Crop Biotech.
Autumn (2014) 7: 15-23.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره هفتم، پاییز ۱۳۹۳ (۲۳-۱۵)

مطالعه تغییرات رونوشت ژن‌های فنیل آلانین آمونیا-لیاز۲ (PAL2) و پروتئین شبه توماتین (TLP) در ژنوتیپ‌های آفتابگردان در پاسخ به جدایه‌های قارچ عامل بیماری ساقه سیاه

آرزو محمدیان فارسانی[۱]، حمید حاتمی ملکی[۲*]، رضا درویش‌زاده[۳] و فرامرز هوشیاردل[٤]

۱، ۳، ٤. به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، دانشیار و دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۱- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۳۰)

Study of Changes in the Phenylalanine Ammonia-lyase 2 (PAL2) and Thaumatin-like Protein (TLP) Genes Transcripts in Sunflower Genotypes in Response to Fungal Isolates Associated with the Black Stem Disease

A. MOHAMMADIAN FARSANI[1], H. HATAMI MALEKI[2]*, R. DARVISHZADEH[3] AND F. HOSHYARDEL[4]

1, 3, 4. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
(Received: Oct. 23, 2014 - Accepted: Dec. 21, 2014)

چکیده

بیماری ساقه سیاه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی آفتابگردان است. استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم به این بیماری یکی از اقتصادی‌ترین روش‌های کنترل آن است. در این مطالعه، میزان رونوشت ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیا- لیاز ۲ (PAL2) و پروتئین شبه توماتین (TLP) در ژنوتیپ‌های AS613 و ENSAT-B5 و ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 آفتابگردان بعد از آلودگی با جدایه‌های MA6، MP8 و MP10 قارچ *Phoma macdonaldii* Boerema عامل بیماری ساقه سیاه آفتابگردان با روش RT-PCR کمی بررسی شد. نتایج نشان داد که سطح رونوشت ژن‌های PAL2 و TLP به طور معنی‌داری تحت تأثیر جدایه، ژنوتیپ و اثر متقابل ژنوتیپ- جدایه می‌باشد. در این مطالعه، میزان رونوشت ژن‌های PAL2 و TLP در برابر جدایه MP8 بیشترین افزایش را نشان داد. در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، میزان رونوشت ژن‌های PAL2 و TLP در ژنوتیپ ENSAT-B5 بیشترین افزایش را نشان داد. ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به ترتیب دارای سطح بالا و پایین از رونوشت ژن‌های PAL2 و TLP بودند.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان روغنی، بیماری ساقه سیاه، فنیل آلانین آمونیا-لیاز۲، پروتئین شبه توماتین، RT-PCR کمی.

Abstract

Black stem disease is one of the most important fungi diseases of sunflower. The use of resistant genotypes is potentially one of the economical ways for its control. In this study, expression level of genes including phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) and thaumatin-like protein (TLP) were measured in sunflower genotypes including ENSAT-B5, AS613 and mutant genotype M5-54-1 infected with MA6, MP8 and MP10 isolates of *Phoma macdonaldii* via quantitative RT-PCR technique. Results revealed that transcript levels of the both PAL2 and TLP genes were significantly affected by isolate and genotype and genotype-isolate interactions. In this study, the expression levels of genes PAL2 and TLP showed higher increase against the MP8 isolate. Among studied genotypes, genotype ENSAT-B5 possessed highest increasing in expression levels of genes PAL2 and TLP. The resistant and susceptible genotypes had possessed high and low transcript levels of PAL2 and TLP and disease symptoms were seen in susceptible genotypes.

Keywords: Sunflower, Black stem disease, Phenylalanine ammonia-lyase2, Thaumatin like protein, Quantitative RT-PCR

* نویسنده مسئول: حمید حاتمی ملکی
E-mail: hatamimaleki@maragheh.ac.ir

مقدمه

آفتابگردان *Helianthus annuus* L. گیاهی از خانواده گل ستاره‌ای (Asteraceae) به عنوان پنجمین منبع عمده تولید روغن خوراکی در دنیا به شمار می‌رود (Hu *et al.,* 2010). ویژگی‌های منحصر به فرد این گیاه از جمله دوره‌ی رشدی کوتاه و سازگاری آن با شرایط مختلف آب و هوایی، آفتابگردان را به گیاهی مناسب جهت کشت در نواحی خشک و کم باران تبدیل کرده است (Rauf, 2008). بهبود تولید آفتابگردان به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات روغنی در دنیا می‌تواند نقطه‌ی امیدی برای جبران کمبود روغن‌های گیاهی مورد نیاز باشد. تنش‌های زنده در کاهش عملکرد آفتابگردان دخیل هستند که از مهم‌ترین آنها بیماری ساقه سیاه آفتابگردان با عامل *Macdonaldii Phoma* می‌باشد که در سراسر جهان گسترش یافته است. کاهش محصول آفتابگردان زمانی که عامل بیماری‌زا موجب پیری زودرس شود بسیار بالا است (Debaeke and Peres, 2003). استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم به این بیماری بدون تردید یکی از اقتصادی‌ترین روش‌های کنترل بیماری به شمار می‌رود با این حال تاکنون ژنوتیپ کاملاً مقاوم در برابر بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان شناخته نشده است هر چند بعضی از لاین‌ها مقاومت بیشتری نسبت به لاین‌های دیگر نشان داده‌اند (Carson *et al.,* 1991). با توسعه روش‌های مولکولی مطالعه خصوصیات و ویژگی ژن‌های گوناگون درگیر در مقاومت به بیماری‌ها و مکانیسم‌های دخیل در مقاومت تسهیل شده است. مطالعه این ژن‌ها باعث شده که نقش آن‌ها و اهمیت آن‌ها در پاسخ به بیماری و کاربرد آن‌ها در گیاهان با استفاده از مهندسی ژنتیک شناخته‌تر شود (Grover and Gowthaman, 2003). از جمله فعال کننده‌های پاسخ دفاعی گیاه میزبان، افزایش بیان ژن‌های مقاومت R می‌باشد که می‌توانند به سبب القا واکنش فوق حساسیت[1] و تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی[2] (PR) و همچنین افزایش تولید سالیسیلیک اسید[3] SA، اتیلن و فیتوالکسین‌ها، از رشد پاتوژن جلوگیری کنند. این پاسخ‌ها مجموعاً منجر به ایجاد یا افزایش سطح مقاومت به قارچ‌های بیماری‌زا می‌گردد. از جمله پروتئین‌هایی که به طور مستقیم علیه عوامل بیماری‌زا سمی هستند و یا باعث کاهش رشد آنها می‌شوند، فیتوالکسین‌ها و PR می‌باشند. فیتوالکسین‌ها متابولیک‌های ثانویه با وزن مولکولی پایین هستند که در طیف وسیعی از گیاهان تولید می‌شوند و ثابت شده که فعالیت ضد میکروبی دارند و از طریق مسیرهای بیوشیمیایی پیچیده مانند مسیر ترکیبات فنلی سنتز می‌شوند (Thomma *et al.,* 1998). فنیل آلانین آمونیا-لیاز ۲[4] (PAL2) آنزیمی کلیدی در متابولیسم فنیل پروپانوئیدها است. این آنزیم از طریق دخالت در مسیرهای ساخت ایزوفلانوییدها و فنیل پروپانوئیدها که فعالیت فیتوالکسینی دارند، تبدیل L-فنیل‌آلانین به ترانس سینامیک اسید را در اولین مرحله متابولیسم فنولیک‌ها انجام می‌دهد. این مرحله یک واکنش بیوشیمیایی کلیدی در نمو و دفاع گیاهان به شمار می‌رود که می‌توانند گیاه را در برابر قارچ، باکتری و نماتد حفاظت کند (Chang *et al.,* 2008). آنزیم PAL2 در محل حمله‌ی عامل بیماری زا، به منظور جلوگیری از گسترش هیف‌های قارچی در ترکیبات لیگنینی دیواره سلولی تجمع می‌یابد و منجر به افزایش تحمل به پاتوژن‌های قارچی می‌شود. افزایش بیان ژن PAL2 در بررسی‌های متعدد، به عنوان ژن دخیل در مقاومت، با اثر مستقیم در افزایش SA، بیان ژن‌های PR و نیز القای سریع مرگ سلولی به اثبات رسیده است (Fitzgerald *et al.,* 2004). نقش تحریکی

1. Hypersensitive response
2. Pathogenesis-related proteins
3. Salicylic acid
4. Phenylalanine ammonia-lyase 2

تیمار با اشعه UV بر فعالیت ژن PAL2 و به دنبال آن افزایش فعالیت آنزیم PAL2 در بافت‌های رویشی برنج، ذرت و شلغم گزارش شده است (Ghaouth *et al.,* 2003). پروتئین شبه توماتین[1] (TLP) با وزن مولکولی ۳۰-۱۵ کیلو دالتون متعلق به خانواده PR-5 است که اعضای این خانواده درجه بالایی از شباهت با پروتئین توماتین از *danielli Thaumatococcus* دارند. این پروتئین‌ها خاص میزبان هستند که به طور طبیعی در گیاهان غیر آلوده در سطح پایین تولید شده ولی بعد از حمله پاتوژن‌ها، حشرات و تحت شرایط تنش‌زا میزان بیان آن‌ها افزایش می‌یابد (Tachi *et al.,* 2009). اولین مدرک فعالیت ضد قارچی مبنی بر وجود TLP در گیاهان با شناسایی زئوماتین در بذر ذرت بدست آمد. در واقع تجمع این پروتئین در گیاه به واسطه فعالیت بتا ۱و ۳ گلوکانازی که دارد باعث هضم دیواره‌ی سلولی قارچ شده و از این طریق از رشد و تکثیر هیف‌های قارچ درون سلول میزبان جلوگیری می‌کند (Liu *et al.,* 2010). گزارش شده که TLP سبب القا نشت سلول قارچی از طریق اختلال و ایجاد سوراخ در غشا پلاسمایی می‌شود و باعث تاخیر در ایجاد علائم بیماری در برابر عوامل بیماری‌زای گوناگون مانند *Botrytis*، *Fusarium*، *Rhizoctonia* و *Sclerotinia* می‌گردد (Punja, 2002).

افزایش بیان ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت و دستکاری‌های مولکولی ژن‌های مقاومت برای افزایش تأثیر آن‌ها در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا استفاده تجاری از مهندسی ژنتیک را در گیاهان فراهم می‌کند. هدف از انجام این پژوهش، مطالعه تغییرات در رونوشت ژن‌های PAL2 و TLP به همراه ژن داخلی EF1alpha در ژنوتیپ‌های AS613 و ENSAT-B5 و M5-54-1 آلوده شده با جدایه‌های MA6، MP8 و MP10 از قارچ *P. macdonaldii* عامل بیماری ساقه سیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه‌های قارچ *Phoma macdonaldii*

در این پژوهش، ۳ ژنوتیپ ENSAT-B5، AS613 و M5-54-1 آفتابگردان مورد استفاده قرار گرفتند. از میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ژنوتیپ M5-54-1 یک ژنوتیپ توسعه یافته با روش بالک تک بذری SSD[2] از نتاج در حال تفرق ژنوتیپ AS613 است که با اشعه γ تیمار شده بود. بذرها قبل از کشت با ماده ضدعفونی کننده‌ی هیپوکلرید سدیم ۶ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند سپس شستشو با آب مقطر انجام شد. بذرهای ضدعفونی شده در جعبه های پلاستیکی با یک بستر پیت ماس کشت شده و به اتاقک رشد با شرایط کنترل شده (۱۴ ساعت طول روز، دمای شبانه ۱۸ و روزانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شدت روشنایی ۲۰۰ $\mu Em^{-2}\ s^{-1}$ که بوسیله لامپ های ۶۰۰ وات تامین می‌شدند و رطوبت ۷۵ الی ۸۰ درصد) منتقل شدند. آزمایش بصورت اسپلیت پلات (جدایه بعنوان کرت اصلی با ۳ سطح و ژنوتیپ بعنوان کرت فرعی با ۳ سطح) با سه تکرار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی اجرا شد. بعد از ۱۰ روز انکوباسیون جدایه‌های قارچ در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، پکنیوسپور قارچ‌ها مشاهده شد. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور جدایه‌ها شامل $۱۰^{۶}$ پکنیوسپور در هر میلی‌لیتر آب به همراه شیره پرتقال ۰/۵ درصد و ژلاتین ۰/۲۵ درصد در روی دمبرگ‌های کتیلدون و هیپوکوتیل گیاهچه‌های آفتابگردان ۴ برگی ریخته شد. در طی ۴۸ ساعت از آلودگی، گیاهچه‌ها با یک پوشش

1. Thaumatin-like protein

2. Single-seed descent

شفاف[1] در شرایط رطوبت نزدیک به اشباع پوشانده شدند که محیط مناسب برای توسعه قارچ است. تیمارهای کنترل در سه تکرار بوسیله ۲۰ میکرولیتر محلول بدون اسپور تلقیح شدند. به منظور کنترل کارایی تلقیح، چندین گیاه تلقیح شده از ژنوتیپ‌های AS613 و ENSAT-B5 و ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 تا ۷ روز بعد از تلقیح رشد داده شدند. در این مدت امکان مشاهده نکروز به صورت واضح در ترکیبات حساس وجود دارد (Roustaee *et al*., 2000).

استخراج RNA و سنتز cDNA

۴۸ ساعت بعد از تلقیح، دمبرگ‌های کوتیلدون از تیمارها ی مختلف جمع‌آوری گردید. RNA کل با روش معرفی شده بوسیله Verwoerd *et al.* (1989) استخراج شد. سپس cDNA با استفاده از روش کیت RT-for-PCR تهیه شد (BD Biosciences). بدین صورت که مخلوط واکنش شامل ۵ میلی گرم از RNA کل و۴۰ پیکو مول الیگو دی تی (dT_{15}) به عنوان آغازگر در ۷۰°C به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد و سپس ۸ میکرولیتر بافر واکنش ۵ برابر، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP، ۱ میکرولیتر (۱ واحد) محدودکننده RNase و ۲ میکرولیتر (۴۰۰ واحد) MMLV ترانس‌کریپتاز معکوس اضافه و واکنش انکوباسیون به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد انجام شد. ۲۰۰ واحد ترانس کریپتاز معکوس MMLV دوباره به واکنش اضافه شد و مخلوط بار دیگر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه (در دستگاه ترموسایکلر) قرار داده شد و به دنبال آن واکنش توقف سنتز با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

واکنش Real-time RT-PCR

با این تکنیک میزان بیان mRNA ژن‌های مورد نظر با روش کمی و با استفاده از رنگ SYBR Green ارزیابی گردیده و میزان تکثیر در چرخه‌ای که بیان ژن‌ها قابل ردیابی بود، تحت عنوان Ct[2] مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت نرمال نمودن داده‌های حاصل از real-time RT-PCR از ژن eEFα1 به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید. سنجش تغییرات در بیان ژن‌ها با استفاده از روش 2^{-DDCT} ارایه شده بوسیله Livak و Schmittgen (۲۰۰۱) انجام گرفت.

$\Delta C_T = (C_T$ ژن هدف $-$ C_Tژن کنترل$)$

$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T$ نمونه آزمایش $-$ ΔC_Tنمونه کنترل$)$

در این مطالعه، از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده توسط برنامه‌ی Primer Express ورژن۲/۰ استفاده شد. توالی آغازگرهای الیگونوکلوتیدی مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. واکنش real-Time RT-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR Green دو برابر (Applied Biosystems)، ۳۰۰ نانومول از هر آغازگر و ۱ میکرولیتر محصول RT (Reverse Transcription) رقیق شده انجام گردید. واکنش‌های PCR در دستگاه ABI PRISM 7900HT (Biosystems Applied) با استفاده از برنامه: ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و در آخر ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام شد. تمام واکنش‌های PCR در ۳ تکرار انجام گرفت. قبل از تجزیه داده‌ها، منحنی ذوب[3] برای هر ژن بدست آمد و با بررسی این منحنی‌ها صحت پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید گردید.

1. Plexiglas

2. Threshold cycle
3. Melting curve

جدول ۱- آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در مطالعه تغییرات رونوشت ژن‌های فنیل آلانین آمونیا-لیاز۲ (PAL2) و پروتئین شبه توماتین (TLP) در ژنوتیپ‌های آفتابگردان در پاسخ به جدایه‌های قارچ عامل بیماری ساقه سیاه

ژن	توالی (′3-′5)	طول (bp)
Phenylalanine ammonia-lyase2 (PAL2)	Forward primer: ACCTTCTCGCCGGTCAAGTA	۲۰
	Reverse primer: ACCCGTTGTATCGGTTTGTGA	۲۱
Thaumatin-like protein	Forward primer: TTAAGCGCGAATTCAGCTAAAGT	۲۳
	Reverse primer: GGAATGCTCGAATGTCAAGGTT	۲۲
eEFα1	Forward primer: CCAAATCAATGAGCCCAAGAG	۲۱
	Reverse primer: CATCCTGAAGTGGGAGACGAA	۲۱

نتایج و بحث

در مطالعات فنوتیپی پاسخ متفاوت ژنوتیپ‌های AS613، ENSAT-B5 و ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 در برابر جدایه‌های قارچی عامل بیماری ساقه‌سیاه مشاهده شده است (Darvishzadeh *et al.*, 2007) بدین صورت که ژنوتیپ AS613 به جدایه‌ی MA6 حساسیت داشته، ولی ژنوتیپ M5-54-1 در برابر جدایه‌ی MA6 مقاومت جزئی نشان داد. از طرف دیگر، ژنوتیپ AS613 به جدایه‌ی MP8 مقاومت جزئی و ژنوتیپ M5-54-1 به جدایه‌ی MP8 حساسیت نشان داد. هر ۲ ژنوتیپ AS613 و M5-54-1 به جدایه‌ی MP10 مقاومت نشان دادند ولی میزان مقاومت جزئی ژنوتیپ M5-54-1 در مقایسه با ژنوتیپ AS613 به جدایه‌ی MP10 بیشتر بود. ژنوتیپ ENSAT-B5 به هر ۳ جدایه‌ی MA6، MP8 و MP10 مقاومت نشان داد. از آنجایی که ژنوتیپ مادری AS613 به جدایه MA6 حساسیت داشته ولی ژنوتیپ جهش یافته آن مقاوم می‌باشد، این تغییر می‌تواند به علت جهش در ژنوم گیاه باشد و با توجه به سودمند بودن این تغییر، به این حالت اصطلاحاً کسب عملکرد[1] گفته می‌شود. از طرفی، این دو ژنوتیپ در پاسخ به جدایه MP8 بصورت معکوس عمل کرده‌اند به طوری که ژنوتیپ مادری ابتدا به جدایه MP8 مقاوم بوده ولی ژنوتیپ جهش یافته حاصل حساس شده است و جهش به واسطه اشعه گاما موجب از دست دادن عملکرد[2] شده است. براساس مطالعات ژنتیکی نیز پاسخ ژنوتیپ‌های AS613، ENSAT-B5 و M5-54-1 آفتابگردان به آلودگی ناشی از جدایه‌های قارچ عامل بیماری ساقه سیاه متفاوت می‌باشد (شکل ۱). تجزیه واریانس نتایج حاصل از بررسی رونوشت ژن‌های PAL2 و TLP در ۳ ژنوتیپ آفتابگردان در پاسخ به ۳ جدایه عامل بیماری ساقه سیاه نشان داد که سطح رونوشت ژن‌های PAL2 و TLP به طور معنی‌داری تحت تأثیر جدایه (MA6، MP8 و MP10)، ژنوتیپ (AS613، ENSAT-B5 و M5-54-1) و اثر متقابل ژنوتیپ-جدایه می‌باشد (جدول ۲).

تفاوت در میزان بیان این دو ژن در جدایه‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت‌های موجود در عملکرد جدایه‌های مختلف قارچ باشد. نتایج نشان داد که نقش ژنوتیپ گیاه میزبان نیز در ایجاد مقاومت جزئی در برابر عوامل بیماری‌زا بسیار مهم است (جدول ۲). بررسی میزان تغییرات در رونوشت دو ژن PAL2 و TLP در ۹ ترکیب حاصل از اثر متقابل سه ژنوتیپ و

1. Gain of function

2. Loss of function

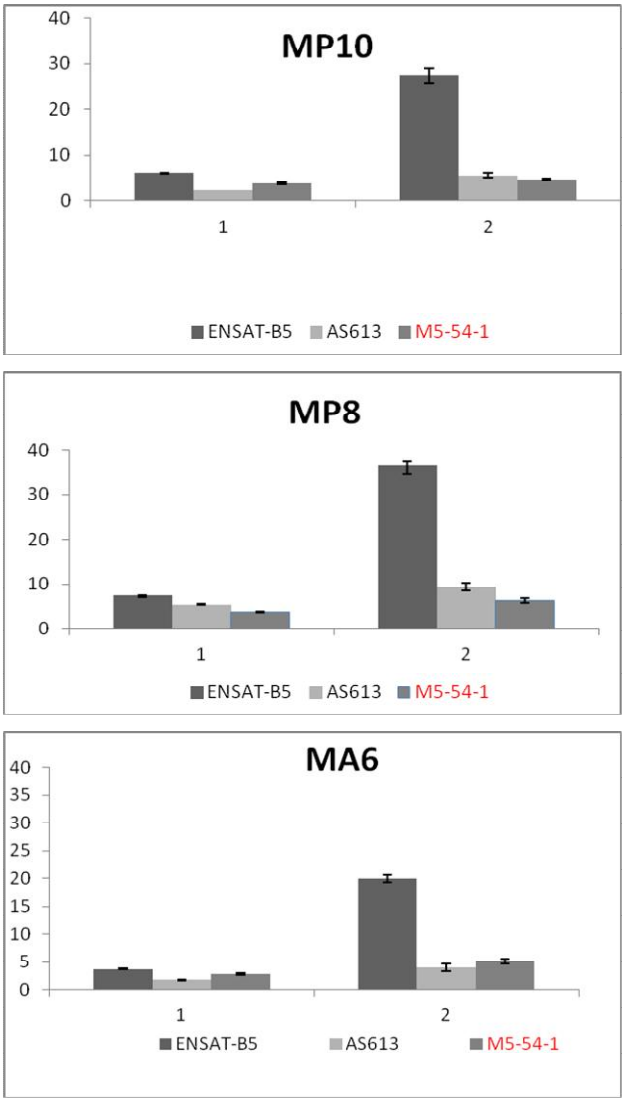
سه جدایه قارچ نشان داد که میزان این تغییرات معنی‌دار بوده و در همه ترکیبات بیان ژن‌ها افزایش یافته است و مقدار افزایش بسته به جدایه و ژنوتیپ متفاوت است. در حقیقت ژنوتیپ‌های مختلف عکس‌العمل فیزیولوژیکی و ژنتیکی یکسانی در برابر پاتوژن‌ها نشان نمی‌دهند. مقدار رونوشت ژن PAL2 و TLP زمانی که سه ژنوتیپ با جدایه MP8 آلوده شده‌اند، نسبت به زمانی که با جدایه‌های دیگر آلوده می‌شدند، بیشترین افزایش را نشان می‌دهد (شکل۱).

جدول ۲- تجزیه آماری بررسی تأثیر جدایه *Phoma macdonaldii* و ژنوتیپ آفتابگردان در تغییرات رونوشت ژن‌های فنیل آلانین آمونیا-لیاز۲ (PAL2) و پروتئین شبه توماتین (TLP)

	تکرار		جدایه		تکرار × جدایه		ژنوتیپ		ژنوتیپ × جدایه		خطا	
	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS
Phenylalanine ammonia-lyase2	2	0.01	2	16.72**	4	0.02	2	17.76**	4	2.87**	12	0.15
Thaumatin-like protein	2	5.99	2	137.61**	4	0.35	2	1473.2**	4	48.12**	12	3.43

*** اختلاف معنی‌داری آماری در سطح ۰/۰۰۱درصد.

در میان سه ژنوتیپ مورد مطالعه، رونوشت دو ژن مورد بررسی در ژنوتیپ ENSAT-B5 بیشترین افزایش را نشان می‌دهد. از آنجایی که ژنوتیپ AS613 به جدایه MA6 حساس بوده ولی دو ژنوتیپ دیگر به آن مقاوم می‌باشند بررسی رونوشت ژن‌ها نشان داد که در دو ژنوتیپ مقاوم به جدایه MA6 (ENSAT-B5 و M5-54-1) میزان بیان دو ژن مورد بررسی در مقایسه با ژنوتیپ حساس بیشتر افزایش پیدا نموده است که نشان‌دهنده تأثیر افزایش مقدار بیان دو ژن در ایجاد مقاومت ژنوتیپ‌ها به جدایه MA6 می‌باشد. نظیر این نتایج در الگوی بیان دو ژن مورد بررسی در ترکیب جدایه MP8 با سه ژنوتیپ نیز مشاهده می‌شود (شکل ۱). با توجه به شکل ۱، در ژنوتیپ جهش یافته حساس به جدایه MP8 میزان رونوشت دو ژن مورد بررسی کمتر افزایش یافته است حال آنکه در دو ژنوتیپ دیگر که مقاوم به جدایه MP8 هستند، بیان بیشتر شده است. بر اساس مطالعات فنوتیپی ژنوتیپ M5-54-1 در مقایسه با ژنوتیپ AS613 به جدایه‌ی MP10 بیشترین میزان مقاومت جزئی را نشان می‌دهد (Darvishzadeh *et al.,* 2007)، هم راستا با نتایج مطالعات فنوتیپی در ژنوتیپ M5-54-1 مقدار بیان ژن PAL2 بیشتر افزایش یافته است. البته در ژنوتیپ مادری AS613، ژن TLP بیشتر بیان گردیده است. این امر نشانگر نقش مهم ژن PAL2 در ایجاد مقاومت ژنوتیپ جهش یافته به جدایه MP10 است. نتایج این پژوهش افزایش معنی‌دار در سطح رونوشت ژن‌های PAL2 و TLP تحت تأثیر اثر متقابل ژنوتیپ-جدایه را نشان می‌دهد که این واکنش اثر متقابل در سطح بیان ژن، برای فهم مکانیسم پاسخ گیاه در برابر بیماری مهم است و نشان می‌دهد که زمینه ژنتیکی و ژنوتیپ جدایه و نیز تعامل آنها، بیان ژن‌ها را در گیاه آفتابگردان تحت تأثیر قرار می‌دهد (جدول ۲). در تحقیقی، ZhanQuan و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی نقش G پروتئین‌ها در زنگ قهوه‌ایی گندم، افزایش فعالیت آنزیم PAL در مراحل اولیه آلودگی و سریعتر از PR را گزارش کردند. همچنین، Mazeyrat و همکاران (۱۹۹۹) افزایش در میزان بیان ژن PAL2 در برابر سفیدک دروغی آفتابگردان ناشی از *Plasmopara halstedii* در آفتابگردان را گزارش نمودند. در مطالعه دیگری، Powell و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت PAL را در مراحل اولیه پس از آلودگی در برابر زنگ زرد گزارش کردند.



شکل ۱- الگوی بیان ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی فنیل‌آلانین آمونیا-لیاز۲ (PAL2) (1) و پروتئین شبه توماتین (2) در ژنوتیپ‌های AS613 و ENSAT-B5 و لاین جهش یافته M5-54-1، تلقیح شده بوسیله سه جدایه *Phoma macdonaldii* (MA6, MP8, MP10) عامل بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان

در مطالعه حاضر، اگرچه بیان ژن TLP پس از آلودگی، با تاخیر نسبت به ژن PAL2 افزایش نشان داد ولی میزان رونوشت آن پس از آلودگی به میزان بیشتری در مقایسه با PAL2، در ژنوتیپ‌های مقاوم مشاهده شد. افزایش بیان ژن TLP پس از آلودگی در برابر جدایه‌ها، از طریق هضم دیواره سلولی قارچ بوده و از این طریق می‌تواند از رشد و تکثیر قارچی جلوگیری کند و به این ترتیب باعث افزایش مقاومت در ژنوتیپ‌های مقاوم شود. در پژوهش‌های انجام شده توسط Coca و همکاران (۲۰۰۰) نقش مهم TLP در ایجاد مقاومت علیه بیماری‌های گیاهی اثبات شده است (Coca *et al.*, 2000). تولید TLP در گیاهان مختلف در پاسخ به آلودگی‌های میکروبی به میزان زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است و مشخص شده که پروتئین تولیدی توسط این ژن از رشد قارچ‌های بیماری‌زا از قبیل *Rizoctonia solani*، *Altenaria alternate* و *Fusarium graminearum* جلوگیری می‌کند (Saaedi,

1385). در بررسی انجام شده توسط Habibi و همکاران (۲۰۱۳)، بیان ژن TLP در لاین مقاوم گندم در برابر قارچ *Mycosphaerella graminicola*، ۷۲ ساعت پس از آلودگی به بیشترین سطح خود رسید که بیانگر نقش مثبت این ژن در مقاومت است. در مطالعه انجام شده توسط Darvishzadeh و همکاران (۲۰۰۷) که شامل بررسی بیان ژن‌های PAL2 و TLP در آفتابگردان آلوده شده با جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق بود نیز میزان بیان ژن‌های PAL2 و TLP، افزایش معنی‌داری نشان داد که با نتایج این بررسی مطابقت دارند. با توجه به اینکه در این مطالعه، بر خلاف مطالعه قبلی (Darvishzadeh *et al.,* 2007) از ژن کنترل داخلی EF1alpha استفاده گردید بنابراین می‌توان بیان پایدار ژن‌های PAL2 و TLP را تایید نمود. وجود الگوی تظاهر مشابه برای ژن‌های PAL2 و TLP در این تحقیق و مطالعه قبلی (Darvishzadeh *et al.,* 2007)، بیانگر این است که هر دو ژن کنترل داخلی eEFα1 و Actin، ژن‌های مناسبی برای مطالعه بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان می‌باشند. در مطالعه‌ای که توسط Gimeno و همکاران (۲۰۱۴) به منظور انتخاب ژن کنترل داخلی مناسب از بین ۱۱ ژن کنترل داخلی برای بررسی بیان ژن در ارزن انجام شد، ژن‌های eEFα1، elF4-a، CYP5 و U2AF به عنوان ژن‌های کاندید مناسب معرفی شدند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد در ژنوتیپ‌هایی حساس به جدایه های مورد مطالعه، میزان رونوشت ژن‌های PAL2 و TLP کاهش داشته و علائم بیماری بیشتر مشاهده می شود در حالی که در ژنوتیپ‌هایی که میزان رونوشت این ژن‌ها افزایش داشته، مقاومت جزئی در برابر قارچ فوما ایجاد می گردد. بنابراین تولید گیاهان تراریخته دارای میزان بالایی از این ژن‌ها، می‌تواند راهبردی مناسب جهت ایجاد مقاومت به بیماری ساقه سیاه آفتابگردان باشد.

REFERENCES

Carson ML (1991) Relationship between Phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. Plant Dis. 75: 1150–1153.

Chang A, Lim MH, Lee SW, Robb EJ, Nazar RN (2008) Tomato PAL gene family: highly redundant but strongly underutilized. J. Biol. Chem. 283: 33591-33601.

Coca MA, Damsz B, Yun DJ, Hasegawa PM, Bressan RA, Narasimhan ML (2000) Heterotrimeric G-proteins of a filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. Plant J. 22: 61–69.

Darvishzadeh R, Hewezi T, Gentzbittel L, Sarrafi A (2007) Differential expression of defense-related genes between compatible and partially compatible sunflower – Phoma macdonaldii interactions. Crop Prot. 27: 740-746.

Debaeke P, Peres A (2003) Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on Phoma black stem (Phoma macdonaldii Boerema). Crop Prot. 22: 741–752.

Donofrio, NM, Delaney TP (2001) Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to Peronospora parasitica in defense-compromised Arabidopsis nim 1–1 and salicylate hydroxylase-expressing plants. Mol. Plant–Microbe Interact. 14: 439–450.

El Ghaouth A, Wilson CL, Callahan A (2003) Induction of chitinase, beta- 1, 3 glucanase and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. Phytopathology 9: 349-355.

Fitzgerald HA, Chern MS, Navarre R, Ronald PC (2004) Overexpression of (At) NPR1 in rice leads to a BTH-and environment-induced lesion-mimic /cell death phenotype. Mol. Plant–

Microbe Interact. 17(2): 140-151.

Gimeno J, Eattock N, Deynze AV, Blumwald E (2014) Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in Switchgrass (*Panicum virgatum*) using quantitative Real-Time RT-PCR. PLoS ONE 9: e91474.

Grover A, Gowthaman R (2003) Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. Curr. Sci. 84:330–340.

Habibi M, Mirakhorli N, Shiran B, Mardi M (2013) Study of resistance related gene expression pattern to *Septoria tritici* Blotch (STB) in wheat (*Triticum aestivum*). Modern Genet. 2: 149-158. (In Farsi).

Hu J, Seiler G, Kole C (2010) Genetics, genomics and breeding of sunflower. Routledge, USA. Pp: 342.

Liu JJ, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM (2010) The super family of thaumatin-like protein its origin, evolution and expression toward biological function. Plant Cell Rep. 29: 419-436.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DDCT method. Methods 25: 402–408.

Mazeyrat F, Mouzeyar S, Courbou I, Badaoui S, Roeckel-Drevet P, Tourvieille de Labrouhe D, Ledoigt G (1999) Accumulation of defense related transcripts in sunflower hypocotyls (*Helianthus annuus* L.) infected with Plasmopara halstedii. Eur. J. Plant Pathol.105: 333–340.

Powell NM (2010) Phenotypic and genetic analysis of yellow rust resistance in the UK winter wheat cultivar Claire. Research final Report. Research, Education and Extension organization. Ph.D thesis. University of East Anglia, Norwich.

Punja KZ (2002) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. Can. J. Plant Pathol. 23: 216-235.

Rauf S (2008) Breeding sunflower (*Helianthus annuus* L.) for drought tolerance. Commun. Biometry Crop Sci. 3: 29-44.

Roustaee A, Costes D, Dechamp-Guillaume G, Barrault G (2000b) Phenotypic variability of Leptosphaeria lindquistii (*Phoma macdonaldii*) a fungal pathogen of sunflower. Plant Pathol. 49: 227–234.

Tachi H, Fukuda-Yamada K, Kojima T, Shiraiwa M, Takahara H (2009) Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. Plant Physiol. Biochem. 47: 73-79.

Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:15107–11.

Verwoerd TC, Dekker MM, Hockema A (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. Nucleic Acids Res.17: 2362.

Zhan Quan Z, Shui Shan S, Ying Chun Z, Wen Xiang Y, Da Qun L (2009) Involvement of the heterotimeric G protein in the defense responses of wheat to *Puccinia triticina*. Sci. Agric. Sinica 42(1):117-123.