

## Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by *Mycosphaerella graminicola*

Jalal Gholamnezhad <sup>1\*</sup>, Forough Sanjarian <sup>2</sup>, Ebrahim Mohammadi Goltapeh <sup>3</sup>, Naser Safaei <sup>3</sup> and Khadijeh Razavi <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran

<sup>2</sup> Agriculture Biotechnology Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Plant Pathology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

### Abstract

The aim of this study was to examine the effect of salicylic acid on the gene expression pattern of four enzymes; Phenylalanine ammonialyase, Polyphenol oxidase, Peroxidase and Catalase in wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. For this reason, Salicylic Acid (2mm) were sprayed on wheat in two-leaf stage before inoculation with the fungal pathogen. Sampling of the plants was done at five time points (0, 3, 6, 12 and 24 h) after inoculation. The scanning of genes expression pattern of encoding enzymes were carried out by reverse northern dot blotting method. The results showed that within 24 hours post inoculation the gene expression of these enzymes significantly increased in this tolerant cultivar. SA enhanced the expression of Phenylalanine ammonialyase and Peroxidase genes in all time points. The expression of Polyphenol oxidase was increased by SA after 12h. On the other hand, increasing the expression level of these genes directly increases the activity of the enzymes which indicates direct role of these gens in plant defense system. SA caused a rapid rise in expression of Catalase gene, but this effect was not continued for 24h.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Gene expression pattern, *Mycosphaerella graminicola*, Salicylic Acid

\* Corresponding Author: jalal.gholamnejad@modares.ac.ir

## بررسی تغییرات بیان ژن‌های دفاعی گیاه گندم در پاسخ به آلودگی به *Mycosphaerella graminicola*

جلال غلام‌نژاد<sup>۱\*</sup>، فروغ سنجریان<sup>۲</sup>، ابراهیم محمدی گل‌تپه<sup>۳</sup>، ناصر صفایی<sup>۳</sup> و خدیجه رضوی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه محیط‌زیست، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

<sup>۲</sup> پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

<sup>۳</sup> بخش بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید بر میزان بیان ژن‌های رمزکننده چهار آنزیم فینیل آلانین آمونیاپاز، پلی‌فنل اکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز در گیاه گندم (رقم متحمل زاگرس) در برهم کشش با قارچ بیماری‌زای *Mycosphaerella graminicola* بود. به این منظور، گیاه گندم در مرحله دو برگگی با سالیسیلیک اسید (SA) تلقیح و سپس با قارچ عامل بیماری مایه‌زنی شد. نمونه‌برداری از این گیاهان در پنج نقطه زمانی (۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) پس از مایه‌زنی قارچ بیماری‌زا انجام شد. سپس میزان بیان ژن‌های رمزکننده این آنزیم‌ها با روش نوردن بلات معکوس بررسی شد. مقدار بیان ژن رمزکننده هر چهار آنزیم، بر اثر مایه‌زنی با قارچ بیماری‌زا و سالیسیلیک اسید، از نخستین نقطه زمانی پس از مایه‌زنی در این رقم از گندم افزایش و تفاوت معنی‌دار داشت. تأثیر سالیسیک اسید بر افزایش بیان ژن آنزیم‌های فینیل آلانین آمونیاپاز و پراکسیداز در همه نقاط زمانی مثبت بود. افزایش سالیسیلیک اسید پس از ۱۲ ساعت بر بیان ژن آنزیم پلی‌فنل اکسیداز مؤثر بود. سالیسیلیک اسید روند جهشی بیان ژن کاتالاز را ۱۲ ساعت پس از آلودگی با قارچ باعث شد؛ اما این تأثیر تا ساعت ۲۴ تداوم نداشت. بر اساس نتایج این پژوهش برای اینکه گیاه بتواند در برابر تهاجم عوامل بیماری‌زا مصون بماند باید بیان ژن‌های دفاعی در ساعات ابتدایی پس از تلقیح قارچ بیماری‌زا افزایش پیدا کند. از سویی افزایش بیان این ژن‌ها با افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های متناظر ارتباط مستقیم دارد که نشان‌دهنده نقش مستقیم ژن‌های دفاعی در فعالیت‌های سیستم دفاعی گیاه است. در پژوهش حاضر، از رقم مقاوم زاگرس استفاده شد، لذا افزایش زود هنگام بیان ژن‌ها، پدیده‌ای قابل توجه در سازوکار مقاومت گیاه در برابر عامل بیماری‌زا به نظر می‌رسد.

**واژه‌های کلیدی:** سالیسیلیک اسید، الگوی بیان ژن، آنزیم‌های اکسیداتیو، گندم، *Mycosphaerella graminicola*

## مقدمه

گندم غذای اصلی حدود ۳۵٪ جمعیت جهان را تشکیل داده است و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۲۰، تقاضای جهانی برای این محصول بین ۸۴۰ تا ۱۰۵۰ میلیون تن باشد. برای رسیدن به این سطح تقاضا، تولید این محصول باید سالانه ۱/۶ تا ۲/۶٪ افزایش پیدا کند (Chartrain et al., 2004). گیاه گندم در مدت کشت تا برداشت، در معرض تنش‌های محیطی زنده و غیرزندهٔ مختلفی مانند بیماری‌ها و خشکی قرار می‌گیرد که رشد گیاه را محدود می‌کند. در گندم نیز مانند سایر گیاهان، سازوکارهای مختلفی برای سازش با این تغییرات و حفظ بقای گیاه تکامل یافته است که از آن جمله می‌توان به سازوکارهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و تغییرات مولکولی اشاره کرد (Kia and Torabi, 2008).

بیماری سوختگی برگ گندم (سپتوریوز برگ) از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در جهان است که سالیانه خسارات فراوانی را به محصول گندم وارد می‌کند (Goodwin et al., 2003). عامل این بیماری قارچ بیماری‌زای *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J.Schröt.in Cohen با شکل غیرجنسی *Zymoseptoria tritici* است (Quaedvlieg et al., 2011). گزارش‌هایی مبنی بر بروز اپیدمی‌های بیماری در بعضی از استان‌ها از جمله گلستان، خوزستان و فارس وجود دارد. میزان کاهش محصول ناشی از خسارت این بیماری بر تعدادی از ارقام متداول، در استان‌های خوزستان و گلستان تا حدود ۴۴٪ برآورد شده است (Kia and Torabi, 2008). کنترل این بیماری با قارچ‌کش، به کار بردن ارقام مقاوم و همچنین با روش‌های زراعی (تناوب زارعی و از بین بردن بقایای گیاهان آلوده) است (Adhikari et al.,

2007). تلاش‌هایی نیز برای کنترل زیستی این قارچ انجام گرفته است که هنوز به نتایج کاربردی در مزرعه منجر نشده است (Zamani et al., 2016; Lynch et al., 2012; Gholamnezhad et al., 2016). با توجه به ناکارآمدی روش‌های زراعی در مهار موثر بیماری، مقاومت جدایه‌های قارچ به سموم سیستمیک، هزینه‌ها و آلودگی ناشی از مصرف سموم شیمیایی؛ استفاده از ارقام مقاوم، اقتصادی‌ترین، بهترین و از نظر زیست‌محیطی، سالم‌ترین روش مقابله با این بیماری است (Berraies et al., 2013).

تأثیر قوی رقم گندم بر بیان ژن‌های بیماری‌زایی *M. graminicola* با مطالعات نسل جدید توالی‌یابی (next generation sequencing) مشخص شده است (McDonald et al., 2016). تفاوت اصلی گیاه حساس و مقاوم، شناسایی به موقع بیماری‌زای مهاجم و فعال‌سازی سریع و موثر سازوکارهای دفاعی گیاه مقاوم است. ژن‌های فراوانی در پاسخ گیاه به بیماری‌زا، فعال یا خاموش می‌شوند. همچنین ممکن است بیان آن‌ها افزایش یا کاهش یابد. بررسی بیان متمایز ژن‌ها یکی از روش‌های مهم برای مشخص کردن اساس زیستی سیستم‌های بیولوژیک است (Wang et al., 2009).

دانش ژنتیک مقاومت، برای اصلاح گندم مقاوم به بیماری لکهٔ برگ گندم اهمیت زیادی دارد. مقاومت ژنتیکی در ارقام مختلف به دو شکل کمی و کیفی گزارش شده است (Vakili Bastam et al., 2010). تحقیقات در این زمینه نشان می‌دهد که مقاومت در برابر این بیماری با ژن‌های بارز کنترل می‌شود (Boukef et al., 2012). وجود تخصص‌یافتگی فیزیولوژیک در بیماری‌زای *M. graminicola* و رابطهٔ ژن برای ژن در این

گیاه بیمار می‌شود (Ray et al., 2003; Adhikari et al., 2007). نوردرن بلات معکوس، یکی از روش‌هایی است که اطلاعات توالی (ژنومیکس ساختاری) را به ژنومیکس عملکردی (تعیین عملکرد و نوع فعالیت) ربط می‌دهد (Rabbani et al., 2003). هدف اصلی از این مطالعه نشان دادن افزایش بیان ژن‌های دفاعی در رقمی نسبتاً مقاوم است که متعاقباً افزایش سیستم‌های دفاعی گیاه را باعث می‌شود. در این مطالعه تأثیر غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید (عامل القای سیستم دفاعی) بر میزان بیان ژن‌های رمزکننده چهار آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، پلی فنل اکسیداز (PPO)، پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) در رقم متحمل زاگرس از گیاه گندم در برهم کنش با قارچ بیماری‌زا بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

**کشت گیاهان و ایجاد تنش بیماری‌زا:** در تحقیق حاضر، رقم گندم زاگرس استفاده شد. اصلاحی و همکاران این رقم را متحمل به قارچ بیماری‌زا *M. graminicola* تشخیص دادند (Eslahi et al., 2013). بذرها پس از استریل شدن با الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و دو بار شستشو با آب مقطر استریل، در عمق ۱ سانتی متری خاک گلدان (محتوی پرلیت، خاک سترون و خاک برگ با نسبت ۱:۱:۱) کشت شدند. در هر گلدان سه بذر کاشته شد و گلدان‌ها در شرایط ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجه سانتیگراد روز و ۱۸ درجه سانتیگراد شب نگهداری شدند. گیاهچه‌ها در مرحله دوبرگی (۱۲ روزه گی) با سوسپانسیون جدایه قارچ بیماری‌زا به روش Chartrain و همکاران (۲۰۰۴) تلقیح شدند. هم‌زمان، این گیاهان با سالیسیلیک اسید در غلظت‌های (۰ و ۲ میلی مولار) محلول‌پاشی شدند.

پاتوسیستم، سال‌ها پیش به اثبات رسید و تعداد ۱۸ ژن مقاومت (*Stb1-Stb18*) به بیماری سپتوریای برگگی در ژنوتیپ‌های مختلف گندم مکان‌یابی شد (Arraiano et al., 2007).

برادینگ و همکاران در سال ۲۰۰۲ با بررسی مقاومت ویژه چند رقم گندم حساس و مقاوم و ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت آن‌ها در مقابل جدایه‌های عامل بیماری لکه برگگی سپتوریایی، بر رابطه ژن برای ژن بین مقاومت اختصاصی گندم و بیماری‌زایی *M. graminicola* تأکید کردند. مقاومت به این بیماری ممکن است کمی یا اختصاصی باشد. مقاومت اختصاصی، تقریباً کامل و الیگوژنیک است و از رابطه ژن برای ژن تبعیت می‌کند (Brading et al., 2002).

سالیسیلیک اسید (SA) تنظیم‌کننده طبیعی رشد گیاه است. علاوه بر این، گیاهان مقدار داخلی این ماده را در برابر بیماری‌زای‌های مختلف افزایش می‌دهند. استفاده از SA خارجی برای القای مقاومت به بیماری‌زای‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی در گیاهان بسیاری آزموده شده و تأثیر مثبت داشته است (Hayat et al., 2010).

در این مطالعه، بیان ژن‌های دفاعی که نقش مهمی در فرایند پاسخ به تنش در گیاه و به خصوص در متحمل بازی می‌کنند، در پاتوسیستم گندم - *M. graminicola* با روش نوردرن بلات معکوس مورد بررسی قرار گرفته است. بازه زمانی برداشت نمونه تا ۲۴ ساعت اولیه پس از آلودگی بود تا گیاه با پاسخ سریع به عامل بیماری‌زا از ایجاد بیماری جلوگیری کند که این پاسخ سریع با افزایش بیان ژن‌های مختلف از جمله ژن‌های دفاعی انجام می‌شود. اگر گیاه نتواند واکنش سریع نشان دهد، عامل بیماری‌زا با گذشت زمان غلبه می‌کند؛ در نتیجه

(کنترل داخلی) نیز از ژن آلفا توبولین استفاده شد.

### استخراج RNA و ساخت cDNA: استخراج RNA

از بافت اندام‌های هوایی گندم با کیت RNXplus (سیناژن، ایران) مطابق دستورالعمل انجام شد. برای ساخت cDNA حدود ۵ میکروگرم از RNA استخراجی با مقدار ۰/۵ میکرولیتر آغازگرهای Oligo dT مخلوط شد و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و سپس روی یخ، سرد شد. واکنش رونویسی معکوس در حضور Thermo Scientific RiboLock RNase و Reverse Transcriptase (Thermo Scientific، آمریکا) و dNTP به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در مرحله پایانی برای غیرفعال کردن آنزیم واکنش، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. با الگوی cDNA و آغازگرهای اختصاصی، هر ژن با واکنش PCR تکثیر شد. مقدار هر ژن از مقایسه میزان روشنایی باند محصول PCR روی ژل آگارز با میزان روشنایی باند متناظر نشانگر DNA در رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و کمی کردن آن با نرم‌افزار (Totalab) Totalab، انگلیس) مشخص شد.

غلظت‌ها براساس مطالعه انجام شده قبلی نگارندگان در گلخانه با همین رقم و عامل بیماری، انتخاب شد (Gholamnezhad et al., 2012). گیاهان شاهد تنها با آب مقطر استریل تلقیح شدند. برای بررسی پاسخ‌های اولیه و سریع گیاه، در زمان‌های ۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ بیماری‌زا، نمونه‌برداری از برگ‌های گیاه گندم انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله در محل نمونه‌برداری به ظرف نیتروژن مایع منتقل و سپس در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد آزمایشگاه ذخیره شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و شامل دو سطح بیماری‌زا، دو سطح سالیسیلیک اسید و پنج سطح زمانی (مجموعاً ۲۰ تیمار) بود.

### انتخاب ژن‌ها و طراحی آغازگر: در پژوهش

حاضر، بیان ژن چهار آنزیم آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل اکسیداز با شماره شناسایی AY515506، فنیل آلانین آمونیلایز با شماره شناسایی AEX59143، پراکسیداز با شماره شناسایی CAA39486 و کاتالاز با شماره شناسایی CAA64077، ارزیابی شد. توالی این ژن‌ها از بانک اطلاعاتی ژنوم (NCBI) به دست آمد و آغازگرهای اختصاصی طراحی شد (جدول ۱). برای ژن خانه‌دار

جدول ۱- نام ژن‌ها و توالی آغازگرهای استفاده شده در نوردن بلات معکوس

نام ژن	نام مخفف	توالی آغازگر (۳-۵)	طول توالی	دمای ذوب درجه سانتیگراد
کاتالاز	CAT	F: AGGCTCACCTGGTTAAGTTC R: CAGTGGGATGATGTCCTCTG	۲۷۱	۶۰
پراکسیداز	POX	F: AATCAGACCGTCTCCTGCG R: GGTGGTGTCTGTTGTTGAAC	۲۴۸	۶۰
فنیل آلانین آمونیلایز	PAL	F: TTCTGTCCGTCCTTGCTGAG R: CAATGGGGGTGCCCTTGGAAG	۲۸۴	۶۲
پلی‌فنل اکسیداز	PPO	F: AACGACCAGCTCTCCAACAT R: AACAGGGATGTGTAGGTCAG	۲۵۰	۶۰
آلفا - توبولین	$\alpha$ -Tub	F: GCTTTCAACACCTTCTTCAG R: GGGGCATAGGAGGAAAGCA		۵۶

**ساخت پروب نشان‌دار: در بررسی الگوی بیان**

ژن‌ها، از RNA استخراجی از گیاهان تیمار شده برای تهیه نشانگر (Probe) استفاده شد. مراحل تهیه پروب یا نشانگر نشاندار، مانند تهیه cDNA معمولی بود با این تفاوت که به جای استفاده از dNTP معمولی از DIG labeled dNTP (Roche Life Science, آلمان) استفاده شد.

**نوردن بلات معکوس و بررسی بیان ژن‌ها: پس**

از بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR، ۰/۵ تا ۱ میکروگرم از محصول PCR هر ژن روی غشا لکه‌گذاری شد. محصول PCR ژن‌های انتخابی با محلول NaOH ۱ میلی‌مولار و محلول NaCl ۰/۲۵ مولار واسرشت شدند و در دستگاه بلاتر ۹۶ چاهکی روی غشا لکه‌گذاری شدند. پس از خشک شدن غشا در دمای اتاق، لکه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد تثبیت شدند. از cDNA ژن آلفا-توبولین گندم برای کنترل داخلی و از آب مقطر و محلول واکنش PCR بدون الگو برای کنترل منفی استفاده شد. برای واسرشت کردن، نشانگرهای تهیه شده (cDNA نشاندار شده با DIG) به مدت ۵ دقیقه در آب‌جوش و به دنبال آن ۵ دقیقه دیگر روی یخ قرار داده شدند. پیش‌دوره‌سازی غشا با ۵۰ میلی‌لیتر از محلول پیش‌هیبریداسیون با pH=۷/۲ (۳۵ میلی‌لیتر SDS ۰/۷٪، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۱ میلی‌مولار و ۱۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲۵ مولار) در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ ساعت داخل دستگاه هیبریداسیون انجام شد. پس از تخلیه محلول پیش‌دوره‌سازی، ۵۰ میکرولیتر نشانگر واسرشته به ۵ میلی‌لیتر محلول پیش‌هیبریداسیون اضافه شد و دوره‌سازی به مدت یک

شب در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و داخل دستگاه هیبریداسیون انجام شد. پس از تخلیه مخلوط نشانگر و محلول دوره‌سازی در لوله استریل و نگهداری آن در ۲۰- درجه سانتیگراد، غشا سه مرتبه شستشو داده شد. شستشوی اول با محلول ۲X SSC حاوی ۰/۱٪ SDS دو مرتبه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. شستشوی دوم غشا با محلول ۰/۵X SSC حاوی ۰/۱٪ SDS از یک بار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انجام شد و در شستشوی آخر، غشا با محلول ۰/۲X SSC بدون SDS به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق شستشو شد. در مرحله آخر، ۱۰ میکرولیتر گهرمایه CDS-Star (Roche Life Science, آلمان) به غشای قرار گرفته در پاکت سلوفونی اضافه شد. سپس غشا در تاریک‌خانه در معرض فیلم رادیولوژی (X-ray) گذاشته شد و فیلم پس از ۳۰ دقیقه ظاهر شد. امتیازدهی به لکه‌ها با نرم‌افزار TotalLab، که میزان تیرگی لکه‌ها را براساس تعداد نقاط تیره موجود در محدوده لکه مد نظر مشخص می‌کند، انجام شد. پس از آنکه همه لکه‌ها با نرم‌افزار، براساس لکه آلفا-توبولین، استاندارد شدند، داده‌های حاصل از نرم‌افزار TotalLab وارد نرم‌افزار Excel شدند و با نرم‌افزار SAS ver.9 تجزیه و تحلیل شدند. میانگین مربوط به بیان هر ژن در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (دو تکرار زیستی و دو تکرار روشی) تجزیه واریانس شد. پس از تجزیه واریانس برای هر ژن، مقایسه میانگین‌های مربوط به هر ژن با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۱٪ انجام شد.

## نتایج

بررسی شده، در دوره ۲۴ ساعت نمونه‌برداری افزایش پیدا کرد. خلاصه تجزیه واریانس برای تغییرات بیان ژن‌های بررسی شده در حالت تیمار با قارچ بیماری‌زا و سالیسیلیک اسید در جدول (۲) آمده است.

براساس اطلاعات به دست آمده از غشاها (برای مثال شکل (۱)، مربوط به آنزیم پلی‌فنل اکسیداز) در پاتوسیستم گیاهی مطالعه شده، بیان ژن آنزیم‌های

جدول ۲- خلاصه تجزیه واریانس میزان تغییرات بیان ژن‌های بررسی شده در گیر در برهم کنش گندم، و قارچ بیماری‌زای *M. graminicola*، در تیمارهای مختلف سالیسیلیک اسید. SA: سالیسیلیک اسید P: بیماری‌زا

PPO	PAL	POX	CAT	منابع تغییرات
میانگین مربعات				
۶۳۱/۴**	۱۶۸۱**	۱۷/۱۱**	۴۱۳۵/۹	تیمار
۱/۰۳	۱/۷۱	۱/۴۶	۲/۲۷	خطا
۳/۳۶	۴/۵۸	۲/۹۴	۲/۰۹	ضریب تغییرات (C.V)

ساعات نمونه‌برداری بعد از تلقیح قارچ بیماری‌زا	گیاهان شاهد		گیاهان تلقیح شده با قارچ بیماری‌زا		گیاه تیمار شده با دومیلی مولار سالیسیلیک اسید		گیاه تیمار شده با دومیلی مولار سالیسیلیک اسید و تلقیح شده با قارچ بیماری‌زا	
۰								
۳								
۶								
۱۲								
۲۴								

شکل ۱- تصویر درشت آرایه از پروفایل بیانی ژن PPO در تنش با قارچ و سالیسیلیک اسید. تیرگی لکه‌ها نشان‌دهنده مقدار cDNA نشان‌دار متصل شده به DNA ژن PPO تثبیت شده در کاغذ نیترو سلولز (مقدار بیان ژن) است. برای آنالیزهای نهایی، تیرگی لکه‌ها براساس لکه آلفا - توبولین با نرم‌افزار، استاندارد شدند.

نشان داد. با اینکه افزایش بیان در هر دو تیمار، روندی مشابه داشت، مایه‌زنی هم‌زمان سالیسیلیک اسید و قارچ بیشتر از تلقیح با قارچ تنها، بر بیان این ژن تاثیر داشت

بیان ژن رمزکننده آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در طول ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ و تیمار هم‌زمان قارچ و سالیسیلیک اسید (2SA+P) افزایش

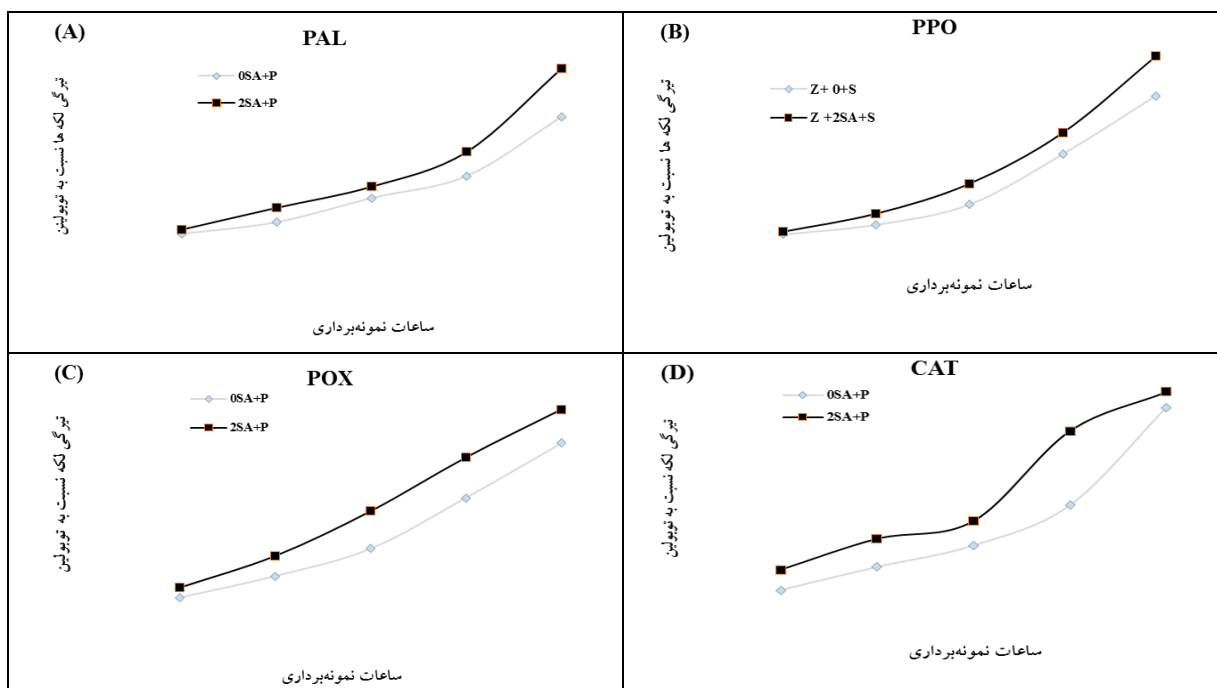
سالیسیلیک اسید همراه با قارچ بیماری‌زا و همچنین قارچ بیماری‌زا به تنهایی مشابه بود و تا ۲۴ ساعت پس از نمونه برداری ادامه داشت. همچنین افزایش بیان ژن در تیمار با قارچ بیماری‌زا کمتر از تیمار هم‌زمان سالیسیلیک اسید و قارچ بود (شکل ۲- C).

بیان ژن رمزکننده آنزیم کاتالاز در مدت ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ و آب مقطر و نیز تیمار هم‌زمان قارچ و سالیسیلیک اسید (2SA+P) افزایش نشان داد (شکل ۲- D). در تیمار هم‌زمان SA و بیماری‌زای قارچی در ساعت ۱۲، روند جهشی افزایش دیده شد که در تیمار قارچ بدون سالیسیلیک اسید مشاهده نشد. پس از آن در ساعت ۲۴، تیمار با قارچ افزایش سریع داشت؛ اما تیمار هم‌زمان سالیسیلیک اسید و قارچ، این افزایش را نشان نداد (شکل ۲- D).

که نشان‌دهنده بیان بیشتر آن در حضور سالیسیلیک اسید و قارچ بیماری‌زا در رقم مقاوم است (شکل ۲- A).

بیان ژن رمزکننده پلی فنل اکسیداز (PPO) در طول ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ و تیمار هم‌زمان قارچ و سالیسیلیک اسید افزایش یافت. با اینکه افزایش بیان در هر دو تیمار از شش ساعت پس از تلقیح، با روند جهشی همراه شد و تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح ادامه یافت. در همه ساعات نمونه برداری بجز نقطه زمانی ۲۴، بیان ژن رمزکننده این آنزیم در تیمار با قارچ، اختلاف معنی‌داری با تیمار هم‌زمان قارچ و سالیسیلیک اسید نشان نداد (شکل ۲- B).

بیان ژن رمزکننده آنزیم پراکسیداز در مدت ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ و آب مقطر و نیز تیمار هم‌زمان قارچ و سالیسیلیک اسید (2SA+P) افزایش یافت. روند افزایش بیان این ژن در هر دو تیمار



شکل ۲- تاثیر سالیسیلیک اسید و قارچ بیماری‌زا بر بیان ژن آنزیم‌های (A) فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)، (B) پراکسیداز (POX)، (C) پلی فنل اکسیداز (PPO) و (D) کاتالاز (CAT) در گندم. SA: سالیسیلیک اسید، P: بیماری‌زا. مقادیر میانگین چهار تکرار و بر اساس آزمون چندمتغیره دانکن در سطح  $(P \leq 0.01)$  معنی دار هستند.



## بحث

نتایج آزمایش مربوط به بیان ژن رمزکننده آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در گیاه گندم که با سالیسیلیک اسید تیمار شده بود، نشان داد که ۲۴ ساعت پس از تلقیح قارچ بیماری‌زا، بیان این ژن در هر دو تیمار افزایش داشت و سالیسیلیک اسید هم تأثیر معنی‌داری در افزایش بیان ژن این آنزیم داشت. با توجه به شکل (۱)، در گیاهان تیمار شده با قارچ و سالیسیلیک اسید، افزایش بیان این ژن مشاهده می‌شود و شیب این افزایش از ساعت ۱۲ تا ۲۴ بیشتر شده است. ترکیبات فنیل پروپانوئیدی از سینامیک اسید مشتق می‌شوند و خود سینامیک اسید از آمینو اسید فنیل آلانین تشکیل شده است (Huang et al., 2010). آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)، واکنش تبدیل فنیل آلانین را به ترانس سینامیک اسید کاتالیز می‌کند. این مرحله، نخستین قدم در مسیر فنیل پروپانوئید است و گلوگاه تنظیمی مهم بین متابولیسم اولیه و ثانویه به شمار می‌رود (Vogt, 2010; Huang et al., 2010). ترانس سینامیک اسید، پیش‌ماده طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های فنلی و دیگر ترکیبات است. فعالیت آنزیم PAL با عوامل زنده و غیرزنده مختلف القا می‌شود که در نتیجه تجمع ترکیبات فنلی مانند اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها را موجب می‌شود. آنزیم PAL با تنظیم متابولیسم ترکیبات مختلف فنلی مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌ها را سبب می‌شود (Wen et al., 2005). در آلودگی گندم با قارچ *Fusarium graminearum* افزایش بیان ژن PAL در رقم حساس فلات، ۳ برابر گزارش شده است که تیمار هم‌زمان سالیسیلیک اسید، این افزایش را به ۷ برابر نسبت به گیاه شاهد

تلقیح شده با آب مقطر رساند. افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز به دنبال افزایش بیان ژن آن مشاهده شد. در پژوهش حاضر، افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL در وارپته متحمل، پس از آلودگی با قارچ، مشاهده شد و تیمار سالیسیلیک اسید آن را تشدید کرد (Sorahinobar et al., 2015). افزایش بیان ژن PAL در گیاه توتون ۱۰ ساعت پس از آلودگی با *Pseudomonas syringae* گزارش شده است که این افزایش بیان با افزایش فعالیت این آنزیم نیز همراه بوده است (Denslow et al., 2005). همچنین، در برگ‌های گندم آلوده شده با *Botrytis cinerea*، در محل آلودگی با این قارچ بیماری‌زا، افزایش فعالیت آنزیم PAL مشاهده شده است (Huang et al., 2010). آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در اکسیداسیون فنل به ترکیبات کینون و تشکیل لیگنین نقش دارد. پژوهش‌ها نشان داده است که آنزیم‌هایی مانند پلی‌فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لیاز در فعالیتهای دفاعی و واکنش‌های فوق حساس در مقابل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی نقش دارند. این آنزیم همچنین مسئول واکنش‌های قهوه‌ای شدن بافت‌های زخمی و تشکیل سدهای دفاعی در مقابل بیماری‌زها است. از سویی ترکیبات کینون حاصل از اکسیداسیون فنل‌ها، ترکیباتی به مراتب سمی‌تر از فنل‌ها هستند و نقش آن‌ها در دفاع از گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا در گیاهان کاملاً شناخته شده است (Mohammadi and Kazemi, 2002). نتایج مربوط به بیان ژن‌های رمزکننده پلی‌فنل اکسیداز (شکل ۲-B) در گیاه گندم شاهد و آلوده با قارچ بیماری‌زای القا شده با سالیسیلیک اسید نشان داد که این القاکننده، بیان ژن‌های یادشده را در گیاه گندم در حضور و غیاب قارچ

آنزیم کاتالاز متناقص هستند. خیساندن دانه‌های ذرت در ۰/۱ میلی‌مولار SA فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را افزایش داد (Momeni et al., 2012). پیش‌تیمار گیاه شاهی با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار SA به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز منجر شد؛ اما با افزایش غلظت به ۰/۱ میلی‌مولار، فعالیت این آنزیم افزایش یافت. اگر چه در هر دو غلظت، فعالیت آنزیم نسبت به گیاه شاهد کمتر بود (Hashemi et al., 2010). گزارش شده است که پیش‌تیمار با SA ۰/۲ میلی‌مولار فعالیت آنزیم کاتالاز را در گیاه عدس پس از ۷ روز تنش شوری کاهش داد (Kayednezami and Balouchi, 2013). پاشیدن SA ۱ میلی‌مولار در گیاه بادرنجوبیو تیمارشده با اشعهٔ فرابنفش به افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز منجر شد (Pourakbar and Adedzadeh, 2014). به نظر می‌رسد غلظت SA استفاده شده و همچنین زمان برداشت نمونه در این تناقض دخیل باشند. در تحقیق حاضر سالیسیک اسید در غلظت ۲ میلی‌مولار، افزایش شدید بیان ژن کاتالاز را نسبت به نمونهٔ تلقیح شده با قارچ در مدت ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار به دنبال داشت؛ اما در مدت ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، این تاثیر را نداشت.

### جمع‌بندی

براساس نتایج این مطالعه، بیان ژن‌های رمزکنندهٔ هر چهار آنزیم که در این مطالعه بررسی شدند با افزایش ساعات نمونه‌برداری افزایش پیدا کرد. البته این روند افزایشی به علت زمان‌های ابتدایی نمونه‌برداری بود (شکل ۲). همان‌طور که قبلاً هم در بسیاری از تحقیقات

بیماری‌زا افزایش داد. اندازه‌گیری آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در برهم‌کنش گیاه گندم با قارچ *Alternaria triticina* مشخص کرد که گرچه فعالیت این آنزیم در رقم متحمل قبل از رویارویی با قارچ، بیشتر از رقم حساس است، تلقیح قارچ بیماری‌زا افزایش فعالیت در هر دو رقم را موجب می‌شود (Tyagi et al., 2000). تشدید فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در جو دوسر بر اثر آلودگی با *Fusarium avenaceum* نیز گزارش شده است (Fuerst et al., 2014).

پراکسیداز و کاتالاز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که غلظت  $H_2O_2$  را تنظیم می‌کنند (Chandra et al., 2007). گیاهان برای از بین بردن اثر رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش‌های زنده و غیرزنده، سازوکارهای دفاعی خود را به کار می‌گیرند. نقش چندین آنزیم از جمله پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکساید دیسموتاز، پلی‌فنل اکسیداز و ترکیباتی شبیه به فنل از انواع متابولیت‌های ثانویه که در پاسخ به تنش در گیاهان تجمع می‌یابند به اثبات رسیده است (Honty et al., 2005). بیان این دو آنزیم در گندم‌های آلوده به قارچ بیماری‌زا در غیاب و حضور سالیسیلیک اسید در زمان‌های نمونه‌برداری افزایش یافت (شکل ۲-C,D). در پاتوسیستم بیماری زنگ برگی (قهوه‌ای) گندم، افزایش بیان ژن آنزیم‌های اکسیداتیو بر اثر قارچ بیماری‌زا گزارش شده است (Fofana et al., 2007). در برهم‌کنش گندم با قارچ بیماری‌زای *Blumeria graminis* افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو ۴۸ ساعت پس از آلودگی در گیاه متحمل نسبت به گیاه حساس مشاهده شد (Ma et al., 2015). داده‌ها دربارهٔ نقش سالیسیلیک اسید بر فعالیت

عامل بیماری‌زا به نظر می‌رسد.

### سپاسگزاری

نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری و دانشگاه تربیت مدرس برای فراهم کردن امکان این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند.

به اثبات رسیده است برای این که گیاه بتواند در برابر تهاجم عوامل بیماری‌زا مصون بماند باید بیان ژن‌های دفاعی در ساعات ابتدایی پس از تلقیح بیماری‌زا افزایش پیدا کند. در پژوهش حاضر از رقم مقاوم زاگرس استفاده شد لذا افزایش زودهنگام بیان ژن‌ها پدیده‌ای قابل توجه در سازوکار مقاومت گیاه در برابر

### منابع

- Adhikari, T. B., Balaji, B., Breeden, J. and Goodwin, S. B. (2007) Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involve early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 55-68.
- Arraiano, L. S., Chartrain, L., Bossolini, E., Slatter, H. N., Keller, B. and Brown, J. K. M. (2007) A gene in European wheat cultivars for resistance to an African isolate of *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathology* 56: 73-78.
- Berraies, S., Gharbi, M. S., Belzile, F., Yahyaoui, A., Hajlaoui, M. R., Trifi, M., Jean, M. and Rezgui, S. (2013) High genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola* (*Zymoseptoria tritici*) from a single wheat field in Tunisia as revealed by SSR markers. *African Journal of Biotechnology* 12(12): 1344-1349.
- Boukef, S., McDonald, B. A., Yahyaoui, A., Rezgui, S. and Brunner, P. C. (2012) Frequency of mutations associated with fungicide resistance and population structure of *Mycosphaerella graminicola* in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology* 132(1): 111-122.
- Brading, P. A., Verstappen, E. C., Kema, G. H. and Brown, J. K. 2002. A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* Blotch Pathogen. *Phytopathology*, 92: 439-4.
- Chandra, A., Saxena, R., Dubey, A. and Saxena, P. (2007) Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of poly phenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhanced resistance in cowpea against *Rhizoctonia Solani*. *Acta Physiologiae Plantarum* 29: 361-367.
- Chartrain, L., Brading, P., Makepeace, J. and Brown, J. (2004) Sources of resistance to *Septoria tritici* blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathology* 53: 454-460.
- Denslow, S. A., Walls, A. A. and Daub, M. E. (2005) Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B6 vitamins during plant defense responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66: 244-255.
- Eslahi M. R., Safaie, N. and Saidi, A. (2013) Study of resistant gene expression of wheat against to *Mycosphaerella graminicola* by cDNA - AFLP . PhD thesis, Tarbiat Modares university (in Persian with English abstract).
- Fofana, B., Banks, T.W., McCallum, B., Strelkov, S.E. and Cloutier, S. (2007) Temporal gene expression profiling of the wheat leaf rust pathos stem using cDNA microarray reveals differences in compatible and incompatible defiance pathways. *International Journal of Plant Genomics* 2007: 1-13.

- Fuerst, E.P., Okubara, P.A., Anderson, J. V. and Morris C.F. (2014) Poly phenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. *Plant Physiology* 5 (689): 1-9.
- Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi Goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi, Kh. (2012) The evaluation of salicylic acid effect on septorios disease by *Mycosphaerella graminicola*. *Researches Plant Pathology* 2(2): 35-46. (in Persian).
- Goodwin, S. B., McDonald, B. A. and Kema, G. H. J. (2003) The *Mycosphaerella* sequencing initiative. In: *Global Insights into the Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals* (Eds. Kema, G. H. J., van Ginkel, M. and Harrabi, M.) 149-151. In: *Proceeding of the 6<sup>th</sup> International Symposium on Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals, Tunis, Tunisia*.
- Hashemi, Sh., Asrar, Z. and Pourseyedi, Sh. (2010) Effects of seed pretreatment by salicylic acid on growth and some physiological and biochemical parameters in *Lepidium sativum*. *Iranian Journal of Plant Biology* 2(2):1-10. (in Persian).
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14-25.
- Honty, K., Hevesi, M., Toth, M. and Stefanovits-Banyai E. (2005) Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia amylovora*. *Acta Biologica Szegediensis* 49: 127-129.
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q. and Chen, Z. (2010) Functional analysis of the Arabidopsis PALgene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology* 153:1526–1538.
- Kayednezami, R. and Balouchi, H. (2013) Effect of salicylic acid priming on lens cultivars (*Lens culinaris* Medik.) germination and some physiological traits under salinity conditions. *Iranian Journal of Plant Biology* 5(18): 15-36. (in Persian).
- Kia, S. and Torabi, M. (2008) Effects of infection with septoria leaf blotch (*Septoria tritici*) at different growth stages on yield and yield components of wheat cultivars in Gorgan. *Seed and Plant* 24: 237-250 (in Persian).
- Lynch, K. M., Zannini, E., Guo, J., Axel, C., Arendt, E. K., Kildea, S. and Coffey, A. (2016) Control of Zymoseptoria tritici cause of septoria tritici blotch of wheat using antifungal Lactobacillus strains. *Journal of Applied Microbiology* 121: 485-494.
- Ma, L. X., Zhong, S. F., Liu, N., Chen, W. Q., Liu, T. G., Li, X., Zhang, M., Ren, Z. L., Yang, J. Z. and Luo, P. G. (2015) Gene expression profile and physiological and biochemical characterization of hexaploid wheat inoculated with *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 90: 39-48.
- McDonald, M.C., McDonald, B.A., Solomon, P.S. (2015) Recent advances in the Zymoseptoria tritici –wheat interaction: insights from pathogenomics. *Frontiers in Plant Science* 6(102): 1-5.
- Mohammadi, M. and Kazemi, H. (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science* 162: 491-498.
- Momeni, N., Arvin, M., Khagoei nejad, Gh., Daneshmand, F. and Keramat, B. (2012) The effect of sodium chloride and salicylic acid on antioxidant defense system in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Biology* 4(14): 23-34. (in Persian).
- Pourakbar, L. and Abedzadeh, M. (2014) Effects of UV-B and UV-C radiation on antioxidative enzymes activity of *Melissa officinalis* and influences of salicylic acid in UV-stress ameliorations. *Iranian Journal of Plant Biology* 6(21): 23-34. (in Persian).

- Quaedvlieg, W., Kema, G. H. J., Groenewald, J. Z., Verkley, G. J. M., Seifbarghi, S., Razavi, M., Gohari, A. M. and Mehrabi, R. (2011) *Zymoseptoria* gen. Nov.: A new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts". *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 26: 57–69.
- Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology* 133: 1755-1767.
- Ray, S., Anderson, J. M., Urmeev, F. I. and Goodwin, S. B. (2003) Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Molecular Biology* 53: 741-754.
- Sorahinobar, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Soltanloo, H., Behmanesh, M. and Tahmasebi nferad, S. (2015) Central Role of Salicylic Acid in Resistance of Wheat Against *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Growth Regulation* 35(2): 477–491.
- Tyagi, M., Kayastha, A. M. and Sinha, B. (2000). The role of peroxidase and polyphenol oxidase isozymes in wheat resistwnce to *Alternaria tritricina*. *Biologia Plantarum* 43(40): 559-562.
- Vakili Bastam, S., Ramezanpour, S. S., Soltanloo, H., Kia, S., Kalatearabi, M. and Pahlavani, M. H. (2010) Inheritance of resistance to septoria tritici blotch (STB) in some Iranian genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Genetics and Molecular Biology* 2(3): 034-042.
- Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3: 2-20.
- Wang, X., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, C., Liu, B. Z., Zhao, J., Han, Q. and Huang, L. (2009) cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striifonnis* f. sp. *tritici*. *BMC Genomics* 10: 289-304.
- Wen, P., Chen, J. Y., Kong, W. F., Pan, Q. H., Wan, S. B. and Huang, W. D. (2005) Salicylic acid induced the expression of Phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science* 169: 928-934.
- Zamani, E., Sanjarian, F., Mohammadi-Goltapeh, E. and Safaie, N. (2016) Studying the resistance of wheat seedlings grown from treated seeds with salicylic acid against *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Protection* 39(1): 1-14. (in Persian).