Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**
Vol. 4, No. 2, Autumn & Winter 2023, p. 157- 166 **جلد ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲، صفحه ۱۶۶-۱۵۷**
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22034/PLANT.2023.139494.1072

تغییرات الگوی بیان برخی ژن‌ها در پاسخ به آلودگی سپتوریا در گندم نان

سیده ساناز رمضانپور[1*]، حسن سلطانلو[1]، سحر سادات حسینی[2]، لیلی قلی‌زاده[3]

۱. دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۱. دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۸

چکیده

یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی که باعث ایجاد خسارت در گندم می‌شود بیماری سپتوریای برگی گندم است. این بیماری چالشی جدی و مداوم، برای تولید گندم در مناطق معتدل در سراسر جهان به‌شمار می‌رود. اساسی‌ترین استراتژی برای کنترل این بیماری، یافتن منابع مقاوم و توسعه کشت ارقام مقاوم است. مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر به بررسی نقش و میزان بیان برخی ژن‌های دخیل در فرایند مقاومت به بیماری پرداخته است و روشنگر نقاط ضعف و قوت گیاه و بیمارگر در مسیر بیماری است. در تحقیق حاضر، به منظور تکمیل این تحقیقات و در تایید بیان افتراقی برخی از ژن‌های جداسازی شده، الگوی بیان ژن‌های استولاکتات سنتاز، کالنکسین و GDP- مانوز ۳ و ۵ اپیمراز با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی در زمان واقعی مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از آلوده‌سازی لاین مقاوم (شماره ۱۰) و رقم حساس گندم (تجن) با قارچ عامل بیماری، بیان ژن‌های مورد نظر در فواصل زمانی قبل از مایه زنی به عنوان کنترل، شش و ۱۲ساعت، یک، دو، سه، چهار، پنج و هفت روز پس از مایه‌زنی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده ضمن تایید نتایج حاصل از cDNA-AFLP، نشان داد که هر سه ژن نقش مهمی در القا واکنش مقاومت به بیماری سپتوریا از طریق تولید اسید آسکوربیک به عنوان یک آنتی اکسیدان در حذف ROSها، حفظ هموستاری اسیدهای آمینه و کنترل تاخوردگی صحیح پروتئین ها برعهده دارند.

کلیدواژگان: بیان ژن، استولاکتات سنتاز، GDP-مانوز ۳ و ۵ اپیمراز، کالنکسین

*ایمیل نویسنده مسئول: ramezanpours@gau.ac.ir

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum*) سابقه‌ای بسیار طولانی در زندگی و تکامل تمدن بشر در خاورمیانه و اروپا داشته است. گونه *Zymoseptoria tritici* عامل سوختگی برگی یا سوختگی خالدار برگ گندم بوده و فرم جنسی قارچ عامل بیماری *Mycosphaerella graminicola* می‌باشد که باعث کاهش معنی‌دار تعداد دانه در سنبله در آلودگی در مراحل اولیه رشد و وزن هزار دانه در تمام مراحل رشد گردید اما روی تعداد سنبله در مترمربع اثر معنی‌داری نداشت (Dadrezaei *et al*, 2003).

آمینواسیدهای شاخه‌دار (BCAAها) شامل لوسین، والین و ایزولوسین در گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها سنتز شده ولی در پستانداران وجود ندارند. آنزیم‌های متعددی در مسیر بیوسنتز BCAA جهت توسعه علف‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها و مواد ضدباکتریایی مورد توجه هستند (Kohlhaw, 2003; Mccourt and Duggleby, 2006). استولاکتات سینتاز (ALS) اولین مرحله را در بیوسنتز BCAA کاتالیز می‌کند و می‌تواند به عنوان یک عامل ضدقارچی نیز عمل نماید (Duggleby *et al*., 2008). هرچند مطالعات کمی در خصوص نحوه عملکرد ALS در کنترل بیماری وجود دارد، ولی در سال‌های اخیر ALS به دلیل نقش مهم آن در بیماری‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. به عنوان مثال Wei و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه خود روی پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه به این نتیجه رسیدند که ALS می‌تواند در اعطای مقاومت به این بیماری نقش موثری داشته باشد. Gao و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه خود به نقش تغییرات القا شده توسط ALS در هموستازی اسیدهای آمینه و مقاومت به بیماری سفیدک پودری در گوجه‌فرنگی تاکید نمودند.

GDP مانوز ۳و۵ اپیمراز (GM35E، GME) متعلق به خانواده بزرگ پروتئینی دهیدروژناز/ریداکتاز کوتاه زنجیره بوده و در گیاهان در بیوسنتز L آسکوربیک اسید (ویتامین C) نقش دارد. L آسکوربیک اسید یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مهم با نقش موثر در تنش‌های گیاهی است (Beerens et al., 2022).

کالنکسین یک پروتئین چاپرون مولکولی است که در داخل شبکه آندوپلاسمی (ER) با ساختار بسیار حفاظت شده و عملکردهای بیولوژیکی در بین گیاهان، قارچ ها و حیوانات قرار دارد (Huang *et al*., 1993; Parlati *et al*., 1995). ژن‌های کالنکسین در تحمل تنش در گیاهان نقش دارند. نشان داده شده است که بیان بیش از حد یک کالنکسین برنج (OsCNX) در تنباکو باعث تحمل تنش خشکی ناشی از مانیتول می شود (Sarwat and Naqvi, 2013). شبکه اندوپلاسمی یکی از بزرگ‌ترین اندام‌های غشایی در سلول‌های یوکاریوتی است و نقش حیاتی در فرآیندهای سلولی مانند ذخیره‌سازی و آزادسازی کلسیم، سنتز لیپید و پروتئین، تغییرات تاخوردگی پروتئین و پس از ترجمه، ارتباطات سلول-سلول و مسیر سیگنالی نقش مهمی ایفا می‌کند (Garg *et al*., 2015). شبکه اندوپلاسمی به شرایط نامطلوب محیطی (تنش‌های زنده و غیرزنده) حساس است. تنش شبکه اندوپلاسمی از طریق پاسخ پروتئین بازشده (UPR) القا می‌شود، که منجر به تنظیم رونویسی ژن‌های کدکننده‌ی چاپرون‌های شبکه اندوپلاسمی مانند کالنکسین و کالرتیکولین می‌شود (Martínez and Chrispeels, 2003; Boston *et a*l., 1996).

هنگامی که عوامل بیماری‌زای قارچی به بافت‌های گیاهی حمله می‌کنند، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR پروتئین‌ها) در بافت‌های آلوده ظاهر شده و تجمع می‌کنند (Van Loon and Van Strien, 1999). این پروتئین‌ها باعث القای واکنش فوق‌حساسیت و مرگ سلولی در اطراف محل آلودگی بیمارگر و مانع از تکثیر و گسترش آلودگی می‌شود (Heath, 2000).

Debona و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تغییرات شیمیایی در برگ‌های گندم آلوده به *Pyricularia oryzae* بیان داشتند که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون – اس ترانسفراز در هر دو رقم حساس و نیمه مقاوم آلوده شده با عامل بیماری در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافتند و میزان افزایش در رقم نیمه مقاوم BRS229 نسبت به رقم BR_{18} در روز چهارم پس از آلودگی بیشتر بود.

Adhikari و همکاران (۲۰۰۷) جهت آزمون میزان بیان ژن‌های مربوط به پاسخ‌های دفاعی گندم به عامل بیماری *Mycosphaerella graminicola* دو رقم حساس و مقاوم را تا ۲۷ روز پس از آلودگی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که ۴ ژن کیتیناز، فنیل آلانین آمونیاز، PR1 و پراکسیداز علیرغم بیان در ۳-۱ روز پس از مایه‌زنی در روزهای بعد بیان نشدند و ۹ ژن مقاومت دیگر در تمام ساعات پس از تلقیح حداقل در یک رقم مقاوم بیان شدند.

Shetty و همکاران (۲۰۰۳) بیان داشتند هنگامی‌که عامل بیماری لکه برگی سپتوریایی سطح تماس خود را روی سطح برگ توسعه می‌دهد، H_2O_2 در بافت برگ تجمع می‌یابد. تجمع H_2O_2 به صورت سیگنالی برای تجمع PR پروتئین‌ها عمل می‌کند. هنگامی که عامل بیماری‌زا به داخل روزنه نفوذ می‌کند، PR پروتئین‌ها شروع به تجزیه‌ی دیواره‌ی سلولی قارچ می‌کنند و ساختارهای دفاعی دیواره‌ی قارچی را حذف می‌کنند تا بدین وسیله از رشد قارچ جلوگیری کرده، دسترسی آن را به آب و موادغذایی کاهش دهد و گیاه را در مقابل توکسین‌ها و آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی که از بیمارگر تولید می‌شود، حفظ کنند. با توجه به اهمیت این بیماری در کاهش محصول گندم و شرایط مناسب آن در برخی مناطق کشور، لذا شناسایی و تعیین خصوصیت ژن‌های درگیر در مکانیسمهای دفاعی و مقاومت به این بیماری می تواند کمک بزرگی به اصلاحگران گیاهی در جهت بهبود مقاومت و جلوگیری از افت عملکرد باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و تکثیر قارچ عامل بیماری سپتوریای برگی گندم

جهت جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های بیمارگر از روش Eyal و همکاران (۱۹۸۷) استفاده گردید. برای تهیه مایع تلقیح جهت مایه‌زنی گیاه از محیط کشت مایع عصاره مخمر و ساکارز (YSM) استفاده شد. پس از تهیه‌ی محیط کشت، حلقه‌هایی به قطر یک تا دو سانتی‌متر از کلنی خالص قارچ رشد کرده روی محیط کشت جامد، با استفاده از چاقوی کوچک جراحی برداشته و به درون ارلن‌های محتوی محیط کشت مایع منتقل شدند. ارلن‌ها روی تکان‌دهنده با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از مدت ۷-۵ روز، سوسپانسیون داخل ارلن‌ها از پارچه ململ دو لایه عبور داده شد تا صاف گردد. سپس تعداد اسپورها در هر میلی‌لیتر با استفاده از لام گلبول‌شمار (هموسیتومتر) شمارش گردید. و غلظت آنها به مقدار 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید.

کشت بذور و آلوده‌سازی گیاهچه‌ها توسط قارچ عامل بیماری

این مرحله در گلخانه بیماری‌های غلات مرکز تحقیقات وآموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان انجام شد. بذور رقم تجن (به عنوان ژنوتیپ حساس) و لاین مقاوم شماره ۱۰ (به عنوان ژنوتیپ مقاوم) به این منظور استفاده شدند. تعداد هشت بذر از هر ژنوتیپ در گلدان‌های پلاستیکی که حاوی مخلوط ماسه، خاک مزرعه و خاک برگ به نسبت ۱:۱:۱ بودند کشت گردیدند. گلدان‌های پلاستیکی به داخل کابین گلخانه با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۵ درصد منتقل شدند. پس از مدت ۱۰ روزه گیاهچه‌ها در مرحله‌ی دو برگی با سوسپانسیون قارچ بیمارگر با استفاده از آب فشان دستی مایه‌زنی شدند. به‌منظور حفظ رطوبت مورد نیاز جهت رشد و نفوذ قارچ از پوشش‌های پلاستیکی قرار گرفته بر روی قیم‌های چوبی به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد.

نمونه گیری از برگ‌های مایه زنی شده با قارچ عامل بیماری

پس از مایه‌زنی گیاهچه‌ها با قارچ عامل بیماری، از دو برگ اول در زمان‌های قبل از مایه زنی به عنوان کنترل، شش و ۱۲ساعت، یک، دو، سه، چهار، پنج و هفت روز نمونه‌برداری انجام گرفت. هر نمونه به میزان یک گرم در فویلی آلومینیومی استریل قرار داده شد و بلافاصله با استفاده از ازت مایع منجمد شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

طراحی آغازگرها

ژن‌های مورد بررسی شامل سه ژن استولاکتات سنتاز، GDP-۳ و ۵ اپیمراز و کالنکسین بر اساس نتایج تحقیق Arjmand (۲۰۱۱) انتخاب گردیدند. این ژن‌ها بر اساس افزایش و یا بیان باند مربوطه جداسازی و تعیین خصوصیت شده بودند. در مطالعه حاضر و به منظور تایید نتایج cDNA-AFLP و همچنین ارزیابی کمی تغییرات بیان ژن های جداسازی شده، ابتدا توالی ژن‌ها از سایت NCBI مشخص گردید و بر اساس این توالی‌ها و ویژگی‌های مورد نظر طراحی آغازگر به کمک نرم‌افزار Primer3 صورت گرفت. مشخصات آغازگرها به همراه شماره دسترسی در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی

ژن	نام کامل ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر پیشرو	توالی آغازگر پسرو	طول محصول (bp)
ACT	β-actin	AB181991.1	GTCTGGATCGGTGGCTCTAT	GCAGCAAGTCCCCTTTGTAA	152
ALS	acetolactate synthase	AA1529550	CCGCAATATGCTATCCAGGT	CTTCGCTCTTCTTCGTCACA	155
GME	GDP-mannose 3,5 - epimerase	AA1306770	TGTCCGTGGCCGTAACTCT	GTGGTGCAGACCTTGGATGT	177
CNX	Calnexin	AA1667880	GTCGGTCATCGTCGTCATT	GCATCCTTGTCATCCTCCTT	162

استخراج RNA

جهت استخراج RNA ، از بافر پی بایوزول شرکت بیوفلوکس (توکیو، ژاپن) مطابق دستورالعمل استفاده گردید. RNA استخراج شده جهت نگهداری به فریزر ۸۰ - درجه سلسیوس منتقل گردید. بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز روی ژل آگارز انجام شد.

ساخت cDNA و انجام RT-qPCR

تیمار DNaseI به منظور از بین بردن DNA ژنومی برای تمامی نمونه‌ها براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز و با استفاده از یک واحد آنزیم DNaseI، انجام شده و نمونه‌های تیمار شده در یخچال ۸۰- درجه سلسیوس تا انجام مرحله‌ی بعدی نگهداری شدند.

به منظور ساخت cDNA میزان ۵ میکرولیتر از هر نمونه RNA بعد از تیمار *DNase*I مطابق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از ۲۰ واحد آنزیم *Ribolock RNase inhibitor* و ۲۰۰ واحد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس انجام شده و نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

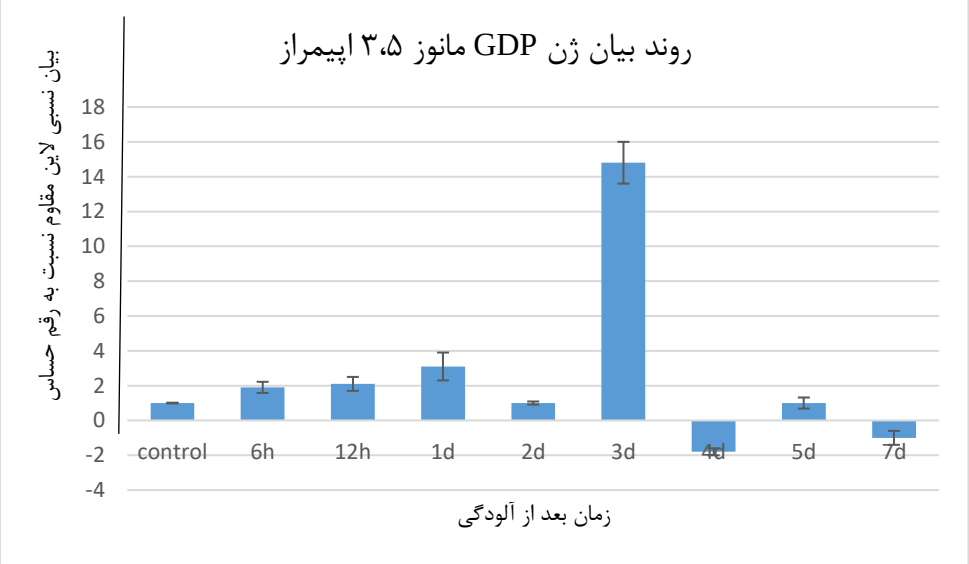
برای انجام RT-qPCR، ۱۵ میکرولیتر مخلوط واکنش RT-qPCR و یک میکرولیتر از آغازگر پیشرو پسرو (با غلظت ۱۰ میکرومولار) و سه میکرولیتر cDNA مطابق چرخه‌ی حرارتی جدول (۲) تکثیر استفاده شد. برای این منظور از دستگاه iQ5 محصول شرکت BIO-RAD ساخت کشور ایالات متحده آمریکا و بافر سایبر بیوپارس- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان استفاده شد. کلیه ارزیابی ها با ۳ تکرار تکنیکی و ۲ تکرار بیولوژیکی انجام شد.

جدول ۲- چرخه حرارتی واکنش کمی زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)
۱	واسرشت	۳ دقیقه	۹۵
۴۰	واسرشت	۱۰ ثانیه	۹۵
	اتصال	۱۰ ثانیه	۶۰
	تکثیر	۱۰ ثانیه	۷۲
۱	تکثیرنهایی	۵ دقیقه	۷۲
۸۱	ذوب	۱۰ ثانیه	۵۵-۹۵

داده‌های حاصل از دستگاه RT-qPCR توسط نرم‌افزار REST 2000 (Pfaffl *et al.*, 2022) و روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تجزیه و تحلیل شدند. در این نرم‌افزار از آزمون آماری جهت بررسی سطح معنی‌داری تغییرات بیان ژن استفاده شده و بر همین اساس میزان افزایش یا کاهش سطح بیان ژن و انحراف معیار آن محاسبه می‌شود. نمودارهای مربوط توسط نرم‌افزار Excel رسم شدند.

از آنجایی که اختصاصی عمل نمودن آغازگرها در روش RT-qPCR از اهمیت بالایی برخوردار است به همین منظور در پایان هر واکنش با رسم منحنی‌های ذوب برای هر آغازگر می‌توان از اختصاصی بودن آنها اطمینان حاصل نمود. در صورت مشاهده تنها یک پیک در حدود درجه حرارت ذوب آغازگر مورد بررسی می‌توان به اختصاصی عمل نمودن آغازگر مطمئن بود.



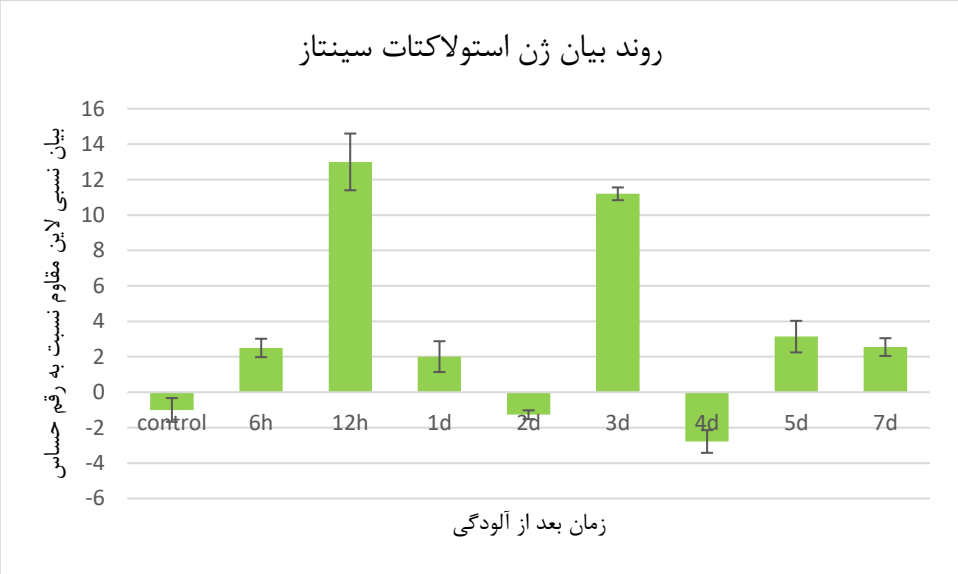
شکل ۱- روند تغییرات بیان ژن GDP-مانوز ۳و۵ اپیمراز در لاین مقاوم نسبت به رقم حساس گندم نسبت به آلودگی بیماری سپتوریای برگی (d: روز بعد از مایه زنی، h: ساعت بعد از مایه‌زنی)

آنزیم GDP-مانوز ۳و ۵ اپیمراز به خانواده ایزومرازها تعلق دارد و GDP مانوز را به GDP گالاکتوز تبدیل می‌کند. این آنزیم در سنتز ویتامین C در گیاهان نقش دارد (Shalata and Neumann, 2001). تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان تحت شرایط تنش پدیده‌ای شایع است. گیاهان از طریق توانایی خود برای خنثی‌کنندن ROS، با تولید ترکیباتی از جمله آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی به این مشکل پاسخ می‌دهند. اسید اسکوربیک

(ویتامین C) با غلظت میلی مولار در گیاهان وجود دارد و یکی از آنتی اکسیدان‌های مهم به شمار می رود که در فرایندهای مهم سلولهای گیاهی از جمله بیوسنتز هورمون و دیواره سلولی، مقاومت به تنش و رشد سلول نقش دارد (Akram *et al*, 2017; Smirnoff and Wheeler, 2000). علاوه بر این ویتامین C، کوفاکتوری برای آنزیم‌هایی از قبیل هیدروکسیلاز و دهیدروکسیژنازاست. سطح اسید آسکوربیک برگ تأثیر شایانی بر بیان ژن‌های درگیر در دفاع (فعال شدن PR پروتئین‌ها) و مسیرهای سیگنالی هورمون‌ها دارد (Major et al., 2005; Shalata and Neumann, 2001).

بررسی الگوی بیان ژن استولاکتات سنتاز

طبق گزارش Arjmand (۲۰۱۱) باند مربوط به ژن رمزکننده آنزیم استولاکتات سنتاز (ALS) تنها در لاین مقاوم دیده شد و در لاین حساس بیان قابل تشخیصی نداشت. همچنین بر اساس شدت و ضعف باندها نیز مشخص شد که بیان این ژن در ژنوتیپ مقاوم به شکل سینوسی بوده و در زمان های مختلف ۱ و ۳ روز بالاترین میزان بیان را دارد. نتایج بررسی الگوی بیان ژن استولاکتات سنتاز در لاین مقاوم نسبت به رقم حساس نشان داد که بیان این ژن، از زمان صفر تا ۶ ساعت پس از آلوده‌سازی به تدریج افزایش یافته (شکل ۲) و در ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی با بیش از ۱۲ برابر افزایش بیان به اوج خود رسید و مجددا در روز سوم افزایش بیان نشان داد که تایید کننده نتایج آزمایشات ارجمند ۱۳۹۰ می باشد. در روز سوم افزایش قابل توجهی (حدود یازده برابر در مقایسه با رقم حساس) در تظاهر ژن استولاکتات سنتاز مشاهده شد که هم زمان با ظهور علائم نکروزه و فوق حساسیت در گیاه بود.



شکل ۲- روند تغییرات بیان ژن استولاکتات سنتاز در لاین مقاوم نسبت به رقم حساس گندم نسبت به آلودگی بیماری سپتوریای برگی (d: روز بعد از مایه زنی، h: ساعت بعد از مایه‌زنی)

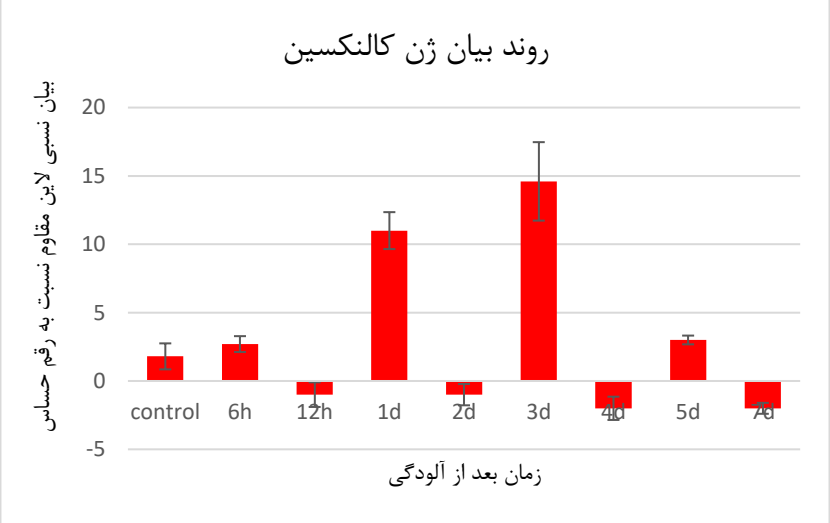
استولاکتات سنتاز که به عنوان استوهیدروکسی سنتاز (AHAS) نیز شناخته می‌شود، آنزیمی است که اولین مرحله سنتز اسیدهای آمینه با زنجیره منشعب (والین، لوسین و ایزولوسین) را کاتالیز می‌کند (Dailey and Cronan, 1986; Rainbolt *et al*., 2005). لوسین، ایزولوسین و والین توسط گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شوند. والین و ایزولوسین از طریق دو مسیر موازی شامل چهار آنزیم مشترک تشکیل می‌شوند که محصولات مختلف را در حضور زیرگونه‌های مختلف کاتالیز می‌کند. اولین آنزیم رایج در مسیر، استولاکتات است که از دو مولکول پیروات برای تشکیل استولاکتات به‌عنوان یک پیشرونده برای بیوسنتز والین و لوسین استفاده می‌کند. در مسیر شیمیایی تبدیل پیروفسفات تیمین به دو پیرووات، این آنزیم تبدیل دو پیرووات به استولاکتات و در نهایت تبدیل این محصول به اسیدآمینه‌های والین، لوسین و ایزولوسین را کاتالیز می‌کند که هر سه از اسیدآمینه‌های ضروری هستند و نمی‌توانند در ارگانیسم سنتز شوند (Dezfulian *et al*., 2017).

گیاهان در محیط طبیعی خود به طور مداوم توسط عوامل بیماری زا مختلف مورد حمله قرار می گیرند. با این وجود، گیاهان می‌توانند از طریق پاسخ‌های ایمنی و القایی، آلودگی ناشی از بیماری را شناسایی کرده و از آنها دوری کنند. پاسخ های القایی

از دو لایه تشکیل شده است (Jones and Dangl, 2006) . اولین لایه توسط الگوهای مولکولی مرتبط با بیماری زا (PAMPs) ایجاد می شود.

بررسی الگوی بیان ژن کالنکسین

طبق گزارش Arjmand (۲۰۱۱) باند مربوط به این ژن بالاترین میزان بیان را در روزهای اول و سوم پس از آلودگی در لاین مقاوم نشان داده و از تیمار ۳ روز جداسازی و تعیین خصوصیت شد. همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود، الگوی بیان ژن کالنکسین در لاین مقاوم نسبت به رقم حساس به صورت بایمودال (دو نقطه افزایش) است در زمان‌های یک و سه روز پس از مایه‌زنی می باشد که تایید کننده نتایج حاصل از آزمایش cDNA-AFLP است. بیان این ژن یک روز پس از مایه‌زنی تا بیش از ۱۰ برابر و ۳ روز پس از مایه‌زنی با بیش از ۱۴ برابر افزایش یافت. به نظر می رسد در این تحقیق به منظور حفظ شرایط بهینه در شبکه اندوپلاسمی تحت تنش بیماری سپتوریا، بیان ژن کالنکسین در پاسخ به سطوح غیرطبیعی پروتئین‌های بازشده حاصل از آلودگی سپتوریای در لاین افزایش می‌یابد که می تولند منجر به تنظیم پروتئین های بازشده در دستگاه شبکه اندوپلاسمی تحت شرایط تنش شود.



شکل ۳- روند تغییرات بیان ژن کالنکسین در لاین مقاوم نسبت به رقم حساس گندم نسبت به آلودگی بیماری سپتوریای برگی (d: روز بعد از مایه زنی، h: ساعت بعد از مایه‌زنی)

Campo و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعات بیان ژن که به روش ریزآرایه به منظور شناسایی ژن‌های بیان شده در گیاه برنج آلوده به قارچ بلاست انجام داده‌اند، اظهار داشتند که بسیاری از ژن‌های مرتبط با فرآیندهای سنتز، تاخوردگی و تثبیت مانند ژن‌هایی درگیر در بیان کالنکسین، کالروتیکولون، HSP90 افزایش بیان نشان دادند. در مطالعه Ha و همکاران (۲۰۲۰) افزایش بیان ژن کالنکسین منجر به افزیش تحمل به تنش پرتوتابی حاصل از اشعه UV و گاما در باکتری ایکولای شده است. این افراد نیز اذعان داشتند که می تواند تحمل به تنش پرتوتابی را در گیاهان نیز افزایش داده و به عنوان نشانگری جهت ردیابی اثرات پرتوتابی مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اســـاس نتایج این تحقیق، الگوی بیان ژن های مورد بررسی مطابقت کاملی با نتایج حاصل از آزمایش cDNA-AFLP نشان داد که بیانگر قدرت روش cDNA-AFLP در شناسایی و جداسازی ژنهای دارای بیان افتراقی می باشد. از سوی دیگر روش RT-qPCR نیز به خوبی توانست روند تغییرات ژنهای مورد بررسی را نشان دهد. نکته قابل توجه افزایش بیان هر سه ژن در روز سوم پس از آلودگی است. از آنجایی که شروع علائم نکروز و واکنش فوق‌حساسیت از روز ســـوم آلودگی آغاز گردید، این افزایش می‌تولند مبین نقش این ژن‌ها در واکنش فوق‌حســـاســـیت گیاه به این بیماری و جلوگیری از گســترش آن باشد. از سوی دیگر کاهش بیان این ژن از روز چهارم به بعد احتمالا به دلیل فعال شدن ژن‌های پایین‌دست و مسیرهای دیگر دخیل در واکنش مقاومت به این بیماری می‌باشـــد. به طور کلی می‌توان اذعان نمود که افزایش بیان ژن رمزکننده آنزیم GDP-مانوز ۳و ۵ اپیمراز در رقم حســاس نســبت به لاین مقاوم بیانگر نقش موثر این ژن در تولید اسید آسکوربیک و دخللت آن در حذف ROSها می‌باشـــد. افزایش بیان ژن رمزکننده آنزیم اســـتولاکتات ســـنتاز در لاین مقاوم نیز نشان‌دهنده اهمیت هموستازی اسیدهای آمینه در پاسخ گیاه به تنش بیماری می‌باشد. همچنین با افزایش بیان ژن رمزکننده آنزیم کالنکســـین نیز می‌توان به اهمیت پیچش صـــحیح پروتئین‌ها و تولنایی گیاه برای ممانعت از پیچش ناصحیح گیاه در واکنش به بیماری سپتوریا پی برد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه علوم و کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در انجام این تحقیق کمال تشـــکر و قدردانی را داریم.

منابع

Adhikari, T.B., Balaji, B. and Breeden, J.D., & Goodwin, S.B. (2007). Resistance to wheat *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *70*, 55-68.

Akram, N.A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. Front. *Plant Science*, *8*, 613.

Arjmand, E. (2011). Identification, isolation and characterization of differentially expressed genes in response to septoria blotch disease. Ms.c Thesis, *Gorgan University of Agricutura Sciences and Natural Resources*, 126p. (In Persian)

Bari, R., & Jones, J.D.G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, *69* (4) , 473-488.

Beerens, K., Gevaert, O., & Desmet, T. (2022). GDP-Mannose 3,5-Epimerase: A View on Structure, Mechanism, and Industrial Potential. *Frontiers in molecular biosciences*, *8*, 784142.

Boston, R.S., Viitanen, P.V. and Vierling, E. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, *32* (1-2), 191-222.

Campo, S., Manrique, S., García-Martínez, J., & San Segundo, B. (2008). Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnology Journal*, *6*(6), 585-608.

Dadrezaei, A.S., Minasian, V., Torabi, M., & Lotf Ali Ayeneh, Gh.A. (2003). Effect of *Septoria tritici* infections at different growth staged on yoeld and yield components of three wheat cultivars. *Seed and Plant Journal*, *19* (1), 101-116. (In Persian)

Dailey, F.E., & Cronan, J.E. (1986). Acetohydroxy acid synthase I, a required enzyme for isoleucine and valine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12 during growth on acetate as the sole carbon source. *Journal of Bacteriology*, *165*, 453-460.

Debona, D., Rodriques, F.A., Rios, J.A. & Nascimento, K.J. (2012). Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, *102*(12) , 1121-1129.

Dezfulian, M.H., Foreman, C., Jalili, E., Pal, M., Dhaliwal, R.K., Karl, D., Roberto, A., Imre, K.M., Kohalmi, S.E., & Crosby, W.L. (2017). Acetolactate synthase regulatory subunits play divergent and overlapping roles in branched-chain amino acid synthesis and Arabidopsis development. *BMC Plant Biology*, *17*(1):1-13.

Duggleby, R.G., McCourt, J.A., & Guddat, L.W. (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, *46*, 309-324.

Eyal, Z., Scharen, A.L., Prescott, J.M., & Ginkel, M.V. (1987). The Septoria Diseases of Wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico D.F. CIMMYT. 54p

Gao, D., Huibers, R.P., Loonen, A.E., Visser, R.G., Wolters, A.M., & Bai, Y. (2014). Down-regulation of acetolactate synthase compromises Ol-1- mediated resistance to powdery mildew in tomato. *BMC Plant Biology*, *14*, 32-43.

Garg, G., Yadav, S., & Ruchi Yadav, G. (2015). Key roles of calreticulin and calnexin proteins in plant perception

Ha, H-J., Subburaj, S., Kim, Y-S., Kim, J-B., Kang, S-Y. & Lee, G-J. (2020). Molecular characterization and identification of *Calnexin 1* as a radiation biomarker from tradescantia BNL4430. *Plants*, *9*(3):387.

Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, *44*, 321-334.

Huang, L., Franklin, A. E., and Hoffman, N. E. (1993). Primary structure and characterization of an *Arabidopsis thaliana* calnexin-like protein. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(9), 6560-6566.

Jones, J.D.G., & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444* (7117): 323.

Kohlhaw, G.B. 2003. Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*, 1-15.

Major, L.L., Wolucka, B.A., & Naismith, J, H. (2005). Structure and function of GDP-mannose-3,5-epimerase; an enzyme which performs three chemical reactions at the same active site. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(51), 18309–18320.

Martínez, I.M., & Chrispeels, M.J. (2003). Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell*, *15*, 561–576.

Mccourt, J.A., & Duggleby, R.G. (2006). Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids*, *31*, 173-210.

Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J.J., & Thomas, D.Y. (1995). *Saccharomyces cerevisiae CNE1* encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *Journal of Biological Chemistry*, *270*, 244–253.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., & Demptle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) For group-wide comparison and statistical analysis of relative expression result in real-time PCR. *Nucleic Acid Research*, *29*, 2002-2007.

Rainbolt, C.R., Thill, D.C., Zemetra, R.S., & Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-Resistant Wheat Acetolactate Synthase *In Vivo* Response to Imazamox. *Weed Technology*, *19*, 539–548.

Sarwat, M., & Naqvi, A.R. (2013). Heterologous expression of rice calnexin (*OsCNX*) confers drought tolerance in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Biology Reports*, *40*, 5451–5464

Schwessinger, B. & Zipfel, C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *11* (4), 389.

Shalata, A., & Neumann, P.M. (2001). Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increase to salt stress and reduces lipid peroxidation. *Expermintal Botany*, *52*, 2207-2211.

Shetty, N.P., Jensen, J.D., Knudsen, A., Finnie, C., Geshi, N., Blennow, A., Colling, D.B. & Jørgensen, H.J.L. (2009). Effect of β-1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responces in wheat. *Journal of Experimental Botany*, *15*, 4287-4300.

Shetty, N.P., Kristensen, B.K., Newman, M.A., Møller, K., Gregersen, P.L., & Jørgensen, H.J.L. (2003). Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *62*, 333-346.

Smirnoff, N., & Wheeler, G.L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *19*(4), 267-290.

Sønderby, I.E., Geu-Flores, F., & Halkier, B. A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates–gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15(5), 283-290.

Stotz, H., Waller, F., &Wang, K. (2013). Innate immunity in plants: the role of antimicrobial peptides. pp. 29–51. In: Hiemstra, P.S., Zaat S.A.J. (Eds.). Antimicrobial Peptides and Innate Immunity. Springer Nature 374p.

under stress conditions: *A review. Advances in life Sciences*, *5*(1), 18-26

Van Loon, L.C., & Van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *55*, 85-97.

Wei, C., Qin, T., Li, Y., Wang, W., Dong, T. &Wang, Q. (2020). Host-induced gene silencing of the acetolactate synthases VdILV2 and VdILV6 confers resistance to Verticillium wilt in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.126

Zeier, J. (2013). New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, Cell and Environment*, *36*(12), 2085-2103.

Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**

Vol.4 , No. 2, Autumn & Winter 2023, p. 157-166 **جلد ۴، شماره ۲ پاییز و زمستان ۱۴۰۲، صفحه ۱۶۶-۱۵۷**

Research Article DOI: 10.22034/PLANT.2023.139494.1072

Expression profile changes of some genes in response to Septoria infection in bread wheat

S. Sanaz Ramezanpour[1*], Hassan Soltanloo[1], Sahar S. Hosseini[2], Leli Gholizadeh[2]

1. Associate professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Ph.D. student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. MSc. graduate, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 03-08-2023
Accepted: 30-10-2023

Abstract

Wheat is one of the most important crops, accounting for about 16% of arable land. One of the most important diseases that cause damage to wheat is Septoria tritici. The disease is a serious and ongoing challenge to wheat production in temperate regions around the world. The most basic strategy to control this disease is to find resistant genotypes and develop cultivation of them. In recent years, studies have evaluated the role and expression of some genes involved in the disease resistance process and have clarified the strengths and weaknesses of the plant and the pathogen in the path of the disease. In the present study, to confirm the differential expression of some isolated genes (from the cDNA-AFLP project), the expression pattern of Acetolactate synthase, calnexin, and GDP-mannose 3 and 5 epimerase genes were evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction. After infection of a resistant line (No. 10) and a susceptible wheat cultivar (Tajan) with the fungus, expression of the studied genes was measured at 9-time points (before inoculation as control, six and 12 hours, one, two, three, four, five and seven days after inoculation). The results, while confirming the results of cDNA-AFLP, showed that all three genes play an important role in inducing the resistance reaction to Septoria disease through the production of ascorbic acid as an antioxidant in removing ROS, maintaining amino acid homeostasis and controlling correct folding of proteins are responsible

Keywords: Gene expression, Acetolactate synthetase (ALS), GDP-mannose 3,5 epimerase, Calnexin

Citation: Ramezanpour,S., Soltanloo, H., Hosseini, S., & Gholizadeh, L. (2023). Expression profilechanges of some genes in response to septoria infection in bread wheat. *Plant Production and Genetics*, 4(2), 157-166. https://doi.org/10.22034/PLANT.2023.139494.1072.

Copyrights:
Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Corresponding Author Email: ramezanpours@gau.ac.ir