

بیان ژن و فعالیت آنزیمی پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز در پاسخ به بیماری سپتوریای برگ گندم

Gene expression and enzymatic activity of peroxidase and polyphenol oxidase in response to *septoria tritici* blotch disease

نسبیه چنارانی^۱، سیده ساناز رمضانپور^{۱*}، حسن سلطانلو^۱، احد یامچی^۱، شعبان کیا^۱

۱- به ترتیب کارشناس ارشد، دانشیاران، استادیار و دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Chenarani N¹, Ramezanpour SS^{*1}, Soltanloo H¹, Yamchi A¹, Kia SH¹

1. Graduated MSc Student, Associate Professors, Assistant Professor, PhD student, Gorgan
University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Ramezanpours@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

چکیده

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
پراکسیداز
پلی فنول اکسیداز
سپتوریای برگ گندم
فعالیت آنزیمی

بسیاری از تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاهان منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود. پلی فنول اکسیداز و پراکسیداز دو آنزیم آنتی اکسیدان با نقشی مهم در حفاظت گیاه در مقابل تنش‌ها هستند. به منظور بررسی بیان این دو ژن و تغییر فعالیت آنزیمی آنها آزمایشی بر روی دو ژنوتیپ مختلف گندم نان حساس (ژنوتیپ تجن) و متحمل (لاین شماره ۱۰) به بیماری سپتوریای برگ گندم (*Septoria tritici*)، در شرایط گلخانه انجام گرفت. نمونه‌های برگ از گیاهان آلوده شده با اسپورهای *S. tritici* و مرحله دو برگ، در زمان‌های مختلف (سه ساعت تا بیست و یک روز) بعد از آلودگی جمع‌آوری شدند. نتایج نشان داد میزان بیان ژن‌های پراکسیداز در اغلب زمان‌ها به جز روز اول و بیست و یک بعد از آلودگی در ژنوتیپ حساس از نمونه کنترل بیشتر بود. در مقابل، تعداد رونوشت‌های این ژن در ژنوتیپ متحمل در کلیه زمان‌های بعد از آلودگی از نمونه کنترل بیشتر بود. در تمام زمان‌های نمونه‌گیری تعداد رونوشت‌های پراکسیداز در ژنوتیپ حساس نسبت به ژنوتیپ متحمل به طور قابل توجهی کمتر بود. تعداد رونوشت‌های پلی فنول اکسیداز در ژنوتیپ حساس سه ساعت بعد از آلودگی افزایش یافته اما در ساعات بعدی نه تنها افزایشی نسبت به نمونه کنترل نداشته بلکه کاهش چشمگیری نیز داشت. میزان رونوشت این ژن در ژنوتیپ متحمل در اکثر زمان‌ها بیشتر از تعداد آن در نمونه کنترل بوده و در روز دهم بعد از آلودگی به بیشترین میزان خود رسید. رونوشت‌های این ژن در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس در تمام زمان‌های نمونه‌گیری بود. همچنین نتایج آزمون فعالیت آنزیمی، نتایج بررسی بیان ژن‌ها را تایید کرد. فعالیت پراکسیداز در ژنوتیپ متحمل در تمام زمان‌های نمونه‌گیری بیشتر از ژنوتیپ حساس بود و میزان آن در ژنوتیپ متحمل در روز بیست و یکم به بیشترین سطح در مقایسه با نمونه کنترل و نمونه‌های ژنوتیپ حساس رسید. طبق نتایج آزمون فعالیت پلی فنول اکسیداز، فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ متحمل در بیشتر زمان‌های نمونه‌گیری از نمونه کنترل و از تمام نمونه‌های ژنوتیپ حساس بیشتر بود. به نظر می‌رسد که این دو ژن دارای نقش مهمی در فرایند تحمل می‌باشند.

مقدمه

بیماری سپتوریای برگی گندم (*Triticum aestivum* L.) توسط قارچ آسکومیست *J. Mycosphaerella graminicola* (Fuckel.) Roberge in *tritici Septoria* Schrot in Cohn (anamorph Desmaz.), ایجاد می شود. این بیماری در تمام نقاط جهان دیده شده و کاهش عملکرد چشمگیری را موجب می شود (Eyal et al. 2001; Hardwick et al. 1987). بنا به گزارش Abrinbana et al. (2010) این بیماری در دو دهه گذشته به تدریج به یک بیماری مهم با کاهش عملکرد بالا در مناطق مستعد بیماری در ایران به ویژه در مناطق عمده کشت گندم مانند شمال و شمال غرب و غرب تبدیل شده است. همچنین طبق مطالعات مشخص شده که گونه های فعال اکسیژن¹ مثل هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، سوپراکساید (O_2^-) و رادیکال های هیدروکسیل ($OH^\bullet$) به علت قابلیت اکسیدکنندگی در سلول های زنده می توانند برای موجودات زنده بسیار خطرناک باشند (Bowler et al. 1992). اگر چه ROSها در مسیرهای بیولوژیکی به عنوان محصول و یا ناقصین پیام در یک میزان پایه ثابت وجود دارند (Wu et al. 2002; Zelko et al. 1997)، اما در شرایط خاصی مثل تولید بیش از حد یا سیستم آنتی اکسیدان ناکارآمد که باعث القا تنش اکسیداتیو در گیاهان می شود، منجر به انباشته شدن ROS تا سطوح کشنده می شود (Fridovich 1991; Monk et al. 1989). ROSها به مولکول های پایه موجودات زنده مثل لیپیدها، کربوهیدرات ها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک حمله کرده و منجر به پراکسیداسیون غشاها (Kendal and Mc Kersie 1989) و شکست کربوهیدرات ها (Sato et al. 1993)، غیرفعال سازی آنزیم ها (Fucci et al. 1983) و برش در رشته های DNA (Halliwell and Gutteridge 1999) می شوند. گیاهان سیستم بسیار کارآمدی از آنزیم های آنتی اکسیدان را برای کاهش ROSها و حفاظت گیاه در تنش اکسیداتیو توسعه داده اند (Bowler et al. 1991). همچنین مطالعات در گیاهان نشان داده که سطوح ترکیبات فنولی و فعالیت فنیل آلانین آمولیز، پراکسیداز و پلی- فنول اکسیداز در گیاهان متحمل و حساس به تنش متفاوت است (Lo et al. 1999; Mohammadi and Kazemi 2002).

طبق گزارش Iiyama et al. (1994) پراکسیدازها (POXs, EC 1.11.1.7; donor: H_2O_2 oxidoreductase) ساخت لیگنین دخالت دارند. مونومرهای سازنده لیگنین دئیدروژنه شده و به رادیکال های فنوکسی در دیواره سلولی تبدیل می شود. این رادیکال ها به طور خودبخودی پلیمریزه شده و نتیجه آن شبکه ای از کراس لینک های مونولیگنول، پروتئین ها و پلی ساکاریدهاست.

پلی فنول اکسیداز (PPOs, EC 1.14.18.1; mono phenol, 3, 4-L- dihydroxyphenylalanine: oxygen oxido reductase) نقش بسیار مهمی در سیستم دفاعی گیاه با تبدیل ترکیبات فنولی درونی به o-quinones که برای پاتوژن ها و حشرات سمی است، ایفا می کند (Mohammadi and Kazemi 2002). فعالیت پلی فنول اکسیداز در گیاهان و طی تنش های غیرزنده (Mayer and Harel 1991) و آلودگی قارچی (Luthra et al. 1988) افزایش می یابد.

با توجه به اهمیت این بیماری فهم وقایع دخیل در فرایند تحمل به بیماری ضروری به نظر می رسد. اهداف این مطالعه، در مرحله اول تعیین میزان بیان ژن های پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز در دو ژنوتیپ حساس و متحمل به بیماری سپتوریای برگی و مقایسه بیان ژن ها در این دو ژنوتیپ می باشد. هدف دوم بررسی و مقایسه فعالیت این دو آنزیم طی دوره بیست و یک روزه بعد از آلودگی در ژنوتیپ های آلوده و حساس می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

بذور ژنوتیپ های متحمل (لاین شماره ۱۰) و حساس (تجن) در گلدان های پلاستیکی کاشته شدند و هر روز صبح آبیاری صورت گرفت. گیاهان در گلخانه مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان در سال ۲۰۱۲ و در شرایط استاندارد رشد داده شدند. گیاهان ده روزه که در مرحله دو برگی قرار داشتند، با سوسپانسیون قارچ با غلظت $10^6 - 10^7$ spore/ml بدست آمده طبق روش Eyal et al. (1987) اسپری شدند. اسپورهای *S. tritici* از مزارع گندم آلوده گرگان جمع آوری شده بودند. به منظور تامین شرایط مناسب برای جوانه زنی و رشد اسپورها، گلدان ها در زیر پوشش های پلاستیکی

¹ Reactive oxygen species (ROS)

نسبی و $\Delta\Delta CT$ (طبق معادله زیر) مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر به دست آمده که نمایانگر نسبت کاهش و یا افزایش تعداد رونوشت‌ها در هر نمونه در مقایسه با نمونه کنترل بود توسط نرم-افزار Excel 2010 به صورت نمودار رسم شد. از ژن داخلی خانه‌دار (در این مطالعه GAPDH) به عنوان ژن مرجع^۲ استفاده شد

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control-sampel})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control-sampel})}}$$

استخراج پروتئین

نمونه‌های برگ‌گی که در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می-شدند، با نیتروژن مایع بصورت پودر درآمدند و یک میلی‌لیتر بافر استخراج به آن اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت $1400 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به تیوب جدید منتقل شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور تهیه بافر استخراج ۲/۴۳۲ گرم تریس در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شده و به pH نهایی ۷/۸ رسانده شد. ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و مجدداً pH آن کنترل شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر گلیسرول به آن اضافه شد و با آب دوبار تقطیر به حجم نهایی ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

تعیین میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان طبق روش Bradford (1976) محتوی پروتئین کل بر حسب mg/ml اندازه‌گیری شد. فعالیت پراکسیداز بر اساس روش Mohammad and Kazemi (2002) اندازه‌گیری شد؛ در این آزمون در مدت دو دقیقه و هر ۲۰ ثانیه یک بار خوانش در طول موج ۴۲۰ نانومتر صورت گرفت. لازم به ذکر است که ابتدا یک زمان تاخیری به مدت دو دقیقه داده شد. کوت شاهد دارای یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH ۷) و ۱۶/۶ میکرولیتر پیروگالول ۰/۲ مولار و کوت نمونه دارای یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH ۷)، ۱۶/۶ میکرولیتر پیروگالول ۰/۲ مولار و ۱۶/۶ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود.

اندازه‌گیری فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز هم بر اساس روش Mohammad and Kazemi (2002) انجام گرفت. در این آزمون در مدت دو دقیقه و هر ۲۰ ثانیه یک بار خوانش در طول موج

نگهداری شدند و به منظور حفظ رطوبت جهت جوانه‌زنی، آب پاشی تا دو روز و با فاصله ۶ ساعت انجام شد. دو تکرار بیوبوژیکی از برگ‌ها در ۱۲ بازه زمانی (۳ ساعت تا بیست و یک روز) بعد از آلودگی به منظور بررسی ژن‌های با پاسخ دیر هنگام و زود هنگام جمع‌آوری شدند (Adhikari et al. 2007) و در نیتروژن مایع نگهداری و به یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج RNA و بررسی‌های Q-PCR

جداسازی RNA به کمک بافر بایوزول و طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز صورت گرفت. حذف DNA ژنومی با تیمار DNase I انجام شد. کیفیت RNA استخراج شده با الکتروفورز روی ژل آگارز و کمیت آن نیز با استفاده از دستگاه نانوفوتومتر (IMPLEN) تعیین شد. cDNA به کمک آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuLV و آغازگر Oligo dT₍₁₈₋₂₀₎ رونوشت بردار معکوس M-MuLV و آغازگر Oligo dT₍₁₈₋₂₀₎ ساخته شد. بررسی کمی رونوشت‌ها در زمان واقعی با کیت سایر بیو پارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) در سه تکرار تکنیکی انجام شد. برای طراحی آغازگرها از نرم‌افزار آنالین 3 Primer استفاده شد (مشخصات آغازگر ژن داخلی گلیسرآلدئید دی فسفات دهیدروژناز^۱ و سایر آغازگرها در جدول یک نشان داده شده است). واکنش Q-PCR شامل پنج میکرولیتر cDNA محلول، ۱۰ میکرولیتر از 2X SYBR Bio Pars PCR Master Mix و یک میکرولیتر از هر از آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول بود که با آب دوبار تقطیر به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR شامل یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه ۱۰ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. منحنی ذوب شامل ۸۱ چرخه در بازه ۵۵-۹۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه به منظور بررسی و تایید اختصاصی بودن آغازگرها انجام شد.

اندازه‌گیری مقادیر افزایش یا کاهش میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در تیمارهای مختلف، در نرم‌افزار REST با استفاده از داده‌های خروجی از نرم‌افزار iQ5 انجام گرفت. روش مقایسه

¹ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

² Reference gene

۴۷۰ نانومتر صورت گرفت. لازم به ذکر است که در ابتدا یک زمان تاخیری به مدت دو دقیقه داده شد. کوت شاهد دارای یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH ۷)، ۳/۳ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد و یک میکرولیتر محلول گایوکل بود و کوت نمونه دارای یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH ۷)، ۳/۳ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد، یک میکرولیتر محلول گایوکل و ۱۶/۶ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیمی بر اساس تغییرات جذب در هر میلی گرم پروتئین در هر دقیقه محاسبه شد.

نتایج و بحث

توسعه بیماری (شکل ۱) از زمان اسپورپاشی تا روز آخر نمونه- برداری در هر دو ژنوتیپ به صورت چشمی بررسی شد. بر اساس مشاهدات، سه روز بعد از مایه زنی اولین علائم فوق- حساسیت^۱ بر روی ژنوتیپ متحمل مشاهده شد که نشان دهنده تلاش گیاه برای جلوگیری از گسترش بیماری است. میزان بیان ژن پراکسیداز در ژنوتیپ متحمل در ساعات اولیه بعد از آلوده- سازی افزایش قابل توجهی داشت. به طوری که شش ساعت بعد از آلودگی میزان رونوشت ژن مذکور در ژنوتیپ متحمل ۱۸ برابر کنترل بود (شکل ۲). اگرچه در ساعات و روزهای بعدی افزایش بیشتری در تعداد رونوشت ها مشاهده نشد، اما در تمام مراحل بعد از آلودگی نسبت به نمونه شاهد به میزان قابل توجهی بیشتر بود. در ژنوتیپ حساس تجن افزایش تعداد رونوشت ها به میزان بسیار کمتر در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بود (شکل ۲). شش ساعت بعد از آلوده سازی تعداد رونوشت ها به بیش از شش برابر رسید، درحالی که بعد از آن دارای روند منظمی نبود و در نهایت سه هفته بعد از آلوده سازی که علائم نکروز و پیکنید به طور کامل در سطوح برگ ها نمایان شد، بیان این ژن نیز کاهش یافت.

سطح بیان ژن پلی فنول اکسیداز در ساعات اولیه در ژنوتیپ متحمل از روند منظمی پیروی نکرد، اما از روز دوم تعداد رونوشت ها به میزان چشمگیری افزایش یافت که با پاسخ فوق- حساسیت در روز سوم مطابقت نشان داد. بیشترین تعداد رونوشت ها نیز ده روز بعد از آلودگی مشاهده شد که به حدود ۱۸ برابر نسبت به کنترل رسید. در سه ساعت بعد از آلودگی

^۱ Hypersensitivity (HR)

افزایش ۸ برابری در رونوشت های ژن پلی فنول اکسیداز نسبت به کنترل مشاهده شد، اما این افزایش پایدار نبوده و در روز اول بعد از آلودگی کاهش شدید ۳۰ برابری نسبت به کنترل مشاهده شد که این کاهش رونوشت شدید در روزهای بعدی نشان دهنده شکست مقاومت ژنوتیپ حساس می باشد (شکل ۳). بنابراین در ساعات و روزهای بعد روند کاهش نسبت به ساعت سوم به خوبی حفظ شده و تعداد رونوشت ها هیچ گاه به مقدار اولیه نرسید که می توان علت این بی نظمی را رفتارهای بیمارگر دانست.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز قبل از آلودگی در ژنوتیپ متحمل بسیار بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (شکل ۴). در تمام دوره بعد از آلوده سازی این اختلاف به خوبی حفظ شد. در روزهای اولیه اختلاف زیادی بین دو ژنوتیپ مشاهده شد، هرچند این اختلاف به مرور کمتر شد تا جایی که در روزهای سوم تا پنجم به کمترین میزان خود رسید، اما مجدداً فعالیت پراکسیداز در ژنوتیپ متحمل از ژنوتیپ حساس پیشی گرفته و این اختلاف تا آخرین دوره نمونه برداری حفظ شد.

میزان فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در نمونه کنترل در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (شکل ۵). میزان فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در ساعات اولیه در ژنوتیپ متحمل افزایش خوبی را نسبت به نمونه کنترل داشت، اگرچه در روز دوم فعالیت آن کاهش اندکی یافت اما مجدداً و تا هفته اول رو به افزایش بود. کاهش اندکی که در هفته اول نسبت به نمونه کنترل رخ داد در روزهای بعدی دیده نشد، به طوری که تا پایان هفته سوم فعالیت آنزیم مجدداً افزایش یافته و در هفته سوم به بیشترین مقدار خود (۴۱/۰۴) رسید. افزایش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در نمونه- های برگی دو و سه هفته بعد از آلوده سازی نسبت به نمونه کنترل مشاهده شد.

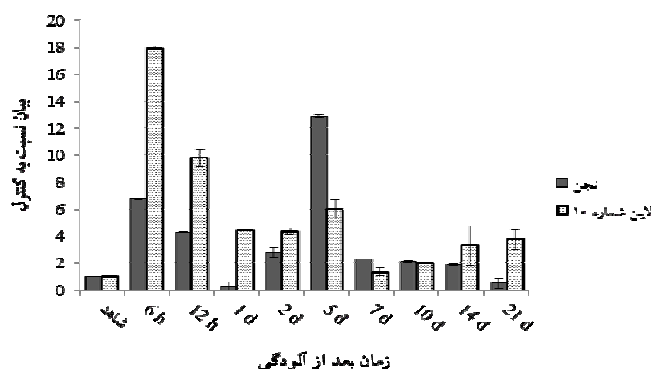
سطح فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در ژنوتیپ حساس تجن در شش ساعت اول و بعد از آن کاهش کمی نسبت به کنترل داشت. دوازده ساعت بعد از آلودگی میزان آن کمی افزایش یافته و تا پایان روز اول میزان آن حفظ شد. اما بعد از آن نیز مقدار اندکی افزایش در روز دوم مشاهده شده و در روز سوم به بیشترین میزانش در هفته اول یعنی ۲۵/۴۴ رسید. کاهش شدیدی در روز پنجم و هفتم رخ داد و میزان فعالیت این آنزیم به یک سوم فعالیت آن در

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در زمان واقعی

Primer name	Tm	%GC	Sequence (5'-3')	Product length (bp)	Accession number
<i>Ta</i> PPO. For	61.62	60.00	GCGACACCAGCTTCGTCTTC	227	AY596267.1
<i>Ta</i> PPO. Rev	61.52	57.14	GTACTCCTTCCGGCCCTTCTT		
<i>Ta</i> POD. For	61.57	60.00	GGTTGCTCTGCGACACCTTC	238	AF005087.1
<i>Ta</i> POD. Rev	61.67	55.00	CCTGCACGGTTGTGTGTGTGT		
<i>Ta</i> GAPDH For	60.49	50	CGGAAAGTTGACTGGAATGG	202	EF592180
<i>Ta</i> GAPDH Rev	60.97	55	GGACCTGTTGTCACCTGAA		



شکل ۱- مقایسه توسعه بیماری در ژنوتیپ حساس (راست) و ژنوتیپ متحمل (چپ)



شکل ۲- تغییرات سطوح رونوشت‌های ژن پراکسیداز در دو ژنوتیپ متحمل و حساس در پاسخ به بیماری سپتریای برگ گندم. ستون‌ها نمایانگر میانگین $\pm$ انحراف معیار است. (d. روز بعد از آلودگی، h) ساعت بعد از آلودگی

رونوشت‌های پراکسیداز در ژنوتیپ متحمل روند افزایش را نسبت به ژنوتیپ حساس و در طول دوره نمونه‌برداری به خوبی نشان داد. بیشترین افزایش در ژنوتیپ متحمل در ساعات اولیه بعد از آلوده‌سازی رخ داد و بیشترین کاهش تعداد رونوشت‌ها در ژنوتیپ حساس در روز اول بعد از آلوده‌سازی دیده شد. این

مقایسه با نمونه روز سوم رسید. با وجود این مجدداً افزایش یافته تا اینکه در هفته سوم به حداکثر میزان خود در طول دوره نمونه‌برداری رسید. در مقایسه فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در هفته دوم و سوم، افزایش قابل توجهی مشاهده شد. در این مطالعه، به کمک کارایی و دقت بالای روش Q-PCR تعیین کمیت رونوشت‌های دو ژن آنتی‌اکسیدان در پاسخ دفاعی گندم به بیماری *Septoria tritici blotch* و همچنین مقایسه فعالیت آنزیمی آنها در دو ژنوتیپ متحمل و حساس پرداخته شد. بدین منظور سطح بیان رونوشت‌های پراکسیداز و پلی‌فنول‌اکسیداز در هر دو ژنوتیپ اندازه‌گیری شد. افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در بیان این دو ژن در ژنوتیپ متحمل دیده شد و همانطور که پیش‌بینی می‌شد، این رابطه به طور مناسبی در محصول نهایی رونوشت‌ها، یعنی در فعالیت آنزیم‌ها حفظ شد. گزارشاتی مبنی بر افزایش فعالیت این دو آنزیم در نتیجه واکنش میان پاتوژن و میزبان در شرایط تنش‌های زنده وجود دارد (Ahl Goy et al. 1992).

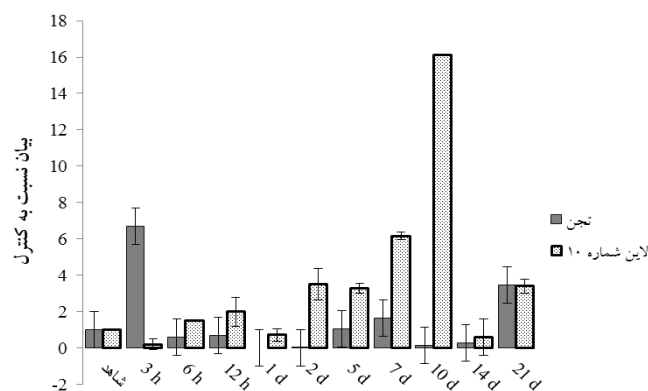
مرحله آخر تولید لیگنین منجر به افزایش مقاومت می شود (Lagrimini et al. 1987). طبق تحقیق (Van Huistee 1987) این کارکرد پراکسیداز با کمک آب اکسیژنه و رادیکال های مونو لیگنال صورت می گیرد. تعداد کم و نوسانات شدید رونوشت های پراکسیداز که در ژنوتیپ حساس مشاهده شد تایید کننده تلاش ناموفق گیاه برای مقابله با بیماری و کاهش ROS تولیدی طی تنش می باشد.

تعداد رونوشت های پلی فنول اکسیداز نیز در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود و بیشترین افزایش در ژنوتیپ متحمل در روز دهم بعد از آلوده سازی و بیشترین کاهش در ژنوتیپ حساس یک روز بعد از آلوده سازی مشاهده شد. بنابراین این نتایج مبین نقش این ژن در مسیر تحمل می باشد.

چنانچه مشاهده شد رونوشت های پلی فنول اکسیداز در ژنوتیپ متحمل پس از ظهور علائم فوق حساسیت (مشاهدات گلخانه ای نویسنده) افزایش مناسبی داشته است. ROS نقش حیاتی بسیاری طی بیماری گیاهی دارند مثل پاسخ فوق حساسیت که واکنش ناسازگاری بین میزبان و بیمارگر است (Baker and Orlandi 1995; Mittler et al. 1996). همچنین قادرند انتشار آلودگی را با تقویت دیواره سلولی گیاه و یا با کشتن بیمارگر محدود کنند (Willekens et al. 1995; Wu et al. 1997) و نهایتاً می توانند به عنوان مولکول های سیگنال طی مقاومت اکتسابی موضعی و سیستمیک عمل کنند (Alvarez et al. 1994; Chamnongpol et al. 1998).

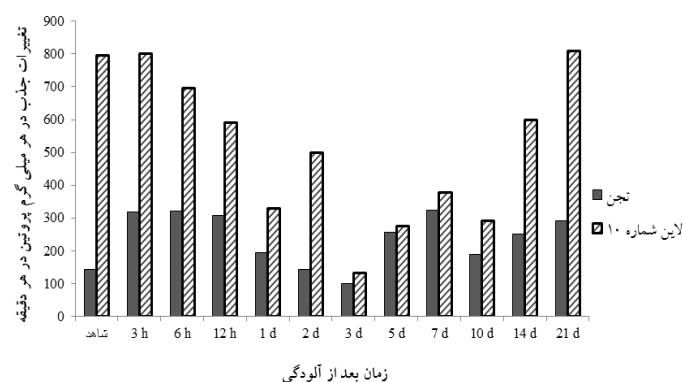
بررسی میزان فعالیت آنزیم های اکسیداتیو پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز نشان داد که بیشترین میزان فعالیت مربوط به آنزیم های ذکر شده در ژنوتیپ متحمل است. به نظر می رسد روند تغییرات در مرحله رونویسی نشانگر افزایش رونوشت ها و تعداد بیشتر رونوشت ها در ژنوتیپ متحمل نسبت به ژنوتیپ حساس است و این روند در مرحله فعالیت آنزیمی که پس از ترجمه به پروتئین اتفاق می افتد به خوبی حفظ شده است.

Debona et al. (2012) به بررسی تغییرات شیمیایی در برگ های گندم آلوده به *Pyricularia oryzae* پرداختند. آن ها بیان داشتند که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و



زمان بعد از آلودگی

شکل ۳- تغییرات سطوح رونوشت های ژن پلی فنول اکسیداز در دو ژنوتیپ متحمل و حساس در پاسخ به بیماری سپتوریای برگ گندم ستون ها نمایانگر میانگین $\pm$ انحراف معیار است. (d. روز بعد از آلودگی و h) ساعت بعد از آلودگی

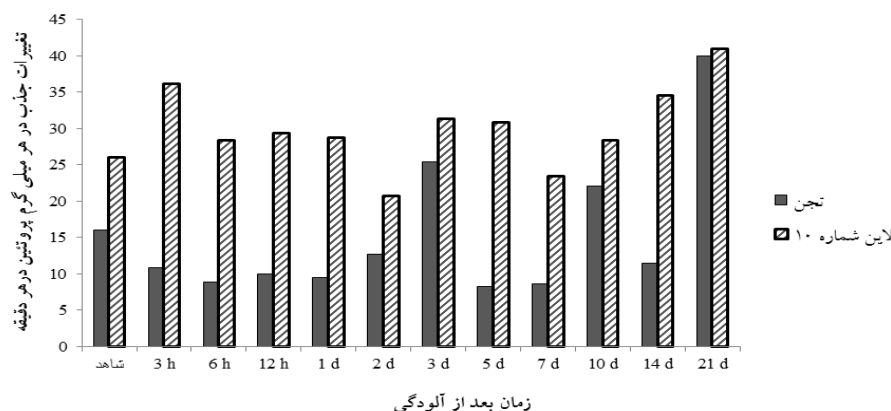


زمان بعد از آلودگی

شکل ۴- تغییرات سطوح فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو ژنوتیپ متحمل و حساس در پاسخ به بیماری سپتوریای برگ گندم. (d. روز بعد از آلودگی و h) ساعت بعد از آلودگی

نتایج نقش این آنزیم اکسیداتیو را در تنش زنده بیماری لکه برگی سپتوریایی گندم نشان می دهد.

افزایش تعداد رونوشت های پراکسیداز در مقابله با بیماری سپتوریای برگی با نتایج (Adhikari et al. 2007) که افزایش میزان رونوشت های پراکسیداز در دو رقم متحمل تادینا و w7984 را بین سه تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی به سپتوریای برگی گزارش کردند کاملاً منطبق است. آنزیم پراکسیداز با ایجاد کراس لینک و استحکام دیواره سلولی نقش خود را به عنوان نشانگری جهت القا مقاومت در گیاه ایفا می کند (Kuc 2001). دخالت این آنزیم در



شکل ۵- تغییرات سطوح فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در دو ژنوتیپ متحمل و حساس در پاسخ به بیماری سپتوریای برگ گندم. d. روز بعد از آلودگی و h. ساعت بعد از آلودگی

ها در ژنوتیپ حساس به اندازه کافی نبوده و فعالیت آنزیمی آن در مقابله با اثرات ROS ناموفق بوده است. تایید نقش این دو ژن در فرآیند تحمل؛ در مطالعات بعدی کمک مفیدی برای گزینش و انتقال ژنهای مقاومت خواهد کرد. مطالعات صورت گرفته در ارقام حساس و متحمل ایرانی به بیماری سپتوریای برگ گندم در زمینه شناسایی ژنهای دخیل در مقاومت اندک است. به همین علت در این پژوهش به تایید و بررسی سطوح بیان دو ژن آنتی-اکسیدان مهم پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز و همچنین فعالیت آنزیمی آنها پرداخته شد که گام مهمی در درک فرایند تحمل به این بیماری مهم گندم در کشورمان محسوب می شود. تعیین ژن-های دیگری که در تحمل نقش دارند و تعیین سطوح تظاهر آنها و همچنین اندازه گیری سطح ROS آنها در این دو ژنوتیپ و سایر ژنوتیپ های با اهمیت گندم نان ایرانی می تواند از گام های بعدی در این راستا باشد.

گلوکاتایون-اس ترانسفراز در هر دو رقم حساس و نیمه متحمل آلوده شده با *Pyricularia oryzae* در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافتند و میزان افزایش در رقم نیمه متحمل BRS 229 نسبت به رقم حساس BR 18 در روز چهارم پس از آلودگی بیشتر بود. طبق گزارش Debona et al. (2012) سیستم کارآمد آنتی-اکسیدان در حذف ROSهای مازاد تولید شده طی آلودگی با *Pyricularia oryzae*، تخریب سلولی توسط قارچ را محدود می کند، بنابراین به مقاومت گندم به بلاست کمک می کند. نتایج نشان داد که رابطه بین رونوشت های پلی فنول اکسیداز و پراکسیداز در ژنوتیپ متحمل و حساس در مرحله بعدی و طی فعالیت آنزیمی آنها به خوبی حفظ شده است. افزایش تعداد رونوشت ها در ساعات اولیه آلودگی در ژنوتیپ متحمل به فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و جلوگیری از افزایش ROS منجر شده و رشد مطلوب گیاه را تضمین کرده است. در صورتی که تعداد رونوشت

منابع

- Abrinbana M, Mozafari J, Shams-bakhsh M, Mehrabi R (2010) Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations in Iran. *Plant Pathology* 59: 829-838.
- Adhikari TB, Balaji B, Breeden JD, Goodwin SB (2007) Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 55-68.
- Ahl Goy P, Felix G, Métraux JP, Mein JRF (1992) Resistance to disease in the hybrid *Nicotian glutinosa*×*Nicotiana debneyi* is associated with high

- constitutive levels of Beta1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and poly phenol oxidase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 11-21.
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784.
- Baker CJ, Orlandi EW (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299-321.

- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montague M, Inzé D (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *European Molecular Biology Organization* 10:1723-1732.
- Bowler C, Montagu MV, Inzé D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43:83-116.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H Jr, Van Montagu M, Inzé D, Camp WV (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 95: 5818-5823
- Debona D, Rodrigues FÁ, Rios JA, Nascimento KJ (2012) Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Piricularia oryzae*. *Phytopathology* 102:1121-1129.
- Eyal Z, Scharen AL, Van Ginkel M (1987) The septoria diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico press 52 pags.
- Fridovich I (1991) Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism: Proceedings, 6th Annual Penn State Symposium in Plant Physiology. American Society of Plant Physiologists.
- Fucci L, Oliver CN, Coon MJ, Stadtman ER (1983) Inactivation of metabolic enzymes by mixed-function oxidation reaction: Possible implication in protein turnover and ageing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 80:1521-1525.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine, 3rd edn. Oxford University Press, New York.
- Hardwick NV, Jones DR, Slough JE (2001) Factors affecting diseases of winter wheat in England and Wales. *Plant Pathology* 50:453-462.
- Iiyama K, Lam TBT, Stone BA (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology* 104: 315-320.
- Kendall EJ, McKersie BB (1989) Free radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat. *Physiologia Plantarum* 76:86-94.
- Kuc J (2001) Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology* 107: 7-12.
- Lagrimini LM, Bukhart W, Moyer M, Rothstein S (1987) Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 84: 7542-7546.
- Lo SCC, De Verdier K, Nicholson RL (1999) Accumulation of 3 deoxyanthocyanidin phytoalexins and resistance to *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *Molecular Plant Pathology* 55:263-273.
- Luthra YP, Ghandi SK, Joshi UN, Arora SK (1988) Total phenols and their oxidative enzymes in sorghum leaves resistant and susceptible to *Ramulispora sorghicola* Harris. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 23:393-400.
- Mayer AM, Harel E (1991) Phenol oxidases and their significance in fruit and vegetables. *Food Enzymology* 1:373-398.
- Mittler R, Shulaev V, Sesar M, Lam E (1996) Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. *Plant Cell* 8: 1991-2001.
- Mohammadi M, Kazemi H (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Sciences* 162:491-498.
- Monk LS, Fagerstedt KV, Crawford RMM (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiologia Plantarum* 76:456-459.
- Sato I, Zu J, Nishikawa S, Kashimura N (1993) Depolymerization of hyaluronic acid by D-fructose 6-phosphate. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57:2005-2009.
- Van Huistee RB (1987) some molecular aspects of plant peroxidases: Biosynthetic studies. *Annual Review Plant Physiology* 38: 205-219.
- Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1: 207-228.
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Fitzsimmons JLKC, Levine EB, Raskin I, Shah DM (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic. *Plant Physiology* 115: 427-435.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: A comparison of CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* 33:337-349.