

تجزیه عملکردی QTL های مرتبط با مقاومت میزبانی و غیر میزبانی در گیاه جو به قارچ های عامل زنگ برگی با استفاده از نشانگرهای SNP

توالی یابی

Functional analyses of QTLs conferring host and non-host resistance of barley to leaf rust fungi using sequence- based SNP markers

انسبه میرزاعلی بابایی^{۱*}، حسین جعفری^۲، محمد رضا عظیمی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه زنجان

۲- دانشیار، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران

۳- استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه زنجان

Mirza Ali Babaei E^{*1}, Jafary H², Azimi MR³

1- MSc Student, Department of Plant Breeding, University of Zanjan

2- Associate Professor, Plant Protection Research Department, Agricultural and
Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Plant Breeding, University of Zanjan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: e.babaei@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

استفاده از گیاهان مقاوم، بهترین و مؤثرترین راه برای کنترل بیماری هایی مانند زنگ ها است. مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی دو نوع از مقاومت ذاتی گیاهان در برابر عوامل بیماری زا است که به ترتیب در مقابل پاتوژن های سازگار و ناسازگار بروز می یابد. یکی از راه های اطلاع از ماهیت ژن های دخیل در این دو نوع مقاومت، استفاده از تجزیه عملکردی QTL های مقاوم می باشد. برای این منظور، QTL های مرتبط با مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی در جو بر علیه تعدادی از قارچ های عامل زنگ برگی که در مطالعات قبلی در دو توده نقشه یابی Vada × Susptrit و Cebada Capa × QTL ها با نشانگرهای SNP بررسی شد. استخراج شد و هموقوعی نشانگرهای مرتبط با هر یک از QTL ها با نشانگرهای SNP بررسی شد. نشانگرهای SNP دارای هموقوعی بالا به عنوان نشانگرهای مرتبط با مقاومت انتخاب و با استفاده از توالی هر یک از نشانگرها نسبت به بلاست آن ها در بانک های اطلاعاتی اقدام شد. با بررسی همولوژی توالی نشانگرهای SNP با ژن های موجود در بانک های اطلاعاتی، خصوصیات هر یک از ژن های با تشابه بالا از نظر عملکرد، دمین های حفاظت شده و ساختار ژن ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی ها نشان داد بیش تر ژن های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی در فعالیت انتقال، هدایت پیام و رونویسی DNA مشارکت دارند و از نظر عملکرد مولکولی، مشابه اند. مشاهده شد، محصولات هر دو گروه ژن در محل غشای پلاسمایی، هسته و کلروپلاست، فعالیت دارند و فرایندهای رونویسی، متابولیک، پاسخ به تنش و پردازش RNA، مشابه اند. نتایج این تحقیق نشان داد که علاوه بر مکانیسم، احتمالاً ژنتیک دو نوع مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی شباهت های زیادی دارد.

واژه های کلیدی

تجزیه عملکردی

جو

مقاومت

QTL

با وجود پیشرفت های قابل توجه در استراتژی های کنترل بیماری های گیاهی، تأمین مواد غذایی در جهان، هنوز هم توسط بسیاری از پاتوژن ها و حشرات تهدید می شود (John et al. 2003). زنگ ها یکی از انواع پاتوژن های قارچی هستند که به لحاظ گسترش جهانی، اهمیت اقتصادی، تعدد میزبان ها و اختصاص یافتگی میزبانی دارای جایگاه ویژه ای بین عوامل بیماری زا هستند و از مخرب ترین بیماری های غلاتی مانند گندم، یولاف و جو به شمار می روند (Mehravaran 1998).

زنگ برگگی جو با عامل *Puccinia hordei* یکی از مهم ترین بیماری های جو است که سالانه به طور قابل ملاحظه ای عملکرد آن را کاهش می دهد. زنگ برگگی در نواحی جو کاری بهاره و زمستانه در ایالت متحده امریکا، آفریقا، اروپا، نیوزیلند، استرالیا و بعضی از کشورهای آسیایی انتشار گسترده ای دارد و در مناطقی که رسیدن محصول به تأخیر می افتد، خسارت زیادی به محصول جو وارد می کند (Mathre 1985). کاهش محصول در اثر زنگ برگگی در ارقام حساس، ۳۲ درصد گزارش شده است (Marcel 2007). استفاده از ارقام مقاوم، بهترین و مؤثرترین راه کنترل بیماری است (Eyal 1981). با توجه به ماهیت تعامل گیاه-پاتوژن، گیاهان دو مکانیسم دفاعی مهم شامل مقاومت میزبانی و مقاومت غیرمیزبانی را توسعه داده اند (Heath 2000). مقاومت میزبانی به دو شکل مقاومت فوق حساسیت (Hypersensitive resistance) و مقاومت نسبی (Partial resistance) بروز می یابد که به ترتیب با ژن های بزرگ اثر و کوچک اثر کنترل می شوند (Niks et al. 2011). مقاومت غیرمیزبانی به علت پایداری بیشتری که دارد، از یک گیاه، در برابر بسیاری از پاتوژن های بالقوه محافظت می کند (Niks and Marcel 2009). این نوع از مقاومت در طیف وسیعی توسط همه گیاهان یک گونه در برابر یک پاتوژن خاص رخ می دهد (Heath 2000).

دست یابی به موفقیت در برنامه های اصلاحی به منظور افزایش کارایی ارقام مقاوم به بیماری ها، مستلزم آگاهی و اطلاعات کافی در زمینه ماهیت ژنتیکی و عملکرد ژن های مؤثر در ایجاد مقاومت است. یک ابزار بسیار مؤثر برای مطالعه مقاومت به بیماری ها، نقشه یابی مکان های ژنی مرتبط با مقاومت کمی (QTL Mapping)

است (Young 1996). مطالعات انجام گرفته نشان داده که مقاومت نسبی برعلیه زنگ ها، در غلاتی مانند گندم و جو، ماهیتی پلی ژنیک داشته و به وسیله ژن های کوچک اثر (QTL)، کنترل می شوند (Qi et al. 1998). براساس تحقیقات انجام یافته، چندین QTL مرتبط با مقاومت نسبی و مقاومت غیر میزبانی به قارچ های عامل زنگ برگگی در جو مکان یابی شده است (Jafary et al. 2008; Jafary et al. 2006). در این مطالعات همپوشانی های قابل توجهی در خصوص QTL های دخیل در مقاومت میزبانی و غیر میزبانی نشان داده شده است. با این حال از آنجایی که QTL ها در واقع منطقه ای از ژنوم را، که با صفت مورد مطالعه ارتباط دارد مشخص می کنند و اطلاعات دیگری در خصوص ماهیت، ساختار و توالی ژن ها ارائه نمی کنند، با مکان یابی آن ها عملاً اطلاعاتی درخصوص عملکرد ژن های دخیل در مقاومت حاصل نمی شود. یکی از راه های به دست آوردن این اطلاعات استفاده از تجزیه عملکردی QTL های مکان یابی شده است که به وسیله آن می توان ساختار و ماهیت ژن ها را مطالعه و درخصوص تشابه یا تمایز ساختاری و عملکردی ژن های دخیل در مقاومت میزبانی و غیر میزبانی اظهار نظر نمود.

از آنجایی که بیوانفورماتیک برنامه ای از تکنولوژی اطلاعات است که داده های مربوط به ژنوم گیاهی را مدیریت می کند (Singh et al. 2011)، می توان از آن به عنوان ابزاری برای بررسی عملکردی ژن ها و QTL های دخیل در مقاومت استفاده کرد. در میان مطالعات بیوانفورماتیکی، تعیین گروه های کارکردی یک ابزار مفید و جامع برای تفسیر کارکردی اطلاعات ژنوم محسوب می شود (Rupp 2003). یکی دیگر از ابتکارات بیوانفورماتیکی، هستی شناسی ژن است که یک زبان سیستماتیک برای توصیف ویژگی ژن ها و محصولات ژنی در سه حوزه کلیدی عملکرد مولکولی، فرایند بیولوژیک و ترکیبات سلولی می باشد (Diehl et al. 2004; Eilbeck et al. 2007). در این پژوهش با بررسی دمن های حفاظت شده و تجزیه هستی شناسی ژن اقدام به گروه بندی ژن ها از نظر عملکرد شد. تجزیه بر اساس دمن های پروتئینی تأثیر عمیقی بر تکمیل اطلاعات مربوط به پروتئین ها

¹ Minor genes

می‌گذارد (Copley et al. 2002). تحقیق پیش رو، با هدف تجزیه عملکردی QTL های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی در جو، نسبت به قارچ‌های عامل زنگ، مشخص کردن ژن‌های کاندید و تعیین میزان هم پوشانی بین ژن‌های کاندید در مقاومت میزبانی و غیر میزبانی صورت گرفت. در این مطالعه سعی شد تا به این پرسش پاسخ داده شود که آیا ژن‌های کاندید مرتبط با QTL های دخیل در مقاومت میزبانی و غیر میزبانی به گروه‌های متفاوتی تعلق دارند یا خیر؟ برای این منظور، QTL های مقاومت میزبانی و غیر میزبانی در برابر قارچ‌های مختلف زنگ که توسط (Qi et al. 1998), Jafary et al (2006; 2008) و Marcel et al. (2007) نقشه‌یابی شده بودند، جمع‌آوری و با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی به بررسی عملکرد ژن‌های این QTL ها پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

اطلاعات مربوط به QTL های اعطا کننده مقاومت میزبانی در جو نسبت به قارچ عامل زنگ برگری جو (*Puccinia hordei*) و QTL های مرتبط با مقاومت غیر میزبانی در جو نسبت به قارچ‌های عامل زنگ *Puccinia hordei-murini*، *Puccinia tritici*، *Puccinia tritici-persistens*، *Cebada caba* × *Susptrit* و *Puccinia tritici-duri*، *Puccinia coronata agropyryna*، *Puccinia tritici*، *Puccinia graminis f.sp. tritici* در جمعیت *Susptrit* × *Vada* حاصل مطالعات (Marcel et al. 2007) و Jafary et al. (2006) از بانک اطلاعاتی (<http://www.wheat.graingenes.org/>) GrainGenes 2.0 (pw.usda.gov/) استخراج شد. جمعیت RILs تحت عنوان *V* × *Su* حاصل از تلاقی *Susptrit* و *Vada* با ۱۵۲ لاین و نقشه لینکاژی با ۴۵۰ مارکر (Jafary et al. 2006) و جمعیت RILs تحت عنوان *CC* × *Su* حاصل از تلاقی بین *Susptrit* و *Cebada Capa* با ۱۱۳ لاین، نقشه لینکاژی با ۴۵۹ مارکر (Jafary et al. 2008) در دانشگاه واخنینگن هلند تهیه شده‌است.

در سال ۲۰۱۲ تعداد ۹۴ لاین به همراه دو والد توده نقشه‌یابی *Su* × *V* و ۹۲ لاین به همراه والدین توده *CC* × *Su* در دانشگاه واخنینگن هلند با استفاده از نشانگرهای Sequenced based SNP

ژنوتایپینگ شدند که نسخه‌ای از این داده‌ها جهت تجزیه‌های اخیر در اختیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان قرار گرفت. در مجموع تعداد ۲۸۸۷ نشانگر SNP پلی‌مورفیک برای توده نقشه‌یابی *Su* × *V* و تعداد ۲۴۸۵ نشانگر پلی‌مورفیک برای توده نقشه‌یابی *Su* × *CC* توسعه داده شد. فایل اطلاعات نشانگرهای SNP علاوه بر الگوی تفرق نشانگرها دارای اطلاعات لازم در خصوص توالی پروب‌های مربوطه بود. علاوه بر آن فایل داده دیگری برای دست‌یابی به توالی کامل تری از ژن‌ها یا EST های مرتبط با هر یک از پروب‌ها در دسترس قرار گرفت. به این ترتیب برای هر یک از نشانگرهای SNP اطلاعات کامل تری از توالی پروب‌ها و ژن‌های مرتبط تهیه شد.

با بررسی هم‌وقوعی در نتایج تفرق نشانگرهای SNP با تفرق نشانگرهای AFLP مرتبط با هر یک از QTL های مقاومت میزبانی و غیر میزبانی، SNP های دارای هم‌وقوعی^۱ بالا با نشانگرهای مجاور مرتبط با QTL ها انتخاب و از روی توالی SNP ها، به بررسی عملکرد هر یک از ژن‌ها پرداخته شد.

با مراجعه به سایت NCBI^۲ و استفاده از الگوریتم BLASTX، توالی مربوط به هر یک از نشانگرهای SNP با توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده برای گیاهان جو، برنج، گندم و براکی‌پودیوم مقایسه و در صفحه نتایج حاصل از BLAST، توالی که کم‌ترین E-Value را نشان می‌داد به عنوان مشابه‌ترین توالی پروتئینی با توالی مورد نظر انتخاب و اطلاعات مربوط به آن ثبت شد. در گام بعدی با استفاده از این اطلاعات، اقدام به تعیین گروه‌های کارکردی ژن‌های اعطا کننده مقاومت شد. برای این منظور، دو روش مورد استفاده قرار گرفت:

در روش اول با مراجعه پایگاه اطلاعاتی NCBI و قسمت CD search، دمین‌های حفاظت شده هر یک از ژن‌ها تعیین شد و با استفاده از اطلاعات سایت Pfam و مطالعه مقالات مرتبط، دمین‌هایی که از نظر عملکرد و وظیفه مشابه بودند در یک گروه قرار گرفتند.

در روش دوم با استفاده از برنامه اینترنتی DAVID bioinformatics Resources 6.7 و جستجو در پایگاه اطلاعاتی

¹ Association

² <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

می‌دهد که در گیاه جو ژن‌های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی به پاتوژن‌های عامل زنگ با اعمال فرایندهای سلولی مشابهی منجر به مقاومت گیاه در برابر پاتوژن‌ها می‌شوند و نکته قابل توجه این است که هر دو گروه ژن‌ها در سه فرایند انتقالات غشایی، هدایت سیگنال و رونویسی، بیش‌ترین فعالیت را داشتند. فعالیت ژن‌های مقاومت میزبانی در گروه‌های عملکردی رونویسی، ترجمه و تأمین انرژی، نسبت به ژن‌های مقاومت غیر میزبانی بیشتر بود. این اختلاف در مورد ژن‌های مقاومت غیرمیزبانی، در گروه کارکردی انتقال دهنده به چشم می‌خورد. توزیع ژن‌ها در سایر گروه‌های عملکردی، بین دو گروه ژن اختلاف چندانی نداشت.

بررسی ژن‌های مقاومت، از نظر دمین‌های حفاظت شده، با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص کرد که، دمین‌های AAA و DEAD متعلق به خانواده بزرگ¹ P-loop_NTPase، در ساختار هر دو گروه ژن مقاومت میزبانی و مقاومت غیر میزبانی وجود دارند. پروتئین‌های AAA+ در تعمیر وابسته به انرژی ماکرومولکول‌ها دخالت دارند و در فرایند باز کردن پیچش‌های پروتئین و تجزیه آن، بیورنر پراکسی‌زوم، نوترکیبی و همانندسازی DNA درگیر می‌شوند (Snider et al. 2008). در یک مطالعه ژن *OsBIRH1* در برنج، که پروتئین RNA هلیکاز جعبه DEAD را کد می‌کند کلون و بررسی شد و نتایج نشان داد که *OsBIRH1*، یک RNA هلیکاز مربوط به جعبه DEAD تولید می‌کند که نقش مهمی در دفاع در برابر تنش زنده و غیر زنده بازی می‌کند. بر اساس نتایج مطالعه مذکور، RNA هلیکازهای جعبه DEAD به‌عنوان واسطه متابولیسم RNA در تنظیم پاسخ دفاعی گیاه فعالیت می‌کنند (Li et al. 2008).

هم‌چنین بر اساس نتایج به‌دست آمده از پایگاه اطلاعاتی NCBI، مشخص شد، دمین 2 ABC_membrane متعلق به خانواده بزرگ ABC_membrane با کد CL00664 نیز در ساختار هر دو گروه ژن مورد مطالعه، وجود دارد.

انتقال دهنده‌های ABC پروتئین‌های انتقال دهنده غشایی هستند که از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP برای انجام فرآیندهای بیولوژیکی خاص مانند انتقالات غشایی و ترمیم DNA و ترجمه RNA، استفاده می‌کنند (Davidson et al. 2008). نشان داده شده

Uniprot، هستی شناسی ژن‌ها در سه حوزه عملکرد مولکولی، فرایندهای بیولوژیک و اجزای سلولی بررسی شده و پروتئین‌هایی که از لحاظ هستی شناسی ژن در هر یک از سه حوزه مشابه بودند در یک گروه قرار گرفتند. سرویس اینترنتی DAVID شاخص P-Value را برای ژن‌های غیر میزبانی < 0.05 و برای ژن‌های مقاومت میزبانی < 0.1 در نظر گرفت.

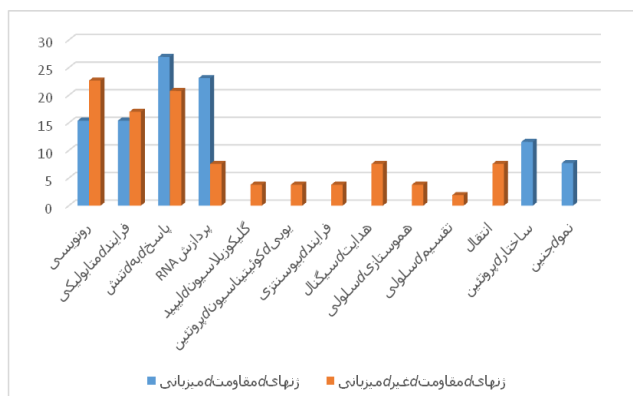
نتایج

تشابه توالی نشانگرهای SNP که به‌عنوان ژن کاندید انتخاب شده بودند، با استفاده از الگوریتم BLASTX در پایگاه اطلاعاتی NCBI بررسی شد و نتایج نشان داد که توالی ۷۸ درصد از ژن‌های مرتبط با مقاومت میزبانی و ۶۹ درصد از ژن‌های مرتبط با مقاومت غیر میزبانی با توالی‌های پروتئینی موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI دارای تشابه بالایی (بین ۱۰۰ - ۸۰ درصد) است. این توالی‌های مشابه با E-Value های کمتر از 1×10^{-5} انتخاب شدند. نتایج جستجوی تشابه توالی برای ۲۲ درصد و ۳۱ درصد باقی‌مانده از توالی ژن‌های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی، بسیار ضعیف بود.

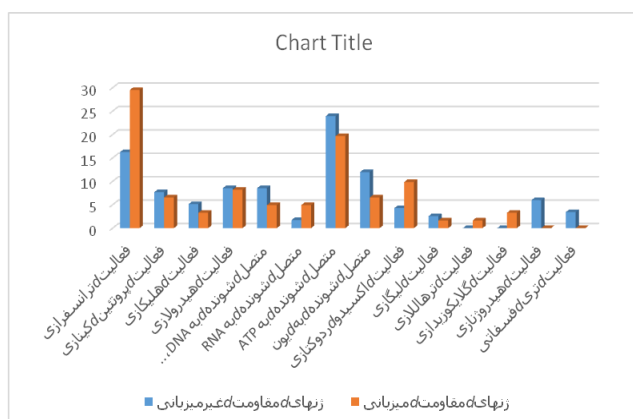
براساس اطلاعات به‌دست آمده از بررسی دمین‌ها، دمین‌های مربوط به ژن‌های مقاومت میزبانی و غیر میزبانی به پاتوژن‌های عامل زنگ، در ۸ گروه عملکردی انرژی، انتقال دهنده‌ها (ترانسفراز و ترانسپورتر)، متابولیسم، پاسخ به تنش، رونویسی و ترمیم DNA، هدایت سیگنال، فعالیت هیدرولازی، ترجمه و پردازش RNA قرار گرفتند. تعدادی از دمین‌ها عملکرد شناخته شده‌ای نداشته و در پایگاه‌های اطلاعاتی متعلق به یک ابر خانواده بودند از این رو آن‌ها در یک گروه به‌نام ناشناخته، دسته بندی شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این گروه‌بندی، مشخص شد ژن‌های مرتبط با مقاومت غیرمیزبانی به پاتوژن عامل زنگ، بیش‌تر از طریق کنترل فرایند هدایت سیگنال و نقل و انتقالات داخل سلولی، مکانیسم‌های مقاومت را کنترل می‌کنند. هم‌چنین نتایج این بررسی نشان داد، بیش‌تر ژن‌های مقاومت میزبانی در گروه‌های عملکردی رونویسی و ترمیم DNA، انتقالات غشایی یا درون سلولی و هدایت سیگنال، فعالیت دارند. این یافته نشان

¹ Clan

ترانسفرای داشته و تعداد قابل توجهی هم پروتئین های متصل شونده به ATP را کد می کردند. تعداد ژن هایی که در فعالیت پروتئین کینازی، هلیکازی و هیدرولازی مشارکت داشتند، در هر دو گروه مشابه بود. فعالیت ترهالازی و گلاکوزیدازی در بین ژن های مقاومت میزبانی و فعالیت هیدرولازی و تری فسفاتازی در بین ژن های مقاومت غیر میزبانی مشهود بود. بررسی ژن ها از نظر ترکیبات سلولی نشان داد غشای پلاسمایی، هسته و کلروپلاست، محل فعالیت بیشتر پروتئین های مربوط به ژن های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی است. در این مطالعه سهم سیتوزول و کمپلکس اسپیلیسوزومی به عنوان مکانی برای فعالیت محصولات هر دو گروه ژن کم تر بود. نتایج هم چنین نشان داد که شبکه آندوپلاسمی، محل فعالیت محصول ژن های مقاومت غیر میزبانی است و فقط ژن های مقاومت میزبانی در میتوکندری فعالیت دارند. (شکل های ۱ تا ۳).



شکل ۱- میزان فعالیت ژن های مقاومت میزبانی و غیر میزبانی در فرایندهای بیولوژیک (بر حسب درصد)



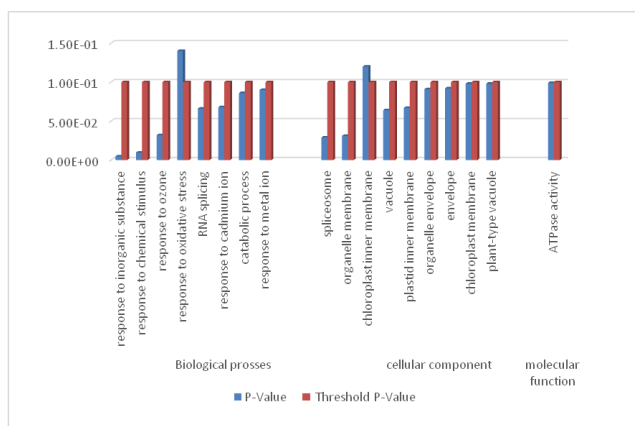
شکل ۲- مقایسه عملکرد مولکولی ژن های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی

است که انتقال دهنده های ABC برای پاسخ به تنش های غیر زنده، مقاومت در برابر پاتوژن و تعامل گیاه با محیط خود، مورد نیاز هستند (Kang et al. 2011).

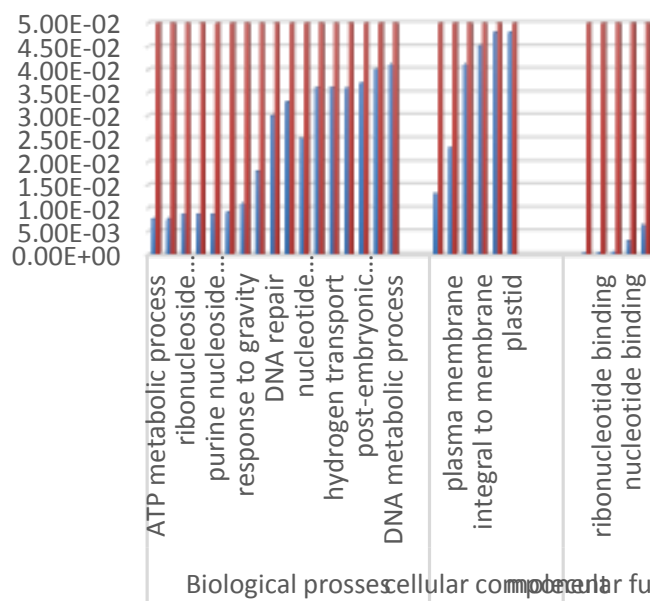
بررسی ها نشان داد، برخی از ژن های مقاومت میزبانی و ژن های مقاومت غیرمیزبانی، در ساختار خود، دمین های Pkinase و Pkinase_tyr (متعلق به خانواده ژنی CL0016 PKinase) دارند. نتایج مطالعات محققان نشان می دهد پروتئین کینازها در ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن ها، نقش مهمی دارند. اغلب کینازها به عنوان تنظیم کننده مسیرهای انتقال سیگنال هستند که در آن ها یک کیناز، کیناز بعدی را فعال می کند. این عمل پی در پی، سیگنال را از سطح سلول به پروتئین هدف می رساند و منجر به پاسخ سلولی مناسب می شود (Gaestel et al. 2009). پروتئین کینازها، در طول شناسایی پاتوژن و سپس فعال سازی سیستم دفاعی گیاهان نقش مهمی دارند (Romeis 2001).

بررسی ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI، مشخص کرد، دمین SNARE متعلق به خانواده (CL0445), SNARE-fusion, LRR8 و LRR (CL0022) متعلق به خانواده LRRNT و دمین F-box متعلق به خانواده F-box (CL00646) در ساختار هر دو گروه ژن وجود دارند. به نظر می رسد، وجود این دمین ها و دمین های دیگر در ساختار ژن های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی، یکی از عواملی است که باعث عملکرد مشابه این ژن ها می شود. بررسی هستی شناسی ژن های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی در پایگاه اطلاعاتی Uniprot، مشخص کرد که فعالیت هر دو گروه ژن، در فرایندهای بیولوژیک رونویسی، متابولیک، پاسخ به تنش و پردازش RNA، بیش تر است. هم چنین نتایج نشان داد که بیشتر ژن های مربوط به مقاومت میزبانی در فرایند پردازش RNA دخالت دارند. در صورتی که بیش ترین فعالیت ژن های مقاومت غیرمیزبانی مربوط به رونویسی است. در این تحقیق مشخص شد که مشارکت در فرایندی مانند هدایت سیگنال، بیوستز، تقسیم سلولی و هموستازی فقط در بین ژن های مقاومت غیر میزبانی دیده می شود. در حالی که برخی از ژن های مقاومت میزبانی، در شکل گیری ساختار سوم پروتئین مداخله می کنند. در حوزه عملکرد مولکولی بیش تر ژن های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی رفتار مشابهی داشتند. بیش تر ژن ها در هر دو نوع مقاومت فعالیت

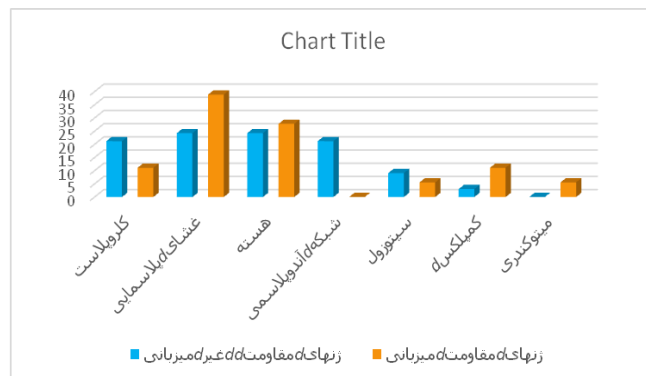
آنزیم‌های متیل ترانسفراز^۴ و گلوکاتینون -اس- ترانسفراز^۵ توسط ژن‌های مقاومت میزبانی به پاتوژن‌های عامل زنگ کد می‌شوند. نتایج همچنین نشان داد بین ترانسفرازها، پروتئین‌های انتقال دهنده لیپید نیز در مقامت گیاه جو نسبت به پاتوژن‌های عامل زنگ، نقش دارند. (Shah (2005) در گزارش مطالعات خود بیان می‌کند که لیپیدها، مکانیسم تعامل گیاه - پاتوژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند و طبق اظهارات (Sing et al. (2002) لیپیدها برای فعال شدن پاسخ دفاعی گیاهان ضروری هستند.



شکل ۴- تجزیه هستی شناسی ژن‌های مقاومت غیر میزبانی با $P\text{-Value} < 0.05$



شکل ۵- آنالیز هستی شناسی ژن‌های مقاومت غیر میزبانی با $P\text{-Value} < 0.05$



شکل ۳- محل فعالیت محصولات ژن‌های مقاومت میزبانی و غیر میزبانی

نتایج بررسی هستی شناسی ژن‌های مقاومت غیر میزبانی با استفاده از برنامه اینترنتی DAVID، تنوع زیادی را نشان داد. در حوزه فرایندهای بیولوژیکی، فعالیت‌هایی نظیر فرایندهای متابولیکی، بیوسنتزی و متابولیسم DNA و در حوزه عملکرد مولکولی، فعالیت ترانسفراز و متصل شونده به نوکلئوتید از نظر آماری معنی‌دار بودند. از نظر محل فعالیت ژن‌های مقاومت، اجزای سلولی نظیر کلروپلاست و غشای پلاسمایی $P\text{-Value} < 0.05$ را نشان می‌داد (شکل ۴).

عملکرد ژن‌های مرتبط با مقاومت میزبانی نسبت به قارچ‌های عامل زنگ، با $P\text{-Value} < 0.1$ بررسی شد. این بررسی مشخص کرد که در حوزه فرایندهای بیولوژیکی، فعالیت‌های پاسخ به مواد شیمیایی و مواد غیرآلی پردازش RNA، پاسخ به یون‌های کادمیوم و یون‌های فلزی و همچنین فرایندهای کاتابولیکی معنی‌دار هستند. نتایج بررسی‌ها همچنین مشخص کرد که ژن‌های مقاومت در اندامک‌هایی نظیر غشای پلاسمایی، اسپیلیسوزوم، واکوئل و غشای کلرو پلاست فعالیت دارند. در حوزه عملکرد مولکولی، تنها فعالیت ATP‌آزی ژن‌های مقاومت معنی‌دار بود (شکل ۵). نتایج بررسی‌ها در مطالعه حاضر، نشان داد که ترانسفرازها و ATP‌آزا، آنزیم‌هایی هستند که به‌طور قابل ملاحظه‌ای توسط ژن‌های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی کد می‌شوند. نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد که آنزیم‌های یوبی کوئیتین-پروتئین ترانسفراز^۱، انتقال دهنده گروه هگزوزیل^۲ و دی متیل ترانسفراز^۳ rRNA توسط ژن‌های مقاومت به زنگ‌های غیرمیزبان و

^۱ ubiquitin-protein transferase

^۲ transferring phosphorus-containing groups

^۳ rRNA (adenine-N6,N6-)-dimethyltransferase

^۴ methyltransferase activity

^۵ glutathione S-transferase

مطالعات محققان نشان داده است که در گیاه آرابیدوپسیس بیان ژن های *UGT* که کد کننده گلاکوسیل ترانسفرازها هستند، در پاسخ به پاتوژن ها ضروری است (Langlois-Meurinne et al. 2005). آنزیم هایی مانند $H^+-ATPase$ و گلیکوزید هیدرولاز، آنزیم هایی با فعالیت هیدرولازی هستند که در این مطالعه مشاهده شدند. بنا بر اظهارات دانشمندان، وجود الیستور پاتوژن در غشای پلاسمایی موجب تحریک فعالیت $H^+-ATPase$ در گیاه میزبان می شود (Palmgren. 2001). (Elmore and Coaker. 2010) عنوان کردند ATPase های غشای انتقال دهنده اتفاقات هدایت پیام را در پاسخ به انواعی از تنش های محیطی، کنترل می کند و در طول پاسخ ایمنی گیاه به پاتوژن، به طور پیوسته تولید می شود. بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه هستی شناسی ژن های مقاومت به پاتوژن عامل زنگ برگ در جو، تعداد قابل توجهی از ژن های مورد بررسی، در تنظیم فرایند و تولید فاکتورهای رونویسی درگیر هستند. پژوهشگران معتقدند، برای ایجاد یک پاسخ دفاعی مناسب، سلول ها به تعدادی از فاکتورهای رونویسی نیاز دارند که فعالیت آن ها را به سرعت افزایش دهد (Moore et al. 2011). *WRKY* و *bzip* دو خانواده بزرگ از فاکتورهای رونویسی هستند که پاسخ دفاعی گیاه در برابر تنش ها را تنظیم می کنند (Singh et al. 2002). تجزیه هستی شناسی ژن ها با استفاده از برنامه اینترنتی David، مشخص کرد، تعداد زیادی از ژن های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی، در تنظیم پردازش RNA نقش دارند. پردازش RNA یکی از جنبه های اساسی ایمنی گیاهی است. طبق اظهارات Woloshen et al. (2011) پاسخ دفاعی گیاهان، نه فقط در مرحله رونویسی، بلکه در مرحله بعد از رونویسی بیان ژن نیز، تنظیم شده و باعث می شود گیاهان نسبت به تنش های محیطی زنده و غیر زنده سریع تر پاسخ دهند نتایج تجزیه داده ها بر اساس هستی شناسی ژن های مقاومت میزبانی و غیر میزبانی، همچنین نشان دهنده دخالت ژن های مورد بررسی در تنظیم فرایندهای متابولیکی و هدایت سیگنال بود. به نظر می رسد حضور متابولیت ها برای ایجاد یک پاسخ دفاعی مؤثر، ضروری است. زمانی که شرایط نامطلوب محیطی، رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار می دهند، متابولیت ها در هدایت سیگنال، تنظیمات فیزیولوژیک گیاهان و پاسخ دفاعی درگیر می شوند (Fraire-

Velázquez and Balderas-Hernández et al. 2013). تنظیم متابولیسم اولیه، آبشارهای هدایت سیگنال را راه اندازی می کند که منجر به پاسخ دفاعی گیاه در برابر پاتوژن ها می شود (Rojas et al. 2014). (Glazebrook. 2001) گزارش کرد که شناسایی پاتوژن و پاسخ دفاعی گیاه توسط تعدادی از مسیرهای هدایت سیگنال اتفاق می افتد و هسته در هدایت سیگنالی بیش تر درگیر است زیرا سیگنال ها در نهایت باعث فعال سازی رونویسی تعدادی از ژن ها می شود که پروتئین ها و ترکیبات ضد میکروبی را سنتز می کند. انتقال سیگنال های اولیه دفاعی در برابر بیمارگرها از طریق مسیرهای غشایی و سیتوزولی امکان پذیر است (Blumwald et al. 1998). مطالعات اخیر دانشمندان، نشان داده است که غشای پلاسمایی سطحی را فراهم می کند که در آن پروتئین های مقاومتی گیاه وجود افکتورها را تشخیص می دهند (Shah 2005).

تجزیه هستی شناسی ژن ها، همچنین نشان داد که تعدادی از محصولات ژن های مقاومت به زنگ در کلروپلاست فعالیت می کنند. کلروپلاست در گیاهان، یک واسطه مهم در ایمنی گیاهی است (Nomura et al. 2009). نتیجه مطالعات (Belhaj et al. 2009) نشان داد، ژن *RPH1* در آرابیدوپسیس یک نقش مقاومتی نسبت به بیماری ها دارد. مشخص شده است که این ژن یک پروتئین کلروپلاستی را کد می کند که نقش آن در این اندامک، فعال سازی یک زیر مجموعه از پاسخ های ایمنی در واکنش به پاتوژن ها است.

بحث

تجزیه ژن های مقاومت میزبانی و غیر میزبانی به قارچ های عامل زنگ، بر اساس دمین های حفاظت شده، نشان داد که هر دو گروه ژن، با عملکرد مشابهی در کنترل مقاومت شرکت می کنند. احتمالاً وجود دمین های مشترک در ساختار ژن های مقاومت میزبانی و غیر میزبانی، باعث مشابهت عملکرد دو گروه ژن می شود. تجزیه ژن ها بر اساس هستی شناسی نشان داد، تعداد زیادی از ژن های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی در فرایندهای پاسخ به تنش، متابولیکی، رونویسی و پردازش RNA فعالیت دارند. نتایج همچنین، نشان داد که هر دو گروه ژن ها به طور عمده در گروه های کارکردی ترانسفرازی، اتصال به DNA و ATP، فعالیت

پاتوژن های میکروبی کنترل می کند وجود دارد (Heath 2000). علاوه بر ژن های ایجاد کننده مقاومت، افکتورهایی نیز بین گونه های میزبان و غیرمیزبان سازماندهی شده است که مشخص می کند در مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی، مکانیسم مشابهی وجود دارد (Vega-Arreguin, 2014). با وجود مکانیسم یکسان در مقاومت میزبانی و غیر میزبانی، شواهدی وجود دارد که مشخص می کند این مکانیسم در هردو نوع مقاومت به طور مشابه عمل نمی کند. به عنوان مثال، فرایند مرگ سلولی در مقاومت غیر میزبانی سریعتر رخ می دهد ولی در طول مقاومت میزبانی مرگ سلولی زمان بیشتری طول می کشد (حدود ۲ ساعت یا بیشتر) (Gill et al. 2015). ممکن است علت ماهیت ژنتیکی یکسان در ژن های مقاومت میزبانی و غیر میزبانی به علت تکامل همزمان گیاه میزبان و پاتوژن باشد زیرا تعامل میزبانی و غیرمیزبانی بین گیاه و پاتوژن به طور عمده تحت تاثیر تکامل است (Senthil-Kumar and Schulze and Panstruga 2011; Mysore 2013). برخی گیاهان میزبان، در اثر تکامل یک طرفه و در اثر رشد، وضعیت غیرمیزبان به دست می آورند و این در صورتی است که پاتوژن اختصاصی میزبان است (Gill et al. 2015). از طرفی Heath (2000) عنوان می دارد که قارچ های بایوتروف اجباری مانند قارچ عامل زنگ در اثر جهش مکرر در طبیعت و در طول تکامل خود با میزبان به تکامل همزمان دست یافته اند. اعتقاد وی این است احتمالاً این قارچ ها به صورت ابتدایی رشد کرده اند و در تکامل همزمان با لاین های گیاهی، با آن ها تعامل ایجاد کرده اند. به علاوه فهرست بزرگی از ژن های R که پیوسته در اثر فرایندهای حذف و اضافه، نوترکیبی، جهش و فشار انتخاب در اثر مقاومت، توسعه می یابند، باعث ایجاد تنوع مقاومت در بین ارقام گیاهی می شود (Gill et al. 2015). همچنین انتقال افقی ژن های بیماری زا بین گونه های پاتوژن، باعث می شود پاتوژن ها میزبان خود را تغییر دهند و غیر میزبان را آلوده کنند (Gill et al. 2015).

پروتئین کینازی و انتقال سیگنال درگیر می شوند. بر اساس نتایج به دست آمده هسته، غشای پلاسمایی و کلروپلاست از اجزای سلولی فعال در واکنش به بیماری زنگ هستند. با توجه به تشابه عملکرد ژن های مقاومت میزبانی و غیر میزبانی، در حوزه تجزیه هستی شناسی، می توان نتیجه گرفت که احتمالاً ماهیت ژنتیکی و عملکرد مولکولی هر دو گروه ژن یکسان است این ادعا با نتایج مطالعات Poland et al. (2009) و Pieterse et al. (2009) که برای شناسایی QTL های مربوط به مقاومت سویا در برابر *Phytophthora sojae*، ویژگی های مشترکی را برای هر دو نوع مقاومت گزارش کردند مطابقت دارد. مشخص شده است، بسیاری از پاسخ های دفاعی که در طول مقاومت غیرمیزبانی رخ می دهند، شباهت زیادی به پاسخ های دفاعی ایجاد شده در طول مقاومت میزبانی دارند (Mysore and Ryu 2004) و هر دو گیاه میزبان و غیرمیزبان فاکتورهای مشابهی را برای آغاز یک پاسخ دفاعی شناسایی می کنند (Gill et al. 2015).

گیل و همکاران (Gill et al. 2015) طی مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که مکانیسم مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی در برابر پاتوژن های قارچی مشابه بوده و در عملکرد ژن هایی که در هر دو نوع مقاومت مشارکت دارند، هم پوشانی وجود دارد. گزارش سایر دانشمندان در مورد عملکرد مشابه ژن های مقاومت میزبانی و غیرمیزبانی این مطلب را تایید می کند (Heath 2000; Mysore and Ryu 2004; Vega-Arreguin et al. 2014). اخیراً در یک مطالعه، بیان حدود ۸۰۰۰ ژن آراییدوپسیس در برابر پاتوژن غیرمیزبان *Pseudomonas syringae* PV. *Phaseolicola* بررسی شد و نتایج آن نشان داد، بیان ژن ها در طول مقاومت غیرمیزبانی مشابه مقاومت میزبانی است (Mysore and Ryu 2004). همچنین مشخص شده است یک ژن مقاومت غیرمیزبانی که در ریشه گل جعفری در پاسخ به پاتوژن گیاهان آوندی *Striga asiatica* بیان می شود، یک پروتئین سیتوپلاسمی حاوی دمین TIR را کد می کند که این دمین در برخی R ژن ها که مقاومت میزبانی را در برابر

منابع

Agrios G n Plant pathology. Translation by Mehravaran h. (1376) Oromieh University 291-301. (In Farsi).
Atkinson N J, Lilley CJ and Urwin PE (2013) Identification of Genes Involved in the Response of Arabidopsis to

Simultaneous Biotic and Abiotic Stresses. Plant Physiology 162: 2028-2041.

Belhaj, Beihaj, K, Lin, B , Mauch, F (2009) The chloroplast protein RPH1 plays a role in the immune

- response of *Arabidopsis* to *Phytophthora brassicae*. *Plant Journal* 58: 287-98.
- Blumwald, E, Aharon, G S, Lam, B C (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Elsevier Science* 3: 342-346
- Copley RR, Doerks T, Letunic I, Borka P (2002) Protein domain analysis in the era of complete genomes. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 513: 129-134.
- Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72: 317-64.
- Diehl AD, Lee JA, Scheuermann RH, Blake JA (2007) Ontology development for biological systems immunology *Bioinformatics* 23: 913-925.
- Ilbeck K and Lewis SE (2004) Sequence Ontology annotation guide. *Compar Funct Genom* 5: 642-647.
- Elmore J M & Coaker G (2010) The Role of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Plant-Microbe Interactions. *Molecular plant* 4: 416-427.
- Flor H H (1971) Current status of the gene- for-gene concept. *Annual Review Phytopathology* 9:275-296.
- Fraire-Velázquez S & Balderas-Hernández V E (2013) Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture, Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses (pp:25-48), Vahdati k and Leslie C (ed)
- Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M (2009) Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery* 8:480-99.
- Glazebrook J (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 301-308.
- Heath MC (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3:315-319.
- Heath MC (1997) Plant Relationships, Evolution of Plant Resistance and Susceptibility to Fungal Parasites (pp: 257-276) Carroll GC, and Tudzynski P (eds) Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Jafary H, Szabo Les J and RE Niks (2006) Innate Nonhost Immunity in Barley to Different Heterologous Rust Fungi Is Controlled by Sets of Resistance Genes with Different and Overlapping Specificities. *The American Phytopathological Society* 19: 1270-1279.
- Jafary H, Albertazzi G, Marcel TC and Niks RE (2008) High Diversity of Genes for Nonhost Resistance of Barley to Heterologous Rust Fungi. *Genetics Society of America* 178: 2327-2339
- John M, Dowell Mc and Woffenden BJ (2003) Plant disease resistance genes recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnology* 21.
- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretschmar T, Leea Yc, and Martinoia E (2011) The *Arabidopsis* Book. *Plant ABC Transporters*. American Society of Plant Biologists. 9: e0153. 2011
- Lahiry P, Torkamani A, Schork NJ, Hegele RA (2010) Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships. *Nature Review Genetics* 11:60-74.
- Langlois-Meurinne M, Gachon MM, and Saindrenan P (2005) Pathogen-Responsive Expression of Glycosyltransferase Genes UGT73B3 and UGT73B5 Is Necessary for Resistance to *Pseudomonas syringae* pv tomato in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 1890-1903.
- Lecourieux D, Ranjeva R & Pugin A (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* 171: 249-269.
- Li D, Liu H, Zhang H, Wang X & Song F (2008) OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defence responses against pathogen infection and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 59:2133-2146.
- Marcel TC, Varshney RK, Barbieri M, Jafary H, de Kock, M J D, Graner A, Niks R E (2007) A high-density consensus map of barley to compare the distribution of QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* and of defence gene homologues. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 487-500.
- Moore J W, Loake GJ, and Spoel SH (2011) Transcription Dynamics in Plant Immunity. *The Plant Cell* 23: 2809-2820.
- Mysore KS and Ryu CM (2004) Nonhost resistance: how much do we know?. *TRENDS in Plant Science*, 9.
- Niks, RE and Marcel TC (2009) Nonhost and basal resistance: How to explain specificity? *New Phytologist journal* 182: 817-828.
- Niks R, Lindhout P, Bai Y & Parleviet J (2011) Plant Breeding for resistance to diseases and pests. Laboratory of Plant Breeding. Wageningen University, The Netherlands
- Nomura Hi, Komori T, Uemura S, Kanda Y, Shimotani K, Nakai K, Furuichi T, Takebayashi K, Sugimoto T, Sano Si, Suwastika I, Fukusaki E, Yoshioka H, Nakahira Y, Shina T (2013) Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 7: 293-296.
- Pieterse CM, Leon-Reyes, Van der Ent AS and Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecules hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wissner RJ, Pratt RC, and Nelson RJ (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Science* 14:1360-1385.
- Qi X, Niks R E, Stam P and Lindhout P (1998) Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1205-1215.
- Rudd S (2003) Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences. *Trends Plant Science* 8:321-9.
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V and Mysore KS (2014) Regulation of primary plant metabolism during plant pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Plant science* 5:1-12.
- Romeis T (2001) Protein kinases in the plant defence response. *Current Opinion in Plant Biology* 4:407-414.
- Singh KB, Foley RC and Sanchez LO (2002) Transcription factors in Plant defense and stress responses. *Plant Biology* 5:430-436.

Singh VK, Singh AK, Chand R And Kushwaha C (2011) role of Bioinformatics in agriculture and sustainable development. *International Journal of Bioinformatics Research* 3: 221-226.

Shah, J 2005 Lipids, Lipases, and Lipid-Modifying Enzymes in Plant Disease Resistance *Annual Review of Phytopathology* 43: 229-260.

Schulze- Lefert p and Panstruga R (2011) A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends Plant Science* 16: 117-125.

Senthi-Kumar M and Mysore KS (2013) Nonhost resistance against bacterial pathogens: Retrospectives and prospects. *Annu Rev Phytopathology* 51:407-427.

Snider J, Thibault G and Houry WA (2008) The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biology* 9:1-9.

Vega-Arreguin J C, Jalloh A, Bos JI, and Moffett P (2014) Recognition of an Avr3 a homologue plays a major role in mediating nonhost resistance to *Phytophthora capsici* in *Nicotiana* species. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 27: 770-780.

Vera-Estrella R, Barkla BJ, Higgins VJ & Blumwald E (1994) Plant Defense Response to Fungal Pathogens (Activation of Host-Plasma Membrane H⁺-ATPase by Elicitor-Induced Enzyme Dephosphorylation. *Plant Physiology* 104: 209-215.

Woloshen V, Huang S and Li X (2011) RNA-Binding Proteins in Plant Immunity. *Journal of Pathogens* 2011: 1-11.

Young ND (1996) QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34: 479-501.