مجله علوم گياهان زراعي ايران
دوره ۴۰، شماره ۲، ۱۳۸۸ (۱۹۶-۱۸۷)

ايجاد نشانگرهاي مولكولي مبتني بر EST پيوسته با مقاومت به بلايت فوزاريومي سنبله در گندم

ثمانه حسيني[۱], محسن مردي[۲]*, محمدرضا غفاري[۳], يوسف نامي[۴], لاله كريمي فرساد[۵], سيد مصطفي پيرسيدي[۶], سيروس عبدميشاني[۷] و علي اكبر شاه نجات بوشهري[۸]
۱، ۷, ۸, دانشجوي سابق كارشناسي ارشد، استاد و دانشيار، پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران
۲, ۳ , ۴, ۵, ۶, استاديار, كارشناس ارشد, دانشجوي سابق كارشناسي ارشد, كارشناس, كارشناس ارشد بخش تحقيقات ژنوميكس, پژوهشكده بيوتكنولوژي كشاورزي
(تاريخ دريافت: ۸۶/۱۲/۸- تاريخ تصويب: ۸۷/۸/۱)

چكيده

جهت ايجاد نشانگرهاي مولكولي مبتني بر **EST** پيوسته با ژن‌هاي كنترل كننده مقاومت به **FHB** در گندم، عملكرد بيولوژيك ۸٦٦۰ **EST** موجود در بانك هاي اطلاعات مطالعه شد و ۲٦۰ **EST** با عملكرد مشخص انتخاب شدند. در مجموع ٦۲ جفت آغازگر با استفاده از نقاط حفظ شده و غير حفظ شده طراحي شد. نتايج تجزيه پيوستگي و **QTL** با استفاده از داده‌هاي ژنوتيپي و فنوتيپي در نسل‌هاي **F۳** و **F۵** حاصل از تلاقي هاي فرونتانا (نيمه مقاوم) / فلات (حساس) نشان داد كه يک نشانگر طراحي شده بر اساس ژن ***NPR1*** قادر است حداكثر ۹/٦ درصد از تغييرات واريانس سطح زير منحني پيشرفت آلودگي را با اثر افزايشي منفي توجيه كند. اين نشانگر روي بازوي كوتاه كروموزوم **۳A** مكان يابي شد. تظاهر ژن ***NPR1*** با استفاده از روش **QRT-PCR** نشان داد بيان اين ژن در ۹٦ ساعت پس از آلودگي در ونگ شوباي و فرونتانا افزايش مي يابد. بنابراين ژن ***NPR1*** و نشانگر مولكولي مبتني بر آن مي توانند در برنامه هاي تحقيقاتي افزايش مقاومت به **FHB** در گندم در نظر گرفته شوند.

واژه‌هاي كليدي: بلايت فوزاريومي سنبله، گندم، ***NPR1***، **EST**، **QRT-PCR**.

مقدمه

وجود پروژه‌هاي تعيين توالي ژنوم تعدادي از موجودات زنده، اطلاعات بسيار زيادي را فراهم نموده اند كه باعث ايجاد بخش جديدي از مطالعات بيولوژي تحت عنوان ژنوميكس ساختاري[۱] شده است. امروزه استفاده از تكنيكها و فن آوري هاي جديد مانند cDNA، Real Time PCR و ريز آرايه اليگونوكلئوتيدي باعث دسترسي به اطلاعاتي در مورد چگونگي عملكرد ژن‌ها تحت عنوان ژنوميكس عملكردي[۲] نيز شده است. در سال‌هاي اخير تكنولوژي نشانگرهاي DNA در گياهان عالي به سمت نشانگرهاي مولكولي مبتني بر ترانسكريپتوم و ديگر توالي‌هاي رمز كننده رو كرده است. در اين ميان نشانگرهاي عملكردي ژنوم كه بر مبناي ظهور يك صفت در گياه انتخاب مي شوند در مطالعه تخمين تنوع ژنتيك، انتخاب به كمك نشانگر، بررسي ژنهاي كانديداي و همسانه سازي بر مبناي مكان‌يابي، تعيين QTLها و مطالعه فيلوژنتيكي و تاكسونوميكي مورد استفاده قرار مي‌گيرند (Mardi et al., 2004).

با توجه به وجود اطلاعات بسيار زياد مربوط به ساختار و عملكرد ژن ها در بانک هاي اطلاعاتي، در حال حاضر اين امكان ميسر مي‌باشد كه نشانگرهاي ساختاري و عملكردي ژنوم يك موجود زنده بر مبناي نشانگرهاي

1 . Structural Genomics
2 . Functional Genomics

* نويسنده مسئول: محسن مردي تلفن: ۰۲۶۱-۲۷۰۰۸۴۵
E-mail: mardi@abrii.ac.ir

ساختاري و عملكردي ژنوم ساير موجودات زنده شناسايي شوند. امروزه با تكميل پروژه‌هاي رديف‌يابي ژنوم در تعدادي از گياهان، ESTs هاي[1] فراواني براي مطالعه ساير گياهان فراهم شده است. ESTها توالي‌هاي كوتاه ۲۰۰-۳۰۰ جفت بازي هستند كه با توالي‌يابيSingle pass همسانه‌هاي cDNA توليد مي‌شوند و نماي مناسبي از توالي‌هاي تظاهر يافته ژن‌ها در بافت‌هاي مختلف تحت شرايط طبيعي و يا بعد از اعمال تنش‌هاي زيستي و غيرزيستي بوجود مي‌آورند. عملكرد و مكان ژنومي اغلب ESTها ناشناخته است. با توجه به وجود اطلاعات مربوط به تعداد زيادي از ژن‌ها، امكان تعيين عملكرد ESTها وجود دارد (Peng et al., 2003).

با طراحي آغازگرهاي مبتني بر EST هاي انتخابي و بررسي چند شكلي آنها در بين والدين مقاوم/متحمل و حساس و جمعيت‌هاي در حال تفرق حاصل از آنها، ارتباط آنها با مقاومت/تحمل و مكان ژنومي آنها بر روي نقشه‌هاي ژنتيک موجود مشخص مي‌شود. پيوستگي نشانگرهاي مبتني بر EST ها با مقاومت/تحمل به تنش‌هاي زيستي و غيرزيستي، موجب افزايش آگاهي مسيرهاي بيوشيميايي ژن‌هاي كنترل كننده مقاومت/ تحمل و متراكم نمودن فاصله نشانگرهاي احاطه‌كننده QTLهاي شناخته شده مي‌شود. توليد نشانگرهاي مبتني بر عملكرد ژن اطلاعات ديگر نشانگرهاي DNA مانند AFLP و SSR را تكميل نموده و نواحي كد كننده را نيز در نقشه‌هاي ژنتيک آشكار مي‌كند (Mardi et al., 2004).

بلايت فوزاريومي سنبله يا FHB[2] گندم (*Triticum aestivum* L.) كه توسط گونه هاي مختلف جنس فوزاريوم (*Fusarium spp.*) ايجاد مي شود، يكي از بيماري هاي مهم گندم در ايران است. اين بيماري باعث كاهش شديد عملكرد، كيفيت دانه و ايجاد سميت در غذاي انسان و خوراك دام مي شود (Mardi et al., 2004). تاكنون مطالعات مختلفي در زمينه شناسايي و مكان‌يابي QTLهاي[3] كنترل كننده به FHB در گندم با استفاده از نشانگرهاي ساختاري ژنوم انجام شده است (Buerstmayr et al., 2002; Buerstmayr et al., 2003; Lin et al., 2004; Somers et al., 2003; Steiner et al., 2004; Waldron et al., 1999). مهمترين QTL هاي كنترل كننده مقاومت به FHB را با استفاده از جمعيت‌هاي در حال تفرق حاصل از تلاقي فلات × ونگ شوباي را روي كروموزوم‌هاي ۳BS و ۲DL شناسايي نمودند. تجزيه QTL با استفاده از ۲۷۳ نشانگر AFLP و SSR در جمعيت‌هاي در حال تفرق حاصل از فلات × فرونتانا نشان داد كه كروموزومهاي ۱BL، ۳AL و ۷AS بيشترين اثر منفي و معني دار را بر واريانس آلودگي داشتند (Mardi et al., 2006). نتايج تجزيه مولكولي ۱۱۰ نشانگر SSR بر روي جمعيت هاي در حال تفرق حاصل از فلات × سوماي۳ نشان داد كه يک QTL روي كروموزوم ۳BS بيشترين سهم واريانس فنوتيپي آلودگي را با اثر منفي توجيه مي نمايد (Mardi et al., 2002).

در گندم گزارشات موفق محدودي از كاربرد نشانگرهاي عملكردي ژنوم گندم در تجزيه QTL وجود دارد. Lu et al. (2006) با استفاده از نقشه يابي فيزيكي ٥٤ EST گندم بر روي كروموزوم 5BL محدوده ژن *Tsn1* گندم را كه سبب حساسيت گندم به Pto ToxA مي‌شود به حدود ۰/۰۸ سانتي‌مورگان كاهش دهند. Raedschelders et al. (2004) با ايجاد نشانگر مبتني بر PCR از ژن *XAXI-like* موفق به شناسايي اين ژن برروي كروموزوم ۳B در گندم شدند. هدف اين تحقيق ايجاد نشانگر مبتني بر EST پيوسته با مقاومت به بلايت فوزاريومي سنبله در گندم بود.

مواد و رو ش‌ها

موادگياهي و ارزيابي‌هاي مزرعه‌اي: جمعيت‌هاي $F_{3:4}$ و $F_{3:5}$ حاصل از تلاقي فلات × فرونتانا در اين تحقيق مورد استفاده قرار گرفتند. فلات با وجود خصوصيات مطلوب زراعي و سطح زير كشت زياد در ايران به FHB بسيار حساس و فرونتانا (از برزيل) نيمه مقاوم به FHB مي‌باشند (Mardi at el., 2004). جمعيت‌هاي $F_{3:4}$ و $F_{3:5}$ به همراه والدين و دو لاين رموس از آلمان به عنوان شاهد حساس و CM_82036 از چين به عنوان شاهد مقاوم در مزرعه و تحت آلودگي مصنوعي مورد ارزيابي فنوتيپي قرار گرفتند. سطح زير منحني پيشرفت آلودگي يا AUDPC بر مبناي درصد پيشرفت بيماري سنبله ۱۰، ۱٤، ۱۸، ۲۲ و ۲٦ روز پس از آلودگي بوسيله فرمول تغيير شكل‌يافته Shaner & Finney (1977) اندازه‌گيري شد. داده‌هاي فنوتيپي اين تحقيق توسط Mardi et al. (2006) حاصل شد.

1. Expressed sequence tag sites
2. Fusarium head blight
3. Quantitative trait loci

ايجاد نشانگرهاي مبتني بر **EST**: تجزيه‌هاي مولكولي با بررسي ۵۸۰۱۵۵ EST گندم (تا تاريخ ۱۴ ژانويه ۲۰۰۵)، ۸۶۶۰ EST حاصل از سنبله‌هاي گندم آلوده به *F. graminearum* موجود در NCBI انتخاب و با استفاده از برنامه BLASTn عملكرد بيولوژيک آنها بررسي شد. از مجموع ۸۶۶۰ EST، ۲۶۰ توالي انتخاب و پس از تبديل به فرمت FASTA با نرم‌افزار Genedoc همرديف شدند. بيشتر اين ESTها جزء ژن‌هاي گندم و ديگر گياهان بودند. با استفاده از نرم افزار اليگوتك[1]، ۶۲ جفت آغازگر از نقاط حفظ شده و غير حفظ شده در اين EST ها طراحي شد كه از اين تعداد، ۴۲ جفت آغازگر بر اساس توالي ژن‌هاي گندم و ۲۰ جفت آغازگر بر اساس توالي ژن‌هاي از برنج، جو، ذرت و آرابيدوپسيس بود. واكنش‌هاي زنجيره‌اي پليمراز با استفاده از DNA والدين به عنوان الگو و جفت پرايمرهاي طراحي شده انجام شد. محصول واكنش پليمراز روي ژل اكريلاميد ۶ درصد تفكيک شد.

تجزيه **Real Time PCR**: به منظور استخراج RNA نمونه گيري در مرحله پرچم دهي از سنبله در زمان‌هاي ۰، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت بعد از آلودگي در دو تيمار شاهد و آلوده در سه تكرار از دو رقم فلات و فرونتانا و ژنوتيپ ونگ شوباي بعنوان شاهد مقاوم صورت گرفت. همچنين نمونه گيري در همين مرحله از رشد گياه از گلوم، لما و پالا در زمان هاي ۰، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از آلودگي از هر دو تيمار، در هر دو رقم و سه تكرار انجام شد. نمونه هاي بعد از انجماد در ازت مايع تا هنگام استخراج RNA در ۸۰- درجه سانتي گراد نگهداري شدند. استخراج RNA با استفاده از Trizol™ (from Gibco BRL Life Technologies) انجام شد. براي تعيين كميت RNA از روش اسپكتروفتومتري استفاده شد. جهت تعيين كيفيت RNA از روش الكتروفورز ژل آگارز ۱/۳% با بافر 1X MOPS استفاده شد.

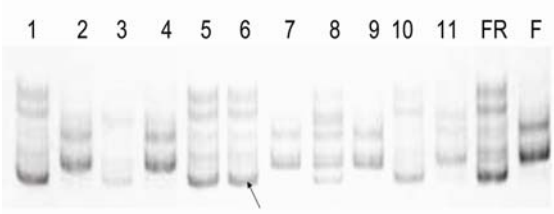
با استفاده از توالي‌هاي موجود در بانک اطلاعاتي NCBI مربوط به ژن‌هاي *NPR1* (No.BT009617) و 18s rRNA (No.AY049040) يک جفت پرايمر براي هر ژن بوسيله نرم‌افزار Beacon designer (Primer Biotech) براي واكنش Real Time PCR طراحي شدند. واكنش Real Time PCR با استفاده از MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System در حجم واكنش ۲۵ ميكروليتر انجام شد. در اين واكنش از iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio Rad Cat.# 170-8882) استفاده شد. به منظور آناليز داده‌هاي Real-Time از نرم افزار طراحي شده توسط شركت Bio Rad بر اساس مقدار threshold cycle (Ct) استفاده شد. از ژن *18s rRNA* براي نرمال كردن داده‌ها استفاده شد. همچنين از نرم‌افزار SPSS نيز براي بررسي معني‌داري اثر زمان آلودگي در ميزان بيان ژن *NPR1* استفاده شد.

تجزيه هاي آماري: در صورت مشاهده نوار چند شكل، تجزيه مولكولي ۱۷۰ گياه $F_{3:4}$ با استفاده از جفت (هاي) آغازگر ايجاد كننده چند شكلي انجام شد. الگوهاي نواري طبق روش Lander et al. (1987) امتيازدهي شدند. نقشه پيوستگي نشانگرهاي چندشكل به منظور استفاده آنها در تجزيه مكان‌يابي، با استفاده از نرم‌افزار MAPMAKER ver 3.00 با در نظر گرفتن فاصله كمتر از ۵۰ سانتي‌مورگان و LOD ≥ ۳ انجام شد (Utz & Melchinger, 1996). مكان‌يابي فاصله‌اي مركب با استفاده از نرم‌افزار PLABQTL با در نظرگرفتن LOD ≥ ۲/۵ و داده‌هاي مزرعه‌اي حاصل از جمعيت‌هاي $F_{3:4}$ و $F_{3:5}$ انجام شد.

نتايج و بحث

ايجاد و مكان‌يابي نشانگر مبتني بر ژن ***NPR1*** پيوسته با مقاومت به **FHB** در گندم

از مجموع ۶۲ جفت آغازگر طراحي شده، جفت آغازگر طراحي شده بر اساس ژن *NPR1* (Non-expressor pathogenesis related protein) داراي چند شكلي بين والدين حساس فلات و نيمه مقاوم فرونتانا بود. تجزيه مولكولي والدين و گياهان $F_{3:4}$ در شكل ۱ نشان داده شده است.



شكل ۱- تفكيک قطعات تكثير شده حاصل از آغازگر اختصاصي ژن *NPR1* در والدين فرونتانا (FR) و فلات (F) و ۱۱ گياه $F_{3:4}$ حاصل از تلاقي آنها

1. Oligotech

نتایج تجزیه پیوستگي با استفاده از داده‌هاي موجود ۲۷۳ نشانگر AFLP و SSR در جمعیت‌هاي حاصل از فلات×فرونتانا (Mardi et al., 2006)، نشان داد که جفت آغازگرهاي طراحي شده بر اساس ژن *NPR1* بر روي بازوي بلند کروموزوم ۳A قرار دارد (شکل۲). نتایج تجزیه QTL نشان داد جفت آغازگرهاي طراحي شده بر اساس این ژن در ناحیه QTL شناسایي شده توسط Mardi et al. (2006) و Steiner et al. (2004) و در حد فاصل مکان‌هاي ژني *Xgwm720* و *Xe87m39_5* با فاصله مکاني به ترتیب ۶/۸ و ۳ سانتي‌مورگان قرار دارد (جدول۱).

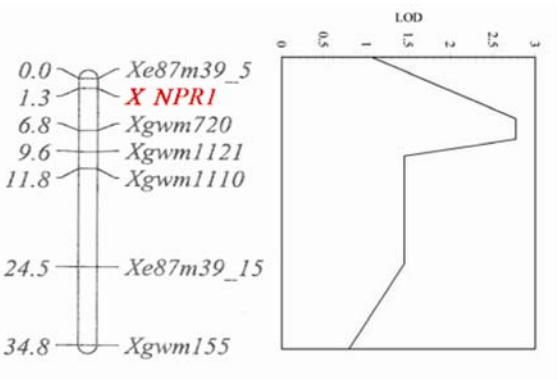
در ارتباط با مکان یابي ژن‌هاي کنترل کننده مقاومت به FHB در فرونتانا تاکنون دو گزارش ارائه شده است. Steiner et al. (2004) و Mardi et al. (2006) مهمترین QTL کنترل کننده مقاومت را روي بازوي بلند کروموزوم ۳A شناسایي نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد نشانگر طراحي شده بر اساس ژن *NPR1* دقیقا درون QTL تعیین شده روي کروموزوم ۳A قرار دارد. اگرچه سهم R^2 نشانگر طراحي شده بر اساس ژن *NPR1* در توجیه واریانس AUDPC ناچیز بود، اما این تأثیر منفي بود. این نشانگر علاوه بر متراکم نمودن نقشه لینکاژي موجود در این ناحیه ژنومي، نقش احتمالي ژن *NPR1* را در ایجاد مقاومت به FHB گندم مشخص نمود. Makander et al. (مکاتبات شخصي) با بررسي بیان ژن *NPR1* جدا شده از آرابیدوپسیس در گندم با استفاده از راه انداز Ubi1 ذرت، نشان دادند که بیان ژن *NPR1* آرابیدوپسیس (At*NPR1*) باعث افزایش مقاومت به FHB در گندم ترانسژنیك مي‌شود. Cao et al. (1998) بیان کردند که سطح بالاي بیان ژن *NPR1* آرابیدوپسیس که یك تنظیم کننده مثبت مسیر انتقال سیگنال مقاومت اکتسابي سیستمیك مي باشد، باعث افزایش مقاومت به پاتوژن هاي باکتریایي و قارچي آرابیدوپسیس مي شود.

جدول ۱- تجزیه QTL براي سطح زیر منحني پیشرفت آلودگي (AUDPC) با استفاده از مکان یابي فاصله‌اي مرکب یا (CIM) در نسل هاي F_3 و F_5 حاصل از تلاقي از فلات × فرونتانا

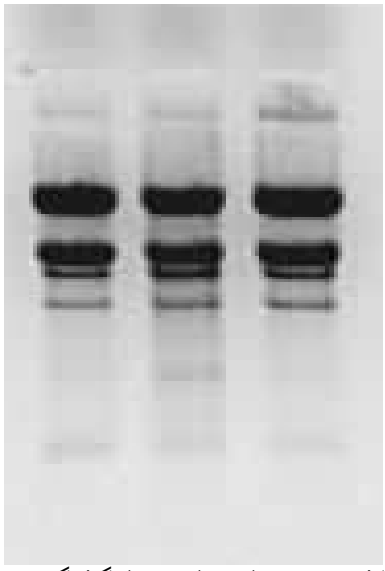
نسل	LOD	R^2	کروموزوم	اثر
F_3	۲/۵۶	۵/۶	۳AL	-۱/۲۴۱
F_5	۳/۳۳	۹/۶	۳AL	-۱/۳۷۱

پروفیل بیان ژن **NPR1**

باندهاي rRNA در یوکاریوت‌ها عبارتند از 28s و 18s و گاهي 5s است و بین آنها مولکول‌هاي mRNA بصورت کشیدگي دیده مي‌شوند. وجود باندهاي rRNA و کشیدگي RNA بدون وجود باندهاي DNA، نمایانگر یک استخراج موفق مي‌باشد. غالبا محدوده وجود RNA در روي ژل تا طول ۶Kb را شامل مي شود. همانگونه که در شکل ۳ مشخص شده است، باندهاي RNA ریبوزومي به وضوح قابل مشاهده هستند همچنین تعداد باندهاي RNA ریبوزومي بیش از دو باند است که به دلیل وجود rRNAهاي کلروپلاستي علاوه بر rRNA هاي هسته اي در بافت هاي سبز مي با شد.



شکل ۲- پلات LOD و گروه لینکاژي مرتبط با مکان ژني مرتبط با ژن *NPR1* شناسایي شده روي کروموزوم ۳A



شکل ۳- RNA استخراج شده از گیاه گندم بر روي ژل آگارز ۱/۳%

به منظور بررسي تغييرات بيان ژن *NPR1* از كميت‌سنجي نسبي[1] استفاده شد و چون از RNA به عنوان الگوي اوليه در واكنش زنجيره‌اي پليمراز نمي‌توان استفاده كرد در اولين مرحله طي رونويسي معكوس RNA به cDNA تبديل شد، سپس cDNA تک رشته اي در واكنش زنجيره اي پليمراز استفاده شد. از آنجا كه در روش كميت‌سنجي نسبي اشتباهات در كمي‌سازي رونوشت‌هاي mRNA به سادگي با هر گونه تغيير در مواد واكنش اتفاق مي افتد و باعث تعبير نادرست از الگوي بيان ژن‌هاي هدف مي شود، روش مورد قبول براي كم كردن اين اشتباهات و تصحيح تغييرات، تكثير همزمان RNA اي است كه به عنوان مرجع داخلي براي نرمال كردن بكار رود، بدين منظور از ژن *18s rRNA* به عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول ۲) (Kim et al., 2003).

جدول ۲- آغازگرهاي طراحي شده

نام	توالي
NPF	5'-AAAGGCTGCGTTCAAGGG-3'
NPR	5'-CTTCTTCACCTGTTGCTCATC-3'
18s F	5'-GTGACGGGTGACGGAGAATT-3'
18s R	5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3'

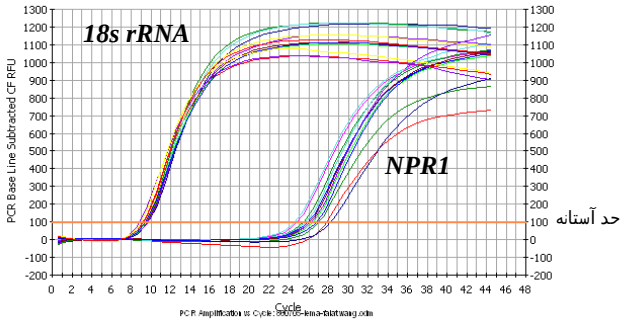
از آنجايي كه در ارزيابي هاي نسبي از راندمان واكنش زنجيره اي پليمراز جهت محاسبه نسبت افزايش يا كاهش بيان ژن در تيمارهاي مختلف استفاده مي شود و از طرفي راندمان تكثير توالي هاي هدف و مرجع به علت تفاوت در نواحي اتصال آغازگر، توالي محصول و اندازه محصول واكنش زنجيره اي پليمراز متفاوت هستند در اين تحقيق از دو منحني استاندارد متفاوت براي توالي هدف (*NPR1*) و توالي مرجع (*18s rRNA*) استفاده شد. راندمان تكثير با فرمول زير محاسبه شد (QIAGEN, 2005):

$$efficiency = 10^{(-1/solop)} = 10^{(-1/-3.32)} = 10^{0.301} \approx 2$$

داده‌هاي حاصل از اين روش با استفاده از نرم افزار iCycler تجزيه و تحليل شدند. در اين نرم افزار گراف هاي مربوط به هر ژن و منحني ذوب مربوطه به طور جداگانه ترسيم مي شود. نمونه اي از نمودارهاي حاصله براي ژن مرجع و ژن هدف در شكل ۴ را مي توان مشاهده نمود.

1. Relative Quantification

همانطور كه در شكل ۴ مشخص است كليه تيمارها داراي مقدار C_T تقريبا يكساني هستند اين نشان مي دهد كه بيان ژن مرجع در شرايط آلودگي با قارچ *F. graminearum* تغييري نداشته است. همچنين تيمارهاي مختلف Ctهاي متفاوتي از ژن مذكور را دارا هستند كه اين امر بيانگر وجود تفاوت در بيان اين ژن در زمان هاي مختلف آلودگي مي باشد.

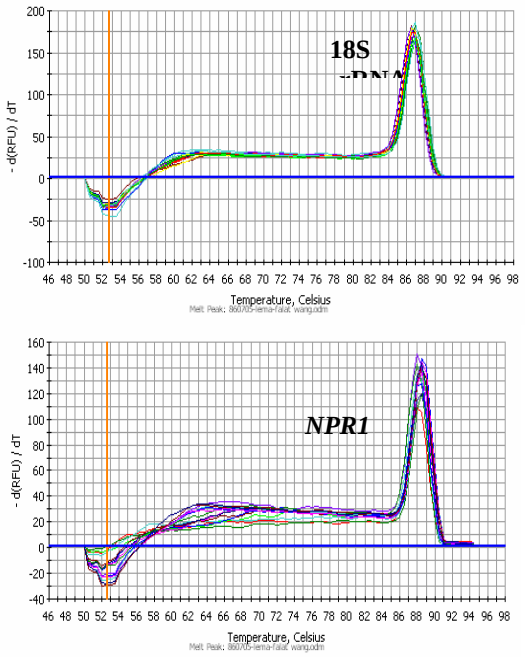


شكل ۴- منحني تكثير واكنش زنجيره اي پليمراز براي ژن مرجع (*18s rRNA*) و ژن هدف (*NPR1*) در لما

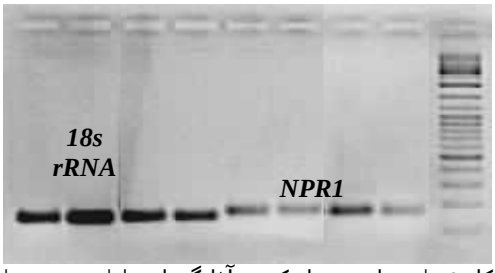
ارزيابي اختصاصي بودن آغازگرهاي طراحي شده

از آنجايي كه SYBR Green با اتصال به دو رشته‌اي-هايي مثل پرايمر دايمر و ديگر باندهاي غير اختصاصي، باعث مي شود كه نتايج بيشتر از غلظت اصلي برآورد شوند بنابراين براي تأييد اختصاصي عمل نمودن آغازگرها از آناليز منحني هاي ذوب (Melt Curve Analysis) استفاده شد. ترسيم منحني ذوب پس از اتمام فرايند PCR انجام شد. به منظور رسم منحني ذوب درجه حرارت به آرامي افزايش يافت. در درجه حرارت‌هاي پايين تمامي‌محصولات واكنش زنجيره‌اي پليمراز به صورت دو رشته اي بوده و SYBR Green به آنها متصل است، در نتيجه ميزان فلورسنت بالا است در حالي كه در درجه حرارت‌هاي بالا محصولات واكنش زنجيره‌اي پليمراز تغيير طبع داده و به حالت تک رشته اي در مي آيند، در نتيجه كاهش سريعي در ميزان فلورسنت ايجاد مي شود. در اين روش ميزان فلورسنت همزمان با افزايش درجه حرارت اندازه‌گيري شده و در مقابل درجه حرارت پلات مي‌شود. در نقطه ذوب (T_m) ۵۰% پيوندهاي هيدروژني در DNAهاي دو رشته اي از هم جدا شده و ميزان فلورسنت بطور ناگهاني تغيير مي‌يابد. در اين منحني هر يک از پيک‌ها نمايانگر T_mيک محصول PCR است (QIAGEN, 2005). بنابراين با

مشاهده تنها یک پیک در آنالیز منحني هاي ذوب مشخص شد که آغازگرهاي ژن مرجع (*18s rRNA*) و ژن هدف (*NPR1*) محصول اختصاصي را تکثیر مي دهند (شکل ۵). همچنین محصولات واکنش زنجیره اي پلیمراز بر روي ژل آگارز ۱/۵% مورد بازبیني قرار گرفت. این آغازگرها بر روي ژل نیز تنها یک باند در محدوده ۱۹۰-۱۵۰ باز ایجاد نمودند (شکل ۶).



شکل ۵- منحني ذوب آغازگرهاي ژن مرجع (*18s rRNA*) و ژن هدف (*NPR1*) و اختصاصي بودن آنها در روش کمیت سنجي نسبي در لما



شکل ۶- اختصاصي عمل کردن آغازگرهاي طراحي شده براي روش کمیت سنجي نسبي روي ژل آگارز ۱/۵%

نتایج آزمون **Relative Quantification-PCR**

براي بررسي تغییرات بیان ژن *NPR1* بعد از اینکه C_T داده‌ها با نرم افزار iCycler مشخص شد، بوسیله نرم افزار طراحي شده توسط شرکت Bio Rad بر اساس مقدار threshold cycle (Ct) و راندمان تکثیر طبق فرمول زیر میزان افزایش یا کاهش بیان ژن هدف محاسبه گردید (Yuan et al., 2006).

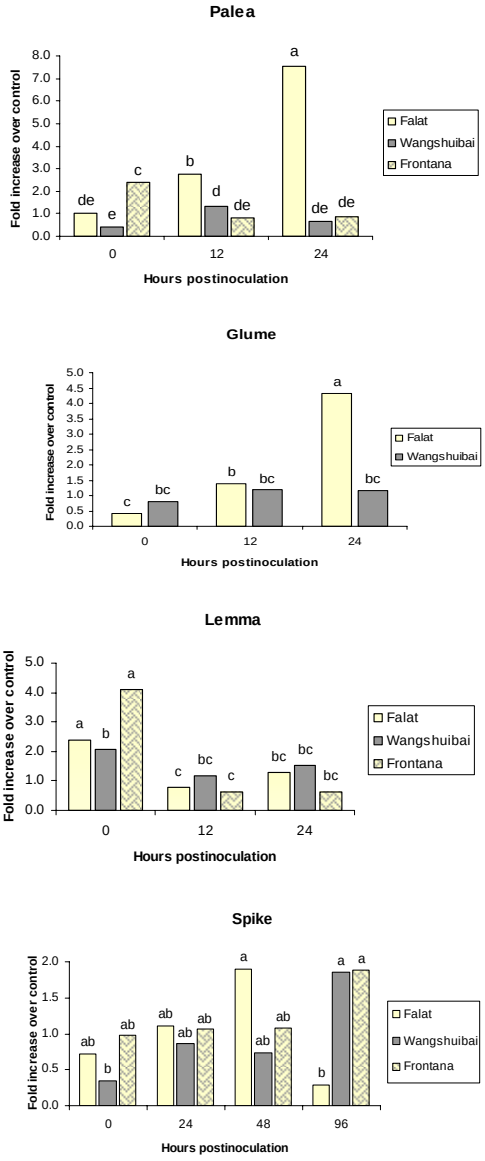
$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta ct_{target}(control - sample)}}{(E_{ref.})^{\Delta ct_{ref.}(control - sample)}}$$

نسبت‌هاي بدست آمده از نرم افزار طراحي شده توسط شرکت Bio Rad به منظور بررسي معني داري اثر زمان آلودگي در میزان بیان ژن *NPR1* در غالب طرح کاملا تصادفي با نرم افزار SPSS تجزیه شدند. آزمون نرمال بودن واریانس خطاي آزمایشي توسط نرم افزار Minitab صورت گرفت و در مواردي که خطاي آزمایشي نرمال نبود تبدیل داده صورت گرفت. مقایسه میانگین داده ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵% صورت گرفت. نتایج حاصله در نمودارهاي زیر نشان داده شده است (شکل ۷).

در رقم فلات (حساس) میزان تظاهر ژن *NPR1* در پالا در اولین زمان نسبت به تیمار شاهد افزایش داشته است و این افزایش با گذشت زمان آلودگي افزایش داشته و در زمان ۲۴ به بالاترین میزان خود (۷/۵۲ برابر نسبت به کنترل) رسیده است. تظاهر این ژن در زمان هاي ۱۲ و ۲۴ افزایش معني داري نسبت به اولین زمان نشان داده است. چنین روند صعودي در رقم فلات در گلوم نیز مشاهده شده است با این تفاوت که در اولین زمان بیان ژن *NPR1* نسبت به تیمار شاهد کاهش یافته است ولي در زمان‌هاي بعد افزایش نسبت به تیمار شاهد و اولین زمان مشاهده گردیده است. در لما افزایش تظاهر ژن نسبت به تیمار شاهد در اولین زمان و زمان ۲۴ نشان داده شده است، ولي در زمان ۱۲ کاهش تظاهر ژن دیده شده است. با وجود افزایش در زمان ۲۴ نسبت به تیمار شاهد، بیشترین میزان تظاهر ژن در اولین زمان بوده است. در نمونه هاي سنبله رقم فلات، میزان تظاهر ژن روند افزایشي تا زمان ۴۸ نشان داده است. اما در زمان ۹۶ ساعت پس از آلودگي نسبت به زمان ۴۸ میزان تظاهر بطور معني داري کاهش یافته است (۰/۲۸۸ برابر نسبت به تیمار شاهد).

در ژنوتیپ مقاوم ونگ شوباي میزان تظاهر ژن در اولین زمان در لما افزایش ۲/۰۷۸ برابري نسبت به تیمار کنترل نشان داده است ولي در همین زمان در پالا و گلوم

كاهش ديده شده است. در زمان هاي بعدي تغييري در ميزان بيان ژن مشاهده نشده است. در نمونه هاي سنبله ژنوتيپ ونگ شوباي كاهش بيان ژن ديده شده است. اما در زمان ۹۶ نسبت به زمان ۴۸ افزايش ديده شد. در مجموع اين تغييرات معني دار نبوده است.



شكل ۷- مقايسه ميانگين تظاهر نسبي تظاهر ژن *NPR1* در ارقام فلات(حساس)، فرونتانا(نيمه مقاوم) و ونگ شوباي(مقاوم)

بالاترين ميزان بيان ژن *NPR1* در رقم فرونتانا (نيمه مقاوم) در اولين ساعات آلودگي (۰، ۱۲ و ۲۴) به *F. graminearum* (۴/۱۱ و ۲/۴۰۹ برابر نسبت به تيمار شاهد در لما و پالا) بوده است. در سنبله تظاهر ژن تغيير معني‌داري نكرده است. اما مانند ژنوتيپ ونگ شوباي بيشترين ميزان بيان ژن مربوط به زمان ۹۶ بوده است.

در مجموع در زمان‌هاي پايين‌تر در رقم حساس فلات روند افزايشي در بيان ژن *NPR1* مشاهده شده است. بطوريكه در زمان هاي پايين معمولا بيشترين ميزان بيان ژن مربوط به رقم حساس فلات بوده است. در ارقام مقاوم و نيمه مقاوم در همين زمانها يا روند كاهشي مشاهده شده است و يا تغييري در ميزان تظاهر ژن *NPR1* مشاهده نشده است. اين تفاوت در بيان ژن در زمان ۹۶ كاملاً عكس شده است بطوريكه فلات كه در زمان‌هاي پايين بيشترين بيان ژن *NPR1* را داشته است، كمترين ميزان را داشته است و در ونگ شوباي و فرونتانا بيشترين ميزان بوده است. نتايج پروفيل بيان ژن كانديداي مقاومت به FHB (*NPR1*) در والدين حساس، نيمه مقاوم و مقاوم مشابه نتايج مطالعات Golkari et al. (2007) مربوط به تجزيه ريزآرايه با تعدادي از ژن‌هاي القاء يافته توسط *F. graminearum* در گندم بود. در اين تحقيق الگوي بيان ژن براي ارگان‌هايي كه از لحاظ بيولوژيكي به يكديگر تشابه بيشتري دارند، نزديك‌تر بود. مطالعات ما نشان داد كه الگوي تظاهر ژن *NPR1* در گلوم و پالا بيشترين تشابه را به يكديگر دارند. Golkari et al. (2007) گزارش نمودند بيشترين همبستگي در الگوي بيان ژن هاي القاء يافته بين گلوم و پالا مي باشد.

NPR1 ژن كانديداي مقاومت به **FHB** در گندم

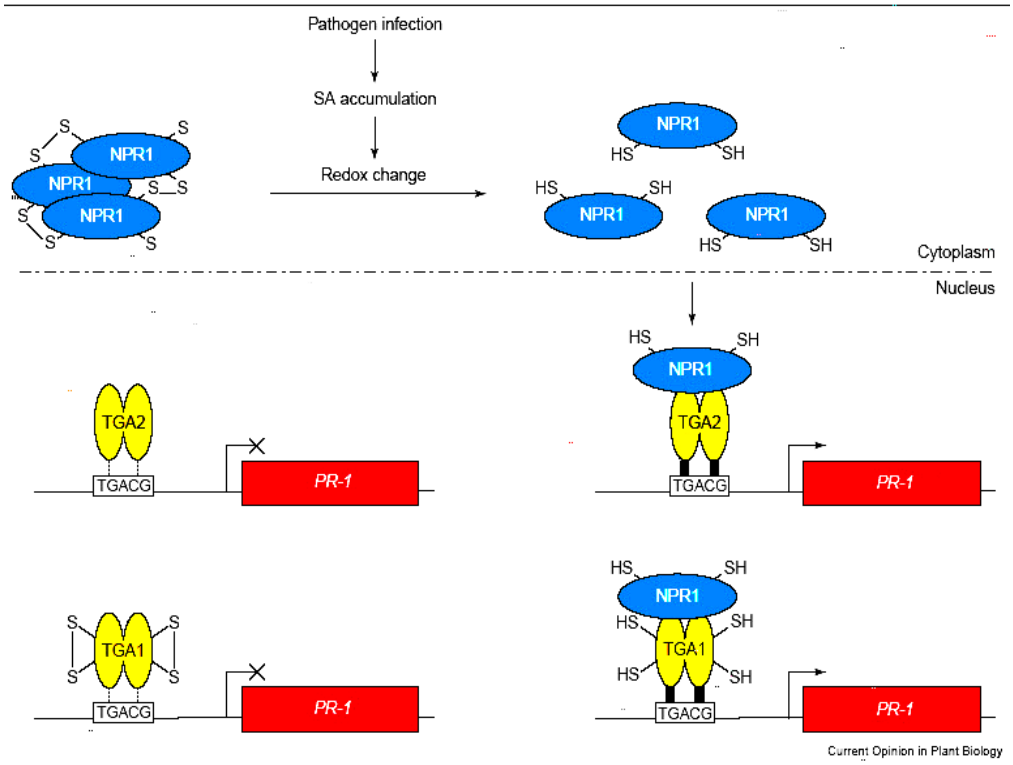
پاسخ‌هاي دفاعي سيستميک كه تحت تأثير عوامل بيولوژيكي تحريک مي‌شوند، شامل مقاومت اكتسابي سيستميک و مقاومت سيستميک القائي مي‌باشند. پاسخ‌هاي دفاعي توسط شبكه اي از مسيرهاي انتقال سيگنال كه با هم مرتبط هستند كنترل مي شوند. در ايجاد اين پاسخ‌ها هورمون هاي ساليسيليک اسيد (SA)، جاسمونيک اسيد (JA) و اتيلن نقش اصلي را ايفاء مي‌كنند (Manosalva et al., 2000). انتقال سيگنال SA براي فعال كردن بيان ژن‌هاي PR[1] نياز به عمل *NPR1* دارد. حمله پاتوژن به گياه موجب افزايش ميزان SA و توليد سريع واسطه هاي اكسيژن فعال مانند آب اكسيژنه مي‌شود. براي خنثي‌سازي اين تركيبات كه به طور بالقوه سمي هستند، حذف كننده هاي ROI فعال مي شوند و از

1 . Pathogenesis related protein

این طریق شرایط احیا کننده در سلول گیاهي بوجود مي‌آید (Despres et al., 2003). در اثر افزایش میزان SA، پروتئین NPR1 با تغییر شکل الیگومري به مونومري به درون هسته منتقل مي‌شود. NPR1 به عنوان یک تعدیل‌کننده بیان ژن‌هاي PR بطورمستقیم به DNA متصل نمي‌شود. آنالیزهاي مخمر دو هیبریدي نشان داده است که NPR1 از طریق فاکتورهاي رونوشت برداري یا TGAs که در فعال‌سازي ژن‌هاي PR نقش دارند عمل مي‌کند و اتصال TGAs به DNA با واسطه NPR1 براي فعال‌سازي ژن هاي PR ضروري است و این کار را از طریق افزایش قابلیت اتصال TGAs به DNA در محل پروموتورهاي واکنش‌دهنده به SA انجام مي‌دهد (Zhou et al., 2000). بنابراین تغییرات اکسیداسیون و احیایي سلول در نتیجه تجمع SA به عنوان یك عامل کلیدي منجر به فعال شدن NPR1 در SAR مي‌شود (شکل ۸) (Despres et al., 2000; Despres et al., 2003).

پروتئین‌هاي WRKY خانواده‌اي از فاکتورهاي رونویسي مي‌باشند که در مسیر انتقال سیگنال دفاعي نقش دارند و بلافاصله بعد از حمله پاتوژن القاء مي‌یابند (Eulgem et al., 2000) این گروه از پروتئین‌هاي چسبنده به DNA به w-box واقع در پروموتر ژن‌هاي مرتبط به واکنش‌هاي دفاعي متصل شده و باعث بیان ژن مي‌شوند (Golkari et al., 2007). ژن کاندید *NPR1* در پروموتر خود چندین جعبه w دارد که پروتئین‌هاي WRKY با اتصال به این جعبه باعث بیان ژن *NPR1* مي‌گردند (Singh et al., 2002; Yu et al., 2001).

همچنین ژن *NPR1* پروتئیني را کد مي‌کند که با اتصال به پروتئین‌هاي TGA از خانواده فاکتورهاي رونوشت برداري واقع در پروموتر ژن‌هاي *PR* منجر به فعال شدن این ژن‌ها در شرایط تیمار با قارچ *F. graminearum* مي‌شود (Despres et al., 2000; Despres et al., 2003; Zhou et al., 2000) و فعالیت اولیه این ژن براي شروع نسخه برداري و فعال شدن ژن‌هاي *PR* لازم است. بنابراین حمله پاتوژن باعث القاء پروتئین‌هاي WRKY و القاء پروتئین *NPR1* مي‌گردد.



شکل ۸- نقش *NPR1* و فاکتورهاي رونویسي TGA در بیان ژنهاي مقاومت

از اين رو در رقم حساس، بعد از حمله پاتوژن براي فعال شدن ژن هاي *PR* بيان اين ژن افزايش مي‌يابد ولي سطح تظاهر اين ژن در رقم حساس در اواخر دوره تنش كاهش معني داري پيدا مي‌كند كه همين امر مي تواند منجر به حساسيت اين رقم به بيماري FHB شود. در ارقام مقاوم به FHB در اوايل دوره تنش به دليلي (احتمالا بدليل وجود مكانيزم‌هاي مقاومت در گياه) نيازي به افزايش بيان اين ژن نيست، در ادامه تنش افزايش بيان ژن هاي *PR*، افزايش بيان ژن *NPR1* را مي طلبد. از اين رو گياه با افزايش بيان اين ژن باعث القاء ژن‌هاي مقاومت به بيماري مي‌شود. با بررسي نتايج الگوي تظاهر اين ژن در ارگان ها و زمان‌هاي بيشتر مي توان با اطمينان بيشتري آن را به عنوان ژن كانديد در القاء مقاومت به بيماري FHB معرفي نمود. زيرا سطح تظاهر ژن در روزهاي پاياني تنش افزايش بيشتري در لاين مقاوم به FHB نسبت به رقم حساس به اين بيماري (فلات) نشان داده است. نتايج اين تحقيق نشان داد ژن *NPR1* و نشانگر مولكولي مبتي بر اين ژن مي توانند در پروژه هاي تحقيقاتي براي ايجاد مقاومت به بلايت فوزاريومي سنبله در گندم مورد استفاده قرار گيرند.

سپاسگزاري

كليه هزينه‌هاي اين تحقيق توسط پژوهشكده بيوتكنولوژي كشاورزي وزارت جهاد كشاورزي تامين شده است كه بدينوسيله تشكر و قدرداني مي گردد.

REFERENCES

1. Buerstmayr, H., Lemmens, M., Hart, L., Doldi, L., Steiner, B., Steirschneider, M. & Ruckenbauer, P. (2002). Molecular mapping of QTLs for fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 84-91.
2. Buerstmayr, H., Steiner, B., Hartl, L., Griesser, M., Angerer, N., Lengauer, D., Miedaner, T., Schneider, B. & Lemmens, M. (2003). Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 503-508.
3. Cao, H., Li, X. & Dong, X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Plant Biology*, 95, 6531-6536.
4. Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D. & Fobert, P.R. (2003). The Arabidopsis *NPR1* disease protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/ leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell*, 15, 2118-2191.
5. Despres, C., Delong, C., Glaze, S., Liu, E. & Fobert, P.R. (2000). The Arabidopsis *NPR1*/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*, 12, 279-290.
6. Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. & Somssick, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*ence, 5, 199-206.
7. Golkari, S., Gilbert, J., Prashar, S. & Procunier, J. D. (2007). Microarray analysis of Fusarium graminearum-induced wheat genes: identification of organ-specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 38-49.
8. Kim, B-R., Nam, H-Y., Kim, S-U. & Chang, Y-J. (2003). Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters*, 25, 1869-1872.
9. Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daley, M. J., Lincoln, S. E. & Newburg, L. (1987). MAPMAKER: an interactive computer package of constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1, 174-181.
10. Lin, F., Kong, Z. X., Zhu, H. L., Xue, S. L., Wu, J. Z., Tian, D. G., Wei, J. B., Zhang, C. Q. & Ma, Z. Q. (2004). Mapping QTL associated with resistance to Fusarium head blight in the Nanda2419 x Wangshuibai population. I. Type II resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1504-1511.
11. Lu, H. J., Friesen, J. P., Meinhardt, T. L. & Faris, J. D. (2006). Genomic analysis and marker development for the Tsn1 locus in wheat using bin-mapped ESTs and flanking BAC contigs. *Theoretical and Applied Genetics*, 3, 1-11.
12. Manosalva, P., Torres, S., Trognitz, F., Gysin, R., Nino-Liu, D., Simon, R., Herrera, M., Perez, W., Landeo, J., Trogenitz, B., Gishlain, M. & Nelson, R. (2000). Plant defense gene associated with quantitative resistance to potato late blight. *CIP Program Report*, 27-37.
13. Mardi, M., Buerstmayr, H., Ghareyazie, B., Lemmens, M., Mohammadi. S. A., Nolz, R. & Ruckenbauer, P. (2005). QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a 'Wangshuibai' derived population. *Plant Breeding*, 124, 329-333.

14. Mardi, M., Ghareyazie, B., Buerstmayr, H., Lemmens, M., Moshrefzadeh, N. & Ruckenbauer, P. (2004). Combing ability analysis of resistance to head blight caused by Fusarium graminearum in spring wheat. *Euphtica*, 139, 45-50.
15. Mardi, M., Ghaffar, M. R., Ghareyazie, B., Mohammadi, S. A. & Pirseyedi, S. M. (2004). Application of DNA markers in breeding for resistance to wheat diseases. Key lecture. In: Proceedings of *8th Iranian congress of crop production and plant breeding*, Rasht, Iran.
16. Mardi, M., Pazouki, L., Delavar, H., Kazemi, M. B., Ghareyazie, B., Steiner, B., Nolz, R., Lemmens, M. & Buerstmayr, H. (2006). QTL analysis of resistance to fusarium head blight in wheat using a "Frontana" derived population. *Plant Breeding*, 125, 313-317.
17. Mardi, M., Yazdisamadi, B., Ghanadha, M. R., Ghareyazie, B., Talei, A. R. & Buerstmayr, H. (2002). Identification of DNA markers linked to QTL controlling Fusarium head blight resistance in common wheat. *Journal and Applied Genetics*, 43, 279-288.
18. Peng, W. C., Rong, J., Williams-Coplin, D., Schulze, S. R. & Paterson, A. H. (2003). EST derived PCR-based markers for functional gene homologues in cotton. *Genome*, 47, 449-472.
19. QIAGEN. (2005). *Quantitative™ SYBR® Green PCR Handbook*.
20. Raedschelders, G., Debefve, H., Delcour, J. A., Volckaert, G. & Van Campenhout, S. (2004). Molecular identification and chromosomal localization of genes encoding Triticum aestivum xylanase inhibitor I-like proteins in cereals. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(1), 112-121.
21. Shaner, G. & Finney, R. A. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67,1051-1056.
22. Singh, K. B., Foley, R. C. & Sanchez, L. O. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Bio*, 5, 430-436.
23. Somers, D. J., Fedak, G. & Savard, M. (2003). Molecular mapping of novel genes controlling Fusarium head blight resistance and deoxynivalenol accumulation in spring wheat. *Genome*, 46, 555–564.
24. Steiner, B., Lemmens, M., Griesser, M., Scholz, U., Schondelmaier, J. & Buerstmayr, H. (2004). Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in the spring wheat cultivar Frontana. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 215-224.
25. Utz, H. F. & Melchinger, A. E. (1996). PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. *Journal of Quantitative Trait Loci,* 1-1996, Data available via world wide web URL http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/jqtl/jqtl1996-01/utz.html.
26. Waldron, B. I., Moreno- Sevilla, B., Anderson, J. A., Stack, R. W. & Frohberg, R. C. (1999). RFLP mapping of QTL for fusarium head blight resistance in wheat. *Crop Science*, 39(3), 805-811.
27. Yu, D., Chen, C. & Chen, Z. (2001). Evidence for an Important Role of WRKY DNA Binding proteins in the regulation of *NPR1* Gene Expression. *Plant Cell*, 13, 1527-1539.
28. Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F. & Jr, C.N.S. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7, 85.
29. Zhou, J-M., Trifa, Y., Silva, H., pontier, D., Lam, E., Shah, J. & Klessig, D. F. (2000). *NPR1* differentially intracts with members of the TGa/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Intraction*, 13(2), 191-202.