

بررسی الگوی بیانی ژن‌های پروتئین ریبوزومی L3 تحت آلودگی بلایت فوزاریومی سنبله در گندم*

TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF RIBOSOMAL PROTEIN L3 (RPL3) GENES UNDER INFECTION OF FUSARIUM HEAD BLIGHT IN WHEAT

حسام شعبانی^۱، امیر موسوی^{۲*}، حسن سلطانیلو^۱، ساناز رمضانپور^۱،
فروغ سنجریان^۲ و مهدی کلاته عربی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۲/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۲۳)

چکیده

دی اکسی نیوالنول (DON) یکی از مهم‌ترین سموم تولیدشده توسط قارچ *Fusarium graminearum* در دانه‌های گندم آلوده می‌باشد. جایگاه عمل DON زیر واحد ۶۰S پروتئین ریبوزومی L3 (*RPL3*) بوده و تغییرات نقطه‌ای در اسید آمینه‌های *RPL3* در مخمر باعث ایجاد مقاومت به آن شده است. بررسی توالی‌های کدکننده *RPL3* نشان داده است که هیچ تفاوتی میان اسید آمینه‌های ارقام حساس و مقاوم گندم وجود ندارد. هدف اصلی از این تحقیق، تشخیص تغییرات احتمالی ایجاد شده در سطوح رونوشت ژن‌های *RPL3* (انواع A و B) تحت تنش بلایت فوزاریومی سنبله در گندم است. بدین منظور، از خوشه‌های آلوده به قارچ بیماری‌زا و غیرآلوده سه رقم Sumai3، Frontana و فلات در بازه‌های زمانی یک، سه و هفت روز بعد از آلودگی، استخراج RNA انجام شد. آزمون‌های RT-PCR نیمه کمی و کمی همراه با آغازگرهای اختصاصی (انواع A و B) برای تشخیص تفاوت در سطوح رونوشت این ژن‌ها بین ارقام حساس و مقاوم انجام گرفت. اطلاعات به دست آمده کاهش در سطح بیان ژن در گیاه آلوده نسبت به غیرآلوده در ارقام Sumai3 و فلات طی ۲۴ ساعت اولیه بعد از آلودگی را نشان می‌دهد. از طرفی، افزایش در سطح بیان ژن *RPL3A* در بازه زمانی هفت روز پس از آلودگی در رقم Frontana می‌تواند بیانگر نقش مشارکت این پروتئین خاص در بروز مقاومت در رقم فوق باشد.

واژه‌های کلیدی: بلایت فوزاریومی گندم، دی اکسی نیوالنول، پروتئین ریبوزومی، PCR در زمان واقعی

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

** :مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m-amir@nigeb.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد و استادیاران اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. به ترتیب دانشیار و استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۳. مربی ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان

مقدمه

عمده‌ترین عامل قارچی بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم (Fusarium Head Blight (FHB) گونه *Fusarium graminearum* می‌باشد. مایکوتوکسین دی اکسی نیوالنول (Deoxynivalenol (DON) که به وسیله این قارچ تولید می‌شود، از دسته تریکوتسین‌های (Trichothecene) نوع B می‌باشد (Bai et al. 2002) که مصرف دانه‌های آلوده به آن آثار نامطلوبی بر سلامتی انسان و حیوانات بر جای می‌گذارد (Chen et al. 2000). DON یک ممانعت‌کننده سنتز پروتئین در یوکاریوت‌هاست که در روند بیماری‌زایی قارچ با غیرفعال کردن و یا به تأخیر انداختن بیان پروتئین‌های مرتبط با مقاومت در گیاه، باعث تشدید شدت بیماری می‌شود (Eudes et al. 2000).

بنابراین ایجاد مقاومت به DON همواره به عنوان یکی از عوامل مهم مقاومت پیچیده و پلی ژنی در مقابل FHB مطرح می‌باشد. مکانیسم عمل تریکوتسین‌ها، مهار سنتز پروتئین در یوکاریوت‌ها با اتصال به زیرواحد ۶۰S ریبوزومی و مهار فعالیت پپتیدیل ترانسفراز است (Cundliffe et al. 1974). L3 بزرگ‌ترین پروتئین ریبوزومی است که نقش اساسی در فعالیت پپتیدیل ترانسفراز ریبوزوم دارد (Meskauskas et al. 2005). مطالعات انجام شده در طی غربالگری جهش یافته‌های مقاوم به توکسین تریکودرمین در مخمر *Saccharomyces servisiae* منجر به معرفی یک الیل نیمه غالب از پروتئین ریبوزومی L3 (RPL3) گشته است (Fried & Warner 1981; Schultz & Friesen 1983). در عین حال، بررسی‌های بعدی نشان داده‌اند که تغییرات نقطه‌ای در توالی اسید آمینه‌ای RPL3 می‌تواند منجر به بروز مقاومت نسبت به توکسین دی اکسی نیوالنول در مخمر و گیاه از طریق ممانعت اتصال DON به قسمت

هدف پروتئین بشود (Harris & Gleddie 2001; Mitterbauer et al. 2004). البته استفاده از آلل‌های جهش یافته در این مدل‌ها عمدتاً به طریق وابسته به مصرف DON بوده است (Mitterbauer et al. 2004). از طرف دیگر، مطالعات انجام گرفته در گندم حاکی از بروز نوعی مقاومت ریبوزومی وابسته به ژنوتیپ در مقابل FHB در رقم Frontana بوده است (Miller & Ewen 1986; Miller & Arnison 1997) و وجود نسخه‌های جهش یافته از ژن *RPL3* به عنوان یکی از دلایل بروز این مقاومت پیشنهاد شده است. *RPL3* همانند سایر پروتئین‌های ریبوزومی در یوکاریوت‌ها به شدت حفاظت شده بوده و بر خلاف مخمر که به وسیله یک ژن کد می‌گردد، در گیاهان عالی از جمله آرابیدوپسیس (Barakat et al. 2001)، برنج (Nishi et al. 1993; Mitterbauer 2001) و گندم (Lucyshyn et al. 2007) به شکل دو ژن پارالوگ *A* و *B* یافت شده است. مطالعات انجام گرفته در طی مقایسه توالی‌های شش cDNA مربوط به *RPL3* های نوع *A* و *B* در گندم نان نشان داده است که هیچ تفاوتی در توالی پیش‌بینی شده اسید آمینه‌ای این پروتئین بین ارقام حساس و مقاوم در شرایط طبیعی (بدون تنش بیماری) وجود ندارد (Sanjarian et al 2005; Lucyshyn et al. 2007). از این رو، شاید بتوان نقش این پروتئین را بدین صورت توجیه کرد که ممکن است تغییراتی در سطح رونوشت و پس از نسخه‌برداری از این ژن به دنبال اعمال آلودگی سبب ایجاد مقاومت نسبت به DON در ارقام مقاوم از طریق القاء بیان پروتئین‌های جهش یافته شود. بنابراین در این تحقیق، بررسی نحوه بیان این ژن‌ها قبل و پس از آلودگی توسط قارچ *F. graminearum* در شرایط مزرعه در دو رقم مقاوم (با الگوی مقاومت متفاوت) و یک رقم حساس مد نظر قرار گرفت.

روش بررسی

مواد گیاهی

در این مطالعه ارقام مختلف از گندم نان (*Triticum aestivum* L.) به نام‌های Sumai3 (مقاوم)، Frontana (نسبتاً مقاوم) و فلات (حساس) هر کدام در ردیف‌هایی به صورت جداگانه در ایستگاه تحقیقات کشاورزی عراقی محله گرگان کشت شدند. کشت هر ژنوتیپ روی ردیف‌های دو متری با عرض ۶۰ سانتی‌متر در دو خط و فاصله بوته ۳۰ سانتی‌متر به صورت دستی انجام شد.

تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ و مایه‌زنی مصنوعی ارقام

برای تهیه سوسپانسیون اسپور، جدایه قارچ *F. graminearum* تهیه شده در گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی گرگان مورد استفاده قرار گرفت. قارچ مورد نظر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar) (PDA) (۲۰٪ عصاره سیب‌زمینی، ۱٪ دکستروز) کشت شد و درون انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از حدود یک هفته قارچ کل سطح محیط کشت را پوشاند. ۲/۵ گرم پودر کاه گندم همراه با ۲/۵ گرم پودر کاه جو درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و ۱۲۵ میلی‌لیتر آب به هر ارلن اضافه شد. پس از اتوکلاو، ارلن‌ها به زیر هود لامینار منتقل شدند. محیط کشت درون تشتک پتری با استفاده از تیغ جراحی سترون خرد و به اندازه یک سانتی‌متر مربع از محیط کشت به هر یک از ارلن‌ها منتقل شد. درب ارلن‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شد و ارلن‌ها به مدت ۹۶ ساعت روی انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از ۹۶ ساعت، محیط درون ارلن‌ها در زیر هود لامینار

با استفاده از پارچه ململ سترون صاف شد. از محیط صاف شده که به صورت یک سوسپانسیون به رنگ قهوه‌ای تیره بود نمونه‌گیری شد و با استفاده از لام هماسیتومتر، غلظت سوسپانسیون برحسب تعداد ماکروکنیدی‌ها در هر میلی‌لیتر تعیین شد. سوسپانسیون مورد نظر را می‌توان حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری کرد. با این وجود در این آزمایش، از سوسپانسیون تازه قارچ استفاده شد و از غلظت 1×10^5 اسپور در میلی‌لیتر برای تلقیح در مزرعه استفاده شد (Bernardo et al, 2007). با توجه به اینکه دوره آسیب‌پذیری گندم به بیماری بلایت فوزاریومی در طول مرحله به سنبله رفتن و باز شدن گلچه‌ها است، در این بررسی نیز مایه‌زنی ارقام گندم با سوسپانسیون اسپور قارچ *F. graminearum* در همین مرحله و با غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر انجام گرفت. به این صورت که ۲۰ میکرولیتر مایع تلقیح توسط میکروپیپت در هر سنبله درون گلچه میانی تزریق گردید (Bernardo et al. 2007).

نمونه‌برداری از خوشه‌ها و استخراج RNA

پس از انجام مایه‌زنی مصنوعی، نمونه‌برداری‌های مورد نظر صورت گرفت. بدین ترتیب که اولین نمونه‌برداری درست قبل از مایه‌زنی سنبله‌های غیرآلوده هر سه رقم انجام گرفت و به‌عنوان کنترل و زمان صفر در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری دوم ۲۴ ساعت پس از آلودگی، به‌طور همزمان از نمونه‌های آلوده شده با اسپور و آب مقطر (شاهد) در هر رقم صورت گرفت. به همین ترتیب نمونه‌برداری‌های بعدی پس از سه روز و هفت روز انجام گرفت. لازم به ذکر است که برای دقت عمل، نمونه‌برداری در ۳ تکرار صورت گرفت و برای جلوگیری از تجزیه RNA موجود در بافت، بلافاصله بعد از جدا شدن سنبله‌ها از گیاه، نمونه‌ها درون ازت مایع قرار داده شدند. استخراج RNA نیز توسط کیت

جهت تأیید، از تمامی نمونه‌های cDNA ی رقیق شده با آغازگرهای ژن *Tubulin*، واکنش PCR انجام شد. جهت انجام آزمایش‌های نیمه‌کمی، واکنش RT-PCR برای ژن‌های *RPL3 A* و *B* به انضمام ژن خانه‌دار *Tubulin* با آغازگرهای اختصاصی مربوطه به طور همزمان انجام شد و محصول حاصله روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

آزمایش‌های RT-PCR کمی

آزمایش‌های PCR در زمان واقعی (Real-Time PCR) به وسیله رنگیزه فلورسنت SYBR Green انجام گردید. به این منظور، از دو جفت آغازگر اختصاصی دیگر برای *RPL3A* و *RPL3B* استفاده شد. در این آزمایش از ژن خانه‌دار *Actin* (با شماره دسترسی AB181991) برای نرمال‌سازی داده‌های آزمایش استفاده گردید (جدول ۲). پس از بررسی نتایج و به دست آوردن اعداد در نرم‌افزار iQ5، از نرم‌افزار REST (Bio-Rad Laboratories) جهت محاسبه مقادیر افزایش یا کاهش میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در تیمارهای مختلف استفاده شد. در این نرم‌افزار از فرمول زیر جهت محاسبه نسبت تظاهر ژن‌ها استفاده می‌شود.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{ACT_{\text{target}}(\text{Control-Sample})}}{(E_{\text{ref}})^{ACP_{\text{ref}}(\text{Control-Sample})}}$$

بر اساس این فرمول نسبت تظاهر ژن هدف بر اساس راندمان تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (E) و تفاوت نقطه تقاطع (Δ) نمونه ناشناخته نسبت به شاهد محاسبه می‌شود. به همین دلیل است که کنترل راندمان واکنش از اهمیت بالایی برخوردار است و در صورتی که راندمان توسط سری‌های غلظت محاسبه نشود نرم‌افزار عدد ۲ را جایگزین خواهد نمود.

RNX-Plus™ (Cinnagen, Tehran, Iran) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. برای تعیین غلظت نمونه‌ها، RNA های استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۲۶۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس با توجه به میزان غلظت RNA هر نمونه، به مقدار مساوی توسط oligo dT و آنزیم AMV Reverse Transcriptase اقدام به ساخت cDNA گردید.

طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن‌ها

از آنجا که توالی‌های مربوط به ژن‌های *RPL3 A* و *B* دارای شباهت‌های زیادی می‌باشند، برای طراحی آغازگرهای اختصاصی مربوط به هر کدام، در ابتدا این توالی‌ها که با شماره‌های دسترسی AY347527-AY347536 در بانک ژن NCBI ثبت گردیده‌اند، توسط نرم‌افزارهای (DNASTAR, Inc.) MegAlign و (Bio-soft) Genedoc هم‌ردیف شدند تا نواحی از توالی‌ها برای طراحی انتخاب شوند که کمترین شباهت را نسبت به هم داشته باشند. اطلاعات مربوط به آغازگرهای اختصاصی این ژن‌ها به همراه آغازگرهای ژن کنترل *Tubulin* (با شماره دسترسی TAU76895) در جدول ۱ ارائه گردیده است.

آزمایشات RT-PCR نیمه کمی

cDNA های سنتز شده برای انجام PCR با دو جفت آغازگر اختصاصی جهت تکثیر ژن‌های *RPL3A*، *RPL3B* و همچنین آغازگرهای مربوط به ژن *Tubulin* استفاده گردید. به منظور استفاده از cDNA ها در PCR نیمه کمی، نمونه‌ها باید رقت‌های متناسب و تا حد امکان مساوی داشته باشند. برای رسیدن به این هدف، از هر cDNA رقت‌های ۰/۵، ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ تهیه گردید و نهایتاً

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی بیان ژن‌های *RPL3* نوع *A* و *B* و آغازگرهای ژن *Tubulin* به‌عنوان ژن خانه‌دار در انجام آزمایش‌های نیمه‌کمی

Table 1. Sequence of the primers used for expression analysis of *RPL3* genes (A and B types) and the primers of *Tubulin* housekeeping gene in semi-quantitative experiments

نام آغازگر	توالی 5'→3'	دمای T_m (درجه سانتی‌گراد)	طول محصول واکنش (bp)
RPL3A Fw	ACCCACAGGGGTCTCCGAA	۶۱	۶۷۰
RPL3A Re	GTCTCAGGAGGCCTGCACT	۶۳	
RPL3B Fw	CCATTGTTGAGACACCCCCGA	۶۰	۶۷۰
RPL3B Re	AGAGGTCTTCGCAAGGTTGC	۵۹	
Tubulin Fw	GCTTTCAACAACCTTCTTCAG	۶۰	۶۸۰
Tubulin Re	GGGGCGTAGGAGGAAAGC	۶۲	

جدول ۲. مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در آزمایشات PCR در زمان واقعی

Table 2. Characteristics of the primers used in Real-time PCR experiments

نام آغازگر	توالی 5'→3'	دمای T_m (درجه سانتی‌گراد)	طول محصول واکنش (bp)
RPL3A Fw2	AGTGCAGGCCTCGTGAGAC	۶۱	۱۳۰
RPL3A Re2	CTCAGTAGAGGCATCATGAGTT	۶۳	
RPL3B Fw2	ACCCACAGGGGTCTCCGAA	۶۰	۱۳۰
RPL3B Re2	CCATTGTTGAGACACCCCCGA	۵۹	
Actin Fw	TGGCTCTATTTTGGCCTCTC	۵۸	۱۲۲
Actin Re	AGTCCCCTTCACCGACTCTT	۶۰	

بنابراین برای این که آغازگرهای بکار رفته جهت تکثیر این دو ژن تا حد امکان به‌طور اختصاصی عمل نمایند، هم‌ردیفی این توالی‌ها برای مشخص شدن نقاط دارای بیشترین اختلاف ضروری بود. این کار توسط نرم‌افزارهای آنالیز توالی‌های DNA انجام گرفت. به این صورت که ابتدا توالی‌های cDNA *RPL3* نوع *A1*، *A2* و *A3* با ژن *RPL3* نوع *B1*، *B2* و *B3* هم‌ردیف شدند و سپس با

نتایج

هم‌ردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی و طراحی آغازگرهای اختصاصی

از آنجا که توالی دو ژن پارالوگ *RPL3* نوع *A* و *B* دارای شباهت زیادی نسبت به یکدیگر می‌باشند (بیشترین تشابه بین *A3* و *B1* با ۸۸/۷ درصد و کمترین تشابه با ۸۷/۹ درصد بین *A3* و *B3* وجود دارد) (Sanjarian et al. 2005)،

درحالی که، سه روز بعد از آلودگی افزایش بیان ژن و هفت روز پس از آلودگی کاهش مجدد بیان این ژن مشاهده گردید (شکل ۲-۱). در آزمایش‌های کمی با روش PCR در زمان واقعی نیز کاهش بیان ژن‌های گروه A در ۲۴ ساعت ابتدایی مشاهده گردید اما در بازه‌های زمانی سه و هفت روز اختلافات معنی‌دار نبودند (شکل ۲-۲). ژن‌های *RPL3A* در رقم فرونتانا در آزمایش‌های نیمه‌کمی کاهش مختصری را در نمونه‌های آلوده نسبت به شاهد در زمان یک روز بعد از آلودگی از خود نشان دادند و به دنبال آن افزایش بیان این ژن هفت روز پس از آلودگی مشاهده گردید (شکل ۳-۱). آزمایشات کمی با روش PCR در زمان واقعی نیز افزایش بیان ژن در روز هفتم را تایید کرد (شکل ۳-۲). آزمایش‌های نیمه‌کمی با آغازگرهای *RPL3B* و *Tubulin* در رقم *Sumai3*، افزایش معنی‌داری را در نمونه‌های آلوده نسبت به شاهد در زمان‌های یک و سه روز بعد از آلودگی نشان دادند (شکل ۴-۱)، که داده‌های به‌دست آمده از روش کمی نیز این نتایج را تایید نمود (شکل ۴-۲). آزمایش‌های نیمه‌کمی با آغازگرهای *RPL3B* و *Tubulin* در رقم فلات کاهش بیان ژن‌های نوع B را ۲۴ ساعت پس از آلودگی نشان داد (شکل ۵-۱) که نتایج کمی نیز آن را تایید می‌کرد (شکل ۵-۲). نتایج به دست آمده از بررسی بیان این ژن‌ها در سایر حالات تغییرات معنی‌داری را نشان نمی‌داد که در اینجا داده‌های مربوطه ارائه نگردیده‌اند.

بحث

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله در طی سال‌های اخیر باعث از بین رفتن محصولات گندم و سایر غلات دانه ریز در بسیاری از نقاط دنیا (Parry et al. 1995, Harris et al. 1999, Burstmayr et al. 2003, Guihong et al. 2004)

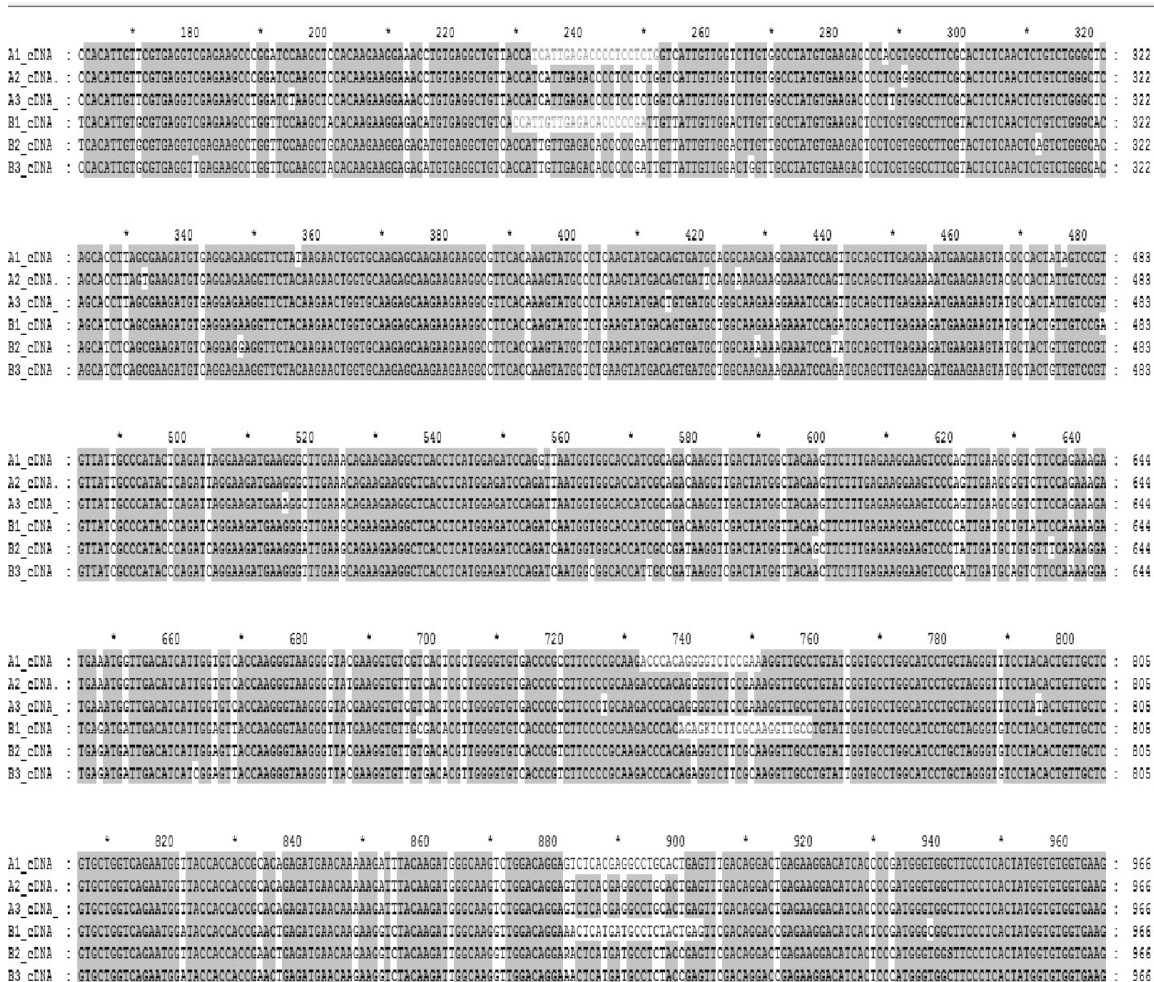
انتقال این داده‌ها به نرم‌افزار GeneDoc نواحی دارای اختلاف مشخص گردیدند (شکل ۱). از نقاط دارای بیشترین اختلاف (به خصوص در نواحی ۳) برای طراحی آغازگرهای اختصاصی توسط نرم‌افزار Oligo استفاده شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA

پس از کشت نمونه‌های گندم و ایجاد سنبله‌ها، RNA کل در محدوده‌های زمانی تعیین شده استخراج و جهت تأیید کیفیت و کمیت آن در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر به دست آمد. باندهای rRNA پس از رنگ‌آمیزی روی ژل مشاهده گردید که مؤید صحت RNA به‌دست آمده بود. RNA استخراج شده از سنبله ارقام انتخابی گندم در ساخت cDNA به کار رفت. از آنجا که هدف نهایی، انجام آزمایش‌های نیمه‌کمی و کمی بود بنابراین ضرورت داشت تا مقادیر یکسان از RNA برای تمام نمونه‌ها برای ساخت cDNA به کار رود. به این منظور، غلظت نهایی RNA ها با اسپکتروفوتومتر (در طول موج ۲۶۰ نانومتر) محاسبه شد، و برای ساخت cDNA هر نمونه ۵ میکروگرم از RNA به کار رفت.

آزمایش‌های مقایسه‌ای بیان ژن‌های *RPL3*

cDNAهای سنتز شده از RNA خوشه‌های آلوده و غیرآلوده ارقام گندم فلات، *Sumai3* و *Frontana*، در سه بازه زمانی یک، سه و هفت روز پس از آلودگی، با آغازگرهای اختصاصی *RPL3* نوع A و B و هم‌چنین آغازگرهای عمومی ژن *Tubulin* هم‌زمان و با یک مقدار در آزمون RT-PCR به کار گرفته شدند. آزمایش‌های نیمه‌کمی با استفاده از آغازگرهای *RPL3A* و *Tubulin* در رقم *Sumai3* کاهش معنی‌داری در نمونه‌های آلوده نسبت به شاهد در زمان یک روز بعد از آلودگی را نشان دادند

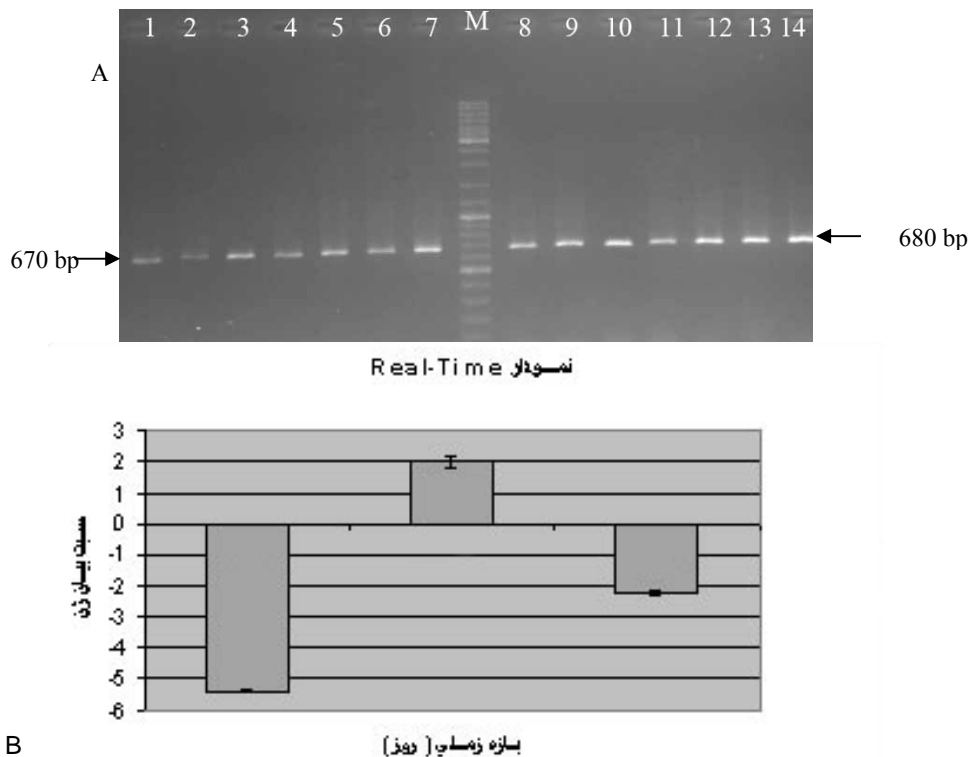


شکل ۱. هم‌ردیفی توالی‌های cDNA مربوط به همولوگ‌های ژن *RPL3* نوع **A** و **B** گندم. نواحی سفید رنگ، نوکلئوتیدهای دارای اختلاف را نشان می‌دهند. توالی‌های به کار رفته جهت آغازگرهای مستقیم به رنگ‌های سبز (برای آزمایش‌های نیمه‌کمی) و قرمز (برای آزمایش‌های PCR در زمان واقعی) و توالی‌های به کار رفته برای آغازگرهای معکوس به رنگ آبی نشان داده شده‌اند

Fig. 1. cDNA alignment of A- and B-type *RPL3* homeologs of wheat. Differences in nucleotides are shown in white boxes. Sequences used in forward primers are shown in green (for semi-quantitative experiments) and red (for real-time experiments), and sequences used in reverse primers are shown in blue

یکی از راهکارهای کنترل شدت بیماری FHB، کاهش تجمع تریکوتسین‌ها در گیاه آلوده است. رابطه مستقیمی بین کاهش تجمع مایکوتوکسین‌ها در دانه با مقاومت به بیماری در مزرعه دیده شده است (Ruckenbauer *et al.* 2001). علاوه بر این، آلودگی محصولات غلات دانه ریز با مایکوتوکسین‌ها در به خطر انداختن سلامت غذایی انسان و دام نقش زیادی دارد (Di *et al.* 2010) و اجتناب از

ازجمله ایران (Mousavi Jofr 2003 Babadoost 1993, Golzar 1993, Foroutan *et al.* 1995) شده است. قارچ عامل بیماری انواع مختلفی از میکوتوکسین‌ها از جمله تریکوتسین‌ها را تولید می‌کند. تریکوتسین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که باعث تشدید بیماری‌زایی و وسعت کلونیزه شدن قارچ می‌شوند و به عنوان عامل افزایش‌دهنده شدت بیماری‌زایی عمل می‌کنند (Mesterhazy 1995).

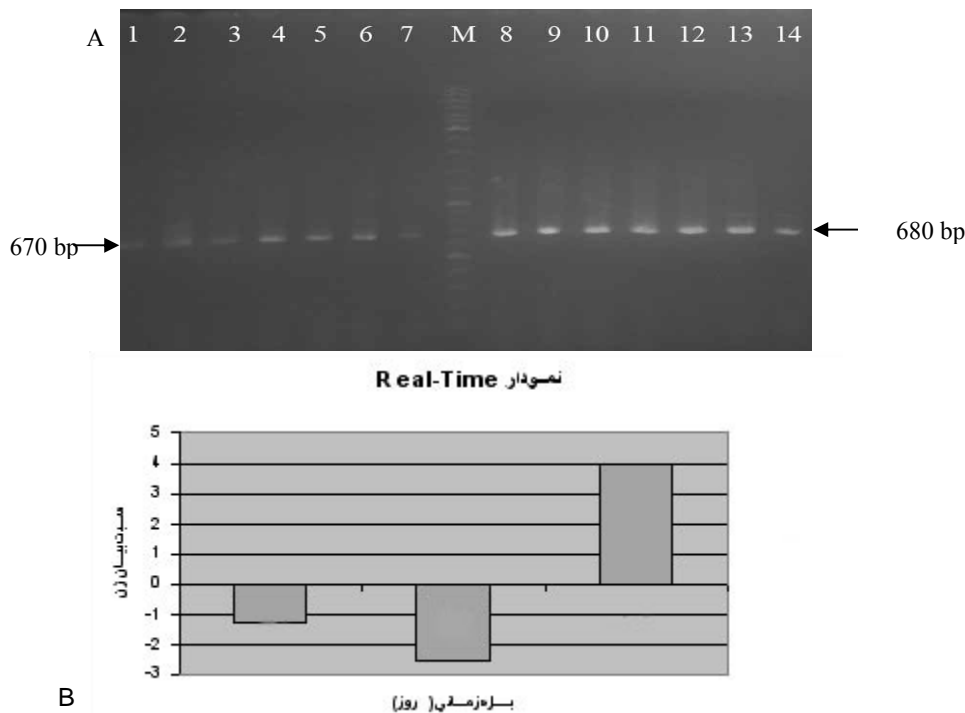


شکل ۲. تغییرات بیان ژن *RPL3A* در بازه‌های زمانی یک، سه و هفت روز پس از آلودگی توسط قارچ *Fusarium graminearum* در رقم Sumai3. A) نتایج حاصل از بررسی نیمه کمی با توجه به قطعات ژن هدف (چاهک‌های اتا ۷) و ژن *tubulin* (چاهک‌های اتا ۸). چاهک‌های ۱ و ۸: نمونه کنترل قبل از آلودگی، چاهک‌های ۲ و ۹: نمونه آلوده یک روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۳ و ۱۰: نمونه آلوده با آب ۱ روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۴ و ۱۱: نمونه آلوده سه روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۵ و ۱۲: نمونه آلوده با آب سه روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۶ و ۱۳: نمونه آلوده هفت روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۷ و ۱۴: نمونه آلوده با آب هفت روز پس از آلودگی، M: Mix Ladder (Fermentas). B) نتایج حاصل از مقایسه الگوی بیان ژن از طریق روش کمی PCR در زمان واقعی

Fig. 2. Expression changes of *RPL3A* in Sumai3 during 1, 3 and 7 days after infection by *Fusarium graminearum*. A) Results obtained from semi-quantitative analysis with respect to the target gene (lanes 1-7) and *tubulin* gene (lanes 8-14); 1 and 8: uninfected samples, 2 and 9: inoculated samples 1 day after infection, 3 and 10: mock-inoculated samples 1 day after infection, 4 and 11: inoculated samples 3 days after infection, 5 and 12: mock-inoculated samples 3 days after infection, 6 and 13: inoculated samples 7 days after infection, 7 and 14: mock-inoculated samples 7 days after infection, M: Mix Ladder (Fermentas). B) Results obtained from expression profile analysis by real-time PCR

سیتوپلاسمی (Miterbauer & Adam 2002)، سم‌زدایی از توکسین با افزودن گروه‌های استیل (Alexaender *et al.* 2000) یا گلیکوزیل (Poppenberger *et al.* 2003) و جلوگیری از اتصال توکسین به پروتئین هدف سلولی

آلودگی مواد غذایی با این ترکیبات گام مؤثری در تهیه غذای سالم در جامعه است. مکانیسم‌های موجود برای مقاومت به تریکوتسین‌ها به سه دسته عمده تقسیم می‌شوند که شامل خارج کردن مواد سمی توسط ناقلین

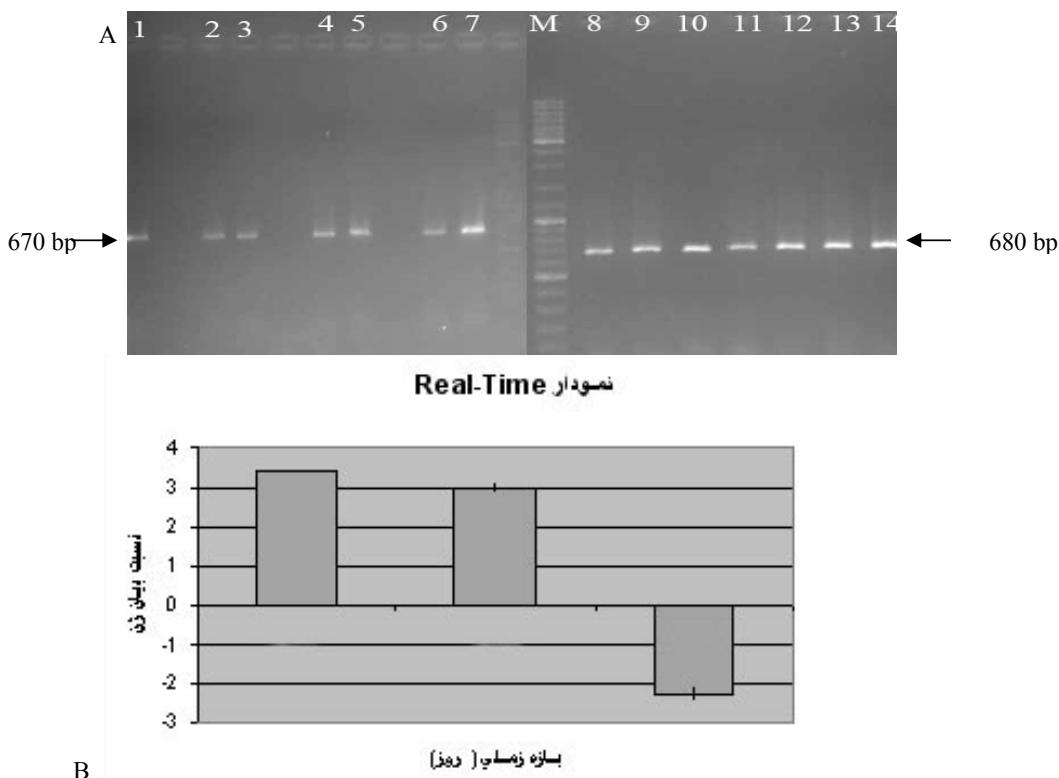


شکل ۳. الگوی تغییرات بیان ژن *RPL3A* در بازه‌های زمانی یک، سه و هفت روز پس از آلودگی توسط قارچ *Fusarium graminearum* در رقم *Frontana*. A) نتایج حاصل از بررسی نیمه کمی بیان ژن با توجه به قطعات تکثیر شده ژن هدف (چاهک‌های ۱ تا ۷) و ژن *tubulin* (چاهک‌های ۸ تا ۱۴). چاهک‌های ۱ و ۸: نمونه کنترل قبل از آلودگی، چاهک‌های ۲ و ۹: نمونه آلوده یک روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۳ و ۱۰: نمونه آلوده با آب یک روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۴ و ۱۱: نمونه آلوده با آب سه روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۵ و ۱۲: نمونه آلوده با آب هفت روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۶ و ۱۳: نمونه آلوده با آب هفت روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۷ و ۱۴: نمونه آلوده با آب هفت روز پس از آلودگی، M: Mix Ladder (Fermentas). B) نتایج حاصل از مقایسه الگوی بیان ژن از طریق روش کمی PCR در زمان واقعی

Fig. 3. Expression changes of *RPL3A* in *Frontana* during 1, 3 and 7 days after infection by *Fusarium graminearum*. A) Results obtained from semi-quantitative analysis with respect to the target gene (lanes 1-7) and *tubulin* gene (lanes 8-14); 1 and 8: uninfected samples, 2 and 9: inoculated samples 1 day after infection, 3 and 10: mock-inoculated samples 1 day after infection, 4 and 11: inoculated samples 3 days after infection, 5 and 12: mock-inoculated samples 3 days after infection, 6 and 13: inoculated samples 7 days after infection, 7 and 14: mock-inoculated samples 7 days after infection, M: Mix Ladder (Fermentas). B) Results obtained from expression profile analysis by real-time PCR

دو ژن پارالوگ *A* و *B*، شش ژن همیولوگ که در دو گروه *RPL3A* و *RPL3B* تقسیم‌بندی می‌شوند وجود داشته که پنج پروتئین متفاوت را کد می‌کنند (Lucyshyn *et al.* 2007). در این بررسی، سنجش کمی بیان ژن با دو جفت آغازگر *RPL3 A* و *B* هر کدام

یعنی *RPL3* است که می‌تواند از طریق تغییر در ساختمان (Harris *et al.* 1999) و یا افزایش بیان آن صورت گیرد. ژن‌های *RPL3* (Di *et al.* 2010) موجود در گندم نان شناسایی و تعیین خصوصیات شده‌اند. با توجه به هگزاپلوئید بودن این گیاه و حضور

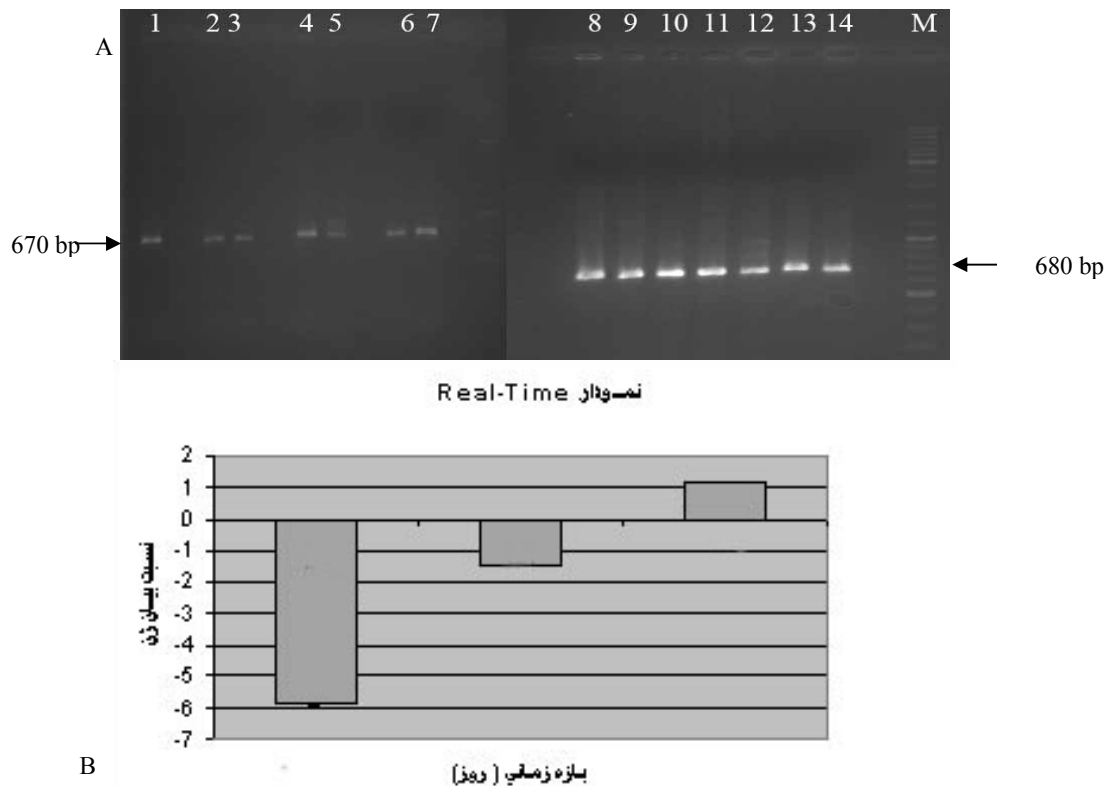


شکل ۴. الگوی تغییرات بیان ژن *RPL3B* در بازه‌های زمانی یک، سه و هفت روز پس از آلودگی توسط قارچ *Fusarium graminearum* در رقم Sumai3. A) نتایج حاصل از بررسی نیمه کمی بیان ژن با توجه به قطعات تکثیر شده ژن هدف به طول ۶۷۰ جفت باز (چاهک‌های ۷ تا ۱۴) و ژن *tubulin* به طول ۶۸۰ جفت باز (چاهک‌های شماره ۸ تا ۱۴). چاهک‌های ۱ و ۸: نمونه کنترل قبل از آلودگی، چاهک‌های ۲ و ۹: نمونه آلوده یک روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۳ و ۱۰: نمونه آلوده با آب یک روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۴ و ۱۱: نمونه آلوده سه روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۵ و ۱۲: نمونه آلوده با آب سه روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۶ و ۱۳: نمونه آلوده هفت روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۷ و ۱۴: نمونه آلوده با آب هفت روز پس از آلودگی، M: Mix Ladder (Fermentas) حاصل از مقایسه الگوی بیان ژن از طریق روش کمی PCR در زمان واقعی

Fig. 4. Expression changes of *RPL3B* in Sumai3 during 1, 3 and 7 days after infection by *Fusarium graminearum*. A) Results obtained from semi-quantitative analysis with respect to the target gene (lanes 1-7) and *tubulin* gene (lanes 8-14); 1 and 8: uninfected samples, 2 and 9: inoculated samples 1 day after infection, 3 and 10: mock-inoculated samples 1 day after infection, 4 and 11: inoculated samples 3 days after infection, 5 and 12: mock-inoculated samples 3 days after infection, 6 and 13: inoculated samples 7 days after infection, 7 and 14: mock-inoculated samples 7 days after infection, M: Mix Ladder (Fermentas). B) Results obtained from expression profile analysis by real-time PCR

از آن به عنوان شاهد و همچنین باندهای ایجاد شده با شفافیت یکسان در همه بازه‌های زمانی می‌تواند در تشخیص تفاوت بیان ژن‌های هدف به کار بسته شود. برای بررسی الگوی بیان ژن‌ها از شرایط آلودگی مزرعه‌ای

به‌طور جداگانه در قیاس با ژن *Tubulin* صورت گرفت. دلیل استفاده از ژن *Tubulin* این بوده است که این ژن به طور دایم در سلول‌ها بیان می‌شود بنابراین بیان آن در شرایط تنش و بیماری مذکور اصولاً تغییری نمی‌کند. لذا،



شکل ۵. الگوی تغییرات بیان ژن *RPL3B* در بازه‌های زمانی یک، سه و هفت روز پس از آلودگی توسط قارچ *Fusarium graminearum* در رقم فلات. A) نتایج حاصل از بررسی نیمه کمی بیان ژن با توجه به قطعات تکثیر شده ژن هدف (چاهک‌های ۱ تا ۷) و ژن *tubulin* (چاهک‌های شماره ۸ تا ۱۴). چاهک‌های ۱ و ۸: نمونه کنترل قبل از آلودگی، چاهک‌های ۲ و ۹: نمونه آلوده یک روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۳ و ۱۰: نمونه آلوده با آب یک روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۴ و ۱۱: نمونه آلوده سه روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۵ و ۱۲: نمونه آلوده با آب سه روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۶ و ۱۳: نمونه آلوده هفت روز پس از آلودگی، چاهک‌های ۷ و ۱۴: نمونه آلوده با آب هفت روز پس از آلودگی، M: Mix Ladder (Fermentas). B) نتایج حاصل از مقایسه الگوی بیان ژن از طریق روش کمی PCR در زمان واقعی

Fig. 5. Expression changes of *RPL3B* in Falat during 1, 3 and 7 days after infection by *Fusarium graminearum*. A) Results obtained from semi-quantitative analysis with respect to the target gene (lanes 1-7) and *tubulin* gene (lanes 8-14); 1 and 8: uninfected samples, 2 and 9: inoculated samples 1 day after infection, 3 and 10: mock-inoculated samples 1 day after infection, 4 and 11: inoculated samples 3 days after infection, 5 and 12: mock-inoculated samples 3 days after infection, 6 and 13: inoculated samples 7 days after infection, 7 and 14: mock-inoculated samples 7 days after infection, M: Mix Ladder (Fermentas). B) Results obtained from expression profile analysis by real-time PCR

ارزیابی نحوه پاسخ ژن‌های مربوطه، از دو روش نیمه کمی و روش کمی PCR در زمان واقعی استفاده شد که در برخی از موارد تفاوت‌های جزئی بین داده‌های به دست آمده از روش نیمه کمی و کمی وجود داشت. از آنجا که

استفاده به عمل آمد که با توجه به مشارکت کلیه عوامل بیماری‌زا و تحریک‌کننده توسط پاتوژن و برهم کنش‌کننده با عوامل محیطی، در نوع خود می‌تواند بروز طیف دقیق‌تر و جامع‌تری از پاسخ‌های تدافعی را دربر داشته باشد. برای

و *PR-3* (Li et al. 2001) و ژن‌های *PR-4* و *PR-5* (Pritsch et al. 2000) در مقابله با بیمارگر *F. graminearum* نسبت به ارقام حساس افزایش بیان بیشتری داشته‌اند. هم‌چنین، تجمع لیگنین در دیواره ارقام متحمل افزایش ناگهانی داشته در صورتی که در ارقام حساس به طور نامحسوس افزایش می‌یابد (Kang & Buchenaure 2000). ژن‌های دیگری با عملکردهای متفاوت نیز گزارش شده‌اند که بیان آنها در طی مراحل آلودگی با این قارچ در ارقام متحمل افزایش می‌یابد که از جمله آنها می‌توان به گلوکاتایون ترانسفراز، اسیل *coa* تیواستراز و یا سیتوکروم *P450* (دخیل در فرآیند سم‌زدایی) و ژن پروتئین شبه 3-14 (مرتبط به مسیر پیام‌رسانی) اشاره کرد (Hill-Ambroz et al. 2006). این درحالی است که گزارش مستدلی در مورد تغییر در الگوی بیان ژن‌های پروتئین ریوزومی گیاه در اثر بیماری مذکور موجود نمی‌باشد. در مطالعات صورت گرفته بر روی *EST* های گندم، افزایش بیان همسانه‌هایی که احتمالاً با پروتئین ریوزومی مرتبط است در جواب به آلودگی با قارچ *F. graminearum* مشاهده شده است (Hill-Ambroz et al. 2006). در گیاه پنبه نیز تغییر بیان *EST* هایی که احتمالاً نشانگر پروتئین ریوزومی *5S* است در جواب به آلودگی به قارچ *F. oxysporum* گزارش شده است (Dowd et al. 2004). مطالعه حاضر، اولین گزارش موجود در ارتباط با تغییر رفتار ژن‌های پروتئین ریوزومی *L3* گندم در شرایط آلودگی مزرعه‌ای می‌باشد. به طور کلی نتایج به دست آمده می‌تواند نمایانگر نقش تأثیرگذار پروتئین‌های *RPL3* در مکانیسم‌های تحمل به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله در گیاه گندم باشد. مطالعه بر روی ژن‌های *RPL3* در گندم وجود مکان‌هایی برای دگر پیرایش در سطح *RNA* را در آنها محتمل

حساسیت و دقت روش کمی به کار رفته بسیار بالا می‌باشد، جهت تفسیر نتایج در برخی حالات از داده‌های حاصل از این روش به عنوان معیار استفاده گردید. در مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن‌های *RPL3A* در رقم‌های مقاوم *Sumai3* و فرونتانا در روزهای اول تا هفتم پس از آلودگی مشاهده می‌شود، اما در رقم حساس فلات این افزایش مشاهده نمی‌شود. الگوی افزایش بیان در رقم‌های مقاوم نیز با هم متفاوت است. در رقم *Sumai3* که مقاومت آن در برابر بیماری مقاومت نوع ۲ (مقاومت در برابر پخش علایم در سنبله گندم) ارزیابی شده است (Bai & Shaner 2004)، افزایش بیان این گروه از ژن‌ها در روز اول آلودگی (یعنی قبل از تولید تریکوتسین‌ها) اتفاق می‌افتد. در صورتی که در رقم فرونتانا که دخالت ریوزوم در مقاومت آن نسبت به *FHB* مورد تأیید قرار گرفته است و دارای مقاومت نوع ۵ (مقاومت به تأثیر تریکوتسین‌ها) است (Bai & Shaner 2004)، افزایش بیان در روز هفتم آلودگی معنی‌دار است.

مطالعه ژن‌های *RPL3B* نیز مشخص کرد که تنها رقمی که کاهش بیان ناشی از تنش بیماری را نشان نمی‌دهد نیز رقم فرونتانا است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گرچه توالی پروتئین ریوزومی *L3* در ارقام مقاوم و حساس گندم با هم تفاوتی نشان نداده‌اند (Lucyshyn et al. 2007) و ساختار این پروتئین در طی تکامل به شدت حفظ شده، ولی این امر در مقاومت به *FHB* تعیین‌کننده نبوده و تغییر در مقدار بیان یکی از آنها می‌تواند نقش کلیدی در مقاومت در برابر میکوتوکسین‌های تولیدی قارچ را داشته باشد. گزارش‌های متعددی در مورد تغییر در بیان ژن‌های مختلف گیاه بر اثر بیماری بلایت فوزاریومی گندم وجود دارد. از جمله این موارد می‌توان به ژن‌های دخیل در مقاومت گیاه به بیمارگر را نام برد. در ارقام متحمل گندم، ژن‌های *PR2*

زیست‌فناوری (طرح پژوهشی ۲۵۹) و بنیاد بین‌المللی علوم (IFS grant C/3861-1) بابت تأمین منابع مالی و هم‌چنین همکاری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان برای تأمین امکانات آزمایشگاهی و مزرعه‌ای کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (9-7) متن انگلیسی مراجعه شود.

می‌داند (Lucyshyn *et al.* 2007) که این موضوع فرضیه دخالت ژن‌های *RPL3* در ایجاد مقاومت از طرق دیگر را نیز تقویت می‌کند. به منظور تأیید فرضیه فوق و هم‌چنین نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، انجام ارزیابی‌های مقایسه‌ای مبتنی بر روش‌های پروتئومیکس، مطالعه وسیع‌تر جهت بررسی تغییرات بعد از رونویسی و بررسی برهمکنش‌های پروتئین‌های *RPL3* با سایر پروتئین‌ها پیشنهاد می‌گردند.

سپاسگزاری

نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و