

بیان ژن و فعالیت آنزیمی پراکسیداز و پلیفنول اکسیداز در پاسخ به بیماری سپتوریای برگی گندم

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

نسیبه چنارانی^۱، سیده ساناز رمضانپور^{۱*}، حسن سلطانلو^۱، احمد یامچی^۱، شعبان کیا^۱

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

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

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

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

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۷/۲۳)

چکیده

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

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
پراکسیداز
پلیفنول اکسیداز
سپتوریای برگی گندم
فعالیت آنزیمی

مقدمه

طبق گزارش (1994) Iiyama et al. پراکسیدازها (POXs, EC 1.11.1.7; donor: H₂O₂ oxidoreductase) ساخت لیگنین دخالت دارند. مونومرهای سازنده لیگنین دهیدروژنه شده و به رادیکال‌های فنوکسی در دیواره سلولی تبدیل می‌شود. این رادیکال‌ها به طور خودبخودی پلیمریزه شده و نتیجه آن شبکه‌ای از کراس لینک‌های مونولیگنول، پروتئین‌ها و پلی‌ساقارید‌هاست.

پلی‌فنول اکسیداز- L-4-OH phenol, 3, 4-OH dihydroxyphenylalanine: oxygen oxido reductase) (PPOs, EC 1.14.18.1; mono phenol, 3, 4-OH dihydroxyphenylalanine: oxygen oxido reductase) بسیار مهمی در سیستم دفاعی گیاه با تبدیل ترکیبات فنولی درونی به o-quinones که برای پاتوژن‌ها و حشرات سمی است، ایفا می‌کند (Mohammadi and Kazemi 2002). فعالیت پلی‌فنول اکسیداز در گیاهان و طی تنش‌های غیرزنده (Mayer and Harel 1991) و آنودگی قارچی (Luthra et al. 1988) افزایش می‌باشد.

با توجه به اهمیت این بیماری فهم وقایع دخیل در فرایند تحمل به بیماری ضروری به نظر می‌رسد. اهداف این مطالعه، در مرحله اول تعیین میزان بیان ژن‌های پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز در دو ژنتوتیپ حساس و متحمل به بیماری سپتوفایی برگی و مقایسه بیان ژن‌ها در این دو ژنتوتیپ می‌باشد. هدف دوم بررسی و مقایسه فعالیت این دو آنزیم طی دوره بیست و یک روزه بعد از آنودگی در ژنتوتیپ‌های آنوده و حساس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرور ژنتوتیپ‌های متحمل (لاین شماره ۱۰) و حساس (تجن) در گلدان‌های پلاستیکی کاشته شدند و هر روز صبح آبیاری صورت گرفت. گیاهان در گلخانه مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان در سال ۲۰۱۲ و در شرایط استاندارد رشد داده شدند. گیاهان ده روزه که در مرحله دو برگی قرار داشتند، با سوسپانسون قارچ با غلظت 10⁷ - 10⁶ spore/ml (Eyal et al. 1987) اسپری شدند. اسپورهای *S. tritici* از مزارع گندم آنوده گرگان جمع‌آوری شده بودند. به منظور تامین شرایط مناسب برای جوانه‌زنی و رشد اسپورها، گلدان‌ها در زیر پوشش‌های پلاستیکی

بیماری سپتوفایی برگی گندم (*Triticum aestivum* L.) توسط *graminicola* (Fuckel.) J. *Mycosphaerella* Roberge in *tritici Septoria* Schrot in Cohn (anamorph Desmaz.), ایجاد می‌شود. این بیماری در تمام نقاط جهان دیده شده و کاهش عملکرد چشمگیری را موجب می‌شود (Eyal et al. 1987; Hardwick et al. 2001 Abrinbana et al. 2010) (al.). بنابراین گزارش (2010) این بیماری در دو دهه گذشته به تدریج به یک بیماری مهم با کاهش عملکرد بالا در مناطق مستعد بیماری در ایران به ویژه در مناطق عمده کشت گندم مانند شمال و شمال غرب و غرب تبدیل شده است. همچنین طبق مطالعات مشخص شده که گونه‌های فعلی اکسیژن¹ مثل هیدروژن پراکسید (H₂O₂), سوپراکساید (O₂⁻) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) به علت قابلیت اکسیدکنندگی در سلول‌های زنده می‌توانند برای موجودات زنده بسیار خطرناک باشند (Bowler et al. 1992). اگر چه ROS‌ها در مسیرهای بیولوژیکی به عنوان محصول و یا ناقلين پیام در یک میزان پایه ثابت وجود دارند (Wu et al. 2002 Zelko et al. 1997), اما در شرایط خاصی مثل تولید بیش از حد یا سیستم آنتی‌اکسیدان ناکارآمد که باعث القا تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود، منجر به انباشته شدن ROS تا سطوح کشنده می‌شود (Monk et al. 1989; Fridovich 1991).

ROS‌ها به مولکول‌های پایه موجودات زنده مثل لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک حمله کرده و منجر به پراکسیداسیون غشایها (Kendal and Mc Kersie 1989) و شکست کربوهیدرات‌ها (Sato et al. 1993)، غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها (Fucci et al. 1983) و برش در رشته‌های DNA (Halliwell and Gutteridge 1999) می‌شوند. گیاهان سیستم بسیار کارآمدی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را برای کاهش ROS‌ها و حفاظت گیاه در تنش اکسیداتیو توسعه داده‌اند (Bowler et al. 1991). همچنین مطالعات در گیاهان نشان داده که سطوح ترکیبات فنولی و فعالیت فنیل‌آلانین‌امولیاز، پراکسیداز و پلی-فنول اکسیداز در گیاهان متحمل و حساس به تنش متفاوت است (Lo et al. 1999; Mohammadi and Kazemi 2002).

¹ Reactive oxygen species (ROS)

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

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

استخراج پروتئین

نمونه‌های برگی که در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند، با نیتروژن مایع بصورت پودر درآمدند و یک میلی لیتر بافر استخراج به آن اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۸ × ۱۴۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به تیوب جدید منتقل شده و در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور تهیه بافر استخراج ۲/۴۳۲ گرم تریس در ۷/۸ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل شده و به pH نهایی ۷/۸ رسانده شد. ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و مجددا pH آن کنترل شد. سپس ۲۰ میلی لیتر گلیسرول به آن اضافه شد و با آب دوبار تقطیر به حجم نهایی ۲۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

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

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

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

استخراج RNA و بررسی‌های Q-PCR

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

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

¹ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

² Reference gene

افزایش ۸ برابری در رونوشت‌های ژن پلیفنول اکسیداز نسبت به کنترل مشاهده شد، اما این افزایش پایدار نبود و در روز اول بعد از آلودگی کاهش شدید ۳۰ برابری نسبت به کنترل مشاهده شد که این کاهش رونوشت شدید در روزهای بعدی نشان‌دهنده شکست مقاومت ژنتوتیپ حساس می‌باشد (شکل ۳). بنابراین در ساعت‌ها و روزهای بعد روند کاهش نسبت به ساعت سوم به خوبی حفظ شده و تعداد رونوشت‌ها هیچ‌گاه به مقدار اولیه نرسید که می‌توان علت این بی‌نظمی را رفتارهای بیمارگر دانست.

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

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

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

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

نتایج و بحث

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

سطح بیان ژن پلیفنول اکسیداز در ساعت‌های اولیه در ژنتوتیپ متتحمل از روند منظمی پیروی نکرد، اما از روز دوم تعداد رونوشت‌ها به میزان چشمگیری افزایش یافت که با پاسخ فوق-حساسیت در روز سوم مطابقت نشان داد. بیشترین تعداد رونوشت‌ها نیز ده روز بعد از آلودگی مشاهده شد که به حدود ۱۸ برابر نسبت به کنترل رسید. در سه ساعت بعد از آلودگی

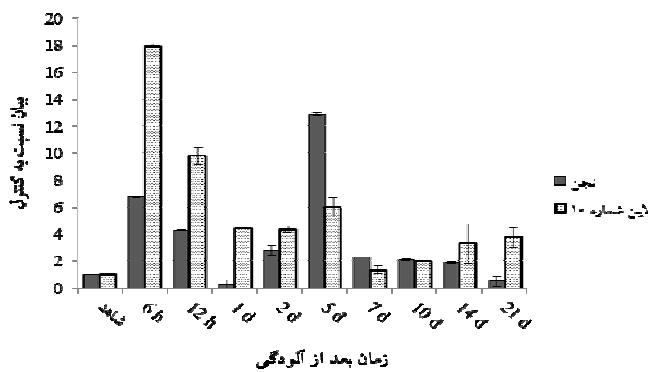
^۱ Hypersensitivity (HR)

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

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



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

شکل ۲- تغییرات سطح رونوشت‌های ژن پراکسیداز در دو ژنوتیپ متتحمل و حساس در پاسخ به بیماری سپتومیک برگی گلدم. ستون‌ها نمایانگر میانگین \pm انحراف معیار است. (d) روز بعد از آزادگانی، (h) ساعت بعد از آزادگانی

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

مقایسه با نمونه روز سوم رسید. با وجود این مجدداً افزایش یافته تا اینکه در هفته سوم به حداقل میزان خود در طول دوره نمونه-

برداری رسید. در مقایسه فعالیت آنزیم پلیفنول اکسیداز در هفته دوم و سوم، افزایش قابل توجهی مشاهده شد.

در این مطالعه، به کمک کارایی و دقت بالای روش Q-PCR به تعیین کمیت رونوشت‌های دو ژن آنتی‌اکسیدان در پاسخ دفاعی گندم به بیماری *Septoria tritici blotch* و همچنین مقایسه فعالیت آنزیمی آنها در دو ژنوتیپ متتحمل و حساس پرداخته شد. بدین منظور سطح بیان رونوشت‌های پراکسیداز و پلیفنول اکسیداز در هر دو ژنوتیپ اندازه‌گیری شد. افزایش قابل ملاحظه‌ای در بیان این دو ژن در ژنوتیپ متتحمل دیده شد و همانطور که پیش‌بینی می‌شد، این رابطه به طور مناسبی در محصول نهانی رونوشت‌ها، یعنی در فعالیت آنزیم‌ها حفظ شد. گزارشاتی مبنی بر افزایش فعالیت این دو آنزیم در نتیجه واکنش میان پاتوژن و میزان در شرایط تمثیلهای زنده وجود دارد (Ahl Goy et al. 1992).

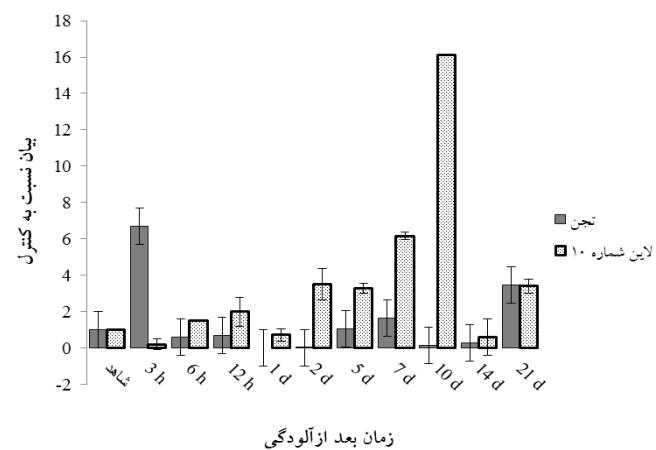
مرحله آخر تولید لیگنین منجر به افزایش مقاومت می شود (Van Huistee et al. 1987). طبق تحقیق (Lagrimini et al. 1987) این کارکرد پراکسیداز با کمک آب اکسیژنه و رادیکال های مونو لیگنان صورت می گیرد. تعداد کم و نوسانات شدید رونوشت های پراکسیداز که در ژنوتیپ حساس مشاهده شد تایید کننده تلاش ناموفق گیاه برای مقابله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

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

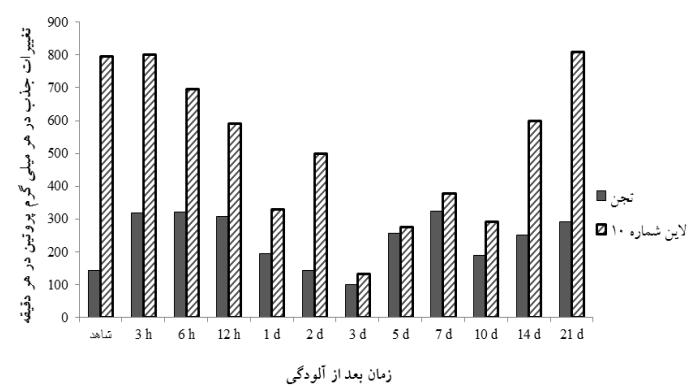
چنانچه مشاهده شد رونوشت های پلیفنول اکسیداز در ژنوتیپ متحمل پس از ظهور عالمی فوق حساسیت (مشاهدات گلخانه ای نویسنده) افزایش مناسبی داشته است. ROSها نقش حیاتی بسیاری طی بیماری گیاهی دارند مثل پاسخ فوق حساسیت که واکنش ناسازگاری بین میزان و بیمارگر است (Baker and Mittler et al. 1995; Orlando 1996; Willekens et al. 1995; Wu et al. 1997). همچنین قادرند انتشار آلودگی را با تقویت دیواره سلولی گیاه و یا با کشتن بیمارگر محدود کنند (Chamnongpol et al. 1998).

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

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



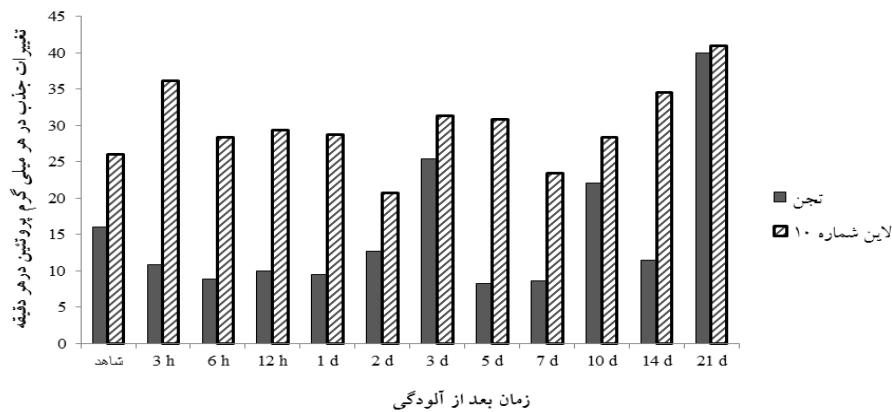
شکل ۳- تغییرات سطوح رونوشت های ژن پلیفنول اکسیداز در دو ژنوتیپ متحمل و حساس در پاسخ به بیماری سپتوریایی برگی گندم ستون ها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار است. (d) روز بعد از آلودگی و (h) ساعت بعد از آلودگی



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

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

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



شکل ۵- تغییرات سطوح فعالیت آنزیم پلیفنول اکسیداز در دو ژنوتیپ متحمل و حساس در پاسخ به بیماری سپتوریایی برگی گندم. d: روز بعد از آلودگی و h: ساعت بعد از آلودگی

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

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

منابع

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

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

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