

بررسی کمی بیان برخی ژن‌های کاندید مقاومت به بلایت فوزاریومی

گندم در پاسخ به داکسی نوالنول (DON)

اکرم صادقی^۱، محمدرضا غفاری^۲، مهربانو کاظمی^۳، پویا نجفی‌ماچانی^۴،
ابراهیم کریمی^۵، یدالله دالوند^۶

۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶- استادیار، استادیار و کارشناسان موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی

کشاورزی کرج، کرج، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aksadeghi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۵/۲/۸۹ - تاریخ پذیرش:)

چکیده

این تحقیق به منظور تعیین تفاوت‌های کمی و بیان سه ژن کاندید مقاومت به بلایت فوزاریومی گندم (FHB) در پاسخ به مایکوتوکسین اصلی قارچ فوزاریوم گرامیناروم عامل بیماری بلایت صورتی گندم (داکسی نوالنول (DON)) انجام شد. نتایج نشان داد که مقدار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر از توکسین DON تاثیر معنی داری بر جوانه‌زنی ارقام حساس، نیمه مقاوم و مقاوم گندم نداشت. ولی غلظت‌های ۱۵-۵ میلی‌گرم بر لیتر آن موجب کاهش معنی‌دار ($P \leq 0/05$) وزن تر و خشک گیاهچه‌های ارقام حساس، مقاوم و نیمه مقاوم گردید. تاثیر DON بر کمیت بیان ژن *PDR5*، *NPR1* و *Xsts3B-138_1* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real time PCR) انجام شد. نتایج نشان داد که بیان ژن *PDR5* تحت تاثیر سم به‌طور معنی‌دار در رقم حساس فلات و نیمه‌مقاوم فرونتانا افزایش یافت. در صورتیکه این افزایش برای رقم مقاوم ونگ‌شوبای معنی‌دار نبود. کاهش بیان ژن *NPR1* برای هر سه رقم ونگ‌شوبای، فلات و فرونتانا معنی‌دار بود. کاهش بیان *Xsts3B-138_1* در فلات و فرونتانا معنی‌دار و برای ونگ‌شوبای معنی‌دار نبود.

مقدمه

بیماری فوزاریوم سنبله گندم (FHB) یا اسکب (Scab) یکی از بیماری‌های مهم گندم در دنیا می‌باشد. عامل بیماری گونه‌های مختلف قارچ *Fusarium* است اما معمولاً دو گونه *F.culmorum* و *F.graminearum* به‌عنوان گونه‌های غالب معرفی می‌گردند (۱۴). این بیماری علاوه بر کاهش محصول، کیفیت آنرا نیز به دلایل مختلف از جمله کاهش سلولز، آمیلوز و پروتئین‌های ذخیره‌ای کاهش می‌دهد. یکی از مسائل نگران‌کننده در مورد این بیماری تولید فیتوتوکسین‌ها از جمله داکسی نوالنول (DON) توسط قارچ می‌باشد. این توکسین‌ها در دانه تجمع می‌یابند (۲) و مصرف آن موجب بیماری در انسان و دام می‌گردد (۱۰).

واژه‌های کلیدی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در

زمان واقعی،

داکسی نوالنول،

NPR1-Xsts3B-138_1-PDR5

به بلایت فوزاریومی سنبله در گندم (*PDR5*)، پس از مکان‌یابی این ژن گزارش کردند که آلل شناسایی شده در ارقام مقاوم و نیمه مقاوم تا ۲۰ درصد از تغییرات مربوط به سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بلایت فوزاریومی سنبله در گندم را با اثر منفی توجیه می‌نماید. آن‌ها همچنین توانستند با تبدیل قطعاتی از آن به یک نشانگر چند شکل این ژن را بر روی یکی از کروموزوم‌های رقم ونگ شوبای (*Wangshuibai*) مکان‌یابی نمایند. تاکنون گزارشی از جداسازی ژن کامل *PDR5* گندم ارایه نشده و تنها یک آلل از این ژن در فرونتانا شناسایی و گزارش شده است (۷).

پاسخ‌های دفاعی سیستمیک که تحت تاثیر عوامل بیولوژیک تحریک می‌شوند شامل مقاومت اکتسابی سیستمیک و مقاومت سیستمیک القایی می‌باشند. پاسخ‌های دفاعی توسط شبکه‌ای از مسیرهای انتقال پیام که با هم مرتبط هستند کنترل می‌شوند. در ایجاد این پاسخ‌ها هورمون‌های سالیسیک اسید (*SA*)، جاسمونیک اسید و اتیلن نقش اساسی را ایفا می‌کنند. انتقال پیام برای فعال کردن بیان ژن‌های *PR* (Pathogenesis related protein) نیاز به عمل پروتیین *NPR1* دارد. در اثر افزایش مقدار *SA* پس از القا توسط قارچ بیماریزا، *NPR1* به‌عنوان یک عامل تعدیل‌کننده بیان ژن‌های *PR* به درون هسته منتقل می‌گردد (۲۶). یکی از *EST* های مرتبط با مقاومت به بیماری بلایت صورتی گندم *Xsts3B-138_1* است که دارای چندشکلی در بین والدین حساس و مقاوم گندم می‌باشد. تجزیه لینکاژی نشان داد *Xsts3B-138* بر روی کروموزوم 3B قرار دارد و دارای اثر معنی‌دار در افزایش مقاومت به *FHB* می‌باشد. براساس گزارش ناجی و همکاران این قطعه شباهت قابل توجه‌ای با ژن مقاومت *RGA* (*Resistance Gene Analogue*) دارد (۲۰).

انواع مقاومی از گندم نان وجود دارند که علاوه بر مقاومت عمومی در برابر حمله قارچ، در برابر سموم تولید شده توسط آن نیز مقاوم می‌باشند. شناخت دقیق مکانیسم این نوع مقاومت و برآورد نقش آن از نظر کمی و کیفی می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی جهت تولید و گزینش ارقامی با توانایی حداکثر جهت مقابله با عامل بیماری و توکسین ایجاد شده توسط آن مفید باشد. در این راستا معرفی منابع ژنی موثر در مقاومت نسبت به *DON*

همبستگی بالا بین مقادیر *DON* و مقاومت در برابر بیماری در گندم گزارش شده است. اما در اکثر مطالعات همبستگی ضعیف تا متوسطی دیده شده است. به عبارتی ضریب همبستگی به‌علت مکان و سال آزمایش متغیر بوده است (۱۲). تحقیقات جدید نشان می‌دهند که *DON* نه تنها محصول بیماری بلکه عامل قسمتی از آن و به عبارتی تشدید کننده آن می‌باشد. بررسی تفاوت بیماریزایی فوزاریومی که واجد و فاقد ژن *Tri5* مسئول تولید *DON* می‌باشند نشان می‌دهد که تمامی ارقام مقاوم و حساس آلوده شده با قارچ واجد این ژن هم در گلخانه و هم در مزرعه علایم شدیدتری از بیماری را نشان داده و عملکرد کمتری داشته‌اند. این موضوع به عدم توانایی گسترش قارچ در خوشه مرتبط می‌باشد (۳). تحقیقات اخیر نیز نشان می‌دهند که لاین‌هایی با مقادیر کمتر *DON* در دانه به‌طور غیر مستقیم از طریق انتخاب گیاهانی که علایم خفیف‌تری از بیماری را نشان می‌دهند حاصل می‌گردد (۱۷).

در طی دو دهه گذشته لاین‌ها و کولتیوارهای مقاوم بسیاری از طریق برنامه‌های اصلاحی بدست آمده است. اما این لاین‌ها دارای دو مشکل اساسی می‌باشند که عبارتند از ناکافی بودن میزان مقاومت نسبت به بیماری در شرایط محیطی بویژه شرایط مناسب برای قارچ و نداشتن عملکرد قابل توجه از نظر اقتصادی، بنابراین در حال حاضر اغلب ارقام زراعی نسبت به بیماری حساس می‌باشند (۲۳).

تلاش‌های زیادی جهت روشن ساختن مکانیسم‌های مقاومت گندم نسبت به بیماری بلایت فوزاریومی خوشه انجام شده است (۲۲، ۲۱، ۱۸، ۱۶، ۶، ۵). اما پایه مولکولی و بیوشیمی مقاومت به-طور عمده ناشناخته باقی مانده است. بیان پروتیین‌های دفاعی (*PR1*)، گلوکانازها (*PR2*)، کیتینازها (*PR3*)، پروتیین‌های شبه توماتین (*PR4*)، *PR5* و پراکسیدازها پس از آلوده سازی نقطه‌ای با قارچ در ارقام حساس و مقاوم القاء می‌گردند (۲۲). بر اساس مطالعات انجام شده بر روی مخمر و تعدادی از گیاهان مدل (مانند *آراییدوپسیس*)، تعدادی از ژن‌های کاندید مقاومت برای برخی از بیماری‌های گندم شناسایی شده است. مردی و همکاران (۱۵) با مطالعه و بررسی بر روی همولوگ‌های ژن کاندید مقاومت

استخراج RNA و ساخت DNA مکمل استخراج RNA از برگ گیاهچه‌های ۱۰ روزه گندم تحت تاثیر RNeasy (شاهد) و ۱۰ میلی گرم بر لیتر DON با استفاده از plant Mini kit شرکت QIAGEN طبق دستورالعمل آن انجام گردید. DNA مکمل از روی ۱ میکروگرم RNA با استفاده از iScript cDNA synthesis kit شرکت Bio Rad و بر اساس رونویسی معکوس با مخلوطی از آغازگرهای تصادفی (Random hexamer) و oligo (dT) طبق دستورالعمل کیت ساخته شد.

تهیه سری‌های رقت

جهت بهینه‌سازی شرایط Real time PCR سریال رقت‌های متفاوت (بر پایه توان ۲، ۳، ۴، ۵، ۸ و ۱۰) از cDNA تهیه شد. بهترین سریال رقت برای ژن‌های *Xsts3B-138_1*، *NPR1*، *PDR5* و *rRNA 18S* به ترتیب سریال‌های تهیه شده بر پایه توان ۵، ۲، ۱۰، ۱۰ بود. پس از بدست آوردن بهترین رقت cDNA برای هر ژن اختصاصی، تکثیر آن ژن و ژن مرجع برای هر نمونه با استفاده از مقدار یکسان (۲ میکرولیتر) از رقت تعیین شده انجام گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real time PCR)

آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی ژنومی و EST‌های گزارش شده در بانک ژن NCBI برای ژن‌های *Xsts3B*، *NPR1*، *PDR5* و *138_1* و *rRNA 18S* (ژن مرجع به عنوان کنترل داخلی) با استفاده از نرم افزار Oligo Tech version 1.0 طراحی گردید (جدول ۱).

(خروج، تجزیه و یا تغییر ساختار سم) ضروری است. این پروژه با هدف شناسایی این منابع ژنی و در ادامه مطالعات انجام شده در بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی در رابطه با شناسایی ژن‌های موثر در مقاومت به بلایت فوزاریومی سنبله گندم انجام گردید.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه

بذور ۴ رقم فلات (Falat)، فرونتانا (Frontana)، ونگ شوای (Wangshuibai) و سومای ۳ (Sumai 3) پس از ضد عفونی سطحی (۱/۵ دقیقه تیمار با الکل ۷۰ درصد، آبشویی، ۲۰ دقیقه تیمار با وایتکس تجاری ۵۰ درصد همراه با یک قطره توتین ۸۰، آبشویی کامل) بر روی محیط آب آگار ۰/۸ درصد با pH=۵/۸ به‌عنوان کنترل و آب آگار حاوی ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در لیتر سم DON (Sigma) به‌عنوان تیمار کشت شد. آزمایش شامل ۶ تکرار و هر تکرار شامل یک پلیت ۸ سانتیمتری حاوی ۶ عدد بذر بود. پلیت‌ها به مدت ۴ روز در تاریکی و سپس به روشنایی منتقل گردیدند. شمارش بذور جوانه زده به ترتیب بعد از ۴۸، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت انجام و ثبت گردید. وزن خشک گیاهچه‌ها پس از ۱۰ روز از کشت اندازه‌گیری گردید. نتایج با استفاده از نرم افزار Excel بررسی و به وسیله T-test آنالیز گردید.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر رونوشت ژن‌های *Xsts3B-138_1*، *NPR1*، *PDR5*، *rRNA 18S*

منبع	دمای ذوب (Tm)	توالی	ژن	ردیف
(۷)	۶۹/۷ °C ۷۰/۳ °C	F(5' CGCCGAATGAGAGCATAGC 3') R (5' TAGGAAGTTTAGGTCGGGGG3')	PDR5	۱
(۹)	۶۶/۸ °C ۶۸/۹ °C	F (5' AAAGGCTGCGTTCAAGGG 3') R (5'CTTCTTACCTGTTGCTCATC 3')	NPR1	۲
(۲۰)	۷۳ °C ۷۳/۹ °C	F (5' TCATCTGGCCCACAACATACCC 3') R (5' CGATGGCTCCACCAATAAGTCC 3')	Xsts3B-138_1	۳
(۹ و ۱۱)	۷۰/۳ °C ۷۰/۳ °C	F (5' GTGACGGGTGACGGAGAATT 3') R (5' GACACTAATGCGCCCGGTAT3')	rRNA 18S	۴

DON بر بیان ژن‌های کاندید در غالب طرح کاملا تصادفی با نرم افزار MSTATC تجزیه شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

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

نتایج و بحث

تاثیر تیمار DON بر جوانه زنی ارقام حساس و مقاوم گندم مطالعات نشان داده است که DON تاثیری بر جوانه زنی ندارد و تاثیر آن در مرحله آغاز رویش بر روی رشد ریشه و اندام هوایی آشکار می‌گردد. غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر DON پس از روز هفتم، رشد ریشه و غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر رشد اندام‌های هوایی را پس از ۴ روز به‌طور معنی‌دار کاهش دادند (۱). همچنین تیمار گیاهچه، قطعات کلئوپتیل، کالوس و جنین‌های حاصل از کشت بساک گندم نیز با غلظت‌های مختلف DON نشان داد که این سم از رشد تمام منابع گیاهی ذکر شده ممانعت می‌کند. در طیف وسیعی از ژنوتیپ‌های بررسی شده کاهش رشد گیاهچه بین ارقام مقاوم و حساس به بیماری تفاوت نداشت (۴). مطالعات دیگری وجود دارد که نشان می‌دهد در میان واکنش کالوس‌های ارقام مقاوم و حساسی که مستقیماً بر روی محیط کالوس‌زایی و باززایی حاوی DON ایجاد شده‌اند تفاوت معنی‌دار وجود دارد. این تفاوت‌ها منجر به انتخاب لاین‌های مقاوم‌تر و پربارتری نسبت به والد مقاوم (Sumie 3) گردیده است (۲۴).

نتایج این بررسی نیز نشان داد تیمار DON در غلظت‌های ۱۵-۵ میلی گرم در لیتر بر جوانه زنی تاثیر نداشت. از آنجا که استفاده از بذور کهنه و یا آلوده به پاتوژن‌های قارچی که از مزرعه جمع آوری شده بود نتایج ضد و نقیض و غیر قابل تکرار نشان داد. لذا در این مطالعه از بذور بدست آمده از گیاهان سالم کشت شده در گلخانه استفاده گردید. بدین ترتیب نتایج این قسمت از مطالعه تکرار پذیر بود (آزمایش جوانه زنی و بررسی رشد سه بار تکرار گردید). تیمار با سم بر رشد گیاهچه ارقام حساس و مقاوم گندم تاثیر معنی‌دار ($P \leq 0.05$) داشت و موجب کاهش رشد و وزن تر

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد انتظار برای ژن *PDR5* یک قطعه به طول ۹۵ bp می‌باشد که از روی انتهای 3' گزارش شده برای رونوشت این ژن تکثیر می‌گردد. محصولات مورد انتظار برای ژن *NPR1* و جایگاه *Xsts3B-138_1* به ترتیب به طول ۱۷۰bp و ۱۴۵bp و از قسمت انتهای 3' می‌باشد.

برای انجام Real time PCR از کیت iQTM SYBR Green Supermix طبق دستورالعمل استفاده گردید. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل دمای واسرشت اولیه 94°C به مدت ۴ دقیقه، چرخه تکثیر با دمای واسرشت 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال 68°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر 72°C به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی 72°C به مدت ۵ دقیقه به انضمام ثبت منحنی ذوب (melting curve) بود. برای تأیید اختصاصی عمل نمودن آغازگرها از آنالیز منحنی‌های ذوب (Melt Curve Analysis) استفاده شد. با مشاهده تنها یک پیک در آنالیز منحنی‌های ذوب هر قطعه تکثیر شده مشخص شد که آغازگرهای ژن مرجع و ژن‌های کاندید مقاومت محصول اختصاصی را تکثیر می‌دهند. همچنین جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر با طول مشخص و قابل انتظار، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ مورد بازبینی قرار گرفتند.

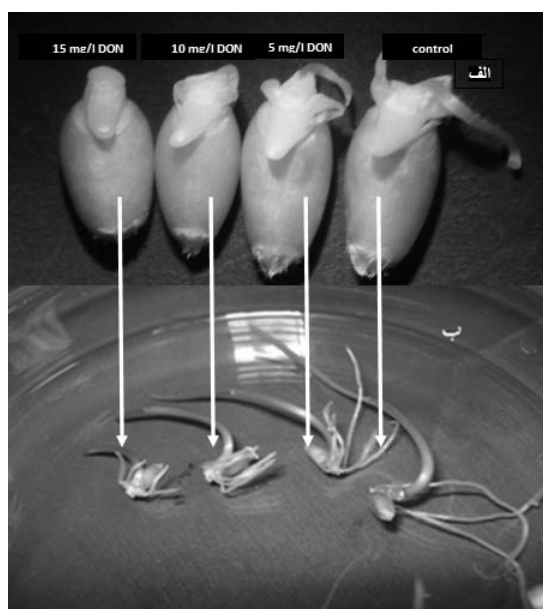
آنالیز داده‌ها و تجزیه آماری

به منظور آنالیز داده‌های حاصل از Real time PCR از نرم افزار طراحی شده توسط شرکت Bio Rad به نام iCycler که بر اساس مقدار *threshold cycle* (Ct) یا چرخه آستانه عمل می‌کند استفاده شد. از ژن ۱۸s (ژن مرجع) برای نرمال کردن داده‌ها استفاده گردید. راندمان و یا بازده تکثیر با توجه به نواحی اتصال آغازگر، توالی و اندازه قطعه تکثیر شده از روی هر ژن تعریف می‌گردد. این کمیت نقش مهمی را در ارزیابی‌های نسبی ایفا می‌کند. لذا در مطالعات نسبی- برای لحاظ شرایط واکنش هر یک از ژن‌های هدف و مرجع- منحنی استاندارد هر ژن بدست آمده و علاوه بر Ct، راندمان واکنش نیز جهت محاسبه افزایش یا کاهش نسبی بیان ژن هدف در نرم افزار iCycler مطابق فرمول زیر استفاده می‌گردد (۲۵). نسبت‌های بدست آمده به‌منظور بررسی معنی‌داری اثر

تأثیر تیمار DON بر بیان ژن‌های کاندید مقاومت برای تولید گندم با مقاومت بالا به FHB و همچنین توکسین، به ژن‌های دفاعی چندگانه‌ای که به‌طور همزمان بیان افزایشی داشته باشند شوند احتیاج است. بررسی تأثیر سم بر بیان این ژن‌ها ضرورت دارد. بنا بر جستجوهای انجام شده تا کنون گزارشی مبنی بر تأثیر سم خالص قارچ بر بیان این ژن‌ها در گندم ارئه نگردیده است. لذا به عنوان یک بررسی پایه و اولیه تأثیر مقادیر تأثیر گذار سم بر گیاهچه ارقام مختلف گندم بررسی گردید. بررسی تأثیر ۱۰ میلی گرم بر لیتر از سم DON بر کمیت بیان ۳ خانواده ژنی مختلف (*Xst3B-138_1*, *NPR1*, *PDR5*) که به-عنوان اجزای مقاومت به فوزاریوم معرفی شده‌اند با استفاده از تکنیک Real time PCR بررسی شد.

نتایج نشان داد که بیان ژن *PDR5* تحت تأثیر سم به‌طور معنی-داری در ارقام فلات و فرونتانا افزایش یافت در صورتیکه این افزایش برای رقم متحمل ونگ شوبای معنی‌دار نبود. در سال ۲۰۰۰ محققین توتون را با ژن *PDR5* مخمر ترانسفورم کردند. انتقال این ژن موجب افزایش مقاومت معنی‌دار گیاه نسبت به trichothecene 4,15-diacetoxyscirpenol یکی از فیتوتوکسین-های قارچ فوزاریوم گرامیناروم گردید. این محققین نشان دادند که حساسیت جوانه زنی بذر توتون پس از بیان ژن نسبت به این سم در مقایسه با گیاه ترانسفورم نشده کاهش یافت (۱۹). از آنجا که حساسیت جوانه زنی بذر گندم آزمایش شده در این تحقیق نسبت به سم تفاوت معنی‌دار نشان نداد، به‌نظر می‌رسد بر خلاف توتون مکانیسم مقاومت پایه بذر گندم نسبت به سم با این ژن ارتباط ندارد. افزایش معنی‌دار بیان ژن در رقم حساس و نیمه مقاوم و معنی‌دار نبودن آن برای رقم مقاوم می‌تواند به‌دلیل وجود مکانیسم و یا مکانیسم‌های دیگری در این رقم مقاوم باشد که ظاهراً قوی‌تر از مکانیسم این ژن به‌عنوان یک multi- transporter drug عمل می‌کنند. غفاری و همکاران (۸) افزایش بیان ژن *PDR5* گندم را با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی در ساعات اولیه پس از آلودگی سنبله با قارچ فوزاریوم گرامیناروم در رقم مقاوم ونگشوبای مشاهده کردند. افزایش بیان مشاهده شده در بررسی‌های این محققین برای رقم

و خشک گردید. این کاهش در ریشه و شاخساره دیده شد. کاهش رشد بین ارقام مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت. از آنجا که مقاومت به تریکوتسین بخشی از مقاومت به بیماری است لذا مقاومت به تجمع توکسین قارچ هدف بسیاری از کوشش‌های اصلاحی بوده و می‌باشد. برخی از محققین با هدف ارائه روشی سریع و ارزان جهت غربالگری ارقام گندم و جو نسبت به این بیماری از عصاره کشت قارچ و یا سموم مختلف تولید شده توسط آن استفاده نموده‌اند. نتایج این محققین روشن ساخته است که استفاده از سم به جای عصاره کشت جهت انتخاب از طریق گزینش در شیشه (*in vitro*) کارآمدتر می‌باشد (۱). در این تحقیق نیز جهت بررسی تأثیر مستقیم یکی از اجزای ایجاد بیماری از سم خالص در ۳ غلظت مختلف استفاده گردید. تغییرات مورفولوژیک در گیاهچه‌ها از اولین روز خروج جوانه و در مراحل مختلف رویش قابل مشاهده بود (شکل ۱). نتایج نشان داد هر ۳ غلظت استفاده شده موجب کاهش وزن خشک معنی‌دار در گیاهچه هر سه رقم حساس، نیمه مقاوم و مقاوم گردید (شکل ۲).



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف DON بر جوانه گندم الف: پنج روز پس از جوانه زنی ب: ده روز پس از جوانه زنی

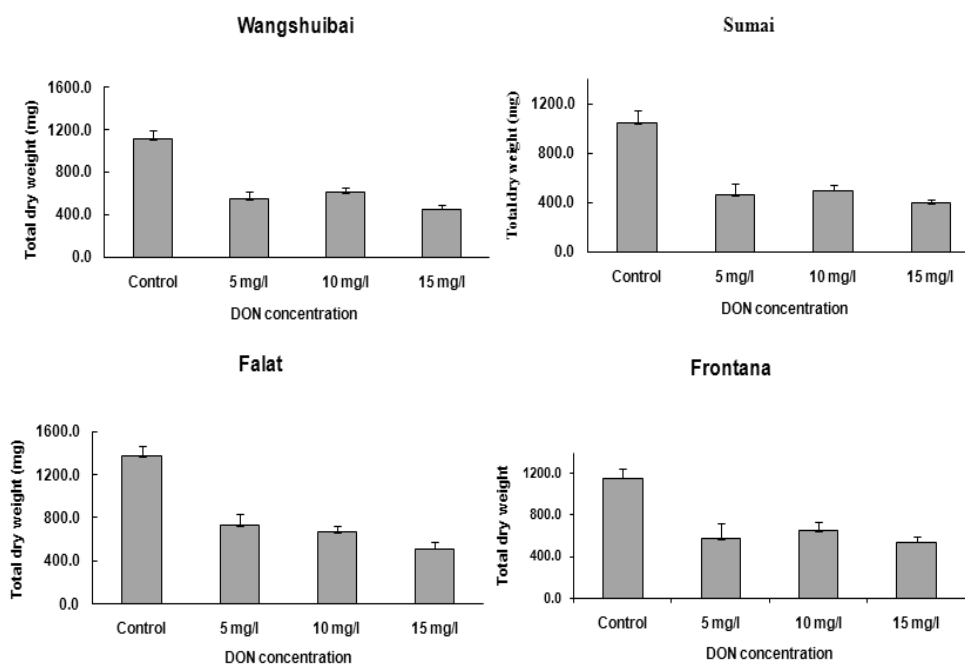
زیاد و به سرعت پس از آلودگی سنبله با قارچ در گیاه تراریخته افزایش یافت (۱۳). از آنجا که مطالعات پایه جهت تراریزش و تولید ارقام مقاوم اهمیت ویژه دارند لذا بررسی تشابه و تفاوت ژن *NPR1* آرابیدوپسیس و گندم، مطالعه تاثیر بر هم کنش مجموعه ژن‌های مقاومت به سم و بیماری در اندام‌های رویشی و زایشی و تفاوت نقش این ژن در ارقام مختلف می‌تواند جهت تراریزش و تولید ارقام مقاوم گندم مفید باشد.

در این مطالعه کاهش بیان EST مرتبط با جایگاه ژنی *Xsts3B-138_1* در فلات و فرونتانا معنی‌دار و برای ونگ شوبای معنی‌دار نبود. هر چند این کاهش برای رقم مقاوم به‌طور معنی‌داری کمتر از رقم نیمه مقاوم بود. ناجی و همکاران (۲۰) در مطالعه‌ای بر روی نقش این EST گزارش کردند که پس از آلودگی با قارچ بیان آن در دو رقم حساس و مقاوم افزایش یافت و افزایش برای رقم مقاوم بیش از حساس بود. مجموع مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که پس از تیمار با سم، بیان ژن مربوطه در رقم حساس و نیمه مقاوم حساسیت بیشتری نسبت به رقم مقاوم نشان می‌دهد. با جداسازی و مقایسه ژن (یا ژن‌های هم خانواده) مربوط به این EST در ارقام مختلف و همچنین مطالعه سیستم‌های تنظیمی و کنترلی آن می‌توان به‌علت این تفاوت‌ها پی برد.

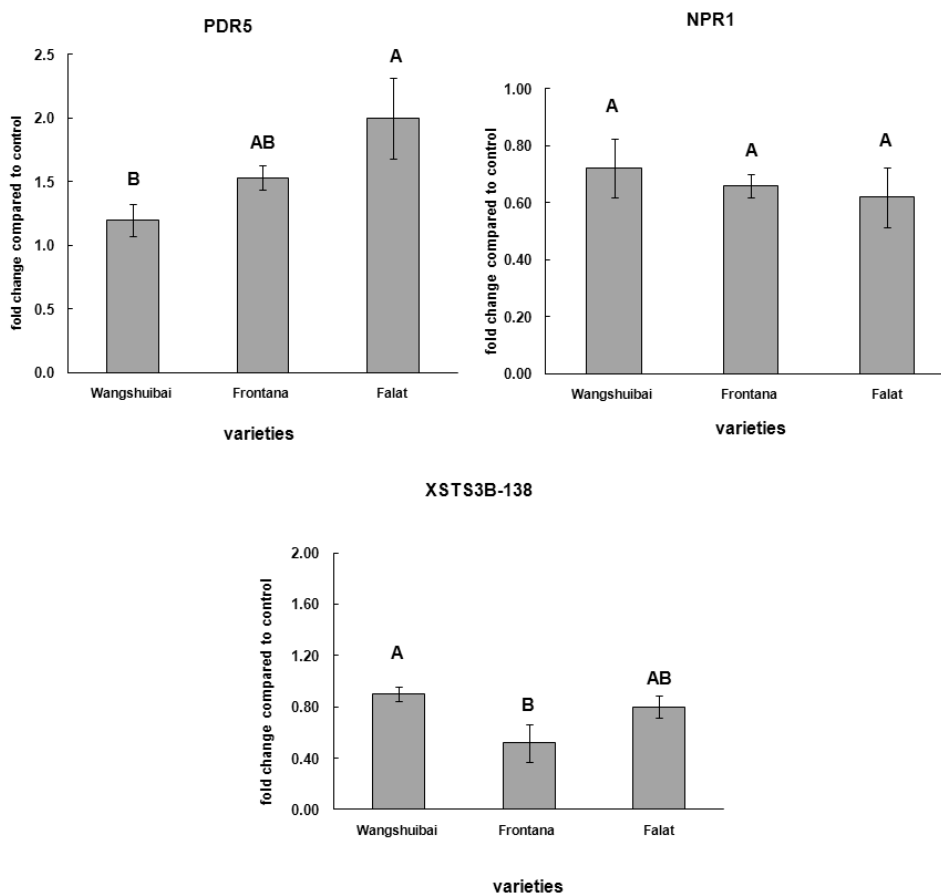
مقاوم بیش از رقم حساس بود. مقایسه این مشاهده با مشاهده صورت گرفته در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که مکان بیان ژن بر میزان بیان و در نتیجه عملکرد آن می‌تواند موثر باشد. هر چند برای اثبات این نظر، بیان این ژن پس از تیمار با سم در گیاهچه و پس از آلودگی با قارچ در سنبله ارقام حساس و مقاوم باید بررسی گردد.

مقایسه نتایج مربوط به مطالعات گذشته در رابطه با ارتباط مقاومت به بیماری با ژن *PDR5*، با نتایج حاصل از مطالعه حاضر که حاکی از افزایش بیان این ژن (شکل ۳) پس از تیمار با یکی از اجزای ایجاد بیماری دارد، نشان داد که احتمالاً مکانیسم مقاومت با استفاده از این ژن برای ارقام حساس و مقاوم متفاوت بوده و عملکرد ژن *PDR5* در ارقام متفاوت می‌باشد.

کاهش بیان ژن *NPR1* برای هر سه رقم ونگ شوبای، فلات و فرونتانا معنی‌دار بود. حسینی و همکاران (۹) نیز گزارش نمودند که بیان ژن *NPR1* پس از آلودگی با فوزاریوم در سنبله ارقام فوق معنی‌دار نبود. گروه دیگری از محققان با انتقال ژن *NPR1* آرابیدوپسیس تالیانا به یک رقم حساس گندم با نام Bobwhite موجب افزایش مقاومت آن به بلایت فوزاریومی سنبله ایجاد شده توسط قارچ فوزاریوم گرامیناروم گردیدند. بیان این ژن به مقدار



شکل ۲- تاثیر سم DON بر وزن خشک گیاهچه سه رقم حساس (Falat)، نیمه مقاوم (Frontana) و مقاوم (Wangshuibai)



شکل ۳- تاثیر سم DON بر بیان سه ژن *PDR5*، *NPR1*، *Xsts3B-138_1* در سه رقم حساس (Falat)، نیمه مقاوم (Frontana) و مقاوم (Wangshuibai)

منابع

- Ahmed, K. Z., A. Mesterházy, T. Bartók and F. Sági, 1996. *In vitro* Techniques for Selecting Wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium* Resistance. II. Culture Filtrate Technique and Inheritance of *Fusarium* Resistance in the Somaclones. *Euphytica*. 91: 341 – 349.
- Argyris, J., D. V. Sanford and D. TeKrony, 2003. Seed Physiology, Production and Technology. *Fusarium graminearum* Infection during Wheat Seed Development and Its Effect on Seed Quality. *Crop Science*. 43: 1782–1788.
- Bai, G. H., A. E. Desjardins and R. D. Plattner, 2002. Deoxynivalenol-Non-producing *Fusarium graminearum* Causes Initial Infection, But does not Cause Disease Spread in Wheat Spikes. *Mycopathologia*. 153: 91-8.
- Bruins, M. B. M., I. Karsai, J. Schepers and C. H. A. Snijders, 1993. Phytotoxicity of Deoxynivalenol to Wheat Tissue with regard to *in vitro* selection for *Fusarium* head blight Resistance. *Plant Science*. 96: 195-206.
- Chen, W. P., P. D. Chen, X. Gu, D. J. Liu and R. Kynast, 1999. Development of Wheat scab Symptoms is Delayed in Transgenic Wheat Plants that Constitutively Express a Rice Thaumatin-like Protein Gene. *Theoretical and Applied Genetic* 99: 755–60.
- Desjardins, A. E., R. H. Proctor, G. H. Bai, S. P. McCormick and G. E. Shaner, 1996. Reduced Virulence of Trichothecene Antibiotic-nonproducing Mutants of *Gibberella zeae* Inwheat Field Tests. *Molecular Plant Microb Interaction*. 9: 775–81.
- Ehya, F., M. R. Ghaffari, M. Mardi, S. Zaheri and B. Ghareyazie, 2005. Development of PCR based marker for candidate *Fusarium* head blight resistance gene (*PDR5*) in wheat. *Iranian Journal of Crop Science*. 6: 395 – 401.
- Ghaffari, M. R., M. Mardi, F. Ehya, L. Karimi Farsad, S. Hosseini and B. Ghareyazie, 2010. Mapping and expression analysis of a *Fusarium* head blight resistance gene candidate pleiotropic drug resistance 5 (*PDR5*) in wheat. *Iranian Journal of Biotechnology*. 8: 112-116.

9. Hosseini, S., M. Mardi, M. R. Ghaffari, Y. Nami, L. Karimi Farsad, S. M. Pirseyedi, S. Abdemishani and A. A. Shanejate Boushehri, 2008. Development of molecular markers based on ESTs linked to Fusarium head blight resistance in wheat. *Iranian Journal of Agricultural Science*. 40.
10. Hsia, C. C., Y. Gao, W. JL and B. Tzian, 1986. Induction of Chromosome Aberrations by Fusarium T-2 Toxin in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes and Chinese hamster Fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. Supplement. 4: 65-72.
11. Kim, B. R., H. Y. Nam, S. U. Kim and Y. J. Chang, 2003. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters*, 25: 1869-1872
12. Kolb, F. L., G. H. Bai, G. J. Muehlbauer, J. A. Anderson, K. P. Smith and G. Fedak, 2001. Symposium on Genetic Solutions to Fusarium Head Blight in Wheat and Barley. Host Plant Resistance Genes for Fusarium Head Blight Mapping and Manipulation with Molecular Markers. *Crop Science*. 41: 611-619.
13. Makandar, R., J. S. Essig, M. A. Schapaugh, H. N. Trick and J. Shah, 2006. Genetically Engineered Resistance to Fusarium Head Blight in Wheat by Expression of Arabidopsis *NPR1*. *Molecular Plant Microb Interaction*. 19: 123-129.
14. Mardi, M., B. Ghareyazie, H. Buerstmayr, M. Lemmens, N. Moshrefzadeh and P. Ruckebauer, 2004. Combining Ability Analysis of Resistance to head blight Caused by *Fusarium graminearum* in Spring Wheat. *Euphytica*. 139:45-50.
15. Mardi, M., M. R. Ghaffari, F. Ehya, S. Zaheri, H. Buerstmayr, G. Adam, B. Ghareyazie, 2005. Application of functional genomics in QTL mapping of Fusarium head blight resistance in wheat. *International Conference on Plant Genomics and Biotechnology: Challenges and Opportunities*, 26-28 October, Raipur, India.
16. Mesterhazy, A. 1995. Types and Components of Resistance to Fusarium Head Blight of Wheat. *Plant Breeding*. 114: 377-86.
17. Miedaner, T., B. Schneider and H. H. Geiger, 2003. Deoxynivalenol (DON) Content and Fusarium Head Blight Resistance in Segregating Populations of Winter Rye and Winter Wheat. *Crop Science*. 43:519-526.
18. Miller, J. D., J. C. Young and D. R. Sampson, 1985. Deoxynivalenol and Fusarium Head Blight Resistance in Spring Cereals. *Phytopathol. Z*. 113: 359-67.
19. Muhitch, M. J., S. P. McCormick, N. J. Alexander and T. M. Hohn, 2000. Transgenic expression of the *TR1101* or *PDR5* gene increases resistance of tobacco to the phytotoxic effects of the trichothecene 4,15-diacetoxyscirpenol. *Plant Science*. 157: 201-207.
20. Naji, A. M., M. Moghaddam, M. R. Ghaffari, H. P. Irandoost, L. Karimi Farsad, S. M. Pirseyedi, S. A. Mohammadi, B. Ghareyazie and M. Mardi, 2008. Validation of EST-derived STS markers localized on Qfhs.ndsu-3BS for Fusarium head blight resistance in wheat using a 'Wangshuibai' derived population. *Journal of Genetics and Genomics*. 35: 625-629.
21. Pritsch, C., C. P. Vance, W. R. Bushnell, D. A. Somers and T. M. Hohn, 2001. Systemic Expression of Defense Response Genes in Wheat Spikes as a Response to Fusarium *graminearum* Infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 58: 1-12.
22. Pritsch, C., G. J. Muehlbauer, W. R. Bushnell, D. A. Somers and C. P. Vance, 1999. Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Microb Interaction*. 13: 159-69.
23. Shaner, G. E. and R. E. Finney, 1977. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-mildewing Resistance in Knox Wheat. *Phytopathology* 67:1051-56.
24. Yang, Z., X. Yang and D. Huang, 1998. Studies on Somaclonal Variants for Resistance to Scab in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Through In Vitro Selection for Tolerance to Deoxynivalenol. *Euphytica*. 101: 213 - 219.
25. Yuan, J. S., A. Reed, F. Chen and C. N. S. Jr, 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 7:85-89.
26. Zhou, J. M., Y. Trifa, H. Silva, D. Pontier, E. Lam, J. Shah and D. F. Klessig, 2000. *NPR1* differentially interacts 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 Microb Interaction*. 13: 191-202.