

بررسی بیان ژن‌های *ZmCYP450* و *ZmCCoAOMT2* در بلال‌های ذرت

آلوده شده با قارچ *Fusarium verticillioides*

Gene Expression Analysis of *ZmCCoAOMT2* and *ZmCYP450* Genes in Maize (*Zea mays* L.) Ears Infected by *Fusarium verticillioides*

پریسا همتی^۱، وحید رهجو^{۲*}، محمدعلی تاجیک قنبری^۳، بهزاد احمدی^۲، ولی‌اله بابائی‌زاد^۳

۱- دانشجوی دکترای رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۲- استادیار پژوهشی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،

کرج، ایران

۳- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

Hemmati P¹, Rahjoo V^{*2}, Tajick Ghanbary MA³, Ahmadi B², Babaeizad V³

1- PhD Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

2- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3- Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: vrahjoo@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۲)

چکیده

قارچ *Fusarium verticillioides* یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در گیاه ذرت است که موجب پوسیدگی بلال و آلوده شدن دانه‌ها با مایکوتوکسین‌های فومونیزین (fumonisin) می‌شود. القای مقاومت بی بیماری‌ها یکی از راه‌کارهایی است که گیاهان برای مقابله با بیمارگرها به کار می‌برند. این تحقیق در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در شش بازه زمانی مختلف (۰، ۲۴، ۴۶، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بعد از آلوده‌سازی) و با دو لاین مقاوم (K18) و حساس (MO17) ذرت در گلخانه موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام شد. به‌منظور درک بهتر سیستم‌های دفاعی گیاه ذرت در سطح مولکولی، گیاهان ذرت یک هفته بعد از ظهور سیلک‌ها با سوسپانسیون اسپور قارچ *F. verticillioides* به غلظت 1×10^6 از طریق ایجاد زخم در وسط بلال تلقیح شدند. میزان بیان ژن‌های *ZmCYP450* و *ZmCCoAOMT2* در بلال‌های ذرت با روش Real-Time PCR بررسی شدند. نتایج نشان داد که سطح بیان هر دو ژن در گیاه مقاوم نسبت به بیماری افزایش یافت. در لاین مقاوم، ژن (*ZmCCoAOMT2*) ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی و ژن *CYP450 89A*، ۹۶ ساعت بعد به حداکثر سطح بیان خود رسیدند. در لاین حساس بعد از آلودگی با قارچ، در ژن *ZmCCoAOMT2* کاهش سطح بیان مشاهده شد، درحالی‌که بیان ژن *CYP450 89A2* در این لاین افزایش یافت. ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم از نظر افزایش بیان این ژن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که ژن‌های مطالعه شده، در برهمکنش گیاه با بیمارگر مرتبط هستند و ممکن است باعث کمک به القای مقاومت در گیاه شوند.

واژه‌های کلیدی

القای مقاومت
پوسیدگی فوزاریومی خوشه ذرت
تنش زیستی
ژن‌های دفاعی
Real-Time PCR

در مقابل، واکنش‌های دفاعی دیر هنگام و ضعیف میزبان منجر به حساسیت و بیماری (تعامل سازگار) می‌شود.

پاسخ دفاعی گیاه ذرت به آلودگی ناشی از قارچ *F. verticillioides*، شامل تغییر در بیان تعداد زیادی از ژن‌های گیاه از قبیل ژن‌های دخیل در برنامه‌ریزی مجدد متابولیسم سلولی، تجمع مواد مؤثر در تقویت دیواره‌های سلولی گیاه و تولید ترکیبات ضد میکروبی که مستقیماً از پیشروی پاتوژن ممانعت می‌کنند است (Santiago et al. 2020). یافته‌های بیان ژن، در تشخیص ژن‌های مؤثر در پاسخ به آلودگی ناشی از *F. verticillioides* نقش به‌سزایی داشته‌اند. اکثر این مطالعات، پاسخ لاین‌های حساس و مقاوم به آلودگی با قارچ در دو مرحله اولیه (۴۸-۱۲ ساعت بعد از تلقیح) و مرحله پایانی پیشرفت بیماری (۱۲۰-۷۲ ساعت بعد از آلوده‌سازی) بررسی نموده‌اند (Lanubile et al. 2012). متابولیت‌های ثانویه از قبیل فنولیک‌ها، فیتوآلکسین‌ها و پروتئین‌های ضد میکروبی به‌عنوان مکانیسم‌های مقاومت به بیماری شناخته می‌شوند (Reid et al. 1992; Schmelz et al. 2011). با این حال، شناسایی ژن‌های دخیل در بیوستز این متابولیت‌ها همچنان در حال بررسی است.

یکی از ژن‌های مؤثر در پاسخ دفاعی گیاه به قارچ *F. verticillioides* ژن *ZmCCoAOMT2* است که نقش آن در بیوستز لیگنین و مسیر فنیل‌پروپانویید تأیید شده است. این ژن، آنزیم CCoAOMT را تولید می‌کند که اولین واکنش انتقال متیل در متابولیسم فنیل‌پروپانویید را کاتالیز کرده (Ma and Luo 2015) و در سنتز مونولیگنول نقش دارد و بر کارایی سنتز لیگنین و ترکیب لیگنین تأثیر می‌گذارد. مسیر فنیل‌پروپانویید به‌عنوان یک منبع غنی از متابولیت‌ها در گیاهان عمل کرده، برای بیوستز لیگنین مورد نیاز است و نقطه شروع تولید بسیاری از ترکیبات مهم دیگر مانند فلاونوئیدها، کومارین‌ها و لیگنان‌ها است (fraser and Chappel 2011). در گیاهان آوندی، لیگنین یکی از مهم‌ترین محصولات مسیر متابولیک فنیل‌پروپانویید است. لیگنین استحکام مکانیکی بافت‌های آوندی را فراهم می‌کند و گیاهان را از

ذرت (*Zea mays* L.) یکی از محصولات اصلی کشت شده در ایران با تولید حدوداً هشت تن در هکتار است. پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت می‌تواند توسط گونه‌های متعددی از جنس *Fusarium* ایجاد شود ولی گونه *Fusarium verticillioides* (Sacc) Nirenberg (Leslie 1991; Chulze et al. 1998; Danielsen et al. 2000) و در ایران است (Rahjoo et al. 2008). این پاتوژن علاوه بر کاهش کمی و کیفی محصول ذرت، از طریق آلوده کردن دانه‌های بلال با گروهی از میکوتوکسین‌ها به نام فومونیزین به محصول نهایی خسارت وارد می‌کند. فومونیزین‌ها به‌عنوان یک میکوتوکسین سرطان‌زا شناخته می‌شوند (Lanubile et al. 2012). روش‌های کنترل شیمیایی و زراعی برای کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت تاکنون موفق نبوده‌اند زیرا *F. verticillioides* می‌تواند بدون ایجاد علائم قابل مشاهده بیماری، در گیاه سیستمیک شده و قابلیت انتقال از بذر به بلال را داراست (Munkvold and Desjardins 1997; Wilke et al. 2007). به این دلایل، مقاومت میزبانی قابل اعتمادترین و اقتصادی‌ترین روش برای کاهش خسارت ناشی از پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت است.

علی‌رغم پیشرفت‌های چشمگیری که در زمینه شناخت ژنوم قارچ و نقش ژن‌های بیمارگر در تولید بیماری و میکوتوکسین صورت گرفته است، هنوز اطلاع زیادی در زمینه برهمکنش گیاه و قارچ در طول پروسه مقاومت و یا آلودگی و شناسایی ژن‌های مؤثر وجود ندارد (Stagnati et al. 2019). در برهمکنش بین گیاهان مختلف با بیمارگرها، فعالیت عامل بیماری‌زا روی تسخیر میزبان و مصرف منابع آن متمرکز می‌شود در حالی که گیاه تلاش می‌کند تا بیمارگر را تشخیص داده و مکانیسم‌های دفاعی خود را برای مقابله با آن و متوقف کردن حمله میکروبی، فعال نماید. یکی از فاکتورهای مهم در گیاهان بعد از آلودگی، سرعت پاسخ‌دهی گیاه می‌باشد. بنابراین تشخیص به موقع یک عامل مهاجم و القاء سریع و مؤثر پاسخ‌های دفاعی (تعامل ناسازگار گیاه و بیماری‌زا)، وجه تمایز گیاه مقاوم از حساس خواهد بود (D'Ovidio et al. 2006).

¹ Caffeoyl-Coenzyme A 3-O-Methyl Transferase

² Coumarin

تنش‌های زیستی، از جمله حمله پاتوژن محافظت می‌کند (Lewis and Yamamoto 1990; Li et al. 2010).
سیتوکروم P450 مونواکسیژناز^۱ یکی از بزرگ‌ترین خانواده آنزیم‌ها با عملکرد گسترده و تولید متابولیت‌های پیچیده در اکثر ارگانسیم‌ها هستند (Urlacher and Marco 2012). در مقایسه با سایر ارگانسیم‌ها، بیشترین ژن‌های *CYP* در گیاهان یافت می‌شوند و این ژن‌ها حدود یک درصد ژن‌های کد کننده پروتئین در گیاهان را تشکیل می‌دهند (Nielsen and Moller 2005; Nelson and Werchreichhar 2011) که بیش از ۲۰۰ هزار متابولیت مختلف را تولید می‌کنند (Renault et al. 2014). این ژن‌ها بر اساس ماهیت توالی و فیلوژنی نام‌گذاری و دسته‌بندی می‌شوند. خانواده‌های *CYP51*، *CYP71-99* و *CYP701-CYP999* در گیاهان در دو نوع A-type و non A-type دسته‌بندی می‌شوند (Kahn and Francis 2000; Nelson 2009). بیش از ۵۰٪ ژن‌های *CYP450s* از نوع A-type آنزیم‌های اختصاصی گیاه را تولید می‌کنند که در سنتز تولیدات ثانویه گیاهی مؤثر هستند. در حالی که، ژن‌های نوع non A-type آنزیم‌هایی را تولید می‌کنند که در انتقال مولکول‌ها و سنتز ترکیبات شبه‌هورمونی، استروئول‌ها و اسیدهای چرب oxygenate نقش دارند (Schuler and Werchreichhart 2003). در مجموع، *CYP450s* در محافظت از گیاهان در برابر انواع تنش‌های ناشی از عوامل محیطی (خشکی، شوری، مسمومیت و تغییرات دمایی) و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و حشرات مؤثر هستند (Singpho and Sharma 2021).
آنالیز ژنوم *Z.mays* نشان داد که ۳۱۴ ژن سیتوکروم P450 در ذرت وجود دارد که در دو نوع A-type و non A-type، ۱۰ قبیله^۲ و ۴۴ خانواده دسته‌بندی می‌شوند (Kahn and Francis 2000; Nelson 2009). در گیاه ذرت افزایش بیان ژن‌های *CYP450* در نتیجه ایجاد زخم مشخص شده است ولی به صورت اختصاصی ژن‌های سیتوکروم مؤثر در پاسخ دفاعی گیاه به پاتوژن‌های قارچی بررسی نشده‌اند. در این تحقیق نقش ژن *CYP89A2* به عنوان یکی از ژن‌های سیتوکروم که در تحقیقات GWAS در رقم مقاوم در واکنش به آلودگی با قارچ *F.verticillioides* شناسایی شده بود

تشنای زیستی، از جمله حمله پاتوژن محافظت می‌کند (Lewis and Yamamoto 1990; Li et al. 2010).
سیتوکروم P450 مونواکسیژناز^۱ یکی از بزرگ‌ترین خانواده آنزیم‌ها با عملکرد گسترده و تولید متابولیت‌های پیچیده در اکثر ارگانسیم‌ها هستند (Urlacher and Marco 2012). در مقایسه با سایر ارگانسیم‌ها، بیشترین ژن‌های *CYP* در گیاهان یافت می‌شوند و این ژن‌ها حدود یک درصد ژن‌های کد کننده پروتئین در گیاهان را تشکیل می‌دهند (Nielsen and Moller 2005; Nelson and Werchreichhar 2011) که بیش از ۲۰۰ هزار متابولیت مختلف را تولید می‌کنند (Renault et al. 2014). این ژن‌ها بر اساس ماهیت توالی و فیلوژنی نام‌گذاری و دسته‌بندی می‌شوند. خانواده‌های *CYP51*، *CYP71-99* و *CYP701-CYP999* در گیاهان در دو نوع A-type و non A-type دسته‌بندی می‌شوند (Kahn and Francis 2000; Nelson 2009). بیش از ۵۰٪ ژن‌های *CYP450s* از نوع A-type آنزیم‌های اختصاصی گیاه را تولید می‌کنند که در سنتز تولیدات ثانویه گیاهی مؤثر هستند. در حالی که، ژن‌های نوع non A-type آنزیم‌هایی را تولید می‌کنند که در انتقال مولکول‌ها و سنتز ترکیبات شبه‌هورمونی، استروئول‌ها و اسیدهای چرب oxygenate نقش دارند (Schuler and Werchreichhart 2003). در مجموع، *CYP450s* در محافظت از گیاهان در برابر انواع تنش‌های ناشی از عوامل محیطی (خشکی، شوری، مسمومیت و تغییرات دمایی) و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و حشرات مؤثر هستند (Singpho and Sharma 2021).
آنالیز ژنوم *Z.mays* نشان داد که ۳۱۴ ژن سیتوکروم P450 در ذرت وجود دارد که در دو نوع A-type و non A-type، ۱۰ قبیله^۲ و ۴۴ خانواده دسته‌بندی می‌شوند (Kahn and Francis 2000; Nelson 2009). در گیاه ذرت افزایش بیان ژن‌های *CYP450* در نتیجه ایجاد زخم مشخص شده است ولی به صورت اختصاصی ژن‌های سیتوکروم مؤثر در پاسخ دفاعی گیاه به پاتوژن‌های قارچی بررسی نشده‌اند. در این تحقیق نقش ژن *CYP89A2* به عنوان یکی از ژن‌های سیتوکروم که در تحقیقات GWAS در رقم مقاوم در واکنش به آلودگی با قارچ *F.verticillioides* شناسایی شده بود

¹ Cytochrome P450 monooxygenase (*CYP450s*)

² Clan

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از دو اینبرد لاین ذرت حساس (MO17) و مقاوم (K18) گزینش شده از آزمایش‌های پیشرفته مقایسه عملکرد و مقاومت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت استفاده شد (Hadadi et al. 2009; Zamani and Hadadi 2005). بذرها و جدایه مهاجم قارچ *F.verticillioides* از بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شدند. بذرها قبل از کاشت با محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد ضدعفونی سطحی شده و داخل گلدان (۴۰ سانتی‌متر قطر، ۳۵ سانتی‌متر ارتفاع) کشت شدند. گلدان‌ها به گلخانه با شرایط محیطی کنترل شده شامل دمای روز و شب ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ درجه سانتی‌گراد و یک دوره نوری شامل استفاده از ۱۶ ساعت دوره روشنایی با لامپ در گلخانه منتقل شدند (Lanubile et al. 2015). این بررسی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار برای هر کدام از شش بازه زمانی انتخاب شده (۰ تا ۱۲۰ ساعت با فواصل زمانی ۲۴ ساعت)، انجام شد. زادمایه قارچ با استفاده از جدایه ۹۶ قارچ *F. verticillioides* که بیماری‌زا بودن آن در آزمون‌های جداگانه اثبات شده بود، تهیه شد. بلال‌های ذرت، ۱۵ روز بعد از گرده‌افشانی دستی با روش تزریق سوسپانسیون اسپور با غلظت ۱۰^۶ اسپور در میلی‌لیتر به داخل زخم ایجاد شده در مرکز بلال با استفاده از روش (Nail Punch) آلوده شدند (Lanubile et al. 2015). بلال تلقیح نشده (T0) به عنوان شاهد انتخاب شد. از بلال‌های آلوده در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بعد از مایه‌زنی، سه بلال (برای هر زمان) انتخاب و نمونه دانه آن‌ها جمع‌آوری شد. برای جلوگیری از خطای ناشی از آسیب مکانیکی، نمونه‌گیری از بذرها مجاور ناحیه مایه‌زنی شده انجام شد. نمونه دانه‌ها با استفاده از اسکالپل استریل جدا شده و به لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شدند. نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد و به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

بیولوژیک در نظر گرفته شد. دمای اتصال پرایمر برای تمامی ژن‌ها ۶۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. ارزیابی و محاسبه میزان بیان ژن با روش C_t مقایسه‌ای ($Comparative C_t = 2^{-\Delta\Delta CT}$) انجام شد (Schemittgen and Livak 2008). تجزیه واریانس و تحلیل داده‌های به‌دست آمده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS8.2 انجام شد. نمودارهای مربوط به بیان نسبی ژن‌ها در سطح رونویسی، با استفاده از نرم‌افزار Exel Office Microsoft 2010 رسم شد.

نتایج و بحث

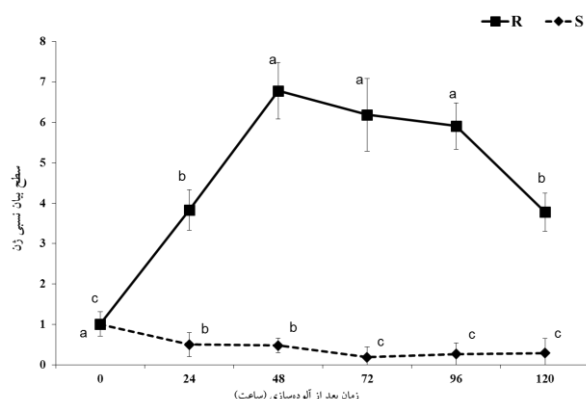
نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بیان ژن *ZmCCoAOMT2* در نتیجه آلودگی با سوسپانسیون قارچ در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس به‌طور معنی‌داری (سطح احتمال $P \leq 0.01$) افزایش داشت. میزان بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ در ساعات مختلف آلودگی روند متفاوتی داشت. با اینکه هر دو لاین قبل از آلوده‌سازی با مایه تلقیح قارچ، تقریباً سطح بیان یکسانی داشتند ولی ۲۴ ساعت بعد از تلقیح، بیان ژن در ژنوتیپ مقاوم سیر صعودی و در ژنوتیپ حساس، سیر نزولی را طی نمود. در ژنوتیپ مقاوم K18، بعد از تلقیح با قارچ بیان ژن در حدود چهار برابر زمان صفر افزایش پیدا کرده است در حالی که بیان این ژن در لاین حساس، به نصف مقدار اولیه خود در زمان صفر رسیده است. در ژنوتیپ مقاوم، ۴۸ ساعت بعد از تلقیح سوسپانسیون قارچ، بالاترین میزان بیان ژن مشاهده شد که در مقایسه با زمان کنترل تا هفت برابر بیشتر بود. بعد از ۴۸ ساعت روند بیان ژن نزولی شد (شکل ۱).

دانه‌های ذرت لاین‌های MO17 و K18 در نیتروژن مایع کوبیده و خرد شدند و RNA کل از ۰/۱ گرم از پودر حاصله با استفاده از بافر ترایزول و طبق روش TRIzol (Invitrogen, CA, USA) استخراج شد. به‌منظور حذف DNA ژنومی، مقدار ۳۰ میکروگرم (برای هر واکنش) از RNA استخراج شده، با استفاده از آنزیم DNaseI (Fermentase, USA) تیمار شد. کیفیت و غلظت RNA استخراج شده از طریق بارگذاری روی ژل آگارز و خوانش با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. RNAهای با غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میکرولیتر برای ساخت cDNA تک رشته‌ای (Revert Aid) مطابق دستورالعمل کیت شرکت Easy cDNA synthesis (Parstous Kit, China) استفاده شدند. ژن‌هایی که میزان بیان آن‌ها در ژنوتیپ‌های مورد نظر بعد از آلودگی با *F.verticillioides* مورد مقایسه قرار گرفت، شامل ژن‌های *Caffeoyl-CoA O-Methyl Transferase (ZmCCoAOMT2)* و *CYP45089A* از خانواده سیتوکروم‌های P450 بودند. ژن خانه‌دار β -actin با آغازگرهای اختصاصی در این تحقیق به‌عنوان ژن کنترل داخلی یا ژن مرجع و برای نرمال‌سازی سطح بیان تمامی ژن‌ها استفاده شد. آغازگر الیگونوکلئوتیدی ژن‌های مورد بررسی بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI انتخاب شدند (جدول ۱). روش سنجش کمی Real-Time PCR با استفاده از دستگاه CFX-96 (Bio-Rad) صورت گرفت. واکنش PCR با حجم نهایی ۱۴ میکرولیتر و طبق روش لائوبیل و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد. برنامه واکنش شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای سه دقیقه، ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ ثانیه برای بررسی بیان ژن در تمامی زمان‌های ذکر شده بود. دو تکرار برای تمامی تکرارهای

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ارزیابی میزان بیان ژن‌ها در واکنش به آلودگی با قارچ *F.verticillioides*

نام ژن	توالی آغازگر	دمای اتصال	طول قطعه	Accession number
<i>ZmCCoAOMT2</i>	5'-GATCACCGCCAAGCACCATG-3' 3'-CGAGGAGCGAGTAGCCGGTGTAG-5'	62.00°C 66.30°C	818bp	XM-023300961
<i>ZmCYP450 89A2</i>	5'-CGAGTACCTCAACGCTGTCA-3' 3'-GTCCACGTGGTCTGGTCCAC-5'	59.76°C 60.30°C	174bp	XM-008680063
β -actin	5'-ATGGTCAAGGCCGTTTCG-3' 3'-TCAGGATGCCTCTCTTGCC-5'	60.64°C 61.63°C	151bp	NM-001155179

در بافت‌های مختلف گونه‌های گیاهی متفاوت القاء می‌کند که منجر به افزایش تجمع آنزیم‌های مربوطه، افزایش فعالیت‌های آنزیمی و لیگینی شدن دیواره‌های سلولی می‌شود (Kliebenstein et al. 2002; Bhuiyan et al. 2007; Zhao et al. 2009).



شکل ۱- نمودار مقایسه آنالیز بیان ژن *ZmCCoAOMT2* در دو لاین حساس (MO17) و مقاوم (K18) ذرت پس از آلودگی با قارچ *F. verticillioides* (حروف روی نمودارها نشان‌دهنده گروه‌بندی آماری داده‌هاست). S: لاین حساس و R: لاین مقاوم

بر اساس نتایج تجزیه آنالیز بیان ژن *ZmCCoAOMT2* در لاین مقاوم، اوج بیان این ژن در مراحل اولیه پیشرفت بیماری (۴۸ ساعت بعد از آلوده‌سازی) مشاهده می‌شود. کاهش بیان ژن‌های مطرح شده می‌تواند به علت تغییر در عوامل تنظیم کننده بیان از قبیل: عوامل رونویسی، RNAهای تنظیم‌کننده‌ای مثل microRNAs و Long Non coding RNAs باشد. افزایش بیان این ژن در واکنش به حضور پاتوژن، موجب فعال شدن مسیر فنیل‌پروپانوئید می‌شود (Yadav et al. 2020). یکی از ژن‌های کلیدی در پاسخ دفاعی ذرت در برابر قارچ *F. verticillioides* ژن‌های مسیر فنیل‌پروپانوئید هستند که سنتز فنیل‌آلانین آمونیا لیاز^۴ را کد می‌کنند که موجب انباشت فلاونوئیدها، ترکیبات فنولیک و فیتوآلکسین‌ها می‌شوند (Lanubile et al. 2017). در مطالعات پیشین هم اثبات شده است که ژنوتیپ‌های ذرت با مقاومت بالا به بیماری پوسیدگی بلال ذرت، سطوح بالایی از فنیل‌پروپانوئید (حدود ۲۳/۷ میلی‌گرم بر گرم پریکارپ خشک) را دارا هستند

در ژنوتیپ حساس MO17 بعد از تلقیح سوسپانسیون به گیاه، برخلاف لاین مقاوم روند بیان ژن نزولی بود به طوری که بعد از ۷۲ ساعت به کمترین مقدار خود رسید. به عبارت دیگر در ژنوتیپ حساس برخلاف مقاوم، تغییرات محسوسی در بیان ژن مشاهده نشد (شکل ۱). از نظر فنوتیپی هم هر دو لاین حساس و مقاوم، شدت آلودگی متفاوتی را نشان دادند. به طوری که آلودگی در لاین مقاوم K18 تنها محدود به ناحیه مایه‌زنی شده بود و کمتر به دانه‌های مجاور گسترش پیدا کرده بود. در حالی که در لاین حساس MO17 آلودگی تا دانه‌های مجاور ناحیه آلوده شده پیشروی داشت و ناحیه وسیع‌تری از نظر تعداد دانه، توسط میسلیم‌های قارچ پوشیده شده بود.

ZMCCoAOMT2 یا Caffeoyl-Coenzyme A 3-O-Methyl Transferase (*CCoAOMT*) یکی از آنزیم‌های او-متیل ترانسفراز^۱ وابسته به اس-آدنوزیل متیونین^۲ است که در جابه‌جایی گروه متیل مشارکت دارد. نقش این آنزیم، متیلاسیون گروه متا-هیدروکسیل Caffeoyl-enzyme A (Co A) در مونولیگنول‌ها است که با مسیر فنیل پروپانوئید و تولید لیگنین مرتبط است. لیگنین یکی از اجزای اصلی دیواره سلولی است و به طور مستقیم با رشد گیاه و مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان مرتبط است. بیوستز و رسوب لیگنین^۳ در دیواره‌های سلولی ثانویه در واکنش به حمله پاتوژن‌ها در گیاهان مختلف مشاهده شده است و مشخص شده که لیگنین یک مانع فیزیکی در برابر کلونیزاسیون اولیه پاتوژن ایجاد می‌کند (Buendgen et al. 1990; Bonello et al. 2003).

رسوب لیگنین در سلول‌های آلوده از انتشار سموم و آنزیم‌های پاتوژن به داخل میزبان و در عین حال از انتقال آب و مواد مغذی از سلول‌های میزبان به پاتوژن جلوگیری کند (Smith et al. 2007). با توجه به افزایش بیان این ژن در مراحل اولیه شیوع بیماری به نظر می‌رسد که گیاه سعی می‌کند تا با بیوستز و رسوب لیگنین در دیواره‌های سلولی ثانویه، یک سد فیزیکی در برابر گسترش بیشتر *F. verticillioides* به سایر سلول‌ها فراهم کند. تنش‌های زیستی و غیرزیستی، بیان ژن‌های مسیر فنیل‌پروپانوئید را

¹ O-methyltransferase

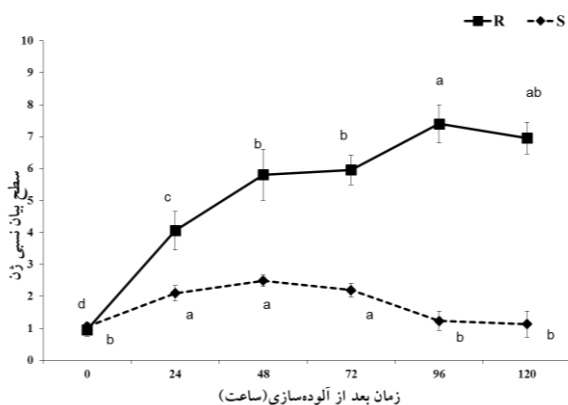
² S-adenosyl methionine (SAM)

³ Lignification

⁴ Phenylalanine ammonia lyase

ژن با افزایش ۱/۷۵ برابری در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی در مقایسه با ۲۴ ساعت قبل، به مقدار ۵ برابر زمان کنترل رسیده و این روند افزایشی با نرخ ثابت تا ۷۲ ساعت حفظ شده است (شکل ۲).

بعد از این مدت زمان یعنی ۹۶ ساعت بعد از مایه‌زنی، بیان ژن سیتوکروم در دو لاین اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. در لاین حساس در زمان ذکر شده، بیان ژن روند نزولی را طی کرده و از نظر آماری به سطحی برابر با زمان صفر رسید. در مقابل، ۹۶ ساعت بعد از تلقیح، بیان ژن در لاین مقاوم به بالاترین میزان خود رسید و تا ۱۲۰ ساعت بعد هم تفاوت معنی‌داری نشان نداد.



شکل ۲- نمودار مقایسه آنالیز بیان ژن *CYP450 89A* در دو لاین حساس (MO17) و مقاوم (K18) ذرت پس از آلودگی با قارچ *F. verticillioides* (حروف روی نمودارها نشان‌دهنده گروه‌بندی آماری داده‌هاست). S: لاین حساس و R: لاین مقاوم

خانواده *CYP89* در ذرت جزو خانواده‌های A-type سیتوکروم P450 است که در قبیله *CYP71* دسته‌بندی می‌شوند و ۱۷ ژن کدکننده پروتئین دارند (Singpho and Sharma 2021). ژن‌های *CYP89* در ذرت در مقایسه با سویا، آرابیدوپسیس و برنج بسیار بیشتر هستند. نقش این ژن‌ها در ذرت در پاسخ به تنش خشکی اثبات شده است (Li and Wei 2020). همچنین مشخص شده است که ژن *CYP89B19* و *CYP89E15P* جزو آنزیم‌های زنوم^۱ هستند که موجب سم‌زدایی سریع‌تر علف‌کش‌ها در سلول‌های ذرت در مقایسه با علف هرز شده و به مقاومت گیاه در برابر

(Sampietro et al. 2013). سطح بالای این گروه از متابولیت‌های ثانویه در پریکارپ بلال موجب کاهش شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت در نتیجه کاهش تجمع فومونیزین در دانه‌ها می‌شود (Assabugi et al. 1993; Sampietro et al. 2013). بنابراین با توجه به نقش این آنزیم در لیگنینی شدن دیواره‌های سلولی و فعال شدن مسیر سنتز متابولیت‌های دفاعی، افزایش بیان این ژن در مراحل اولیه آلودگی قارچی از طریق غیرفعال کردن آنزیم‌های پاتوژن و تقویت دیواره‌های سلولی گیاه، موجب ممانعت از پیشروی بیمارگر می‌شوند.

با توجه به نزولی بودن بیان ژن در لاین حساس MO17 و افزایش میزان رونوشت‌های ژن در لاین مقاوم K18 این ژن به عنوان یک نشانگر برای ارزیابی میزان مقاومت در ژنوتیپ‌های ذرت قابل استفاده می‌باشد. همچنین با توجه به افزایش بیان این ژن در ژنوتیپ مقاوم، می‌توان استنباط نمود که *ZmCCoAOMT2* علاوه بر ایجاد مقاومت کیفی به دو بیماری سوختگی جنوبی و لکه خاکستری برگ ذرت که (Yang et al. 2017) در مقاومت به بیماری پوسیدگی بلال ناشی از قارچ فوزاریوم هم مؤثر است. ژن دیگری که در این مطالعه بررسی شد، ژن *CYP450 89A* از بالا خانواده سیتوکروم‌های P450 و یکی از اعضای خانواده *CYP89* در ذرت می‌باشد. تجزیه و تحلیل آماری بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ حساس و مقاوم بعد از مایه زنی با قارچ *F. verticillioides* روند افزایشی را نشان داد ولی میزان افزایش بیان در ژنوتیپ مقاوم به‌طور معنی‌داری (سطح احتمال $P \leq 0.01$) بیشتر از ژنوتیپ حساس بود. علی‌رغم اختلاف بیان ناچیز ژن در هر دو لاین پیش از آلودگی (زمان صفر)، ۲۴ ساعت بعد از تلقیح بلال‌ها با سوسپانسیون اسپور قارچ تفاوت معنی‌داری از نظر افزایش بیان ژن در دو لاین مشاهده شد. میزان بیان این ژن در لاین حساس MO17، ۲۴ ساعت بعد از تلقیح، دو برابر این میزان در زمان قبل از آلودگی بوده است. در مقابل لاین K18 با افزایش بیان ۴ برابری در همین زمان نسبت به زمان کنترل، روند افزایشی بالاتری را در مقایسه با MO17 طی کرده است. در لاین MO17، سطح بیان ژن تا ۷۲ ساعت بعد از آلودگی تقریباً ثابت بوده و میزان بیان در بازه زمانی ذکر شده (۲۴-۷۲ ساعت) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشت. در مقابل در لاین مقاوم K18، بیان

^۱ Xenome

توکسین تولید شده و همچنین القای مقاومت از طریق مسیرهای سیگنال‌دهی مربوطه است. با توجه به افزایش پائین‌تر بیان این ژن در لاین حساس در مقایسه با لاین مقاوم، واکنش‌های دفاعی ضعیف‌تری فعال شده و به‌همین دلیل میزان حساسیت گیاه افزایش می‌یابد. برخلاف لاین حساس، بیان ژن در لاین مقاوم K18 روندی افزایشی را سیر نموده و در ساعات انتهایی آلودگی (۹۶ ساعت) به اوج بیان خود رسیده است. با توجه به نقش ژن در سم‌زدایی سلول‌ها شاید بتوان علت این افزایش در ساعات پایانی را افزایش میزان فومونیزین و سایر ترشحات قارچی در سلول و در مقابل افزایش رونوشت‌های آنزیم در پاسخ به این شرایط دانست.

در این مطالعه مستقیماً تغییرات بیان ژنی صورت گرفته در تعدادی از ژن‌های منتخب از GWAS در دانه‌های ذرت در طول فرایند آلوده شدن بافت بذر در زمان‌های ابتدایی و انتهایی آلودگی با قارچ *F. verticillioides* بررسی شد. با مقایسه پروفایل بیان ژن در طول توسعه بیماری در گلخانه، تا حدودی به نقش هر یک از ژن‌های منتخب در این بررسی پی برده شد. این مطالعه شباهت‌ها و تفاوت‌های موجود بین دو ژنوتیپ حساس و مقاوم از نظر میزان بیان ژن‌های انتخاب شده در طول پروسه بیماری را مشخص نمود. با بررسی بیان ژن‌ها، مشخص شد که ژن *ZmCCoAMT2* که قبلاً نقش آن در مقاومت به بیماری برگری مشخص شده بود، در بروز مقاومت به بیماری بذری هم مؤثر می‌باشد. همچنین افزایش بیان بیشتر ژن *CYP89A2* در لاین مقاوم هم نشان دهنده نقش مؤثر آن در افزایش مقاومت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت است. نقش سیتوکروم‌های متعددی در ذرت بررسی شده بود ولی این اولین گزارش از بررسی بیان این ژن سیتوکروم در گیاه ذرت در واکنش به آلودگی قارچی است.

سپاسگزاری

این تحقیق بر اساس یک پروژه تحقیقاتی با کد مصوب ۰۰۰۹۴۹-۰۸۸-۰۴-۰۳-۰۳ در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام شد که بدین وسیله نگارندگان از مدیریت بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای و مسئولین مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و همچنین از زحمات آقای دکتر

Brazier-Hicks et al. 2022; Xiao-) علف‌کش‌ها کمک می‌کنند (min et al. 2018).

آنزیم‌های سیتوکروم P450، در بیوستز متابولیت‌های دفاعی و سم‌زدایی سموم قارچی (مایکوتوکسین‌ها) از طریق مسیر گلوکاتایون اس-ترنسفراز^۱ و یا ABC transporters نقش دارند (Werck-Richard et al. 2002). به‌عنوان مثال، تیمار سنبله‌های جو با قارچ *Fusarium graminearum* منجر به افزایش قابل توجه رونوشت ژن‌هایی شد که گلوکاتایون اس-ترنسفرازها را کد می‌کنند (Gardiner et al. 2010). همچنین، سیتوکروم‌های P450 متابولیسم اسیدهای چرب غیراشباع و اکسی‌لیپین‌ها^۲ را سنتز می‌کنند. دو اکسی‌لیپین اصلی در گیاهان جاسمونیک اسید^۳ و متیل جاسمونات^۴ هستند. بیان ژن‌های مسئول برای بیوستز این اکسی‌لیپین‌ها و سطح این مولکول‌ها در گیاه، نقش مهم و اساسی را در مسیرهای سیگنال‌دهی وابسته به استرس‌های متعدد به‌خصوص در زمان صدمات فیزیکی و دفاع گیاهی ایفا می‌کند (Blee 2002; Bari and Jones 2009). جدای از بیوستز اکسی‌لیپین‌ها، CYPs در مسیرهای سیگنال‌دهی متیل جاسمونات و جاسمونیک اسید هم نقش دارند. به‌عنوان مثال، در سویا بیان ژن *CYP82A3* با متیل‌جاسمونات و در پاسخ به آلودگی‌های قارچی متنوع القا می‌شود. ژن *CaCYP1* در گیاه *Capsicum annuum* در واکنش دفاعی HR^۵ در پاسخ به آلودگی ناشی از *Xanthomonas axonopodis* نقش دارد (Godiard et al. 1998). در مقاومت به بلایت خوشه گندم ناشی از قارچ *F. graminearum* نقش *CYP82C2* شناخته شده است (Kong et al. 2005).

ژن *CytochromeP450 89A2 (LOC103653100)* در گیاه ذرت، بر روی کروموزوم شماره ۴ قرار دارد. نتایج این بررسی، افزایش بیان این ژن در هر دو لاین را نشان می‌دهد. با توجه به نقش سیتوکروم‌های نوع A-type در سم‌زدایی سلول‌های گیاهی، این فرایند قابل توضیح می‌باشد. یعنی تولید توکسین توسط قارچ موجب افزایش بیان این ژن و تلاش گیاه برای خنثی کردن

¹ Glutathione S-Transferase (GST)

² Oxylipins

³ Jasmonic Acid

⁴ Methyl Jasmonate

⁵ Hypersensitive Reaction

مجید غلامحسینی و آقای دکتر محمدرضا نظری برای کمک در تجزیه داده‌ها سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

- Alessandra L, Luca P, Adriano M (2010) Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection. *Journal of plant physiology* 16:1398-1406.
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño M A (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of experimental botany* 60:377-390.
- Bari R, Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant molecular biology* 69:473-488.
- Blée E (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in plant science* 7:315-322.
- Blokhina O, Fagerstedt KV (2010) Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:359-373.
- Campos-Bermudez VA, Fauguel CM, Tronconi MA, Casati P, Presello DA, Andreo CS (2013) Transcriptional and metabolic changes associated to the infection by *Fusarium verticillioides* in maize inbred with contrasting ear rot resistance. *PLOS One* 8:1-10.
- Chulze SN, Ramirez ML, Torres A, Leslie JF (2000) Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5312-5315.
- Danielsen S, Meyer UM, Funck Jensen D (1998) Genetic characteristics of *Fusarium verticillioides* isolates from maize in Costa Rica. *Plant Pathology* 47:615-622.
- Kahn RIA, Francis D (2000) Function and evolution of plant cytochrome P450. *Recent Advances in Phytochemistry* 34:151-190.
- Kebede AZ, Johnston A, Schneiderman D, Bosnich W, Harris LJ (2018) Transcriptome profiling of two maize inbreds with distinct responses to *Gibberella* ear rot disease to identify candidate resistance genes. *BMC genomics* 19:1-12.
- Kebede AZ, Woldemariam T, Reid LM, Harris LJ (2016) Quantitative trait loci mapping for *Gibberella* ear rot resistance and associated agronomic traits using genotyping-by-sequencing in maize. *Theor Applied Genetic* 129:17-29.
- Kong L, Anderson JM, Ohm, HW (2005) Induction of wheat defense and stress-related genes in response to *Fusarium graminearum*. *Genome* 48:29-40.
- Lanubile A, Bernardi J, Marocco A, Logrieco, A, and Paciolla, C (2012) Differential activation of defense genes and enzymes in maize genotypes with contrasting levels of resistance to *Fusarium verticillioides*. *Environmental and experimental botany* 78:39-46.
- Lanubile A, Ferrarini A, Maschietto V, Delledonne M, Marocco A and Bellin D (2014) Functional genomic analysis of constitutive and inducible defense responses to *Fusarium verticillioides* infection in maize genotypes with contrasting ear rot resistance. *BMC genomics* 15:1-16.
- Lanubile A, Maschietto V, De Leonardis S, Battilani P, Paciolla C and Marocco A (2015) Defense responses to mycotoxin-producing fungi *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, and *Aspergillus flavus* in kernels of susceptible and resistant maize genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:546-557.
- Lanubile A, Pasini L, Lo Pinto M, Battilani P, Prandini A, Marocco A (2011) Evaluation of broad spectrum sources of resistance to *Fusarium verticillioides* and advanced maize breeding lines. *World Mycotoxin Journal* 4:43-51.
- Leslie JF (1991) Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology* 81:1058-1060.
- Mc Callum BD and Hiebert CW (2022) Interactions between Lr67 or Lr34 and other leaf rust resistance genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Frontiers in Plant Science* 13:1-9
- Munkvold GP, Desjardins AE (1997) Fumonisin in Maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Disease* 81:556-565.
- Nelson D R (2009) The cytochrome P450 homepage. *Human Genomics* 4:1-7.
- Nelson D, Werckreichhar D (2011) A P450-centric view of plant evolution. *The Plant Journal* 66:194-211.
- Nielsen K A, Møller B L (2005). *Cytochrome P450s in Plants*. Springer, USA 553-583.
- Pandian BA, Sathishraj R, Djanaguiraman M, Prasad PV and Jugulam M (2020) Role of cytochrome P450 enzymes in plant stress response. *Antioxidants* 9:1-15.
- Renault H, Bassard JE, Hamberger B, Werckreichhart D (2014) Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: Current progress and future challenges. *Current Opinion in Plant Biology* 19:27-34.
- Schmittgen TD and Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols* 3:1101-1108.
- Schuler MA, Werckreichhart D (2003) Functional genomics of P450s. *Annual Review of Plant Biology* 54:629-667.
- Singpho NL and Sharma JG (2021) Importance of Cytochrome P450 gene family from metabolite biosynthesis to stress tolerance: A review IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 775
- Stagnati L, Lanubile A, Samayoa LF, Bragalanti M, Giorni P, Busconi M, Holland JB and Marocco A (2019) A genome wide association study reveals markers and genes associated with resistance to *Fusarium verticillioides* infection of seedlings in a maize diversity panel. *G3: Genes, Genomes Genetics* 9:571-579.

- Torres MA (2010) ROS in biotic interactions. *Physiologia plantarum* 138:414-429.
- Urlacher VB, Marco G (2012) Cytochrome P450 monooxygenases: An update on perspectives for synthetic application. *Trends in Biotechnology* 30:26-36.
- V Rahjoo J Zad M Javan-Nikkhah A Mirzadi Gohari SM Okhovvat MR Bihanta J Razzaghian⁴ and SS Klemsdal (2008) MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF FUSARIUM ISOLATED FROM MAIZE EARS IN IRAN. *Journal of Plant Pathology* 90:463-468
- Van Loon LC, Rep M and Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44:135-162.
- Warburton ML and Williams WP (2014) Aflatoxin resistance in maize: what have we learned lately? *Advances in Botany* 2014:1-10.
- Werck-Reichhart D, Bak S and Paquette S (2002) Cytochromes P450. *The Arabidopsis book* 1:1-28
- Yang Q, He Y, Kabahuma M, Chaya T, Kelly A, Borrego E, Bian Y, El Kasmi F, Yang L, Teixeira P and Kolkman J (2017) A gene encoding maize caffeoyl-CoA O-methyltransferase confers quantitative resistance to multiple pathogens. *Nature Genetics* 49:1364-1372.
- Zamani M and Choukan R (2013) The role of parents in response of maize cultivars to Fusarium ear rot. *Seed and Plant* 29:13-24. (in Farsi)