دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

غربالگری چند ژنوتیپ جو در برابر قارچ عامل سفیدک سطحی و بررسی نقش تعدادی از ژن‌های مرتبط با بیماریزایی و *NH1* در مقاومت به بیماری

مرضیه محرابیون محمدی[۱]، ولی اله بابایی‌زاد[۲]، حشمت اله رحیمیان[۳] و شاهپور ابراهیم نژاد[۴]

۱ و ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: babaeizad@yahoo.com)
۴- استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران
تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۱

چکیده

جو یکی از مهم‌ترین غلات در تغذیه دام بوده که به عنوان منبع جایگزین گندم و برنج در تغذیه رژیمی نیز نقش مهمی دارد. جو همواره در معرض خسارت عوامل متعدد آفات و بیماری‌ها می‌باشد که سبب کاهش میزان محصول و یا پائین آوردن ارزش غذایی آن می‌شوند. از جمله عوامل خسارت‌زا جو قارچ بیوتروف (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) عامل بیماری سفیدک سطحی است که در برخی مناطق زیر کشت این محصول خسارات جدی وارد می‌کند. همانند سایر گیاهان، جو نیز با استفاده از سیستم‌های دفاعی بر پایه پروتئین‌ها و سایر مواد ضد میکروبی در مقابل بیمارگرها مقاومت می‌کند و در این میان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis- Related Proteins) نقش بسزایی دارند. این تحقیق به منظور بررسی مورفولوژیکی و مولکولی چندین ژنوتیپ جو کشور در تعامل با قارچ *Bgh* انجام شد. تجزیه وتحلیل آماری نتایج غربالگری نشان داد لاین Mb-86-5 بیشترین حساسیت و بجز ژنوتیپ Beecher، بقیه ژنوتیپ‌ها BIR، Ceres، Avt/Attiki، L1242، یوسف، نصرت، ماهور، Comp171E، Rihane-03در مقایسه با لاین حساسMb-86-5 مقاومت معناداری داشتند. جهت تعیین پروفایل ژن‌های دخیل در مقاومت از گیاهچه‌های یک هفته‌ایی در ساعات مختلف پس از تلقیح (۰-۱۲-۲۴-۴۸ ساعت) نمونه‌برداری و Total RNA از آنها استخراج شد. نتایج بررسی مولکولی نشان داد که بیان ژن‌های *PR1*، *PR5*، *NH1* و *POX* به مقدار معنی‌داری در ژنوتیپ مقاوم در مقایسه با ژنوتیپ حساس افزایش یافت. این نتایج نشان می دهد ژن‌های مطالعه شده در مقاومت به بیماری *Bgh* در ژنوتیپ Ceres جو ایفای نقش می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: جو، سفیدک سطحی، پروتئین‌های مرتبط به بیماریزایی، تعامل، Real time PCR

مقدمه

جو یکی از نخستین غله‌های جهان بشمار می‌رود که سابقه هزار ساله در تغذیه انسان دارد. در ایران از نظر سطح زیر کشت، بعد از گندم، در رتبه دوم قرار دارد و چهارمین غله مهم بعد از گندم، ذرت و برنج در جهان محسوب می‌گردد. جو نیز همچون گیاهان دیگر در معرض آفات و بیماری‌ها قرار دارد و سالیانه مقادیر بسیار زیاد جو توسط این عوامل از بین می‌رود. بنابر این برای کنترل این بیماری‌ها، کوالیتورهای مقاوم و کاربرد مواد ضد میکروبی بطور گسترده ایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۷). بیماری سفیدک پودری غلات بوسیله قارچ‌های انگل اجباری و دارای میزبان اختصاصی از گونه *Blumeria graminis* f.sp *hordei* ایجاد می‌شود. این بیماری باعث ضعف تدریجی، کاهش رشد، خشک شدن بافت های آلوده، پر نشدن دانه، چروکیدگی و لاغری بذرها می شود و بهترین شیوه کنترل بیماری، استفاده از ژنوتیپ‌ها مقاوم است(۲). مقاومت از خصوصیات ژنتیکی میزبان است که متخصصین اصلاح نباتات از آن برای تولید ژنوتیپ‌ها مقاوم استفاده می‌کنند. مقاومت ژنتیکی میزان مصرف سموم شیمیایی را کاهش داده و یا حذف می‌کند و در نتیجه به عنوان اقتصادی‌ترین و از لحاظ زیست محیطی سالم‌ترین روش مبارزه باابیماری‌های گیاهی مطرح می‌باشد.

دفاع در گیاهان بر پایه سدهای دفاعی اولیه شامل باز شدن کانال‌های یونی ویژه در غشاء پلاسمایی گیاهان، تولید سریع گونه‌های اکسیژن فعال و پاسخ‌های القایی استوار است (۱۰). در این میان ژن‌های کد کننده پروتئین‌های NPR1[1] و مرتبط با بیماریزایی PRs[2] که در بافت‌های گیاهان، در استرس‌های مختلف تجمع می‌یابند از جمله برجسته‌ترین آنها هستند که پژوهشگران با افزایش بیان ژن‌های مرتبط در گیاهان مختلف مقاومت آن‌ها را به بیمارگرها از طریق فعال کردن مسیر SAR[3] بهبود بخشیدند (۳۸،۳۴،۱۷،۱۶،۱۴،۸،۶).

از زمان کشف اولین PR پروتئین‌ها در سال۱۹۷۰ در گیاهان توتون آلوده به ویروس موزائیک، تاکنون ۱۷ خانواده از آن‌ها براساس توالی آمینواسیدی، روابط سرولوژیکی و فعالیت‌های بیولوژیکی آنزیمی‌شان شناخته شده است (۱،۱۹،۳۳). این پروتئین‌ها اغلب با عملکرد مختلف، اثر ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند. چنانچه بعضی از آنها مانند PR2 (گلوگاناز)، PR3 (کتیناز) و PR10 (لیزومایز) با تاثیر بر ساختار دیواره سلولی بیمارگرها، PR1، PR5، PR12 و PR13 نیز با بهم زدن خاصیت تراوایی غشای سیتوپلاسمی و تعدادی نیز با اثرهای دیگر باعث افزایش مقاومت گیاهان و کاهش توسعه بیمارگرها می‌شوند (۲۶،۲۰). PR9(POX) با کاتالیز فرآیند تولید لیگنین سبب تقویت دیواره سلولی گیاه و در نتیجه مقاومت علیه بسیاری از بیمارگرها می‌شوند (۱۱،۲۲،۳۵). در بررسی‌های متعدد نشان داده شد افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بیماریزایی از طریق تیمار گیاهان با

1- Non-expressore of Pathogenesis Related genes/1 2- Pathogenesis Related genes 3- Systemic Acquired Resistance

القاکننده‌های زیستی و غیر زیستی منجر به بالارفتن مقاومت گیاهان به بیمارگرهای مختلف شد (۳۲). از سوی دیگر نتایج مطالعات در سرکوب فعالیت این ژن‌ها و یا ژن‌های بالا دست آن‌ها مثل ژن‌های *NPR1* (که ناقل سیگنال سالیسیلیک اسید به هسته است و در القای مقاومت نقش دارد) و *PAL*[1] منجر به حساسیت گیاهان تراریخت به بیمارگرهای مختلف شده است (۵،۲۳،۷،۳۰،۳۶).

در این پژوهش پس از غربالگری ژنوتیپ‌ها مختلف جو در مقابل قارچ عامل بیماری سفیدک سطحی، به بررسی نقش چند ژن مرتبط با بیماریزایی مثل ژن‌های *PR1*، *PR5*، *POX*(*PR9*) و ژن بالا دست آنها *NH1* در تعامل جو با قارچ سفیدک سطحی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بذور ژنوتیپ‌ها جو و تولید گیاهچه‌های همسان

بذور ۱۱ ژنوتیپ جو مورد نظر(جدول ۱) از مرکز تحقیقات کشاورزی مازندران و گرگان جمع‌آوری و جهت انجام پژوهش به آزمایشگاه منتقل شد. بذرها در محلول هیپوکلرید سدیم (Naclo) ۳ درصد به مدت ۳ ساعت ضدعفونی، سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و پوسته خارجی آنها جدا گردید. جهت جوانه زنی، بذور درون پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی استریل از ناحیه شکمی پخش شدند. ۳ روز بعد بذور جوانه زده همسان به گلدان‌های حاوی خاک استریل منتقل شدند و تحت شرایط گلخانه رشد یافتند. گیاهچه‌های یک هفته‌ای جهت آلودگی به قارچ *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) استفاده شدند.

تهیه نمونه قارچی

ایزوله‌ای از قارچ سفیدک سطحی جو *Bgh* از مزارع پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان در ایستگاه عراقی محله گرگان تهیه و در آزمایشگاه در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد بر روی ژنوتیپ حساس جو تکثیر و نگهداری شد.

غربال‌گری ژنوتیپ‌های جو

برای ارزیابی ژنوتیپ‌ها جو در مقابل عامل بیماری همسن بودن گیاهچه‌ها ضروری است. برای آلوده سازی ژنوتیپ‌ها جو از روش بابایی‌زاد و همکاران (۹،۲) استفاده شد. یک هفته پس از رشد گیاهچه‌ها در خاک، برگ اول آنها را چیده و بطور تصادفی در پتری‌های Water agar نیم درصد حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر قارچکش بنزیمیدازول پخش شدند. پتری‌های حاوی برگ‌ها درون اتاقک آلوده سازی قرار داده شد و با اسپورهای قارچ *Bgh* به نسبت ۵ اسپور در میلی‌متر مربع آلوده سازی شدند. پس از ۳۰ دقیقه پتری‌ها از اتاقک آلوده سازی خارج و در اتاقک رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگهداری شدند. یک هفته بعد تعداد کلنی‌های رشد یافته در سطح ۲ سانتی‌متر مربع هر برگ، بوسیله استریو میکروسکوپ شمارش شد. تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار اکسل در ۳ تکرار و آزمون غربالگری، با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

آلوده سازی و نمونه برداری

در این بررسی گیاهچه دو ژنوتیپ مورد آزمایش(Ceres و Mb-86-5) یک هفته پس از رشد با حجم ۳۰ اسپور قارچ در میلی‌متر مربع مایه زنی شد و گیاهچه‌ها در اتاقک کشت با رطوبت نسبی ۷۰٪ و در دمای ۲۲درجه سیلیسوس قرار داده شدند. نمونه گیری در فواصل زمانی ۰-۱۲-۲۴-۴۸ ساعت پس از آلودگی انجام و نمونه‌ها داخل لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و پس از انجماد سریع در ازت مایع در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج RNA و زدودن DNA ژنومی از نمونه‌ها

محتوی RNA کل از نمونه‌ها در زمان‌های مختلف با استفاده از کیت RNX plus شرکت سیناژن بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد. به منظور زدودن DNA ژنومی از نمونه‌های RNA کیت RQI RNase-free DNase ساخت شرکت فرمنتاز (EN0521) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

ساخت DNA مکمل و بررسی کیفیت

ساخت DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت Aid first strand cDNA Revert(شرکت فرمنتاز k1622) و براساس دستورالعمل از Total RNA استخراج شده ساخته شد و نمونه‌ها تا زمان استفاده در فریزر ۴۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. کیفیت cDNA ساخته شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر ژن خانه دار(House keeping) ubiquitin انجام شد. ارزیابی محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE صورت گرفت.

بررسی بیان ژن‌ها به کمک روش Quantitative Real-time PCR

بیان ژن‌ها بوسیله QRT-PCR و با استفاده از کیت Sybr green و آغازگرهای طراحی شده (جدول ۱)، در دستگاه Thermal cycler M*3000P(Bio rad) انجام گرفت. واکنش‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر Sybr green، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت (Primer Forward)، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت (Primer Reverse)، ۶ میکرولیتر آب و ۲ میکرولیتر از نمونه cDNA (10 ng) بود.

1- Phenyl Alanin Ammonia Lyase

جدول ۱- جفت آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز
Table 1. Primers and their nucleotide sequences used in qRT-PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول نوکلئوتید (bp)	دمای اتصال (درجه سلسیوس)
HvUbi	F: ACCCTCGCCGACTACAACAT R: CAGTAGTGGCGGTCGAAGTG	243	60
HvNH1	F: CAGGTCGACAACCCTTTCAT R: TAAATCCGGCAAGCAGTTTC	211	60
HvPR-1b	F: GGACTACGACTACGGCTCCA R: GGCTCGTAGTTGCAGGTGAT	149	60
Hv PR 5	F: TAGAGCTTGCAGCAATGTCGACC R: CCTGAGCCCAGCTCGAAG	159	60
HvPrx8	F: TGTTCAACAACGACACCACC R: CATTCACGTGTCGTGCTAGC	221	60

پارامترهای دمایی جهت ۴۰ مرتبه تکثیر مطابق زیر می‌باشد:
مرحله اتصال آغازگر (۳۰ ثانیه در۶۰ درجه سلسیوس)، مرحله تکثیر (۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس) و مرحله تکثیر نهایی (۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس).

آنالیز داده‌ها

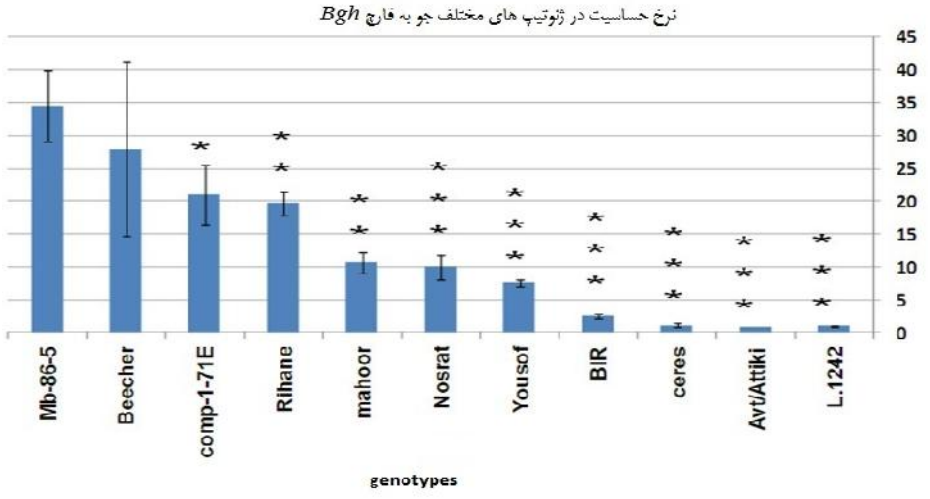
نرخ بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش دلتا-دلتا (delta-delta) طبق فرمول زیر محاسبه شد (۱۵).

$$\text{Gene expression} = 2^{\wedge\,(\Delta CT\ (\text{House-keeping gene}) - \Delta CT\ (\text{target gene}))}$$

این آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام گرفت و تجزیه داده‌ها با محاسبه انحراف استاندارد و آزمون t در نرم افزار Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه آماری نتایج حاصل از واکنش غربالگری ۱۱ ژنوتیپ جو در مقابل قارچ عامل سفیدک سطحی بر اساس میانگین تعداد کلنی‌های تشکیل شده در ۲ سانتیمتر مربع هر برگ (۲) نشان داد که ژنوتیپ‌ها Mb-86-5 و Beecher به ترتیب با میانگین تعداد کلنی ۳۴ و ۲۸ در سطح فوق‌العاده حساس، Comp-1-71E و Rihane-03 به ترتیب با میانگین تعداد کلنی ۲۱ و ۱۹ حساس، ژنوتیپ‌ها ماهور، نصرت و یوسف به ترتیب با میانگین تعداد کلنی ۱۱، ۱۰ و ۷ دارای حساسیت متوسط، ژنوتیپ BIR با میانگین تعداد کلنی۳ مقاوم و ژنوتیپ‌ها Ceres، L.1242 و Avt/Attiki به ترتیب با میانگین تعداد کلنی ۱/۴، ۱/۳ و ۱/۲ دارای درجه‌ای بالایی از مقامت به بیماری بودند (۲). به طوریکه تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها نیز نشانگر وجود اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها مقاوم در مقایسه با ژنوتیپ حساس از نظر حساسیت به عامل سفیدک سطحی بود (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج آزمون غربالگری ۱۱ ژنوتیپ جو در مقابل با قارچ عامل سفیدک سطحی. *، ** و *** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف در سطح ۵ درصد، ۱درصد و ۰/۱ درصد است

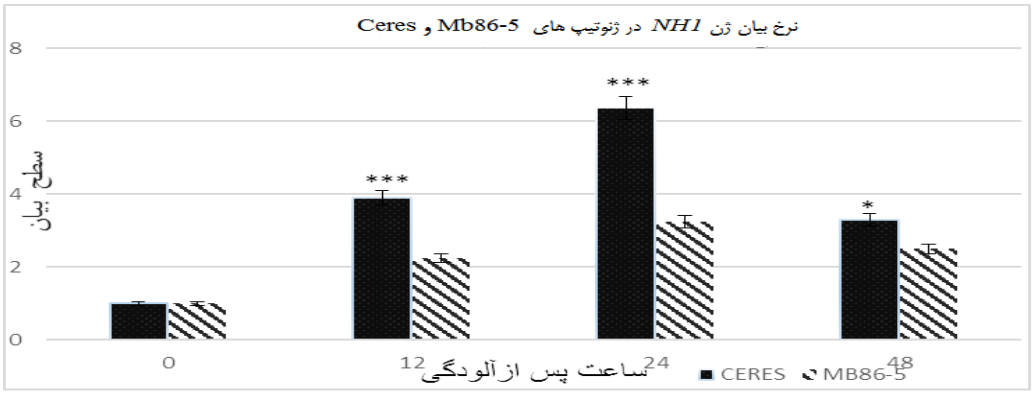
Figure 1. Screening of 11 barley genotypes against powdery mildew agent, *Bgh* display different level of susceptibility. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two genotypes. (P<0.001=***, P<0.01=**, P<0.05=*).

مطالعه روند بیان ژن *NH1* در دو ژنوتیپ Ceres و Mb-86-5 نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار نرخ رونوشت‌های این ژن در اولین بازه زمانی بعد از آلودگی بود. بیان این ژن در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به اوج خود رسید که سطح آن در ژنوتیپ مقاوم و حساس به ترتیب تقریباً ۶/۵ و۳ برابر زمان صفر خود محاسبه شد. در این ساعت بیان ژن *NH1* در ژنوتیپ مقاوم ۲ برابر ژنوتیپ حساس بود. بعد از آن بیان این ژن در ۴۸ ساعت بعد آلودگی روند نزولی به خود گرفت ولی همچنان سطح آن در ژنوتیپ مقاوم Ceres بیش از ژنوتیپ حساس Mb-86-5 بود (شکل ۲).

تجمع رونوشت‌های ژن *PR1* پس از آلودگی روند افزایشی یافت و در ساعت ۲۴ پس از آلودگی به اوج بیان رسید. در این بازه سطح آن به ترتیب در ژنوتیپ مقاوم ۱۲ و در ژنوتیپ حساس ۵ برابر زمان شاهد بود و در همین زمان بیان ژن *PR1* در ژنوتیپ مقاوم تقریباً ۲/۵ برابر در ژنوتیپ حساس بود (شکل ۳).

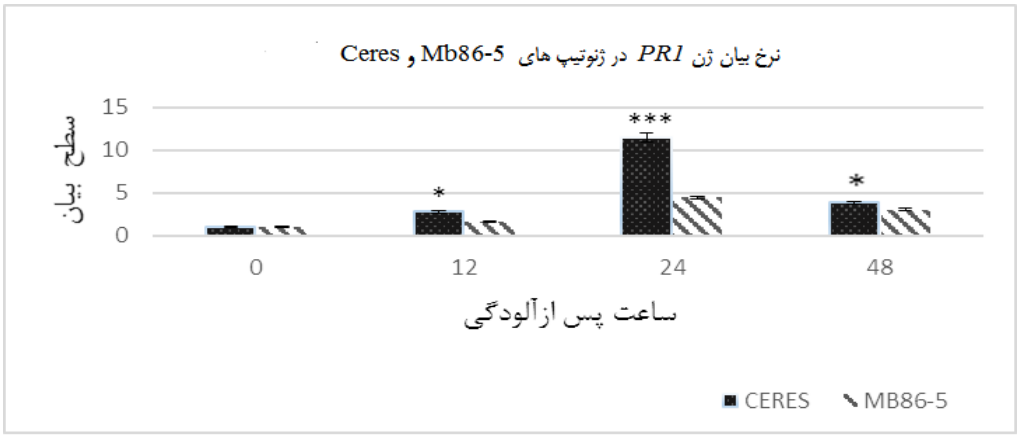
بیان ژن *PR5* نیز در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس به دنبال آلودگی به *Bgh* روند افزایشی گرفت که سطح آن در بازه ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی به بیشینه خود رسید. در این ساعت میزان بیان ژن *PR5* در ژنوتیپ مقاوم و حساس به ترتیب ۱۶ و ۶ برابر شاهد بود. پس از ۲۴ساعت بیان این ژن روند نزولی را در پیش گرفت ولی سطح آن در تمام بازه‌های پس از آلودگی در ژنوتیپ مقاوم در مقایسه با ژنوتیپ حساس بطور معنی‌داری بالاتر بود (شکل ۴).

بیان ژن *POX* نیز دربازه‌های زمانی پس از آلودگی در هر دو ژنوتیپ حساس و مقاوم روند افزایشی یافت و در ساعت ۲۴ بعد از تلقیح به بیشینه خود رسید. سطح بیان این ژن در ژنوتیپ مقاوم Ceres در مقایسه با ژنوتیپ حساس Mb-86-5 در بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از آلودگی بیش از ۴ برابر ژنوتیپ حساس بود (شکل ۵).



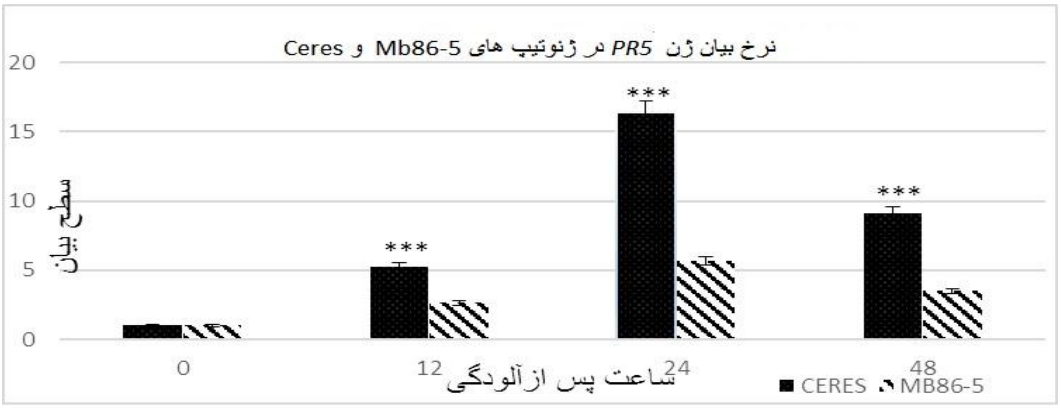
شکل ۲– نرخ بیان ژن *NH1* در ژنوتیپ‌ها Ceres و Mb-86-5 پس از الودگی با قارچ *Bgh* بر اساس ازمون t-test اختلاف معنی‌دار در هر بازه زمانی در سطح۵ درصد با * و اختلاف معنی دار در سطح ۰/۱ درصد با *** مشخص شده است.

Figure 2. Expression level of *NH1* gene in susceptible (Mb-86-5) and resistant (Ceres) barley genotypes after challenging by *Bgh* at different time courses. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two genotypes. (P<0.001=***, P<0.05=*).



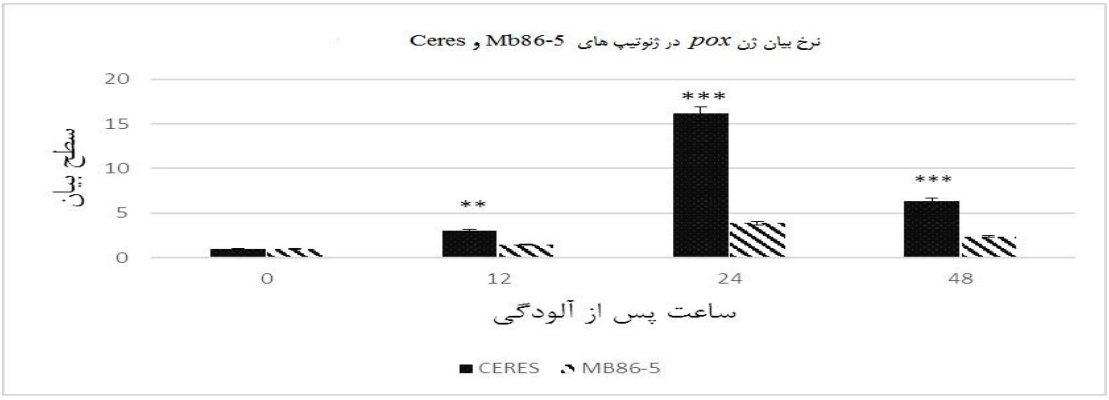
شکل ۳– نرخ بیان ژن *PR1* در ژنوتیپ‌ها Ceres و Mb-86-5 پس از آلودگی با قارچ *Bgh* بر اساس آزمون t-test اختلاف معنی‌دار در هر بازه زمانی در سطح ۵ درصد با * و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد با *** مشخص شده است.

Figure 3. Expression rate of PR1 gene in susceptible (Mb-86-5) and resistant (Ceres) barley genotypes after challenging by Bgh. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two genotypes. (P<0.001=***, P<0.05=*).



شکل ۴- نرخ بیان ژن *PR5* در ژنوتیپ‌ها Ceres و Mb-86-5 پس از آلودگی با قارچ *Bgh* بر اساس آزمون t-test اختلاف معنی‌دار در هر بازه زمانی معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد با *** مشخص شده است.

Figure 4. Expression rate of PR5 gene in susceptible (Mb-86-5) and resistant (Ceres) barley genotypes after challenging by Bgh. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two genotypes. (P<0.001=***).



شکل ۵- نرخ بیان ژن *POX* در ژنوتیپ‌ها Ceres و Mb-86-5 پس از آلودگی با قارچ *Bgh* بر اساس آزمون t-test اختلاف معنی‌دار در هر بازه در سطح ۱ درصد با ** و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد با *** مشخص شده است.

Figure 5. Expression rate of POX gene in susceptible (Mb-86-5) and resistant (Ceres) barley genotypes after challenging by Bgh. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two genotypes. (P<0.001=***, P<0.01=**).

با توجه به نتایج غربالگری ۱۱ ژنوتیپ جو در برابر قارچ عامل *Bgh*، دو ژنوتیپ Mb-86-5 و Ceres به ترتیب به عنوان حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ژنوتیپ انتخاب شدند. نتایج Real Time PCR نشان داد که میزان بیان اولیه ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش در ژنوتیپ مقاوم بیش از میزان بیان آن‌ها در ژنوتیپ حساس بود. در تمامی بررسی‌ها میزان ژن‌ها در هر دو ژنوتیپ در همان ساعات اولیه پس از آلودگی افزایش یافته و در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به حداکثر مقدار خود می‌رسد. این افزایش بیان همزمان با تشکیل هاستوریوم و انشعابات ریسه قارچ است که با بررسی‌های سایر محققین مطابقت دارد (۱،۳) و پس از آن در ۴۸ ساعت پس از آلودگی روند نزولی را در پیش می‌گیرد. ولی در مجموع میزان بیان در تمامی ساعات مورد بررسی در ژنوتیپ مقاوم Ceres بیش از ژنوتیپ حساس Mb-86-5 بود. بیشتر بودن بیان این ژن‌ها در ژنوتیپ مقاوم نسبت به ژنوتیپ حساس در تمامی بازه‌ها بیانگر نقش فعال این ژن‌ها در دفاع جو علیه بیمارگر *Bgh* می‌باشد.

مولکول *NH1* برای هدایت سیگنال SA به منظور فعال کردن ژن‌های *PR* و القای مکانیسم SAR ضروری است که خود باعث مقاومت در برابرطیف وسیعی از بیماری‌ها می‌شود. فعال شدن مکانیسم SAR با *NH1* باعث تجمع بالایی از PR پروتئین‌ها می‌شود (۱۸). تاکنون نقش این ژن در مقاومت گیاهان مختلف به بیمارگرهای مختلف ثابت شده است (۲۸،۱۶). نتایج این بررسی نیز نشان داد ژن *NH1* در تعامل گیاه جو و قارچ عامل بیماری سفیدک سطحی *Bgh* در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به حداکثر رسید که به دلیل نقش دیگر این ژن در بسته‌بندی و انتقال پروتئین‌های سنتز شده گیاهی است.

چنانچه اشاره شد ژن‌های *PR* با اثر مستقیم و غیرمستقیم باعث افزایش مقاومت به بیمارگرهای گیاهی می‌شوند. پروتئین‌های PR1 از طریق واکنش با پروتئین‌های کانال‌های غشایی سلول هدف، نفوذپذیری غشا را تغییر داده و منجر به مرگ سلولی می‌گردد. نقش این ژن در دفاع جو علیه قارچ *Bgh* به خوبی ثابت شده است (۱،۲،۲۹). از طرفی با

افزایش بیان ژن *PR1* در ۲۴ ساعت پس از آلودگی و شناخت ژن *PR1* بعنوان یک مارکر مقاومت القایی تحریک شده بوسیله SA که غالباً در دفاع گیاهان در مقابل بیمارگرهای بیوتروف موثر واقع می‌گردد می‌توان نتیجه گرفت که جو در تعامل با *Bgh* بوسیله فعال نمودن مسیرهای دفاعی وابسته SA به حمله این بیمارگر عکس‌العمل نشان می‌دهد (۲۵،۳۱). ژن *PR5* سبب تغییر نفوذ پذیری غشا سیتوپلاسمی قارچ‌ها شده و در نهایت سبب مرگ سلولی قارچی می‌گردد (۱۳) لذا بیان بالای این ژن را می‌توان به نقش این ژن در القای مقاومت دانست. به طوریکه در بررسی انجام شده توسط کمپل و همکاران (۴) مشاهده شد که این ژن در لاین‌های مقاوم گندم در پاسخ به قارچ عامل زنگ قهوه‌ایی سریعتر و به میزان بیشتری نسبت به لاین‌های حساس بیان می‌شود. نقش این ژن همچنین در افزایش مقاومت به بیماری‌ها توسط محققین دیگری تایید گردید (۲۱،۲۰).

پراکسیداز با فرآیند لیگنینی شدن (Lignification) که سبب محکم‌تر شدن دیواره سلولی گیاه می‌شود باعث بروز مقاومت در گیاهان در برابر بیمارگرها می‌گردد (۲۴). تولید گونه‌های فعال اکسیژن و سنتز فیتوآلکسین‌ها و تجمع ترکیبات مختلف در دیواره سلولی گیاهان در مقاومت به بیماگرها نقش دارد. علاوه بر این فعالیت ضد قارچی داشته و متابولیسم اکسین را بر عهده دارد (۱۲). در این مطالعه سطح بیان این ژن در ۱۲ ساعت پس از آلودگی افزایش اندکی داشت که به دلیل نفوذ هیف‌های اولیه به بافت پارانشیمی در این زمان است و پس از آن در زمان ۲۴ ساعت پس از آلودگی به اوج خود رسید که همزمان با نفوذ هیف‌های اپرسوریومی و تشکیل هاستوریوم در گیاه است. با توجه به عملکردهای پراکسیداز این افزایش را می‌توان به این صورت توجیه نمود که گیاهان با فعال نمودن پراکسیدازها و تولید گونه‌های اکسیژن فعال و افزایش فراوانی نرخ جواب مقاومتی مرگ سلولی برنامه ریزی شده به منظور توقف رشد قارچ استفاده می‌کند. این نتایج با بررسی‌های قبلی در مورد بیان ژن پراکسیداز در گیاه برنج پس از تلقیح *M. grisea* و *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* مطابقت دارد (۲۷). با توجه به نتایج این پژوهش و یافته های گذشته می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ژن‌های *PRs* و *NH1* نقش مهمی در مقاومت گیاهان به بیمارگرها دارند و می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی در راستای تولید گیاهان تراریخته مقاوم که نقش مهمی در ایمنی زیستی دارند استفاده کرد. امید است که نتایج حاصل از این پژوهش در درک بهتر مقاومت جو به قارچ عامل سفیدک سطحی و توسعه استراتژی‌های جدید در مبارزه با این بیماری از طریق تولید گیاهان تراریخته مؤثر باشد.

منابع

1. Ahangar, L., V. Babaeizad, G.A. Ranjbar, H. NajafiZarrini and A. Biabani. 2015. Study of PR Gene Expression Pattern related to in Induced Resistance to Powdery Mildew in Susceptible Wheat Genotype after Treating with Salicylic Acid. Journal of Crop Breed, 17: 208-217 (In Persian).
2. Babaeizad, V. 2009. Generation and molecular analyses of transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) in response to relevant pathogens. University of Giessen, Giesssen/ Germany, 103 pp.
3. Bryngelsson, T., J. Sommer-Knudsen, P.L. Gregersen, D.B. Collinge, B. Ek and H. Thordal-Christensen. 1994. Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley. Mol. Plant Microbe Interaction, 7: 267-275.
4. Campbell, J., H. Zhang, M.J. Giroux, L. Feiz, Y. Jin, M. Wang and L. Huang. 2012. A mutagenesis-derived broad-spectrum disease resistance locus in wheat. TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik, 125: 391-404.
5. Cao, H., S.A. Bowling, A.S. Gordon and X. Dong. 1994. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cel, 6: 1583-1592.
6. Cao, H., J. Glazebrook, J.D. Clarke, S. Volko and X. Dong.1997. The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats Cell, 88: 57-63.
7. Delaney, T.P., S. Uknes, B. Vernooji and L. Friedrich.1994. "A central role of salicylic acid in plant disease resistance" Science, 266: 1247-1250.
8. Dong, X. 2004. NPR1, all things considered. Current Opinion in Plant Biology, 7: 547-552.
9. Eichmann, R., C. Dechert, K.H. Kogel and R. Huckelhoven. 2006. Transient over-expression of barley BAX inhibitor-1 weakens oxidative defence and MLA12-mediated resistance to Blumeria graminis f.sp hordei. Molecular Plant Pathology, 7: 543-552.
10. Grover, A. and R. Gowthaman. 2003. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. Current Science, 84: 330-40.
11. Hernandez, H., M. Figueredo, N. Garrido, L. Sa´nchez and J. Sarracent. 2005. Intranasal immunisation with a 62 kDa proteinase combined with cholera toxin or CpG adjuvant protects against Trichomonas vaginalis genital tract infections in mice. International Journal Parasitology, 35: 1333-1337.
12. Hilaire, E., S.A. Young, L.H. Willard, J.D. McGee, T. Sweat , J.M. Chittor, J.A .Guikema and J.E. Leach. 2001. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14: 1411-1419.
13. Jwa, N.S., G.K. Agrawal, S. Tamogami, M. Yonekura, O. Han, H. Iwahashi and R. Rakwal. 2006. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. Plant Physiology and Biochemistry, 44: 261-273.
14. Liu, D.O.N.G., K.G. Raghothama, P.M. Hasegawa and R.A. Bressan. 1994. Osmotin over expression in potato delays development of disease symptoms. Proceeding National Academy of Sciences of the United States America, 91: 1888-1892.

15. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25: 402-408.
16. 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 Microbe Interact, 19: 123-139.
17. Malnoy, M., Q. Jin, E.E. Borejsza-Wysocka, S.Y. He and H.S. Aldwinckle. 2007. Over-expression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in Malus X domestica. Molecular Plant Microbe Interaction, 20: 1568-1580.
18. Matton, D.P. and N. Brisson. 1989. Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2: 325-331.
19. Menezes, S.P., E.M. de Andrade Silva, E.M. Lima, A.O. de Sousa, B.S. Andrade, L.S.L. Lemos, K.P. Gramacho, A. da Silva Gesteira, , C.P. Pirovani and F. Micheli. 2014. The pathogenesis-related protein PR-4b from Theobroma cacao presents RNase activity, Ca 2+ and Mg 2+ dependent-DNase activity and antifungal action on Moniliophthora perniciosa.BMC Plant Biology, 11: 14-1.
20. Molitor, A., D. Zajic, L.M. Voll, J. Pons-Kühnemann, B. Samans, K.H. Kogel and F. Waller. 2011. Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and Piriformosporaindica-mediated systemic induced resistance to powdery mildew. Molecular Plant-Microbe Interactions, 24: 1427-1439.
21. Muthukrishnan, S. 2003. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against Fusarium graminearum. Journal of Experimental Botany, 384: 1101-1111
22. Nidermann, T., I. Genetet, T.Bruyère, R. Gees, A.Stintzi, M. Legrand, B. Fritig and E. Mösinger. 1995. Isolation and characterization of three 14-kiloDalton proteins 41 of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against Phytophthora infestans. Plant Physiology, 108: 17-27.
23. Pallas, J.A., N.L. Paiva, C. Lamb and R.A. Dixon. 1996. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. Plant Journal, 10: 281-293.
24. Passardi, F., C. Penel and C. Dunand. 2004. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. Trends in Plant Science, 9: 534–40.
25. Peterhänsel, C., A. Freialdenhoven, J. Kurth, R. Kolsch and P. Schulze-Lefert. 1997. Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. Plant Cell, 9: 1397-1409.
26. Rayapuram, C., J. WU, C. Haas and I.T. Baldwin. 2008. PR-13/Thionin but not PR-1 mediates bacterial resistance in Nicotiana attenuata in nature and neither influences herbivore resistance. Molecular Plant Microbe Interactions, 21: 988-1000.
27. Sasaki, K., T. Iwai, S. Hiraga, K. Kuroda, S. Seo, I. Mitsuhara, A. Miyasaka, M. Iwano, H. Ito, H. Matsui and Y. Ohashi. 2004. Ten Rice Peroxidases Redundantly Respond to Multiple Stresses Including Infection with Rice Blast Fungus. Plant Cell Physiology, 45: 1442-1452.
28. Sayari, M., V. Babaeizad, M.A.T. Ghanbari and H. Rahimian. 2014. Expression of the pathogenesis related proteins, NH-1, PAL, and lipoxygenase in the iranianTarom and Khazar rice cultivars, in reaction to *Rhizoctoni asolani* – the causal agent of rice sheath blight. Journal of Plant Protection Research, 54: 36-43.
29. Schultheiss, H., C. Dechert, K.H. Kogel and R. Hückelhoven. 2003. Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. Plant Journal, 36: 589-601.
30. Shah, J., F. Tsui and D.F. Klessig. 1997. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. Molecular Plant Microbe Interactions, 10: 69-78.
31. Stein, M., J. Dittgen, C. Sánchez-Rodrïguez, B.H. Hou, A. Molina, P. Schulze-Lefert, V. Lipka and S. Somerville. 2006. Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. Plant Cell, 18: 731-746.
32. Van Loon, L.C. and E.A. Van Strien. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55: 85-97.
33. Van Loon, L.C. 2000. Systemic induced resistance. In Mechanisms of resistance to plant diseases Kluwer: Academic press, Dirdrecht, pp: 521-574.
34. Van Loon, L.C., M. Rep and C.M.J. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology, 44: 135-62.
35. Velazhahan, R., S.K. Datta and S. Muthukrishnan. 1999. The PR-5 family, Thaumatin-like Proteins. In: Pathogenesis-Related Proteins in Plants. Ed. S. K. Datta and S. Muthukrishnan, CRC Press. pp: 107-129.
36. Yuan, Y., S. Zhong, Q. Li, Z. Zhu, Y. Lou, L. Wang, J. Wang, M. Wang, D. Yang and Z. He. 2007. Functional analysis of rice *NPR1*-like genes reveals that *OsNPR1 /NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. Plant Biotechnology Journal, 5: 313-324.
37. Zhang, Y., Y.T. Cheng, N. Qu, Q. Zhao, D. Bi and X. Li. 2006. Negative regulation of defense responses in Arabidopsis by two NPR1 paralogs Plant Journal, 48: 647-656.
38. Zhu, B., T.H.H. Chen and P.H. Li. 1995. Activation of two osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. Plant Physiology, 108: 929-937.

Screening of some Barley Genotypes Against Powdery Mildew Agent and Considering of *NH1* and Several *Pathogenesis Related Genes* in Disease Resistance

Marzieh Mehrabioun Mohammadi[1], Valiollah Babaeizad[2], Heshmatollah Rahimian[3] and Shahpor Ebrahim Nejad[4]

1 and 3- Graduated M.Sc. Student and Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, (Corresponding author: babaeizad@yahoo.com)
4- Research. Assistant Professor, of Plant breeding in Agricultural and Natural Resource Research Center of Mazandaran, Sari, Iran
Received: October 27, 2015 Accepted: May 31, 2016

Abstract

Barley is one of the most important cereals in animal nutrition and it has a role as a substitute source of wheat and rice in diet nutrition. This product is always exposed to damaging factors such as pests and diseases which lead to reduce yield and quality. The Powdery mildew agent, as a biotrophic fungus, seriously causes damage in some barley plantation areas. Similar to other plants, barley employs diverse mechanisms against the disease based on proteins and other antimicrobial agents such as pathogenesis- related proteins which have essential roles in disease resistance. In this study, morphological and molecular analyses were conducted on some barley genotypes after challenge inoculation with *Blumeria graminis* f.sp *hordei* (*Bgh*), the causal agent of powdery mildew. For this purpose, 11 barley genotypes were selected for initial screening. Result from data analysis showed that Mb-86-5 was the most susceptible cultivar and in Avt/Attiki, Ceres, BIR, L.1242, Yousef, Nosrat, Mahoor, Comp-1-71E and Rihane-03 genotypes, the rate of *Bgh* colony number significantly decreased when compared to susceptible genotype, The susceptibility rate between Beecher and Mb-86-5 was not significant. Determination of the genes expression involving in disease resistance, carried out on one- week old seedling. For all samples total RNAs were extracted. Molecular investigation showed that *PR1, PR5, NH1, POX* genes enhanced significantly in resistant genotype Ceres when compared to Mb-86-5 susceptible genotype. Results of this study indicate that the mentioned genes are involved in powdery mildew disease resistance in Ceres barley genotype.

Keywords: Barley, Powdery mildew, PR Proteins, Interaction, Real time PCR