بررسی الگوی بیان ژن کدکننده پروتئین انتقال‌دهنده چربی در مقابله با بیماری سپتوریوز برگی در گندم نان و کلون‌سازی آن

Cloning and Expression Pattern Analysis of *Lipid Transfer Protein* Gene from Wheat (*Triticum aestivum*) Responding to *Septoria tritici* Blotch (STB)

معصومه حبیبی[۱]، ندا میرآخورلی[۲*] و محسن مردی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۳

چکیده

پروتئین‌های انتقال‌دهنده چربی (LTP)، در حدود ۱۰-۷ کیلودالتون وزن داشته و به‌دلیل توانایی که در انتقال انواع مولکول‌های فسفولیپید از محل سنتز (شبکه آندوپلاسمی) به غشاهای سلولی دارند، به این نام خوانده می‌شوند. در این مطالعه نقش این پروتئین‌ها در ایجاد مقاومت گندم نان نسبت به بیماری سپتوریوز برگی (*Septoria tritici*) با بررسی الگوی بیان ژن *LTP2* طی ۶-۰ روز بعد از آلودگی در رقم مقاوم ونگشوبایی و حساس فلات با استفاده از روش RT-PCR نیمه‌کمی بررسی گردید. از آن‌جا که این روش امکان مقایسه نسبی مقدار رونوشت ژن‌ها را در انواع سلول‌های مختلف فراهم می‌نماید مطالعه‌ی الگوی بیان ژن به سادگی ممکن می‌گردد. که طی آن علاوه‌بر میزان بیان، زمان بیان ژن نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بیان ژن در اثر آلودگی گیاه با بیماری سپتوریوز برگی در هر دو رقم حساس و مقاوم افزایش می‌یابد. بیان این ژن در رقم مقاوم طی ۲۴ ساعت بعد از آلودگی افزایش می‌یابد درحالی‌که این افزایش بیان در رقم حساس با تأخیر و بعد از شش روز مشاهده می‌شود. با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت این ژن با ایجاد مقاومت علیه بیماری سپتوریوز برگی مرتبط بوده و در کنار ژن‌های اصلی ایجادکننده مقاومت باعث تشدید و حفظ مقاومت خواهد شد. هم‌چنین ژن پس از کلون‌سازی، تعیین توالی گردید و مورد بررسی بلاست پروتئینی قرار گرفت. با بررسی نتایج بلاست مشخص گشت که توالی کلون شده دارای هشت سیستئین ثابت و حفاظت شده است که در همه پروتئین‌های انتقال‌دهنده چربی ثابت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Mycosphaerella graminicola*، تظاهر ژن *LTP2*، *Triticum aestivum*

۱و ۲. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۳. دانشیار بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

*: نویسنده مسوول Email: Nedamirakhorli@yahoo.com

محل انجام تحقیق آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد می‌باشد.

مقدمه

پروتئین‌های انتقال‌دهنده چربی (Lipid Transfer Protein) با نام اختصاری LTP، پپتیدهای کوچک، غنی از سیستئین و کاتیونی می‌باشند. LTPهای گیاهی جدا شده از گونه‌های گیاهی مختلف *کادر* و همکاران (Kader *et al.*, 1997) به دو خانواده LTP1S و LTP2S تقسیم می‌شوند و در حدود ۱۰-۷ کیلودالتون وزن داشته و نقطه ایزوالکتریک آن‌ها در حدود ۸/۸ تا ۱۰ بسته به منبع گیاهی متفاوت است *سلس* و همکاران (Sels *et al.*, 2008). این پروتئین‌ها دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی بوده و به‌دلیل حضور فراوان‌شان در دیواره سلولی، حدس زده می‌شود که در تجمع کوتین و واکس در لایه‌های سطحی دیواره سلولی و استحکام دیواره نقش داشته باشند *کاروالهو* و همکاران (Carvalho *et al.*, 2007). LTPها متعلق به خانواده ۱۴ پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR-14) می‌باشند و در مطالعات مختلفی مشخص شده است که در هنگام آلودگی با پاتوژن‌های قارچی، باکتریایی و ویروئیدی به میزان بسیار بالایی بیان می‌شوند. به‌طور مثال *پارک* و همکاران (Park *et al.*, 2002) نشان دادند که ژن *LTP* در گیاه فلفل در اثر بیماری ویروس موزاییک توتون به میزان بسیار بالایی بیان شده و باعث ایجاد مقاومت می‌گردد. *کریستنسن* و همکاران (Kristensen *et al.*, 2000) نیز نشان دادند که مولکول‌های LTP دارای فعالیت ضدقارچی بوده و از رشد قارچ *Cercospora beticola* در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند. *ونگ* و همکاران (Wang *et al.*, 2004) نیز نشان دادند که پروتئین‌های جدا شده از گیاه لوبیا دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه قارچ‌هایی از قبیل *Fusarium oxysporum* و *Phythium aphaniderm* و باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* می‌باشد. هم‌چنین *کایروباکاران* و همکاران (Kirubacaran *et al.*, 2008) یک ژن *LTP* را به نام *Ltp3F1* از گندم استخراج کردند که دارای فعالیت ضدقارچی علیه قارچ *Blumeria graminis f. sp. tritici* می‌باشد.

بیماری سپتوریوز برگی، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های قارچی گندم می‌باشد که به‌وسیله قارچ *Mycosphaerella graminicola* (آنامورف: *Septoria tritici*) ایجاد می‌شود. میزان کاهش محصول در اثر این بیماری در آلودگی‌های شدید ۳۱٪ تا ۵۳٪ گزارش شده است (کیا و ترابی، ۱۳۸۷). براساس گزارشات موجود ۱۵ ژن (*Stb1-Stb15*) ایجادکننده مقاومت به سپتوریوز برگی (STB)، در گندم شناخته شده اند *رامان* و همکاران (Raman *et al.*, 2009). مطالعات انجام شده جهت شناسایی ژن‌های مؤثر در ایجاد مقاومت به سپتوریوز برگی از طریق تکنیک cDNA-AFLP نشان داده است که علاوه‌بر مقاومت اختصاصی یا تک ژنی، طی پاسخ مقاومت گیاه به این بیماری تظاهر تعداد زیادی از ژن‌ها افزایش می‌یابد *آدهیکاری* و همکاران (Adhikari *et al.*, 2007). تفاوت در الگوی بیان این ژن‌ها در ارقام مقاوم و حساس پس از آلودگی با قارچ *M. graminicola* می‌تواند باعث افزایش دانسته‌ها در درک بهتر مکانیزم مقاومت در گندم نان نسبت به این بیماری گردد.

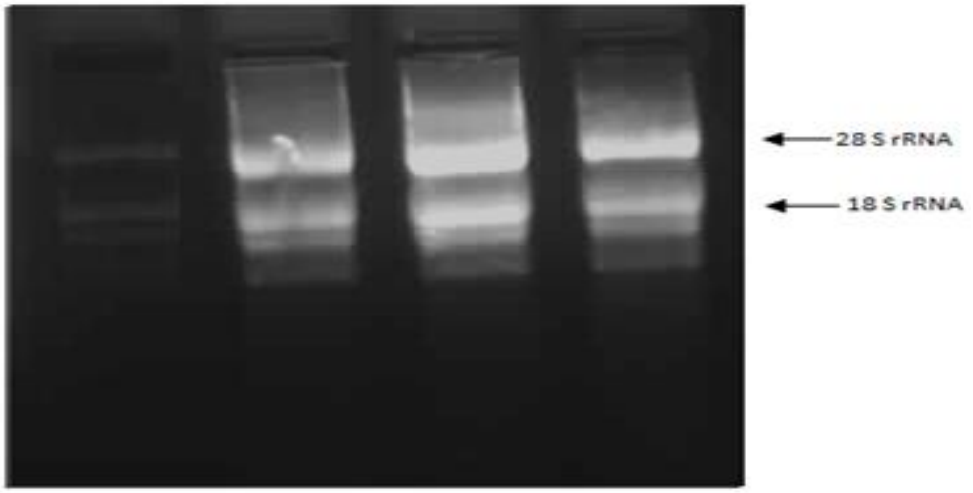
هدف از این تحقیق، بررسی الگوی بیان ژن کدکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده چربی (LTP2) به‌عنوان ژن دفاعی در گیاه گندم (*آدهیکاری* و همکاران، 2007) در زمان‌های مختلف بعد از آلودگی به بیماری سپتوریوز برگی بود که به‌منظور تعیین اثر این ژن در ایجاد مقاومت، الگوی بیان آن در واریته فلات به‌عنوان رقم حساس و واریته ونگشوبایی (Wangshuibai) به‌عنوان رقم مقاوم با استفاده از روش RT-PCR نیمه‌کمی (Semi quantitative RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفته است.

به‌منظور مقایسه نسبی مقدار رونوشت ژن‌ها در بین انواع سلول‌های مختلف استفاده از یک روش نیمه‌کمی کافی خواهد بود. با وجود این‌که این روش هیچ مقدار عددی برای میزان mRNA در نمونه مورد بررسی نمی‌دهد، ولی به راحتی می‌توان با استفاده از آن تفاوت مقادیر mRNA را بین ۲۰-۱۰ برابر در نمونه‌های مختلف تعیین کرد. هم‌چنین به‌منظور تعیین توالی ژن *LTP2* موجود در واریته‌های مورد آزمایش در این تحقیق و مقایسه‌ی آن با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن این ژن از نمونه‌های مورد تحقیق کلون شده و توالی‌یابی گردید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق دو رقم گندم فلات و ونگشوبای که به‌ترتیب نسبت به بیماری سپتوریوز برگی حساس و مقاوم می‌باشند، مورد استفاده قرار گرفتند *طالبی* و همکاران (Talebi *et al.*, 2010). جهت ایجاد آلودگی از تک جدایه‌های *M. graminicola* تکثیر یافته در محیط‌کشت مایع استفاده شد. ابتدا ایزوله‌های قارچ روی محیط‌کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت داده شده و به‌مدت پنج روز در دمای۲۲-۱۸°C در زیر لامپ فلورسنت نگهداری شدند. سپس میسلیوم‌های رشد کرده به داخل محیط‌کشت مایع YGA (Yeast Glocuse Agar) منتقل شدند. محیط‌کشت مایع به‌مدت پنج روز روی شیکر (۳۰ دور در دقیقه) در دمای ۱۸°C قرار گرفت. بعد از رشد مناسب قارچ، فلاسک‌های حاوی محیط‌کشت مایع به‌صورت کج روی پایه‌های فلزی به‌مدت ۵-۳ ساعت گذاشته شدند تا اسپورهای قارچ رسوب کنند. سپس فاز مایع خالی شده و اسپورهای رسوب کرده در آب مقطر حل شدند و میزان غلظت قارچ با استفاده از لام هموسایتومتر در زیر میکروسکوپ تعیین گردید. غلظت

نهایی برای اسپورپاشی ۲×۱۰^{۶} در نظر گرفته شد. پس از آن‌که سوسپانسیون قارچ به غلظت موردنظر رسانده شد، به هر لیتر از سوسپانسیون، ۱۰ قطره توئین ۲۰ اضافه گردید تا باعث چسبندگی اسپورها و باقی ماندن آن‌ها روی برگ در هنگام اسپورپاشی شود. اسپورپاشی به‌وسیله اسپری دستی انجام شد. میزان اسپورپاشی به اندازه‌ای بود که به‌طور کامل سطح برگ خیس شود. بعد از اسپورپاشی، گیاهان به‌مدت ۷۲ ساعت در داخل پاکت‌های پلاستیکی جهت تأمین رطوبت قرار گرفتند و روی آن‌ها با پلاستیک سیاه پوشیده شد. بعد از ۷۲ ساعت گیاهان از پلاستیک خارج شده و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۶-۲۲ºC و رطوبت نسبی ۹۵-۹۰ درصد و حداقل ۱۶ ساعت روشنایی در روز قرار گرفتند. از گیاهان آلوده و شاهد دو رقم حساس و مقاوم نمونه‌های برگی (دو برگ بالایی ساقه) در زمان‌های صفر، سه، شش، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و شش روز پس از آلودگی و هر کدام در سه تکرار گرفته شد و بعد از قرار گرفتن درون فویل آلومینیوم سریعاً به‌وسیله ازت مایع منجمد گردید و به فریزر ۱۸ºC- برای استخراج RNA انتقال یافت. به‌منظور استخراج RNA، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی منجمد شده به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی به‌خوبی سائیده شده و به تیوپ دو میلی‌لیتری انتقال یافت. استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy®Mini Kit از شرکت QIAGEN (#74903) انجام شد. تعیین کمیت RNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام شد و به‌منظور تعیین کیفیت نمونه‌ها از روش الکتروفورز ژل آگارز ۱/۳ درصد در بافر MOPS 1x استفاده گردید (شکل ۱). cDNA رشته اول با استفاده از کیت Vivantis (#RTPL12) سنتز شد. برای این



شکل ۱: نمونه‌ای از الکتروفورز RNA استخراج شده از برگ بر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد
Fig. 1: Native agarose gel electrophoresis of total RNA from plant leaves

منظور یک میکروگرم RNA استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت. از واکنش RT-PCR نیمه‌کمی به‌منظور آنالیز الگوی بیان ژن کدکننده پروتئین انتقال‌دهنده چربی (LTP) در دوره شش روزه پس از آلودگی استفاده شد. به‌منظور انجام واکنش RT-PCR، از یک میکرولیتر cDNA سنتز شده و آغازگرهای مربوط به ژن هدف و ژن کنترل داخلی اکتین استفاده گردید. لازم به‌ذکر است این آغازگرها با توجه به منابع مورد بررسی انتخاب شدند (جدول ۱).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی بافر (1x) PCR، dNTP ۲۰۰ میکرومولار، یک واحد *Taq* پلی‌مراز و ۰/۴ میکرومولار از هر کدام از آغازگرها انجام شد. شرایط دمایی برای تکثیر PCR، سه دقیقه در دمای ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر جفت آغازگر، یک دقیقه در ۷۲°C و سپس نگه‌داری در دمای ۱۰°C بود. پس از اتمام واکنش PCR، فراورده PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد با بافر ۰/۵x TBE مورد الکتروفورز قرار گرفت (شکل ۲). سپس با استفاده از نرم‌افزار Image J راسبند (Rasband, 2011)، میزان بیان ژن به‌صورت کمی بررسی گردید. به این منظور ابتدا جهت حذف اثرات احتمالی مختلف محیط (خطای آزمایش) بر بیان متفاوت ژن‌ها در نمونه‌های مختلف، بیان هر نمونه با توجه به بیان یک ژن خانه‌دار (در این آزمایش ژن اکتین) (شکل ۳) در همان نمونه به‌صورت نسبی تعیین گردید و جهت نرمال‌سازی داده‌ها و دست‌یابی به مقدار افزایش بیان، میزان عددی به‌دست آمده برای هر دو حالت کنترل و تنش ارقام نسبت به مقدار بیان ژن در نمونه کنترل رقم حساس نسبی شدند.

جدول۱: توالی آغازگر مربوط به ژن *LTP* و ژن *اکتین* مورد استفاده در این مطالعه

Table 1: Primer sequences used to amplify *LTP* and *actin* genes

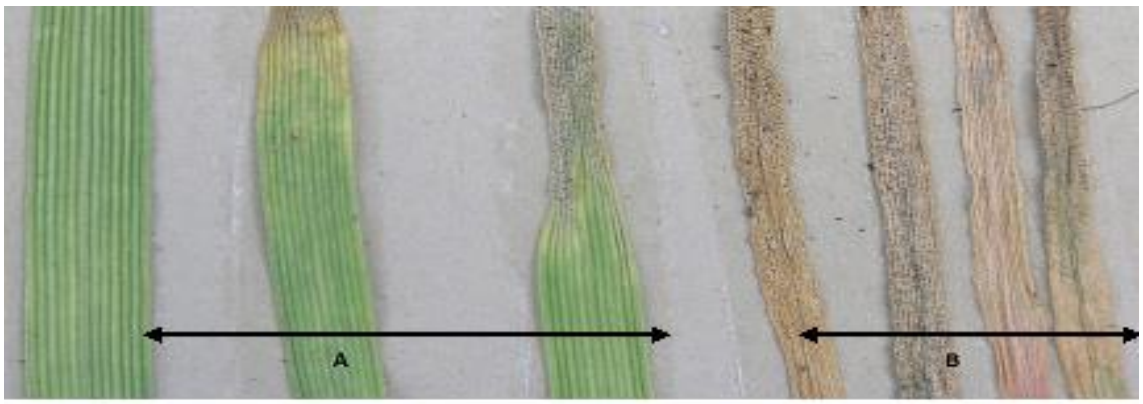
ژن Gene	توالی Sequence	محصول سایز Product size	منابع Reference
LTP2	For: TGGCTCGCACTGCAGCTACT Rev: CTCAACGTACTCAGCATCAA	430	*جانگ* و همکاران (2007) (Jang *et al.*, 2007)
Actin	For: GCCGTGCTTTCCCTCTATG Rev: GCTTCTCCTTGATGTCCCTTA	200	جی و همکاران (2011) (Ji *et al.*, 2011)

به‌منظور تعیین توالی ژن *LTP2* موجود در واریته‌های مورد آزمایش در این تحقیق و مقایسه‌ی آن با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن این ژن از نمونه‌های مورد تحقیق کلون شده و توالی‌یابی گردید. به این منظور ابتدا فراورده PCR توسط کیت PCR Clean-up kit ساخت شرکت Vivantis (#GF-PC-050) خالص‌سازی شد و سپس با استفاده از کیت CloneJET PCR Cloning kit (#k1231) ساخت شرکت فرمنتاز قطعه مورد نظر به داخل وکتور pJET1.2 کلون گردید. سپس وکتور به باکتری *E. coli* سویه DH5α با استفاده از روش شوک حرارتی انتقال داده شد و پس از انتخاب کلونی‌های تراریخت، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت Plasmid DNA Extraction ساخت شرکت Vivantis (#GF-PL-050) انجام شد. سپس به‌منظور توالی‌یابی، پلاسمیدهای استخراج شده به شرکت ماکروژن کره فرستاده شد.

نتایج و بحث

گیاهان در مقابل تنش‌های زیستی و غیرزیستی از طریق بیان ژن‌های خاص و سنتز پروتئین‌های متعدد از خود دفاع می‌کنند. در بین این پروتئین‌های القائی یک گروه پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis Related Protein) وجود دارد که در اثر حمله پاتوژن یا شرایط مشابه در میزبان تولید می‌شوند. این پروتئین‌های دفاعی از تکثیر و توزیع پاتوژن جلوگیری می‌کنند. این پروتئین‌ها براساس ساختار اولیه، ارتباط سرولوژیکی، توالی آمینواسیدی و فعالیت بیولوژیکی به ۱۷ گروه طبقه‌بندی شده‌اند.

در این تحقیق الگوی بیان ژن کدکننده پروتئین انتقال‌دهنده چربی (*LTP2*) که در گروه ۱۴ پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR-14) طبقه‌بندی می‌شوند، در طی دوره شش روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی در دو رقم حساس فلات و مقاوم ونگشوبایی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). پس از بررسی باندهای به‌دست آمده بر روی ژل الکترفورز (شکل ۴)، آنالیز نتایج RT-PCR نیمه‌کمی تأیید نمود که بیان این ژن در هر دو رقم حساس و مقاوم در اثر بیماری سپتوریوز برگی به‌طور قابل توجه و معنی‌داری افزایش می‌یابد. نمودار الگوی بیانی نشان می‌دهد که بیان این ژن در رقم مقاوم سریع‌تر از رقم حساس افزایش می‌یابد. همان‌طورکه در شکل ۵ نشان داده شده است در رقم مقاوم افزایش بیان معنی‌داری نسبت به حالت نرمال تا زمان یک روز پس از آلودگی مشاهده نمی‌شود ولی در این زمان بیان این ژن نسبت به حالت نرمال تقریباً چهار برابر افزایش یافته و سپس در زمان‌های بعدی بیان آن کاهش یافته و دارای اختلاف معنی‌دار ($p\leq0.05$) نسبت به زمان ۲۴ ساعت پس از آلودگی می‌باشد. در رقم حساس افزایش بیان این ژن به تأخیر افتاده و در ۶ روز پس از آلودگی افزایش بسیار بالا (۱۳ برابر) و معنی‌داری مشاهده می‌شود.



شکل ۲: سپتوریوز برگی گندم، عامل بیماری قارچ *Mycosphaerella graminicola* در مرحله جنسی *Septoria tritici*، میزان خسارت بر اساس درصد سطح صدمه دیده‌ی برگ بعد از شش روز پس از آلودگی اندازه‌گیری می‌شود. *سرازتدینووا* و همکاران (Serazetdinova *et al.*, 2005): گندم مقاوم، B: گندم حساس ۱۰۰٪ آلوده

Fig. 2: *Septoria tritici* blotch (STB), caused by the ascomycete fungus *Mycosphaerella graminicola* (asexual stage: *Septoria tritici*), symptoms were assessed as percentage of infected leaf area 6 days after inoculation (Serazetdinova *et al.*, 2005) A: resistant wheat, B: sensitive wheat 100% infected

تفاوت در الگوی بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت در ارقام مقاوم و حساس، پس از آلودگی با قارچ *M. graminicola* می‌تواند نقش اصلی را در مکانیسم‌های مرتبط با مقاومت در گندم داشته باشد. *کوهن* و *ایال* (Cohen *and* Eyal, 1993)، حدس زدند که فعالیت زودهنگام مکانیسم‌های دفاعی در رقم مقاوم از رشد هیف‌های قارچ در منفذ زیر روزنه جلوگیری کرده و باعث پایین ماندن بیومس قارچی می‌شود و این به‌دلیل تفاوت در زمان بیان ژن‌های موثر در مقاومت در رقم حساس و مقاوم می‌باشد.

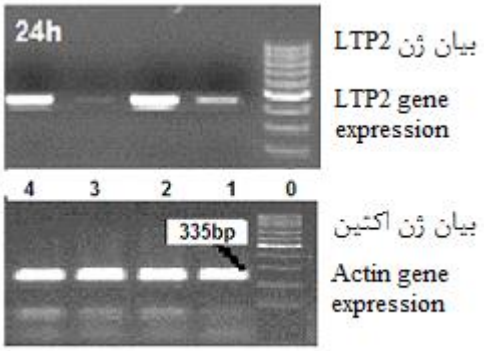
در مطالعه‌ای دیگر که به‌وسیله *آدهیکاری* و همکاران، 2007) بر روی بیان ژن‌های کاندید (۱۴ ژن) در مقاومت به سپتوریا روی ارقام حساس و مقاوم گندم انجام شد معلوم گردیدکه بیان این ژن‌ها در ارقام مقاوم و حساس در زمان‌های مختلف متفاوت است، گروهی تظاهر زودهنگام دارند و در ۲۴ ساعت اول پس از آلودگی بیان می‌شوند. و گروهی از ژن‌ها در روزهای بعد (زمان رشد پاتوژن) باعث توسعه مقاومت می‌شوند. بنابراین نه تنها بیان بالای ژن در رقم مقاوم بلکه زمان القاء بیان ژن هم می‌تواند نقش موثری در ایجاد مقاومت داشته باشد هم‌چنین آنالیز الگوی بیان این ژن‌ها می‌تواند روشی صحیح و سریع برای تفکیک لاین‌ها و ارقام مقاوم از حساس باشد.

با توجه به القاء سریع این ژن در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس در مطالعه حاضر و تحقیقات مشابه می‌توان گفت این ژن می‌تواند با مقاومت علیه بعضی از بیماری‌ها در ارتباط باشد. در واقع افزایش بیان زودهنگام این ژن می‌تواند از طریق تجمع کوتین و واکس باعث تقویت دیواره سلولی گیاه به‌عنوان اولین سد دفاعی در برابر پاتوژن شود *چاسوت* و همکاران (Chassot *et al.*, 2007). هم‌چنین *کادر* و همکاران (1997) گزارش کردند که این پپتیدها می‌توانند از طریق تأثیر مستقیمی که بر روی غشاءهای سلولی دارند باعث ایجاد منافذ در غشاء و افزایش نفوذپذیری غشاء پلاسمایی قارچ شده و در نهایت از رشد پاتوژن جلوگیری کنند.

در روز دوم و سوم بیان این ژن در گیاه مقاوم کاهش می‌یابد ولی همچنان ادامه دارد. این امر را می‌توان به نقش بسیار وسیعی که این پروتئین‌ها در انواع فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارند نسبت داد، هم‌چنین ادامه بیان این ژن در روز ششم باعث تداوم مقاومت گیاه به بیماری و نفوذ قارچ می‌شود (*آدهیکاری* و همکاران، 2007).

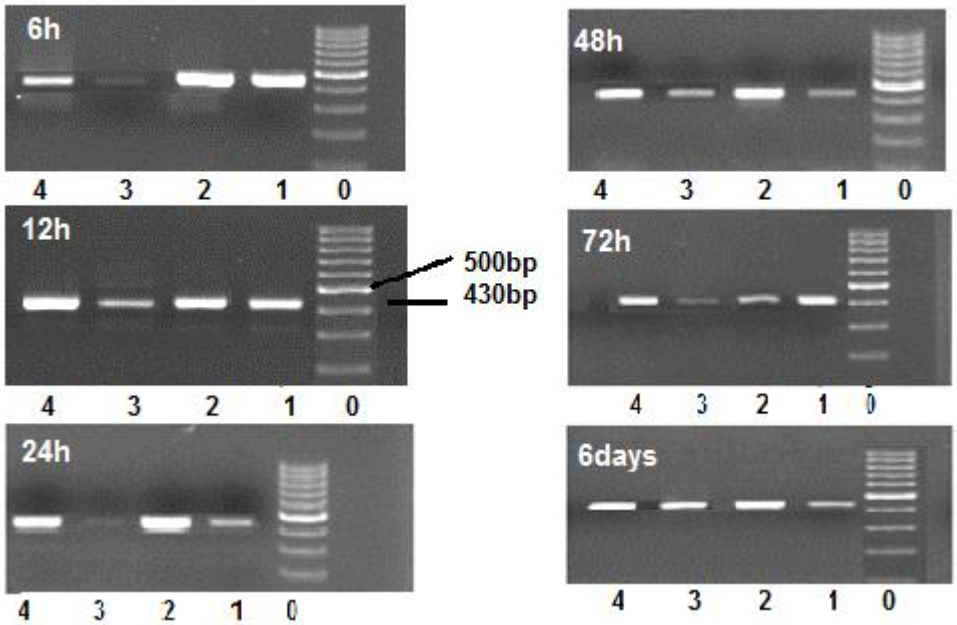
در مطالعات دیگر نیز افزایش بیان زودهنگام ژن *LTP2* در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس گزارش شده است ازجمله در مطالعه‌ای که توسط *لی* و همکاران (Li *et al.*, 2006)، بر روی بیان ژن *LTP* (با استفاده از روش RT-PCR نیمه‌کمی) در گندم در طی آلودگی با بیماری سفیدک پودری انجام شد نیز مشخص گردید که بیان این ژن، در رقم مقاوم سریعاً و در سه ساعت پس از آلودگی افزایش می‌یابد درحالی‌که در رقم حساس افزایش بیان قابل توجهی مشاهده نشده است. هم‌چنین مطابق نتایج *لو* و همکاران (Lu *et al.*, 2005) نیز مشخص شد که ژن *LTP* در اثر آلودگی با قارچ *Tilletia tritici* در هر دو رقم مقاوم (Bw553) و حساس (Nee pawa) در فاصله زمانی ۱۶ تا ۳۲ روز پس از آلودگی افزایش می‌یابد ولی میزان آن در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس می‌باشد. افزایش بیان سریع این ژن در گیاهان دیگر ازجمله برنج نیز تأیید شده است. در مطالعه‌ای که توسط *گایدردونی* و همکاران (Guiderdoni *et al.*, 2002) بر روی بیان ژن *LTPC1* در طی آلودگی با قارچ *Magnaporth grisea* انجام شد مشخص گردید که این ژن

سریعاً طی یک روز پس از آلودگی در رقم مقاوم افزایش می‌یابد و در طی مطالعه‌ای دیگری که توسط کیم و همکاران (Kim *et al.*, 2006) بر روی بیان این ژن در اثر آلودگی با قارچ *Magnaporth grisea* انجام شد القاء سریع‌تر این ژن در هشت ساعت پس از آلودگی به اثبات رسید.



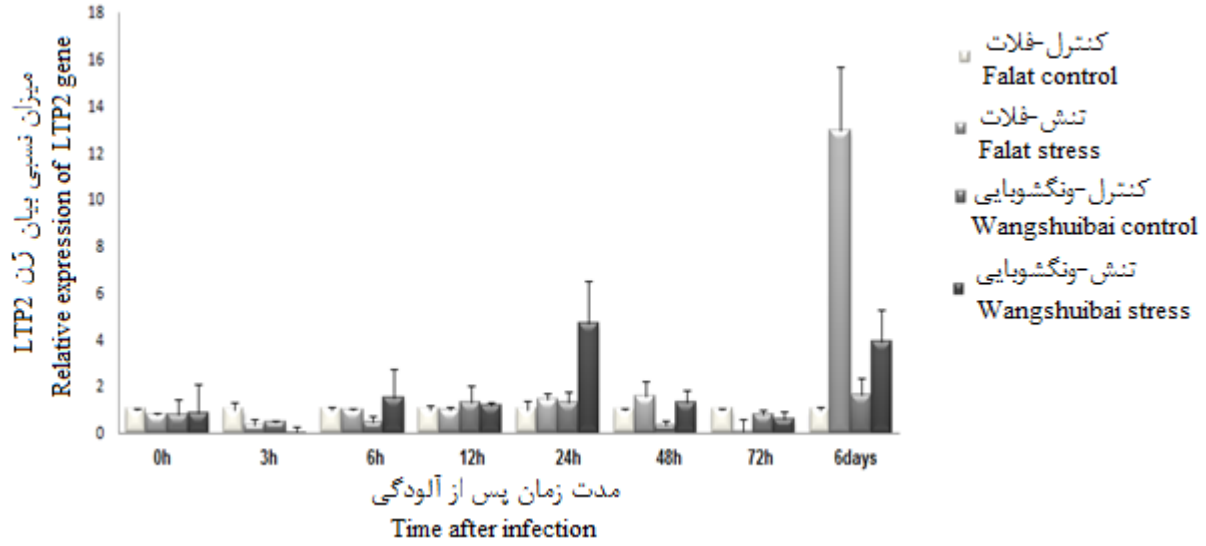
شکل ۳: مقایسه تظاهر ژن با روش RT-PCR نیمه‌کمی در برگ گندم. ژن اکتین به‌عنوان کنترل استفاده شد. و با مقایسه باند ناشی از بیان هر ژن با باند مربوط به ژن اکتین همان نمونه با استفاده از نرم‌افزار Image J (Image J software; *راسبند*، 2011) میزان بیان سنجیده می‌شود

Fig. 3: Comparison of expression in leaves of wheat by using semi-quantitative RT-PCR. *Actin* gene used as a comparative control by ImageJ software; Rasband, 2011



شکل ۴: RT-PCR نیمه‌کمی تظاهر ژن *LTP2* در زمان شش، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و شش روز پس از آلودگی در برگ گندم. باند ۱: کنترل فلات ۲: تنش فلات ۳: کنترل ونگشوبای ۴: تنش ونگشوبای

Fig. 4: Semi-quantitative RT-PCR of *LTP2* gene expression at 6, 12, 24, 48 and 72 hours and 6 days after inoculation in leaves of wheat. 1: Control in Falat 2: Stress in Falat 3: Control in Wangshuibai 4: Stress in Wangshuibai



شکل ۵: الگوی بیان ژن *LTP2* در دو رقم حساس (فلات) و مقاوم (ونگشوبای) در پاسخ به بیماری سپتوریوز برگی

Fig. 5: Pattern of *LTP2* gene expression in sensitive (Falat) and resistant (Wangshuibai) wheats in response to *Septoria tritici* blotch

tggctcgagt tttcagcaga ttggctcgca ctgcagctac taagctcgtg ctggtcgccc tggtggcggc aatgatcctc gcagcctccg acgcggccat cagctgcggc caggtgagct ctgccttgac cccctgcgtc gcctatgcga agggcagcgg gaccagcccg tctggggcct gctgcaacgg cgtcaggaaa ttggccggct tagcgcggag caccgccgacaagcaagcta catgcaggtg cctcaagagt gttgccggag ggctcaaccc caacaaggcc gcaggcattc cctccaagtg cggcgtcagc gtcccctaca cgatcagcgc atccgtggac tgctctaaga tccactgatc gatttctggc cgccatcatc gccgattata gttccagcga ttgatgctgagtacgttgag

شکل ۶: توالی ژن *LTP2*، رقم فلات، شماره دسترسی JQ621901

Fig. 6: Sequence of *LTP2*, Falat cultivar, accession: JQ621901

Falat 1 LARTAATKLVLVALVAAMILAASDAAISCGQVSSALTPCVAYAKGSGTSPSGACCNGVRK 60
T. aestivum 1 MARTAATKLVLVALVAAMILAASDAAISCGQVSSALTPCVAYAKGSGTSPSGACC+GVRK 60
H. vulgar 1 MARAAASQLVLVALVAAMLLVAADAAISCGQVSSALSPCISYARGNGAKPPAACCSGVKR 60
O. sativa 1 MARAGHNKYVARVMVVALLLAAR-APVTCGQVVSTWAPCIMYADGEGVAPTGGCCDGVRT 59
S. cereal 1 MARTAAIKLVLVTLLAALLLMASDAAISCGQVNSALGPCISYARGSGANTSAACCSGVKR 60
Z. mays 14SEAAISCGQVASAIAPCISYARGQGSGPSAGCCSGVRS 37
S. bicolor 23SEAAISCGQVSSAIALCLSYARGQGFAPSAGCCSGVRS 61

Falat 61 LAGLARSTADKQATCRCLKSVAGGLNPNKAAGIPSKCGVSVPYTISASVDCSKIH 115
T. aestivum 61 LAGLARSTADKQATCRCLKSVAGGLNPNKAAGIPSKCGVSVPYTISASVDCSKIH 115
H. vulgar 61 LAGAAQSTADKQAACKCIKSAAGGLNAGKAAGIPSMCGVSVPYAISASVDCSKIR 115
O. sativa 60 LNSAAATTADRQTTCACLKQQTKAMGRLRPDHVAGICGVNIPYAISPSTDCSRVH 117
S. cereal 61 LAGSVRTSDDKKAACLCIKRAAGGLNPGKAADIPTKCRVTIPYKISSNVNCNNLH 115
Z. mays 38 LNNAARTTADRRAACNCLKNAAAGLNAGNAASIPSKCGVSIPYTISTSTDCSRVN 103
S. bicolor 62 LNSAARTTADRRAACNCLKNAASGLNAGNAASIPSKCGVSVPYTISTSTDCSRV 117

شکل ۷: نتیجه بلاست پروتئینی پروتئین LTP2 درگندم رقم فلات و شباهت آن با دیگر گیاهان

Fig. 7: Protein BLAST results showing homology between LTP2 protein in Flat cultivar and some of plants

در این تحقیق پس از بررسی و تأیید افزایش بیان ژن *LTP2*، قطعه تکثیر شده به‌وسیله جفت پرایمر داخل پلاسمید کلون شد و پس از توالی‌یابی با استفاده از سایت NCBI بلاست نوکلئوتیدی انجام گرفت. توالی ژن کلون‌شده در شکل ۶ آورده شده است. شباهت توالی ژن *LTP2* در هر دو رقم فلات و ونگشوبای با توالی ژن‌های *LTP2* (AF334185.1)، *ltp9.5b* (AJ852557.1)، *LTP1* (AY566607.1)، *LTP4* (AY789644.1) گزارش شده برای گندم مورد تأیید قرار گرفت. میزان شباهت در رقم فلات و ونگشوبای برای دو ژن *LTP2* و *ltp9.5b* ۹۶ درصد، برای ژن *LTP1* به‌ترتیب ۹۶٪ و ۹۵٪ و برای ژن *LTP4* به‌ترتیب ۹۴٪ و ۷۹٪ بود. هم‌چنین این توالی با توالی ژن *LTP* در جو با شماره دسترسی (U18127.1) برای هر دو رقم به میزان ۹۳٪ شباهت نشان داد. میزان شباهت توالی دو رقم فلات و ونگشوبایی ۹۰/۹٪ بود. توالی این ژن برای رقم فلات در بانک ژن NCBI با شماره دسترسی JQ621901 ثبت گردید.

بررسی بلاست پروتئینی این توالی نشان داد که این توالی دارای هشت سیستئین ثابت موجود در همه پروتئین‌های انتقال‌دهنده چربی می‌باشد. پروتئین‌های انتقال‌دهنده چربی در حدود نه کیلودالتون وزن داشته و دارای ۹۰ تا ۹۵ اسیدآمینه می‌باشند. توالی این پپتیدها در گیاهان مختلف متفاوت است ولی در همه آن‌ها هشت سیستئین به‌صورت ثابت وجود دارد که تشکیل چهار پل دی‌سولفیدی را می‌دهد. بررسی ساختار سه بعدی این پروتئین‌ها که در پایگاه داده‌ای Expasy ثبت شده‌است، نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها دارای چهار مارپیچ آلفا و یک ناحیه انتهایی C می‌باشند. هم‌چنین این پپتیدها یک حفره تونل مانند درونی دارند که برای انتقال مولکول‌های لیپید لازم می‌باشد. تشکیل چهار پل دی‌سولفید برای تاخوردگی و ایجاد ساختار سه بعدی این پروتئین‌ها ضروری است و منجر به باند شدن لیپیدها و دیگر خصوصیات این پپتیدها از قبیل فعالیت ضدمیکروبی می‌شود (*کاروالهو* و همکاران، 2007). در شکل ۷ نتایج بلاست پروتئینی و هشت سیستئین ثابت و حفاظت شده آورده شده است.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۸-۹ متن انگلیسی مراجعه شود.