

## بررسی الگوی بیان ژن‌های کیتیناز و بتا-۳ و گلوکاناز در گیاه نخود آلوده به بیماری برق‌زدگی

رحیم افضل<sup>۱\*</sup>، سیدحسین مرعشی<sup>۲</sup>، نسرین مشتاقی<sup>۳</sup> و حمیدرضا کاووسی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و په‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۲- عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی و په‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی و په‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی و گروه بقولات پژوهشکده علوم گیاهی

دانشگاه فردوسی مشهد

۴- عضو هیئت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۵

### چکیده

القای مقاومت نسبت به پاتوژن‌ها از راهکارهایی است که گیاهان برای مقابله با تنش‌های زیستی به‌کار می‌برند. آنزیم‌های کیتیناز و بتا-۳ و گلوکاناز جزء پروتئین‌های قابل‌القاء هستند که در پاسخ به عوامل بیماری‌زا توسط گیاه، سنتز می‌شوند. در این تحقیق، بیان ژن ایزوفرم‌های اسیدی و بازی این دو آنزیم در سطح مولکولی در گیاه نخود زراعی مورد مطالعه قرار گرفت. به این ترتیب که سطح تظاهر ژن‌های مذکور در نمونه‌های تیمار شده و شاهد، در ژنوتیپ نخود حساس MCC403 و ژنوتیپ مقاوم MCC496 نسبت به آلودگی با نژاد شیش قارچ زدگی (*Ascochyta rabiei*) در ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی با استفاده از روش ارزیابی نیمه کمی RT-PCR بررسی شد. نتایج حاکی از افزایش بیان ایزوفرم اسیدی هر دو ژن کیتیناز و بتا-۳ و گلوکاناز پس از آلودگی بود. هر دو ژن مذکور در ۲۴ ساعت اولیه پس از تلقیح، حداکثر بیان را در ژنوتیپ مقاوم نشان دادند. این در حالی است که در ژنوتیپ حساس در ساعات اولیه بعد از آلودگی، تظاهر دو ایزوفرم اسیدی به حداکثر می‌رسد و تا ۷۲ ساعت بعد از آلودگی، سطح بیان در هر دو ژنوتیپ به کمترین سطح تظاهر می‌رسد. ایزوفرم بازی کیتیناز در ژنوتیپ حساس به‌میزان بیشتری بیان شد و ایزوفرم بازی بتا-۳ و گلوکاناز تظاهر پیدا نکرد. در کل، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً ایزوفرم‌های اسیدی ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در اعطای مقاومت در برابر بیماری برق‌زدگی نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: بتا-۳ و گلوکاناز، برق‌زدگی نخود، پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن، کیتیناز، RT-PCR

### مقدمه

بیماری برق‌زدگی نخود یکی از مهم‌ترین بیماری‌های شایع نخود زراعی (*Cicer arietinum*) است که عامل آن قارچ *Ascochyta rabiei* (Pass) Labrnssse می‌باشد (Maden et al., 1975). این قارچ به اندام‌های هوایی گیاه حمله می‌کند و موجب خسارت شدید به‌خصوص در هوای خنک و بارندگی زیاد در طی فصل رشد می‌گردد (Yonesi, 2003). در حال حاضر این بیماری به‌عنوان مهم‌ترین عامل محدودکننده کشت زمستانه نخود مطرح است (Shokouhifar et al., 2006). این بیماری یکی از مهم‌ترین تنش‌های زیستی است که باعث کاهش عملکرد این گیاه در ایران شده است. بهبود مقاومت ژرم‌پلاسما گیاهی، راهکار مناسبی برای مقابله با بیماری‌های گیاهی است (Kavousi et al., 2009). گیاهان در پاسخ به حمله پاتوژن‌ها مکانیسم‌های دفاعی پیچیده‌ای را فعال می‌کنند

که باعث مقاومت گیاه نسبت به پاتوژن می‌شود. واکنش فوق حساسیت، تجمع موضعی فیتوالکسین‌ها، ساخت دیواره سلولی ضخیم از سلولز، پکتین، لیگنین و فعال‌سازی مسیر فنیل پروپانویید از جمله این مکانیسم‌ها می‌باشند (Kavousi et al., 2009). در تعداد زیادی از گیاهان، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی<sup>۱</sup> را به‌عنوان پروتئین‌هایی که بعد از آلودگی گیاهان با پاتوژن‌های مختلف تجمع می‌یابند، می‌شناسند (Bol et al., 1990). این پروتئین‌ها القاء‌پذیر می‌باشند و در طول حمله پاتوژن‌ها و یا شرایط تنش‌زای مشابه، القاء می‌شوند و فعالیت ضدقارچی دارند. به‌علاوه، اکثر این پروتئین‌ها دارای مجموعه‌ای از خصوصیات مشترک می‌باشند که می‌توان به وزن مولکولی پایین، مقاومت به پروتازها و پایداری در بافرهای با pH پایین اشاره کرد (Van Loon et al., 1999). PR پروتئین‌ها بر اساس تشابه اسیدهای آمینه، روابط سرولوژیک و یا فعالیت‌های آنزیمی بیولوژیکی، به ۱۷ خانواده طبقه‌بندی می‌شوند

\* نویسنده مسئول: استان اردبیل، شهرستان گرمی، بخش انگوت، روستای قباله

همراه: ۰۹۱۴۹۵۵۶۲۴۶، تلفن: ۰۴۵۲۶۳۸۳۲۰۴، afzal64rahim@gmail.com

<sup>1</sup> Pathogen related proteins

گردید. سطح بذور، قبل از کشت توسط هیپوکلریت سدیم ۲درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی شد. بذور پس از شستشو با آب مقطر، برای رشد به پتری دیش انتقال داده شدند. بعد از ۳۶ ساعت رشد، بذور جوانه زده، در گلدان‌هایی به قطر ۲۰ سانتی متر حاوی مخلوط خاک، ماسه و کود دامی (به ترتیب با غلظت‌های ۳:۱:۰) در عمق ۲/۵ سانتی متری کاشته شدند. در هر گلدان، پنج بذر کشت گردید. این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار انجام شد. برای این منظور دو ژنوتیپ حساس و مقاوم، در بازه‌های زمانی (۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی با قارچ) مورد مطالعه قرار گرفتند.

آماده‌سازی نمونه قارچ و تهیه سوسپانسیون اسپور: نژاد شماره ۶ قارچ *Ascochyta rabiei* در محیط کشت جامد عصاره نخود<sup>۱</sup> CDA کشت گردید و در شرایط دمایی ۱۸ درجه سانتی گراد و ۱۴ ساعت روشنایی نگهداری و پس از ۷ تا ۱۰ روز، ۵/۰ سانتی متر مربع از نمونه قارچ برای تولید اسپور به داخل ویال حاوی محیط کشت مایع<sup>۲</sup> CDB منتقل شدند. بعد از سه روز، اسپورها آماده تکثیر می‌باشند و تا شش روز بعد نیز اسپورها توانایی بیماری‌زایی دارند. در این مرحله، سوسپانسیون محیط کشت از پارچه ملامل دولایه عبور داده شد و غلظت محلول عبوری با استفاده از لام گلبول شمار به غلظت  $10^6 \times 1/2$  اسپور در هر میلی‌لیتر رسانده شد.

تلقیح گیاهان نخود: سوسپانسیون اسپور با آب‌پاش‌های پلاستیکی به طور یکنواخت بر روی گیاهچه‌های ۱۴ روزه نخود اسپری شد. عمل اسپری تا مرحله ریزش اولین قطره از سطح برگ ادامه یافت و گلدان‌ها به مدت ۵ روز در زیر پلاستیک به منظور حفظ رطوبت تا ۹۰ درصد نگهداری شدند و روزانه سه تا پنج بار آب‌پاشی در زیر پلاستیک انجام شد و پس از آن پوشش پلاستیکی به تدریج برداشته شد و رطوبت گلخانه در سطح ۷۰ درصد تنظیم گردید.

استخراج RNA و ساخت cDNA: RNA کل از برگ‌های گیاهان در بازه‌های زمانی ۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی قارچی با استفاده از کیت RNX<sup>TM</sup> plus (شرکت سیناژن، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت تولیدکننده استخراج شد. قبل از استخراج RNA نمونه‌های برگ و ساقه گیاهان هر تیمار باهم مخلوط شدند. RNA کل استخراج شده (۳۰ میکروگرم برای هر واکنش) با استفاده از آنزیم DNaseI (Fermentas, USA) تیمار شد تا DNA ژنومی حذف شود و با استفاده از نانودراپ غلظت نمونه‌های

(Gorjanovic, 2009) PR پروتئین‌ها بسته به نقطه ایزوالکتریک خود به دو ایزوفرم اسیدی یا بازی تقسیم‌بندی می‌شوند. نوع اسیدی غالباً در فضاهای آپوپلاستی تجمع می‌یابد و نوع بازی عمدتاً در درون سلول و در درون واکوئل قرار دارد (Van Loon, 1997). در مکانیسم دفاعی گیاهان، دو خانواده PR-2 و PR-3 نقش مهمی در مقاومت گیاهان به بیماری‌های قارچی دارند. خانواده PR-2 عمدتاً شامل  $\beta$ -۱ و ۳- گلوکاناز می‌باشند و توانایی هیدرولیز پلیمرهای گلوکوزیدی را که واحدهای آن با پیوند بتا ۱ و ۳ گلوکان به یکدیگر متصل شده‌اند، دارند (Simmons, 1994). خانواده PR-3 نیز در بردارنده کیتینازها می‌باشند که پیوندهای گلیکوزیدی کیتین را به واحدهای مونومری، می‌شکنند. کیتین و گلوکان جزء تشکیل‌دهنده دیواره سلولی بسیاری از پاتوژن‌های قارچی می‌باشند (Saikia et al., 2005). در بسیاری از گیاهان در پاسخ به آلودگی، فعالیت این دو آنزیم، القاء شده و باعث ایجاد مقاومت می‌شود. کیتینازها و گلوکانازها در تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها با یکدیگر همکاری دارند (Saikia et al., 2005). در مطالعات انجام‌شده در مورد بیان این ژن، نشان داده شد که بیان آن‌ها بعد از آلودگی به پاتوژن، چندین برابر افزایش می‌یابد. به عنوان مثال، در تحقیقی که بر روی تنباکوی آلوده‌شده به باکتری *Pseudomonas syringae* pv *syringae* انجام شد، تعداد نسخه‌های آنزیم بتا-۱ و ۳ گلوکاناز تا ۲۱ برابر افزایش یافت (Alonso et al., 1995). واریته‌های سویای مقاوم به *Meloidogyne incognita* نیز القای بیان ژن کیتیناز را به میزان سه تا چهار برابر نشان دادند (Cao et al., 1997).

در مطالعه حاضر، تغییرات الگوی بیان ژن ایزوفرم‌های اسیدی و بازی ژن‌های کیتیناز و بتا-۱ و ۳ گلوکاناز در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با قارچ بیماری‌برق‌زدگی در دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به بیماری‌برق‌زدگی در نخود به روش RT-PCR نیمه‌کمی بررسی شد تا واکنش گیاه به آلودگی قارچی در سطح نسخه‌برداری، مورد ارزیابی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: این تحقیق در سال ۱۳۸۹ در گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. در این تحقیق، از دو ژنوتیپ نخود مقاوم MCC496 و حساس MCC402 به بیماری‌برق‌زدگی نخود (Shokouhifar et al., 2006) استفاده شد. بذرها از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه

<sup>1</sup> Chickpea Dextrose Agar

<sup>2</sup> Chickpea Dextrose Broth

نمونه‌ها قرار داد. بدین منظور از متوازن کردن باند یوبی کوئیتین استفاده شد. واکنش‌های مکرر PCR برای تکثیر قطعه‌ای از cDNA کدکننده پروتئین عمومی یوبی کوئیتین همراه با رقیق‌سازی مکرر cDNA در هر نمونه در هر سری PCR انجام گرفت. در نهایت، غلظت‌هایی از استوک‌های cDNA ایجاد شد که در صورت وارد نمودن مقادیر مساوی از cDNA یوبی کوئیتین همه به واکنش‌های PCR، باند تکثیرشده یوبی کوئیتین همه نمونه‌ها از غلظت چشمی یکسانی برخوردار گردیدند. آغازگرهایی براساس توالی ژن‌های اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار (Primer Permier V5.0) طراحی شد که در جدول ۱ آورده شده است. در ادامه برای کمی کردن باندهای روی ژل و شاخص‌بندی شدت باندهای DNA تکثیرشده ژن‌ها، از نرم‌افزار Lab Work (version 3.0.2) استفاده گردید.

RNA با یکدیگر یکسان شدند و سپس RNA‌های با غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میکرولیتر برای ساخت cDNA با استفاده از کیست cDNA سنتتاز (Fermentas, USA) مطابق دستورالعمل شرکت تولیدکننده، مورد استفاده قرار گرفت. cDNA سنتز شده در ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین برای اطمینان، نمونه‌های RNA کل به‌عنوان الگو برای تکثیر ژن یوبی کوئیتین استفاده شدند. تکثیر نشدن ژن یوبی کوئیتین، تأییدکننده عدم آلودگی RNA کل با cDNA ژنومی در نمونه‌های مورد مطالعه بود. بررسی نیمه کمی RT-PCR: برای بررسی نیمه کمی سطوح بیان ژن‌های مورد نظر، ابتدا یک مرحله متوازن کردن مقدار cDNA وارد شده به واکنش‌های PCR انجام گرفت تا بتوان شدت باند تکثیرشده در هر واکنش را ملاک مقایسه بین

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن‌های اختصاصی کیتیناز و گلوکاناز و ژن خانگی یوبی کوئیتین

Table 1. The sequence of gene-specific chitinase and glucanase primers and Ubiquitin house keeping

آغازگرهای اختصاصی gene-specific primers	آغازگرهای رفت Forward primers	آغازگرهای برگشت Reverse primers
<i>Basic chitinase</i>	5'-ACAAGCTGGTGGTGC GTTGT-3'	5'-TACCAGCCGCACGATCAGAA-3'
<i>Basic glucanase</i>	5'-GGTGGCTCTTCTGGCTTGC-3	5'-CCGTAGTTGCATTGAAGTCATCG-3
<i>Acidic chitinase</i>	5'-TGCTGGCCATTGTGATCCAT-3	5'-GCATCAGAAGCAGGCACACC-3
<i>Acidic glucanase</i>	5'-GGTGACAATCTGTTGGTGT-3	5'-ACCACTGCGACGCTCGCTAA-3
<i>Ubiquitin</i>	5'-CGACAACGTCAAGGCGAAGAT-3	5'-CCAAAGCCACGGCACAAAGTT-3

نمونه متفاوت به هر واکنش PCR وارد شده است (Zolala et al., 2008).

مقایسه نیمه کمی بیان ژن‌ها: در صورتی که مقادیر مساوی از cDNA کل نمونه‌های مختلف به واکنش‌های مقایسه‌ای PCR برای تکثیر قطعه‌ای از cDNA ژن مورد نظر وارد شود، می‌توان غلظت باندهای تکثیرشده در هر نمونه را به‌عنوان شاخص میزان بیان ژن مورد مطالعه در نظر گرفت. نمونه‌هایی که باند تکثیرشده قوی‌تری را نشان دهند، سهم نسبی cDNA مورد نظر در cDNA کل آنها بیشتر است که این تناسب را به‌طور مستقیم می‌توان به غلظت mRNA نسبت داد (Salzer et al., 2000). پس از همسانه‌سازی غلظت cDNA کل در نمونه‌ها بر اساس غلظت یوبی کوئیتین و همچنین طی مرحله بهینه‌سازی تعداد چرخه‌های مناسب واکنش PCR برای سنجش کمی و نسبی، تعداد ۲۴ چرخه برای ایزوفرم‌های اسیدی بتا ۳ و ۱ گلوکاناز و ۲۸ چرخه برای ایزوفرم‌های کیتیناز و ۲۴ چرخه برای ژن کیتیناز اسیدی انتخاب شد.

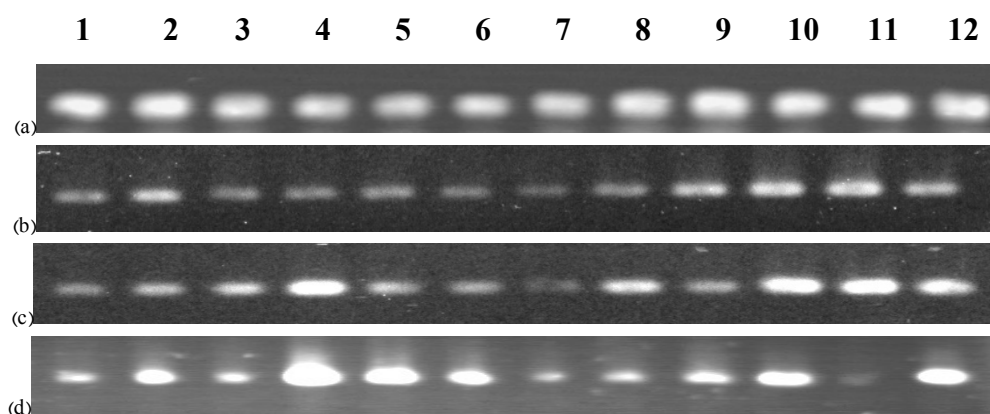
## نتایج و بحث

استخراج RNA: پس از استخراج RNA کل از ۱۲ نمونه گیاهی و مشاهده دو باند قوی 18S و 28S ریبوزومی که نشان‌دهنده کیفیت خوب RNA‌های استخراج شده بود، cDNA هر یک از نمونه‌ها پس از موازنه cDNA استاندارد یوبی کوئیتین ساخته شد.

موازنه باند cDNA استاندارد یوبی کوئیتین: شکل ۱- a، باندهای یوبی کوئیتین تکثیر یافته در واکنش‌های PCR با مقادیر مساوی از غلظت‌های نهایی cDNA همه نمونه‌ها را نشان می‌دهد که پس از ۲۸ چرخه PCR، توازن مقداری آنها مشاهده می‌شود. پروتئین یوبی کوئیتین به‌عنوان یک پروتئین خانگی در سلول‌های گیاهی شناخته شده است که mRNA می‌کدکننده آن در تمام بافت‌ها و اندام‌های مختلف، تقریباً به یک اندازه نسخه‌برداری می‌شوند. بعد از استاندارد کردن غلظت cDNA، با وارد کردن غلظت‌های cDNA نمونه‌های مختلف به واکنش‌های PCR، در حقیقت مقادیر یکسانی از cDNA از

بعد از آلودگی، مقدار آن به بیشترین میزان می‌رسد و بعد از این ساعت از شدت بیان کاسته می‌شود. در ژنوتیپ مقاوم، ۴۸ ساعت بعد از آلودگی، میزان بیان به‌طور چشمگیری افزایش پیدا می‌کند سپس کاهش چشمگیری در سطح تظاهر این ژن رخ می‌دهد. البته بیان این ژن در زمان صفر در دو ژنوتیپ نیز به مقدار کم مشاهده می‌شود.

بررسی بیان ایزوفرم اسیدی ژن کیتیناز: نتایج اندازه‌گیری بیان نیمه کمی ایزوفرم اسیدی ژن کیتیناز (شکل ۲- b) مبین غلظت متفاوت mRNA کیتیناز اسیدی در دو ژنوتیپ MCC496 و MCC403، بعد از آلودگی می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ در ساعات بعد از آلودگی روند عکس هم دارند. در ژنوتیپ حساس در ساعات اولیه، بیشترین میزان بیان ژن مشاهده می‌شود و در ۶ ساعت



شکل ۱- a: یوبی کوئیتین یکسان شده در ۲۸ چرخه؛ b: ایزوفرم اسیدی ژن کیتیناز در ۲۴ چرخه؛ c: ایزوفرم اسیدی ژن بتا-۱ و ۳ گلوکاناز در ۲۴ چرخه؛ d: ایزوفرم بازی ژن کیتیناز در ۲۸ چرخه

چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، نشان‌دهنده بیان ژن‌ها در ژنوتیپ حساس (MCC403) به ترتیب در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی با قارچ، و چاهک‌های ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ نشان‌دهنده بیان ژن‌ها در ژنوتیپ مقاوم (MCC496) به ترتیب در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی با قارچ می‌باشند.

**Fig. 2. a: Equilibrated ubiquitin in 28 cycle; b: acidic isoform of chitinase in 24 cycle; c: acidic isoform of  $\beta$ -1,3-glucanase in 24 cycle; d: basic isoform of chitinase in 28 cycle**

Lanes 1-6 were load correspond to the expression level in sensitive genotype (MCC403) at times 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after infection with *A. rabiei* and Lanes 7-12 were load correspond to the expression level in resistant genotype (MCC496) at times 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after infection with *A. rabiei*

این ژن افزایش یافت اما مقدار آن در مقایسه با ژنوتیپ MCC403 کمتر بود. به نظر می‌رسد ایزوفرم بازی ژن کیتیناز، رابطه ای با مقاومت به بیماری برق‌زدگی نخود نداشته باشد.

بررسی بیان ایزوفرم بازی ژن بتا-۱ و ۳ گلوکاناز: با وجود این‌که حضور ایزوفرم بازی ژن بتا-۱ و ۳ گلوکاناز در DNA ژنومی نخود با PCR تأیید شد، ولی در هیچ‌کدام از نمونه‌های مورد مطالعه، این ژن بیانی را نشان نداد. (Pozo et al, 1999) در مطالعه‌ای بر روی گوجه‌فرنگی آلوده به *Phytophthora parasitica* مشاهده کردند که ایزوفرم بازی بتا-۱ و ۳ گلوکاناز به مقدار اندکی در نمونه شاهد بیان شده است.

تجزیه و تحلیل بیان این ژن‌ها نشان می‌دهد که دو ژنوتیپ MCC496 و MCC403 پاسخ‌های متفاوتی را نسبت به آلودگی قارچی نشان می‌دهند. ایزوفرم اسیدی ژن کیتیناز در ژنوتیپ MCC496 به میزان بیشتری القاء شده است

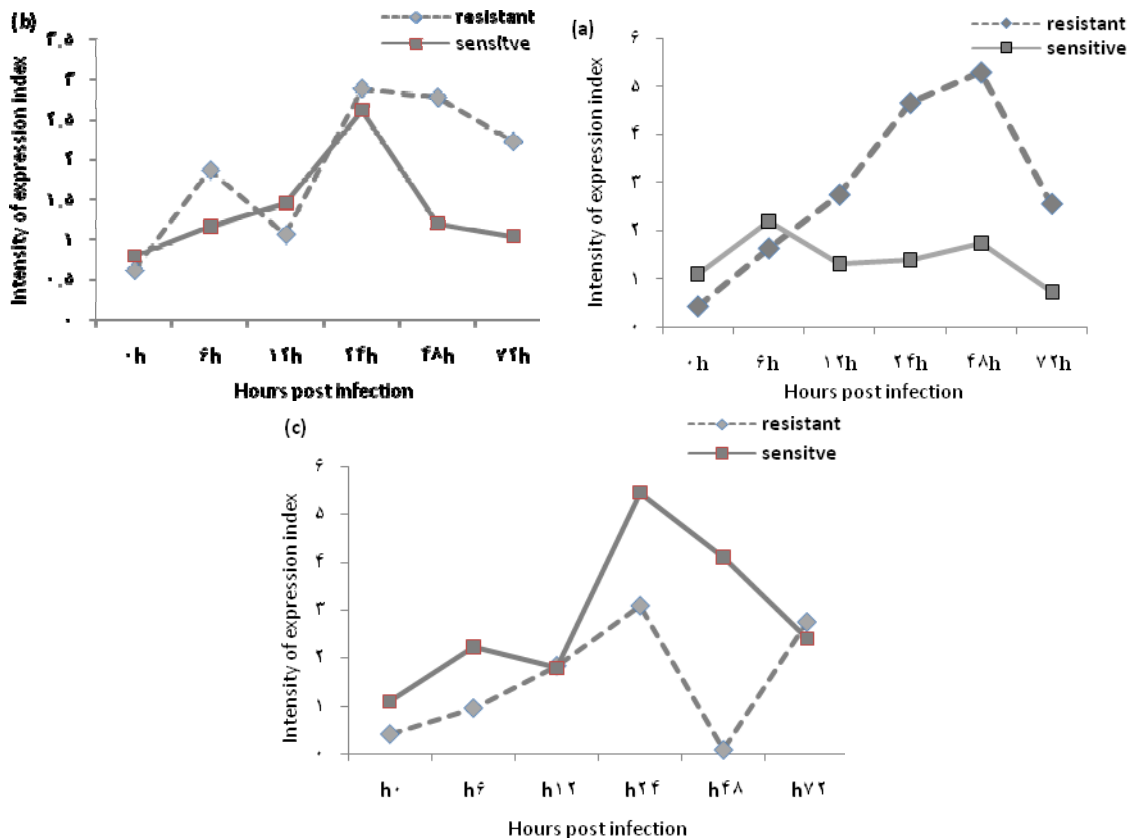
بررسی بیان ایزوفرم اسیدی ژن بتا-۱ و ۳ گلوکاناز: تغییرات بیان ژن بتا-۱ و ۳ گلوکاناز در دو ژنوتیپ MCC496 و MCC403 مشهود بود (شکل ۱- c). بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ، در ۲۴ ساعت پس از تلقیح به حداکثر مقدار خود می‌رسد و پس از آن، بیان این ژن تا ۷۲ ساعت بعد از آلودگی در ژنوتیپ مقاوم MCC496 در حد بالا ادامه می‌یابد؛ ولی در ژنوتیپ حساس MCC403، به تدریج از میزان نسخه‌های این ژن کاسته می‌شود. به نظر می‌رسد بیان این ژن در ژنوتیپ مقاوم روند بهتری نسبت به ژنوتیپ حساس دارد.

بررسی بیان ایزوفرم بازی ژن کیتیناز: بیان این ژن در دو ژنوتیپ مورد مطالعه روندی متفاوت داشت و در ژنوتیپ MCC403 بیان این ژن بیشتر از ژنوتیپ MCC496 بود (شکل ۱- d). در ژنوتیپ MCC403، ۲۴ ساعت بعد از آلودگی بیان ایزوفرم بازی ژن کیتیناز به بیشترین مقدار خود رسید و به تدریج از میزان آن کاسته شد اما در ژنوتیپ MCC496 بیان

ژنوتیپ حساس MCC403 است. این ژن هم احتمالاً در مکانیسم مقاومت به بیماری نقش دارد. با توجه به این که ایزوفرم بازی ژن کیتیناز که در ژنوتیپ حساس MCC403 بیشتر از ژنوتیپ مقاوم MCC496 بیان شده (شکل ۲- c) و عدم بیان ژن بتا ۱ و ۳-گلوکاناز بازی در هیچ کدام از آنها، احتمالاً این دو ژن تأثیری در مقاومت گیاه نخود به بیماری برقرزگی نخود ندارند.

با توجه به بیان بالای ژن‌های مورد مطالعه در ژنوتیپ حساس MCC403 به نظر می‌رسد که این ژن‌ها شاخص مناسبی برای حساسیت نیستند.

(شکل ۲- a) و در ۴۸ ساعت اولیه، این ژن به حداکثر بیان خود رسید و در ۷۲ ساعت بعد از آلودگی کاهش یافت. میزان بیان ژن کیتیناز اسیدی در ژنوتیپ مقاوم MCC496 نسبت به ژنوتیپ حساس MCC403 تقریباً سه برابر شده است. با توجه به بیان این ژن در ژنوتیپ MCC403 که در حد پایینی می‌باشد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که احتمالاً این ژن در ایجاد مقاومت به برقرزگی نخود نقش دارد. الگوی بیان ایزوفرم اسیدی بتا ۱ و ۳-گلوکاناز نیز در ژنوتیپ MCC496 به بیشترین مقدار خود در ۲۴ ساعت بعد از آلوده کردن گیاه با قارچ، می‌رسد (شکل ۳- b) و در ادامه نیز این روند مقدار بالای بیان را حفظ می‌کند و مقدار بیان در ژنوتیپ مقاوم MCC496 بیشتر از



شکل ۲- الگوی بیان ژن‌های a: ایزوفرم اسیدی ژن کیتیناز؛ b: ایزوفرم اسیدی ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز؛ c: ایزوفرم بازی ژن کیتیناز

در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم نخود بعد از آلودگی با قارچ *A. rabiei*

Fig. 3. Gene expression patterns a: acidic isoform of chitinase; b: acidic isoform of  $\beta$ -1,3-glucanase; c: basic isoform of chitinase in sensitive and resistant chickpea genotype after infection by *A. rabiei*

حمله قرار گیرد، این ژن‌ها را تا حدی در خود بیان می‌کند. در مطالعه‌ای در نیشکر، مشاهده شده است که کیتینازها به‌طور دائمی حضور دارند و توسط محرک‌های زیستی و غیرزیستی (به‌طور سیستماتیکی القاء می‌شوند (Viswanathan *et al.*, 2001). در بررسی دیگری گزارش شد که فعالیت ژن

در مورد ژنوتیپ مقاوم MCC496 نیز باید گفت که چون دو ژن ایزوفرم اسیدی در این ژنوتیپ به‌طور معنی‌داری بیان شده‌اند، احتمالاً این ژنوتیپ یک ژنوتیپ مقاوم به بیماری برقرزگی نخود است. همچنین بیان این ژن‌ها در گیاه شاهد هم نشان می‌دهد که گیاه قبل از این که با پاتوژن قارچی مورد

محرک‌هایی از دیواره سلولی قارچ‌ها مکانیسم‌های دفاعی مختلفی را در گیاهان تحریک کنند (Ren *et al.*, 1992). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که قارچ *Ascochyta rabiei* باعث ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه نخود می‌شود. دو ژنوتیپ MCC496 و MCC403 پاسخ‌های متفاوتی را نسبت به آلودگی قارچی نشان دادند که این نشان از مناسب بودن این دو ژنوتیپ برای استفاده به‌عنوان ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به بیماری برق‌زدگی نخود می‌باشد، ولی بهتر است در مطالعات علاوه بر این دو ژنوتیپ، ژنوتیپ‌های کاملاً حساس و مقاوم به این بیماری نیز بررسی شود. با توجه به تفاوت میزان بیان ژن‌های ایزوفرم اسیدی بتا ۱،۳ گلوکاناز و کیتیناز در ژنوتیپ‌های MCC496 و MCC403، به‌نظر می‌رسد که ایزوفرم اسیدی هر دو ژن کیتیناز و گلوکاناز در ایجاد مقاومت به بیماری برق‌زدگی در ژنوتیپ مقاوم نقش داشته باشند و هر دو در سطح بالایی در ژنوتیپ مقاوم بیان شده‌اند. همچنین افزایش همزمان تعداد نسخه‌های ایزوفرم‌های اسیدی هر دو آنزیم در ژنوتیپ مقاوم، تأییدکننده فعالیت سینرژیستی این دو آنزیم در القای مقاومت می‌باشد.

کیتیناز III در رقم مقاوم نخود پس از تلقیح با *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cicer* افزایش می‌یابد (Sephri, 2009). تعداد نسخه‌های mRNA بتا-۱ و ۳ گلوکاناز اسیدی در برگ‌های گوجه‌فرنگی آلوده به پاتوژن قارچی *Cladosporium fulvum* نیز به‌مقدار زیادی تجمع پیدا کرده است که نشان‌دهنده نقش این ایزوآنزیم در مقابله با پاتوژن می‌باشد (Van Kan *et al.*, 1992). فعالیت ضدقارچی کیتیناز و بتا-۱ و ۳ گلوکاناز به‌وسیله محققان اثبات شد، به‌طوری‌که آنها پس از خالص‌سازی و قراردادن این پروتئین‌ها در محیط کشت حاوی پاتوژن‌های قارچی گیاهی مشاهده کردند که رشد این قارچ‌ها در نواحی که این پروتئین‌ها حضور دارند، محدود می‌شود که این دلیل خوبی برای تأثیر مستقیم این PR پروتئین‌ها بر روی پاتوژن‌ها می‌تواند باشد (Saikia *et al.*, 2005). تجمع PR پروتئین‌ها با مکانیسم SAR<sup>1</sup> در گیاهان مرتبط می‌باشد (Ryals *et al.*, 1996). کیتیناز و بتا-۱ و ۳ گلوکاناز علاوه بر هیدرولیز دیواره سلولی گلوکان و کیتین، توانایی این را هم دارند که با رهاسازی

#### منابع

- Alonso, E., De Carvalho Niebel, F., Obregon, P., Gheysen, G., Inzé, D., Van Montagu, M., and Castresana, C. 1995. Differential *in vitro* DNA binding activity to a promoter element of the *gn1*  $\beta$ -1, 3-*glucanase* gene in hypersensitively reacting tobacco plants. *Plant Journal* 7: 309-0320.
- Bol, J.F., Linthorst, H.J.M., and Cornelissen, B.J.C. 1990. Plant pathogenesis-related protein induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology* 28: 113-138.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X. 1997. The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88: 57-62.
- Gorjanovic, S. 2009. Biological and technological functions of barley seed pathogenesis-related protein (PRs). A review. *Journal of the Institute of Brewing* 115(4): 334-360.
- Kavousi, H.R., Marashi, H., Mozafari, J., and Bagheri, A.R. 2009. Expression of phenylpropanoid pathway genes in chickpea defense against race 3 of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology Journal* 8: 127-132.
- Maden, S., Mathur, D., and Neergaard, S.B. 1975. Detection and location of seed born inoculum of *Ascochyta rabiei* and its transmission in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Seed Science and Technology* 3: 667-681.
- Pozo, M., Azcon-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, E., and Barea, G.M. 1999.  $\beta$ -1,3 Glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science* 141: 149-157.
- Ren, Y.Y., and West, C.A. 1992. Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiology* 99: 1169-1178.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., and Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Saikia, R., Pratab Singh, B., Kumar, R., and Arora, K. 2005. Detection of pathogenesis-related proteins-chitinase and  $\beta$ -1,3-*glucanase* in induced chickpea. *Current Science* 89(4): 659-663.
- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Aeschbacher, R.A., and Boller, T. 2000. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. *Molecular Plant Microbe Interaction* 13: 763-777.

<sup>1</sup> Systemic-acquired-resistance

12. Sefhri, H., 2009. Gene Expression Profiling of Chitinase in Chickpea by Using Real-Time PCR. MSc. Thesis. Agriculture Faculty, University of Ferdowsi Mashhad. ( In Persian).
13. Shokouhifar, F., Bagheri, A.R., and Fallahati Rastegar, M. 2006. Identification of resistant chickpea lines against pathotypes causing *Ascochyta* blight disease in Iran. *Iranian Journal of Plant Biology* 19(1): 29-42. (In Persian).
14. Siddiqui, I.A., and Shaukat, S.S. 2004. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is Independent of Salicylic Acid Production. *Journal Phytopathology* 152: 48-54.
15. Simmons, C. 1994. The physiology and molecular biology of plant 1,3- $\beta$ -D-glucanases and 1,3; 1,4- $\beta$ -D-glucanases. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 325-387.
16. Van Kan, J.A.L., Joosten, M.H.A.J., and Wagemakers, C.A.M. 1992. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and a virulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Molecular Biology* 20: 513-527.
17. Van Loon, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related protein. *European Journal of Plant Pathology* 103: 753-765.
18. Van Loon, L.C., and Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related protein, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
19. Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., and Conejero, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related protein. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 245-264.
20. Viswanathan, R., and Samiyappan, R. 2001. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* Went causing red rot disease in sugarcane. *Microbiological Research* 155: 309-314.
21. Yonesi, H., Okhowat, S.M., and Hajarod, G. 2003. Virulence variability of *Ascochyta rabiei* isolates on chickpea cultivar sin Kermanshah province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 39: 213-228. (In Persian).
22. Zolala, J., Farsi, M., Moghaddam Matin, M., Bahrami, A.R., and Ghabooli, M. 2008. The comparison of *cel I* endonuclease gene expression in some Apiaceae plants using semi-quantitative RT-PCR. *Agricultural Sciences and Technology Journal* 1(22): 4-11. (In Persian).

## Gene expression profiling of chitinase and $\beta$ -1,3 glucanase in chickpea infected by *Ascochyta* blight

Afzal<sup>1\*</sup>, R., Marashi<sup>2</sup>, S.H., Moshtaghi<sup>3</sup>, N. & Kavousi<sup>4</sup>, H.R.

1. MSc. Student of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Contribution from Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture & Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
4. Department of Plant Breeding, College of Agriculture, Bahonar University of Kerman

Received: 23 February 2011

Accepted: 15 May 2014

### Abstract

Induced resistance to pathogen is one of the ways which plants use against biotic stresses. Pathogenesis-related proteins (PR), including chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase synthesized by the plant in response to pathogenic infection. In this investigation, the expression of two isoforms: acidic and basic of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes were analyzed at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after fungal inoculation of chickpea genotypes (MCC496 as resistant and MCC403 as sensitive) with race 6 of *Ascochyta rabiei* by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the expression of both acidic isoforms of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes were increased at 24 and 48 hours, respectively after fungal inoculation in genotype MCC496, but the expression level in sensitive genotype increased in early time after inoculation and then decreased. The basic isoform of chitinase was expressed in sensitive genotype more than the resistant genotype. The basic isoform of  $\beta$ -1,3-glucanase was not expressed in these genotypes. Totally, acidic isoforms of these enzymes specifically chitinase would play roles in plant defense against *Ascochyta blight*.

**Key words:** *Ascochyta* blight, Chitinase, Pathogenesis-related proteins, RT-PCR,  $\beta$ -1,3-glucanase

---

\* Corresponding Author: afzal64rahim@gmail.com, Mobile: 09149556246