

استفاده از روش‌های سری زمانی جهت پیش‌بینی بیان ژن‌های دفاعی گندم تلقیح شده با *Zymoseptoria tritici* و اسیدسالیسیلیک

جلال غلام‌نژاد^{۱*}، فروغ سنجریان^۲ و مسعود فهرستی ثانی^۳

۱- استادیاران دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران.

۲- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

*مسئول مکاتبه igholamnezhad@ardakan.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۲۰

چکیده

اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های دفاعی گیاهی روشی پرکاربرد و مفید برای بررسی مکانیسم مقاومت در گیاهان است، اما این روش در عین حال هزینه بر و زمان‌بر نیز می‌باشد. به منظور بررسی تأثیر اسیدسالیسیلیک بر تغییرات بیان بعضی از ژن‌های دفاعی درگیر در مقاومت (NADPH اکسیداز، اگزالات اکسیداز، پروتئین Stress responsive، گلوکاتایون S ترانسفراز و سوپراکسید دیسموتاز) گندم‌های تلقیح شده با بیمارگر *Z. tritici* به روش نوردن‌بلات معکوس بررسی شد. بر اساس اطلاعات به دست آمده از نوردن‌بلات معکوس جهت پیش‌بینی بیان ژن‌های درگیر در مقاومت از روش‌های میانگین متحرک ساده، میانگین متحرک وزنی و هموارسازی نمایی استفاده شد. در ۲۴ ساعت بعد از تلقیح بیمارگر در همه ژن‌های مورد بررسی و در هر دو تیمار میزان بیان به بیشترین مقدار خود رسید و علی‌رغم تفاوت در هر ژن، روند کلی افزایشی بود. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از روش هموارسازی نمایی، با توجه به محاسبه و مقایسه شاخص‌های قدرت پیش‌بینی، دارای دقت بالاتری نسبت به دو روش دیگر می‌باشد. میزان بیان در مورد سه ژن NADPH اکسیداز، گلوکاتایون S ترانسفراز و اگزالات اکسیداز روند مشابه داشتند، به عبارتی تا ۲۴ ساعت بعد از تلقیح بیمارگر، اسیدسالیسیلیک باعث افزایش شد و سپس میزان بیان روند کاهشی در پیش گرفت. بررسی بیان ژن روش بسیار حساسی است، و باید تحت شرایط کنترل شده باشد، و فقط تیمار مورد نظر محقق، تأثیرگذار بر روی بیان ژن در گیاه باشد، در این شرایط، پیشنهاد می‌شود اطلاعات بیان ژن‌ها در طی دوره‌هایی ابتدایی اندازه‌گیری شود، سپس با استفاده از این اطلاعات و روش‌های پیش‌بینی میزان بیان، برای زمان‌های بعدی مورد پیش‌بینی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، نوردن‌بلات معکوس، پیش‌بینی، گندم، *Zymoseptoria tritici*

مقدمه

بسیاری از مناطق دنیا توسط تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده متعدد محدود می‌گردد (Rezvani Moghaddam and Koocheki, 2001). گیاه گندم در طول کشت تا برداشت در معرض تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده مختلفی مانند بیماری‌ها و خشکی قرار می‌گیرد که رشد گیاه را محدود می‌کند. در گندم نیز مانند سایر گیاهان، مکانیسم‌های مختلفی برای سازش با این

گندم غذای اصلی حدود ۳۵ درصد جمعیت جهان را تشکیل داده و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۲۰، تقاضای جهانی برای این محصول بین ۸۴۰ تا ۱۰۵۰ میلیون تن باشد (Anders and Huber, 2010). برای رسیدن به این سطح تقاضا، تولید این محصول باید سالانه ۱/۶ تا ۲/۶ درصد افزایش پیدا کند. رشد و عملکرد گیاهان در

ارقام مقاوم و پر محصول محدود است (Eyal et al., 1987). در این راستا و به منظور شناسایی منابع مقاومت به بیماری سوختگی برگ گندم تحقیقات فراوانی در سراسر دنیا انجام گرفته که در این زمینه موفقیت‌هایی نیز حاصل شده و ارقام و لاین‌هایی با مقاومت بالا شناسایی شده اند (van Ginkel and Rajaram, 1999).

اسیدسالیسیلیک یک مولکول پیام‌دهنده طبیعی است که در پاسخ‌های دفاعی گیاهان علیه بیمارگرها نقش دارد. اسیدسالیسیلیک جزء مواد فنلی است که به صورت طبیعی در گیاهان وجود دارد و می‌تواند باعث القاء مقاومت سیستمیک در گیاهان شود (Kawano et al., 2004).

بررسی بیان ژن‌ها در زمان تنش و شناسایی ژن‌های دفاعی نسبت به بیمارگرها، بسیار ضروری است. نتایج این تحقیقات اطلاعات مرتبط به مکانیسم تحمل و مقاومت به بیمارگرها را افزایش داده و تولید ارقام متحمل از راه روش‌های زیست فناوری را هموارتر می‌سازد. روش‌های مختلفی جهت تجزیه پروفایل بیان ژن در گیاهان از جمله گندم وجود دارد.

نوردن بلات معکوس یکی از معمولترین این روش‌هاست که به عنوان رابط، اطلاعات توالی (ژنومیکس ساختاری) را به ژنومیکس عملکردی (تعیین عملکرد و نوع فعالیت) ارتباط می‌دهد (Rabbani et al., 2003).

ژن‌های دفاعی باعث سنتز آنزیم‌های دفاعی می‌شوند که آنزیم‌های تولیدی نقش بسیار مهمی را در فعالیت‌های دفاعی گیاه بر عهده دارند. بررسی بیان ژن‌ها در یک بازه زمانی، فعالیت‌های زیاد و همچنین هزینه‌های هنگفتی را می‌طلبد. با وجود اینکه هر روزه تکنیک‌های جدیدی برای بررسی بیان ژن به وجود می‌آید (مانند RNAseq) ولی همواره بررسی بیان ژن پروسه‌ای گران و هزینه بر است (Gholamnezhad, 2016). با

تغییرات جهت حفظ بقای گیاه تکامل یافته است که از آن جمله می‌توان به مکانیسم‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و تغییرات مولکولی اشاره کرد (Arraiano and Brown, 2007).

آفات و بیماری‌ها بسته به شرایط آب و هوایی یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای گندم است که همواره این گیاه را تحت تنش قرار می‌دهند (Gholamnejad et al., 2010). یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی که به گندم خسارت وارد می‌کند بیماری سوختگی برگ گندم با عامل *Mycosphaerella graminicola* می‌باشد (Goodwin, 2007). بیماری سوختگی برگ گندم یا سپتریوز گندم با فرم غیرجنسی *Zymoseptoria tritici* 2011 به دلیل کاشت ارقام مکزیک (ارقام اصلاح شده در سیمیت) حساس، نیمه پاکوتاه و زودرس به صورت تک‌کشتی و در سطح وسیع در اغلب نقاط دنیا خسارت وارد می‌کند. وقوع و بقا بیماری لکه برگی به شدت به شرایط محیطی بستگی دارد. کنترل این بیماری از طریق استفاده از قارچ‌کش، به کاربردن ارقام مقاوم و همچنین استفاده از روش‌های زراعی است. با توجه به عدم کارایی روش‌های زراعی در کنترل موثر بیماری، مقاومت جدایی‌های قارچ به سموم سیستمیک، هزینه‌ها و آلودگی ناشی از مصرف سموم شیمیایی، استفاده از ارقام مقاوم اقتصادی‌ترین، بهترین و از نظر زیست‌محیطی، سالم‌ترین روش مقابله با این بیماری است (Gholamnezhad et al., 2016c). در مورد این بیماری مانند سایر بیماری‌های گیاهی روش شیمیایی اولین و موثرترین روش مبارزه است، ولی با توجه به مقاومت عامل بیماری نسبت به سموم شیمیایی همواره استفاده از ارقام مقاوم به عنوان یک روش مورد بحث برای کنترل این بیماری مطرح بوده است (Adhikari et al., 2007). از طرفی اغلب ارقام تجاری به این بیماری حساس بوده و دسترسی به

² Reverse Northern blot

¹ CIMMYT

خاک گلدان (محتوی پرلیت، خاک سترون و خاکبرگ با نسبت ۱:۱:۱) کشت شدند. در هر گلدان سه بذر کاشته شد. گیاهچه‌ها در مرحلهٔ دوبرگی (۱۲ روزه‌گی) با سوسپانسیون جدایهٔ قارچ بیمارگر به روش Chartrain و همکاران (۲۰۰۴) تلقیح شدند. همزمان، این گیاهان با سالیسیلیک اسید در غلظت‌های (۰ و ۲ میلی مولار) محلول‌پاشی شدند. غلظت‌ها بر اساس مطالعه قبلی نگارندگان که در گلخانه با استفاده از همین رقم و عامل بیماری صورت گرفت، انتخاب شد (Gholamnezhad *et al.*, 2016a). گیاهان شاهد فقط با آب مقطر استریل تلقیح شدند. جهت بررسی پاسخ‌های اولیه و سریع گیاه، در زمان‌های صفر، سه، شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از مایه-زنی بیمارگر، نمونه‌برداری از برگ‌های گیاه گندم انجام گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در محل نمونه برداری به ظرف نیتروژن مایع منتقل و سپس در فریزر -۷۰ درجه- سانتی‌گراد آزمایشگاه ذخیره شدند (Gholamnezhad *et al.*, 2016b).

طراحی آغازگر برای ژن‌های منتخب

در این تحقیق بیان پنج ژن شامل اگزالات اکسیداز، NADPH اکسیداز، پروتئین Stress responsive، گلوکاتایون S ترانسفراز GST و سوپراکسید دیسموتاز مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی این ژن‌ها از بانک اطلاعاتی ژنوم (NCBI) به دست آمد و آغازگرهای اختصاصی طراحی شد (جدول ۱). از ژن آلفا توبولین نیز بعنوان ژن خانه دار (کنترل داخلی) استفاده شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA از بافت اندام‌های هوایی گندم با استفاده از کیت RNXplus (سیناژن، ایران) مطابق دستورالعمل انجام گرفت. ساخت cDNA نیز با استفاده از کیت Reverse Transcriptase (Thermo Scientific، آمریکا) انجام شد. با الگوی cDNA و آغازگرهای

توجه به این مطالب در صورتی که بتوان با استفاده از نرم‌افزارهای رایانه‌ای و همچنین روش‌های آماری میزان بیان ژن را در یک بازهٔ مورد نظر پیش‌بینی کرد، صرفه‌جویی زیادی در زمان و هزینه‌های این کار انجام می‌شود. در این مطالعه ابتدا بررسی بیان ژن‌های دفاعی در بازهٔ زمانی ۲۴ ساعت بعد از آلوده‌سازی انجام گرفت و سپس با استفاده از روش‌های سری زمانی پیش‌بینی میزان بیان ژن‌ها برای ۲۴ ساعت بعد، صورت گرفت.

دلیل نمونه‌برداری در این نقاط زمانی این است که گیاه با پاسخ سریع به بیمارگر از ایجاد بیماری جلوگیری می‌کند، و این پاسخ سریع با افزایش بیان ژن‌های مختلف درگیر در سیستم دفاعی میزبان صورت می‌گیرد. در صورت عدم توانایی گیاه به واکنش سریع با گذشت زمان بیمارگر غلبه کرده، در نتیجه گیاه بیمار می‌شود (Gholamnezhad *et al.*, 2016b).

هدف از این مطالعه ابتدا بررسی بیان ژن‌های درگیر در مقاومت گیاه گندم به بیماری سوختگی برگ در شرایط وجود و عدم وجود اسید سالیسیلیک در ۲۴ ساعت ابتدایی بعد از تلقیح بیمارگر است. سپس با استفاده از اطلاعات بیان ژن‌ها، به کمک استفاده از روش‌های روش میانگین متحرک ساده (اس‌ام‌ای)، روش میانگین متحرک وزنی (اس‌ام‌ای) و روش هموارسازی نمائی منفرد (اس‌ای اس) میزان بیان این ژن‌ها در ساعات بعد از تلقیح مورد پیش‌بینی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و آلوده سازی

بذرهای رقم متحمل زاگرس (Eslahi *et al.*, 2013) پس از ضدعفونی با الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و دو بار شستشو با آب مقطر سترون، در عمق یک سانتی‌متری

³ SAS

¹SMA

² SMA

اختصاصی، هر ژن با استفاده از واکنش PCR تکثیر شد. مقدار هر ژن از مقایسه میزان روشنایی باند محصول PCR بر روی ژل آگارز با میزان روشنایی باند متناظر نشانگر DNA در رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و کمی کردن آن با نرم‌افزار Totallab (TotalLab ، انگلیسی) مشخص شد.

جدول ۱- نام ژن ها و توالی آغازگرها مورد استفاده در نوردن بلات معکوس.

Table 1. Names of genes and sequence of primers used in reverse northern blot.

نام ژن (Gene names)	نام مخفف (Abbreviated) (name)	توالی آغازگر (۳-۵) (Primer seq.)	طول توالی Seq. (lengt)	دمای ذوب درجه سانتی‌گراد (Melting tem.)
اکزالات اکسیداز Oxalate oxidase	Oo	F: ACTTCCTCTTCTCGTCCAAG R: CTTACCGACGTTGAACTGCA F: CAGCATCCATGTTTCGGCAAC	229	60
NADPH اکسیداز NADPH oxidase		R: ATAAGCGTACCCAGATCAAC F: CCAACTACGCCATGTCCGTG R: TCCACAGCACCGACTCGTCC	242	62
پروتئین Stress responsive protein		F: TGGAGCACAAGAGCCCCGAG R: TCGCCTTCCCTCAGCAGGTC	248	62
گلوکاتینون S ترانسفراز Glutation S transferase	GST	F: CGATAGCCAGATTCCTTTGAC R: GGAAACCAGCGACCTACAACG F: GCTTTCAACACCTTCTTCAG	157	62
سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase	SOD	R: GGGGCATAGGAGGAAAGCA	179	62
آلفا - توبولین α -tubulin	α -Tub		150	56

ساخت پروب نشان‌دار

از RNA استخراجی از گیاهان تحت تیمار جهت تهیه نشانگر (Probe) برای بررسی الگوی بیان ژن‌ها استفاده شد. مراحل تهیه پروب یا نشانگر نشاندار، مانند تهیه cDNA معمولی بود با این تفاوت که به جای استفاده از dNTP معمولی از DIG labeled dNTP (Roche Life Science, آلمان) استفاده شد.

نوردن بلات معکوس و بررسی بیان ژن ها

پس از بهینه سازی شرایط واکنش PCR، ۰/۵ تا ۱ میکروگرم از محصول PCR هر ژن بر روی غشاء لکه-گذاری شد. از cDNA ژن آلفا-توبولین گندم به عنوان کنترل داخلی و از آب مقطر و محلول واکنش PCR بدون

الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد. واکنش دورگ-سازی به مدت یک شب در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و در داخل دستگاه هیبریداسیون انجام شد. سپس غشا در تاریکخانه در معرض فیلم رادیولوژی (X-ray) گذاشته شد و بعد از ۳۰ دقیقه فیلم ظاهر گردید. امتیازدهی به لکه‌ها با استفاده از نرم‌افزار TotalLab، که میزان تیرگی لکه‌ها را براساس تعداد نقاط تیره موجود در محدوده لکه مورد نظر مشخص می نماید، صورت گرفت. پس از آنکه تمامی لکه‌ها بر اساس لکه آلفا-توبولین توسط نرم-افزار استاندارد شدند، داده‌های حاصل از نرم‌افزار TotalLab وارد نرم‌افزار Excel شده، و نمودار رسم شد.

پیش‌بینی میزان بیان ژن‌ها

در تحقیق حاضر از انواع روش‌ها مانند میانگین متحرک ساده، میانگین متحرک وزنی و روش هموارسازی نمائی جهت پیش‌بینی آنزیم مورد نظر استفاده شد. در تمام روش‌های مورد بررسی، میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه با تأخیر یک روز به عنوان ورودی مدل و میزان بیان ژن در فردای آن روز به عنوان خروجی مدل در نظر گرفته شد. به این ترتیب به عنوان مثال میزان بیان ژن در ۱۲ ساعت بعد از تلقیح بیمارگر ورودی برای میزان بیان ژن در ۲۴ ساعت بعد از تلقیح بیمارگر قرار داده شد.

پیش‌بینی روند

روش‌های کمی پیش‌بینی به دو گروه روش‌های مبتنی بر گذشته و روش‌های علت و معلولی تقسیم‌بندی می‌شوند. روش‌هایی مانند میانگین متحرک ساده، میانگین متحرک وزنی و روش هموارسازی نمائی در زیرگروه روش‌های پیشرفته مبتنی بر گذشته قرار دارند که در ادامه توضیح داده می‌شود.

۱- روش میانگین متحرک ساده (SMA)^۴

در این روش میانگین مقادیر واقعی چند دوره قبل به عنوان پیش‌بینی دوره بعد در نظر گرفته می‌شود. تعیین تعداد دوره‌هایی که میانگین آن‌ها، مقدار پیش‌بینی دوره بعد را شکل می‌دهد، بستگی به ارزش اطلاعات دوره‌های گذشته دارد. رابطه (۱) روش میانگین متحرک ساده را نمایش می‌دهد (Makridakis et al., 1998).

$$F_{t+1} = \frac{\sum_{i=t+1-k}^t A_i}{k} \quad (1)$$

که در آن:

F_{t+1} : مقدار پیش‌بینی برای دوره بعد.

A_i : مقدار واقعی مربوط به دوره جاری.

t : تعداد دوره‌های مورد بررسی.

k : تعداد دوره‌هایی که میانگین آن‌ها، مقدار پیش‌بینی دوره بعد را شکل می‌دهد.

۲- روش میانگین متحرک وزنی (WMA)^۵

معمولاً میزان اثرگذاری مقادیر واقعی در دوره‌های گذشته بر پیش‌بینی آینده، متفاوت است. به‌طور مثال اطلاعات جدیدتر ارزش بیشتری دارند. لذا در این روش همانگونه که در فرمول (۲) نشان داده شده است، به اطلاعات دوره‌های گذشته وزن‌های مختلفی داده می‌شود. محدودیت ارائه شده در رابطه شماره ۳ بیان می‌کند، که مجموع وزن‌های تخصیص داده شده باید برابر با یک باشد (Makridakis et al., 1998).

$$F_{t+1} = \sum_{i=t+1-k}^t \theta_i \cdot A_i \quad (2)$$

$$\sum_{i=t+1-k}^t \theta_i = 1 \quad (3)$$

که در آن:

F_{t+1} : مقدار پیش‌بینی برای دوره بعد.

A_i : مقدار واقعی مربوط به دوره جاری.

t : تعداد دوره‌های مورد بررسی.

k : تعداد دوره‌هایی که میانگین آن‌ها، مقدار پیش‌بینی دوره بعد را شکل می‌دهد.

θ_i : وزن مربوط به دوره i ام.

۳- روش هموارسازی نمائی منفرد (SES)^۶

این روش، یک نوعی از روش میانگین متحرک وزنی است که وزن‌ها حالت نمائی دارند و همچنین به تمام مشاهدات قبل وزن داده می‌شود و وزن بالاتر به

⁵ Weight Moving Average

⁶ Single Exponential Smoothing

⁷ Weighted Moving Average

⁸ Exponential

¹ Single Moving Average

² Weight Moving Average

³ Exponential Smoothing

⁴ Single Moving Average

هر دوره به صورت رابطه ۴ است (Gelper et al., 2010):

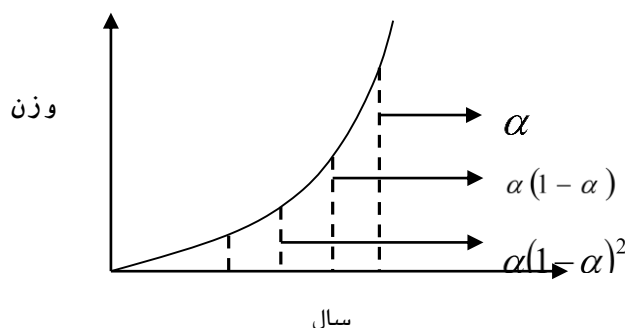
$$F_{t+1}(t) = \alpha D_t + \alpha(1-\alpha)D_{t-1} + \alpha(1-\alpha)^2 D_{t-2} + \alpha(1-\alpha)^3 D_{t-3} + \dots \quad (4)$$

داده می‌شود. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، ضریب α در آخرین مشاهده (مشاهده ای که قرار است بعد از آن پیش بینی صورت گیرد) ضرب می‌شود. سپس $\alpha(1-\alpha)$ در مشاهده ماقبل آخر ضرب می‌شود که دلیل کوچکتر از یک بودن α مقدار آن ($\alpha(1-\alpha)$) از α کمتر است و لذا ضریب اهمیت کمتری به خود می‌گیرد (Gelper et al., 2010).

مشاهدات اخیر داده می‌شود و به عبارتی، وزن‌ها به صورت هندسی، کاهش می‌یابد. بنابراین پیش‌بینی برای

که در آن، $F_{t+1}(t)$ نشان‌دهنده مقدار پیش‌بینی دوره $t+1$ متغیر مورد نظر در دوره t و عبارت D_t مقدار آخرین مشاهده متغیر می‌باشد. در رابطه ۴، مقدار α کوچکتر از یک است.

در این رابطه فرض بر این است که قدرت توضیح-دهندگی D_t یعنی آخرین مشاهده، در پیش بینی بیشتر از سایر مشاهده‌هاست، بنابراین بزرگترین وزن به آن



شکل ۱- نمودار ارزشگذاری مشاهده‌ها در روش هموارسازی نمائی منفرد

Figure 1: Valuation Schedule of Observations in the Single-Point Equilibrium Method

رابطه ۴ را می‌توان به شکل ساده‌تر و به صورت رابطه ۵ یا ۶ نوشت:

$$F_{t+1} = \alpha D_t + (1-\alpha)F_t \quad (5)$$

$$F_{t+1} = F_t + \alpha(D_t - F_t) \quad (6)$$

در واقع، پیش‌بینی در دوره $t+1$ برابر است با متوسط موزون مقدار در سال t به اضافه پیش‌بینی تا دوره t . مقدار ضریب α یا همان ضریب هموارسازی، بصورت تجربی و بین صفر و یک انتخاب می‌شود. مقدار این ضریب بهتر است که به صفر نزدیک‌تر باشد تا به یک، زیرا در این صورت خطای کمتری صورت می‌گیرد.

۴- شاخص‌های مرتبط با بررسی قدرت

پیش‌بینی

به منظور مقایسه قدرت پیش‌بینی و انتخاب بهترین روش پیش‌بینی، از معیارهای مختلف از جمله میانگین قدرمطلق خطا (MAE)، میانگین مجذور مربعات خطا (RMSE) و درصد میانگین مطلق خطا (MAPE) استفاده شد. این معیارها به صورت روابط ۷-۹ نشان داده می‌شود (Ostertagova & Steertagova, 2011).

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^n |e_i|}{n} \quad (7)$$

با قارچ) تقریباً روند مشابهی داشته است. در زمان‌های صفر، ۲ و ۱۲ ساعت بعد از آلودگی با قارچ اختلافی بین دو تیمار در میزان بیان ژن این آنزیم وجود نداشته است ولی در زمان ۱۲ و ۲۴ میزان فعالیت آنزیم در تیمار اسیدسالیسیلیک و قارچ بیشتر از تیمار قارچ تنها بود، به بیان دیگر اسیدسالیسیلیک به میزان اندک باعث افزایش بیان این ژن شده است.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n e_i^2}{n}} \quad (8)$$

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{e_i}{Y_i} \right| \times 100 \quad (9)$$

که در این روابط:

n : تعداد پیش‌بینی‌ها

e_i : خطای پیش‌بینی است که از تفاوت مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر واقعی به دست می‌آید.

Y_i : مقدار واقعی

نتایج

گلوکاتینون S ترانسفرانز GST

با توجه به شکل ۲ (الف) میزان بیان ژن رمزکننده گلوکاتینون S ترانسفرانز (GST) در طول ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ تنها (Z+0+S) و همچنین تیمار قارچ و اسیدسالیسیلیک (Z+2SA+S) افزایش یافته است. میزان این افزایش در مورد هر دو تیمار از زمان صفر تا آخرین نقطه زمانی (۲۴ ساعت بعد از آلودگی با قارچ) تقریباً روند مشابهی داشته است. در کلیه ساعات نمونه برداری میزان بیان ژن این آنزیم در هر دو تیمار نزدیک به هم بودند به بیان دیگر اسیدسالیسیلیک تأثیر زیادی بر روی بیان این ژن نداشت و این امر نشان دهنده تأثیر قارچ بر روی افزایش فعالیت این ژن است.

سوپراکسید دیسموتاز SOD^۱

با توجه به شکل ۲ (ب) میزان بیان ژن رمزکننده سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در طول ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ تنها (Z+0+S) و همین طور تیمار قارچ و اسیدسالیسیلیک (Z+2SA+S) افزایش یافته است. میزان این افزایش در مورد هر دو تیمار از زمان صفر تا آخرین نقطه زمانی (۲۴ ساعت بعد از آلودگی

پروتئین Stress responsive

با توجه به شکل ۲ (ج) میزان بیان ژن رمزکننده پروتئین Stress responsive در طول ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ تنها (Z+0+S) و همین طور تیمار قارچ و اسیدسالیسیلیک (Z+2SA+S) به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. در کلیه ساعات نمونه برداری به غیر از زمان صفر، میزان بیان این ژن در تیمار کاربرد توأم قارچ و اسیدسالیسیلیک بیشتر از کاربرد تیمار قارچ تنها بود، و این اختلاف هم معنی‌دار بود. این نکته نشان دهنده تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روی افزایش فعالیت بیان این ژن است.

NADPH اکسیداز^۲

میزان بیان این ژن در هر دو تیمار قارچ تنها (Z+0+S) و همچنین تیمار قارچ و اسیدسالیسیلیک باهم، (Z+2SA+S) در طول زمان‌های نمونه برداری دارای روندی افزایشی بود. میزان این افزایش در مورد هر دو تیمار روندی تقریباً مشابه به هم داشته ولی مایه‌زنی توأم اسیدسالیسیلیک و قارچ تأثیر بیشتری از استفاده از قارچ به تنهایی بر روی میزان بیان این ژن داشت و بعد از زمان ۶ روند افزایش در تیمار توأم، به صورت جهشی زیاد شد، این نکته نشان می‌دهد که این ژن در حضور اسیدسالیسیلیک و بیمارگر در رقم متحمل دارای بیان بیشتری است (شکل ۲ د).

² NADPH Oxidase

¹ Super Oxide Dismotase

اگزالات اکسیداز (Oo)^۱

مقادیر پیش بینی شده میزان بیان ژن بر اساس میانگین متحرک ساده برای سایر ژن‌ها شامل گلوکاتایون S ترانسفراز، سوپراکسیددیسموتاز، اگزالات اکسیداز و Stress responsive 1 در مورد تیمار Z+0+S، به ترتیب مقادیر ۴۶/۲۲، ۶۰/۸۹، ۲۷/۶۰ و ۴۷/۹۳ مشاهده و برای تیمار Z+2SA+S به ترتیب مقادیر ۵۲/۰۹، ۶۶/۶۰، ۲۸/۱۵ و ۵۲/۱۴ به دست آمد.

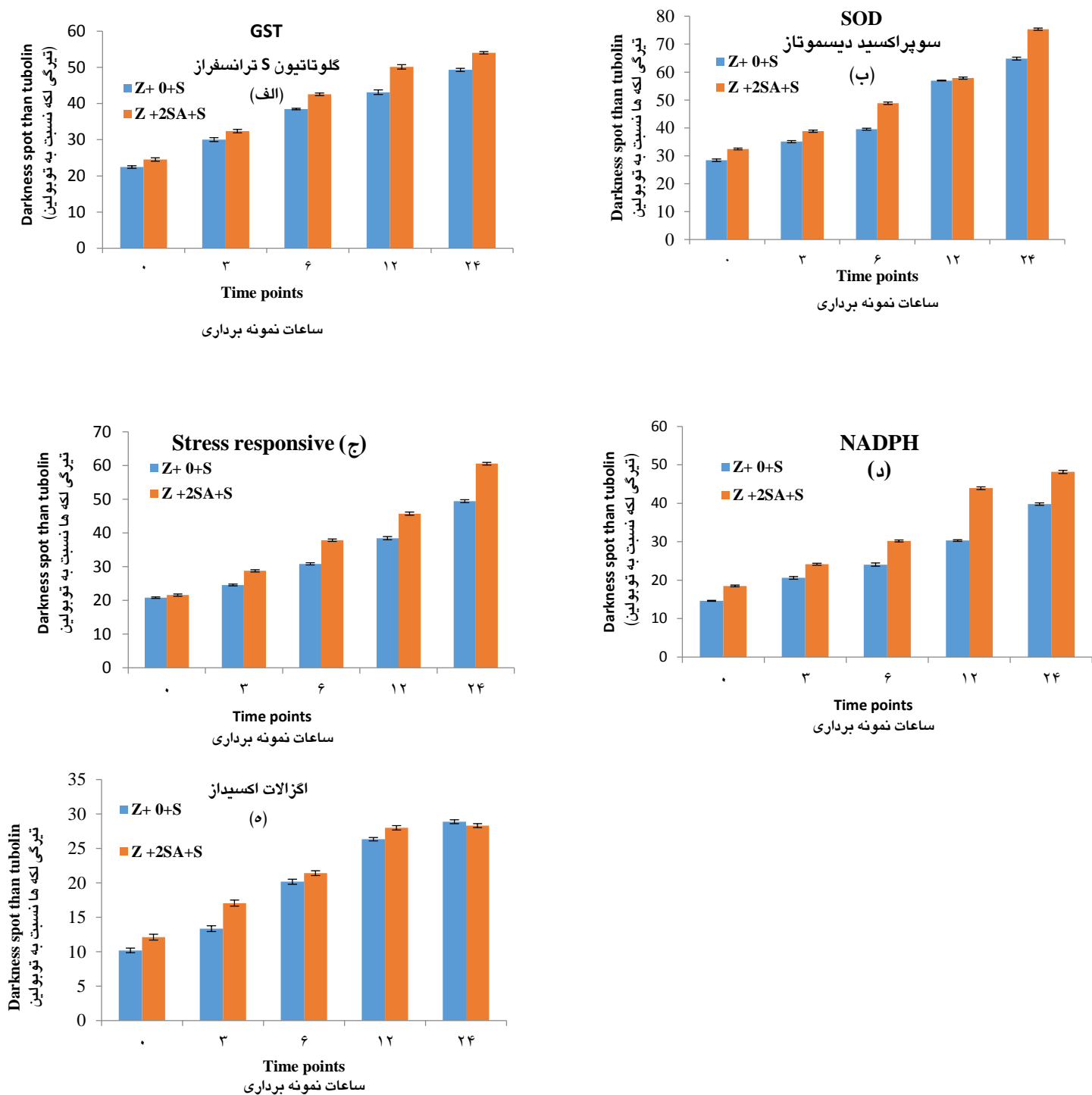
جدول ۳ مقدار پیش‌بینی شده میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در تیمارهای مورد نظر را ۲۴ ساعت بعد از آلودگی با بیمارگر بر اساس میانگین متحرک وزنی (WMA) را نشان می‌دهد. بر اساس جدول ۲ میزان عددی پیش‌بینی برای ژن NADPH اکسیداز در تیمار Z+0+S (گیاهان تیمار شده با بیمارگر به تنهایی)، Z+2SA+S (گیاهان تیمار شده با بیمارگر و اسیدسالیسیلیک با غلظت دو میلی‌مولار) به ترتیب ۳۶/۹۵ و ۴۶/۹۰ پیش‌بینی شد. که در این روش مقادیر به دست آمده در الگوی پیش‌بینی با مقادیر واقعی دارای انحرافی است که بر اساس شاخص‌های قدرت پیش‌بینی، اشاره شده در بخش مواد و روشها، مقدار محاسبه شده برای میانگین قدرمطلق خطا برای دو تیمار Z+0+S و Z+2SA+S به ترتیب ۷/۴۷ و ۹/۳۳، درصد میانگین مطلق خطا به ترتیب ۰/۲۶ و ۰/۲۵، و میانگین مجموع مجزورات خطا به ترتیب ۷/۸۴ و ۱۰/۰۵ است. مقادیر پیش‌بینی شده بر اساس میانگین متحرک وزنی برای سایر ژن‌ها شامل گلوکاتایون S ترانسفراز، سوپراکسیددیسموتاز، اگزالات اکسیداز و Stress responsive 1 در مورد تیمار Z+0+S به ترتیب مقادیر ۴۷/۴۶، ۶۲/۴۶، ۲۸/۱۰ و ۴۶/۱۲ به دست آمد و برای تیمار Z+2SA+S به ترتیب مقادیر ۵۲/۸۶، ۷۰/۱۱، ۲۸/۲۱ و ۵۶/۱۱ مشاهده شد.

میزان بیان این ژن در هر دو تیمار قارچ تنها (Z+0+S) و نیز تیمار قارچ و اسید سالیسیلیک باهم، (Z+2SA+S) در طول زمان‌های نمونه‌برداری دارای روندی افزایشی بود. میزان این افزایش در مورد هر دو تیمار روندی تقریباً مشابه به هم داشته و مایه‌زنی توأماً اسیدسالیسیلیک و قارچ تأثیر مشابهی با تیمار قارچ تنها داشت در نتیجه اسید سالیسیلیک تأثیری در القای میزان بیان ژن این پروتئین در حضور قارچ بیمارگر نداشته است و با توجه به وجود اگزالات در قارچ به عنوان ماده مترشحه، این افزایش در حضور قارچ توجیه می‌گردد (شکل ۲ ه).

پیش‌بینی میزان روند بیان ژن‌ها

نتایج جدول ۲ مقدار پیش‌بینی شده بیان ژن‌های مورد مطالعه در تیمارهای مورد نظر را، ۲۴ ساعت بعد از آلودگی با بیمارگر بر اساس روش میانگین متحرک ساده، نشان می‌دهد. بر اساس جدول ۱ میزان عددی پیش‌بینی برای ژن NADPH اکسیداز در تیمار Z+0+S (گیاهان تیمار شده با بیمارگر به تنهایی) و Z+2SA+S (گیاهان تیمار شده با بیمارگر و اسیدسالیسیلیک با غلظت دو میلی‌مولار) به ترتیب ۳۵/۰۶ و ۴۶/۰۶ پیش‌بینی شد، که در این روش مقادیر اختصاص داده شده در الگوی پیش‌بینی با مقادیر واقعی دارای انحرافی است و بر اساس شاخص‌های قدرت پیش‌بینی، اشاره شده در بخش مواد و روشها، مقدار محاسبه شده برای میانگین قدرمطلق خطا برای دو تیمار Z+0+S و Z+2SA+S به ترتیب ۸/۲۶ و ۱۰/۶۰، درصد میانگین مطلق خطا به ترتیب ۰/۲۸ و ۰/۲۹، و میانگین مجموع مجزورات خطا به ترتیب ۸/۶۶ و ۱۱/۳۵ است.

¹ Oxalate oxidase



شکل ۲- تجزیه و تحلیل نوردن بلات معکوس مربوط به ژنهای (الف) گلو تاتیون S ترانسفراز ، (ب) سوپراکسید دیسموتاز ، (ج) پروتئین Stress responsive ، (د) NADPH اکسیداز ، (ه) اکزالات اکسیداز (oxo) ، در شرایط با تنش بیمارگر تنها (Z+0+S) و بیمارگر به همراه غلظت دو میلی مولار اسیدسالیسیلیک (Z+2SA+S).

Figure 2: Reverse Northern Blot analysis of Glutathione S Transferase genes, (b) Superoxide Dismutase, (c) Stress responsive protein, (d) NADPH oxidase, (e) Oxalate oxidase (oxo), under stress conditions Only (Z + 0 + S) and the pathogen with a concentration of two milliliters of acid salicylic (Z + 2SA + S).

جدول ۲- نتایج مقادیر پیش بینی آنزیم ها و شاخص های مرتبط با قدرت پیش بینی بر اساس روش میانگین متحرک ساده (SMA).

Table 2. Results of predictive values of enzymes and indices related to spin-off power based on simple moving average method (SMA).

نام ژن	نام تیمارها Treatments	مقدار پیش بینی Predicted quantity	میانگین قدر مطلق خطا (MAE)	درصد میانگین مطلق خطا (MAPE)	میانگین مجذور مربعات خطا (RMSE)
NADPH اکسیداز	Z+0+S	35.06	8.26	0.28	8.66
	Z+2SA+S	46.06	10.60	0.29	11.35
گلوکاتایون S ترانسفراز	Z+0+S	46.22	9.30	0.24	9.47
	Z+2SA+S	52.09	10.58	0.24	10.96
سوپراکسید دیسموتاز	Z+0+S	60.89	12.66	0.25	13.82
	Z+2SA+S	66.60	13.90	0.24	14.97
اگزالات اکسیداز	Z+0+S	27.60	6.69	0.30	7.14
	Z+2SA+S	28.15	6.03	0.26	6.33
Stress responsive1	Z+0+S	43.93	9.37	0.25	10.19
	Z+2SA+S	53.14	12.87	0.29	13.42

مأخذ: یافته‌ها و محاسبات پژوهش.

References: Research findings and calculations

جدول ۳- نتایج مقادیر پیش بینی آنزیم ها و شاخص های مرتبط با قدرت پیش بینی بر اساس روش میانگین متحرک وزنی (WMA)

Table 3. Results of prediction values of enzymes and indexes related to power prediction based on WMA

آنزیم پیش بینی شده	نام تیمارها Treatments	مقدار پیش بینی Predicted quantity	میانگین قدر مطلق خطا (MAE)	درصد میانگین مطلق خطا (MAPE)	میانگین مجذور مربعات خطا (RMSE)
NADPH اکسیداز	Z+0+S	36.95	7.47	0.26	7.84
NADPH Oxidase	Z+2SA+S	46.90	9.33	0.25	10.05
گلوکاتایون S ترانسفراز	Z+0+S	47.46	8.27	0.21	80.39
GST	Z+2SA+S	52.86	9.30	0.22	9.62
سوپراکسید دیسموتاز	Z+0+S	62.46	11.23	0.22	12.33
SOD	Z+2SA+S	70.11	12.63	0.22	13.56
اگزالات اکسیداز ۱	Z+0+S	28.10	5.88	0.27	6.27
Oxo1	Z+2SA+S	28.21	5.24	0.23	5.61
Stress responsive	Z+0+S	46.12	8.49	0.23	9.16
	Z+2SA+S	56.11	11.57	0.27	12.11

مأخذ: یافته‌ها و محاسبات پژوهش

References: Research findings and calculations

محاسبه شده برای میانگین قدرمطلق خطا برای دو تیمار Z+0+S و Z+2SA+S به ترتیب ۴/۵۶ و ۶/۱۱، درصد میانگین مطلق خطا به ترتیب ۰/۱۷ و ۰/۱۷، و میانگین مجموع مجزورات خطا به ترتیب ۵/۱۰ و ۷/۱۹ است. مقادیر پیش‌بینی شده بر اساس روش هموارسازی نمائی منفرد برای سایر ژن‌ها شامل گلوکاتیون Sترانسفران، سوپراکسیددیسموتاز، اگزالات اکسیداز و Stress responsive 1 در مورد تیمار Z+0+S به ترتیب مقادیر ۵۲/۴۱، ۶۲/۸۹، ۲۹/۱۱ و ۵۴/۷۷ مشاهده شد و برای تیمار Z+2SA+S به ترتیب مقادیر ۵۳/۸۱، ۸۵/۶۲، ۲۴/۹۳ و ۶۸/۸۷ مشاهده شد.

نتایج جدول ۴ مقدار پیش‌بینی شده میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در تیمارهای مورد نظر را ۲۴ ساعت بعد از آلودگی با بیمارگر بر اساس روش هموارسازی نمائی منفرد (SES) را نشان می‌دهد. بر اساس جدول ۳ میزان عددی پیش‌بینی برای ژن NADPH اکسیداز در تیمار Z+0+S (گیاهان تیمار شده با بیمارگر به تنهایی)، Z+2SA+S (گیاهان تیمار شده با بیمارگر و اسیدسالیسیلیک با غلظت ۲ میلی‌مولار) به ترتیب ۴۳/۰۵ و ۴۵/۰۵ پیش‌بینی شد. که در این روش مقادیر اختصاص داده شده در الگوی پیش‌بینی با مقادیر واقعی دارای انحرافی است که بر اساس شاخص‌های قدرت پیش‌بینی، اشاره شده در بخش مواد و روشها، مقدار

جدول ۴- نتایج مقادیر پیش‌بینی ژن‌ها و شاخص‌های مرتبط با قدرت پیش‌بینی بر اساس روش هموارسازی نمائی منفرد (SES)

Table 4: Results of predictive values of enzymes prediction and indexes related to sputum strength based on individual SEM

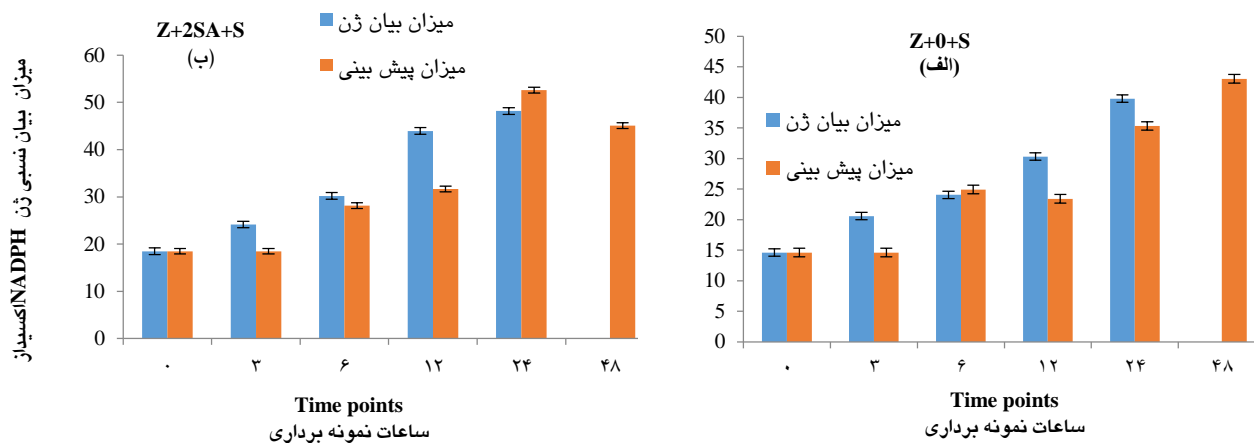
میانگین مجذور (RMSE) مربعات خطا	درصد میانگین مطلق خطا (MAPE)	میانگین قدر مطلق خطا (MAE)	مقدار پیش بینی Predicted quantity	نام تیمارها Treatments	ژن پیش‌بینی شده
5.10	0.17	4.56	43.05	Z+0+S	NADPH اکسیداز
7.19	0.17	6.11	43.05	Z+2SA+S	NADPH Oxidase
4.54	0.11	3.99	52.41	Z+0+S	گلوکاتیون
4.87	0.10	4.02	53.81	Z+2SA+S	Sترانسفران GST
9.36	0.14	6.79	62.89	Z+0+S	سوپراکسیددیسموتاز
8.39	0.14	7.60	85.62	Z+2SA+S	SOD
2.95	0.14	2.58	29.11	Z+0+S	اگزالات اکسیداز ۱
4.52	0.17	4.01	24.93	Z+2SA+S	Oxo1
5.12	0.14	4.89	54.77	Z+0+S	Stress responsive
7.27	0.16	6.73	68.87	Z+2SA+S	

مأخذ: یافته‌ها و محاسبات پژوهش

References: Research findings and calculations

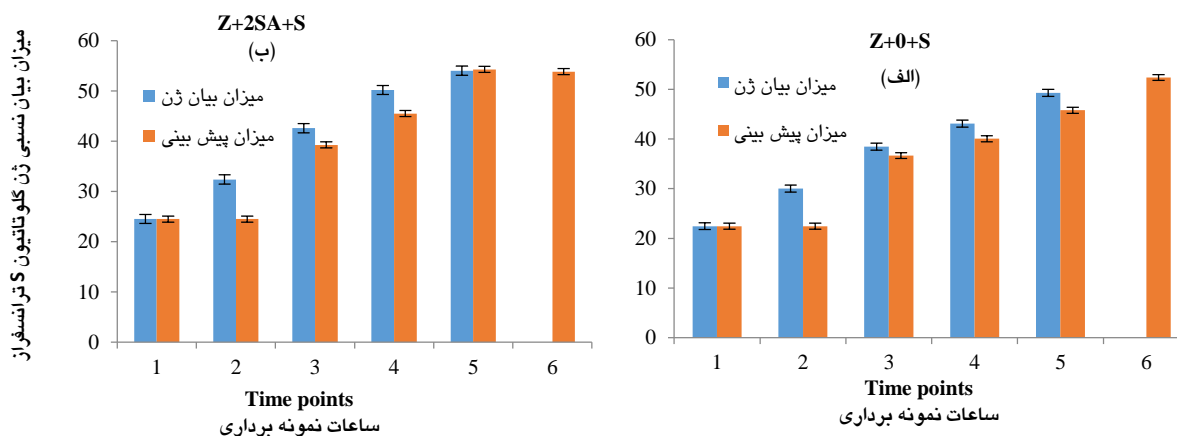
و پیش‌بینی شده بر اساس روش هموارسازی نمائی منفرد بیان ژن NADPH اکسیداز در تیمار Z+0+S و Z+2SA+S نشان داده شده است، همانطور که این نمودارها (شکل‌های ۳ الی ۷) نشان می‌دهند، الگوی پیش‌بینی دارای انحراف کمی نسبت به مقادیر واقعی می‌باشد در نتیجه مقدار پیش‌بینی بیان ژن در ۲۴ ساعت بعدی از درجه اطمینان بالایی برخوردار است.

در جدول ۴ تنها مقادیر پیش‌بینی شده هر آنزیم و میزان خطاهای منتسب به آن آورده شده است. لکن الگوی هموارسازی نمائی منفرد قابلیت پیش‌بینی تمام مقادیر واقعی را دارد، لذا می‌توان با محاسبه و نمایش مقدار پیش‌بینی هر عدد و مقایسه آن با عدد واقعی قدرت پیش‌بینی الگو را به لحاظ بصری نیز ارزیابی کرد. در نمودارهای یک (الف و ب) روند مقادیر واقعی



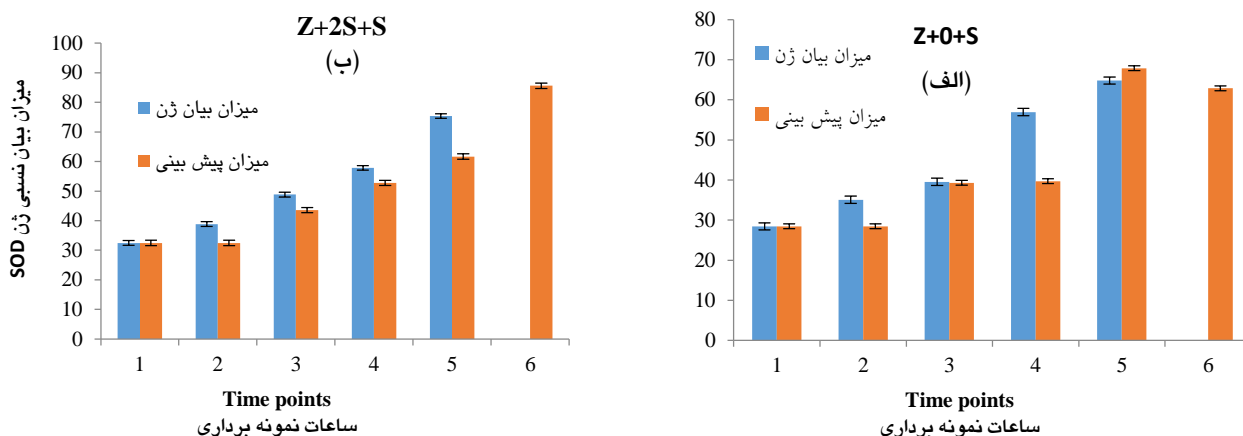
شکل ۳- روند تغییرات مقادیر واقعی و پیش بینی شده بیان ژن NADPH اکسیداز، Z+0+S: تیمار استفاده از بیمارگر تنها بر روی رقم زاگرس، Z+2SA+S: تیمار استفاده توأمان از بیمارگر و اسیدسالیسیلیک با غلظت ۲ میلی مولار.

Figure 3: Trend of actual and predicted values of NADPH oxidase expression, Z + 0 + S: treatment using Zagros, Z + 2SA + S only on Zagros, Zambol, Sulfur, Molar.



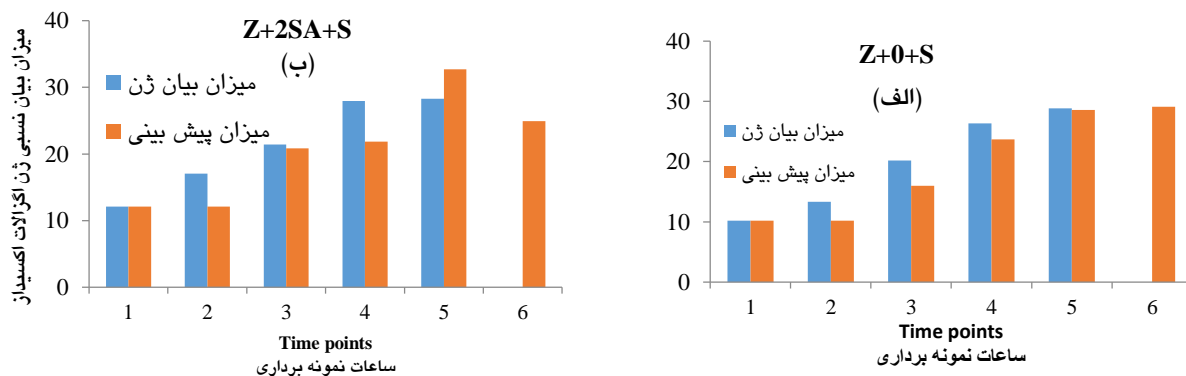
شکل ۴- روند تغییرات مقادیر واقعی و پیش بینی شده بیان ژن گلوتاتیون S ترانسفراز، Z+0+S: تیمار استفاده از بیمارگر تنها بر روی رقم زاگرس، Z+2SA+S: تیمار استفاده توأمان از بیمارگر و اسیدسالیسیلیک با غلظت ۲ میلی مولار.

Figure 4: Changes in actual and predicted values of glutathione S transferase expression, Z + 0 + S: treatments using Zagros, Z + 2SA + S alone, on Zagros cultivar, treatment with a patient with 2 mg concentration of salicylic acid Umolar.



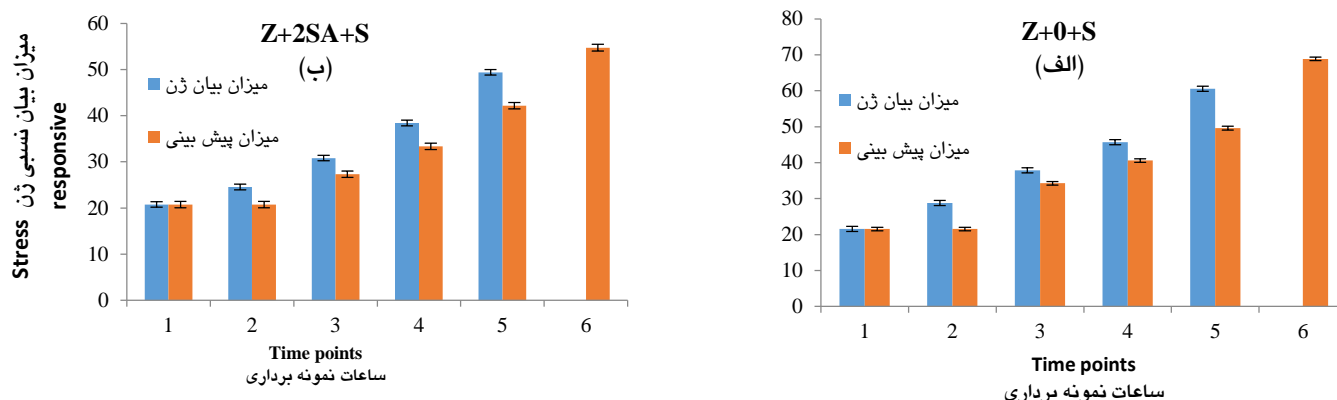
شکل ۵- روند تغییرات مقادیر واقعی و پیش بینی شده بیان ژن سوپراکسیددیسموتاز، Z+0+S: تیمار استفاده از بیمارگر تنها بر روی رقم زاگرس، Z+2SA+S: تیمار استفاده توأمان از بیمارگر و اسیدسالیسیلیک با غلظت ۲ میلی‌مولار.

Figure 5: Trend of actual and predicted values for the expression of superoxide dismutase gene, Z + 0 + S: treatment using Zagros, Z + 2SA + S alone, on a Zagrosa cultivar, with 2 millimolar concentration of salicylic acid.



شکل ۶- روند تغییرات مقادیر واقعی و پیش بینی شده بیان ژن اگزالات اکسیداز، Z+0+S: تیمار استفاده از بیمارگر تنها بر روی رقم زاگرس، Z+2SA+S: تیمار استفاده توأمان از بیمارگر و اسیدسالیسیلیک با غلظت ۲ میلی‌مولار.

Figure 6: Changes in actual and predicted values of oxalate oxidase gene expression, Z + 0 + S: Treatment using Zagros, Z + 2SA + S alone, on patients with Zagros, with 2 mg / Molar.



شکل ۷- روند تغییرات مقادیر واقعی و پیش بینی شده بیان ژن Stress responsive پروتئین، Z+0+S: تیمار استفاده از بیمارگر تنها بر روی رقم زاگرس، Z+2SA+S: تیمار استفاده توأمان از بیمارگر و اسیدسالیسیلیک با غلظت ۲ میلی‌مولار، در تمام نمودارهای فوق ستون‌های آبی رنگ مقدار واقعی و ستون‌های نارنجی رنگ مقدار پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد.

Figure 7: The trend of changes in actual and predicted values of expression of Stress responsive protein gene, Z + 0 + S: treatment using Zagros, Z + 2SA + S only on Zagros, Zambol, Sialiser and 2-Molsalic acid, In all of the above graphs shows the actual value and the predicted value.

بحث

یکی از فعالیت‌هایی که در مورد اصلاح ارقام انجام می‌شود، شناسایی ژن‌های مقاومت در ارقام مقاوم و انتقال آن به ارقام حساس با خصوصیات مطلوب زراعی است؛ در نتیجه مطالعاتی در زمینه شناسایی ژن‌های مقاومت و دفاعی در گیاه ضروری است (Wang et al., 2010). زمانی که ارقام مقاوم و یا متحمل مورد حمله بیمارگر قرار می‌گیرند، سیستم‌های دفاعی در گیاه میزبان فعال می‌شود و ژن‌هایی که در این مسیرها درگیر هستند فعال می‌شوند و در نهایت بیان آن‌ها افزایش می‌یابد. افزایش بیان ژن‌های دفاعی منجر به تولید پروتئین‌های دفاعی بیشتری می‌شود و حاصل آن، مقاومت در گیاه بروز پیدا می‌کند. در گیاهان حساس و مقاوم هر دو مقدار بیان ژن‌های دفاعی افزایش پیدا می‌کند، ولی میزان این افزایش در رقم مقاوم بسیار زودتر از رقم حساس اتفاق می‌افتد، به عبارت دیگر زمانی که بیمارگر به گیاه حمله می‌کند، در صورتی گیاه نسبت به حمله بیمارگر مقاومت نشان می‌دهد که در همان ساعات

ابتدایی بعد از حمله بیمارگر، میزان بیان ژن‌های دفاعی افزایش یابد (Rabbani et al., 2003).

نتایج این پژوهش نشان داد، اسید سالیسیلیک می‌تواند به عنوان یک القاگر مناسب در القا میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق عمل کند و به عنوان یک محرک خوب برای افزایش میزان بیان ژن‌های دفاعی باشد. این روند در مورد تمام ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق مورد مشاهده قرار گرفت. برخی از پژوهشگران نشان دادند، اسیدسالیسیلیک با تأثیر بر روی افزایش بیان ژن‌های دفاعی از جمله آنزیم‌های دفاعی باعث افزایش مقاومت گیاه به عوامل بیمارگر گیاهی می‌شوند. نتایج تحقیقی نشان داد که تیمار لوبیا چشم بلبلی با اسیدسالیسیلیک باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیلایز و پراکسیداز در برهمکنش با بیمارگر *Rhizoctonia solani* می‌شود (Chandru et al., 2007). استفاده از مواد شیمیایی و مضرات آن‌ها، محققان را برآن داشت که به دنبال موارد جایگزین استفاده از سموم شیمیایی باشند. یکی از

قادر به از بین بردن قارچ‌ها و باکتری‌ها است ولی مکانیسم این عمل هنوز شناخته نشده است، اما یکی از دلایل احتمالی آن می‌تواند از بین بردن آنزیم‌های متابولیکی ضروری باشد. یکی از اولین اتفاقی‌هایی که در زمان واکنش ناسازگار بین گیاهان و بیمارگرها می‌افتد، افزایش سریع انفجار اکسیداسیونی به واسطه فعالیت گونه‌های اکسیژن فعال است (Torres et al., 2005).

آنزیم‌های اکسیداز از پروتئین‌های فاز حاد در گیاهان است که در حضور اکسیژن مولکولی، اکزالات را به آب اکسیژنه و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌نماید (Dunwell et al., 2000). بسیاری از قارچ‌های بیمارگر پس از آلوده کردن گیاه، اکزالات را به عنوان ماده سمی تولید می‌کنند. گیاه نیز در پاسخ با استفاده از این آنزیم، اکزالات را تجزیه می‌کند و از محصولات عمل، به ترتیب در چرخه کربن و تولید ماده ضدقارچی استفاده می‌کند (Christensen et al., 2002). آنزیم‌های اکسیداز تاکنون از گیاهان مختلفی از جمله گندم، جو، برنج، ذرت و چغندر قند جدا و شناسایی شده است. تفاوت انواع ایزوآنزیم‌های این آنزیم در گیاهان مختلف در تعداد اسیدهای آمینه، شرایط واکنش، ساختمان کلی آنزیم و تعداد زیر واحدهای آن می‌باشد (Skinner and Watson, 2001).

در این مطالعه میزان بیان ژن‌های دفاعی در گیاه گندم که تحت تأثیر اسیدسالیسیلیک و بیمارگر قرار گرفته بود، با روش نوردن بلات معکوس مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که بررسی بیان ژن‌های دفاعی در گیاه میزبان در زمان بیماری امری لازم است، اگر محققان با پس از بررسی بیان ژن در ساعات ابتدایی استفاده از روش‌های پیش‌بینی بتوانند میزان بیان ژن‌های دفاعی را در ساعات و حتی روزهای بعد پیش‌بینی کنند، علاوه بر صرفه‌جویی در هزینه، گام بزرگی در کاهش اتلاف وقت هم برداشته‌اند (Gholamnezhad, 2018).

بهترین جایگزین‌ها در این امر، استفاده از ارقام مقاوم است (Eyal, 1999).

سلول‌های گیاهی برای کاهش اثرات تخریبی اکسیژن‌های فعال، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانت خود از جمله آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) را افزایش می‌دهند (Gholamnejad et al., 2009b). در تحقیقی مشاهده شد وقتی که اسید سالیسیلیک در غلظت‌های مناسب به صورت خارجی بر روی گیاه استفاده می‌گردد، باعث بالا رفتن توان سیستم آنتی‌اکسیدانت بافت‌های گیاهی از طریق فعال نمودن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز می‌شود (Cao et al., 2010). مطالعه‌ای به وسیله یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۳ با عنوان بررسی نبرد پیام‌ها بین گندم و بیمارگر *Septoria tritici* به وسیله پروتئوم و فسفو پروتئوم انجام گرفت. نتیجه این مطالعه مشخص نمود که تجمع پروتئین‌های دفاعی و مرتبط با تنش باعث کاهش فتوسنتز و تغییر در متابولسیم قندها می‌شود. داده‌های حاصل از PCR کمی در این مطالعه، نشان داد که بیان ژن سوپراکسیددیسموتاز در سلول گیاهی با حمله بیمارگر افزایش پیدا کرده است (Yang et al., 2013).

به عنوان یک قانون کلی، پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده به وسیله القای یکسری از پروتئین‌هایی که از سلول‌ها محافظت می‌کنند، انجام می‌گیرد. تنش‌های غیرزنده نظیر گرما، سرما، خشکی، شوری، فقر غذایی، اوزن، فلزات سنگین، امواج مرئی، مواد شیمیایی سمی، تنش‌های اکسیداسیونی ناشی از عوامل زنده و غیرزنده از مهم‌ترین تهدیدها در زمینه کشاورزی هستند (Miao and Zentgraf, 2007).

NADPH اکسیداز (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase) یک کمپلکس آنزیمی باند شونده به غشا است. این سوپراکسید در فعالیت‌های دفاعی گیاه بسیار موثر است. سوپراکسید

دخیل در سنتز فیتوالکسین ها و پمپ های ناقل-ABC transporter را فعال می سازند.

بیان ژن‌های اگزالات اکسیداز و گلوکاتایون S ترانسفراز دقیقاً مانند ژن NADPH اکسیداز، روند افزایشی داشت. در مورد این دو ژن هم روند پیش‌بینی در ۲۴ ساعت دوم در مورد تیمار بیمارگر تنها افزایشی بود، اما در مورد استفاده از اسید سالیسیلیک به همراه بیمارگر در ۲۴ ساعت دوم روند کاهش می‌شد. این روند کاهش می‌تواند به عملکرد این دو ژن و نقش آن‌ها در متابولیسم در سلول نسبت داد. آنزیم اگزالات اکسیداز از پروتئین‌های فاز حاد در گیاهان است که در حضور اکسیژن مولکولی، اگزالات را به آب اکسیژنه و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌نماید (Dunwell et al., 2000). بسیاری از قارچ‌های بیمارگر پس از آلوده کردن گیاه، اگزالات را به عنوان ماده سمی تولید می‌کنند. گیاه نیز در پاسخ با استفاده از این آنزیم، اگزالات را تجزیه می‌کند و از محصولات عمل، به ترتیب در چرخه کربن و تولید ماده ضدقارچی استفاده می‌کند (Christensen et al., 2002). آنزیم گلوکاتایوت S ترانسفراز هم خانواده‌ای از آنزیم‌های فاز دو است که در سم زدایی در سلول نقش دارد (Schröder, 2000). نظر به مکانیسم مشابه هر دو آنزیم در مکانیسم های سلولی تأثیر مشابه اسید سالیسیلیک بر روی آن‌ها دور از ذهن نمی‌باشد.

در تحقیقی مشاهده شد وقتی که اسید سالیسیلیک در غلظت‌های مناسب به صورت خارجی بر روی گیاه استفاده می‌گردد، باعث بالا رفتن توان سیستم آنتی‌اکسیدانت بافت‌های گیاهی از طریق فعال نمودن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز می‌شود (Cao et al., 2010). این ژن هم تحت تأثیر بیمارگر و هم اسیدسالیسیلیک و بیمارگر به صورت کاربرد توأمان قرار گرفت. اما روند پیش‌بینی نشان داد که بیمارگر به تنهایی قادر به افزایش بیان در ۲۴ ساعت دوم نیست اما

در واقع زمانی که بتوان میزان بیان ژن‌های دفاعی را با استفاده از داده‌های یک دوره، برای دوره آینده بدون اندازه‌گیری میزان بیان ژن مورد مطالعه، در روز بعد هم پیش‌بینی کرد، می‌توان در زمان و هزینه‌ها صرفه جویی کرد و از طریق آن به وجود ارقام مقاوم و غیرمقاوم پی برد. روش‌های مختلفی جهت پیش‌بینی میزان بیان ژن‌های گیاهان وجود دارد، که در این مطالعه از سه روش میانگین متحرک ساده، میانگین متحرک وزنی و روش هموارسازی نمائی استفاده شد.

نتایج این مطالعه نشان داد، استفاده از روش هموارسازی نمائی منفرد، با توجه به محاسبه و مقایسه شاخص‌های قدرت پیش‌بینی، دارای دقت بالاتری نسبت به سایر روش‌های مذکور در این پژوهش است. در مورد ژن NADPH اکسیداز میزان پیش‌بینی شده در ۲۴ ساعت دوم در مورد دو تیمار مختلف Z+0+S و Z+2SA+S (شکل ۲ الف و ب) نشان دهنده اختلاف روند میزان بیان ژن در مورد دو تیمار بود، به نحوی که علیرغم افزایش بیان این ژن به وسیله ترکیب اسیدسالیسیلیک در ۲۴ ساعت اول نسبت به تیمار بیمارگر تنها، این افزایش در ۲۴ ساعت دوم ادامه نیافت و حتی کاهش نیز پیش‌بینی شد، که می‌توان این گونه استنباط کرد، اسیدسالیسیلیک قادر به افزایش بیان تنها در ساعات ابتدایی بعد از تلقیح بیمارگر است و در ادامه نیز پیش‌بینی می‌شود، حتی در دوره‌های بعدی نیز این شدت روند کاهش بیشتر شود. اسید سالیسیلیک به عنوان یک عامل کلیدی در القای تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله بیماری‌ها نقش دارد. پس از هجوم پاتوژن‌ها به خصوص عوامل قارچی، گیاهان با القای مقاومت اکتسابی سیستمیک که با افزایش میزان اسید سالیسیلیک درونی گیاه همراه است مسیرهای پیام‌رسانی گسترده‌ای از قبیل رونویسی ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی (Pathogenesis related proteins)، آنزیم‌های

انتخاب شد. نظر به نیاز به این چنین اطلاعاتی از سامانه دفاعی گیاه، استفاده بیش از پیش این مدل‌ها در پیش بینی میزان بیان ژن‌ها و سایر فعالیت‌های فیزیولوژیکی که در ارتباط با دفاع گیاهی است، می‌تواند به عنوان پیش نیاز تحقیقات پژوهشگرانی باشد که در زمینه تراریخت کردن گیاهان با انتقال ژن‌های مفید گام بر می‌دارند. لذا پیشنهاد می‌شود، تحقیقاتی از این دست با تعداد بیشتری داده در مورد هر ژن و همچنین با تعداد بیشتری ژن صورت گیرد، همچنین پیشنهاد می‌شود، مطالعات در مورد بیان ژن‌هایی صورت گیرد که در مسیرهای متنوع فیزیولوژیکی شرکت دارند و با استفاده از اطلاعات حاصل از این پیش بینی‌ها مسیرهایی که در سیستم‌های بیولوژیکی فعال هستند، با یکدیگر ارتباط داد. زمانی که بتوان بیان ژن‌ها را در سلول در بازه‌های زمانی بیشتری مورد پیش‌بینی قرار داد، افق گسترده تری در مورد عملکرد آن ژن و یا ژن‌های مورد مطالعه در برابر دیدگاه محقق قرار می‌گیرد و با استفاده از این اطلاعات فرایند اصلاح نباتات با دقت و بازدهی بیشتری صورت می‌پذیرد.

اسید سالیسیلیک توانست میزان بیان را در ۲۴ ساعت دوم نیز حفظ کند. نتیجه این بخش از تحقیق می‌تواند نوید دهنده استفاده از اسیدسالیسیلیک به عنوان یک عامل القاگر شیمیایی در کنترل بیمارهای گیاهی باشد، در مورد این آنزیم اسیدسالیسیلیک توانست میزان بیان ژن را (بر اساس مقدار پیش‌بینی شده) در ۲۴ ساعت دوم هم افزایش دهد و گیاه را همچنان در برابر تنش‌های اکسیداتیو مقاوم نگه دارد.

پروتئین‌های Stress responsive از گروه پروتئین‌هایی هستند که همواره در تنش‌های زیستی و غیر زیستی میزان بیان آن‌ها افزایش می‌یابد. این نوع پروتئین‌ها تقریباً یک نوع پروتئین‌های دفاعی عمومی هستند. نظر به وسیع بودن سطح فعالیت دفاعی این نوع پروتئین‌ها افزایش میزان بیان آن‌ها به وسیله هر نوع الاقاری اعم از زنده و غیرزنده امری منطقی به نظر می‌رسد؛ که البته نتایج این تحقیق هم موید همین مطلب است.

بین سه روش پیش‌بینی ارائه شده در این پژوهش، مدل هموارسازی نمایی منفرد بهترین الگوی پیش‌بینی بر اساس شاخص‌های اندازه‌گیری قدرت پیش‌بینی

منابع

Adhikari TB, Balaji B, Breeden J and Goodwin SB. 2007. Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involve early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71: 55-68.

Anders, S and Huber, W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11:R106.

Arraiano, L. and Brown, J. 2007. Genetic analysis of Septoria tritici blotch to improve resistance in European wheat breeding programmes. *Wheat Production in Stressed Environments*: 12: 109-112.

Cao SF, Hu ZC, Zheng YH and Lu BH. 2010. Synergistic effect of heat treatment and salicylic acid on alleviating internal browning in cold-stored peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 58(2): 93-97.

Chartrain L., Berry ST and Brown JKM. 2004: Resistance of wheat line Kavkaz-K4500 L.6.A.4 to septoria tritici blotch controlled by isolate-specific resistance genes. *Phytopathology*, 95: 664-671.

Christensen AB, Cho BH, Næsby M, Gregersen PL, Brandt J and Madriz-Ordeñana K. 2002. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, 3(3): 135-144.

Dunwell JM, Khuri S and Gane PJ. 2000. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol Molecul Biol Reviews*; 64:153-79.

Eslahi M. R., Safaie N and Saidi A. 2013. Study of resistant gene expression of wheat against to *Mycosphaerella graminicola* by cDNA-AFLP. PhD thesis, Tarbiat Modares university (in Persian with English abstract).

Eyal Z, Scharen A, Prescott J and Van Ginkel M. 1987. The Septoria diseases of wheat: concepts and methods of disease management. International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT), Mexico, DF.

Eyal, Z. 1999. Breeding for resistance to Septoria and Stagonospora diseases of wheat. Septoria on Cereals: A Study of Pathosystems. JA Lucas, P. Bowyer, and AM Anderson, eds .CAB International, Wallingford, UK: 115-130.

Gelper S, Fried R and Croux CH. 2010. Robust Forecasting with Exponential and Holt Winters Smoothing, *Journal of forecasting*, Vol. 29, No. 3, 285–300.

Gholamnejad J, Etebarian HR, Roustae, A and Sahebani N. 2009a. Biological control of apple blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Plant Protection research*, 49: 270-275.

Gholamnejad J, Etebarian HR, Sahebani NA, and Roustae A. 2009b. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Iran against blue mould of apple in order to reduce the environmental pollution. *Journal of International Environmental Application and Science*, 4(1), 28-36

Gholamnejad J, Etebarian HR and Sahebani N. 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Food Science* 4: 001-007.

Gholamnezhad J. 2016. Transcriptomics and useful techniques of defense gene expression evolution of plant. *Applied biology*, 6(4): 21-42.

Gholamnezhad J. 2017. Effect of plant extracts against apple gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Applied Microbiology In Food Industries*, 3(1): 53-66.

Gholamnezhad J. 2018. Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(0): 1-10.

Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi goltapeh E, Safaei N and Razavi Kh. 2016b. Effect of salicylic acid on enzyme activity in wheat in immediate early time after infection with *Mycosphaerella graminicola*. *Scientia agriculturæ bohémica*, 47(1): 1-8.

Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi goltapeh E, Safaei N and Razavi Kh. 2016c. Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by *Mycosphaerella graminicola*, *Iranian Journal of Plant Biology*, 8(30): 43-55.

Goodwin SB. 2007. Back to basics and beyond: increasing the level of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Australasian Plant Pathology* 36: 532-538 .

Kawano, T., T. Furuichi and L.Shoshi Muto. 2004. Controlled Salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants. *Plant Biotechnology*, 21:319 – 335.

Kia S and Torabi M. 2008. Effects of infection with septoria leaf blotch (*Septoria tritici*) at different growth stages on yield and yield components of wheat cultivars in Gorgan. *Seed and Plant*, 24: 237-250 (in Persian).

Makridakis S, Wheelwright SC and Hyndaman RJ. 1998. *Forecasting Methods and Applications*, New York, Wiley.

Miao Y and Zentgraf U. 2007. The Antagonist Function of Arabidopsis WRKY53 and ESR/ESP in Leaf Senescence Is Modulated by the Jasmonic and Salicylic Acid Equilibrium. *The Plant Cell Online*, 19: 819-830.

Ostertagova E and Ostertag O. 2011. The Simple Exponential Smoothing Model, *Proceedings of the 4th International Conference on Modeling of Mechanical and Mechatronic Systems*, Technical University of Košice, Slovak Republic, 380–384.

Quaedvlieg W, Kema G H J, Groenewald JZ, Verkley GJM, Seifbarghi S, Razavi M, Gohari AM and Mehrabi R. 2011. "*Zymoseptoria* gen. Nov.: A new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts". *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 26: 57–69.

Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan M A, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology*, 133: 1755-1767.

Rezvani Moghaddam, P and Koocheki A. 2001. Research history on salt affected lands of Iran: Present and future prospects – Halophytic ecosystem – International symposium on prospects of saline agriculture in the GCC Countries. Dubai, UAE.

Schröder P. 2000. Metabolism of Organic Xenobiotics in Plants: Conjugating Enzymes and Metabolic Endpoints. In: *Intercost Workshop on Bioremediation*, Italy.

Skinner E and Waterson M. 2001. Improvement of a standard MIRA method for urinary oxalate by elimination of reagent carry-over. *Annal Clin Biochemistry*, 38: 54-56.

Torres MA, Jones JDG and Dangl JL. 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature genetics*, 37: 1130-1134.

Van Ginkel, M and Rajaram, S. 1999. Breeding for resistance to the Septoria/Stagonospora blights of wheat. In: M. van Ginkel, A. McNab, and J. Krupinsky, ed. *Septoria and Stagnospora Diseases of Cereals: A Compilation of Global Research*. CIMMYT, Mexico, DF, pp. 117-126.

Yang F, Li W and Jorgensen H J L. 2013. Transcriptional reprogramming of wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. *PLoS One*, e81606.

Application of Time Series Methods to Predict the Process of Expression of Defense Genes in Wheat During Infection whit *Zymoseptoria tritici*

J Gholamnezhad^{*1}, F Sanjarian² and M Fehresti-Sani³

^{1,3}Assistant Professors, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran

²Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

*Corresponding author: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

Received: 11 July 2019

Accepted: 18 January 2020

Abstract

The measurement of the level of defense genes expression is a useful method for investigating the resistance mechanisms of plants, but it is also time consuming and costly. In this study, it was investigated the effect of salicylic acid on the defense genes expression involved in the resistance of wheat inoculated with *Z. tritici*, by reverse northern blot method. In this research, the amount of genes expression was measured including NADPH oxidase, oxalate oxidase, stress responsive protein and glutathione S transferase superoxide dismutase was by reverse northern Blot method. In the next step, based on the information of reverse northern Blot method, it was predicted the rate of genes expression using prediction methods including simple moving average, weighted moving average and single exponential smoothing. The highest genes expression was observed at 24 hours after pathogen inoculation, in both treatments; however, there were differences for each gene, but the overall trend was incremental. The results of this study showed that the use of single exponential smoothing method, with regard to calculating and comparing predictive power indexes, has a higher accuracy than two simple and weighted moving averages. The expression of NADPH oxidase, glutathione S transferase and oxalate oxidase genes showed a similar trend, however salicylic acid increased the genes expression to 24 hours after inoculation, and then the rate of expression decreased. Examining gene expression is a very sensitive method, and should be under controlled conditions, and should be the only treatment the researcher can influence on gene expression in the plant. Then, using this information and methods of predicting the expression, predict the next time.

Keywords: Gene expression, Reverse northern blot, Prediction, Wheat, *Zymoseptoria tritici*.