

بررسی مولکولی برخی تغییرات فیزیولوژیک در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل ذرت در پاسخ به آلودگی ویروس موزاییک کوتولگی ذرت (*Maize Dwarf Mosaic Virus; MDMV*)

فروه سادات مصطفوی نیشابوری^۱، سید کاظم صباغ^{۲*}، احد یامچی^۳، سعید نصراله نژاد^۴ و ناصر پنجه‌که^۵

۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی دانشگاه زابل.

۲- دانشیار گروه زیست شناسی پردیس علوم دانشگاه یزد.

۳- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۴- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۵- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل.

* مسئول مکاتبه sksabbagh@yazd.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۲

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۲

چکیده

در این تحقیق تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز به روش طیف سنجی و سطح بیان ژن‌های *NPRI*، *Chlorophyll a-b binding protein*، *FKBP* و *Metallothionein-like protein* به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز کمی (qRT-PCR) در دو ژنوتیپ متحمل (هیبرید ۸) و حساس (*SC705*) ذرت در پاسخ به بیماری ویروس موزاییک کوتولگی ذرت مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش در شرایط گلخانه بصورت مایه‌زنی مکانیکی صورت گرفت و نمونه‌برداری در زمان‌های ۰، ۱، ۹، ۲۴ و ۷۲ ساعت انجام شد. نتایج نشان دهنده‌ی افزایش فعالیت پراکسیداز در ژنوتیپ متحمل در کلیه‌ی زمان‌های نمونه‌برداری نسبت به ژنوتیپ حساس بود. بالاترین میزان افزایش در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی درمقایسه با شاهد ثبت گردید. این میزان در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلوده‌سازی نسبت به گیاهان کنترل کاهش یافت. فعالیت آنزیم کاتالاز در تمام بازه‌های زمانی بعد از آلودگی به میزان قابل ملاحظه‌ای نسبت به گیاهان کنترل کمتر بود. تغییرات بیان ژن‌های *NPRI* و *MT-LP* در هر دو ژنوتیپ افزایش داشته ولی این افزایش در گیاه متحمل بیشتر بود. میزان بیان ژن *FKBP* در ژنوتیپ متحمل از اولین ساعت پس از آلودگی ویروسی افزایش یافت و با سرعت بیشتری نسبت به گیاه حساس کاهش یافت. تغییرات بیان در ژن *Chlorophyll a-b* در گیاه حساس کاهش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد داشت. تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان رونوشت ژن‌ها در آلودگی ویروسی می‌تواند در مطالعات تعامل بین گیاه و ویروس به عنوان مارکر زیستی انتخابی برای مقاومت به بیماری‌های ویروسی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پراکسیداز، کاتالاز، ویروس موزاییک کوتولگی ذرت.

مقدمه

گیاهان ذرت و سورگوم باعث می‌شود (کوتو-گینزو و همکاران ۲۰۱۶). انتقال آلودگی توسط چندین گونه شته، بصورت مکانیکی و درصد خیلی کم با بذر صورت می‌گیرد (فورد و همکاران ۲۰۰۴). این ویروس در برگ‌های گیاهان آلوده به خصوص برگ‌های جوان ایجاد علائم موزاییک، پیسک و خطوط موازی می‌کند که البته نوع علائم

بیماری ویروس موزاییک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus, MDMV*) یکی از بیماری‌های شایع و محدود کننده‌ی رشد در ذرت بشمار می‌رود. عامل بیماری متعلق به جنس پوتی‌ویروس با ژنوم ssRNA مثبت است که گسترش جهانی داشته و بالاترین میزان خسارت را در

گیاهان افزایش و موجب مقاومت القایی می‌شود. پراکسیدازها گلیکوپروتئین هستند که با مصرف H_2O_2 ، اکسیداسیون ترکیبات آلی و غیرآلی را کاتالیز می‌کنند و نقش‌های متفاوتی در مقاومت گیاهان علیه بیمارگرها دارند از جمله آنها می‌توان اکسیداسیون هیدروکسی-سینامیل الکل‌ها به رادیکالهای آزاد اکسیژن، اکسیداسیون فنول‌ها، اتصالات عرضی پلی‌ساکاریدها، استحکام دیواره آوند چوب، سنتز فیتوالکسین‌ها و تجمع ترکیبات فنلی در دیواره سلولی گیاهان و محدود کردن گسترش بیمارگر (دیپاکا و همکاران ۲۰۰۷) نام برد. طی آلودگی به ویروس‌ها، تغییرات فیزیولوژیکی و سلولی زیادی را می‌توانم برد که در گیاهان میزبان اتفاق می‌افتد و اغلب توام با تغییرات بیان ژن‌های گیاه است (لیو و همکاران ۲۰۱۲). پاسخ‌های متنوع گیاهان مختلف به آلودگی با انواع ویروس‌ها طی مطالعاتی مورد بررسی قرار گرفته است (گانگیا و همکاران ۲۰۰۷، لیو و همکاران ۲۰۱۲ و یانگ و همکاران ۲۰۱۳). درک پاسخ‌های میزبان به آلودگی با ویروس اهمیت زیادی برای درک مکانیسم‌های تعامل گیاه-میکروب و کشف راهبردهای جدید کنترل دارد. بطور کلی آلودگی‌های ویروسی میزان رونوشت ژن‌های مختلفی از گیاه مانند ژن‌هایی که در مسیرهای متفاوتی همچون متابولیسم، انرژی، تنفس، فتوسنتز و پاسخ‌های دفاعی گیاه دخیل هستند، را تغییر می‌دهند (اوزاروسکا و همکاران ۲۰۰۹، و همکاران ۲۰۱۳ و چنگ و همکاران ۲۰۱۶). از جمله این ژن‌ها *Chlorophyll a-b binding protein*، *FKBP*، *NPR1* و *Metallothionein-like protein* هستند که در مسیرهای مختلف ذکر شده نقش اساسی دارند (پکانوا و پکان ۲۰۱۵، کوتو-گینزو و همکاران ۲۰۱۶، اوزاروسکا و همکاران ۲۰۰۹ و لومرسکی و همکاران ۲۰۱۵). در این تحقیق اثر آلودگی ویروسی روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تغییرات میزان بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای مختلف در گیاه نرت آلوده به ویروس موزاییک کوتولگی نرت با استفاده از روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفته است.

ایجاد شده بسته به ژنوتیپ گیاه، زمان آلودگی و گونه ویروس متفاوت خواهد بود (کوتو-گینزو و همکاران ۲۰۱۶). در گیاهان حساس به ویروس برهم‌کنش‌های سازگار میزبان-ویروس منجر به بیان و تکثیر ژن‌ها، حرکت سلول به سلول و حرکت در فواصل دورتر می‌گردد (ماول و همکاران ۲۰۰۲). در مقابل پاسخ گیاهان به بیمارگرها به صورت افزایش بیان ژن‌های مختلف دفاعی، باز کردن کانال‌های یونی، تغییر وضعیت فسفریلاسیون پروتئینی و فعال کردن آنزیم‌های پیش ساخته ظاهر می‌شود (دونروا و همکاران ۲۰۰۷) افزایش واکنش اکسیداتیو، پاسخ اولیه به حمله‌ی بیمارگر است که منجر به تشکیل گونه‌های فعال (رادیکال) اکسیژن (ROS) شامل H_2O_2 و O_2 می‌شود (بینچلر و همکاران ۲۰۰۶). گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species-ROS) در طول بیماریزایی نقش حیاتی دارند و در پاسخ واکنش فوق حساسیت در برهم‌کنش‌های ناسازگار گیاه-بیمارگر دخالت دارند. آن‌ها می‌توانند با تقویت دیواره‌ی سلولی یا از بین بردن مستقیم بیمارگر مانع از گسترش عامل بیماری در گیاهان شوند (دات و همکاران ۲۰۰۰). همچنین گونه‌های فعال اکسیژن به عنوان ترکیبات سیتوتوکسیک نیز عمل می‌کنند و گیاهان برای حفاظت از صدمه‌ی آنها سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی پیچیده‌ای در غشای سلولی و اندامک‌های خود دارند (لی و لی ۲۰۰۰). آنزیم کاتالاز از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که تقریباً در کلیه‌ی موجودات زنده یافت می‌شود و از دسته پروتئین‌های آهن‌دار محسوب می‌شود و هنگامی در سلول‌های گیاهی و جانوری وارد عمل می‌شود که در محیط سلولی مقدار ماده پراکسید هیدروژن زیاد باشد و آن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند (دو و همکاران ۲۰۰۷). پژوهشگران مختلفی گزارش کرده‌اند که تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در ارتباط با مقاومت به تنش‌های مختلف است (دونروا و همکاران ۲۰۰۷، ریدل-بائر و همکاران ۲۰۰۰، اشفق و همکاران ۲۰۱۰ و ماهوسودان و همکاران ۲۰۰۸). آنزیم پراکسیداز یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که در حالت تنش‌های زیستی در

مواد و روش‌ها

تهیه منبع ویروس

گیاهان با علائم مشکوک به MDMV از مزارع ذرت استان گلستان جمع‌آوری و در آزمون الایزای غیر مستقیم با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی MDMV و ویروس موزاییک ایرانی قیاق (IJMV) که معمولاً همراه با MDMV است به روش کانورز و مارتین (۱۹۹۰) مورد بررسی قرار گرفتند. یک نمونه‌ی آلوده که در آزمون الایزا فقط به آنتی‌بادی MDMV واکنش مثبت نشان داده بود، انتخاب و در ۵ حجم بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار، pH ۷، در هاون سترون عصاره‌گیری و به منظور خالص‌سازی MDMV به گیاه ارزن مرواریدی که تنها MDMV در آن تکثیر می‌یابد و با پودر کاربوراندوم جهت نفوذ ویروس گرد پاشی شده بود، مایه‌زنی گردید تا طی مراحل آزمایش از یک نمونه مشخص استفاده شود. به منظور اطمینان از وجود MDMV در گیاهان مایه‌زنی شده، قطعه‌ای از ژنوم ویروس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس تکثیر شد، بدین جهت mRNA Capture Kit طبق دستورالعمل سازنده از ارزن مرواریدی استخراج گردید و سپس از RNA جذب شده به میکروتیوب برای واکنش نسخه برداری معکوس و سنتز cDNA با آنزیم نسخه بردار معکوس از نوع (Roche, Germany) Expand M-MULV استفاده گردید. واکنش با مخلوط کردن ۱۰ میکرولیتر بافر (5x) ExpandRT، ۵ میکرولیتر DTT، ۱۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر مخلوط dNTP، ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر آنزیم RNase inhibitor، ۳ میکرولیتر آغازگر (18) oligodT (۱۰ میکرو مولار و ۲۰ واحد آنزیم M-MULV تهیه گردید. مخلوط حاصل با افزودن آب مقطر استریل به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و بمدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتیگراد و سپس به منظور غیر فعال‌سازی آنزیم ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شد. از cDNA بدست آمده، در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی (5'- CCTTGACAACCCTCGTGACG-3') MDM1F و

MDM1R (5'-GTGGCAAGCTATGGCGTTAT-3') استفاده گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با مخلوط کردن ۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase buffer (10X)، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط dNTP، ۰/۴ میکرومولار از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن-ایران) و ۳ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. برنامه PCR شامل یک چرخه‌ی ۹۴ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه به منظور واسرشته سازی اولیه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۴ درجه‌ی سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال به مدت یک دقیقه در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتیگراد و بسط در ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و به علاوه یک چرخه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۵ دقیقه برای امتداد رشته‌ها بود (مصطفوی و همکاران ۲۰۱۵). محصول PCR در ژل آگارز دو درصد الکتروفورز گردید.

مواد گیاهی و مایه‌زنی ویروس

ژنوتیپ‌های ذرت مورد مطالعه در این تحقیق از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند. بر اساس بررسی‌های انجام شده، هیبرید شماره ۸ به عنوان ژنوتیپ متحمل و رقم SC705 به عنوان ژنوتیپ حساس به ویروس موزاییک کوتولگی ذرت انتخاب شدند (زارع و همکاران ۲۰۱۶). بذور پس از ضد عفونی با سه درصد کلرآمین T به مدت یک و نیم دقیقه، سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو و در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک شامل خاک مزرعه و ماسه شسته شده به نسبت ۱:۱ (دو دفعه به مدت یک ساعت سترون شده) در شرایط گلخانه با رعایت موارد لازم از قبیل نور، رطوبت و دمای استاندارد کشت شدند. از عصاره‌ی گیاهان آلوده به MDMV جهت مایه‌زنی مکانیکی به ذرت‌های کشت شده در گلخانه در مرحله سه برگی استفاده شد. تعداد گیاهان موجود در هر گلدان برای هر تیمار پنج عدد انتخاب و بقیه گیاهچه‌ها حذف شدند. برای هر تیمار، سه تکرار در نظر گرفته شد. علائم توسعه بیماری از زمان مایه‌زنی گیاهان ذرت با عصاره‌ی آلوده به ویروس تا یک ماه بعد از آن به صورت

و سپس با توجه به میزان غلظت RNA، یک میکروگرم از هر نمونه به همراه ۲ میکرولیتر آغازگر oligo dT ۱۰ میکرومولار (۱۸ تیمین)، ۴ میکرولیتر بافر ساخت cDNA، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP ۱۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر بازدارنده ریبونوکلاز، ۲۰ واحدی و آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MULV Reverse Transcriptase (Roche, Germany) (۲۰۰ U/μl) برای سنتز cDNA استفاده و حجم نهایی مخلوط واکنش با آب تیمار شده با دپس (DEPC) به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد.

طراحی آغازگرها

توالی‌های ثبت شده در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و Uniprot مربوط به گیاه ذرت برای هر یک از ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق در وب گاه Multialin به آدرس <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin> هم‌ردیف-سازی شدند و از نواحی مشترک توالی‌ها جهت طراحی آغازگرهای مورد نیاز با استفاده از نرم افزارهای AlleID7.0 و Oligo7 استفاده و جهت سنتز به شرکت ماکروژن (Macrogen, North Korea) سفارش داده شد. از ژن اکتین که دارای بیان یکسانی در تمام مراحل نمونه برداری است به عنوان ژن مرجع استفاده شد. مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است.

چشمی بررسی شد. گیاهان شاهد تنها با بافر فسفات مایه-زنی شدند. پس از انجام مایه‌زنی مکانیکی، نمونه برداری-های مورد نظر صورت گرفت. بدین ترتیب که اولین نمونه برداری درست قبل از مایه‌زنی گیاهان هر دو ژنوتیپ انجام گرفت و به عنوان کنترل (زمان صفر) در نظر گرفته شد. نمونه برداری دوم یک ساعت پس از آلودگی، به طور همزمان از نمونه‌های آلوده شده با ویروس و تیمار شده با بافر فسفات (شاهد) صورت گرفت. به همین ترتیب نمونه برداری‌های بعدی پس از ۹، ۲۴ و ۷۲ ساعت در سه تکرار انجام شد و برای جلوگیری از تجزیه RNA موجود در بافت‌های نمونه برداری شده، بافت‌های برگ (۵ گرم) از هر گیاه شاهد و تیمار بلافاصله بعد از نمونه برداری در نیتروژن مایع قرار گرفته و به فریزر ۸۰- درجه سانتی-گراد منتقل شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA گیاهان

از ۰/۱ گرم بافت گیاهی جهت استخراج RNA توسط کیت RNX-Plus™ (Cinnagen, Tehran, Iran) طبق دستورالعمل سازنده استفاده شد. برای تعیین غلظت نمونه-ها، RNAهای استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر و الکتروفورز در ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت حذف DNA ژنومی از نمونه‌های RNA از آنزیم *DnaseI*, Rnase free (Fermentas) استفاده شد

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای طراحی شده در واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی

| Primer name | Sequence (5'-3') | Annealing temperature | Product length (bp) | Accession number |
|--|---|-----------------------|---------------------|------------------|
| MTL-F MTL-R | CGGAGGCAACTGTGG CCTGCTCAGCCATGTC | 59°C | 90 | Q5U7K6 |
| Chlorophyll a-b -F Chlorophyll a-b -R | CCATGTTTCGGATTCTTCG AAGTTGGTGGCGTAGG | 59°C | 115 | NM001154761 |
| NPR1-F NPR1-R | TACCCATCCACCGCT CCTCCATCTTGTACCGC | 59°C | 160 | NM001154115 |
| FKBP-F FKBP-R | AGTGCCCGCTGGAG GTCGAACACCGTGCC | 59°C | 120 | EU958134 |
| Actin-F Actin-R | AAGAGAGGCATCCTGACA CAGGGTGATCTTCAGGC | 59°C | 120 | J01238 |

واکنش qRT-PCR و آنالیز بیان ژن‌ها

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) ژن‌های *Chlorophyll a-b binding*، *FKBP*، *NPR1* و *Metallothionein-like protein*، پروتئین‌ها و اکتین برای تیمارها صورت گرفت. به منظور استفاده از cDNAها در واکنش PCR کمی، نمونه‌ها باید رقت‌های متناسب و تا حد امکان مساوی داشته باشند به همین دلیل از هر cDNA رقت‌های ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۰۵ تهیه و از هر یک از رقت‌ها با آغازگرهای اکتین واکنش PCR انجام گرفت و سپس واکنش qRT-PCR در سه تکرار برای هر یک از ژن‌ها به همراه ژن مرجع توسط دستگاه iCycler (iQ5, BioRad, USA) انجام شد. این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت SYBR Green و دستگاه iQ5 در شرایط بهینه اجرا شد. چرخه‌های حرارتی واکنش شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و ۴۰ چرخه هر یک شامل ۹۴، ۵۷ و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۱۰ ثانیه تنظیم گردید. شرایط بهینه طوری فراهم شد که بازدهی واکنش در بهترین حالت ممکن باشد و هیچ محصول غیراختصاصی در طول واکنش تولید نشود که این امر با استفاده از منحنی ذوب (مشاهده یک پیک ذوب منفرد برای هر تیمار) تایید شد. سطح نسبی بیان ژن‌های مورد نظر در مقایسه با ژن کنترل مرجع، با استفاده از نرم افزار GenEx 6 بر اساس رابطه زیر تجزیه و تحلیل شدند (پافل ۲۰۰۱) و نمودارهای مربوط توسط Excel رسم شد.

$$R = \frac{(E_{target})^{\Delta C_{Ptarget}} (Mean\ control - Mean\ sample)}{(E_{ref})^{\Delta C_{Pref}} (Mean\ control - Mean\ sample)}$$

بر اساس این رابطه، نسبت تظاهر ژن هدف بر اساس راندمان تکثیر واکنش PCR (E) و تفاوت نقطه تقاطع (Δ) نمونه ناشناخته نسبت به شاهد محاسبه می‌شود. به همین دلیل است که کنترل راندمان واکنش از اهمیت بالایی

برخوردار است و در صورتیکه راندمان توسط سری‌های غلظت، محاسبه نشود نرم افزار عدد ۲ را جایگزین خواهد نمود.

استخراج آنزیم از بافت گیاهی

جهت سنجش فعالیت آنزیمی، نیم گرم بافت گیاهی در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع پودر و سپس یک میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار به آن اضافه و کاملاً مخلوط و در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتیگراد سانتریفوژ و از مایع رویی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد (روونی ۱۹۹۵).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت پراکسیداز از سوبسترای پیروگالل استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم، مقدار یک و نیم میلی‌لیتر پیروگالل تهیه شده به همراه نیم میلی‌لیتر عصاره‌ی آنزیمی و نیم میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد مخلوط شد. تغییرات جذب نور در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدتیکی دقیقه توسط دستگاه طیف سنج ثبت گردید (محمدی و کاظمی ۲۰۰۲).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۹۸۰ میکرولیتر از بافر فسفات شامل آب اکسیژنه دو میلی مولار مخلوط شدند و تغییرات جذب آنها در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف سنج به مدت دو دقیقه اندازه‌گیری و از دقیقه اول فعالیت کاتالاز محاسبه شد (لوک ۱۹۷۴).

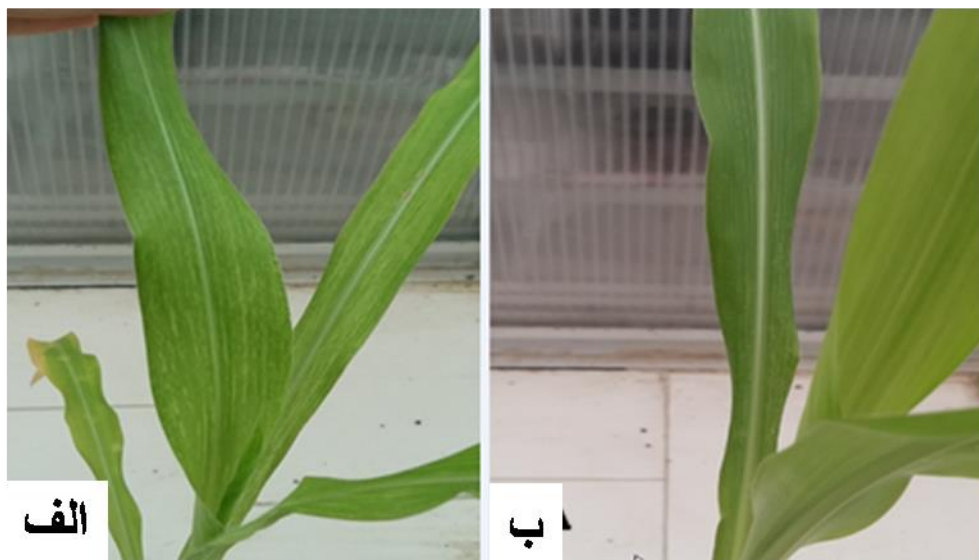
داده‌های کمی حاصل از بررسی میزان تغییر در آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی جهت مرتب کردن و رسم نمودارها به نرم‌افزار Excel وارد شدند. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت و میانگین‌ها به روش آزمون Duncan در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

آزمون‌های سرولوژیکی و گلخانه‌ای

نتایج آزمون الایزای غیر مستقیم نشان داد که گیاهان با علائم موزاییک دارای آلودگی به ویروس موزاییک

کوتولگی ذرت بودند. نتایج بیانگر ایجاد علائم موزاییک شدید در رقم حساس بعد از ۱۶ روز و موزاییک خفیف در هیبرید متحمل بعد از ۱۹ روز بود (شکل ۱).

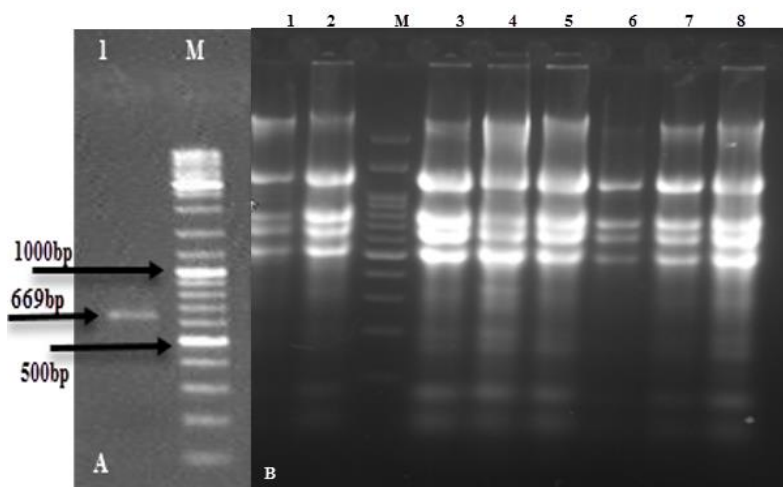


شکل ۱- علائم موزاییک شدید در رقم حساس (الف) و موزاییک خفیف در هیبرید متحمل (ب)

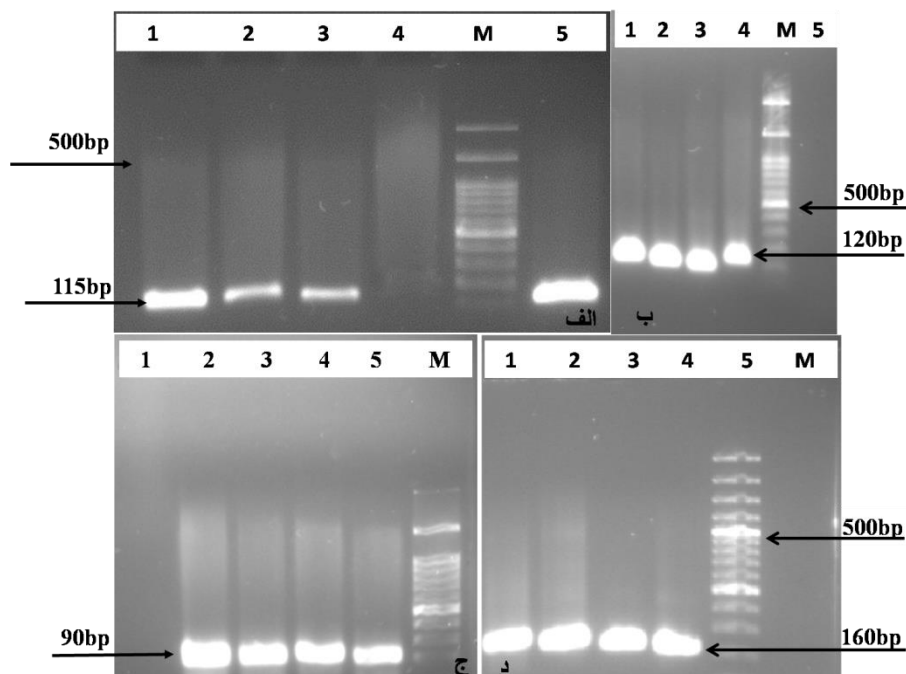
آزمون‌های مولکولی و تغییرات بیان ژن‌ها

در بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز، باندهای مربوط به قطعات rRNA مشاهده شد (شکل ۲ الف). cDNAهای سنتز شده در واکنش زنجیره‌ای پلی-مرارز با آغازگرهای ژن مرجع تایید شدند. نتیجه واکنش PCR از cDNA گیاهان مایه‌زنی شده به ویروس نیز نشان دهنده تکثیر قطعه ۶۶۹bp توسط آغازگرهای

اختصاصی ویروس بود. قطعه تکثیر شده در الکتروفورز ژل آگارز تایید شد (شکل ۲ ب). نتایج حاصل از PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که تمام آغازگرها قادر به تکثیر مولکولهای cDNA می‌باشند (شکل ۳). بدین ترتیب با تایید دمای ذوب هر آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرارز، از این آغازگرها برای بررسی میزان بیان ژن در واکنش qRT-PCR مورد استفاده قرار گرفت.



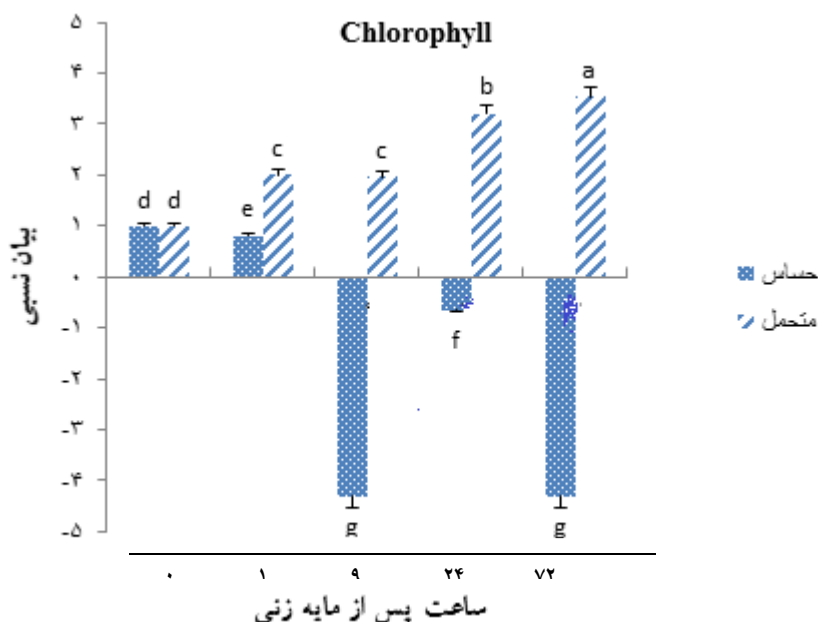
شکل ۲-الف: چاهک ۱: تکثیر ناحیه ژنی مربوط به ویروس در بافت‌های آلوده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *MDM1F/MDM1R*، *M*: نشانگر ۱۰۰ bp. ب: استخراج RNA در تیمارهای متحمل مربوط به هیبرید شماره ۸ (چاهک‌های ۱، ۲، ۶، و ۷ به ترتیب در بازه‌های زمانی ۱، ۲۴، ۷۲ و ۹۰ ساعت بعد از آلوده سازی با ویروس) و تیمارهای حساس مربوط به رقم SC705 (چاهک‌های ۳، ۴، ۵ و ۸ به ترتیب در بازه‌های زمانی ۱، ۲۴، ۷۲ و ۹۰ ساعت بعد از آلوده سازی با ویروس).



شکل ۳-الکتروفورز محصولات RT-PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن‌ها در بازه‌های زمانی ۱، ۲۴، ۷۲ و ۹۰ ساعت پس از مایه‌زنی با ویروس به ترتیب. الف: ژن اکتین در محدوده ۱۲۰ bp. چاهک ۱: نشانگر DNA 100bp Ladder؛ چاهک‌های ۲-۵: در گیاهان متحمل؛ چاهک‌های ۶-۹: در گیاهان حساس و چاهک‌های ۱۰-۱۱ گیاهان شاهد. ب: ژن *FKBP* در گیاهان حساس به ویروس (چاهک ۱-۴). کنترل منفی (چاهک ۵). ج: ژن *MT-LP* در گیاهان حساس به ویروس (چاهک ۲-۵). کنترل منفی (چاهک ۱). د: ژن *NPRI* در گیاهان حساس به ویروس (چاهک ۱-۴). کنترل منفی (چاهک ۵). *M*: نشانگر DNA 100bp Ladder

اتفاق افتاد و این کاهش تا ۷۲ ساعت نیز ادامه داشت. در گیاه متحمل پس از ۲۴ ساعت میزان رونوشت‌های ژن افزایش بیشتری داشت و در زمان ۷۲ ساعت با گیاه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد و از گیاه حساس ۳/۵ برابر بیشتر بود (شکل ۴).

میزان بیان ژن *Chlorophyll a-b binding* در گیاه حساس در زمان صفر اختلافی با گیاه متحمل نداشت ولی در بازه زمانی یک ساعت بعد از آلودگی میزان بیان این ژن در رقم متحمل بیش از دو برابر رقم حساس تعیین گردید. در زمان ۹ ساعت بعد از آلودگی، کاهش معنی‌داری در بیان این ژن در گیاه حساس نسبت به متحمل و شاهد



شکل ۴- آنالیز بیان ژن *Chlorophyll a-b binding* در گیاهچه‌های ذرت آلوده به MDMV در چهار بازه زمانی بعد از آلودگی با سه تکرار بیولوژیک و تکنیکی. در بازه‌های زمانی ۱، ۹، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی، بیان این ژن در رقم حساس در مقایسه با متحمل سرکوب شده است.

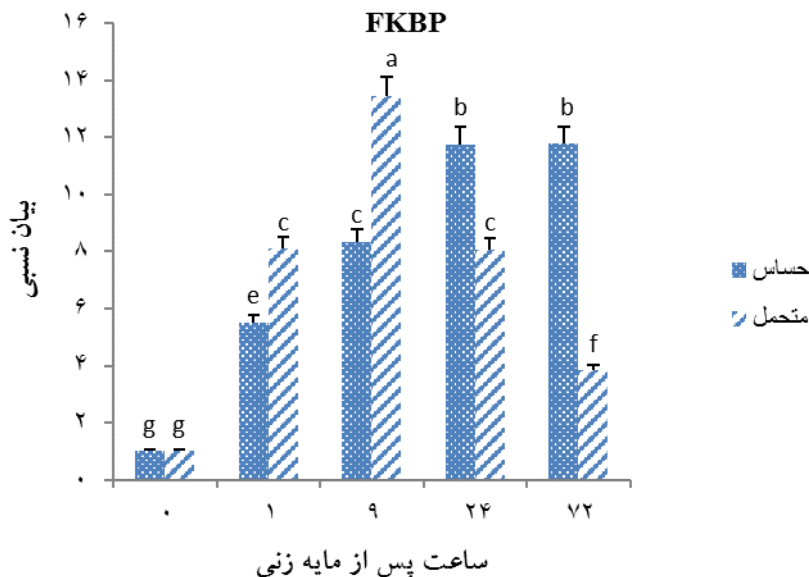
فیزیولوژیک ذرت آلوده به MDMV و تیمار شده با سالیسیلیک اسید، معنی‌دارترین تغییرات در فتوسنتز مشاهده شد و مطابق با یافته‌های بدست آمده در این بررسی، پروتئین *Chlorophyll a-b binding* گیاهان آلوده با ویروس نسبت به شاهد کاهش بیان داشتند. در مطالعات بسیاری مشخص شده است که وقتی گیاهان تحت استرس زنده یا آلودگی ویروسی قرار می‌گیرند، بیان پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز که بخش مهمی از پاسخ میزبان است کاهش می‌یابد (پیندا و همکاران ۲۰۱۰). تغییرات در بیان پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز نیز در تعدادی از

افزایش واکنش اکسیداتیو، پاسخ اولیه به حمله بیمارگر است که منجر به تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود. از طرفی کلروپلاست‌ها مکان اصلی محصول ROS هستند جایی که پروتئین‌های *Chlorophyll a-b binding* نقش کلیدی دارند (گالوز-والدیویزو و مولینوکس ۲۰۱۰) و می‌توانند از سلول‌ها در مقابل صدمه ROS‌ها محافظت کنند و میزان بیان آنها در زمان برهم کنش بیمارگر و گیاه افزایش یافته و باعث ایجاد مقاومت القایی گردد (کوئو-گینزو و همکاران ۲۰۱۶). در مطالعه کوئو-گینزو و همکاران (۲۰۱۶) در بین همه پارامترهای

شاخصی از تنش وارد شده به ذرت توضیح دهد (کوتو-گینزو و همکاران ۲۰۱۶).

میزان بیان ژن *FKBP* در ژنوتیپ متحمل با سرعت بیشتری نسبت به حساس افزایش نشان داد و در اولین ساعت پس از مایه‌زنی ویروس این افزایش مشاهده شد و در زمان ۹ ساعت پس از مایه‌زنی به اوج خود رسید اما کاهش سریع بیان در زمان ۲۴ ساعت در گیاه متحمل اتفاق افتاد و این کاهش در ۷۲ ساعت نیز مشاهده شد. در گیاه حساس، افزایش میزان رونوشت‌های ژن از یک ساعت اول آغاز و اوج آن در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد این افزایش همچنان در ۷۲ ساعت نیز دیده شد اما بین ۲۴ و ۷۲ ساعت در رقم حساس اختلاف معنی‌دار نبود (شکل ۵).

برهم کنش‌های گیاه-ویروس از قبیل آلودگی گیاه نخود به ویروس آبله‌ای آلو (*Plum pox virus, PPV*) و گیاه سویا به ویروس موزاییک سویا (*Soybean mosaic virus, SMV*) مشاهده شده است که بیان پروتئین روبیسکو هم کاهش نشان داده است (یانگ و همکاران ۲۰۱۱، دی کارلی و همکاران ۲۰۱۰ و کلمنت-مورنو و همکاران ۲۰۱۳). همچنین بیان پروتئین *Chlorophyll a-b binding* در گیاه برنج آلوده به ویروس کوتولگی گال سیاه (*Rice black gall dwarf virus, RBSDV*) کاهش یافته است (زو و همکاران ۲۰۱۳). با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و همچنین نتایج پژوهش‌های مشابه، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که پروتئین *Chlorophyll a-b binding* در تنش‌های مختلف گیاه ذرت نقش دارد و تحقیقات بیشتر در مورد دینامیک این پروتئین و ژن کد کننده‌ی آن، ممکن است پتانسیل آن را به عنوان



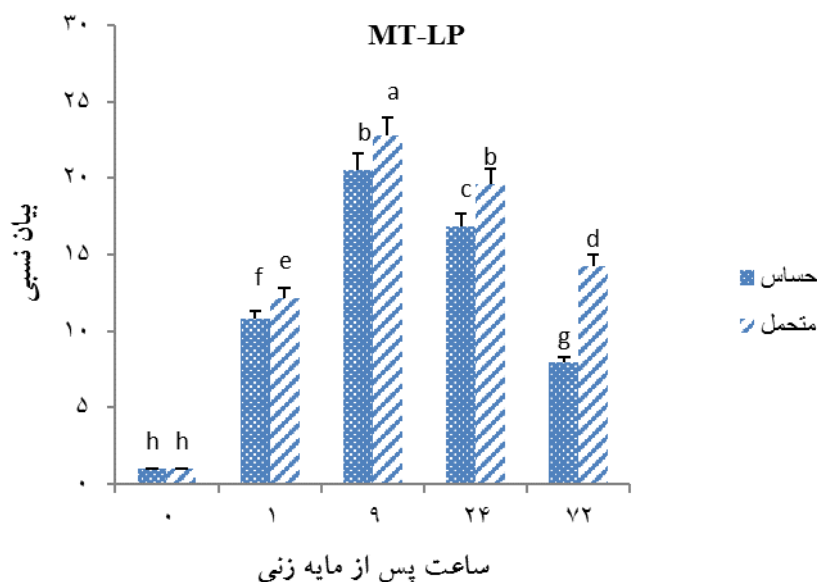
شکل ۵- آنالیز نرخ بیان ژن *FKBP* در گیاهچه‌های ذرت آلوده به *MDMV* در چهار بازه زمانی بعد از آلودگی با سه تکرار بیولوژیک و تکنیکی. با مقایسه تغییرات سطح آستانه با نمونه شاهد، بالاترین میزان بیان ژن در بازه زمانی ۹ ساعت بعد از آلودگی در رقم متحمل تعیین گردید.

تیمار شده با سالیسیلیک اسید و آلوده شده با *MDMV*، نتایج آنالیزهای پروتئومیکس نشان داد که نمودار بیان پروتئین *FKBP* در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید و گیاهانی که بعد از تیمار با سالیسیلیک اسید با ویروس نیز

در ذرت، ۳۰ ژن *FKBP* شناسایی شده است که روی ده کروموزم در بافت‌های مختلف گیاه واقع شده‌اند و نقش اساسی در متابولیسم گیاه ایفا می‌کنند (وانگ و همکاران ۲۰۱۲). در بررسی صورت گرفته روی پروتئوم ذرت پیش

میزان رونوشت‌های ژن شبه متالوتاینین (*MT-LP*) در ژنوتیپ حساس و متحمل در اولین ساعت پس از مایه‌زنی گیاهان با MDMV افزایش نشان داد که این افزایش در ژنوتیپ متحمل بیشتر بود و ۹ ساعت پس از آلودگی اوج بیان در ژنوتیپ متحمل بود که میزان رونوشت ژن مذکور ۲۲ برابر گیاه شاهد شد. در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت با وجود اختلاف معنی‌دار با گیاه شاهد اما روند بیان سیر کاهشی داشت (شکل ۶).

آلوده شدند، شروع کاهشی معنی‌دار و متعاقباً سیر افزایشی نشان داده‌اند و برعکس، *FKBP* در گیاهانی که تنها با ویروس مایه‌زنی شده بودند، افزایش بیان اولیه نشان داد (کوتو-گینزو و همکاران ۲۰۱۶). همچنین مطابق با یافته‌های این تحقیق، نتایج نشان داد که نرخ بیان گیاهان آلوده به ویروس در مقایسه با شاهد با گذشت زمان روند کاهشی داشته است بطوریکه ۱۴ و ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی با ویروس، بیان *FKBP* به ترتیب ۱/۳۷ و ۰/۷۹ برابر نسبت به گیاه شاهد سالم بوده است (کوتو-گینزو و همکاران ۲۰۱۶).



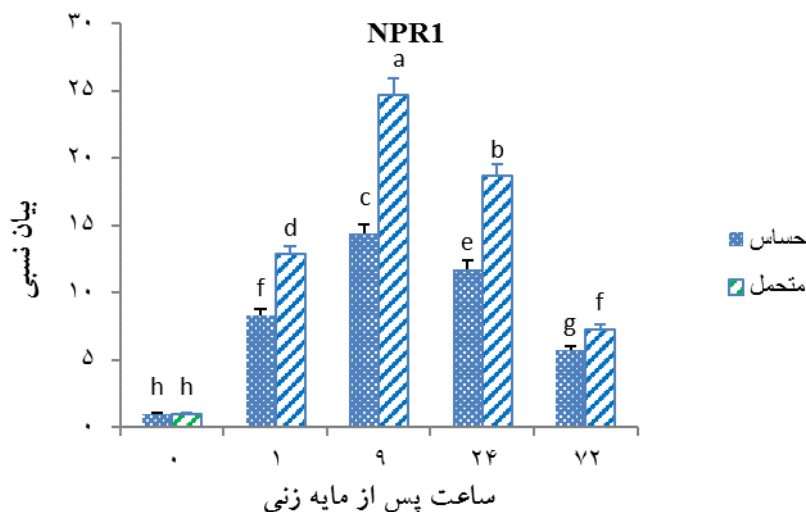
شکل ۶- آنالیز نرخ بیان ژن *MT-LP* در گیاهچه‌های ذرت آلوده به MDMV در چهار بازه زمانی بعد از آلودگی با سه تکرار بیولوژیک و تکنیکی. با مقایسه تغییرات سطح آستانه با نمونه شاهد، بالاترین میزان بیان ژن در بازه زمانی ۹ ساعت بعد از آلودگی در رقم متحمل تعیین گردید.

۷۲ ساعت پس از آلودگی سیر نزولی نشان داد، برای تایید این نتیجه تنش‌ها و مواد شیمیایی مختلف را جهت القای بیان این ژن مورد بررسی قرار دادند. نتایج نورترن بلات و هیبریداسیون نشان داد بیان ژن شبه متالوتاینین توتون در اثر خراش و آلودگی با TMV افزایش می‌یابد اما در تیمار گیاه با سالیسیلیک اسید، اتیلن و مس تغییری در بیان این ژن مشاهده نشد (چیو و همکاران ۱۹۹۶). آزمایشات

در مطالعه صورت گرفته روی گیاه توتون آلوده به ویروس موزاییک توتون (*Tobacco mosaic virus, TMV*) نتایج نشان داده است که بیان ژن شبه متالوتاینین در توتون در پاسخ دفاعی علیه TMV افزایش می‌یابد و مطابق با نتایج ما افزایش بیان ژن از اولین زمان‌های آلودگی تا ۱۲ ساعت (اوج بیان) رخ داد و در ۲۴ ساعت کاهش و در ۳۶ و ۴۸ ساعت مجدداً افزایش یافت و پس از آن از ۶۰ تا

بیان ژن *NPR1* در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل پس از مایه‌زنی نسبت به شاهد افزایش داشت، این نرخ بیان در زمان ۹ ساعت پس از مایه‌زنی به طور چشمگیری افزایش یافت که در ژنوتیپ متحمل و حساس به ترتیب ۲۴ و ۱۵ برابر بالاتر از شاهد بود. نرخ بیان این ژن در گیاه متحمل در زمان اوج بیان حدود ۲/۵ برابر بالاتر از رقم حساس بود. در ۲۴ ساعت پس از آلودگی، با وجود کاهش در سطح بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ، این نرخ در گیاه متحمل در مقایسه با رقم حساس اختلاف داشت. پس از آن در ۷۲ ساعت نرخ بیان بین دو ژنوتیپ اختلاف چندانی نشان نداد (شکل ۷).

ریزآرایه‌ای (Microarray) در زمان‌های مختلف از یک تا ۲۴ ساعت در ذرت آلوده شده با ویروس موزاییک نیشکر (*Sugarcane mosaic virus, SCMV*) و ویروس موزاییک کوتولگی ذرت، ۶۸ توالی که دارای تفاوت معنی‌داری در بیان بودند، در زمان‌های مورد بررسی شناسایی شدند که یکی از آنها ژن شبه متالوتائینین بود که همراه با چند ژن دیگر افزایش بیان‌شان با واکنش qRT-PCR نیز تایید شد. ژن شبه متالوتائینین در هر دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به ویروس از همان اولین ساعت پس از مایه‌زنی افزایش بیان نشان داد (اوزاروسکا و همکاران ۲۰۰۹) که با یافته‌های این بررسی مطابقت دارد.



شکل ۷- آنالیز نرخ بیان ژن *NPR1* در گیاهچه‌های ذرت آلوده به MDMV در چهار بازه زمانی بعد از آلودگی با سه تکرار بیولوژیک و تکنیکی. با مقایسه تغییرات سطح آستانه با نمونه شاهد، بالاترین میزان بیان ژن در بازه زمانی ۹ ساعت بعد از آلودگی در رقم متحمل تعیین گردید.

همکاران ۱۹۹۸). ثابت شده است که القای مقاومت توسط بیان *NPR1* می‌تواند به دلیل بیان سریع‌تر و بیشتر ژن‌های *PR* باشد. در ذرت ژن‌های *PR1* و *PR5* پس از آلودگی گیاه به سفیدک پودری با سرعت و میزان بیشتری در گیاه ناسازگار نسبت به گیاه سازگار به بیماری بیان می‌شوند (موریس و همکاران ۲۰۰۰). با توجه به نقش *NPR1* به عنوان تنظیم کننده کلیدی SAR و افزایش دهنده بیان تعداد زیادی از *PR* پروتئین‌ها و افزایش رونوشت این ژن در

NPR1 (Nonexpresser of PR Genes1) نسخه‌ی بیان نشده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی است، این ژن کد کننده‌ی یک فعال کننده رونویسی است که نقش اصلی را در تنظیم پاسخ دفاعی پروتئین‌های *PR* ایفا می‌کند. ژن *NPR1* در فعال کردن سیستمیک پاسخ‌های القا پذیردفاعی گیاه ضروری است. تحقیقات نشان داده است که افزایش بیان *NPR1* در گیاهان تراریخت مقاومت به بیمارگرها را با افزایش سطح بیان ژن‌های *PR* افزایش می‌دهد (کائو و

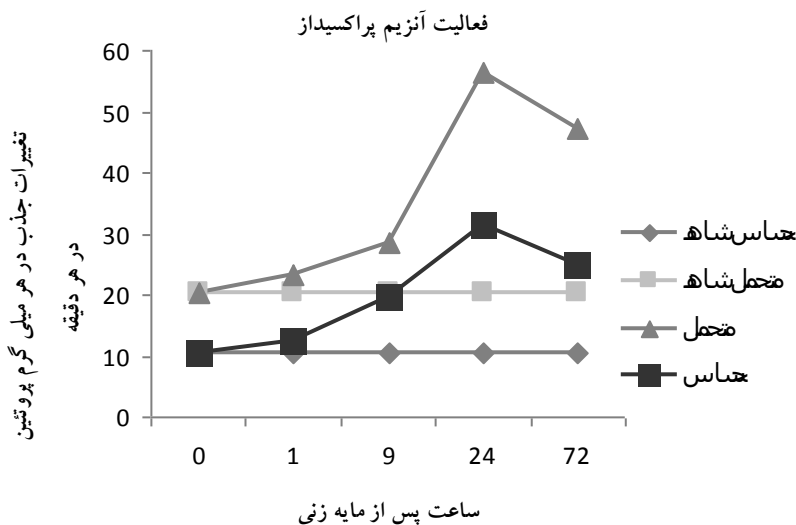
سیستم گیاه-ویروس باشد و نیاز است که جزئیات بیشتری مورد مطالعه قرار گیرد.

سنجش آنزیم‌ها

فعالیت آنزیم پراکسیداز با گذشت زمان در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل افزایش یافت اما در گیاه متحمل آلودگی ویروسی سبب افزایش فعالیت آنزیم در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نسبت به گیاه حساس شد. اوج فعالیت آنزیم در زمان ۲۴ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد که ۲/۷۵ برابر بیشتر از شاهد بود و پس از آن تا ۷۲ ساعت روند کاهشی داشت. همین روال در گیاه حساس نیز مشاهده شد اما در همه زمان‌ها نسبت به گیاه متحمل میزان فعالیت آنزیم کمتر بود و در زمان ۲۴ ساعت، فعالیت آنزیم ۴/۵ برابر شاهد بود (شکل ۸).

ژنوتیپ متحمل نسبت به حساس در این تحقیق، این احتمال وجود دارد که *NPRI* در پاسخ دفاعی گیاه به بیماری‌های ویروسی نیز نقش موثری داشته باشد.

با توجه به مسیرهای فعالیت هر یک از ژن‌های فوق، تغییرات بیان آنها در گیاه متحمل و حساس متغیر است و ژن‌هایی که در مسیرهای دفاعی دخیل هستند در گیاه متحمل بیان بیشتری نسبت به گیاه حساس دارند. پاسخ فوری گیاهان در برابر ویروس برای فعال‌سازی سریع مکانیسم‌های دفاعی ضروری است (اوزاروسکا و همکاران ۲۰۰۹) بطوریکه پس از گذشت اولین ساعت از آلودگی تغییرات در میزان رونوشت آنها آشکار شد. عدم تغییر بیان ژن‌ها در گیاهان شاهد نشان می‌دهد این اختلاف بیان مربوط به پاسخ گیاه به ویروس است. مشاهدات مختلف گروه‌های تحقیقاتی مختلف ممکن است به دلیل اختصاصی



شکل ۸- تغییرات آنزیم پراکسیداز در گیاه ذرت آلوده به MDMV در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی هر نقطه روی نمودار میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد است.

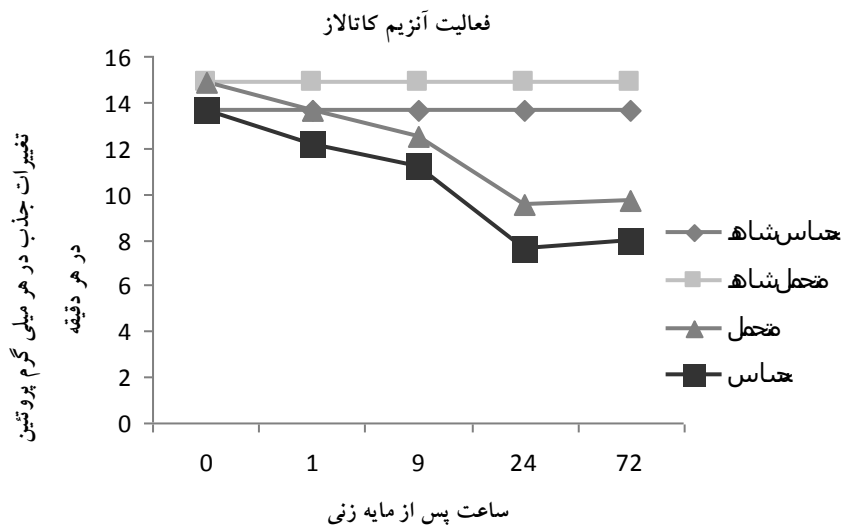
و همکاران ۲۰۱۰). مطابق با نتایج این تحقیق، در مطالعات صورت گرفته در مورد فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان

افزایش پراکسیداز می‌تواند دلیلی بر فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی در گیاه آلوده به ویروس باشد (اشفق

فعالیت آنزیم بود (گنکالوس و همکاران ۲۰۱۳) که با نتایج ما در این تحقیق مطابقت دارد. این نتایج نشان داد که آلودگی به ویروس با افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان آلوده ارتباط نزدیکی دارد که مطابق با نتایج سایر بررسی‌ها در مورد برهم‌کنش سیستمیک گیاه-ویروس است.

در فعالیت آنزیم کاتالاز در همه زمان‌های نمونه‌برداری بین گیاه شاهد حساس و شاهد متحمل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در گیاهان حساس و متحمل آلوده به ویروس، آنزیم کاتالاز نسبت به گیاه شاهد کاهش یافت و در هر دو ژنوتیپ، با گذشت زمان فعالیت آنزیم نسبت به شاهد کاهش یافت و پایین‌ترین سطح فعالیت در ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی ویروس اتفاق افتاد بطوریکه در گیاه متحمل کاهش ۱/۵ برابری و در گیاه حساس کاهش ۱/۸ برابری نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۹).

آلوده به بیمارگرها در زمان‌های مختلف افزایش فعالیت آنزیم ثبت شده است، در تحقیق روی گیاه پامچال (*Primulavulgaris*) آلوده به ویروس موزائیک نواری گندم (*Wheat streak mosaic virus, WSMV*) نتایج نشان داد که فعالیت پراکسیداز بعد از آلودگی گیاه به این ویروس بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد (کلارک و همکاران ۲۰۰۲). در بررسی صورت گرفته در گیاه ماش (*Vigna mungo*) حساس و مقاوم آلوده به ویروس چروکیدگی برگ ماش (*Urdbean leaf crinkle virus, ULCV*) فعالیت پراکسیداز در گیاه آلوده با گذشت زمان تا ۳۰ روز در هر دو ژنوتیپ افزایش نشان داد و این افزایش در گیاه مقاوم بطور معنی‌داری بیشتر از حساس بود (اشفق و همکاران ۲۰۱۰). در مطالعه‌ای دیگر در مقایسه فعالیت پراکسیداز در گونه‌ای از گیاه فلفل مقاوم آلوده شده و آلوده نشده به ویروس موزائیک زرد فلفل، نتایج نشان دهنده‌ی افزایش فعالیت آنزیم در زمان‌های اولیه پس از آلودگی و پس از آن کاهش



شکل ۹- تغییرات آنزیم کاتالاز در گیاه ذرت آلوده به MDMV در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی هر نقطه روی نمودار میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد است.

موزائیک توتون و مقایسه آنها با گونه‌ای از توتون مقاوم به این ویروس نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در

بررسی میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان فلفل و گوجه فرنگی حساس به ویروس

آلوده به ویروس WCIMV گزارش شده است (کلارک و همکاران ۲۰۰۰). هرناوندزو همکاران (۲۰۰۱) در گیاهان آلوی آلوده به ویروس آبله‌ای آلو (*Plum pox virus*) کاهش فعالیت کاتالاز نسبت به گیاهان سالم را گزارش کردند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. کاهش فعالیت کاتالاز پس از آلودگی گیاه به ویروس منجر به افزایش سطح پراکسید هیدروژن می‌شود که این امر احتمالاً باعث القاء مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) می‌شود (نانچاندر و همکاران ۱۹۹۵).

همه زمان‌های نمونه‌برداری در گیاهان مقاوم و حساس نسبت به شاهد کاهش محسوسی داشته است (ماهوسودان و همکاران ۲۰۰۸). تنش اکسیداتیو در برهم‌کنش گیاهان سازگار با ویروس‌های موزائیک خیار (*Cucumbermosaicvirus, CMV*) و موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV*) به ترتیب در خیار و کدو مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده است که در گیاهان آلوده، القاء سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز به صورت افزایش میزان بیان تجلی یافته است (ریدل-بائر ۲۰۰۰). کاهش فعالیت کاتالاز در گیاه پامچال

منابع

- Ashfaq M, Aslam Khan M, Javed N, Mughal SM, Shahid M and Sahi ST, 2010. Effect of urdbean leaf crinkle virus infection on total soluble protein and antioxidant enzymes in blackgram plants. *Pakistan journal of Botany* 42: 447-454.
- Bindschedler LV, Dewdney J, Blee KA, Stone MJ, Tsuneaki, A, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish Ch, Davies DR, Ausubel FM and Bolwell GP, 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant Journal* 47: 851-863.
- Cao H, Li X and Dong X, 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 6531-6536.
- Cheng Ch, Zhang Y, Zhong Y, Yang J and Yan Sh, 2016. Gene expression changes in leaves of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck infected by *Citrus tristeza virus*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 91: 466-475.
- Choi D, Kim HM, Yun HK, Park J, Kim WT and Bok SH, 1996. Molecular Cloning of a Metallothionein-Like Gene from *Nicotiana glauca* L. and Its induction by Wounding and Tobacco Mosaic Virus infection. *Plant Physiology* 11: 353-359.
- Clarke SF, Guy PL, Burrit DJ and Jameson PE, 2002. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiologia Plantarum* 114(2): 157-164.
- Clemente-Moreno MJ, Díaz-Vivancos P, Rubio M, Fernández-García N and Hernández JA, 2013. Chloroplast protection in Plum pox virus-infected peach plants by L-2-oxo-4-thiazolidine-carboxylic acid treatments: effect in the proteome. *Plant, Cell Environment* 36: 640-654.
- Converse RH and Martin RR, 1990. ELISA methods for plant viruses. APS Press. pp. 179-196.
- Cueto-Ginzo IA, Serrano L, Sin E, Rodríguez R, Morales JG, Lade SB, Medina V and Achon MA, 2016. Exogenous salicylic acid treatment delays initial infection and counteracts alterations induced by *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) in the maize proteome. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 96: 47-59.

- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D and Van Breusegem F, 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779-795.
- Deepaka Sh, Niranjana-Raja S, Shailasreea Sh, Kinia RK, Boland W, Shetty HS and Mithofer A, 2007. Induction of resistance against downy mildew pathogen in pearl millet by a synthetic jasmonate analogon. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 96-105.
- Di Carli M, Villani ME, Bianco L, Lombardi R, Perrotta G, Benvenuto E and Donini M, 2010. Proteomic analysis of the plant-virus interaction in *Cucumber mosaic virus* (CMV) resistant transgenic tomato. *Journal of Proteome Research* 9: 5684-5697.
- Doubnerova V, Janoskova M, Synkova H, Subr Z, Cerovska N and Ryslava H, 2007. Effect of potato virus Y on the activities of antioxidant and anaplerotic enzymes in *Nicotiana tabacum* L. transgenic plants transformed with the gene for p3 protein. *Genetic Applied Plant Pathology* 33: 123-140.
- Du YY, Wang PC, Chen J and Song CP, 2007. The comprehensive functional analysis of catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 121: 16-23.
- Ford RE, Tosic M, Shukla DD, 2004. Maize dwarf Mosaic Virus. AAB Descriptions of Plant Viruses Online: Description no. 341.
- Gandia M, Conesa A, Ancillo G, Gadea J, Forment J, Pallás V and Guerri J, 2007. Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus*. *Virology* 367: 298-306.
- Galvez-Valdivieso G, Mullineaux PM, 2010. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiologia Plantarum* 138: 430-439.
- Goncalves LSA, Rodrigues R, Diz MSS, Robaina RR, Do Amaral Junior AT, Carvalho AO and Gomes VM, 2013. Peroxidase is involved in Pepper yellow mosaic virus resistance in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Genetic and molecular research* 12: 1411-1420.
- Hernandez JA, Talavera JM, Martínez-Gómez P, Dicenta F and Sevilla F, 2001. Response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. *Physiologia Plantarum* 111: 313-321.
- Lee DH and Lee CB, 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science* 159: 75-85.
- Liu Y, Wang G, Wang Z, Yang F, Wu G and Hong N, 2012. Identification of differentially expressed genes in response to infection of a mild *Citrus tristeza virus* isolate in *Citrus aurantifolia* by suppression subtractive hybridization. *Scientia Horticulturae* 134: 144-149.
- Luck H, 1974. *Methods in Enzymatic Analysis*. 2nd Ed. Academic Press. New York.
- Ludmerszki E, Almasi A, Racz I, Szigeti Z, Solti A, Olah C and Rudnoy S, 2015. S-methylmethionine contributes to enhanced defense against Maize dwarf mosaic virus infection in maize. *Brazilian Journal of Botany* 38(4): 771-782.
- Madhusudhan KN, Srikanta BM, Shylaja MD, Prakash HS and Shetty HS, 2008. Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible and incompatible host-tobamovirus interaction. *Journal of Plant Interactions* 4: 157-166.
- Maule A, Leh V and Lederer C, 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 279-284.
- Mohammadi, M and Kazemi H, 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Journal of Plant Science* 162: 491-498.

- Morris K, Mackerness SA, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP and Buchanan-Wollaston V, 2000. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal* 23: 677- 685.
- Mostafavi Neishaburi FS, Masumi M, Nasrollanejad S, Rahpeyma-Sarvestani N, Izadpanah K. 2015. Analyses of complete nucleotide sequence of iranian isolate of maize dwarf mosaic virus (MDMV) and notes on the origin and evolution of MDMV. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51:69-81.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L, Uknes, S., Kessmann, H. & Ryals, J. (1995). Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance?. *Plant Journal*, 8,227_233.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29:2002-2007.
- Pechanova O and Pechan T, 2015. Maize-Pathogen Interactions: An Ongoing Combat from a Proteomics Perspective. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 28429-28448.
- Pineda M, Sajnani C and Baron M, 2010. Changes induced by the Pepper mild mottle tobamovirus on the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana*. *Photosynthesis Research* 103: 31.
- Reuveni R, 1995. Biochemical markers as tools for screening resistance against plant pathogens, In: Reuveni, R. (Eds.), *Novel Approaches to Integrated Pest Management*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 21-45.
- Riedle-Bauer M, 2000. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *Journal of Phytopathology* 148:297_302.
- Uzarowska A, Dionisio G, Sarholz B, Piepho HP, Xu M, Ingvarsdson CR, Wenzel G and Lubberstedt T, 2009. Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. *BMC Plant Biology* 9: 15.
- Wang WW, Ma Q, Xiang Y, Zhu SW and Cheng BJ, 2012. Genome-wide analysis of immunophilin FKBP genes and expression patterns in *Zea mays*. *Genetics and Molecular Research* 11: 1690-700.
- Wu L, Wang S, Chen X, Wang X and Wu L, 2013. Proteomic and Phytohormone Analysis of the Response of Maize (*Zea mays* L.) Seedlings to *Sugarcane Mosaic Virus*. *PLoS ONE* 8: 1-17.
- Xu Q, Ni H, Chen Q, Sun F, Zhou T, Lan Y and Zhou Y, 2013. Comparative proteomic analysis reveals the cross-talk between the responses induced by H₂O₂ and by long-term *Rice Black-streaked dwarf virus* infection in rice. *PLoS ONE* 8: 81640.
- Yang F, Wang G, Jiang B, Liu YH, Liu Y, Wu GW and Hong N, 2013. Differentially expressed genes and temporal and spatial expression of genes during interactions between Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) and a severe *Citrus tristeza virus* isolate. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 83: 17-24.
- Yang H, Huang Y, Zhi H and Yu D, 2011. Proteomics-based analysis of novel genes involved in response towards soybean mosaic virus infection, *Molecular Biology Reports* 38: 511-521.
- Zare Z, Nasrollahnejad N, Sadeghi Z, Mosavat A, Rzinotaj M. 2016. Effect of maize dwarf mosaic virus in morphological features of 12 hybrids of maize. Thesis in Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources. 120 pp.

Molecular Study on Some of Physiological Changes in Susceptible and Tolerant Genotypes of Maize in Response to Maize Dwarf Mosaic Virus Infection

F S Mostafavi Neishaburi¹, S K Sabbagh^{21*}, A Yamchi³, S Nasrollanejad⁴ and N Panjekeh⁵

¹Ph. D. Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran.

²Associate Professor, Department of Biology, Campus of Sciences. Yazd University, Iran.

³Assistant Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Iran.

⁴Associate Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Iran.

⁵Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran.

Received: 24 August 2017

Accepted: 3 March 2018

Abstract

In this work, the changes of antioxidant enzymes activity were studied by spectrophotometry method and expression level of *NPR1*, *FKBP*, *Chlorophyll a-b binding protein* and *Metallothionein-like protein* genes in two tolerant and susceptible genotypes of maize in response to maize dwarf mosaic virus was investigated by qRT-PCR method. Experiment was done in green-house condition by mechanical inoculation and sampling was carried out at different time intervals (0, 1, 9, 24, 72) hours post inoculation (hpi). The results showed a significant increase of peroxidase activity in the tolerant genotype at all sampling times when compared to the susceptible genotype. The highest increase of peroxidase enzyme was recorded at 24hpi for both genotypes in comparison to the control plants, but after 72hpi the rate of peroxidase enzyme was reduced. Catalase enzyme activity was significantly reduced at all sampling time after virus inoculation when compared to the control plants. Gene expression analysis showed that the related expression of *NPR1* and *MT-LP* genes were increased in both genotypes but this increase was significant only in the tolerant genotype. The expression level of *FKBP* gene in the tolerant genotype increased at the early times after virus inoculation and was decreased more rapidly than susceptible cultivar. The expression changes of Chlorophyll a-b binding gene plants significantly reduced in susceptible plants compared to the control plants. Changes in the antioxidant enzyme activity and gene expression could be used as bio-markers for virus-plant interaction studies and the associated markers may be selected for plant resistance to viral disease

Keywords: Catalase, Gene expression, Maize dwarf mosaic virus, Peroxidase.

Abbreviations: MDMV= maize dwarf mosaic virus; BgSMV= bermudagrass southern mosaic virus; qRT-PCR= quantitative real-time polymerase chain reaction; SAM= S-adenosyl methionine synthase; Prx= peroxiredoxin; GF14-6=G-box factor 14-6; GLP= Germin-like protein; MT-LP= Metallothionein like protein; NPR1= nonexpressor of pathogenesis related genes1