بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده تولید گیاهی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی‌ارشد در رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی

بررسی الگوی بیان برخی ژن‌های دخیل در واکنش دفاعی گندم نسبت به سپتوریای برگی

پژوهش و نگارش

سیما تدین

استاد راهنما

دکتر سیده‌ساناز رمضان‌پور

اساتید مشاور

دکتر حسن سلطانلو

مهندس شعبان کیا

۱۳۹۰

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **سیما تدین** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی در کشاورزی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به گلهای سرسبد بوستان زندگیم

پدر بزرگوار و مادر مهربانم

و همسرم

که زندگی‌ام در کنار او معنا یافت و سرچشمه محبتی عمیق و ابدی است

و استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر سیده سانازر مضانپور

که نبض خاطرم همه لحظه به پاس راهنمایشان به یاد ایشان خواهد بود.

چکیده

گندم یکی از گیاهان مهم اساسی و یک منبع غذایی غنی، اقتصادی و مناسب است. عوامل بیماری‌زا، آفات، علف‌های هرز و تنش‌های غیر زنده از جمله فاکتورهایی هستند که باعث کاهش عملکرد گندم می‌شوند. یکی از بیماری‌های مهم قارچی در گندم، بیماری سپتوریای برگی گندم است که عامل آن در مرحله جنسی *Mycosphaerella graminicola* می‌باشد. در این مطالعه به منظور بررسی و تأیید تفاوت در واکنش ژنوتیپ مقاوم و حساس، در مرحله‌ی گیاهچه‌ای صفات سطح نکروز، سطح پوشش پیکنیدی و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای هر صفت و در مرحله‌ی گیاه کامل شدت بیماری و سطح زیر منحنی پیشرفت شدت بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج برای هر دو آزمایش گیاهچه‌ای و گیاه کامل نشان داد که بین ژنوتیپ لاین مقاوم و رقم حساس تجن برای هر کدام از صفات مورد ارزیابی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. سپس به منظور بررسی الگوی بیان برخی از ژن‌های دخیل در واکنش‌های دفاعی سه رقم گندم به سپتوریای برگی و نیز برای تعیین زمان برهم‌کنش گندم- عامل بیماری سپتوریای برگی در واکنش سازگار و ناسازگار بین آنها، الگوی تظاهر ژن‌های بتا-۱،۴-گلوکاناز، بتا-۱،۳،۴،۱-گلوکاناز، اسیدیک کیتیناز در مرحله‌ی دو برگی در ژنوتیپ لاین مقاوم، رقم متحمل آرتا و رقم حساس تجن در شرایط گلخانه‌ای با استفاده از روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. همچنین الگوی تظاهر ژن‌های بتا-۱،۳-گلوکاناز، بتا-۱،۴-گلوکاناز، بتا-۱،۳،۴،۱-گلوکاناز، PR-1.2، اسیدیک کیتیناز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، کالکون سینتاز و اگزالات اکسیداز در شرایط مزرعه‌ای در ژنوتیپ لاین مقاوم و رقم حساس تجن بررسی شد. تجزیه و تحلیل نتایج در نرم‌افزار REST نشان دهنده بیان افتراقی این ژن‌ها بین ارقام حساس و مقاوم به سپتوریای برگی بود. مقایسه نتایج به دست آمده در شرایط گیاهچه‌ای و گیاه کامل، حاکی از آن بود که ژن‌های اسیدیک کیتیناز، بتا-۱،۳-گلوکاناز و اگزالات اکسیداز کاندیداهای خوبی به‌عنوان ژن‌های واکنش دفاعی گندم به بیماری لکه‌برگی سپتوریایی محسوب می‌شوند. ژن‌های کالکون سینتاز و PR-1.2 در شرایط گیاه کامل و ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در شرایط گیاهچه‌ای در مسیر سیگنال مقاومت نقش داشتند. ژن‌های بتا-۱،۴-گلوکاناز، بتا-۱،۳،۴،۱-گلوکاناز نقشی در مسیر سیگنال مقاومت نداشتند.

واژه‌های کلیدی: سطح زیر منحنی، پیشرفت بیماری، مایکوسفارلاگرامینیوکولا، Real-Time PCR، بیان افتراقی، انتقال سیگنال

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم: مرور منابع

۲-۱- گندم ۸

۲-۱-۱- تاریخچه و کلیات گندم ۸

۲-۱-۲- اهمیت اقتصادی ۸

۲-۱-۳- ارزش و اهمیت غذایی گندم ۸

۲-۱-۴- تاکسونومی و ژنتیک گندم ۹

۲-۲- بیماری لکه برگی سپتوریایی گندم ۱۰

۲-۲-۱- سایر اسامی بیماری ۱۰

۲-۲-۲- تاریخچه و اهمیت اقتصادی قارچ عامل بیماری لکه برگی سپتوریایی ۱۰

۲-۲-۳- زیست شناسی عامل بیماری لکه برگی سپتوریایی ۱۳

۲-۲-۴- پراکنش بیماری ۱۵

۲-۲-۵- میزبان‌ها ۱۵

۲-۲-۶- سیکل زندگی عامل بیماری لکه برگی سپتوریایی ۱۶

۲-۲-۷- علائم بیماری لکه برگی سپتوریایی ۱۸

۲-۲-۸- اپیدمی بیماری ۲۰

۲-۲-۹- کنترل بیماری ۲۱

۲-۳- پروتئین‌های قارچی ۲۳

۲-۳-۱- آنزیم‌های هیدرولیتیک ۲۴

۲-۳-۲- پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی ۲۴

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۴- بررسی بیان ژن دخیل در واکنش دفاعی و مطالعه تغییر در الگوی بیان ژن ۲۷
۲-۴-۱- کاربرد روش qRT-PCR ۲۷
۲-۴-۲- اصول روش qRT-PCR ۲۸
۲-۴-۳- روش استفاده از رنگینه‌های DNA دو رشته‌ای ۲۹
۲-۴-۴- روش‌های ارزیابی کمّی ۳۰
۲-۴-۴-۱- ارزیابی مطلق ۳۱
۲-۴-۴-۲- ارزیابی نسبی ۳۱
۲-۴-۴-۲-۱- راندمان تکثیر متفاوت ۳۱
۲-۴-۴-۲-۲- راندمان تکثیر یکسان ۳۲
۲-۴-۵- اندازه‌گیری بیان ژن ۳۲
۲-۵- مروری بر مطالعات گذشته ۳۳

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- تهیه و تکثیر پاتوژن عامل بیماری لکه برگی سپتوریایی ۵۰
۳-۱-۱- کشت، جداسازی و خالص‌سازی قارچ عامل بیماری ۵۰
۳-۱-۲- تهیه مایه تلقیح ۵۱
۳-۱-۳- کشت بذور و آلوده‌سازی گیاهچه‌ها به عامل بیماری ۵۲
۳-۱-۴- نمونه‌گیری از برگ‌های آلوده‌شده به قارچ عامل بیماری ۵۴
۳-۲- صفات مورد مطالعه در مرحله گیاهچه‌ای ۵۶
۳-۳- صفات مورد مطالعه در مرحله گیاه کامل ۵۷
۳-۴- استخراج RNA ۵۸
۳-۴-۱- مراحل استخراج RNA ۵۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۴-۱-۱- همگن کردن ۵۸
۳-۴-۱-۲- جداسازی فازها ۵۹
۳-۴-۱-۳- رسوب RNA ۵۹
۳-۴-۲- تعیین غلظت RNA با استفاده از اسپکتوفتومتر ۵۹
۳-۵- تیمار DNase ۶۰
۳-۵-۱- ساخت cDNA ۶۰
۳-۶- انجام روش qRT- PCR ۶۱
۳-۶-۱- تجزیه داده‌ها ۶۳
۳-۶-۲- منحنی‌های ذوب ۶۳

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- نتایج صفات مورد مطالعه در مرحله گیاهچه‌ای ۶۸
۴-۱-۱- نکروز و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای آن (nAUDPC) ۶۸
۴-۱-۲- پیکنید و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای آن (pAUDPC) ۶۹
۴-۲- نتایج صفات مورد مطالعه در شرایط گیاه کامل ۷۱
۴-۲-۱- شدت بیماری و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای آن (sAUDPC) ۷۱
۴-۳- نتایج آزمایشات مطالعه‌ی تغییر در الگوی بیان ژن‌های دخیل در واکنش دفاعی ۷۳
۴-۳-۱- استخراج RNA ۷۳
۴-۴- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه‌برداری معکوس در زمان واقعی ۷۴
۴-۵- ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده ۷۵
۴-۶- نتایج آزمون qRT-PCR ۷۶
۴-۶-۱- نتایج آزمون QRT-PCR در شرایط گلخانه‌ای ۷۶

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۴-۶-۱-۱- بررسی الگوی تظاهر ژن اسیدیک کیتیناز ۷۶
۴-۶-۱-۲- بررسی الگوی تظاهر ژن بتا-۱،۴-گلوکاناز ۷۹
۴-۶-۱-۳- بررسی الگوی تظاهر ژن بتا-۱،۳؛۱،۴-گلوکاناز ۸۲
۴-۶-۲- نتایج آزمون QRT-PCR در شرایط مزرعه‌ای ۸۴
۴-۶-۲-۱- بررسی الگوی تظاهر ژن اسیدیک کیتیناز ۸۴
۴-۶-۲-۲- بررسی الگوی تظاهر ژن بتا-۱،۴-گلوکاناز ۸۷
۴-۶-۲-۳- بررسی الگوی تظاهر ژن بتا-۱،۳؛۱،۴-گلوکاناز ۸۸
۴-۶-۲-۴- بررسی الگوی تظاهر ژن بتا-۱،۳-گلوکاناز ۹۰
۴-۶-۲-۵- بررسی الگوی تظاهر ژن PR1.2 .....۹۳
۴-۶-۲-۶- بررسی الگوی تظاهر ژن کالکون سینتاز ۹۵
۴-۶-۲-۷- بررسی الگوی تظاهر ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز ۹۸
۴-۶-۲-۸- بررسی الگوی تظاهر ژن اگزالات اکسیداز ۱۰۲
۴-۷- نتیجه‌گیری نهایی ۱۰۵
۴-۸- پیشنهادات ۱۱۱
فهرست منابع ۱۱۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- زمان‌های نمونه‌گیری برای انجان آزمایش QRT-PCR ۵۵
جدول ۳-۲- مشخصات آغازگرهای ژن‌های مورد استفاده برای آزمایش Real-Time -PCR..... ۶۲
جدول ۳-۳- شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۶۳
جدول ۴-۱- تجزیه واریانس برای صفت نکروز در شرایط گیاهچه‌ای با استفاده از طرح کاملاً تصادفی .. ۶۸
جدول ۴-۲- میانگین صفات برای ارقام مورد نظر ۶۸
جدول ۴-۳- تجزیه واریانس برای صفت پیکنید در شرایط گیاهچه‌ای با استفاده از طرح کاملاً تصادفی .. ۷۰
جدول ۴-۴- میانگین صفات برای ارقام مورد نظر ۷۰
جدول ۴-۵- تجزیه واریانس برای صفت شدت بیماری در شرایط گیاه کامل..... ۷۲
جدول ۴-۶- میانگین صفات برای ارقام مورد نظر ۷۲

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- ایجاد بیماری توسط قارچ عامل بیماری ۱۵
شکل ۲-۲- چرخه‌ی غیرجنسی قارچ عامل بیماری لکه برگی سپتوریایی ۱۸
شکل ۲-۳- برگ گندم آلوده به بیماری سپتوریایی با پیکنیدهای سیاه رنگ ۱۹
شکل ۲-۴- شکل فضایی سایبرگرین ۳۰
شکل ۳-۱- استفاده از برگ آلوده دارای پیکنید برای تکثیر قارچ عامل بیماری ۵۱
شکل ۳-۲- کلنی‌های سفید صورتی رنگ قارچ *S.tritici* ۵۱
شکل ۳-۳- قرار دادن ارلن‌های حاوی قارچ عامل بیماری روی شیکرها ۵۲
شکل ۳-۴- تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ برای مایه‌زنی ۵۲
شکل ۳-۵- بذور جوانه‌دار شده در پتری‌دیش ۵۳
شکل ۳-۶- کشت بذور در گلدان‌ها ۵۳
شکل ۳-۷- رشد یکنواخت گیاهچه‌های گندم در گلدان‌ها ۵۴
شکل ۳-۸- قرار دادن پوشش پلاستیکی روی گلدان‌ها برای حفظ رطوبت پس از اسپورپاشی ۵۴
شکل ۳-۹- نمونه‌گیری از دو برگ اول و قرار دادن بافت برگ در فویل آلومینیومی ۵۵
شکل ۳-۱۰- علایم نکروز حاوی پوشش پیکنیدی در برگ‌های اولیه‌ی رقم حساس تجن ۵۷
شکل ۳-۱۱- کوبیدن برگ‌های منجمد شده در ازت مایع ۵۸
شکل ۳-۱۲- منحنی ذوب آغازگر اختصاصی بتا-۱،۴-گلوکاناز برای ژنوتیپ لاین مقاوم ۶۵
شکل ۴-۱- نمودار مقایسه میانگین برای صفت نکروز در مرحله گیاهچه‌ای برای ارقام مورد نظر ۶۹
شکل ۴-۲- نمودار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای صفت نکروز در مرحله گیاهچه‌ای برای ارقام مورد نظر ۶۹
شکل ۴-۳- نمودار مقایسه میانگین برای صفت پیکنید در مرحله گیاهچه‌ای ۷۰
شکل ۴-۴- نمودار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای صفت پیکنید در مرحله گیاهچه‌ای ۷۱
شکل ۴-۵- نمودار شدت بیماری در مرحله‌ای گیاه کامل ۷۲

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۶- نمودار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای صفت شدت بیماری در مرحله گیاه کامل ۷۳
شکل ۴-۷- تصویر باندهای RNAی استخراج شده ۷۴
شکل ۴-۸- منحنی تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن کیتیناز در ژنوتیپ لاین مقاوم..... ۷۵
شکل ۴-۹- اختصاصی عمل نمودن آغازگرهای طراحی شده برای روش QRT-PCR روی
ژل آگارز با cDNA ۷۶
شکل ۴-۱۰- تظاهر ژن اسیدیک کیتیناز در ژنوتیپ لاین مقاوم ۷۸
شکل ۴-۱۱- تظاهر ژن اسیدیک کیتیناز در رقم حساس تجن ۷۸
شکل ٤-۱۲- تظاهر ژن اسیدیک کیتیناز در رقم متحمل آرتا..... ۷۹
شکل ۴-۱۳- تظاهر ژن بتا-۱،۴-گلوکاناز در ژنوتیپ لاین مقاوم..... ۸۰
شکل ۴-۱۴- تظاهر ژن بتا-۱،۴-گلوکاناز در رقم متحمل آرتا ۸۱
شکل ۴-۱۵- تظاهر ژن بتا-۱،۴-گلوکاناز در رقم حساس تجن..... ۸۱
شکل ۴-۱۶- تظاهر ژن بتا-۱،۳؛۱،۴-گلوکاناز در ژنوتیپ لاین مقاوم ۸۳
شکل ۴-۱۷- تظاهر ژن بتا-۱،۳؛۱،۴-گلوکاناز در رقم متحمل آرتا..... ۸۳
شکل ۴-۱۸- تظاهر ژن بتا-۱،۳؛۱،۴-گلوکاناز در رقم حساس تجن ۸۴
شکل ۴-۱۹- تظاهر ژن اسیدیک کیتیناز در ژنوتیپ لاین مقاوم ۸۶
شکل ۴-۲۰- تظاهر ژن اسیدیک کیتیناز در رقم حساس تجن ۸۶
شکل ۴-۲۱- تظاهر ژن بتا-۱،۴-گلوکاناز در ژنوتیپ لاین مقاوم..... ۸۷
شکل ۴-۲۲- تظاهر ژن بتا-۱،۴-گلوکاناز در رقم حساس تجن..... ۸۸
شکل ۴-۲۳- تظاهر ژن بتا-۱،۳؛۱،۴-گلوکاناز در ژنوتیپ لاین مقاوم ۸۹
شکل ۴-۲۴- تظاهر ژن بتا-۱،۳؛۱،۴-گلوکاناز در رقم حساس تجن ۸۹
شکل ۴-۲۵- تظاهر ژن بتا-۱،۳-گلوکاناز در ژنوتیپ لاین مقاوم..... ۹۲
شکل ۴-۲۶- تظاهر ژن بتا-۱،۳-گلوکانار در رقم حساس تجن..... ۹۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۲۷- تظاهر ژن PR1.2 در ژنوتیپ لاین مقاوم ۹۵
شکل ۴-۲۸- تظاهر ژن PR1.2 در رقم حساس تجن ۹۵
شکل ۴-۲۹- تظاهر ژن کالکون سینتاز در ژنوتیپ لاین مقاوم ۹۷
شکل ۴-۳۰- تظاهر ژن کالکون سینتاز در رقم حساس تجن ۹۸
شکل ۴-۳۱- تظاهر ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در ژنوتیپ لاین مقاوم ۱۰۱
شکل ۴-۳۲- تظاهر ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در رقم حساس تجن ۱۰۱
شکل ۴-۳۳- تظاهر ژن اگزالات اکسیداز در ژنوتیپ لاین مقاوم ۱۰۴
شکل ۴-۳۴- تظاهر ژن اگزالات اکسیداز در رقم حساس تجن ۱۰۴

فصل اول

مقدمه

۱-۱) مقدمه

گندم یک محصول غذایی اساسی در ایران و سرتاسر جهان و نیز مهم‌ترین کالای کشاورزی در تجارت بین‌المللی به شمار می‌آید. محصول گندم از دیر باز به طور مستقیم و غیرمستقیم با زندگی روزانه مردم عجین شده و درهم آمیخته است. گندم محصول غذایی بیش از یک سوم جمعیت جهان است (رحمان و همکاران، ۲۰۰۸) و با اختصاص ۲۰ درصد از سطح زیر کشت جهانی و به عنوان عمده‌ترین منبع غذایی برای ۳۵ درصد جمعیت جهان، مهم‌ترین محصول غله به شمار می‌رود (روح پرور، ۲۰۰۷). از آنجا که کشاورزی و تولید مواد غذایی رکن اصلی یک جامعه را تشکیل می‌دهد و از طرف دیگر جمعیت جهان به طور فزاینده‌ای در حال افزایش است و به لحاظ اینکه عمر منابع طبیعی محدود می‌باشد، باید به روش‌هایی دست یافت که با مصرف حداقل انرژی به بیشترین بازدهی محصول رسید (هریوندی، ۱۳۷۹).

نان، قوت غالب جهانیان از جمله ما ایرانیان است و تأمین آن در زمره اولین اولویت‌های جوامع بشری به شمار می‌آید. بنابراین، برنامه‌ریزی و اعمال مدیریت به منظور افزایش تولید این محصول ضروری است. مهم‌ترین محصول کشاورزی ایران، گندم بوده و نان به عنوان عمده‌ترین مورد مصرف آن بیش از ۵۰ درصد کالری روزانه را تأمین می‌نماید (روح پرور، ۲۰۰۷). با توجه به جمعیت روزافزون ایران و جهان و نیاز فزاینده به مواد غذایی، خصوصاً گندم و با توجه به اهمیت خودکفایی در تأمین مواد غذایی، تأمین گندم مورد نیاز کشور از طریق تولید داخلی اجتناب‌ناپذیر به نظر می‌رسد. به طوری که خودکفایی در تولید، یکی از سیاست‌های مهم وزارت کشاورزی در طی سال‌های گذشته بوده است (رحیمی و خسروانی، ۱۳۸۴). اهمیت فوق‌العاده گندم به جنبه‌های متعددی مانند ارزش غذایی، تنوع و مرغوبیت فرآورده‌ها، قابلیت کشت آن در مناطق مختلف، قابلیت انبارداری بالا و سهولت در تبدیل و نگهداری آن مربوط می‌شود. همچنین علاوه بر نقش آن در تغذیه انسان در درجات بعد جهت تغذیه دام و طیور، مصارف صنعتی و در برنامه‌های مدیریت خاک و تناوب زراعی نقش عمده‌ای دارد (کوچکی و همکاران، ۱۳۶۹). امروزه با توجه به اهمیت گندم، کشورهای صادرکننده آن به عنوان قدرت سبز معرفی می‌شوند. لذا برای رسیدن به چنین قدرتی می‌بایستی به دنبال راهکارهایی برای افزایش میزان محصول در واحد سطح بود.