

## بررسی تأثیر مولکول سیگنال دهنده نماتد ascr#18 در القای مقاومت به

### زنگ قهوه‌ای گندم *Puccinia triticina*

#### Investigating the effect of nematode signaling molecule ascr#18 in inducing resistance in wheat against to *Puccinia triticina*

صبا دلفان<sup>۱\*</sup>، محمدرضا بی‌همتا<sup>۱\*</sup>، سید طه دادرزایی<sup>۲</sup>، علیرضا عباسی<sup>۱</sup>، هادی علی پور<sup>۳</sup>

۱- به‌ترتیب دکتری اصلاح نباتات، استاد، دانشیار، دانشگاه تهران، کرج، چهارراه دانشکده، خیابان دانشکده،

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج، ایران

۲- دانشیار، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج،

ایران

۳- دانشیار، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، دانشگاه ارومیه

Delfan S<sup>\*1</sup>, Bihamta MR<sup>\*1</sup>, Dadrezaei ST<sup>2</sup>, Abbasi A<sup>1</sup>, Alipour H<sup>3</sup>

1- PhD of Plant Breeding, Professor, Associate Professor, University of Tehran, Daneshkade Avenue, College of Agriculture and natural Ressources, Karaj, Iran

2- Associate Professor, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

3- Associate Professor, Urmia University, Iran, Urmia city, 11km Sero road

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mrghanad@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹)

#### چکیده

زنگ برگ یا زنگ قهوه‌ای گندم که توسط قارچ *Puccinia triticina* (Pt) ایجاد می‌شود، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در سرتاسر جهان است و تأثیر منفی آن بر عملکرد محصول با افزایش دما به دلیل تغییرات آب‌وهوایی تشدید می‌شود. آسکاروزیدها فرمون‌های نمادی هستند که فعالیت‌های القاکننده مقاومت در برابر پاتوژن‌ها و آفات میکروبی در محصولات مختلف را دارند. در مطالعه حاضر تأثیر ascr#18، آسکاروزید اصلی نماتدهای انگلی گیاهی بر آلودگی گندم رقم بولانی با نژاد PKTTS از زنگ قهوه‌ای گندم بررسی شده است. محلول پاشی گیاهچه‌های دوهفته‌ای بولانی با غلظت‌های ماکرومولاری از ascr#18، ۲۴ ساعت قبل از آلودگی با اسپورهای زنگ قهوه‌ای گندم انجام شد. نتایج نشان داد که پس از محلول پاشی با ascr#18 تعداد جوش‌های زنگ روی برگ‌های گندم تیمار شده به میزان ۵۵ تا بیش از ۸۰ درصد کاهش یافت که نشان می‌دهد ascr#18 می‌تواند باعث مقاومت القایی در گندم در برابر زنگ قهوه‌ای می‌شود. همچنین پیش تیمار با ascr#18 باعث افزایش بیان ژن‌های کیتیناز ۳ و PAL که از ژن‌های درگیر در مسیر مقاومت به بیماری‌های گیاهی هستند، شد. به‌طور کلی با توجه به اثرات محافظتی گسترده آسکاروزیدهای نماتد در غلظت‌های بسیار پایین در مقایسه با القاکننده مقاومت شیمیایی، مانند ABA، استدلال می‌شود که این فرمون در آینده می‌تواند ابزار جالبی برای افزایش تولیدات گیاهی سازگار و پایدار با محیط‌زیست باشد.

#### واژه‌های کلیدی

آسکاروزیدهای نماتد

زنگ قهوه‌ای

گندم

مقاومت القایی

در مواجهه با تغییرات آب و هوایی، بحران‌های سیاسی و افزایش جمعیت، نیاز مبرمی به تأمین امنیت و حتی افزایش تولید گندم برای تضمین امنیت غذایی پایدار وجود دارد (Poore and Nemecek 2018; OECD 2020). زنگ برگ که توسط پاتوژن *Puccinia triticina* (Pt) ایجاد می‌شود، یکی از شایع‌ترین بیماری‌هایی است که بر تولید گندم در سراسر جهان تأثیر می‌گذارد (Huerta-Espino et al. 2011; Kolmer 2013) و به افزایش دما پاسخ می‌دهد (Helfer 2014; Junk et al. 2016; Caubel 2017). در گذشته کنترل زنگ برگ با استفاده از روش‌های معمول شامل ژن‌های مقاومت (ژن‌های R) یا آفت‌کش‌های مصنوعی به‌طور گسترده‌ای موفقیت‌آمیز بود، اما این روش‌ها در یک دوره نسبتاً کوتاه کارایی خود را از دست می‌دهد، زیرا جمعیت‌های قارچ در معرض فشار انتخاب قوی قرار می‌گیرند که می‌تواند منجر به مقاومت یا تحمل در برابر آفت‌کش‌های مصنوعی شود (Hawkins et al. 2019). علاوه بر این، استفاده گسترده از مواد شیمیایی مصنوعی در گذشته منجر به خطراتی برای محیط زیست و سلامت انسان در برخی موارد، هرچند اندک، شده است (Yoon et al. 2013).

استراتژی‌های جدید حفاظت از گیاهان شامل روش‌هایی است که بر سیستم ایمنی طبیعی گیاه متکی هستند. گیاهان، مانند حیوانات، استراتژی‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی مختلفی را برای مبارزه با عوامل بیماری‌زا ایجاد کرده‌اند (Sharrock and Sun 2020; Mermigka et al. 2020). گیاهان در درجه اول به دو لایه به‌هم پیوسته سیستم ایمنی ذاتی برای درک و پاسخ به عوامل بیماری‌زا متکی هستند (Jones and Dangl 2006; Spoel and Dong 2012; Han 2019). نخست، گیرنده‌های تشخیص الگو (PRR)، الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب (MAMPs) را از طیف وسیعی از میکروب‌ها تشخیص می‌دهند که منجر به ایجاد ایمنی تحریک‌شده با الگو (PTI) می‌شود. لایه دوم شامل پروتئین‌های مقاوم به بیماری (R) است که مولکول‌های عامل بیماری‌زا یا فعالیت‌های آن‌ها را بر روی میزبان هدف شناسایی می‌کنند و در نتیجه ایمنی تحریک‌شده توسط عامل (ETI) ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، مقاومت گیاهی می‌تواند با مقابله اولیه با میکروب‌ها یا ترکیبات

طبیعی مانند هورمون‌های گیاهی که منجر به مقاومت اکتسابی سیستماتیک (SAR) یا مقاومت سیستماتیک القایی (ISR) می‌شود، بسته به اینکه مسیر دفاعی اسید سالیسیلیک یا جاسمونات القاء شده باشد، مقاومت بیماری را به‌دست آورند (Ryals et al. 1996; Pieterse et al. 2014; Klessig et al. 2018). این یافته‌ها منجر به توسعه صنعتی القاکننده‌های مقاومت مصنوعی مانند بنزوتیادiazول (BTH) و پروبنازول شده است که توانایی خاصی برای محافظت از گیاهان در برابر بیماری‌های مختلف دارند (Nakashita et al. 2002; Görlach et al. 2006; Vlot et al. 2021). اخیراً کشف شده است که برخی از القاکننده‌های مقاومت مصنوعی و برخی ترکیبات طبیعی مانند اسید سالیسیلیک یا اسید  $\beta$ -آمینوبوتیریک (BABA) در غلظت‌های پایین باعث ایجاد پرایمینگ دفاعی در گیاهان می‌شوند که منجر به یک حالت فیزیولوژیکی می‌شود که گیاهان را قادر می‌سازد سریع‌تر و/یا بیشتر به تنش‌های زیستی و غیرزیستی که با آن‌ها مواجه می‌شوند پاسخ دهند (Conrath et al. 2016; Baccelli and Mauch-Mani 2015). از آنجایی که یک گیاه پرایم شده تنها بخش بسیار محدودی از سیستم دفاعی خود را فعال می‌کند، پرایمینگ می‌تواند اقدامی برای محافظت از گیاهان در برابر بیماری‌ها و آفات و در عین حال اجتناب از انرژی گیاهی و در نتیجه تلفات محصول باشد.

چندین مطالعه اخیر نشان داده‌اند که فرمون‌های مشتق شده از نماتد، به‌نام آسکاروسیدها، می‌توانند با تنظیم مجدد مسیرهای سیگنال دفاعی خاص، در گیاهان مختلف در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا و آفات مقاومت ایجاد کنند (Manosalva et al. 2015; Ali et al. 2018; Klessig et al. 2019; Ning et al. 2020). گیاهان می‌توانند آسکاروسیدها را متابولیزه کنند و در نتیجه پیام شیمیایی خود را تغییر دهند و مخلوط‌های آسکاروزید تولید کنند که بیماری‌ها و آفات انگلی گیاهی را دفع کنند و علائم بیماری را کاهش دهند (Manohar et al. 2020; Yu et al. 2021). ما در اینجا نشان می‌دهیم که ascr#18، فراوان‌ترین آسکاروزید نماتدهای انگلی گیاهی (Jones et al. 2013)، می‌تواند گندم را در شرایط گیاهیچه از زنگ برگ از طریق کاهش تعداد جوش‌های زنگ قهوه‌ای روی برگ محافظت کند. علاوه بر این، بیان نسبی ژن‌های مسیر مقاومت شامل کیتیناز ۳ و فنیل آلانین آمونیو لیاز

(PAL) در گیاهان آلوده پیش تیمار شده با ascr#18 نسبت به گیاهان تیمار نشده افزایش نشان داد که قویاً نشان می‌دهد که آسکاروزیدها توانایی پرایم کردن برای افزایش مقاومت در برابر زنگ قهوه‌ای گندم را دارند. کیتینازها از جمله آنزیم‌هایی هستند که پیوندهای گلیکوزیدی کیتین را به واحدهای مونومری می‌شکنند. کیتین و گلوکان اجزای تشکیل‌دهنده دیواره سلولی بسیاری از بیمارگرهای قارچی می‌باشند. در بسیاری از گیاهان در پاسخ به آلودگی، فعالیت این دو آنزیم القا شده و باعث ایجاد مقاومت می‌شود. کیتینازها و گلوکانازها در تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها با هم همکاری می‌کنند (Saikia et al. 2005). با توجه به اینکه کیتین در گیاهان عالی وجود ندارد، بررسی‌ها نشان می‌دهد که حضور آنزیم‌های کیتیناز در گیاهان، بخشی از پاسخ ایمنی گیاه در مواجهه با عوامل بیماری‌زای کیتین‌دار می‌باشد (Botha et al. 1998). همچنین، فنیل آلانین آمونیولایز (PAL) آنزیم کلیدی در مسیر سنتز فنل از طریق دخالت در مسیرهای ایزوفلاونوئیدها و فنیل پروپانوییدها و تجمع فنل به‌عنوان فیتوالکسین است که در پاسخ القای اولیه گیاهان در برابر تعدادی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی شرکت می‌کند. واکنش مقاوم بیشتر به دلیل دفاع از دیواره‌های سلولی با تشدید لیگنین و تجمع ترکیب فنلی متصل به دیواره سلولی رخ می‌دهد (You et al. 2020). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که افزایش بیان ژن کیتیناز ۳ و PAL در گیاهان باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری می‌شود. در گندم نان، افزایش بیان این ژن‌ها پس از آلوده شدن به گونه‌های *Puccinia* گزارش شده است (Zhan et al. 2022; Asghari et al. 2015; Soltanloo et al. 2010).

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی، منبع ماده تلقیح و تیمار ascr#18

رقم حساس گندم بولانی و زنگ برگ نژاد (Delfan et al. 2022) PKTTS برای این آزمایش استفاده شدند. پروفایل پرآزاری/ناپرآزاری نژاد PKTTS در جدول ۱ نشان داده شده است.

جداسازی، تکثیر و تعیین نژاد PKTTS در گلخانه‌های بخش پاتولوژی غلات مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام شد. آزمایش به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD)، با سه تکرار بیولوژیکی در دپارتمان فیتوپاتولوژی دانشگاه یوستوس لیپیک گیسن، آلمان انجام شد. به‌طور خلاصه، گیاهان گندم در یک گلدان (حاوی پیت ماس) در یک اتاقک رشد تحت شرایط کنترل شده با دمای تنظیم شده ۲۰/۱۷ درجه سانتی‌گراد (شب/روز)، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی با ۱۵۰۰۰ لوکس) و رطوبت نسبی ۶۵ درصد رشد کردند. گیاهان ده روزه با استفاده از اسپری دستی با غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۰٫۰۱، ۰٫۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار ascr#18 در محلول آبی حاوی ۰٫۱ درصد اتانول تا زمان رواناب اسپری شدند. ۲۴ ساعت بعد، برگ‌های گیاه با اسپورهای زنگ قهوه‌ای دو هفته‌ای جدا شده از رقم بولانی تلقیح شدند. تلقیح با استفاده از مخلوطی از اسپور زنگ قهوه‌ای و پودر تالک (Alliance Chemical، آلمان) در غلظت ۱:۴ با استفاده از قلم‌مو انجام شد (McIntosh et al. 1995). گیاهچه‌های مایه‌زنی شده به مدت یک روز در دمای ۱۷±۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی نزدیک به ۹۵ درصد در تاریکی قرار گرفتند. سپس به یک محفظه رشد در دمای ۲۰/۱۷ درجه سانتی‌گراد (شب/روز) با ۱۶ ساعت دوره نوری منتقل شدند. ارزیابی تعداد جوش‌های زنگ قهوه‌ای ۱۰ روز پس از تلقیح با استفاده از میکروسکوپ (Leica Microsystems، آلمان) انجام شد. برای سنجش میزان بیان ژن، گیاهان ۱۰ روزه با ۱۰ و ۰ (به‌عنوان شاهد) ماکرومولار ascr#18 اسپری شدند و ۲۴ ساعت بعد با اسپورهای زنگ قهوه‌ای مایه‌زنی شدند. برگ‌های آلوده در ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی جمع‌آوری شده و در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا زمان استخراج RNA کل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این آزمایش نیز از طرح فاکتوریل بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD)، با سه تکرار بیولوژیکی استفاده شد.

جدول ۱- پروفایل پرازاری/ ناپرازاری نژاد PKTTS زنگ قهوه‌ای گندم استفاده شده در آزمایش

| ژن‌های مؤثر                                     | ژن‌های غیرمؤثر                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Lr2a, Lr9, (Lr10, Lr27+Lr31), Lr16, Lr19</i> | <i>Lr22b, Lr1, Lr2b, Lr2c, Lr3, Lr3ka, Lr3bg, Lr10, Lr11, Lr12, Lr13, Lr14a, Lr14b, Lr15, Lr17, Lr18, Lr20, Lr21, Lr22a, Lr23, Lr24, Lr25, Lr26, Lr28, Lr29, Lr30, Lr32, Lr33, Lr34, Lr35, Lr36, Lr37, Lrb, Lr13</i> |

## استخراج RNA و سنتز cDNA

برای استخراج RNA، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ با TissueLyser (Qiagen، آمریکا) آسیاب شد. RNA کل با استفاده از کیت Direct-zol RNA (Zymo research، آلمان) استخراج شد. ابتدا، ۷۰۰ میکرولیتر تریزول به مواد گیاهی آسیاب‌شده اضافه شد و با سرعت بسیار بالا وورتکس انجام شد، سپس نمونه مورد نظر به مدت ۲ دقیقه در  $13000 \times g$  سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک تیوپ میکروسانتریفیوژ جدید منتقل شد و ۷۰۰ میکرولیتر اتانول (۹۶ درصد) به آن اضافه شد. مخلوط به یک ستون چرخشی QIAshredder منتقل شد و به مدت ۳۰ ثانیه در  $13000 \times g$  سانتریفیوژ شد. جریان عبوری دور ریخته شد و ۴۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی RNA به اسپین RNeasy Mini اضافه شد و در  $13000 \times g$  به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد، جریان عبوری دور انداخته شد و سپس مخلوطی از ۷۵ میکرولیتر DNA digestion buffer و ۵ میکرولیتر DNase 1 به ستون چرخش RNeasy Mini اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۷۰۰ میکرولیتر از بافر RNA pre wash اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه در دور  $13000 \times g$  سانتریفیوژ شد. این مرحله دو بار تکرار شد، سپس ۴۰۰ میکرولیتر RNA wash buffer اضافه شد و در دور  $13000 \times g$  به مدت ۶۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. در نهایت، RNA کل در یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتر با استفاده از ۵۰

میکرولیتر RNase-free water جمع‌آوری شد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کمیت و کیفیت همه نمونه‌ها با استفاده از یک بیوآنالایزر Agilent 2100 اندازه‌گیری شد ( $RIN > 6.2$ ). همچنین سنتز cDNA با استفاده از ۲ میکروگرم RNA با کمک کیت qScript cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, USA) انجام شد.

## سنجش بیان ژن

RT-qPCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad، Germany) و کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR (BioRad Master Mix، Germany) انجام شد. سه تکرار فنی برای هر یک از سه تکرار بیولوژیکی برای نقاط زمانی مختلف تنظیم شد. تجزیه و تحلیل بیان برای دو ژن دفاعی گندم شامل کیتیناز (*TaChi3*) و فیل‌آلانیل آمونیو لیاژ (*TaPAL*) با استفاده از برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد: مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه ۱۵ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به منظور استانداردسازی داده‌ها، نمونه‌ها با ژن خانه‌دار TaActin نرمال‌سازی شدند. فهرست آغازگرهای مورد استفاده در این کار در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- لیست پرایمرهای استفاده شده

| آغازگر             | شماره دسترسی در NCBI | مسیر    | توالی آغازگر            |
|--------------------|----------------------|---------|-------------------------|
| <i>TaActin</i>     | DN551593.1           | Forward | GAACAAGCGGCATCTTCTGT    |
|                    |                      | Reverse | CCAAGGGAGAGTACGACGAA    |
| <i>chitinase 3</i> | AB029936.1           | Forward | GTTTAAGACGCGTTGTGGT     |
|                    |                      | Reverse | GCAGTAGCGCTTGTAGAACC    |
| <i>TaPAL</i>       | X99705.1             | Forward | TGTCCTCTACATTTTGGTTGCA  |
|                    |                      | Reverse | CCTTGACTGCGTTCTTGACATTC |

## تجزیه و تحلیل آماری

سنجش بیان ژن با استفاده از روش CT مقایسه‌ای ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Schmittgen and Livak 2008) انجام شد، همچنین تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (با استفاده از آزمون دانکن) به صورت فاکتوریل با دو عامل شامل تیمار ascr#18: ۲ سطح (۰ و ۱۰ ماکرومولار) و نقاط مختلف زمانی: ۷ سطح (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) با ۳ تکرار با نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار RStudio استفاده شد.

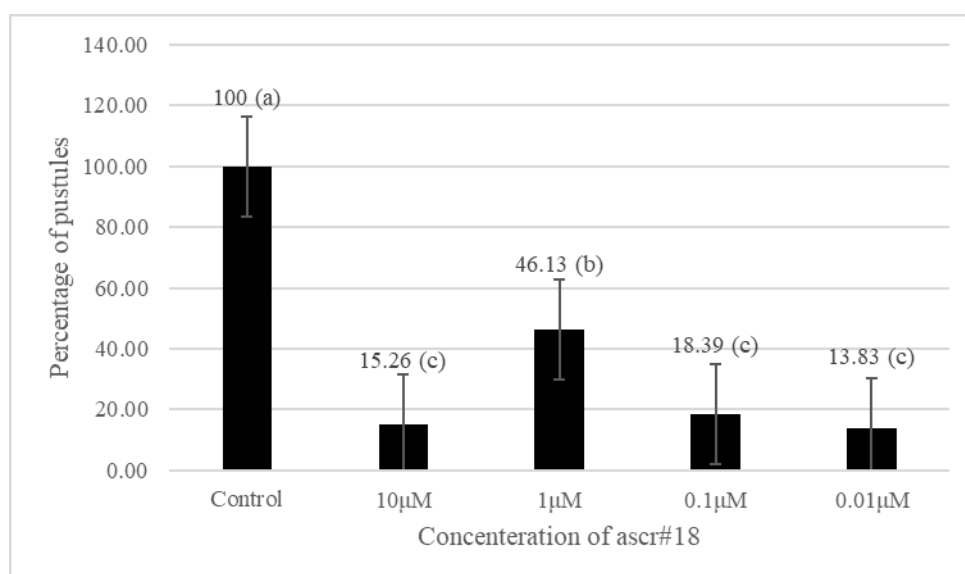
## نتایج و بحث

ascr#18 باعث ایجاد مقاومت در برابر *Puccinia triticina* در

## گندم می‌شود

برای آزمایش تأثیر ascr#18 بر گندم در برابر زنگ قهوه‌ای، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ غلظت از

تیمار ascr#18 شامل غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ ماکرومولار انجام شد. نتایج آزمایش نشان داد که پیش تیمار گیاهچه‌های بولانی با ascr#18 تعداد جوش‌های زنگ قهوه‌ای را به میزان زیادی کاهش می‌دهد (شکل ۱). تجزیه واریانس تعداد جوش‌ها نشان داد که بین تیمارها (غلظت‌های مختلف ascr#18) در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲). از آنجایی که به خوبی شناخته شده است که ascr#18 اثرات سمی مستقیمی بر قارچ‌ها نشان نمی‌دهد، بلکه واکنش‌های دفاعی گیاه را القاء می‌کند (Manosalva et al. 2015; Klessig et al. 2019) و به دلیل اینکه زنگ قهوه‌ای گندم بی‌تروفی اجباری است، آزمایش مستقیم سمیت روی قارچ ممکن نیست و بنابراین فرض می‌کنیم که ascr#18 باعث ایجاد مقاومت در گندم در برابر قارچ زنگ برگ می‌شود.



شکل ۱- میانگین تعداد جوش‌های شمارش شده در سطح برگ روی رقم گندم بولانی پیش تیمار با غلظت‌های مختلف از ascr#18 بعد از مایه‌زنی با اسپوره‌های زنگ قهوه‌ای گندم نژاد PKTTS. مقادیر هر تیمار میانگین سه تکرار بیولوژیکی هستند و هر تکرار میانگین تعداد جوش در ۱۰ برگ مختلف از گندم رقم بولانی هستند (برای مقایسات میانگین از آزمون دانکن استفاده شده است).

جدول ۲- تجزیه واریانس بیان ژن و صفات مورفولوژیک رقم گندم بولانی با پیش تیمار ascr#18 برای مقاومت به زنگ قهوه‌ای گندم

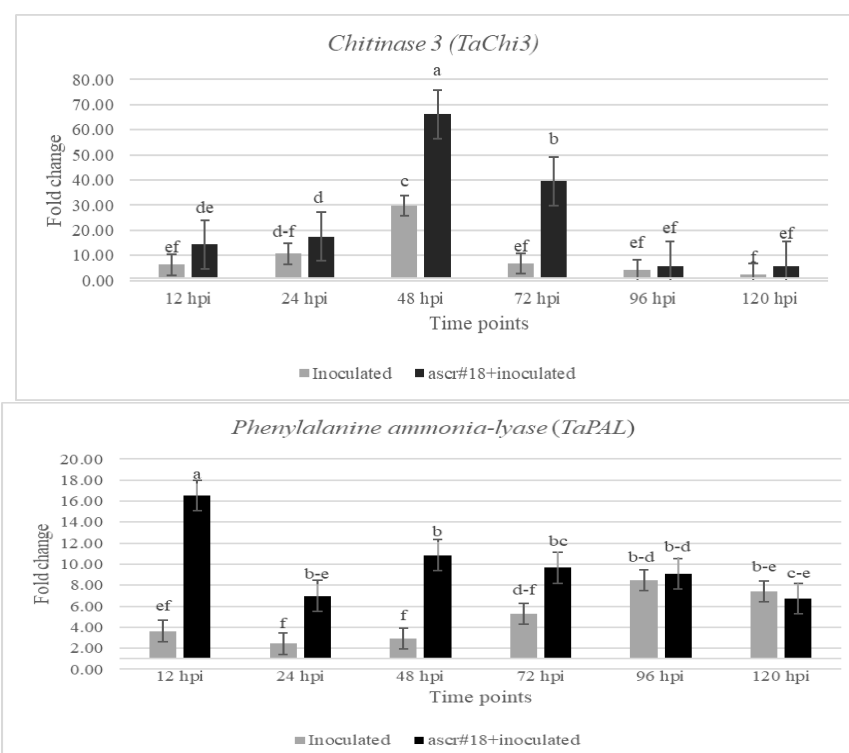
| میانگین مربعات     |            |                |          |                  |            |                |                  |
|--------------------|------------|----------------|----------|------------------|------------|----------------|------------------|
| بیان ژن            |            | صفات مورفولوژی |          | بیان ژن          |            | صفات مورفولوژی |                  |
| منابع تغییرات      | درجه آزادی | Tachi 3        | TaPAL    | منابع تغییرات    | درجه آزادی | تعداد جوش      | ضریب تغییرات (%) |
| بلوک               | ۲          | ns۲۲/۶۸        | ns۱۳/۲۶  | بلوک             | ۲          | ns۱/۲۰         | ۱۵/۶۵            |
| تیمار              | ۱          | **۱۴۵۶/۱۳      | **۱۹۰/۲۵ | تیمار            | ۴          | **۳۰۳/۶۹       |                  |
| نقطه زمانی         | ۶          | **۱۵۳۱/۹۶      | **۳۸/۳۱  | خطا              | ۸          | ۸/۲۷           |                  |
| تیمار × نقطه زمانی | ۶          | **۳۸۷/۶۲       | **۳۶/۰۰  |                  |            |                |                  |
| خطا                | ۲۶         | ۲۸/۵۲          | ۴/۴۰     |                  |            |                |                  |
| ضریب تغییرات (%)   |            | ۷/۶۵           | ۶/۹۸     | ضریب تغییرات (%) |            |                |                  |

ns و \*\* به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد

### ascr#18 باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی در گندم می‌شود

برای اثبات بیشتر اینکه ascr#18 باعث ایجاد مقاومت القایی در گیاه می‌شود، فعالیت ژن‌های دفاعی درگیر در مسیر مقاومت به بیماری‌های گیاهی در برگ‌های گندم در دو غلظت ۰ و ۱۰ میکرومولار ascr#18 (به عنوان دو حد آستانه از غلظت‌های استفاده شده) آزمایش شد. برای این منظور گیاهچه‌های ۱۴ روزه بولانی، ۲۴ ساعت قبل از تلقیح با اسپورهای نژاد PKTTS با ۱۰

میکرومولار ascr#18 اسپری شدند و سپس برای تجزیه و تحلیل بیان نسبی ژن‌های TaPAL و TaChi3 در بازه زمانی ۰ تا ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح نمونه برداری برگی انجام شد. تجزیه واریانس برای داده‌های بیان ژن نشان داد که اثر تیمار، نقاط زمانی و اثر متقابل آن‌ها برای هر دو ژن در سطح ۱ درصد معنی دار است (جدول ۲).



شکل ۲- میزان بیان ژن‌های دفاعی گیاهی کیتیناز ۳ (*Chitinase 3*) و فنیل آلانین آمینولایز (*PAL*) در رقم گندم بولانی در محدوده نقاط زمانی مختلف ۰-۱۲۰ ساعت پس از مایه زنی تلقیح شده با اسپورهای زنگ قهوه‌ای گندم نژاد PKTTS. مقادیر سه تکرار بیولوژیکی با تعداد ۱۰ گیاه در هر نقطه زمانی مختلف می‌باشند (مقایسات میانگین با آزمون دانکن انجام شده است).

تجزیه و تحلیل RT-qPCR نشان داد که سطح بیان *TaChi3* در گیاهان تیمار شده با *ascr#18* در مقابل گیاهانی که فقط با زنگ قهوه‌ای مایه‌زنی شده بودند (نمونه‌های شاهد) به‌طور قابل توجهی بالاتر است. بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار  $\times$  نقطه زمانی برای ژن کیتیناز ۳، بالاترین سطح بیان ژن در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی در گیاهان تیمار شده با میانگین تغییر ۶۶ برابری مشاهده شد. علاوه بر این، همانند ژن *TaChi3*، بیان *TaPAL* به دنبال تلقیح در گیاهان پیش تیمار شده با *ascr#18* در مقایسه با گیاهان تیمار نشده به شدت افزایش یافت. پروفایل بیان *TaPAL* القا شده توسط *ascr#18* تا حدودی با پروفایل *TaChi3* متفاوت بود؛ زیرا افزایش بیان ژن *TaPAL* در دو زمان ۱۲ و ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی مشاهده شد (شکل 2b). به‌طور کلی نتایج مقایسات میانگین میزان بیان ژن در گیاهان پیش تیمار شده با *ascr#18*، افزایش بیان هر دو ژن در مقاطع زمانی مختلف در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. در مطالعه حاضر، حفاظت با واسطه *ascr#18* گندم نان در برابر بیماری زنگ برگ را بررسی کردیم. شمارش تعداد جوش روی برگ‌های آلوده گندم رقم بولانی و تجزیه و تحلیل بیان دو ژن نشانگر دفاعی *TaChi3* و *TaPAL* نشان می‌دهد که پیش تیمار برگ‌ها با *ascr#18* منجر به القای بسیار قوی‌تر ژن‌های دفاعی در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده با زنگ قهوه‌ای می‌شود که با تعریف مقاومت القایی ایجاد شده توسط عوامل پرایمینگ که توسط کنراد و همکاران (۲۰۱۵) ارائه شده است مطابقت دارد (Conrad et al. 2015).

گزارش‌های قبلی اثر مثبت *ascr#18* را در حفاظت گیاهان در برابر عوامل مختلف بیماری‌زا شامل ویروس (Turnip Crinkle Virus)، باکتری (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)، قارچ (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)، اوومیسست (*Meloidogyne* و *Heterodera schachtii*) و دو نماتد (*incognita*) در چهار گونه گیاهی (جو، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و آرابیدوپسیس) نشان داده است (Manosalva et al. 2015). در گزارشی دیگر، پاسخ *ascr#18* در پنج گونه گیاهی شامل (گندم، سویا، برنج، ذرت و گوجه‌فرنگی) در برابر هشت عامل بیماری‌زا/آفت شامل یک ویروس، دو باکتری، سه قارچ، یک اوومیسست و یک نماتد بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که

پیش تیمار *ascr#18* محافظت نسبی تا قوی را در هفت عامل بیماری‌زا گیاهی از هشت عامل (به‌جز ذرت) القا می‌کند (Klessig et al. 2019)، که نشان می‌دهد آسکاروسیدها ابزارهای مؤثری هستند که می‌توانند در حفاظت گیاهی استفاده شوند. همچنین مطالعات قبلی نشان داده است که ژن‌های کیتیناز ۳ و *TaPAL* آبشارهای سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) (Xie et al. 2014; Gai et al. 2019) مسیرهای سیگنالینگ با واسطه اسید سالیسیلیک (Zhang et al. 2021) و مسیرهای سیگنالینگ دفاعی با واسطه اسید جاسمونیک (Xiang et al. 2022) در گیاهان دخیل هستند. به‌طور کلی، فعال‌شدن این مسیرها با القای ژن‌های مرتبط با پاتوژن (PR genes) که اجزای اصلی پاسخ دفاعی گیاهی هستند، دنبال می‌شود. در اینجا نشان می‌دهیم که پیش تیمار با *ascr#18* پاسخ دفاعی سریع‌تر و قوی‌تری را در گندم هنگام مواجه با عوامل بیماری‌زا زنگ قهوه‌ای ممکن می‌سازد. آسکاروسیدها از یک زنجیره جانبی مشتق از اسید چرب تشکیل شده‌اند که در موقعیت  $\alpha$  به دی‌اکسی قند آسکاریلوز متصل است. ساختار آن شباهت‌هایی به رامنولپیدهای باکتریایی دارد که از زنجیره جانبی اسید چرب چربی‌دوست تشکیل شده است که در موقعیت  $\alpha$  به یک یا دو بخش قند رامنوز متصل شده است. عملکرد رامنولپیدها مشابه MAMPها است که از طریق القای هجوم سلولی  $Ca^{2+}$ ، تولید گونه‌های اکسیژن فعال، فعال‌شدن پروتئین کینازهای فعال شده با میتوژن، القای مسیرهای سیگنالینگ دفاعی با واسطه اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک، بیان ژن‌های دخیل در ایمنی گیاهی را تحریک می‌کند.

به‌طور کلی، احتمال داده می‌شود که استفاده از سیگنال‌های مولکولی کوچک، مانند *ascr#18*، القا مسیرهای سیگنالینگ مختلف را برای فعال‌کردن پاسخ‌های ایمنی در گیاهان را ممکن می‌سازد؛ بنابراین، *ascr#18* و سایر سیگنال‌های مولکولی کوچک می‌توانند مورد مطالعه بیشتری قرار گیرند تا در آینده به‌عنوان یک روش جایگزین برای کاهش آسیب‌های ناشی از بیماری‌های گیاهی و افزایش امنیت غذایی پایدار استفاده شوند.

## منابع

- Ali MA, Anjam MS, Nawaz MA, Lam HM, Chung G (2018) Signal transduction in plant–nematode interactions. *International Journal of Molecular Sciences* 19:1648.
- Asghari A, Babaeizad V, Tajick Ghanbari MA, and Mahdian SA (2014) Analysis of the Expression Rate of *PAL* and *PR3* Genes in Two Wheat Cultivars in Response to Brown Rust Agent *Puccinia triticina* E. 1<sup>st</sup> International and 13th Iranian Genetics Congress. Tehran, Iran.
- Bacelli I, Mauch-Mani B (2016) Beta-aminobutyric acid priming of plant defense; the role of ABA and other hormones. *Plant Molecular Biology* 91:703-711.
- Botha AM, Nagel MAC, Van der Westhuizen AJ, & Botha FC (1998). Chitinase isoenzymes in near-isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene, and mechanical wounding. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39.
- Caubel J, Launay M, Ripoche D, Gouache D, Buis S, Huard F, Huber L, Brun F, Bancal MO (2017) Climate change effects on leaf rust of wheat: Implementing a coupled crop-disease model in a French regional application. *Eur J Agr* 90:53-66. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2017.07.004>.
- Conrath U, Beckers GJ, Langenbach CJ, Jaskiewicz MR (2015) Priming for enhanced defense. *Annu Rev Phytopathol* 53:97-119.
- Delfan S, Bihamta MR, Dadrezaei ST, Abbasi A, Alipour H (2022) Identification sources of resistance for leaf rust (*Puccinia triticina* Erikss.) in Iranian wheat genotypes. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 52:115-133. (In Farsi).
- Gai QY, Jiao J, Wang X *et al.* (2019) Chitosan promoting formononetin and calycosin accumulation in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures via mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Sci Rep* 9:10367. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46820-6>
- Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH *et al.* (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629-643.
- Hawkins NJ, Bass C, Dixon A, Neve P (2019) The evolutionary origin of pesticide resistance. *Biological Reviews* 94:135-155.
- Han GZ (2019) Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytol* 222:70-83.
- Helfer S (2014) Rust fungi and global change. *New Phytol* 201:770-780. [doi.org/10.1111/nph.12570](https://doi.org/10.1111/nph.12570).
- Huerta-Espino J, Singh RP, German S, McCallum BD, Park RF, Chen WQ *et al.* (2011) Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica* 179:143-160.
- Jones J, Dangl J (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329. [doi.org/10.1038/nature05286](https://doi.org/10.1038/nature05286).
- Jones JT, Haegeman A, Danchin EG, Gaur HS, Helder J, Jones MG, *et al.* (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 14:946-961.
- Junk J, Kouadio L, Delfosse P, El Jarroudi, M (2016) Effects of regional climate change on brown rust disease in winter wheat. *Climatic Change* 135:439-451. <https://doi.org/10.1007/s10584-015-1587-8>.
- Klessig DF, Manohar M, Baby S, Koch A, Danquah W. B., Luna E, Schroeder FC (2019) Nematode ascaroside enhances resistance in a broad spectrum of plant–pathogen systems. *J Phytopath* 167:265-272.
- Klessig DF, Choi HW, Dempsey DA (2018) Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future. *Mol Plant Microbe Interact* 31:871-888. [doi: 10.1094/MPMI-03-18-0067-CR](https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR).
- Kolmer J (2013) Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. *Forests* 4:70-84.
- Manohar M, Tenjo-Castano F, Chen S, Zhang YK., Kumari A, Williamson VM, Schroeder FC (2020) Plant metabolism of nematode pheromones mediates plant–nematode interactions. *Nature Comm* 11:1-11.
- Manosalva P, Manohar M, Von Reuss SH, Chen S, Koch A, Kaplan F *et al.* (2015) Conserved nematode signaling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nature Comm* 6:1-8.
- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995). *Wheat rusts: an atlas of resistance genes*. CSIRO publishing. Sydney. Australia.
- Mermigka G, Amprazi M, Mentzelopoulou A, Amartolou A, Sarris PF (2020) Plant and Animal Innate Immunity Complexes: Fighting Different Enemies with Similar Weapons. *Trends in Plant Science* 25:80-91. [doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.008](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.008).
- Nakashita H, Yoshioka K, Yasuda M, Nitta T, Arai Y, Yoshida S, Yamaguchi I (2002) Probenazole induces systemic acquired resistance in tobacco through salicylic acid accumulation. *Physiological Molecular Plant Pathology* 61:197-203. [doi.org/10.1006/pmpp.2002.0426](https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0426).
- Ning S, Zhang L, Ma J, Chen L, Zeng G, Yang C, *et al.* (2020) Modular and scalable synthesis of nematode pheromone ascarosides: implications in eliciting plant defense response. *Organic Biomolecular Chemistry* 18:4956-4961.
- OECD (2020) COVID-19 and International Trade: Issues and Actions, [https://read.oecd-ilibrary.org/view/?ref=128\\_128542-3ijg8kfswh&title=COVID-19-and-international-trade-issues-and-actions](https://read.oecd-ilibrary.org/view/?ref=128_128542-3ijg8kfswh&title=COVID-19-and-international-trade-issues-and-actions).
- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC, Bakker PA (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52:347-375. [doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340).
- Poore J and Nemecek T (2018) Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science* 360:987-992.
- Ryals J, Neuenschwander U, Willits M, Molina A, Steiner H, Hunt H (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819.

- Saikia R, Singh BP, Kumar R, & Arora DK (2005). Detection of pathogenesis-related proteins-chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase in induced chickpea. *Current Science*, 659-663.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3:1101-1108.
- Sharrock J, Sun JC (2020) Innate immunological memory: from plants to animals. *Curr Opin Immunol* 62:69-78. doi: 10.1016/j.coi.2019.12.001.
- Soltanloo H, Ramezani SS, and Gaudet D (2010). The study of Chitinase gene expression during infection of wheat near isogenic lines carrying Lr34/Yr18 locus to stripe and leaf rust pathogens. *Iranian Journal of Biology* 23:115-124. (In Farsi)
- Spoel SH, Dong X (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immun* 12:89-100.
- Vlot AC, Sales J H, Lenk M, Bauer K, Brambilla A, Sommer A, Nayem S (2021) Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytol* 229:1234-1250.
- Xiang S, Wu S, Jing Y, Chen L, Yu D (2022). Phytochrome B regulates jasmonic acid-mediated defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Diversity* 44:109-115.
- Xie K, Chen, J, Wang Q, Yang Y (2014) Direct phosphorylation and activation of a mitogen-activated protein kinase by a calcium-dependent protein kinase in rice. *Plant Cell* 26:3077-3089.
- Yoon MY, Cha B, Kim JC (2013) Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. *Plant Pathology Journal* 29:1-9.
- You X, Fang H, Wang R, Wang GL, and Ning Y (2020) Phenylalanine ammonia lyases mediate broadspectrum resistance to pathogens and insect pests in plants. *Sci. Bull*, 65, 1425-1427. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scib.2020.05.014>
- Yu Y, Zhang YK, Manohar M, Artyukhin AB, Kumari A, Tenjo-Castano FJ, Nguyen H, Routray P, Choe A, Klessig DF, Schroeder FC (2021) Nematode signaling molecules are extensively metabolized by animals, plants, and microorganisms. *ACS Chem Biol* 16:1050-1058. doi: 10.1021/acscchembio.1c00217.
- Zhan C, Li Y, Li H, Wang M, Gong S, Ma D, and Li Y (2022) Phylogenomic analysis of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) multigene family and their differential expression analysis in wheat (*Triticum aestivum* L.) suggested their roles during different stress responses. *Frontiers in plant science*. 13:982457. doi: 10.3389/fpls.2022.982457