

الگوی بیان ژن‌های دفاعی ارقام حساس و مقاوم گندم در پاسخ به آلودگی به سفیدک سطحی

Expression profile of defense-related genes in susceptible and resistant wheat cultivars in response to powdery mildew infection

لیلا آهانگر^{۱*}، ولی‌اله بابایی‌زاد^۱، غلامعلی رنجبر^۱، حمید نجفی‌زرینی^۱، عباس بیابانی^۲

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، دانشیار و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار، دانشگاه گنبد کاووس

Ahangar L^{1*}, Babaezad V¹, Ranjbar GA¹, Najafi Zarrini H¹, Biabani A²

1. PhD Student, Assistant Professor, Associate Professor, Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
2. Associate Professor, Gonbad-Kavoos University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: L.ahangar63@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۱۸)

چکیده

گندم نان یکی از محصولات غذایی است که جایگاه مهمی در تغذیه جوامع بشری دارد. بیماری سفیدک سطحی در گندم که توسط عامل (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*)) ایجاد می‌شود، یکی از بیماری‌های مهم گندم به شمار می‌رود. گیاهان در معرض عوامل بیولوژیکی ترکیبات متنوعی مثل گونه‌های اکسیژن فعال، فیتوالکسین‌ها و گروهی از پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (*PR*) را تولید می‌کنند. در این تحقیق الگوی تظاهر ژن *PAL* و تعدادی از ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی شامل *PR1*، *PR2* و *PR3* با استفاده از تکنیک qPCR در دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به بیماری *Bgt* بررسی شد. در ابتدا ۴۰ ژنوتیپ مختلف گندم تجاری و بومی ایران در مرحله گیاهچه پس از آلودگی با بیماری سفیدک سطحی گندم از نظر میزان حساسیت بر اساس تعداد کلنی رشد یافته در واحد سطح نسبت به این بیماری غربال شدند نهایتاً دو رقم *تجن* و *فلات* به ترتیب به عنوان ارقام مقاوم و حساس انتخاب و در معرض قارچ *Bgt* قرار گرفتند. سپس بیان ژن‌های مورد نظر در پنج بازه زمانی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفته و میزان نسبی آن‌ها نسبت به ژن مرجع اکتین نرمالیزه شد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در ارقام حساس و مقاوم پس از آلودگی به عامل سفیدک سطحی، نسبت به زمان کنترل روند افزایشی دارد. بررسی روند تغییرات بیان نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها پس از آلودگی در رقم *تجن* سریع‌تر از رقم *فلات* افزایش یافت. در هر دو رقم حساس و مقاوم بیشترین میزان بیان ژن‌ها ۲۴ ساعت پس از آلودگی بوده تا از نفوذ و استقرار هاستوریوم قارچ در سلول میزبان ممانعت نمایند. پیشینه بیان تمامی ژن‌ها در رقم مقاوم به طور معنی‌داری بیشتر از رقم حساس بود که با توجه به این نتایج این ژن‌ها در کنار ژن‌های اصلی، باعث تشدید و حفظ مقاومت می‌شوند. هر دو رقم حساس و مقاوم، ۴۸ ساعت بعد از آلودگی دچار کاهش بیان ژن‌ها شدند ولی میزان این کاهش در رقم *فلات* به طور معنی‌داری بیشتر از رقم مقاوم *تجن* بود. علاوه بر این، تغییرات ژن *PR1* در زمان اوج بیان از سایر ژن‌های مورد بررسی بیشتر بود و رقم *تجن* با افزایش ۲/۲ برابری اختلاف معنی‌داری نسبت به رقم *فلات* نشان داد که به نظر می‌رسد این ژن در برهمکنش بیمارگر-گیاه نقش به‌سزایی دارد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
ژن‌های *PR*
سفیدک سطحی
گندم
Bgt

مقدمه

گندم (*Triticum spp.*) یکی از مهمترین محصولات زراعی است که در حال حاضر در اکثر نقاط جهان رشد می‌کند (Tong et al. 2003). گندم بیش از ۴۰ درصد غذای اصلی جمعیت جهان را تامین می‌کند و هم اکنون بیش از ۹۵ درصد مردم کشورهای در حال توسعه گندم و ذرت را به عنوان منبع غذایی اصلی خود استفاده می‌کنند (Akhtar et al. 2011; Coventry et al. 2011). گندم بیش از ۹۰ درصد تولید جهان را به خود اختصاص می‌دهد که تقریباً در ۷۰ درصد از زمین‌های قابل کشت در جهان که بیش از ۲۰۰ میلیون هکتار را در بر می‌گیرد، رشد می‌نمایند. در ایران سطح زیر کشت گندم حدود ۷ میلیون هکتار می‌باشد (FAO 2014). علی‌رغم افزایش مساحت زیر کشت گندم در جهان، تولید آن با چالش‌های بیماری مواجه می‌شود که مانع توسعه آن می‌شود. بیماری سفیدک سطحی گندم یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در شرایط آب و هوایی معتدل است. این بیماری توسط یک پارازیت اجباری بنام *Blumeria graminis f.sp. tritici* (Bgt) ایجاد می‌شود که برای رشد و انتشار به بافت زنده میزبان نیاز دارد (Oberhaensli et al. 2011). خسارت بیماری از ۱۳-۳۴ درصد در زمان آلودگی کم تا حد متوسط و ۵۰-۱۰۰ درصد تحت هجوم شدید بیمارگر متغیر می‌باشد (Zhang et al. 2008; Li et al. 2011; Alam et al. 2013).

کاشت ارقام مقاوم، یکی از بهترین راه‌های مبارزه علیه این بیماری است (Kazemi et al. 2004). استفاده از مهندسی ژنتیک جهت تولید گندم‌های تراریخته مقاوم یکی از روش‌های کارآمد جهت تولید گیاه مقاوم به بیمارگرهای قارچی می‌باشد (Lillemo et al. 2008; He et al. 2009). در این میان ژن‌های مقاومت به خصوص ژن‌های سنتز کننده پروتئین‌های مرتبط به بیماریزایی (PRs) بیشترین توجه را به خود جلب کردند که می‌توان از آن‌ها در راستای تولید گیاهان تراریخت مقاوم به عوامل تنش‌زا استفاده کرد (Kogel and Langen 2005; Van Loon et al. 2006). پروتئین‌های PR تولید شده توسط این دسته از ژن‌ها، موجب تخریب دیواره‌های سلول قارچی، ایجاد اختلال در

غشاهای سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماریزایی و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می‌شوند (Dahleen et al. 2001). تولید PR پروتئین‌ها یکی از راهکارهای مهم گیاهان جهت مقابله با بیماری است که میزان آنها در پاسخ به تنش یا حمله بیمارگرها به میزان زیادی افزایش می‌یابد (Agrios 2005; Van loon et al. 2006). بیان این پروتئین‌ها در گیاه به صورت اختصاصی انجام می‌شود، برای مثال در گیاه *Arabidopsis thaliana*، مجموع ژن‌های PR که در پاسخ به آلودگی با قارچ *Prenospora parasitica* بیان می‌شود با مجموع ژن‌های PR که در پاسخ به آلودگی با قارچ *Alternaria brassiciola* بیان می‌شود متفاوت است (Thomma et al. 1998). در میان همه PR پروتئین‌ها، PR1 از مهمترین آن‌ها در مقاومت به بیمارگرهای مختلف از جمله سفیدک سطحی می‌باشد (Schulthesis et al. 2003; Van loon et al. 2006). اگرچه عملکرد بیوشیمیایی خاصی برای آن در نظر گرفته نشده اما نقش ضد میکروبی آن توسط محققین گزارش شده است (Rauscher et al. 2008; Sels et al. 1999). در مطالعات میکرواری در گندم تحت آلودگی با سفیدک سطحی ۴۶ ژن به عنوان پروتئین-های PR شناسایی شدند که در هر دو ژنوتیپ حساس و مقاوم پس از آلودگی با بیمارگر افزایش یافتند. این PRها شامل PR1، PR2، PR3، PR4 و PR10 می‌باشد. در میان آنها PR1 با بیان ۶۲ برابری افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (Xin et al. 2012). گروهی دیگر از ژن‌های سنتز کننده PRها، پروتئین‌هایی مانند کیتیناز و بتا-۱ و ۳ گلوکاناز را رمز می‌کنند. تحقیقات نشان داده که این ژن‌ها با فعالیت هیدرولتیکی علیه اجزای دیواره سلولی قارچ‌ها در بازدارندگی از فعالیت قارچ سفیدک سطحی در جو و زنگ در گندم نقش به سزایی ایفا می‌کند (Poulsen 2001; Soltanloo et al. 2010b). (Tohidfar et al. 2005). ژن کیتیناز را برای ایجاد مقاومت به بیماری ورتیسیلیومی به پنبه منتقل کردند. نسل سوم گیاهان پنبه تراریخت، بیان پایدار ژن کیتیناز را در ایجاد مقاومت به قارچ *Verticilium dahlia* نشان داد. با توجه به گزارشات فراوان مبنی بر دخالت مشتقات مسیر بیوشیمیایی فنیل پروپانوئید در مواجهه با انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌توان به

¹ Pathogenesis related genes

تحت آلودگی با قارچ *Bgt* با استفاده از روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ایزوله قارچ *Bgt*

در این مطالعه از تعداد ۴۰ ژنوتیپ مختلف گندم که از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شد، استفاده شد که مشخصات آن‌ها در جدول (۱) آورده شده است. جهت آلوده سازی جدایه قارچ کرج عامل بیماری (*Bgt*) از بخش تحقیقات پاتولوژی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شد. ارزیابی میزان حساسیت و غربالگری ارقام گندم در برابر قارچ

Bgt

برای آلوده‌سازی و تعیین میزان حساسیت ۴۰ ژنوتیپ گندم از روش بابایی‌زاد و آیشمن (Eichmann et al. 2006; Babaeizad et al. 2009) استفاده شد. به این منظور ابتدا بذور هر رقم ضدعفونی و پس از جوانه زنی به گلدان حاوی خاک استریل، منتقل شدند. گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با تناوب ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۶۵ درصد به مدت یک هفته نگهداری شدند. برگ‌های اول گیاهچه‌های یک هفته‌ای هر ژنوتیپ بریده شد و در سه تکرار در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی روی محیط آب آگار ۰/۵ درصد حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بنزیمیدازول داخل تشتک پتری پخش شدند و سپس با اسپورهای قارچ *Bgt* (به نسبت ۵ اسپور در میلی‌متر مربع) آلوده شدند. یک هفته بعد از آلوده‌سازی تعداد کلنی رشد یافته در سطح ۲/۵ سانتی‌متر مربع هر برگ شمارش و پس از محاسبه میانگین داده‌ها برای هر رقم، بر اساس شدت آلودگی ارقام حساس و مقاوم شناسایی شدند (Kaur et al. 2008).

تعیین نرخ پاسخ‌های دخیل در مقاومت

در این مطالعه به منظور درک پاسخ‌های دفاعی و شناسایی حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ژنوتیپ به *Bgt*، پس از غربالگری چند ژنوتیپ با طیف مختلف حساسیت به بیماری انتخاب شدند. سپس برگ‌های اول گیاهچه‌های یک هفته‌ای بریده شده و بر روی محیط آب آگار ۰/۵ درصد پخش شدند. سپس با اسپورهای

بررسی تغییرات برخی از آنزیم‌های این مسیر از جمله فنیل-آلانین‌آمونیا‌لیاز^۱ (*PAL*) اشاره کرد. ژن *PAL* از طریق دخالت در مسیرهای سنتز فنیل پروپانوئیدها و ایزوفلاونوئیدها که فعالیت فیتوالکسینی دارند در مقاومت گیاه نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. این ژن همچنین در مسیر بیوستنز اسید سالیسیلیک و دیگر ترکیبات وابسته دفاعی دخیل بوده و یک ترکیب سیگنال‌دهی کلیدی برای فعال‌سازی ژن‌های وابسته دفاعی، کاتالیزکننده‌ها و فاکتورهای رونویسی است (Stotz et al. 2009). ارزیابی میکروآرای گندم آلوده به سفیدک سطحی حاکی از افزایش چندین آنزیم کلیدی درگیر در مسیر بیوستنز فلاونوئیدها از جمله *PAL* بود که نتایج بررسی تغییرات بیان ژن‌های این مسیر بوسیله تکنیک Real time PCR نیز تایید کننده نتایج میکروآرای بود (Xin et al. 2012).

سفیدک سطحی یکی از عوامل خسارت‌زای گندم به حساب آمده و کنترل شیمیایی آن علاوه بر صرف هزینه در سلامت محیط زیست نیز مسئله ساز است. دانش ژنتیک مقاومت برای اصلاح گندم مقاوم به سفیدک سطحی از اهمیت بالایی برخوردار است. تفاوت اصلی گیاهان حساس و مقاوم، شناسایی به موقع بیمارگر و فعال سازی سریع و موثر مکانیسم‌های دفاعی گیاه است (Wang et al. 2010). ژن‌های متعددی در پاسخ گیاه به بیمارگر فعال یا خاموش می‌شود و یا بیان آن‌ها افزایش یا کاهش می‌یابد. بنابراین تجزیه الگوی بیان ژن‌ها می‌تواند روشی صحیح و سریع در تفکیک لاین‌ها و ارقام مقاوم از حساس باشد (Adhikari et al. 2007). هدف از این تحقیق، بررسی الگوی تظاهر ژن‌های مسیر مقاومت *PR1*، *PR2*، *PR3* و *PAL* در زمان‌های مختلف بعد از آلودگی در ارقام حساس و مقاوم به سفیدک سطحی بود. لذا در این پژوهش واکنش ۴۰ ژنوتیپ تجاری و بومی گندم کشور در برابر عامل سفیدک سطحی گندم (*Bgt*)، ارزیابی شده و میزان پاسخ‌های دخیل در مقاومت (تشکیل پاپیل، مرگ سریع سلولی) در ارقام با درجات مختلف حساسیت جهت انتخاب ارقام حساس و مقاوم به بیماری مورد بررسی قرار گرفت. سپس به منظور تعیین اثرات ژن‌های مورد بررسی در ایجاد مقاومت، الگوی تغییرات بیان آن‌ها در ارقام حساس و مقاوم انتخاب شده

¹ Phenylalanine ammonia-lyase

جدول ۱- مشخصات و مبدا ژنوتیپ‌های گندم‌های مورد مطالعه

شماره	نام ژنوتیپ	تیپ رشدی	مبدا	شماره	نام ژنوتیپ	تیپ رشدی	مبدا
۱	مروارید	بهاره	کرج-دورگ	۲۱	N-80-19	بهاره	سیمیت
۲	بولانی	بهاره	زابل-بومی	۲۲	سپاهان	بهاره	کرج-دورگ
۳	موراگو	بهاره	مراکش	۲۳	زرین	زمستانه	سیمیت و ایکاردا
۴	دریا	بهاره	سیمیت	۲۴	گاسپارد	زمستانه	فرانسه
۵	گنبد	بهاره	کرج-دورگ	۲۵	الموت	زمستانه	کرج-دورگ
۶	فلات	بهاره	سیمیت	۲۶	آزادی	بهاره	کرج-دورگ
۷	میلان	بهاره	سیمیت	۲۷	کرج ۱	بهاره	کرج-دورگ
۸	تجن	بهاره	سیمیت	۲۸	قدس	بهاره	کرج-دورگ
۹	ارتا	بهاره	کرج-دورگ	۲۹	توس	زمستانه	سیمیت
۱۰	مغان ۱	بهاره	سیمیت	۳۰	خزر	بهاره	کرج-دورگ
۱۱	مغان ۲	بهاره	سیمیت	۳۱	استار	بهاره	فرانسه
۱۲	مغان ۳	بهاره	سیمیت	۳۲	گلستان	بهاره	سیمیت
۱۳	نای شصت	بهاره	سیمیت	۳۳	زارع	زمستانه	سیمیت
۱۴	اروم	زمستانه	کرج-دورگ	۳۴	سیروان	بهاره	کرج-دورگ
۱۵	میهن	زمستانه	کرج-دورگ	۳۵	گاسکوجن	زمستانه	فرانسه
۱۶	البرز	بهاره	سیمیت	۳۶	پارسی	بهاره	کرج-دورگ
۱۷	بم	بهاره	کرج-دورگ	۳۷	شانگهای	بهاره	سیمیت
۱۸	کویر	بهاره	کرج-دورگ	۳۸	ER-89-13	بهاره	سیمیت
۱۹	سیستان	بهاره	کرج-دورگ	۳۹	ER-89-20	بهاره	سیمیت
۲۰	ارگ	بهاره	کرج-دورگ	۴۰	ER-89-15	بهاره	سیمیت

سلولی) در مقابل *Bgt* مشاهده و فراوانی هر کدام ثبت شد (Hückelhoven et al. 1999; Babaezade et al. 2009).

آلوده‌سازی ارقام حساس و مقاوم انتخاب شده جهت بررسی بیان ژن

بر اساس نتایج آزمون‌های غربالگری و نرخ پاسخ‌های دفاعی، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ژنوتیپ گندم برای ارزیابی بیان ژن انتخاب شدند. پس از کشت بذور ارقام انتخاب شده، گلدان‌ها به اتاقک رشد (۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۸-۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد) منتقل و به مدت دو هفته در این شرایط نگهداری شدند. آبیاری روزانه جهت حفظ رطوبت انجام شد و گلدان‌ها با فاصله ۶ روز با محلول هوکلند تغذیه شدند. سپس گیاهچه‌ها بوسیله قارچ *Bgt* در غلظت $50 \text{ conidia mm}^{-1}$ آلوده شدند. در تمامی مراحل گیاهان شاهد نیز با محلول آب و توئین ۲۰، تیمار شده و در

قارچ *Bgt* (به نسبت ۵۰ اسپور در میلی‌متر مربع) آلوده شدند (Hückelhoven et al. 1999). بعد از ۴۸ ساعت برگ‌ها به محلول DAB^1 (pH=4) منتقل شده و به مدت پنج ساعت رنگ آمیزی شدند (Thordal-Christensen et al. 1997). بعد رنگ آمیزی، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول (کلروفرم- اتانول ۴:۱) شامل ۰/۱۵ درصد تری‌کلرواستیک اسید^۲ رنگ‌بری شده و در محلول گلیسرین ۵۰ درصد نگهداری شدند. برگ‌های رنگ‌بری شده به مدت سه دقیقه در محلول مرکب چین (۹۲ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۷ میلی‌لیتر اسید استیک و یک میلی‌لیتر جوهر آبی) رنگ آمیزی شده و در زمینه میکروسکوب UV/Vis مشاهده و پاسخ‌های مختلف گیاه (تشکیل پاپیل، نفوذ و مرگ سریع

¹ Diaminobezidine

² Trichloro-acetic acid

درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای اتصال آغازگرها و سپس نگهداری در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بود. بلافاصله برای آزمون عملکرد اختصاصی واکنش PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی ۰/۵ درجه در هر چرخه بین دمای ۹۵-۶۰ درجه سانتی-گراد رسم شد. مقدار تکثیر در انتهای هر چرخه توسط دستگاه بیوراد اندازه‌گیری شد. سپس تغییرات نسبی بیان ژن‌های مورد بررسی نسبت به ژن اکتین نرمالیزه شد. میزان بیان قبل از آلودگی به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد. محاسبه و تغییرات بیان ژن نیز مطابق با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) اندازه‌گیری شد.

$$\Delta\Delta Ct = (CT \text{ target gene} - CT \text{ actin})_{\text{sample}} - (CT \text{ target gene} - CT \text{ actin})_{\text{calibrator}}$$

این آزمایش در سه تکرار زیستی و دو تکرار آزمایشگاهی انجام شد و پس از محاسبه بیان ژن‌های مورد مطالعه برای هر نمونه، انحراف معیار آن‌ها محاسبه و در نهایت نتایج برای مقایسه بین ساعات پس از آلودگی با زمان کنترل در هر رقم با استفاده از آزمون *t* تجزیه شدند. همچنین میزان بیان بین ارقام حساس و مقاوم نیز به روش حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) مقایسه شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین نتایج نرخ پاسخ‌های مقاومتی در ژنوتیپ انتخاب شده، توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی میزان حساسیت ارقام مختلف گندم به بیماری سفیدک سطحی (*Bgt*) در ۴۰ ژنوتیپ گندم برای صفت مرتبط با مقاومت به این بیماری نشان داد که ارقام شانگهای، فلات، ارگ و پارسی با بیشترین میزان کلنی رشد یافته در cm^2 ۲/۵ (بیش از ۹۰ کلنی رشد یافته) به عنوان حساس‌ترین و ارقام زارع، گاسکوجن، تجن، سیروان و ER-89-13 با کمترین میزان کلنی رشد یافته (کمتر از ۵۰ کلنی) به عنوان مقاوم‌ترین ارقام به بیماری سفیدک سطحی شناسایی شدند (شکل ۱). در جدول ۳، نتایج تجزیه واریانس از نظر میزان حساسیت ژنوتیپ‌ها بر اساس

اتاقک کشت نگهداری شدند. جهت استخراج RNA، از برگ‌های اول گیاه قبل از آلوده‌سازی و سپس در بازه‌های زمانی ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی نمونه‌برداری انجام شد. برگ‌ها بلافاصله در ازت مایع قرار گرفته و سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد جهت استخراج RNA کل نگهداری شدند.

استخراج RNA کل

به منظور استخراج RNA برگ‌ها در هاون استریل با استفاده از ازت مایع پودر شدند. استخراج RNA از نمونه‌های برگ‌ها با استفاده از محلول RNX-plus (شرکت سیناژن) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. سپس کیفیت RNA استخراج شده، در ژل آگارز ۱/۵ درصد توسط الکتروفورز و کمیت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد.

ساخت cDNA و واکنش Real time PCR

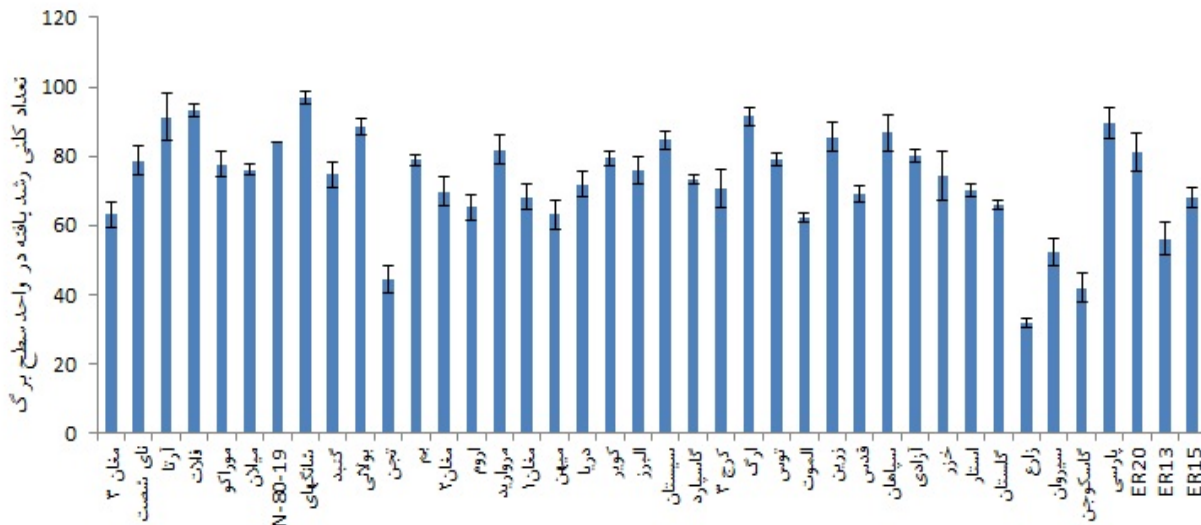
یک میکروگرم از RNA کل، با استفاده از آغازگر الیگومر تیمیدین (Oligodt) و کیت (RevertAid™ First (Fermentase) Strand cDNA Synthesis Kit در حجم ۲۰ میکرولیتر طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل شد. برای انجام واکنش RT-PCR، از دو میکرولیتر cDNA رقیق شده (به نسبت ۱:۷) و آغازگرهای *PR1*، *PR2*، *PR3* و *PAL* به عنوان ژن‌های مورد بررسی و آغازگرهای مرتبط با اکتین به عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول ۲). این آغازگرها به وسیله نرم‌افزارهای BioEdit 7.0.9.0 و OligoExplorer V1.4 طراحی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی^۱ با استفاده از دستگاه C1000™ Thermal Cycler شرکت بیوراد^۲ با استفاده از کیت سایبرگرین (SYBR Green/ROX qPCR Maxima Master Mix (2X)) شرکت ترموسایتیفیک انجام شد. هر واکنش PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر حاوی دو میکرولیتر از cDNA الگو، ۷/۵ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۰/۳ ماکرومولار از هر آغازگر و آب عاری از RNase انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه برای واسرشته‌سازی، دمای ۶۰

^۱ Quantitative real time PCR

^۲ BioRad

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش

ژن	آغازگر رفت (5'→3')	آغازگر برگشت (3'→5')
<i>TaActin</i>	TAC AGT GTC T GG ATC GGT GGT	GGA AAA GTG CAG AGA GAC ACG
<i>TaPAL</i>	GAG CTT CCC TCC AAG ATG TG	CCA ATG TTC TGT CCG TCC TT
<i>Ta PR1</i>	TCG TAG TTG CAG GTG ATG AAG	ACT ACG ACT ACG GGT CCA ACA
<i>Ta PR2</i>	CAC ATA CGT ACC GCA TAC ACG	AGC AGA ACT GGG GAC TCT TCT
<i>Ta PR3</i>	C CGT AGT TGT AGT TGT CCT GC	CCC TAC ACA TGG GGC TAC TG



شکل ۱- نتایج آزمون غربالگری ۴۰ ژنوتیپ‌های گندم ایران با قارچ عامل سفیدک سطحی (*Bgt*) بر اساس تعداد کلنی رشد یافته در $2/5 \text{ cm}^2$ هر برگ.

جدول ۳- تجزیه واریانس ۴۰ ژنوتیپ گندم از نظر میزان حساسیت به سفیدک سطحی گندم (*Bgt*) بر اساس تعداد کلنی رشد یافته در $2/5 \text{ cm}^2$ هر برگ

درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
تیمار	۲۳۴۹۱/۴	۶۰۲/۳	۵۵/۰۹ **
بلوک	۱۹۷/۱۷	۹۸/۵	۹/۰۲ **
خطا	۸۵۲/۷۹	۱۰/۹	
کل	۲۴۵۴۱		
CV	R^2	۰/۹۶	
	۴/۵		

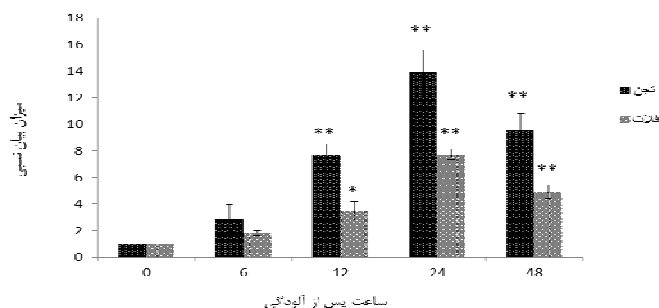
* و ** به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطوح پنج و یک درصد

ژنوتیپ‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد وجود دارد (شکل ۲) به طوری‌که رقم فلات با میزان بالای نفوذ (بیش از ۵۳ درصد) نسبت به سایر ارقام از حساسیت بالاتری برخوردار می‌باشد. در حالی‌که در ارقام مقاوم میزان نفوذ بطور معنی‌داری کاهش و میزان مرگ سریع سلولی (HR) و تشکیل رسوب کنار دیواره سلولی (CWA) در مقابل عامل بیماری سفیدک پودری به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۲).

تعداد کلنی رشد یافته در $2/5 \text{ cm}^2$ برگ آورده شده است. اثر ژنوتیپ‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار شد که نشان دهنده وجود تفاوت ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. نتایج حاصل از مطالعات دقیق‌تر از چگونگی پاسخ گیاه به عامل بیماری در تعدادی از ارقام منتخب شامل ارقام حساس فلات و شانگهای و ارقام مقاوم تچن، سیروان، گاسکوچن و زارع در مقابل عامل بیماری سفیدک سطحی *Bgt* نشان داد که بین

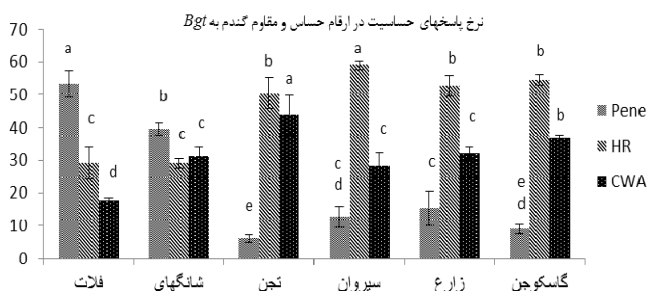
ساعت پس از اعمال آلودگی به حداکثر مقدار خود رسید. رقم تجن در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی با میزان بیان ۷/۶ و ۱۳/۹ برابری نسبت به زمان کنترل اختلاف معنی‌داری را به ترتیب در سطوح پنج و یک درصد نشان داد. در حالی که رقم حساس فلات تنها ۳/۴ و ۷/۷ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت اگرچه این افزایش نسبت به کنترل خود معنی‌دار بود ولی میزان آن نسبت به رقم تجن به طور معنی‌داری پایین بود (شکل ۳). مقایسه میزان بیان ژن *PAL* در هر دو گروه از این گیاهان در زمان اوج بیان نشان داد که در گیاهان مقاوم میزان رونوشت ژن *PAL* حدود ۱/۸ برابر بیشتر از گیاهان حساس بود که این اختلاف در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. سپس بیان این ژن در ۴۸ ساعت پس از آلودگی روند کاهشی را نشان داد ولی این کاهش در گیاهان حساس بیشتر از گیاهان مقاوم بود (شکل ۳). با توجه به اینکه این ژن تنها در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی در هر دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به اوج می‌رسد می‌توان الگوی بیان آن را تک اوجی (تک گانه) نامید.

میزان بیان نسبی ژن PAL در گیاهان مقاوم و حساس



شکل ۳- میزان بیان ژن فیل آلانین امونیا لایاز (*PAL*) در ارقام مقاوم (تجن) و حساس (فلات) گندم تحت آلودگی به سفیدک سطحی (*Bgt*). * و ** به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با کنترل در سطوح پنج و یک درصد در آزمون *t* می‌باشد.

آنزیم *PAL* اولین آنزیم در مسیر سنتز اسید سالیسیلیک می‌باشد. ژن *PAL* با تاثیر مستقیم در افزایش تولید مولکول سیگنال اسید سالیسیلیک سبب فعال کردن ژن *NPRI* و به دنبال آن افزایش بیان ژن‌های *PR* و القای مکانیسم *SAR* در گیاه می‌شود (Shah et al. 2004; Fitzgerald et al. 2001; Rate et al. 1999). آنزیم حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است. این



شکل ۲- میزان پاسخ‌های مختلف ژنوتیپ‌های گندم با درجه حساسیت متفاوت به عامل بیماری سفیدک سطحی (*Pene Bgt*) بیانگر نفوذ قارچ؛ (HR) مرگ سریع سلولی؛ (CWA) تشکیل دیواره سلولی. مقایسه میانگین بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام گرفت.

مقایسه نتایج این بررسی با یافته‌های دیگران ثابت می‌کند که هر دو عکس‌العمل HR و CWA نقش اصلی را به عنوان پاسخ‌های دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرهایی با چرخه زندگی بیوتروفیک مثل *Bgt* ایفا می‌کنند (Hückelhoven 2004; Babaeizad et al. 2009). لذا به منظور ادامه تحقیق و بررسی الگوی تغییرات بیان ژن‌های دخیل در مسیر مقاومت، رقم فلات با میزان نفوذ بیشتر و تجن با میزان بالای پاسخ‌های مقاومتی (تشکیل پاپیل و مرگ سریع سلولی) به ترتیب به عنوان ارقام حساس و مقاوم بهاره انتخاب شدند.

در این تحقیق، الگوی بیان ژن‌های کد کننده پروتئین‌های PR1، PR2، PR3 و *PAL* در طی پنج بازه زمانی پس از آلوده‌سازی با بیماری سفیدک سطحی در دو ژنوتیپ حساس فلات و مقاوم تجن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج Real time PCR تایید کرد که بیان همه ژن‌های مورد بررسی در هر دو ژنوتیپ بعد از آلودگی به طور قابل توجه و معنی‌داری افزایش یافت. روند تغییرات بیان این ژن‌ها نشان می‌دهد که سطح تظاهر این ژن‌ها در زمان‌های مختلف پس از آلودگی در هر دو رقم فلات و تجن متفاوت می‌باشد.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل تغییرات در تظاهر ژن در نتیجه آلودگی به عامل بیماری سفیدک سطحی نشان داد که تجمع رونوشت ژن *PAL* در ۶ ساعت پس از آلودگی به سفیدک در رقم مقاوم آغاز شد ولی در ۱۲ ساعت پس از آلودگی در هر دو رقم مقاوم و حساس به طور معنی‌داری افزایش یافت و ۲۴

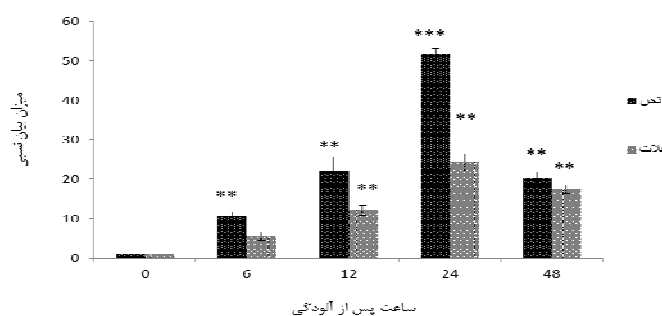
را در مکانیسم دفاعی گیاه بازی می‌کنند لذا افزایش بیان ژن *PAL* در مراحل اولیه آلودگی را می‌توان به نقش این ژن در سنتز فیتوالکسین‌ها نیز نسبت داد. همچنین نقش ژن *PAL* در القای مرگ سریع سلولی (Rate et al. 2001; Fitzgerald et al. 2004) به اثبات رسیده است. بنابراین افزایش بیان این ژن در زمان اوج آلودگی (۲۴ ساعت) را می‌توان بدین صورت توجیه کرد که گیاه با افزایش بیان این ژن سبب ایجاد مرگ سلولی برنامه ریزی شده می‌شود تا از توسعه این قارچ بیوتروف در سلول میزبان جلوگیری کند. نتایج همچنین بیانگر آن بود که برگ‌های گیاهان مقاوم در تمامی بازه‌های زمانی بعد از آلودگی بیان زودهنگام و بالایی را نسبت به رقم حساس نشان دادند که می‌تواند بیانگر بیان متمایز ژن *PAL* در ارقام حساس و مقاوم و کلیدی بودن نقش این ژن در کنار ژن‌های اصلی در مقاومت علیه سفیدک سطحی باشد که این نتیجه با یافته‌های (Gjetting et al. 2004) مطابقت دارد.

بررسی الگوی بیان ژن *PRI* حاکی از آن بود میزان بیان این ژن در گیاهان حساس و مقاوم در همان ساعات اولیه بعد آلودگی با *Bgt* به طور معنی‌داری افزایش یافت به طوری که سطح رونوشت ۶ ساعت بعد از آلودگی در گیاهان مقاوم ۱۰/۹ برابر و در رقم فلات ۵/۶ برابر زمان صفر بود. این روند افزایشی در گیاهان مقاوم به طور کاملاً واضحی قابل مشاهده بود به طوری که رقم مقاوم تجن در ۱۲ ساعت پس از آلودگی با افزایش تقریباً دو برابری نسبت به فلات افزایش معنی‌داری را در سطح پنج درصد نشان داد. بیشینه بیان این ژن در هر دو گروه از گیاهان ۲۴ ساعت پس از آلودگی بود که میزان آن در رقم حساس و مقاوم به ترتیب ۲۴/۲۵ و ۵۱/۸ برابر زمان صفر مربوطه بود (شکل ۴). میزان افزایش بیان در زمان اوج بیان در رقم مقاوم حدود ۲/۲ برابر رقم حساس محاسبه شد که این اختلاف در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. میزان رونوشت ژن *PRI*، در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از اعمال آلودگی در هر دو گروه از گیاهان سیر نزولی را نشان داد ولی میزان این ژن در گیاهان مقاوم بیشتر از گیاهان حساس بود. این کاهش بیان می‌تواند نشان‌دهنده سرکوب شدن موثر آن‌ها به دنبال تشکیل هاستوریوم باشد (Bindschedler et al. 2009; Spanu et al. 2010; Molitor et al. 2011).

آنزیم اولین آنزیم کلیدی و تعیین‌کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل پروپانوئید می‌باشد. آنزیم *PAL* بوسیله برداشتن گروه آمین از فنیل آلانین سبب تولید سینامیک اسید و آمونیاک می‌شود. در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها، سینامیک اسید مسئول فراهم کردن پیش ماده‌های لازم برای سنتز محصولات متابولیکی ثانویه مانند لیگنین، لیگنان‌ها، فلاونوئیدها، فیتوالکسین‌ها و برخی ترکیبات دیگر می‌باشند که همه اینها از جمله ترکیبات موثر دفاعی در گیاه می‌باشند (Mohammadi and Kazemi 2002; Ritter and Schulz 2004; Bagal et al. 2012) لذا با توجه به تاثیر آنزیم *PAL* در سنتز لیگنین، تغییر در میزان بیان این ژن از جمله معیارهای تعیین میزان سنتز لیگنین در گیاه می‌باشد. بنابراین میزان بیان *PAL* می‌تواند به عنوان معیار کیفی واکنش دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرها باشد. مطالعات نشان داد که مهار کردن بیان ژن *PAL* در توتون مقاوم به ویروس موزائیک توتون موجب غیرفعال شدن مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) و بروز آلودگی در گیاه شده است (Paxton 1981). Way et al. (2002) با انتقال ژن *PAL* از گیاه *Stylosanthes humilis* به توتون افزایش ۸ برابری این آنزیم در گیاه تراریخت و افزایش مقاومت آن به بیمارگرهای قارچی مشاهده شد. در این پژوهش میزان بیان ژن *PAL* در برگ‌های تیمار شده با قارچ *Bgt* در همان ساعات اولیه بعد آلودگی (۶ ساعت) در رقم مقاوم افزایش یافت و در ۱۲ ساعت پس از آلودگی که همزمان با نفوذ قارچ به سلول‌های اپیدرمی است با افزایش دو برابری اختلاف معنی‌داری را در سطح پنج درصد با رقم فلات نشان داد. در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بیشترین میزان خود رسید تا از توسعه بیشتر هیف‌های قارچ در سلول‌های گیاهی جلوگیری کند (Eichmann and Hückelhoven 2008). میزان بیان این ژن در رقم مقاوم در تمامی بازه‌های زمانی بعد از آلودگی به طور معنی‌داری (در سطح پنج درصد) بیشتر از رقم حساس بود. بر اساس مطالعات قبلی و عملکرد ژن *PAL* این افزایش بیان را می‌توان بدین صورت توجیه کرد که گیاه با فعال کردن ژن *PAL* سعی می‌کند تا با سنتز لیگنین و رسوب‌گذاری ترکیبات فنیل پروپانوئیدی سبب تقویت دیواره سلولی شده تا از نفوذ هیف‌های قارچ در سلول جلوگیری کند. با توجه به اینکه فیتوالکسین‌ها یک نقش کلیدی

تمامی ساعات نمونه‌برداری در رقم تجن در مقایسه با رقم فلات افزایش معنی‌داری داشته که می‌توان به نقش بسیار موثر این ژن در القا مقاومت گندم به قارچ *Bgt* نسبت داد. نقش ضد قارچی *PR1* در سیستم دفاعی گیاه تا حد بسیار زیادی پذیرفته شده است به طوری‌که (Schulthesis et al. 2003) تاثیر و فعالیت *PR1* را در ایجاد مقاومت گیاه جو برای جلوگیری از نفوذ سفیدک سطحی جو (*Bgh*) طی مطالعاتی تایید کردند. افزایش بیان ژن *PR1* پس از آلودگی به قارچ *Bgt* در این تحقیق نیز با نتایج (Molina et al. 1999)، (Khong et al. 2012) و (Xin et al. 2012) در گندم مطابقت داشت.

پروتئین‌های *PR2* که به بتا ۱-۳ گلوکونازها شهرت دارند دومین گروه از *PR* پروتئین‌ها می‌باشند که از طریق هضم بتا ۱-۳ گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ‌ها، سبب تخریب این پلی-ساکارید و در نهایت از بین رفتن قارچ‌ها می‌شوند (Leubner-Metzger and Meins 1999). پروتئین‌های *PR2* معمولاً در نوک هیف‌های قارچ تجمع می‌یابند و بوسیله لیز شدن سبب ضعیف شدن دیواره سلولی قارچ و در نهایت آزاد شدن الیگوساکاریدها و مرگ سلولی می‌شوند (Hernández et al. 2005). الیگوساکاریدهای آزاد شده از دیواره سلولی قارچ به عنوان یک الیستور عمل کرده و در نتیجه سبب فعال شدن پاسخ‌های دفاعی ثانویه با تولید فیتوالکسین‌ها و گلیکولین‌ها^۱ در گیاه می‌شوند. در این مطالعه بیان ژن *PR2* در همان ساعات اولیه پس از آلودگی افزایش معنی‌داری را در رقم مقاوم نشان داد به طوری‌که در ۶ ساعت بعد از آلودگی نسبت به زمان کنترل ۴ برابر افزایش یافت که در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. این افزایش بیان در بازه‌های زمانی بعدی قابل ملاحظه بود به طوری‌که رقم تجن در ۶ و ۱۲ ساعت پس از آلودگی به ترتیب با میزان بیان ۲/۳ و ۳/۸ برابری نسبت به فلات اختلاف معنی‌داری را با رقم حساس نشان داد. سپس بیان این ژن در ۲۴ ساعت پس از آلودگی نسبت به حالت کنترل ۱۶/۵ برابر افزایش یافته و به بیشترین میزان بیان ژن در رقم تجن رسید. در حالی‌که رقم حساس فلات میزان بیان ژن *PR2* روند آرامی را نشان داد و در ۲۴ ساعت پس از آلودگی با ۹/۲ برابر نسبت به زمان کنترل به بیشترین میزان بیان رسید. میزان

میزان بیان نسبی ژن *PR1* در گیاهان مقاوم و حساس

شکل ۴ - میزان بیان ژن *PR1* در ارقام مقاوم (تجن) و حساس (فلات) گندم تحت آلودگی به سفیدک سطحی (*Bgt*). * و ** به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با کنترل در سطوح پنج و یک درصد در آزمون *t* می‌باشد.

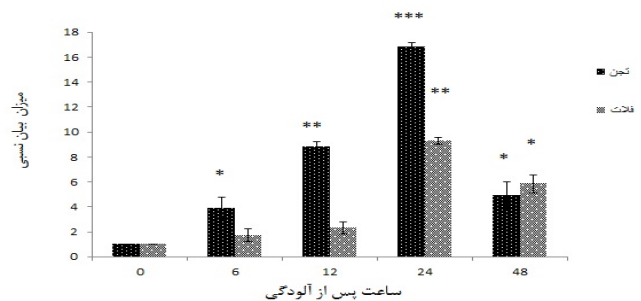
*PR1*ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌های غنی از سیستئین می‌باشند که در بافت‌های مختلف گیاهی مثل دیواره سلولی، دستجات آوندی و واکوئول‌ها وجود دارند (Hoegenet et al. 2002; Grunwald et al. 2003). در جو و سایر غلات بیان ژن خانواده *PR1* معمولاً به عنوان مارکر قابل قبولی در مقاومت گیاه به بیماری سفیدک سطحی و سایر بیماری‌ها به کار برده می‌شود. علاوه بر این *PR1*ها، بعنوان شاخصی برای مقاومت القایی سیستمیک (SAR) مورد استفاده قرار می‌گیرند (Schulthesis et al. 2006; Van Loon et al. 2003; Soltanloo et al. 2010a). طی مطالعاتی نشان دادند که افزایش بیان ژن *PR1*، کیتیناز و گلوکوناز در گندم، منجر به بالا بردن مقاومت گیاه در مقابل *Fusarium graminearum* می‌شود. این پروتئین‌ها با اثر مستقیمی که بر روی بیماری‌ها دارند از رشد و گسترش آنها در گیاه میزبان جلوگیری می‌کنند. نتایج این بررسی نشان داد که میزان رونوشت این ژن در ۶ و ۱۲ ساعت پس از اعمال آلودگی سریعاً در گیاه مقاوم افزایش یافته است که این افزایش زود هنگام و سریع موجب ممانعت از گسترش بیشتر بیمارگر شده و بدین شکل منجر به مقاومت در رقم مقاوم می‌شود. به طوری‌که بیان این ژن در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی که زمان اوج حمله قارچ (Aist and Bushnell 1991) به گیاه می‌باشد، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت تا از نفوذ و توسعه هیف‌های قارچ در میزبان جلوگیری کند. همچنین مشاهده شد که سطح رونوشت در

¹ Glyceollin

کیتیناز به تهایی و یا همراه با سایر پروتئین‌های PR سطوح بالایی از مقاومت را به آلودگی قارچی یا توسعه علائم بیماری نشان می‌دهند (Grisson et al. 1996; Bieri et al. 2003). ژن کیتیناز از گروه ژن‌های مسئول واکنش دفاعی می‌باشد و معمولاً پس از حمله بیمارگر، سطح بیان آن توسط سلول‌های گیاهی افزایش می‌یابد. در این مطالعه در گیاهان مقاوم و حساس قبل از اعمال آلودگی بیان کمی از ژن *PR3* مشاهده شد در حالی که پس از اعمال آلودگی بیان آن سیر صعودی داشت. میزان بیان ژن کیتیناز در رقم مقاوم اختلاف معنی‌داری را با رقم حساس نشان داد. میزان بیان ژن کیتیناز در رقم مقاوم در ساعات اولیه (۶ ساعت) بطور چشمگیری افزایش یافت به طوری که این رقم با افزایش ۲/۵ برابری اختلاف معنی‌داری را با رقم حساس نشان داد. همچنین میزان بیان این ژن در رقم تجن در ۱۲ ساعت پس از آلودگی ۸/۵ برابر نسبت به کنترل افزایش یافته و سپس در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بیشترین میزان بیان خود رسید. الگوی بیان ژن کیتیناز در رقم حساس مشابه رقم مقاوم بود به طوری که بیان این ژن در فلات پس از یک روند افزایشی آرام در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بیشترین میزان خود رسید. میزان رونوشت ژن کیتیناز ۴۸ ساعت پس از آلودگی روند کاهشی را در هر دو ژنوتیپ نشان داد. اگرچه هر دو رقم حساس و مقاوم در یک بازه زمانی به بیشترین میزان بیان ژن رسیدند ولی میزان بیان در رقم مقاوم تجن ۲۰ برابر در حالی که در رقم حساس فلات تنها ۱۲/۹۹ برابر نسبت به زمان کنترل افزایش یافت (شکل ۶). مقایسه میزان رونوشت در زمان اوج بیان در رقم تجن ۱/۵ برابر رقم فلات بود که این افزایش در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. مطالعات قبلی محققان حاکی از آن بود که بیان بالای پروتئین تراریخت کیتیناز می‌تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم سبب مقاومت به بیمارگرهای قارچی شود. در روش مستقیم کیتیناز، کیتین موجود در هیف‌های در حال رشد را تجزیه می‌کند در حالی که در روش غیرمستقیم کیتیناز سبب آزاد سازی الیگومرهای کیتین شده که می‌توانند به عنوان الیسیتورهای مکانیسم دفاعی در گیاه عمل کنند (Collinge et al. 1993). از آنجا که کیتیناز رشد قارچ را به وسیله تجزیه ساختار پلی ساکاریدی دیواره قارچ محدود می‌کند در این مطالعه به عنوان

بیان در ساعات بعدی (۴۸ ساعت) پس از آلودگی در هر دو رقم حساس و مقاوم روند کاهشی را نشان داد. مقایسه گیاهان مقاوم و حساس در زمان اوج بیان نشان داد که رقم مقاوم تجن با میزان رونوشت ۱/۸ برابری، اختلاف معنی‌داری را در سطح پنج درصد با فلات نشان داد (شکل ۵). بررسی الگوی تغییرات ژن *PR2* حاکی از آن بود که این ژن مانند *PR1* و *PAL* دارای الگوی بیان تک اوجی می‌باشد.

بنا گلکونازها معمولاً بعد از حمله بیمارگر به گیاه و یا تحت تنش‌های زیستی یا غیرزیستی مختلف در گیاه القا می‌شود و معمولاً به صورت سینرژیست با آنزیم کیتیناز عمل می‌کند (Simmons 1994). با توجه به اینکه *PR2* ها در تشکیل پاپیل نیز نقش بسزایی را در گیاه ایفا می‌کنند، بیان سریع و بالای میزان رونوشت این ژن در رقم مقاوم تجن نسبت به رقم حساس فلات موثر بودن این ژن را در القا مسیر مقاومت تایید می‌کند. همچنین زیاد بودن میزان تشکیل پاپیل در نتایج میکروسکوپی رقم تجن تایید کننده این مطلب می‌باشد.

میزان بیان نسبی ژن *PR2* در گیاهان مقاوم و حساس

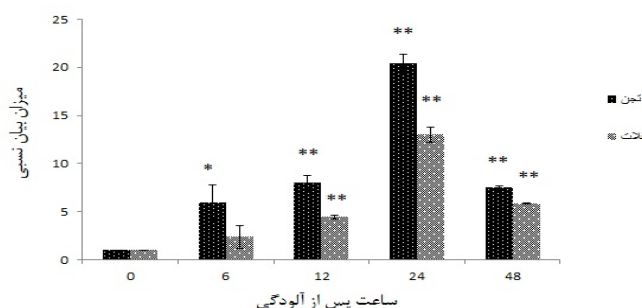
شکل ۵- میزان بیان ژن بتا ۱-۳ گلوناز (*PR2*) در ارقام مقاوم (تجن) و حساس (فلات) گندم تحت آلودگی به سفیدک سطحی (*Bgt*). * و ** به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با کنترل در سطوح پنج و یک درصد در آزمون *t* می‌باشد.

پروتئین‌های کیتیناز (EC 3.2.1.14) گروهی از اندوکیتینازها می‌باشند که پیوند بتا-۱-۴ بین N-استیل گلوکوزآمین موجود در ساختار کیتین که یکی از اجزا مهم دیواره قارچ‌ها محسوب می‌شود را هیدرولیز می‌کنند (Leah et al. 1991). لذا آنزیم‌های کیتیناز می‌توانند نقش بسیار مهمی در مقاومت علیه این بیمارگرها ایفا کنند. مطالعات نشان داد که گیاهان تراریخت با بیان بالای

و CWA با مقاومت در برابر *Bgt* در این بررسی با نتایج سایر محققین مطابقت دارد که نشان دهنده این است که این پاسخ‌ها گاهی به طور انفرادی و یا توأم در مقاومت غلات در برابر بیمارگر بیوتروف نقش بسیار موثری را ایفا می‌کند (Hückelhoven et al. 1999; Panstruga 2005).

پیش نیاز تولید ارقام مقاوم، شناسایی مکانیسم‌های گیاهی درگیر در واکنش به عوامل بیماریزا است که منجر به ظهور مقاومت در ارقام مقاوم و حساسیت در ارقام حساس گیاهی می‌شود (Baker et al. 1997). بنابراین درک درست از روند تخریب بیماری و همچنین مقاومت میزبان به بیمارگر ممکن است به محقق کمک کند تا با ایده‌های تحقیقاتی بیشتری برای غلبه به بیماری گام بردارد. بررسی میزان رونوشت ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق نشان داد که میزان بیان ژن *PR1* در رقم مقاوم پس از اعمال آلودگی بیشتر از بیان ژن *PR2* و سایر ژن‌های دیگر بوده است که می‌توان به نقش کلیدی آن در القای مقاومت به قارچ بیوتروف *Bgt* نسبت داد به طوری که افزایش بیان ژن *PR1* به عنوان یکی از نشانگرهای مقاومت غلات به سفیدک شناخته شده است (Schulthesis et al. 2003). همچنین میزان بیان ژن کیتیناز ضدقارچی آن باشد که با یافته‌های (Mansouri et al. 2009) نیز مطابقت داشت. همپنین نتایج این بررسی بیانگر این بود که میزان رونوشت ژن‌های مورد مطالعه در تمامی ساعات مورد بررسی در رقم مقاوم تجن بالاتر از رقم حساس فلات می‌باشد. همچنین زمان القای این ژن‌ها در رقم مقاوم در اثر آلودگی به سفیدک سطحی سریع‌تر اتفاق می‌افتد، لذا بر این اساس تصور می‌شود نه تنها سطح بیان ژن‌های مرتبط با مکانیسم دفاعی گیاه در ایجاد مقاومت تاثیر دارد بلکه زمان القای بیان ژن نیز از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. با توجه به تغییرات مشاهده شده در الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه و نقش آنها در آلودگی سفیدک سطحی، تصور می‌شود این ژن‌ها در ارتباط با پاسخ‌های دفاعی گندم نسبت به سفیدک سطحی باشند و می‌توانند به عنوان ژن‌های کاندید، برای مطالعات بیشتر در جهت تولید ارقام مقاومی که دارای سطح بیان بیشتری از این ژن‌ها باشند، محسوب شوند. et Anand al. (2003) لاین‌های گندم تراخیختی تولید کردند که در

یک ژن پاسخ‌دهنده دفاعی، نقش آن در تعامل گندم با قارچ سفیدک سطحی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق حاکی از بیان زود هنگام و بالای این ژن در رقم مقاوم پس از آلودگی با *Bgt* بود. بیان بالای ژن کیتیناز می‌تواند بیانگر نقش بسیار موثر آن در مکانیسم دفاعی گیاه علیه بیمارگر قارچی باشد به طوری که ژن کیتیناز با بیان بالا و زود هنگام، مانع توسعه قارچ در بافت پارانشیمی و القای مقاومت در گیاه می‌شود. افزایش سطح بیان ژن کیتیناز در ارقام مقاوم نسبت به رقم حساس توسط (Soltanloo et al. 2010) برای بیماری زنگ زرد و قهوه‌ای گزارش شد. چنین نتایجی قبلاً توسط محققین برای بیماری‌های دیگر گندم مثل سیاهک و سفیدک پودری نیز گزارش شده است (Rubiales and Niks 1995; Gjetting et al. 2004; Rosewarne et al. 2006)

میزان بیان نسبی ژن *PR3* در گیاهان مقاوم و حساس

شکل ۶- میزان بیان ژن کیتیناز (*PR3*) در ارقام مقاوم (تجن) و حساس (فلات) گندم تحت آلودگی به سفیدک سطحی (*Bgt*). * و ** به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با کنترل در سطوح پنج و یک درصد در آزمون *t* می‌باشد.

مطالعات نشان می‌دهد که گیاهان در مقابله با عوامل بیوتروف عمدتاً با مکانیسم‌های مرگ سریع سلولی، محکم کردن دیواره سلولی در محل نفوذ بیمارگر و با افزایش تولید بعضی از پروتئین‌های ضد میکروبی مثل پروتئین‌های PR از نفوذ و توسعه بیمارگر در خود جلوگیری می‌کنند (Van loon et al. 2006; Glazebrook 2005). بررسی پاسخ‌های دخیل در مقاومت رقم و لاین‌های مختلف در این مطالعه نشان داد که واکنش مرگ سریع سلولی و تشکیل پاپیل در ارقام مقاوم افزایش معنی‌داری را نسبت به فلات داشته است. ارتباط افزایش نرخ جواب‌های HR

پتانسیل مناسبی برای اصلاح در زمینه مقاومت به بیماری به خصوص سفیدک سطحی را داراست.

آنها بیان همزمان ژن‌های کتیناز و گلوکوناز سبب مقاومت نسبی به فوزاریوم در شرایط گلخانه‌ای شد. از سویی بیان بالای ژن‌های مسیر مقاومت در رقم مقاوم تاجن حاکی از آن بود که این رقم

منابع

Adhikari TB, Balaji B, Breeden J, Anderson JM, Goodwin SB (2004) Quantification of *Mycosphaerella graminicola* in wheat by real-time PCR. *Phytopathology* 94: S2.

Agrios GN (2005) *Plant Pathology*. Academic Press, Science. 922-952.

Aist JR, Bushnell WR (1991) Invasion of plant hosts by powdery mildew fungi and cellular mechanism of resistance. In: Cole GT, Hoch HC (Eds) *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press, New York 321-345

Akhtar S, Anjum FM, Anjum MA (2011) Micronutrient fortification of wheat flour: Recent development and strategies. *Food Research International* 44: 652-659.

Alam MA, Mandal MSN, Wang C, Ji W (2013). Chromosomal location and SSR markers of a powdery mildew resistance gene in common wheat line N0308. *African Journal of Microbiology Research* 7: 477-482.

Anand A, Zhou T, Trick HN, Gill Bikram S, Bockus W, Muthukrishnan S (2003) Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany* 54:1101-1111.

Babaeizad V, Imani JG, Kogel KH, Eichmann R, Hüchelhoven R (2009) Over-expression of the cell death regulator *BAX inhibitor-1* in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 455-463.

Bagal UR, Leebens-Mack JH, Walter Lorenz W, Dean JFD (2012) The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. *Bio Med Central Genomic* 13: S3-S1

Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in Plant Microbe Interactions. *Science* 276: 726-733.

Bieri S, Potrykus I, Fütterer J (2003) Effects of combined expression of antifungal barley seed proteins in transgenic wheat on powdery mildew infection. *Molecular Breeding* 11: 37-48.

Bindschedler LV, Burgis TA, Mollis DJ, Ho JT, Cramer R, Panu PD (2009) In planta proteomics and proteogenomics of the biotrophic barley fungal pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular and Cellular Proteomics* 8:2368-2381

Campbell MM, Ellis BE (1992) Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: III. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Physiology* 98:62-70.

Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinases. *Plant Journal* 3: 31-40.

Coventry DR, Gupta RK, Yadav A, Poswal RS, Chhokar RS, Sharma RK, Yadav VK, Gill SC, Kumar A, Mehta A, Kleemann SGL, Bonamano A, Cummins JA (2011) Wheat quality and productivity as affected by varieties and sowing time in Haryana. *Indian Field Crops Research* 123: 214-225.

Dahleen L, Okubara PA, Blech AE (2001) Transgenic approaches to combat fusarium head blight in wheat and barley. *Crop Science* 41:628-637.

Eichmann R, Dechert C, Kogel KH, Hüchelhoven R (2006) Transient over-expression of barley *BAX inhibitor-1* weakens oxidative defence and *MLA12*-mediated resistance to *Blumeria graminis* f.sp *hordei*. *Molecular Plant Pathology* 7: 543-552.

Eichmann R, Hüchelhoven R (2008) Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. *Journal of Plant Physiology* 165: 5-18.

Fitzgerald HA, Chern MSH, Navarre R, Ronald, PD (2004) Overexpression of (At) NPR1 in rice leads to a BTH-and environment-induced lesion-mimic/cell Death phenotype. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17:140-151

Gjetting T, Carver TCW, Skøt T, Lyngkjær MF (2004) Differential Gene Expression in Individual Papilla-Resistant and Powdery Mildew-Infected Barley Epidermal Cells. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17: 729-738

Glazebrook L (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology* 43: 205-227.

Grison R, Grezes-Besset B, Schneider M, Lucante N, Olsen L, Leguay J, Toppan A (1996) Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Natural Biotechnology* 14:643-646

Grunwald I, Rupprecht I, Schuster G, Kloppstech K (2003) Identification of guttation fluid proteins: the presence of pathogenesis-related proteins in noninfected barley plants. *Physiologia Plantarum* 119: 192-202.

He R, Chang Z, Yang Z, Yuan Z, Zhan H, Zhang X, Liu J (2009) Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene Pm43 introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 1173-1180.

Hernández H, Figueredo M, Garrido N, Sánchez L, Sarracent J (2005) Intranasal immunisation with a 62 kDa proteinase combined with cholera toxin or CpG adjuvant protects against *Trichomonas vaginalis* genital tract infections in mice. *International Journal for Parasitology* 35: 1333-1337.

Hoegen E, Strömberg A, Pihlgren U, Kombrink E (2002) Primary structure and tissuespecific expression of the

- pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Molecular Plant Pathology* 3: 329-345.
- Hückelhoven R (2004) *BAX inhibitor-1*, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9: 299-307.
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel KH (1999) Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with H₂O₂ but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* 119: 1251-1260.
- Kaur N, Street K, Mackay M, Yahiaoui N, Keller B (2008) Molecular approaches for characterization and use of natural disease resistance in wheat. *European Journal of Plant Pathology* 121: 387-397.
- Kazemi H, Foroutan A, Aghajani MA, Karbalaee-Khiavi H (2004) Evaluation of some foliar fungicides for controlling powdery mildew of wheat. *Proceeding of the 16th Iranian Plant Protection Congress*. University of Tabriz. P: 26. (In Farsi).
- Khong NG, Randoux B, Tayeh Ch, Coutte F, Bourdon N, Tisserant B, Laruelle F, Jacques P, Reignault P (2012) Induction of resistance in wheat against powdery mildew by bacterial cyclic lipopeptides. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 77: 39-51.
- Kogel KH, Langen G (2005) Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Journal Cellular Microbiology* 11:1555-1564.
- Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *Journal of Biological Chemistry* 266: 1564-1573.
- Leubner-Metzger G, Meins FJR (1999) Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). In: Datta SK, Muthukrishnan S (Ed.) *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL 49-76.
- Li H, Wang X, Song F, Wu C, Wu X, Zhang N, Zhou Y, Zhang X (2011). Response to Powdery Mildew and Detection of Resistance Genes in Wheat Cultivars from China. *Acta Agronomica Sinica* 37: 943-954.
- Lillemo M, Asalf B, Singh RP, Huerta-Espino J, Chen XM, He ZH, Björnstad A (2008) The adult plant rust resistance loci Lr34/Yr18 and Lr46/Yr29 are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 1155-1166.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- Δ CT} method. *Methods* 25: 402-408.
- Mansouri M, Hosseini pour A, Sharifi-sirchi GhR, Massumi H (2009). Changes in chitinase and β -1,3-glucanase transcript levels in sweet orange (*Citrus sinensis*) in response to treatment with *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. *Journal Agriculture Biotechnology* 2: 39-52 (In Farsi).
- Mohammadi M, Kazemi H (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science* 162: 491-498.
- Molina A, Görlach J, Volrath S, Ryals J (1999) Wheat Genes Encoding Two Types of PR-1 Proteins Are Pathogen Inducible, but Do Not Respond to Activators of Systemic Acquired Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 12: 53-58.
- Molitor A, Zajic D, Voll LM, Pons- Hückelhoven J, Samans B, Kogel H, Waller F (2011) Barley Leaf Transcriptome and Metabolite Analysis Reveals New Aspects of Compatibility and *Piriformospora indica*-Mediated Systemic Induced Resistance to Powdery Mildew. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 24: 1427-1439.
- Oberhaensli S, Parlange F, Buchmann JP, Jenny FH, Abbott JC, Burgis TA, Spanu PD, Keller B, Wicker T (2011) Comparative sequence analysis of wheat and barley powdery mildew fungi reveals gene colinearity, dates divergence and indicates host-pathogen coevolution. *Fungal Genetic Biology* 48: 327-334.
- Panstruga R (2005) Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. *Biochemical Society Transaction* 33: 389-392.
- Paxton JD (1981) Phytoalexins-a working redetinition. *Phytopathology* 101:106-109.
- Poulsen TT (2001) Transgenic barley with enhanced resistance to fungal pathogens. PhD thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark. Pp. 86.
- Rate DN, Greenberg JT (2001) The Arabidopsis aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant Journal* 27: 203-211.
- Rauscher M, Adam AL, Wirtz S, Guggenheim R, Mendgen K, Deising HB (1999) PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant Journal* 19: 625-633.
- Ritter H, Schulz GE (2004) Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell* 16: 3426-3436.
- Rosewarne GM, Singh RP, Huerta-Espino J, William HM, Bouchet S, Cloutier S, McFadden H, Lagudah ES (2006) Leaf tip necrosis, molecular markers and proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes Lr46/Yr29. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 500-508.
- Rubiales D, Niks RE (1995) Characterization of Lr34, a major gene conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust. *Plant Disease* 79:1208-1212.
- Schultheiss H, Dechert C, Kogel KH, Hückelhoven R (2003) Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. *Plant Journal* 36: 589-601.
- Sels J, Mathys M, De Coninck BMA, Cammue BPA (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 941-950.
- Shah J, Klessig DF (1999) Salicylic acid: Signal perception and transduction. In: Libbenga K, Hall M, Hooykaas PJJ (Eds.). *New comprehensive biochemistry*.

- Biochemistry and Molecular Biology Plant Hormones. Elsevier, UK 513-554.
- Simmons CR (1994) The physiology and molecular biology of plant 1,3-b-d-glucanases. Critical Review Plant Science 13: 325-387.
- Soltanloo H, Ghadirzade Khorzoghi E, Ramezani SS, Kalate Arabi M, Pahlavani MH (2010) The expression profile of Chi-1, Glu-2, Glu-3 and PR1.2 genes in Scab-resistant and susceptible wheat cultivars during infection by *Fusarium graminearum*. Plant Omics Journal 5: 162-166
- Soltanloo H, Ramezani SS, 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. Biology of Iran Journal 23: 115-124 (In Farsi)
- Spanu PD, Abbott JC, Amselem J, Burgis TA, Soanes DM, Stuber K, van Themaat EVL, Brown JKM, Butcher SA, Gurr SJ, Lebrun MH, Ridout CJ, Schulze-Lefert P, Talbot NJ, Ahmadinejad N, Ametz C, Barton GR, Benjdia M, Bidzinski P, Bindschedler LV, Both M, Brewer MT, Cadle-Davidson L, Cadle-Davidson MM, Collemare J, Cramer R, Frenkel O, Godfrey D, Harriman J, Hoede C, King BC, Klages S, Kleemann J, Knoll D, Koti PS, Kreplak J, Lopez-Ruiz FJ, Lu XL, Maekawa T, Mahanil S, Micali C, Milgroom MG, Montana G, Noir S, O'Connell RJ, Oberhaensli S, Parlange F, Pedersen C, Quesneville H, Reinhardt R, Rott M, Sacristan S, Schmidt SM, Schon M, Skamnioti P, Sommer H, Stephens A, Takahara H, Thordal-Christensen H, Vigouroux M, Wessling R, Wicker T, Panstruga R (2010) Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. Science 330:1543-1546.
- Stotz HU, Thomson JG, Wang Y (2009) Plant defensins defense, development and application. Plant Signaling and Behavior 11: 1010-1012.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF (1998) Separate Jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 95:15107-15111.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. Plant 11: 1187-1194.
- Tohidfar M, Mohammadi M, Ghareyazie B (2005) Agrobacterium-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. Plant Cell Tissue, Organ and Culture 83: 83-96 (In Farsi).
- Tong C, Hall CAS, Wang H (2003). Land use change in rice, wheat and maize production in China (1961–1998). Agriculture, Ecosystems and Environment 95: 523-536
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Phytopathology 44: 135-162.
- Wang X, Liu W, Chen X, Tang C, Dong Y, Ma J, Huang X, Wei G, Han Q, Huang L, Kang Z (2010) Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. Biology Molecular Cell Plant Biology 10: 9-23.
- Way HM, Kazan K, Mitter N, Goulter KC, Birch RG, Manners JM (2002) Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth. Physiological and Molecular plant pathology 60: 275-282.
- Xin T, Wang X, Peng H, Yao Y, Xie Ch, Han Y, Ni Zh and Sun Q (2012) Transcriptome comparison of Susceptible and resistant wheat in response to powdery mildew infection. Genomics Proteomics Bioinformatics 10: 94-106
- Xu F, Deng G, Cheng Sh, Zhang W, Huang X, Li L, Cheng H, Rong X, Li J (2012) Molecular cloning, characterization and expression of the phenylalanine ammonia-lyase gene from *Juglans regia*. Molecules 17: 7810-7823.
- Zhang K, Zhao L, Hai Y, Chen G, Tian J (2008) QTL Mapping for Adult Plant Resistance to Powdery Mildew, Lodging Resistance, and Internode Length Below Spike in Wheat. Acta Agronomica Sinica 34: 1350-1357.