

## 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

لila آهنگر<sup>۱\*</sup>، ولی الله بابایی زاد<sup>۱</sup>، غلامعلی رنجبر<sup>۱</sup>، حمید نجفی زرینی<sup>۱</sup>، عباس بیابانی<sup>۲</sup>

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

Ahangar L<sup>1\*</sup>, Babaezad V<sup>1</sup>, Ranjbar GA<sup>1</sup>, Najafi Zarrini H<sup>1</sup>, Biabani A<sup>2</sup>

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

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

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸)

#### چکیده

گندم نان یکی از محصولات غذایی است که جایگاه مهمی در تغذیه جوامع بشری دارد. بیماری سفیدک سطحی در گندم که توسط عامل (*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 *PRI*, *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 کلی 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 بیان نسی آن‌ها نسبت به ژن مرجع اکتنین نرماییزه 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 پس از آلودگی به عامل سفیدک سطحی، نسبت به زمان کنترل روند افزایشی استقرار هاستوریوم قارچ در سلول میزان ممانت نمایند. بیشینه 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 *PRI* 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 به سزاگی دارد.

#### واژه‌های کلیدی

بیان ژن

ژن‌های *PR*

سفیدک سطحی

گندم

*Bgt*

## مقدمه

غشاهای سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماریزایی و سترن 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 تنفس 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 آلدگی با قارچ *Prenospora parasitica* بیان می‌شود با *Alternaria brassicicola* مجموع ژن‌های PR که در پاسخ به آلدگی با قارچ *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) عملکرد بیوشیمیایی خاصی برای آن در نظر گرفته نشده اما نقش ضد میکروبی آن توسط محققین گزارش شده است (Rauscher et al. 1999; Sels et al. 2008). در مطالعات میکروواری در گذم تحت آلدگی با سفیدک سطحی ۴۶ ژن به عنوان پروتئین-های PR شناسایی شدند که در هر دو ژنوتیپ حساس و مقاوم پس از آلدگی با بیمارگر افزایش یافتد. 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 سترن کننده PRها، پروتئین‌هایی مانند کیتیناز و بتا-۱ و ۳ گلوكناتراز 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 *Poulsen 2001*; Poulsen et al. 2010b زنگ در گندم نقش به سزاوی ایفا می‌کند (Tohidfar et al. 2005). *Soltanloo et al. 2010b* برای ایجاد مقاومت به بیماری ورتیسیلیومی به پنه متنقل کردند. نسل سوم گیاهان پنه تاریخت، بیان پایدار ژن کیتیناز را در ایجاد مقاومت به قارچ *Verticillium dahliae* نشان داد. با توجه به گزارشات فراوان مبنی بر دخالت مشتقات مسیر بیوشیمیایی فنیل پروپانوئید در مواجهه با انواع تنفس‌های زیستی و غیر زیستی (Campbell and Ellis 1992; Xu et al. 2012) می‌توان به

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. 2014). 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 معتل 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 آلدگی 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 تاریخته مقاوم یکی از روش‌های کارآمد جهت تولید گیاه مقاوم به بیمارگرهای قارچی می‌باشد (Lillemo et al. 2008; He et al. 2009) مقاومت به خصوصی ژن‌های سترن کننده پروتئین‌های مرتبط به بیماریزایی<sup>۱</sup> (PRs) بیشترین توجه را به خود جلب کردند که می‌توان از آن‌ها در راستای تولید گیاهان تاریخت مقاوم به عوامل تنفس‌زا استفاده کرد (Van Loon et al. 2005; Kogel and Langen 2005). پروتئین‌های PR تولید شده توسط این دسته از ژن‌ها، موجب تخريب دیواره‌های سلول قارچی، ایجاد اختلال در

<sup>۱</sup> Pathogenesis related genes

تحت آلدگی 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 ژنتیپ 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 آلدوده 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 آلدودسازی و تعیین میزان حساسیت ۴۰ ژنتیپ گندم از روش بابایی‌زاد و آیشمن (Eichmann et al. 2006; Babaeizad et al. 2009) استفاده شد. به این منظور ابتدا بذور هر رقم ضدغفعونی و پس از جوانه زنی به گلدان حاوی خاک استریل، منتقل شدند. گیاهچه‌ها در اتفاق 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 هفتاهی هر ژنتیپ بریده شد و در سه تکرار در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی روی محیط آب آکار ۰/۵ درصد حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر بنزیمیدازول داخل تشک پتری پخت شدند و سپس با اسپورهای قارچ *Bgt* (به نسبت ۵ اسپور در میلی‌متر مربع) آلدوده شدند. یک هفته بعد از آلدودسازی تعداد کلی رشد یافته در سطح ۲/۵ سانتی‌متر مریع هر برگ شمارش و پس از محاسبه میانگین داده‌ها برای هر رقم، بر اساس شدت آلدگی 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 ژنتیپ به *Bgt* پس از غربالگری چند ژنتیپ با طیف مختلف حساسیت به بیماری انتخاب شدند. سپس برگ‌های اول گیاهچه‌های یک هفتاهی بریده شده و بر روی محیط آب آکار ۰/۵ درصد پخت شدند. سپس با اسپورهای

بررسی تغییرات برخی از آنزیم‌های این مسیر از جمله فنیل-آلانین‌آمونیالیاز<sup>۱</sup> (*PAL*) اشاره کرد. ژن *PAL* از طریق دخالت در مسیرهای سنتز فنیل پروپانوئیدها و ایزووفلانوئیدها که فعالیت فیتوالکسینی دارند در مقاومت گیاه نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. این ژن همچنین در مسیر بیوستز اسید سالیسلیک 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 میکرواری گندم آلدوده به سفیدک سطحی حاکی از افزایش چندین آنزیم کلیدی درگیر در مسیر بیوستز فلاونوئیدها از جمله *PAL* بود که نتایج بررسی تغییرات بیان ژن‌های این مسیر بوسیله تکنیک Real time PCR نیز تایید کننده نتایج میکرواری 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 ظاهر ژن‌های مسیر مقاومت *PRI*, *PR2*, *PR3* و *PAL* در زمان‌های مختلف بعد از آلدگی در ارقام حساس و مقاوم به سفیدک سطحی بود. لذا در این پژوهش واکنش ۴۰ ژنتیپ 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

<sup>۱</sup> Phenylalanine ammonia-lyase

جدول ۱- مشخصات و مبدأ ژنوتیپ‌های گندم‌های مورد مطالعه

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

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 اتفاقک 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 (Hukelhoven et al. 1999). بعد از ۴۸ ساعت برگ‌ها به محلول DAB<sup>۱</sup> (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 ۱۵ درصد تری‌کلرواستیک اسید<sup>۲</sup> رنگبری شده و در محلول گلیسیرین 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

<sup>1</sup> Diaminobezidine

<sup>2</sup> Trichloro-acetic acid

درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای اتصال آغازگرها و سپس نگهداری در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بود. بلافضلله برای آزمون عملکرد اختصاصی واکنش PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی ۰/۵ درجه در هر چرخه بین دمای ۶۰-۹۵ 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 نرم‌البیزه شد. میزان بیان قبل از آلدگی به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد. محاسبه و تغییرات بیان ژن نیز مطابق با روش  $\Delta\Delta CT$  (Livak and Schmittgen 2001) مطابق با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  است.

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

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 آلدگی با زمان کنترل در هر رقم با استفاده از آزمون *t* تجزیه شدند. همچنین میزان 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 ژنتوتیپ 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 ژنتوتیپ گندم برای صفت مرتبط با مقاومت به این بیماری نشان داد که ارقام شانگهای، فلاٹ، ارگ و پارسی با بیشترین میزان کلنی رشدیافتة در  $\text{cm}^2$  (بیش از ۹۰ کلنی رشدیافتة) به عنوان حساس‌ترین و ارقام زارع، گاسکوچن، تجن، سیرووان و ER-13-89 با کمترین میزان کلنی رشد یافته (کمتر از ۵۰ کلنی) به عنوان مقاوم‌ترین ارقام به بیماری سفیدک سطحی شناصایی شدند (شکل ۱). در جدول ۳، نتایج تجزیه واریانس از نظر میزان حساسیت ژنتوتیپ‌ها بر اساس

اتفاق کشت نگهداری شدند. جهت استخراج RNA، از برگ‌های اول گیاه قبل از آلدوسازی و سپس در بازه‌های زمانی ۶، ۱۲ و ۴۸ ساعت پس از آلدگی نمونه‌برداری انجام شد. برگ‌ها بلافضلله 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 برگی 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 اسپکتروفوتومتر بررسی شد.

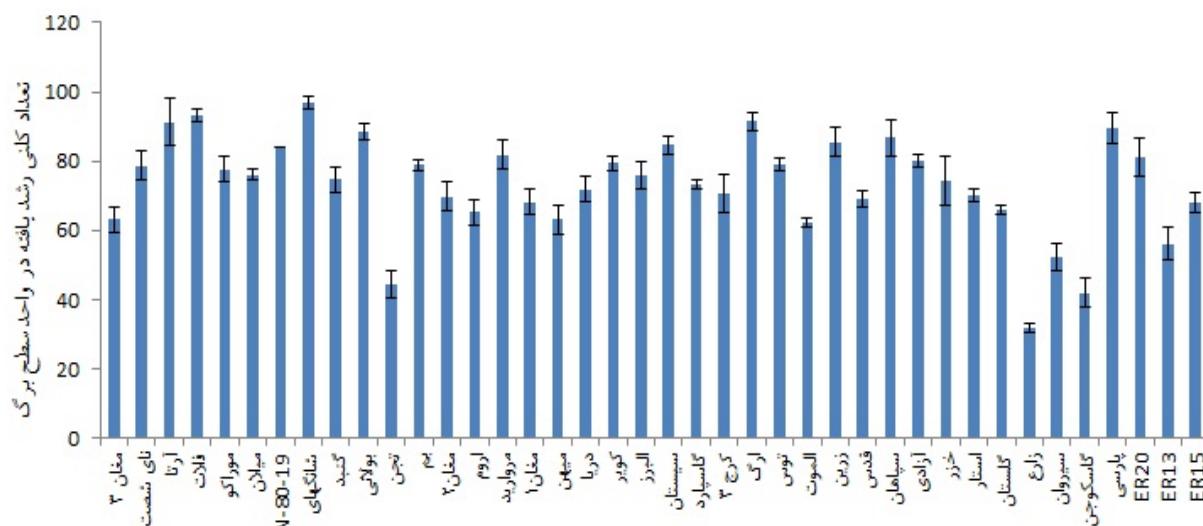
Real time PCR ساخت cDNA و واکنش یک میکروگرم از RNA کل، با استفاده از آغازگر الیگومر Timedien (OligodT) و کیت RevertAid™ First (Fermentase) واکنش Strand cDNA Synthesis Kit در حجم ۲۰ میکرولیتر طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل شد. برای انجام RT-PCR، از دو میکرولیتر cDNA رقیق شده (به نسبت ۱:۷) و آغازگرهای *PAL*, *PR3*, *PR2*, *PRI* 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 OligoExplorer V1.4 و BioEdit 7.0.9.0 با استفاده از دستگاه C1000™ Thermal Cycler شرکت بیوراد<sup>۱</sup> با استفاده از کیت سایبرگرین (Master Mix 2X) شرکت ترموساینتیفیک انجام شد. هر واکنش PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر حاوی دو میکرولیتر cDNA الگو، ۷/۵ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۰/۳ ماکرومolar از هر آغازگر و آب عاری از RNase انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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

<sup>1</sup> Quantitative real time PCR

<sup>2</sup> BioRad

## جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش

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



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

جدول ۳-۲- تجزیه واریانس، ۴۰ زنوتیپ گندم از نظر میزان حساسیت به سفیدک سطحی، گندم (*Bgt*) پر اساس، تعداد کلینه، رشد یافته در  $2/5 \text{ cm}^2$  هر یوگ

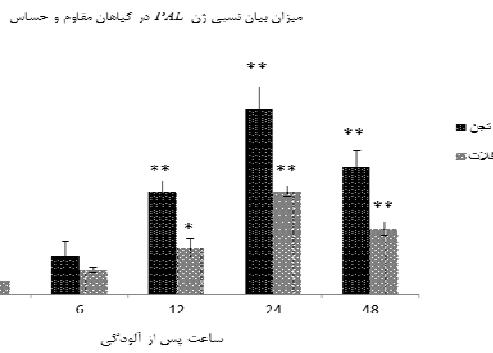
F	میانگین مریعات	مجموع مریعات	درجه آزادی	
۵۵/۰۹ **	۶۰۲/۳	۲۳۴۹۱/۴	۳۹	تیمار
۹/۰۲ **	۹۸/۰	۱۹۷/۱۷	۲	بلوک
	۱۰/۹	۸۵۲/۷۹	۷۸	خطا
		۲۴۵۴۱	۱۱۹	کل
۰/۹۶		R <sup>2</sup>	۴/۵	CV

\*و\*\* به ترتیب اختلاف معنی دار در سطوح پنج و یک درصد

ژنوتیپ‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد وجود دارد (شکل ۲) به طوری که رقم فلات با میزان بالای نفوذ (بیش از ۵۳ درصد) نسبت به سایر ارقام از حساسیت بالاتری برخوردار می‌باشد. در حالی که 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 بوده‌است، به طور معنی‌داری، افزایش یافت (شکل ۲).

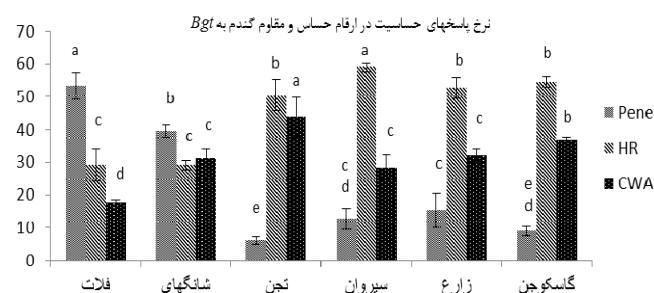
تعداد کلی رشد یافته در  $2/5 \text{ cm}^2$  برگ آورده شده است. اثر ژنوتیپ‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار شد که نشان دهنده وجود تفاوت ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. نتایج حاصل از مطالعات دقیق‌تر از چگونگی پاسخ گیاه به عامل بیماری در تعدادی از ارقام منتخب شامل ارقام حساس فلات و شانگهای و ارقام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

ساعت پس از اعمال آلودگی به حداقل 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.



شکل ۳- میزان بیان ژن فیبل آلانین امونیالیاز (*PAL*) در ارقام مقاوم (تجن) و حساس (فلات) گدم 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.

آنژیم *PAL* اولین آنژیم در مسیر سنتر 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. 1999; Rate et al. 2001; Fitzgerald et al. 2004). آنژیم حد بواسطه 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 *Bgt* (Pene)، بیانگر نفوذ قارچ، (HR) مرگ سریع سلولی؛ (CWA) تشکیل دیواره سلولی. مقایسه میانگین بین ژنوتیپ‌ها با استفاده آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام گرفت.

مقایسه نتایج این بررسی با یافته‌های دیگران ثابت می‌کند که هر دو عکس العمل HR و CWA نقش اصلی را به عنوان پاسخ‌های دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرهایی با چرخه زندگی بیوتروفیک 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 پایپل 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 PR4 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. بررسی روند تغییرات بیان این ژن‌ها نشان می‌دهد که سطح ظاهر 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 ظاهر 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

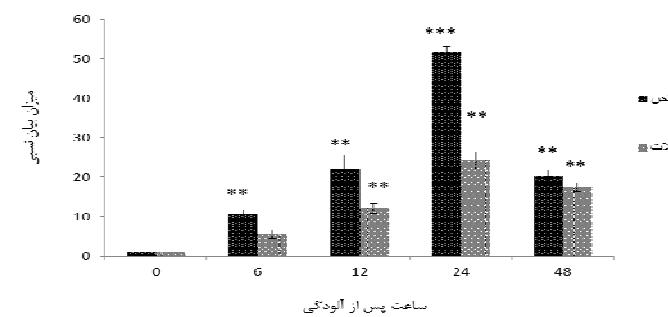
را در مکانیسم دفاعی گیاه بازی می‌کنند لذا افزایش بیان ژن *PAL* در مراحل اولیه آلدگی را می‌توان به نقش این ژن در سنتز فیتوالکسین‌ها نیز نسبت داد. هچنین نقش ژن *PAL* در القای (Rate et al. 2001; Fitzgerald et al. 2004) به اثبات رسیده است. بنابراین افزایش بیان این ژن در زمان اوج آلدگی (۲۴ ساعت) را می‌توان 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 میزان جلوگیری کند. نتایج همچنین بیانگر آن بود که برگ‌های گیاهان مقاوم در تمامی بازه‌های زمانی بعد از آلدگی 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 Gjetting et al. 2004 سطحی باشد که این نتیجه با یافته‌های 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 آلدگی با *Bgt* به طور معنی‌داری افزایش یافت به طوری که سطح رونوشت ۶ ساعت بعد از آلدگی در گیاهان مقاوم  $10/9$  برابر و در رقم فلات  $5/6$  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 آلدگی 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 آلدگی بود که میزان آن در رقم حساس و مقاوم به ترتیب  $24/25$  و  $51/8$  برابر زمان صفر مربوطه بود (شکل ۴). میزان افزایش بیان این اوج بیان در رقم مقاوم حدود  $2/2$  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 آلدگی 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).

آنژیم 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 پیش‌ماده‌های لازم برای سنتز محصولات متابولیکی ثانویه مانند لیگنین، لیگنان‌ها، فلاونوئیدها، فیتوالکسین‌ها و برخی ترکیبات دیگر می‌باشد که همه اینها از جمله ترکیبات موثر دفاعی در گیاه می‌باشند (Ritter and Schulz 2004; Bagal et al. 2012 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 آلدگی 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 تاریخت 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 ساعت اولیه بعد آلدگی (۶ ساعت) در رقم مقاوم افزایش یافت و در ۱۲ ساعت پس از آلدگی 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 آلدگی به بیشترین میزان خود رسید تا از توسعه بیشتر هیفا-های قارچ در سلول‌های گیاهی جلوگیری کند (Eichmann and Hückelhoven 2008). میزان بیان این ژن در رقم مقاوم در تمامی بازه‌های زمانی بعد از آلدگی 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 هیفه‌های 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 الگا مقاومت گندم به قارچ *Bgt* نسبت داد. نقش ضد قارچی *PRI* در سیستم دفاعی گیاه تا حد بسیار زیادی پذیرفته شده است به طوری که Schulthesis et al. (2003) تاثیر و فعالیت *PRI* را در ایجاد مقاومت گیاه جو برای جلوگیری از نفوذ سفیدک سطحی جو (*Bgh*) طی مطالعاتی تایید کردند. افزایش بیان ژن *PRI* پس از آلدگی به قارچ *Bgt* در این تحقیق نیز با Xin et al. (1999), Molina et al. (2012) و Khong et al. (2012) در گندم مطابقت داشت.

پروتئین‌های *PR2* که به بتا ۳-۱ گلوکونازها شهرت دارند دومین گروه از PR پروتئین‌ها می‌باشند که از طریق هضم بتا ۳-۱ گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ‌ها، سبب تخریب این پلی-ساکارید و در نهایت از بین رفتتن 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 (Hernaández et al. 2005). الیگوساکاریدهای آزاد شده از دیواره سلولی قارچ به عنوان یک الیسیتور عمل کرده و در نتیجه سبب فعال شدن پاسخ‌های دفاعی ثانویه با تولید فیتوالکسین‌ها و گلیکولین‌ها<sup>۱</sup> در گیاه می‌شوند. در این مطالعه بیان ژن *PR2* در همان ساعات اولیه پس از آلدگی افزایش معنی‌داری را در رقم مقاوم نشان داد به طوری که در ۶ ساعت بعد از آلدگی 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 طوری که رقم تجن در ۶ و ۱۲ ساعت پس از آلدگی به ترتیب با میزان بیان ۲/۳ و ۳/۸ برابر نسبت به فلات اختلاف معنی‌داری را با رقم حساس نشان داد. سپس بیان این ژن در ۲۴ ساعت پس آلدگی نسبت به حالت کنترل ۱۶/۵ برابر افزایش یافته و به بیشترین میزان بیان ژن *PR2* تجن رسید. در حالی که رقم حساس فلات میزان بیان ژن *PR2* روند آرامی را نشان داد و در ۲۴ ساعت پس از آلدگی با ۹/۲ برابر نسبت به زمان کنترل به بیشترین میزان بیان رسید. میزان

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

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

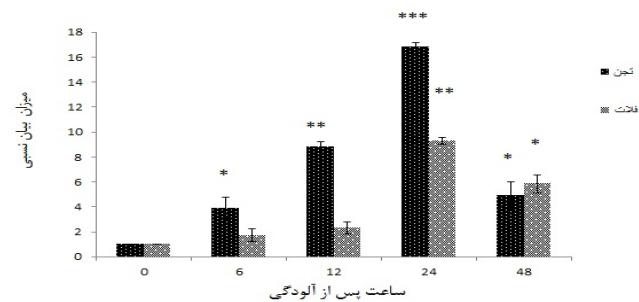
*PRI*‌ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌های غنی از سیستمیین می‌باشند که در بافت‌های مختلف گیاهی مثل دیواره سلولی، دستجات آوندی و واکوئل‌ها وجود دارند (Hoogenen et al. 2002; Grunwald et al. 2003). در جو و سایر غلات بیان ژن خانواده *PRI* معمولاً به عنوان مارکر قابل قبولی در مقاومت گیاه به بیماری سفیدک سطحی و سایر بیمارگرها به کار برده می‌شود. علاوه بر این *PRI*‌ها، عنوان شاخصی برای مقاومت القایی Schulthesis et al. (2003) مورد استفاده قرار می‌گیرند (Soltanloo et al. 2006; Van Loon et al. 2006). طی مطالعاتی نشان دادند که افزایش بیان ژن *PRI* کیتبیناز و گلوکوناز در گندم، منجر به بالا بردن مقاومت گیاه در مقابل *Fusarium graminearum* می‌شود. این پروتئین‌ها با اثر مستقیمی که بر روی بیمارگرها دارند از رشد و گسترش آن‌ها در گیاه می‌بینان جلوگیری می‌کنند. نتایج این بررسی نشان داد که میزان رونوشت این ژن در ۶ و ۱۲ ساعت پس از اعمال آلدگی 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 طوری که بیان این ژن در ۲۴ ساعت بعد آلدگی که زمان اوچ حمله قارچ (Aist and Bushnell 1991) به گیاه می‌باشد، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت تا از نفوذ و توسعه هیف‌های قارچ در میزان جلوگیری کند. همچنین مشاهده شد که سطح رونوشت در

<sup>1</sup> Glyceollin

کیتیناز به تنها یی و یا همراه با سایر پروتئین‌های PR سطوح بالایی از مقاومت را به آلدگی قارچی یا توسعه عالمی بیماری نشان می‌دهند (Grison et al. 1996; Bieri et al. 2003). ژن کیتیناز از گروه ژن‌های مسئول واکنش دفاعی می‌باشد و عموماً پس از حمله بیمارگر، سطح بیان آن توسط سلول‌های گیاهی افزایش می‌یابد. در این مطالعه در گیاهان مقاوم و حساس قبل از اعمال آلدگی بیان کمی از ژن *PR3* مشاهده شد در حالی‌که پس از اعمال آلدگی 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 طوری‌که 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 آلدگی ۸/۵ برابر نسبت به کنترل افزایش یافته و سپس در ۲۴ ساعت پس از آلدگی به بیشترین میزان بیان خود رسید. الگوی بیان ژن کیتیناز در رقم حساس مشابه رقم مقاوم بود به طوری‌که بیان این ژن در فلات پس از یک روند افزایشی آرام در ۲۴ ساعت پس از آلدگی به بیشترین میزان خود رسید. میزان رونوشت ژن کیتیناز ۴۸ ساعت پس از آلدگی 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 حالی‌که 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 تاریخت 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 حالی‌که در روش غیرمستقیم کیتیناز سبب آزاد سازی الیگومرهای کیتین شده که می‌توانند به عنوان الیستیورهای 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 آلدگی 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 *PAL* و *PRI* دارای الگوی بیان تک اوچی می‌باشد.

بنا گلوبونازها عموماً بعد از حمله بیمارگر به گیاه و یا تحت تنش‌های زیستی یا غیرزیستی مختلف در گیاه القا می‌شود و عموماً به صورت سینزیست 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 تنسی ژن *PR2* در گیاهان مقاوم و حساس

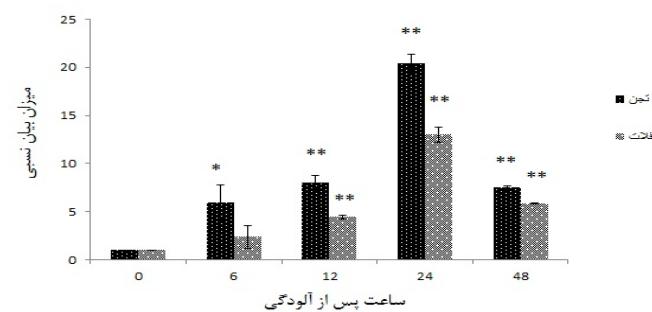
شکل ۵- میزان بیان ژن بتا-۳-۳ گلوبوناز (*PR2*) در ارقام مقاوم (تجن) و حساس (فلات) گندم تحت آلدگی به سفیدک سطحی (*Bgt*). \* و \*\* به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با کنترل در سطح پنج و یک درصد در آزمون *t* می‌باشد.

پروتئین‌های کیتیناز (EC 3.2.1.14) گروهی از اندوکیتینازها می‌باشند که پیوند بتا-۱ و بتا-۴ بین N-استیل گلوکزامین موجود در ساختار کیتین که یکی از اجزا مهم دیواره قارچ‌ها محاسب می‌شود را هیدرولیز می‌کنند (Leah et al. 1991). لذا آنزیم‌های کیتیناز می‌توانند نقش بسیار مهمی در مقاومت علیه این بیمارگر-ها ایفا کنند. مطالعات نشان داد که گیاهان تاریخت 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 توان 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 میزان 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 *PRI* در رقم مقاوم پس از اعمال آلدگی 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 *PRI* به عنوان یکی از نشانگرهای مقاومت غلات به سفیدک شناخته شده است (Schulthesis et al. 2003). همچنین میزان بیان ژن کیتیناز نسبت به گلوکوناز بیشتر بود که می‌تواند به دلیل نقش خدقارچی آن باشد که با یافته‌های Mansouri et al. (2009) نیز مطابقت داشت. همین 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 آلدگی 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 آلدگی 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 al. (2003) لاین‌های گندم تاریخی 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 آلدگی 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 زودهنگام، 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 قبل از 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 آلدگی 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 عمدها 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 دارد.

## 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, Hückelhoven 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, Futterer 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, Krugh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinases. *Plant Journal* 3: 31-40.

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 تجن حاکی از آن بود که این رقم

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, Hückelhoven 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, Hückelhoven 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 J (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, Sañchez 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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, Karbalaei-Khiavi H (2004) Evaluation of some foliar fungicides for controlling powdery mildew of wheat. Proceeding of the 16<sup>th</sup> 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  $\beta$ -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<sup>-ΔΔCt</sup> method. *Methods* 25: 402-408.
- Mansouri M, Hosseini pour A, Sharifi-sirchi GhR, Massumi H (2009). Changes in chitinase and  $\beta$ -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, Görlich 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 redetermination. *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-1protein 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, Ramezanpour SS, Kalate Arabi M, Pahlavani MH (2010) The expression profile of Chi-1, Glu-2, Glu-3 and PR1.2genes in Scab-resistant and susceptible wheat cultivars during infection by Fusarium graminearum. Plant Omics Journal 5: 162-166
- Soltanloo H, Ramezanpour 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 IAM, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF (1998) Separate Jasmonate- dependent and salicylate-dependent defense-response pathway s 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 AdultPlant Resistance to Powdery Mildew, Lodging Resistance, and Internode Length Below Spike in Wheat. Acta Agronomic Sinco 34: 1350-1357.