

## بررسی تأثیر مولکول سیگنال دهنده نماتد ascr#18 در القای مقاومت به زنگ قهوه‌ای گندم *Puccinia triticina*

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

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

۱- بهترتب دکتری اصلاح نباتات، استاد، دانشیار، دانشگاه تهران، کرج، چهارراه دانشکده، خیابان دانشکده، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج، ایران

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

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

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

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

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

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

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۹)

### چکیده

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

### واژه‌های کلیدی

آسکاروزیدهای نماد

زنگ قهوه‌ای

گندم

مقاومت القایی

## مقدمه

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

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

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

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

جداسازی، تکثیر و تعیین نژاد PKTTS در گلخانه‌های بخش پاتولوژی غلات مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام شد. آزمایش به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD)، با سه تکرار بیولوژیکی در دپارتمان فیتوپاتولوژی دانشگاه یوستوس لیبیک گیسن، آلمان انجام شد. به طور خلاصه، گیاهان گندم در یک گلدان (حاوی پیت ماس) در یک اتاق ک رشد تحت شرایط کنترل شده با دمای تنظیم شده  $20/17$  درجه سانتی‌گراد (شب/روز)، دوره نوری  $16$  ساعت روشنایی/ $8$  ساعت تاریکی با  $15000$  لوکس) و رطوبت نسبی  $65$  درصد رشد کردند. گیاهان ده روزه با استفاده از اسپری دستی با غلظت‌های  $0$ ،  $0.1$ ،  $0.10$  و  $0.10$  میکرومولار asc#18 در محلول آبی حاوی  $4$  غلظت  $1:4$  با استفاده از قلم مو انجام شد (McIntosh et al. 1995). گیاهچه‌های مایه‌زنی شده به مدت یک روز در دمای  $2\pm 17$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی نزدیک به  $95$  درصد در تاریکی قرار گرفتند. سپس به یک محفظه رشد در دمای  $20/17$  درجه سانتی‌گراد (شب/روز) با  $16$  ساعت دوره نوری منتقل شدند. ارزیابی تعداد جوش‌های زنگ قهقهه‌ای  $10$  روز پس از تلقیح با استفاده از میکروسکوپ (Leica Microsystems) انجام شد. برای سنجش میزان بیان ژن، گیاهان  $10$  روزه با  $0$  و  $24$  ساعت (به عنوان شاهد) ماکرومولار asc#18 اسپری شدند و در بعد با اسپورهای زنگ قهقهه‌ای مایه‌زنی شدند. برگ‌های آلدود در  $0$ ،  $12$ ،  $24$ ،  $48$ ،  $72$  و  $120$  ساعت پس از مایه‌زنی جمع‌آوری شده و در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا زمان استخراج RNA کل در دمای  $-80$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این آزمایش نیز از طرح فاکتوریل بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD)، با سه تکرار بیولوژیکی استفاده شد.

(PAL) در گیاهان آلدود پیش تیمار شده با asc#18 نسبت به گیاهان تیمار نشده افزایش نشان داد که قویاً نشان می‌دهد که آسکاروزیدها توانایی پرایم کردن برای افزایش مقاومت در برابر زنگ قهقهه‌ای گندم را دارند. کیتینازها از جمله آنزیم‌هایی هستند که پیوندهای گلیکوزیدی کیتین را به واحدهای مونومری می‌شکنند. کیتین و گلوکان اجزای تشکیل‌دهنده دیواره سلولی بسیاری از بیمارگرهای قارچی می‌باشند. در بسیاری از گیاهان در پاسخ به آلدودگی، فعالیت این دو آنزیم القا شده و باعث ایجاد مقاومت می‌شود. کیتینازها و گلوکونازها در تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها با هم همکاری می‌کنند (Saikia et al. 2005). با توجه به اینکه کیتین در گیاهان عالی وجود ندارد، بررسی‌ها نشان می‌دهد که حضور آنزیم‌های کیتیناز در گیاهان، بخشی از پاسخ ایمنی گیاه در مواجهه با عوامل بیماری‌زا کیتین دار می‌باشد (Botha et al. 1998). همچنین، فنیل آلانین آمونیولیاز (PAL) آنزیم کلیدی در مسیر سنتز فنل از طریق دخالت در مسیرهای ایزووفلانوئیدها و فنیل پروپانوئیدها و تجمع فنل به عنوان فیتوآلکسین است که در پاسخ القای اولیه گیاهان در برابر تعدادی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی شرکت می‌کند. واکنش مقاوم بیشتر به دلیل دفاع از دیواره‌های سلولی با تشدید لیگنین و تجمع ترکیب فنلی متصل به دیواره سلولی رخ می‌دهد (You et al. 2020). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که افزایش بیان ژن کیتیناز  $3$  و PAL در گیاهان باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری می‌شود. در گندم نان، افزایش بیان این ژن‌ها پس از آلدود شدن به گونه‌های *Puccinia* گزارش شده (Zhan et al. 2022; Asghari et al. 2015; Soltanloo et al. 2010).

## مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی، منبع ماده تلقیح و تیمار asc#18**  
رقم حساس گندم بولانی و زنگ برگ نژاد (Delfan et al. 2022)  
PKTTS برای این آزمایش استفاده شدند. پروفایل پرآزاری/نپرآزاری نژاد PKTTS در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- پروفایل پرآزادی/ ناپرآزادی نژاد PKTTS زنگ قهقهه‌ای گندم استفاده شده در آزمایش

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

ماکرولیتر RNase-free water جمع‌آوری شد و تا زمان استفاده در دمای  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کمیت و کیفیت همه نمونه‌ها با استفاده از یک بیوآنالایزر 2100 Agilent (RIN > 6.2) اندازه‌گیری شد (Applied Biosystems, USA). همچنین سنتز cDNA با استفاده از qScript cDNA Synthesis Kit میکروگرم RNA با کمک کیت (Applied Biosystems, USA) انجام شد.

#### سنجهش بیان ژن

BioRad RT-qPCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Maxima SYBR Green/ROX qPCR kit, Germany) و کیت BioRad Master Mix (MedChemExpress, Germany) انجام شد. سه تکرار فنی برای هر یک از سه تکرار بیولوژیکی برای نقاط زمانی مختلف تنظیم شد. تجزیه و تحلیل بیان برای دو ژن دفاعی گندم شامل کیتیناز (*TaChi3*) و فنیل‌آلانین آمونیو لیاز (*TaPAL*) با استفاده از برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد: مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن  $40^{\circ}\text{C}$  چرخه  $15\text{ s}$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در  $60^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به منظور استانداردسازی داده‌ها، نمونه‌ها با ژن خانه‌دار *TaActin* نرمال‌سازی شدند. فهرست آغازگرهای مورداستفاده در این کار در جدول ۲ نشان داده شده است.

#### cDNA و سنتز RNA

برای استخراج RNA،  $100\text{ }\mu\text{g}$  از بافت برگ با آسیاب (Qiagen) TissueLyser کل با استفاده از کیت Direct-zol RNA (Zymo research) استخراج شد. ابتدا،  $700\text{ }\mu\text{g}$  میکرولیتر تراپیزول به مواد گیاهی آسیاب شده اضافه شد و با سرعت بسیار بالا وورتکس انجام شد، سپس نمونه مورد نظر به مدت ۲ دقیقه در  $13000\times g$  سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک تیوب میکروسانتریفیوژ جدید منتقل شد و  $700\text{ }\mu\text{g}$  میکرولیتر اتانول (درصد) به آن اضافه شد. مخلوط به یک ستون چرخشی QIAshredder منتقل شد و به مدت ۳۰ ثانیه در  $13000\times g$  سانتریفیوژ شد. جریان عبوری دور ریخته شد و  $400\text{ }\mu\text{g}$  میکرولیتر بافر شستشوی RNA به اسپین RNeasy Mini اضافه شد و در  $13000\times g$  به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد، جریان عبوری دور انداخته شد و سپس مخلوطی از  $75\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر DNA digestion buffer و  $5\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر DNase ۱ به ستون چرخش اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.  $700\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر از بافر RNA pre wash اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه در دور  $13000\times g$  سانتریفیوژ شد. این مرحله دو بار تکرار شد، سپس  $400\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر RNA wash buffer اضافه شد و در دور  $13000\times g$  به مدت ۶۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. در نهایت، RNA کل در یک لوله  $1/5\text{ ml}$  با استفاده از  $50\text{ }\mu\text{l}$

جدول ۲- لیست پرایمرهای استفاده شده

توالی آغازگر	مسیر	شماره دسترسی در NCBI	آغازگر
GAACAAAGCGGCATCTTCTGT	Forward	DN551593.1	<i>TaActin</i>
CCAAGGGAGACTGACGCAA	Reverse		
GTTTAAGACGGCGTTGTGGT	Forward	AB029936.1	<i>chitinase 3</i>
GCAGTAGCGCTTGTAGAACCC	Reverse		
TGTCTCTACATTTTGGTTGCA	Forward	X99705.1	<i>TaPAL</i>
CCTGACTGCGTTCTTGACATT	Reverse		

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

### تجزیه و تحلیل آماری

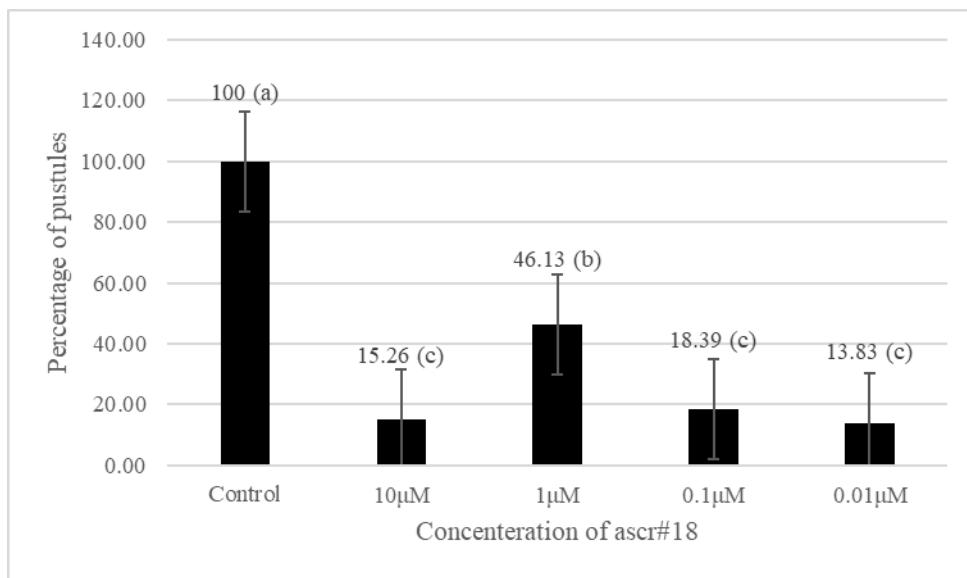
سنجهش بیان ژن با استفاده از روش CT مقایسه‌ای ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Schmittgen and Livak 2008) انجام شد، همچنین تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (با استفاده از آزمون دانکن) به صورت فاکتوریل با دو عامل شامل تیمار ascr#18 (۰ و ۱۰ ماکرومولار) و نقاط مختلف زمانی: سطح (۰، ۷۲، ۴۸، ۲۴، ۱۲، ۰) ساعت پس از مایه‌زنی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

### نتایج و بحث

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

##### گندم می‌شود

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



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

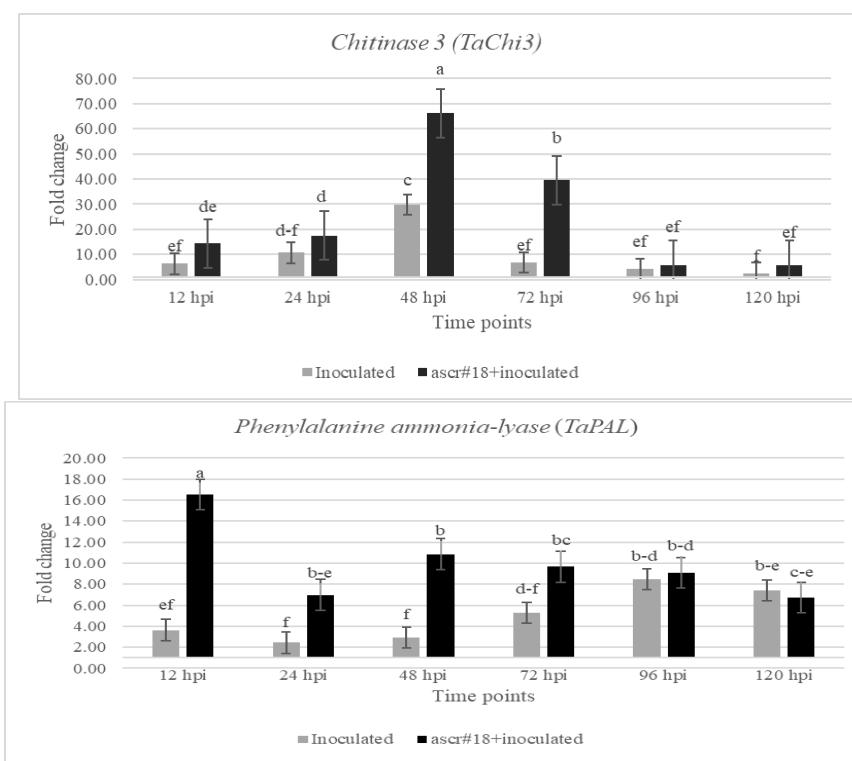
جدول ۲- تجزیه واریانس بیان ژن و صفات مورفولوژیک رقم گندم بولانی با پیش تیمار ascr#18 برای مقاومت به زنگ قهوه‌ای گندم

مانگین مربوط	بیان ژن				صفت مورفولوژی			
	منابع تغییرات	درجه آزادی	Tachi 3	TaPAL	منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد جوش	
بلوک	۲	ns <sup>۲۲/۶۸</sup>	ns <sup>۱۳/۲۶</sup>	بلوک	۲	ns <sup>۱/۲۰</sup>		
تیمار	۱	** <sup>۱۴۵۷/۱۳</sup>	** <sup>۱۹۰/۲۵</sup>	تیمار	۴	** <sup>۳۰۳/۶۹</sup>		
نقاطه زمانی	۶	** <sup>۱۵۳۱/۹۶</sup>	** <sup>۲۸۷/۳۱</sup>	خطا	۸	۸/۷۷		
تیمار × نقطه زمانی	۶	** <sup>۳۸۷/۶۲</sup>	** <sup>۳۶/۰۰</sup>					
خطا	۲۶	۲۸/۵۲	۴/۴۰					
ضریب تغییرات (%)		۷/۶۵	۷/۹۸	ضریب تغییرات (%)		۱۵/۶۵		

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

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

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



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

پیش تیمار #18 ascr#18 محافظت نسبی تا قوی را در هفت عامل بیماری‌زا گیاهی از هشت عامل (به جز ذرت) القا می‌کند (Klessig et al. 2019)، که نشان می‌دهد آسکاروسیدها ابزارهای مؤثری هستند که می‌توانند در حفاظت گیاهی استفاده شوند. همچنین مطالعات قبلی نشان داده است که ژن‌های کیتیناز ۳ و TaPAL در آبشارهای سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (Xie et al. 2014; Gai et al. 2019) (MAPK) و سیگنالینگ باوسطه اسید سالیسیلیک (Zhang et al. 2021) و مسیرهای سیگنالینگ دفاعی باوسطه اسید جاسمونیک (Xiang et al. 2022) در گیاهان دخیل هستند. به طور کلی، فعال شدن این مسیرها با القای ژن‌های مرتبط با پاتوژن (PR genes) که اجزای اصلی پاسخ دفاعی گیاهی هستند، دنبال می‌شود. در اینجا نشان می‌دهیم که پیش تیمار با ascr#18 پاسخ دفاعی سریع‌تر و قوی‌تری را در گندم هنگام مواجهه با عوامل بیماری‌زا زنگ قهقهه‌ای ممکن می‌سازد. آسکاروزیدها از یک زنجیره جانبی مشتق از اسید چرب تشکیل شده‌اند که در موقعیت  $\alpha$  به دی‌اکسی قند آسکاریلوز متصل است. ساختار آن شباهت‌هایی به رامنولیپیدهای باکتریایی دارد که از زنجیره جانبی اسید چرب چربی‌دوست تشکیل شده است که در موقعیت  $\alpha$  به یک یا دو بخش قند رامنوز متصل شده است. عملکرد رامنولیپیدها مشابه MAMP‌ها است که از طریق القای هجوم سلولی  $Ca^{2+}$ . تولید گونه‌های اکسیژن فعال، فعال شدن پروتئین کینازهای فعال شده با میتوژن، القای مسیرهای سیگنالینگ دفاعی باوسطه اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک، بیان ژن‌های دخیل در اینمنی گیاهی را تحریک می‌کند. به طور کلی، احتمال داده می‌شود که استفاده از سیگنال‌های مولکولی کوچک، مانند ascr#18، القای مسیرهای سیگنالینگ مختلف را برای فعال کردن پاسخ‌های اینمنی در گیاهان را ممکن می‌سازد؛ بنابراین، ascr#18 و سایر سیگنال‌های مولکولی کوچک می‌توانند مورد مطالعه بیشتری قرار گیرند تا در آینده به عنوان یک روش جایگزین برای کاهش آسیب‌های ناشی از بیماری‌های گیاهی و افزایش امنیت غذایی پایدار استفاده شوند.

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

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

## منابع

- Ali MA, Anjam MS, Nawaz MA, Lam HM, Chung G (2018) Signal transduction in plant–nematode interactions. International Journal of Molecular Sciences 19:1648.
- Asghari A, Babaeizad V, Tajick Ghanbari MA, and Mahdian SA (2014) Analysis of the Expression Rate of *PAL* and *PR3* Genes in Two Wheat Cultivars in Response to Brown Rust Agent *Puccinia triticina* E. 1<sup>st</sup> International and 13th Iranian Genetics Congress. Tehran, Iran.
- Bacelli I, Mauch-Mani B (2016) Beta-aminobutyric acid priming of plant defense; the role of ABA and other hormones. Plant Molecular Biology 91:703-711.
- Botha AM, Nagel MAC, Van der Westhuizen AJ, & Botha FC (1998). Chitinase isoenzymes in near-isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene, and mechanical wounding. Botanical Bulletin of Academia Sinica 39.
- Caubel J, Launay M, Ripoche D, Gouache D, Buis S, Huard F, Huber L, Brun F, Bancal MO (2017) Climate change effects on leaf rust of wheat: Implementing a coupled crop-disease model in a French regional application. Eur J Agr 90:53-66. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2017.07.004>.
- Conrath U, Beckers GJ, Langenbach CJ, Jaskiewicz MR (2015) Priming for enhanced defense. Annu Rev Phytopathol 53:97-119.
- Delfan S, Bihamta MR, Dadrezaei ST, Abbasi A, Alipour H (2022) Identification sources of resistance for leaf rust (*Puccinia triticina* Erikss.) in Iranian wheat genotypes. Iranian Journal of Plant Protection Science 52:115-133. (In Farsi).
- Gai QY, Jiao J, Wang X et al. (2019) Chitosan promoting formononetin and calycoxin accumulation in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures via mitogen-activated protein kinase signaling cascades. Sci Rep 9:10367. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46820-6>
- Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH et al. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell 8:629-643.
- Hawkins NJ, Bass C, Dixon A, Neve P (2019) The evolutionary origin of pesticide resistance. Biological Reviews 94:135-155.
- Han GZ (2019) Origin and evolution of the plant immune system. New Phytol 222:70-83.
- Helfer S (2014) Rust fungi and global change. New Phytol 201:770-780. doi.org/10.1111/nph.12570.
- Huerta-Espino J, Singh RP, German S, McCallum BD, Park RF, Chen WQ et al. (2011) Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. Euphytica 179:143-160.
- Jones J, Dangl J (2006) The plant immune system. Nature 444:323-329. doi.org/10.1038/nature05286.
- Jones JT, Haegeman A, Danchin EG, Gaur HS, Helder J, Jones MG, et al. (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular plant pathology, 14:946-961.
- Junk J, Kouadio L, Delfosse P, El Jarroudi, M (2016) Effects of regional climate change on brown rust disease in winter wheat. Climatic Change 135:439-451. <https://doi.org/10.1007/s10584-015-1587-8>.
- Klessig DF, Manohar M, Baby S, Koch A, Danquah W. B., Luna E, Schroeder FC (2019) Nematode ascaroside enhances resistance in a broad spectrum of plant-pathogen systems. J Phytopathol 167:265-272.
- Klessig DF, Choi HW, Dempsey DA (2018) Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future. Mol Plant Microbe Interact 31:871-888. doi: 10.1094/MPMI-03-18-0067-CR.
- Kolmer J (2013) Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. Forests 4:70-84.
- Manohar M, Tenjo-Castano F, Chen S, Zhang YK, Kumari A, Williamson VM, Schroeder FC (2020) Plant metabolism of nematode pheromones mediates plant-nematode interactions. Nature Comm 11:1-11.
- Manosalva P, Manohar M, Von Reuss SH, Chen S, Koch A, Kaplan F et al. (2015) Conserved nematode signaling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. Nature Comm 6:1-8.
- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995). Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO publishing. Sydney. Australia.
- Mermigka G, Amprazi M, Mentzelopoulou A, Amartolou A, Sarris PF (2020) Plant and Animal Innate Immunity Complexes: Fighting Different Enemies with Similar Weapons. Trends in Plant Science 25:80-91. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.008>.
- Nakashita H, Yoshioka K, Yasuda M, Nitta T, Arai Y, Yoshida S, Yamaguchi I (2002) Probenazole induces systemic acquired resistance in tobacco through salicylic acid accumulation. Physiological Molecular Plant Pathology 61:197-203. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0426>.
- Ning S, Zhang L, Ma J, Chen L, Zeng G, Yang C, et al. (2020) Modular and scalable synthesis of nematode pheromone ascarosides: implications in eliciting plant defense response. Organic Biomolecular Chemistry 18:4956-4961.
- OECD (2020) COVID-19 and International Trade: Issues and Actions, [https://read.oecd-ilibrary.org/view/?ref=128\\_128542-3ijg8kfsw&title=COVID-19-and-international-trade-issues-and-actions](https://read.oecd-ilibrary.org/view/?ref=128_128542-3ijg8kfsw&title=COVID-19-and-international-trade-issues-and-actions).
- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC, Bakker PA (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. Annu Rev Phytopathol 52:347-375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- Poore J and Nemecek T (2018) Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. Science 360:987-992.
- Ryals J, Neuenschwander U, Willits M, Molina A, Steiner H, Hunt H (1996) Systemic Acquired Resistance. Plant Cell 8:1809-1819.

Saikia R, Singh BP, Kumar R, & Arora DK (2005). Detection of pathogenesis-related proteins—chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase in induced chickpea. Current Science, 659-663.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3:1101-1108.

Sharrock J, Sun JC (2020) Innate immunological memory: from plants to animals. *Curr Opin Immunol* 62:69-78. doi: 10.1016/j.cois.2019.12.001.

Soltanloo H, Ramezanpour SS, and Gaudet D (2010). The study of Chitinase gene expression during infection of wheat near isogenic lines carrying Lr34/Yr18 locus to stripe and leaf rust pathogens. *Iranian Journal of Biology* 23:115-124. (In Farsi)

Spoel SH, Dong X (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immun* 12:89-100.

Vlot AC, Sales J H, Lenk M, Bauer K, Brambilla A, Sommer A, Nayem S (2021) Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytol* 229:1234-1250.

Xiang S, Wu S, Jing Y, Chen L, Yu D (2022). Phytochrome B regulates jasmonic acid-mediated defense response against Botrytis cinerea in Arabidopsis. *Plant Diversity* 44:109-115.

Xie K, Chen, J, Wang Q, Yang Y (2014) Direct phosphorylation and activation of a mitogen-activated protein kinase by a calcium-dependent protein kinase in rice. *Plant Cell* 26:3077-3089.

Yoon MY, Cha B, Kim JC (2013) Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. *Plant Pathology Journal* 29:1-9.

You X, Fang H, Wang R, Wang GL, and Ning Y (2020) Phenylalanine ammonia lyases mediate broadspectrum resistance to pathogens and insect pests in plants. *Sci. Bull.*, 65, 1425-1427. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scib.2020.05.014>

Yu Y, Zhang YK, Manohar M, Artyukhin AB, Kumari A, Tenjo-Castano FJ, Nguyen H, Routray P, Choe A, Klessig DF, Schroeder FC (2021) Nematode signaling molecules are extensively metabolized by animals, plants, and microorganisms. *ACS Chem Biol* 16:1050-1058. doi: 10.1021/acscchembio.1c00217.

Zhan C, Li Y, Li H, Wang M, Gong S, Ma D, and Li Y (2022) Phylogenomic analysis of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) multigene family and their differential expression analysis in wheat (*Triticum aestivum* L.) suggested their roles during different stress responses. *Frontiers in plant science*. 13:982457. doi: 10.3389/fpls.2022.982457