مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره دوم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۲
صفحه ۹۰-۸۱

ارزیابی پاسخ‌های مولکولی دو رقم گندم به قارچ عامل زنگ قهوه‌ای *Puccinia triticina* E.

Molecular Analysis of Two Commercial Wheat Cultivars in Response to Brown Rust Agent *Puccinia triticina* E.

عارفه اصغری[۱]، ولی‌اله بابایی‌زاد*[۲]، محمدعلی تاجیک قنبری[۲]، صفرعلی مهدیان[۲]

Arefeh Asghari[1], Valiollah Babaeizad*[2], Mohammad Ali Tajik Ghanbari[2], Safar Ali Mahdian

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و عضو هیئت علمی گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

1 and 2- Postgraduate and Assistant Professor of Plant-Pathology in Sari University of Agricultural Sciencesand Natural Resources.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:babaeizad@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/٤)

چکیده

بیماری‌های گیاهی یکی از محدودیت‌های بزرگ در تولید محصولات کشاورزی به شمار می‌روند. زنگ قهوه‌ای با عامل *Puccinia triticina*، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم است. با توجه به اینکه، استفاده بیش از حد از مواد شیمیایی در کشاورزی جهت کنترل بیماری‌ها، سبب آلودگی محیط زیست و مقاومت پاتوژن‌ها به این مواد می‌شود، پیدا کردن روشی جایگزین برای مدیریت بیماری‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد. امروزه پیشرفت‌های گسترده در علم زیست‌شناسی مولکولی فهم بشر را از تعاملات بین گیاه-بیمارگر، ژن‌های دخیل در مقاومت و مسیرهای سیگنال‌دهی بهبود بخشیده است. این یافته‌ها می‌تواند راهکار ژنتیک مناسب و کارآمدی را به‌منظور افزایش مقاومت گیاهان به بیمارگرها پیش روی پژوهشگران قرار دهد. در این میان ژن‌های مقاومت گیاهان (R genes)، منابع ژنتیک با ارزشی هستند که می‌توان از آن‌ها در راستای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به عوامل تنش‌زا استفاده کرد. این پژوهش با هدف غربالگری ۵ رقم تجاری و ۱۵ لاین تا حدودی ایزوژنیک گندم و تجزیه مولکولی دو رقم تجاری گندم در تعامل با قارچ *P. triticina* انجام شد. بر اساس نتایج غربالگری، رقم مروارید به‌عنوان رقم حساس و رقم آرتا به‌عنوان ژنوتیپ مقاوم انتخاب شدند. گیاهچه‌های گندم، در مرحله دو برگی، با سوسپانسیون اسپور قارچ *P. triticina* تیمار و نمونه‌برداری از برگ‌های اول در ساعات مختلف پس از آلودگی انجام شد. آر.ان.ای کل از نمونه‌های برگی استخراج و پس از ساخت دی.ان.ای مکمل (cDNA)، بیان ژن‌ها با استفاده از روش Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیان ژن‌های *PAL*، *Lipase* و *LTP* در رقم مقاوم آرتا نسبت به رقم حساس مروارید، پس از مایه‌زنی به شدت افزایش یافت. یافته‌های حاصل از این پژوهش حاکی از نقش فعال ژن‌های فوق در مکانیسم‌های مقاومت گیاه گندم با *P. triticina* هستند.

واژه‌های کلیدی

زنگ قهوه‌ای گندم
ژن‌های مقاومت
cDNA
qRT-PCR

مقدمه

گندم یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است که نقش مهمی در تغذیه جوامع بشری دارد. بیماری زنگ قهوه‌ای با عامل *Puccinia triticina Eriks.* که به زنگ برگی نیز معروف است، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در برخی نقاط دنیاست (Knott, 1989;McIntosh *et al.*1995). این بیماری در جهان در درجه اول و در ایران بعد از زنگ زرد، در درجه دوم اهمیت قرار دارد. بهترین شیوه کنترل این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم است. مقاومت از خصوصیات ژنتیک میزبان است که متخصصین اصلاح نباتات از آن برای تولید ارقام مقاوم استفاده می‌کنند. از لاین‌هایی که در یک بررسی مقاوم تشخیص داده می‌شوند می‌توان در برنامه به‌نژادی دیگر، به‌عنوان منبع مقاومت استفاده کرد. مقاومت ژنتیک، میزان مصرف سموم شیمیایی را کاهش داده و یا حذف می‌کند و در نتیجه به عنوان اقتصادی‌ترین و از لحاظ زیست‌محیطی، سالم‌ترین روش مبارزه با بیماری‌های گیاهی مطرح است (Roelfs *et al.*1992).

دفاع در گیاهان بر پایه سدهای دفاعی اولیه و پاسخ‌های القایی استوار است (Grover and Gowthaman, 2003). این واکنش‌های اولیه، پیش‌نیاز آغاز شبکه‌های سیگنالی بوده که سبب راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی سراسری می‌شوند. به‌دنبال حمله پاتوژن‌ها ممکن است سلول‌های دورتر از نقطه رخنه هم در برابر آلودگی‌های بعدی مقاوم شوند، پدیده‌ای که به‌نام مقاومت سیستمیک اکتسابی[1] خوانده می‌شود. در بسیاری از گونه‌های گیاهی، SAR توسط افزایش سیستمیک سالیسیک اسید[2] به راه می‌افتد (Thomma *et al.*1998). مقاومت سیستمیک القایی[3]، نوعی مقاومت است که در اثر حمله سودوموناس و رایزوباکترهای غیربیماری‌زا بر روی ریشه گیاه القا می‌شود و حفاظت سیستمیک علیه قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها ایجاد می‌کند. در بیشتر موارد پدیده ISR، مستقل از تولید و تجمع سالیسیلیک اسید و پروتئین‌های در ارتباط با بیماری‌زایی است و نیازمند پاسخ‌های دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید[4] و اتیلن است. مکانیسم دقیق ISR به‌طور کامل مشخص نیست ولی به‌نظر می‌رسد پاسخ‌های دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید و اتیلن توسط نکروتروف‌ها و پاسخ‌های وابسته به SA توسط بیوتروف‌ها فعال شود. به هرحال هم‌پوشانی بین مسیرهای سیگنالی مختلف و گاهی اثرهای سینرژیستی، بین مسیرهای مختلف وابسته به SA، اتیلن و JA گزارش شده است (Thomma *et al.*1998). هر ۳ مسیر دفاعی در ارتباط با افزایش نسخه‌های ژن‌های دفاعی زیادی هستند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی[5]، به‌طور معمول به‌عنوان پروتئین‌های خاص میزبانی بوده که به‌طور طبیعی در گیاهان غیرآلوده در سطح بسیار پایین تولید، ولی پس از حمله پاتوژن‌ها، حشرات و جونده‌ها، هم‌چنین پس از جراحات و شرایط استرس‌زای محیطی افزایش می‌یابند (Van Loon *et al.*2006).

PAL[6]، آنزیمی حیاتی در مسیر فنیل پروپانوئید است که نقش مهمی را در مقاومت گیاهان از طریق دخالت در مسیرهای ساخت ایزوفلاونوییدها[7] و فنیل‌پروپانوییدها[8] که فعالیت فیتوالکسینی دارند ایفا می‌کند. این پروتئین هم‌چنین در ترکیبات لیگنین، سوبرین و دیگر مواد فنلی دیواره سلولی گیاه میزبان که در محل حمله بیمارگر در ساختارهایی مانند پاپیلا، به‌منظور جلوگیری از گسترش هیف‌های قارچ تجمع می‌یابند، به‌عنوان یک پیش‌ماده عمل می‌کند. افزایش بیان ژن *PAL* در بررسی‌های متعدد، به‌عنوان ژن دخیل در مقاومت، با اثر مستقیم در افزایش SA، فعال کردن ژن *NPR1* و به دنبال آن بیان ژن‌های *PR* و نیز القای سریع مرگ سلولی به اثبات رسیده است (Fitzgerald *et al.*2004). در پژوهش‌های انجام شده، نقش موثر PAL در پاسخ‌های دفاعی گیاهان علیه پاتوژن‌ها اثبات شده است (Zhu *et al.*1995) . نقش مهم *PAL* در پاسخ‌های دفاعی پس از عفونت با قارچ عامل زنگ ساقه (سیاه)[9]، در گندم اثبات شده است (Li and Liao, 2003).

Lipase آنزیمی است که توانایی هیدرولیز استرها را دارد و نقش اختصاصی تبدیل تری‌گلیسرید به گلیسرول و اسید چرب را ایفا می‌کند که به این عمل لیپولیز می‌گویند. لیپاز از لحاظ

1- Systemic acquired resistance (SAR)
2- Salicylic acid (SA)
3- Induce Systemic Resistance (ISR)
4- Jasmonic acid (JA)
5- Pathogenesis Related Proteins
6- Phenyl alanin ammonia lyase
7- isoflavonoids
8- phenylpropanoids
9- *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*

زیست‌شناسی، دگرگونی چربی‌ها را به‌وسیله هیدرولیز باندهای fatty acyl ester در acyl glycerol، آغاز می‌کند (Carriere *et al.*1994). لیپازها را می‌توان زیرمجموعه‌ای از استرازها دانست که تری، دی و منوگلیسیریدهای موجود در حدفاصل بین روغن-آب را هیدرولیز می‌کنند. در پژوهش‌های انجام شده بر روی ویژگی‌های ژنتیک قارچ‌های عامل زنگ، افزایش قابل توجهی در میزان بیان چند نوع آنزیم لیپاز در برگ‌های گندم آلوده به زنگ سیاه، مشاهده شده است. این مسئله می‌تواند بیانگر نقش این پروتئین در مقاومت باشد (Duplessis *et al.*2011).

LTP[10] یا پروتئین‌های انتقال دهنده لیپید، از اعضای خانواده PR14 هستند که دارای فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی قوی هستند (Molina *et al.*1993). در سلول‌های گیاهی، لیپید یا چربی، از محل اصلی ساخت خود یعنی شبکه آندوپلاسمی[11] به غشاهای درون‌سلولی مانند کلروپلاست و غشای میتوکندری منتقل می‌شود که این پروتئین‌ها مسئول انتقال چربی در داخل سلول هستند (Wirtz, 1991). گروهی از این پروتئین‌ها انتقال بین‌غشایی انواع دیگری از ملکول‌های آلی به غیر از چربی را نیز تسهیل می‌کنند که None specific-LTP نامیده می‌شوند (Pozanski *et al.*1999). افزایش بیان[12] یکی از انواع LTP در ژنوتیپ حساس گندم، موجب افزایش مقاومت آن در برابر *Fusarium graminearum* و قارچ عامل پوسیدگی معمولی ریشه، *Cochliobolus sativus* می‌شود (Zhu *et al.*2012). نرخ بیان پروتئین LTP در لاین مقاوم گندم آلوده به زنگ قهوه‌ای در مقایسه با لاین حساس در سطح بالاتری قرار دارد (Hulbert *et al.*2007).

یکی از رویکردهای مهندسی ژنتیک برای مبارزه با آفت‌ها و بیماری‌های گیاهی، مقاوم کردن گیاه از طریق دست‌کاری ژنتیک و انتقال ژن است. تولید گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های سمی که در مقابل آفت‌ها و بیمارگرهای خاصی بسیار سمّی و مؤثر بوده و در عین حال برای انسان، گیاه، محیط زیست و حشرات مفید، زیانی ندارند، از مثال‌های کاربردی مهندسی ژنتیک در کشاورزی است. ژن‌های مقاومت گیاهان (R genes)، منابع ژنتیک با ارزشی هستند که می‌توان از آن‌ها در راستای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به عوامل تنش‌زا استفاده کرد. این پژوهش با هدف ارزیابی درجه مقاومت ۱۵ لاین به‌طور تقریبی ایزوژنیک و ۵ رقم تجاری گندم در پاسخ به جدایه مشخصی از قارچ عامل زنگ قهوه‌ای، بر اساس تراکم جوش یا میانگین تعداد جوش‌ها در واحد سطح انجام شد. هم‌چنین نرخ بیان ژن‌های *PAL*، *Lipase* و *LTP* در ارقام حساس و مقاوم گندم تجاری انتخاب شده، در زمان‌های مختلف پس از آلوده‌سازی به عامل زنگ قهوه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه: در این بررسی جدایه زنگ قهوه‌ای مربوط به منطقه ساری (با شماره ایزوله ۲۰-۹۰)، ۵ رقم تجاری گندم شامل آرتا، دریا، مروارید، تجن و مغان ۳ و همچنین ۱۵ لاین به‌طور تقریبی ایزوژنیک گندم شامل *Lr1*، *Lr2a*، *Lr3*، *Lr9*، *Lr10*، *Lr11*، *Lr12*، *Lr16*، *Lr19*، *Lr21*، *Lr24*، *Lr25*، *Lr26*، *Lr28* و *Lr34* (با توجه به نتایج حاصل از پژوهش‌های مورفولوژیک پیشین) به منظور تعیین درجه مقاومت و حساسیت در آزمایش‌های غربالگری و سپس تجزیه ملکولی حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ارقام، انتخاب و از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد.

تکثیر اسپور: برای تکثیر جدایه قارچ، اسپور به روش تک جوش خالص و سپس بر روی برگ اول گیاهچه‌های ۷ روزه رقم حساس بولانی، مایه‌زنی شد. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده در محیط تاریک، در دمای ۱۵ تا ۱۷ درجه سلسیوس و در رطوبت اشباع، به مدت ۲٤ ساعت نگهداری و سپس به گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵ درصد منتقل شدند. اسپور خالص تکثیر شده در ویال‌های پلاستیکی و در فریزر با دمای ٤۰- درجه سلسیوس نگهداری و برای فعال کردن مجدد اسپورها، ویال‌های پلاستیکی به مدت ۳ دقیقه در دمای ٤۲ درجه سلسیوس بن‌ماری و سپس در دسیکاتور حاوی آب مقطر به مدت ٤۵ دقیقه قرار داده شدند.

تولید گیاهچه‌های همسان جهت آزمون غربالگری: جهت غربالگری لاین‌های اصلی، ۲۰ عدد بذر از هر لاین به مدت ۲٤ ساعت در ظرف حاوی آب مقطر و سپس بر روی کاغذ صافی

10- Lipid Transfer Proteins
11- ER
12- Overexpress

درون تشتک پتری استریل قرار داده شد. پس از مرطوب کردن کاغذ صافی با آب مقطر، برای یکنواخت‌ترشدن جوانه‌زنی، پتری‌ها در ژرمیناتور و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و بعد از ٤٨ ساعت بذور جوانه زده به گلدان‌های حاوی خاک استریل منتقل شدند. گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با تناوب ١٦ ساعت روشنایی با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ درجه سلسیوس، با رطوبت نسبی ۷۵ درصد و به مدت یک هفته نگهداری شدند.

برگ‌های اول گیاهچه‌های ۷ روزه، بریده و در پتری‌های حاوی محیط کشت نیمه جامد water agar نیم درصد حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بنزیمیدازول قرار داده شدند. برگ‌های مربوط به لاین‌های ایزوژنیک و ارقام تجاری به‌طور تصادفی و با تکرارهای مساوی در کنار هم در هر پتری پخش شدند. این آزمایش ۲ مرتبه تکرار و در هر تکرار ١٤ برگ از هر لاین بررسی شد. به منظور مایه‌زنی، از سوسپانسیون حاوی 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی توین ۲۰ استفاده و سوسپانسیون بر روی نمونه‌ها اسپری شد. پتری‌ها به مدت ٢٤ ساعت در ژرمیناتور تاریک و در دمای ۱۵ تا ۱۷ درجه سلسیوس و با رطوبت اشباع نگهداری و سپس به گلخانه با دمای ۲۰-۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۵ درصد منتقل شدند.

ارزیابی تیپ آلودگی: دوازده روز بعد از مایه‌زنی، ارزیابی میزان حساسیت هر لاین براساس شمارش تعداد جوش در سطح معینی از برگ‌های آلوده (تعداد جوش‌ها در ۲/۵ سانتی‌متر مربع از هر برگ) و بوسیله استریو میکروسکوپ، صورت گرفت. تجزیه آماری داده‌ها در ۲ تکرار انجام شده آزمون غربالگری، با روش Duncan's Multiple Range Test، انجام شد.

مایه‌زنی و جمع‌آوری نمونه جهت تجزیه ملکولی: جهت بررسی ملکولی ارقام تجاری آرتا (ژنوتیپ مقاوم) و مروارید (ژنوتیپ حساس) بر اساس نتایج غربالگری انتخاب شدند. گیاهچه‌های ۷ روزه ارقام مورد آزمایش در تجزیه ملکولی (آرتا و مروارید)، با سوسپانسیون اسپور تهیه شده به غلظت 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر، مایه‌زنی شدند. گیاهچه‌ها در اتاق رشد به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی در دمای ۱۵ تا ۱۷ درجه سلسیوس و رطوبت اشباع و سپس در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس تناوب ١٦ ساعت روشنایی و رطوبت ۷۵ درصد نگهداری شدند. نمونه‌گیری از برگ‌های اول گیاهچه‌ها در زمان پیش از مایه‌زنی و در ساعات ۱۲، ٢٤ و ٤٨ پس از تلقیح انجام گرفت و پس از پودر شدن با ازت مایع در فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج آر.ان.ای و زدودن دی.ان.ا ژنومی از نمونه‌ها: محتوی آر.ان.ای کل از برگ‌های نمونه‌برداری شده در زمان‌های مختلف با استفاده از کیت RNXplus (شرکت سیناژن) انجام شد. به منظور زدودن دی.ان.ای ژنومی از نمونه‌های آر.ان.ای، از کیت RQ1 RNase-free DNase ساخت شرکت Fermentas طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

بررسی کیفیت و کمیت آر.ان.ای استخراجی: به‌منظور بررسی کیفیت آر.ان.ای استخراجی از دو روش استفاده شد. نمونه‌های استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE (40mM Tris acetate, 1 mM EDTA 1X) بررسی شدند. ژل در اتیدیوم بروماید (0.5 µg/mL) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از شستشو با آب مقطر با UV دستگاه ژل‌خوان کداک از آن عکس‌برداری شد. درجه خلوص و غلظت نمونه‌ها در طول موج‌های ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر و بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد.

ساخت cDNA و بررسی کیفیت: cDNA با استفاده از کیت Revert Aid First Standard cDNA (شرکت Fermentase) و بر اساس دستورالعمل، از محتوی آر.ان.ای کل استخراج شده ساخته شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. تکثیر قطعات cDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[13] و جفت آغازگر بتا-اکتین انجام شد. ارزیابی محصول واکنش پی.سی.آر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE صورت گرفت.

بررسی میزان بیان ژن‌ها به کمک روش Quantitative real- time PCR: بیان ژن‌ها بوسیله qRT-PCR، و با استفاده از کیت Syber green و آغازگرهای مربوطه در دستگاه M*3000P thermal cycler (BioRad) انجام شد. ۲ μL از cDNA رقیق شده (50 ngr) از هر نمونه به‌عنوان الگو در واکنش‌ها استفاده شد و به ترکیب: ۱ μL از هر آغازگر، ۷/۵ μL سایبرگرین و ۸/۵ μL

13- Polymerase Chain Reactin (PCR)

جدول ۱- جفت آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز.

Table 1- Properties and Nucleotide sequences of primers used in qRT-PCR.

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')	طول نوکلئوتید (bp)	دمای اتصال (°c)
TaActin	F: GGAAAAGTGCAGAGAGAACG R: TACAGTGTCTGGATCGGTGG	150	60
TaLipase	F: CACAAAATATCGACCCACCAC R: ACTGGGTATTCGTCTGTCAGC	145	60
TaLTP	F: ACGTAGGTACTCCTCTCGCTGT R: GTTGATCGACCACTTCTTCTCA	148	60
TaPAL	F: CCAATGTTCTGTCCGTCCTT R: CTTCAGCTTGTGGGTCAGGT	150	60

آب (حجم نهایی: μL ۲۰) افزوده شد. پارامترهای دمایی جهت تکثیر مطابق زیر است.

۱- مرحله واسرشته‌سازی اولیه: ٤ دقیقه در ۹۵ درجه سیلسیوس.

۲- مرحله واسرشته‌سازی: ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سیلسیوس.

۳- مرحله اتصال آغازگر: ۳۰ ثانیه در دمای ٦۰ درجه سیلسیوس.

٤- مرحله تکثیر: ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس.

۵- مرحله تکثیر نهایی: ۵ دقیقه در دمای ٦۰ درجه سیلسیوس.

و ٤۰ مرتبه چرخش بین مراحل ۲ الی ٤.

لیست آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش نیز در جدول ۱ آمده است. در تمام آزمایش‌ها از ژن β-*Actin* به‌عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. تمام واکنش‌های پی.سی.آر در ۲ تکرار انجام گرفت.

تجزیه داده‌ها: تجزیه داده‌های دستگاه Real time با نرم‌افزار Bio-Rad cfx manager انجام شد. نرخ بیان هر ژن در این روش با استفاده از فرمول $۲^{-(\Delta\Delta CT)}$ (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد.

$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T$ نمونه آزمایش $- \Delta C_T$ نمونه کنترل$)$

$\Delta C_T = (C_T$ ژن خانه‌دار $- C_T$ ژن هدف$)$ [14]

تجزیه داده‌ها، با محاسبه STDEV و TTEST در نرم‌افزار اکسل، انجام گرفت.

نتایج و بحث

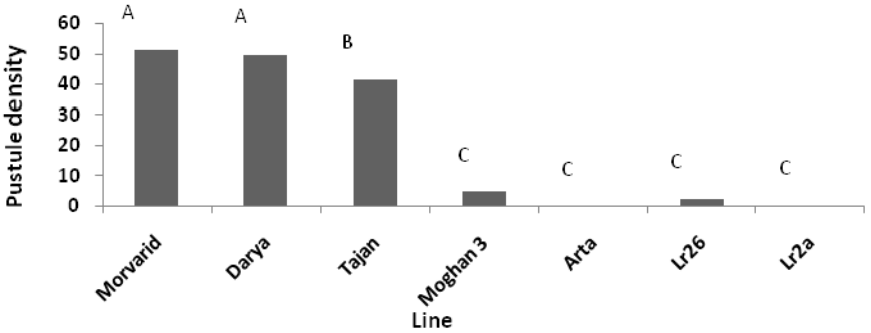
تجزیه آماری نتایج حاصل از واکنش غربالگری ١٤ لاین به‌طور تقریبی ایزوژنیک و ۵ رقم تجاری گندم در مقابل جدایه زنگ قهوه‌ای (تعداد جوش در ۲/۵ سانتی‌متر مربع از هر نمونه) با روش Duncan's Multiple Range Test، نشان داد که اختلاف بین لاین‌های مقاوم در مقایسه با لاین‌های حساس در میزان حساسیت به قارچ عامل زنگ قهوه‌ای در سطح پنج درصد معنی‌دار است ($P \leq 0.05$) (شکل ۱ و ۲).

بر این اساس، در بین ارقام تجاری، رقم آرتا و در بین لاین‌های به‌طور تقریبی ایزوژنیک *Lr2a* بیشترین نرخ مقاومت را نشان دادند. هم‌چنین رقم مروارید و *Lr11* به ترتیب در بین ارقام تجاری و لاین‌های به‌طور تقریبی ایزوژنیک، بیش‌ترین میزان حساسیت را نشان دادند. در مجموع بیش‌ترین مقاومت به ترتیب در آرتا، *Lr2a*، *Lr26*، *Lr19*، *Lr28*، *Lr24* و مغان۳ مشاهده شد و *Lr25*، *Lr16*، *Lr1*، *Lr10*، *Lr21*، *Lr12*، *Lr3*، *Lr34*، تجن، *Lr11*، دریا و مروارید حساس‌ترین ارقام و ژنوتیپ‌ها ارزیابی شدند (شکل ۱ و ۲).

در این بررسی شمارش تعداد کلنی‌های قارچ عامل بیماری در تکرارهای لاین ایزوژنیک *Lr9* ناهمگن بوده که به نظر می‌رسد این امر به دلیل عدم خلوص بذور در لاین فوق باشد. از این‌رو از بیان نتایج مربوط به این لاین صرف نظر شده است.

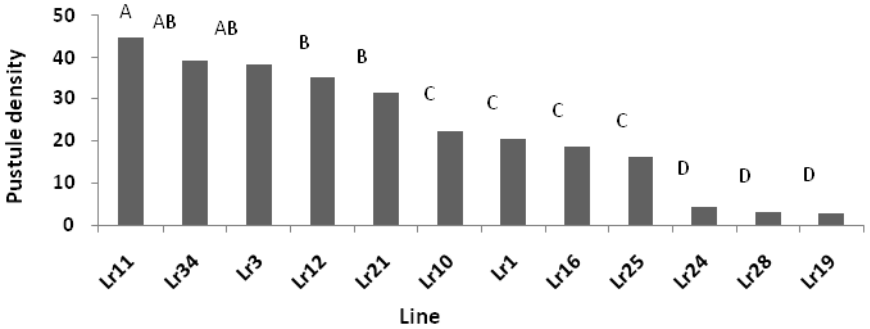
بخشی از نتایج این بررسی در ارتباط با ژنوتیپ‌های *Lr* با یافته‌های قبلی مطابقت دارد (Afshari *et al*.2005;Afshari, 2008). در پژوهش‌های انجام شده توسط افشاری و همکاران در سال ۱۳۸٦، برای لاین‌های حاوی ژن‌های *Lr37*، *Lr36*، *LR34*، *Lr35*، *Lr29*، *Lr28*، *Lr25*، *Lr19*، *Lr18* و *Lr9* بیماری‌زایی مشاهده نشد و در تمامی مناطق مورد بررسی واکنش مقاومت

14- Threshold Cycle (Ct)



شکل ۱- نتایج آزمون غربالگری ۵ رقم تجاری و ۲ لاین به‌طور تقریبی ایزوژنیک گندم در مقابل با قارچ عامل زنگ قهوه‌ای گندم.

Figure 1- The result of screening 5 commercial and 2 near-isogenic lines of wheat in response to *P. triticina*.



شکل ۲- نتایج آزمون غربالگری ١٤ لاین به‌طور تقریبی ایزوژنیک گندم در مقابل با قارچ عامل زنگ قهوه‌ای گندم.

Figure 2- The result of screening 14 near-isogenic lines of wheat in response to *P. triticina*.

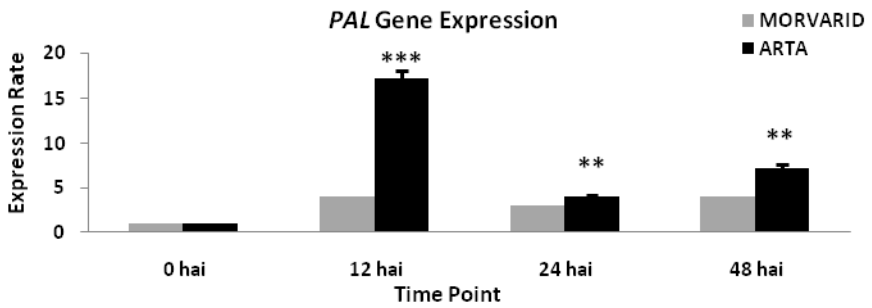
نشان دادند (Afshari *et al*.2005). در پژوهش‌های انجام شده توسط افشاری در سال ۱۳۸۹، برای لاین‌های حاوی ژن‌های *Lr2a*، *Lr36*، *Lr32*، *Lr29*، *Lr28*، *Lr26*، *Lr25*، *Lr23*، *Lr19*، *Lr14* و *Lr9* بیماری‌زایی مشاهده نشد و در تمامی مناطق مورد بررسی واکنش مقاومت نشان دادند (Afshari, 2008).

بررسی بیان ژن‌های دفاعی در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*

نرخ بیان ژن *PAL* درارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*: میزان بیان ژن *PAL* در پاسخ به آلودگی در هر دو رقم آرتا و مروارید، در ساعات پس از مایه‌زنی[15] افزایش یافت. بیشینه بیان این ژن نیز در ساعت ۱۲ پس از مایه‌زنی همزمان با جوانه‌زنی و تشکیل germ tube در هر دو لاین مشاهده شد و نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و مجددا در زمان ٤٨ (در اثر عفونت ثانویه) همزمان با تشکیل هوستوریوم و انشعابات شبکه میسیلیومی قارچ افزایش یافت. میزان رونوشت‌های این ژن در رقم مقاوم آرتا در زمان‌های ۱۲، ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از آلودگی، به ترتیب ۱۷/۲، ٤ و ۷/۲۲ برابر زمان صفر به عنوان شاهد بوده است (شکل ۳). نرخ بیان این ژن در رقم مروارید در زمان‌های ۱۲، ٢٤و ٤٨ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ٤/۰۳، ۲/۹۸ و ۳/۹۷ برابر زمان صفر این رقم بوده است (شکل ۳). بیان ژن *PAL* در زمان اوج در رقم مقاوم آرتا ٤/۲ برابر آن در زمان مشابه در رقم حساس مروارید بود. آزمون مقایسه‌ای t-test نیز اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۱ و ۱ درصد به ترتیب در زمان‌های ۱۲ و ٤٨ پس از مایه‌زنی بین این دو رقم نشان داده است (شکل ۳).

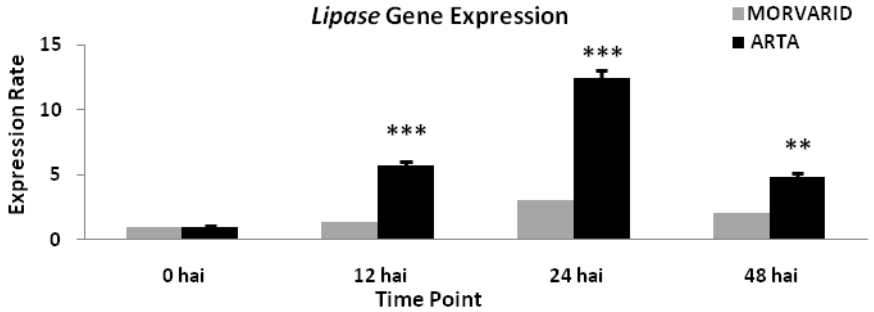
ژان‌کوان و همکاران (۲۰۰۹)، در پژوهش‌های خود بر روی

15- Hour after inoculation (hai)



شکل ۳- نرخ بیان ژن *PAL* در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*. بر اساس آزمون t-test اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با *، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد با ** و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد با *** مشخص شده است.

Figure 3- Effect of *P. triticina* on PAL activity in susceptible (Morvarid) and resistant (Arta) uninfected (0 hai) and infected (12, 24 and 48 hai) wheat. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two cultivars (P<0.001=***, P<0.01=**, P<0.05=*).

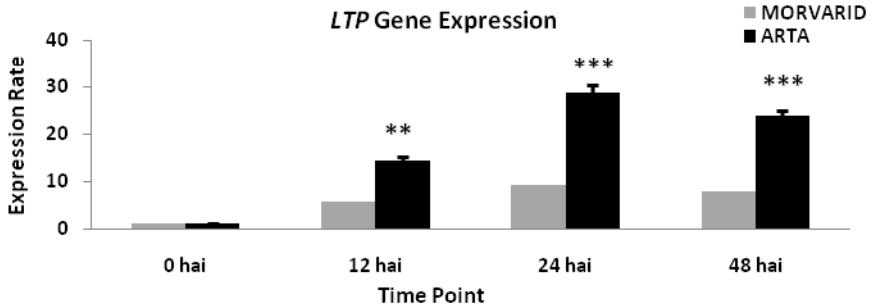


شکل ٤- نرخ بیان ژن *Lipase* در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*. بر اساس آزمون t-test اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با *، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد با ** و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد با *** مشخص شده است.

Figure 4- Effect of *P. triticina* on Lipase activity in susceptible (Morvarid) and resistant (Arta) uninfected (0 hai) and infected (12, 24 and 48 hai) wheat. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two cultivars (P<0.001=***, P<0.01=**, P<0.05=*).

بررسی نقش G پروتئین‌ها در زنگ قهوه‌ای گندم، افزایش فعالیت آنزیم دفاعی PAL را در همان مراحل اولیه آلودگی و سریع‌تر از سایر PR پروتئین‌ها مشاهده کردند (ZhanQuan *et al*.2009). در پژوهش‌های انجام شده توسط پاول (۲۰۱۰) در رابطه با بیان ژن *PAL* در برابر زنگ زرد فعالیت ضدمیکروبی آن در مراحل اولیه پس از آلودگی مشاهده شده است (Powell, 2010).

نرخ بیان ژن *Lipase* درارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*: بیان ژن *Lipase* در هر دو رقم آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ زنگ قهوه‌ای افزایش می‌یابد و در ساعت ۲٤ پس از آلودگی همزمان با تشکیل آپرسوریوم و به دنبال آن میخ رخنه به بیشینه سطح خود می‌رسد. نرخ بیان این ژن در هر دو رقم پس از زمان اوج کاهش می‌یابد. بیان این ژن در رقم آرتا در زمان‌های ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ۵/۷۵، ۱۲/٤۳ و ٤/۸٤ برابر زمان صفر به‌عنوان شاهد بوده است (شکل ٤). نرخ بیان این ژن در رقم مروارید در زمان‌های ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ۱/۳۵، ۳/۰۲ و ۲/۰۹ برابر زمان صفر این رقم بوده است (شکل ٤). بیان ژن *Lipase* در زمان اوج در رقم مقاوم آرتا ٤/۱ برابر آن در زمان مشابه در رقم حساس مروارید بوده است. آزمون مقایسه‌ای t-test نیز اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۱ درصد در زمان‌های ۱۲ و ۲٤ بین این دو رقم نشان



شکل ۵- نرخ بیان ژن *LTP* در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*. بر اساس آزمون t-test اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با *، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد با ** و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد با *** مشخص شده است.

Figure 5- Effect of *P. triticina* on LTP activity in susceptible (Morvarid) and resistant (Arta) uninfected (0 hai) and infected (12, 24 and 48 hai) wheat. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two cultivars (P<0.001=***, P<0.01=**, P<0.05=*).

داده است (شکل ٤).

در بررسی انجام شده توسط لو و همکاران (۲۰۰۵)، میزان بیان ژن لیپاز در هر دو لاین مقاوم و حساس گندم، پس از آلودگی با عامل سیاهک معمولی گندم *Tilletia tritici*، افزایش داشته است و در ساعت ١٦ پس از آلودگی به حداکثر سطح خود رسیده است و سپس به صورت تدریجی کاهش یافت. البته نرخ بیان این آنزیم در لاین مقاوم، همواره بیشتر از لاین حساس بوده است (Lu *et al*.2005). همچنین در مطالعه انجام شده توسط باقری بجستانی و همکاران (۲۰۱۲)، نرخ بیان ژن لیپاز، در لاین مقاوم گندم در برابر قارچ عامل *FHB*، *Fusarium graminearum*، در ساعت ۱۲ پس از آلودگی به بیشترین سطح خود رسید که بیانگر نقش مثبت این ژن در مقاومت است که با نتایج این بررسی مطابقت دارند (Bagheri Bajestani *et al*.2012).

نرخ بیان ژن *LTP* در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*: بیان ژن *LTP* در هر دو رقم آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ زنگ قهوه‌ای، افزایش می‌یابد و در ساعت ٢٤ پس از آلودگی، همزمان با تشکیل آپرسوریوم و به دنبال آن میخ رخنه، به بیشترین سطح خود می‌رسد. نرخ بیان این ژن در هر دو رقم پس از زمان اوج به‌تدریج کاهش یافت. بیان این ژن در رقم آرتا در زمان‌های ۱۲، ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ١٤/٥٤، ٢٨/٨٤ و ٢٣/٨٦ برابر زمان صفر به‌عنوان شاهد بوده است (شکل ۵). بیان ژن *LTP* در رقم حساس مروارید نیز در زمان‌های ۱۲، ٢٤و ٤٨ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ۵/۵۹، ۹/۱۷ و ۸/۰۰ برابر زمان صفر این رقم بوده است (شکل ۵). بیان ژن *LTP* در زمان اوج در رقم مقاوم آرتا ۳/۱ برابر آن در زمان مشابه در رقم حساس مروارید بود. آزمون مقایسه‌ای t-test نیز اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۱ درصد در زمان‌های ٢٤ و ٤٨ بین این دو رقم نشان داده است (شکل ۵).

مولینا و گارسیا اولمدو (١٩٩٤) در پژوهش اثر ژن *LTP* در پاسخ‌های دفاعی جو به پاتوژن‌ها، مشاهده کردند که سطح بیان این ژن پس از آلودگی به قارچ عامل سفیدک پودری *Blumeria graminis* f.sp *hordei* در رقم مقاوم افزایش یافته و در ساعت ١٦ پس از مایه‌زنی به اوج خود رسید که با نتایج این بررسی مطابقت دارد (Molina and Olmedo, 1993). بر اساس پژوهش‌های انجام شده توسط ژنگ و همکاران (۲۰۱۰) سطح بیان ژن *LTP2* در لاین مقاوم گندم پس از آلودگی به زنگ زرد افزایش یافت و در زمان ٢٤ پس از آلودگی به اوج خود رسید و سپس به‌طور منظمی کاهش یافت که با نتایج این بررسی مطابقت دارد (Zeng *et al*.2010). لی و همکاران (٢٠٠٦) در بررسی نقش ژن *LTP* در مقاومت گندم به قارچ عامل سفیدک پودری *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* به افزایش قابل ملاحظه رونوشت‌های این ژن در لاین مقاوم در مقایسه با لاین حساس در ساعات اولیه پس از آلودگی و سپس کاهش تدریجی آن پی بردند (Li *et al*.2006).

نتیجه‌گیری

نرخ بیان ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش در رقم مقاوم آرتا در مقایسه با ژنوتیپ حساس مروارید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و هم‌چنین سطح بیان این ژن‌ها در نمونه‌های شاهد (پیش از آلودگی) در هر دو لاین مورد بررسی در این آزمایش بسیار پایین بود. این نتایج حاکی از نقش مثبت این ژن‌ها در مکانیسم‌های مقاومت‌گیاه‌گندم در پاسخ‌به آلودگی‌قارچ عامل‌زنگ قهوه‌ای است. به‌طورکلی ژنوتیپ‌های مختلف عکس‌العمل فیزیولوژیک و ژنتیک یکسانی را در برابر حمله بیمارگرها نشان نمی‌دهند. عملکرد صفت پیچیده‌ای است که تحت تاثیر اثر متقابل ژنوتیپ و محیط است. برای دستیابی به حداکثر تولید، مقاوم بودن به آفات و بیماری‌ها ضروری است. عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی و ویروسی در مقاطع مختلف از مرحله رشد گیاه بیشترین خسارت را به محصول وارد می‌کنند. مهندسی ژنتیک همواره سعی بر دستیابی به گیاهانی را دارد که حاوی ژن‌های مطلوب مقاومت به آفت‌ها و بیماری‌ها هستند. کاهش هزینه کشاورزان از طریق کاهش مصرف سموم، افزایش کمیت و کیفیت محصول و از سوی دیگر کاهش صدمات وارده به منابع زیستی مثل خاک و آب‌های زیرزمینی از جمله مزیت‌های حاصل از کاربرد گیاهان تراریخته است.

با توجه به نتایج این پژوهش و یافته‌های گذشته نتیجه‌گیری می‌شود که ژن *PAL* که در افزایش اسید سالسیلیک به‌طور مستقیم نقش دارد و خود به‌عنوان ملکول سیگنال با فعال کردن ژن *NPR1*، موجب بیان ژن‌های *PR* (*PR1*، *PR2*، *PR3*، *PR5* و ...) می‌شود، در تولید گیاهان تراریخته، توصیه می‌شود. ارزیابی این ژن‌ها با استفاده از روش افزایش بیان و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی در راستای تولید گیاهان تراریخته مقاوم که نقش مهمی در برنامه‌های مقاومت ژنتیک و ایمنی زیستی دارند پیشنهاد می‌شود. امید است که نتایج حاصل از این پژوهش در درک بهتر مقاومت گندم به قارچ عامل زنگ قهوه‌ای و توسعه استراتژی‌های جدید در مبارزه با این بیماری از طریق تولید گیاهان تراریخته موثر باشد.

منابع

1. Afshari F 2008. Identification of virulence factors of *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust in Iran. In: Proceedings of 11th International Wheat Genetics Symposium, Brisbane, Australia, 106 P.
2. Afshari F, Torabi M, Kia S, Dadrezai S, Safavi SA, Chaichi M, Nasrolahi M, Karbalai Khiavi H, Zakeri A, Bahrami Kamangar S, Patpour M, Ebrahimnejad S. 2005. Monitoring of virulence factors of *Puccinia triticina* Eriksson, the causal agent of wheat leaf rust in Iran during 2002-2004. Seed and Plant 21:485-500 (in Farsi with English abstract).
3. Bagheri Bajestani F, Ramezanpour S, Soltanloo H, Vakili Bastam S. 2012. Study on differentially *Lipase* gene expression against different inducers of defense response in scab-resistant and susceptible wheat cultivars. J Rec Adv Agri 1(1):6-14.
4. Carriere F, Thirstrup K, Boel E, Verger R, Thim L. 1994. Structure–function relationships in naturally occurring mutants of pancreatic lipase. Protein Engineering 7(4):563-569.
5. Duplessis S, Cuomo CA, Lin YC, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly DL, Hacquard S, Amselem J, Cantarel BL 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(22):9166-9171.
6. Fitzgerald HA, Chern MS, Navarre R, Ronald PC. 2004. Overexpression of (At) NPR1 in rice leads to a BTH-and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. Molecular Plant-Microbe Interactions 17(2):140-151.
7. Grover A, Gowthaman R. 2003. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. Curr. Sci 84:330–40.
8. Hulbert SH, Bai J, Fellers JP, Pcheco MG, Bowden RL. 2007. Gene expression patterns in near isogenic lines for wheat rust resistance gene Lr34/Yr18. Phytopathology 97:1083-1093.
9. Knott DR 1989. The wheat rusts. Breeding for Resistance. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 201 pp.
10. Li HP, Liao YC. 2003. Isolation and characterization of two closely linked phenylalanine ammonia-lyase genes from wheat. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan ,China, 30(10):907-12.
11. Li AL, Meng CS, Zhou RH, Ma ZY, Jia JZ. 2006. Assessment of *Lipid Transfer Protein* (*LTP1*) gene in wheat powdery mildew resistance. Agricultural Sciences in China 5(4):101-105.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 to the (-Delta Delta Ct) method. Methods 25:402–408.
13. Lu Z, Gaudet DA, Frick M, Puchalski B, Genswein

B, Laroche A. 2005. Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 38(4):420.
14. McIntosh RA, Welling CR, Park RF. 1995. Wheat Rust: an atlas of resistance genes. CSIRO, Australia, 200 pp.
15. Molina A, Garcia-Olmedo F. 1993. Developmental and pathogeninduced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. Plant J 6:983-991.
16. Molina A, Segura A, and Garcia-Olmedo F. 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. FEBS Lett 316:119-122.
17. Powell NM. 2010. Phenotypic and genetic analysis of yellow rust resistance in the UK winter wheat cultivar Claire. Research final Report. Research, Education and Extension organization. PhD thesis. University of East Anglia, Norwich.
18. Poznanski J, Sodano P, Suh SW, Lee JY, Ptak M, Vovelle F. 1999. Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds: comparison with homologous proteins. Eur. I. Biochem 259:692-708.
19. Roelfs AP, Singh RP, Saari EE. 1992. Rust disease of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMIT, Mexico, D.F, 81pp.
20. Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:15107–11.
21. Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu. Rev. Phytopathol 44:135–62.
22. Wirtz KWA. 1991. Phospholipid transfer protcins. Annu. Rev. Biocheni 60:73-99.
23. Zeng X, Wang C, Ali M, Zhang H, Liu X, Li W, Ji W. 2010. Profiling gene expression patterns of strip rust (*Puccinia striformis* f.sp. *tritici*) resistance gene in new wheat germplasm. Pak. J. Bot 42(6):4253-4266.
24. ZhanQuan Z, ShuiShan S, YingChun Z, WenXiang Y, DaQun L. 2009. Involvement of the heterotimeric G protein in the defense responses of wheat to *Puccinia triticina*. Scientia Agricultura Sinica 42(1):117-123.
25. Zhu Q, Dabi T, Beeche A. 1995. Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Mol Biol* 29:535-50.
26. Zhu X, Li Z, Xu H, Zhou M, Du L, and Zhang Z. 2012. Overexpression of wheat lipid transfer protein gene TaLTP5 increases resistance to *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* in transgenic wheat. Funct Interg Genomics DOI 10.1007/s10142-012-0286-z.