بررسی بیان فنیل آلانین آمونیالیاز و ژن‌های مرتبط با بیماریزایی در گندم همزیست شده با قارچ اندومیکوریز *Piriformospora indica* پس از آلودگی با سفیدک پودری

STUDY ON EXPRESSION OF PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE AND PATHOGENESIS-RELATED GENES IN WHEAT SYMBIONT WITH ENDOMYCORRHIZAL FUNGUS PIRIFORMOSPORA *INDICA* AFTER INFECTION WITH POWDERY MILDEW

لیلا آهنگر*[۱]، غلامعلی رنجبر[۲]، ولی الله بابایی زاد[۳]، حمید نجفی زرینی[۴] و عباس بیابانی[۵]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۲۵)

چکیده

قارچ اندومیکوریز *Piriformospora indica* پس از همزیست شدن با ریشه گیاه، با القای مقاومت سیستمیک، سبب حمایت گیاه میزبان در مقابل استرس‌های زیستی و غیرزیستی می‌گردد. به منظور بررسی توانایی این قارچ در القای مقاومت در گندم در مقابل بیماری سفیدک پودری که بوسیله قارچ بیوتروف *Blumeria graminis f.* sp. *tritici* (Bgt) ایجاد می‌گردد ، چهل ژنوتیپ گندم ایرانی بر اساس حساسیت به بیماری غربال شدند و رقم فلات بعنوان حساس‌ترین ژنوتیپ انتخاب گردید. به‌منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های دفاعی *PR1*، *PR2*، *PR5* و *PAL*، رقم فلات با قارچ *P. indica* همزیست گردید و به همراه گیاهان غیرهمزیست در معرض قارچ *Bgt* قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که در هر دو گروه از گیاهان، حداکثر بیان ژن‌های دفاعی ۲۴ ساعت بعد از آلودگی است . این روند در گیاهان غیر همزیست به صورت تدریجی بود، در حالیکه در گیاهان همزیست شده القای زودهنگام و بالای این ژن‌های دفاعی در ساعات اولیه بعد از آلودگی با *Bgt*، مشاهده شد. این نتیجه نشان داد که قارچ میکوریز با القای مقاومت سیستمیک سبب بیان زود هنگام و سریع در گیاه گندم شده و با افزایش بیان ژن‌های دفاعی سبب القای مقاومت در گیاه می گردد. در هر دو گروه از گیاهان آزمایشی، ۴۸ ساعت بعد از آلودگی، روند کاهشی بیان مشاهده شد که می‌تواند به دلیل جلوگیری از تظاهر موثر این ژن‌ها به دنبال تشکیل مکینه (هاستوریوم) باشد.

کلیدواژه: اندومیکوریز، گندم، سفیدک پودری، مقاومت، ژن‌های دفاعی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: l.ahangar63@gmail.com

۱- دانشجوی دکتری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳ و ۴- استادیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۵- دانشیار دانشگاه گنبد کاووس

مقدمه

گندم گیاهی یکساله از تیره غلات است که بیش از ۲۰ درصد کالری و پروتئین را در رژیم غذایی انسان فراهم می‌کند و غذای اصلی انسان در بیش از ۴۰ کشور جهان می‌باشد (Kole and Timothy 2008). سالیانه مقادیر زیادی از این محصول در اثر بیماریهای ناشی از بیمارگر های مختلف از بین می‌روند. استراتژی مقاومت به بیماری جزء مهمی از کشاورزی مطلوب و مدرن می‌باشد. این استراتژی کاربرد مواد شیمیایی را در محیط کاهش داده و سبب ایجاد کشاورزی سالم می‌گردد. گیاهان توسط مکانیسم ساختاری و مقاومت القایی از خود در برابر بیمارگرهای مختلف دفاع می کنند (Sticher *et al.* 1997 , Heil and Bostock 2002). مقاومت القایی به عنوان یک پتانسیل جایگزین یا استراتژی تکمیلی در کنار مقاومت ذاتی و مقاومت بر اساس ژن R، سبب حمایت از گیاهان در برابر تنش‌ها می‌گردد. بر اساس مکانیسم‌های مختلفی که در ایجاد مقاومت القایی دخیل‌اند انواع مختلفی از مقاومت القایی تعریف شده است (Van Hulten *et al.* 2006). پدیده مقاومت سیستمیک القایی (ISR) یکی از مقاومت‌های القایی است که توسط برخی نژادهای غیربیماریزای باکتری‌ها و قارچ‌های همزیست شده با ریشه و یا با کاربرد برخی مواد شیمیایی ایجاد می‌شود (Van loon *et al.* 2006).

در سال ۱۹۹۷ برای اولین بار در خاک‌های صحرای "شن‌تار" در شمال غرب هندوستان یک قارچ اندومیکوریز همزیست کننده با ریشه بنام *Piriformospora indica* در بوته‌های *Prosopsis juliflora* و *Zizyphus nummularia* شناسایی گردید (Verma *et al* .1998). قارچ *P. indica* به عنوان یک عضو از شاخه بازیدیومیکوتا و کلاس B از راسته Sebacinales و فرم‌های همزیست دو سویه دسته بندی گردید (Hibbett 2006 , Verma *et al.* 1998). این قارچ بوسیله مقاومت سیستمیک القایی (ISR) سبب حمایت سیستمیک در گیاه میزبان می‌گردد. مقاومت سیستمیک القایی ایجاد شده توسط قارچ *P. indica*، به سیگنال‌های جاسمونیک اسید (JA)، عملکرد *NPR1* سیتوزولی، سطح پایین بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت سیستمیک در گیاه قبل از حمله بیمارگر و همچنین القای ژن القاء کننده JA (VSP1) بعد از حمله بیمارگر وابسته بوده و از مقاومت ایجاد شده توسط سالسیلیک اسید (SA) و سیگنال‌های مرتبط با آن مستقل می‌باشد (Molitor and Kogel 2009). قارچ *P. indica* همزیست طیف وسیعی از گیاهان تک لپه‌ای مثل گندم، جو و برنج و بسیاری از گیاهان دولپه‌ای مثل آرابیدوپسیس می‌باشد (Varma *et al.* 1999). همزیست شدن ریشه گیاهان بوسیله این قارچ سبب افزایش رشد در گیاه میزبان (Peškan-Berghöfer *et al.* 2004، Varma *et al.* 1999) و حمایت از گیاه در برابر استرس‌های زیستی و غیرزیستی می‌گردد. مقاومت ISR در غیاب بیمارگر سبب تغییرات بسیار ضعیف میزان رونوشت ژن‌های مقاومتی در گیاه می‌گردد. از این رو، گیاهان همزیست شده با *P. indica* در مقایسه با گیاهان شاهد سطح یکسانی از ژن‌های پاسخ دهنده به اتیلن (ET)، JA و SA را نشان می‌دهند. در حالیکه بعد از حمله سفیدک پودری بیان پروتئین VSP1 القاءکننده JA در گیاهان همزیست شده با *P. indica* به میزان زیادی افزایش یافت. بیان زیاد این ژن در گیاهان همزیست شده بطور قطع حاکی از نقش JA در مقاومت القاء شده توسط *P. indica* می‌باشد (Molitor and Kogel 2009). در استراتژی مقاومت توسط قارچ همزیست *P. indica*، با توجه به اینکه این قارچ در ریشه وجود دارد،

این سوال مطرح است که این قارچ چگونه از برگ و اندام‌های هوایی گیاه در مقابل قارچ بیوتروف مثل عامل سفیدک پودری دفاع می‌نماید؟ تحقیقات نشان داده اند که حمایت این قارچ همزیست از گیاه در برابر بیمارگرهای برگی نیاز به ارسال پاسخ‌های سیستمیکی از ریشه دارد (Waller *et al.* 2005). والر و همکاران (۲۰۰۵) طی تحقیقات خود مشاهده نمودند که جوهای همزیست شده در مقابل جوهای شاهد مقاومت بیشتری در برابر آلودگی با سفیدک سطحی نشان دادند. بررسی میکروسکوپی حاکی از فراوانی بالای پاسخ‌های فوق حساسیت (مرگ سریع سلولی) و تشکیل رسوب در دیواره سلولی در این گیاهان بود که تایید کننده آن بود که این قارچ همزیست با افزایش این پاسخ‌های دفاعی از گیاه در برابر بیمارگر بیوتروف حمایت نموده و از تشکیل هاستوریوم آن در بافت‌های گیاهی جلوگیری می‌نماید. آنها همچنین با ارزیابی‌های بیوشیمیایی پیشنهاد نمودند که قارچ *P. indica* بوسیله القاء مقاومت سیستمیک از گیاه در برابر تنش های زیستی و شوری حمایت می‌نماید (Waller *et al.* 2005). بیماری سفیدک پودری بوسیله یک قارچ انگل اجباری بنام *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) ایجاد می‌گردد. این بیماری یکی از مخرب‌ترین بیماری‌ها در شرایط آب و هوایی معتدل است و منجر به ۳۴- ۵ درصد کاهش عملکرد در مزارع گندم می‌شود (Conner *et al.* 2003). همچنین نتایج مطالعات قبلی نیز حاکی از آن است که مقاومت القاء شده (ISR) توسط قارچ *P. indica* سبب حمایت از گیاه در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌ها می‌گردد (Molitor *et al.* 2011). با توجه به اینکه تاکنون مطالعات خاصی در مورد همزیستی گندم با قارچ *P. indica* در القای مقاومت به سفیدک سطحی انجام نگرفته است، بنابراین هدف این تحقیق بررسی امکان همزیست شدن رقم حساس گندم با قارچ اندومیکوریز و مطالعه القاء مقاومت به عامل سفیدک پودری (*Bgt*) در گیاه همزیست شده و بررسی تغییرات بیان ژن‌های مرتبط به بیماریزایی (Pathogenesis- Related genes, PR) در گیاهان تیمار شده به همراه گیاهان شاهد تحت تنش قارچ *Bgt* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نحوه تهیه و نگهداری قارچ سفیدک پودری

بذر چهل ژنوتیپ مختلف گندم استفاده شده در این بررسی از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران تهیه شده است که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. جدایه قارچ عامل بیماری (*Bgt*) نیز از بخش تحقیقات پاتولوژی غلات این موسسه تهیه و در آزمایشگاه روی رقم حساس گندم بولانی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰٪ در طول مدت این بررسی تکثیر و نگهداری شد (Molitor *et al.* 2011). برای ارزیابی ارقام گندم در مقابل عامل بیماری، بذور مورد نیاز هر رقم به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شده و بر روی کاغذ فیلتر مرطوب در تشتک پتری قرار داده شدند. پس از جوانه زنی، بذور به گلدان حاوی خاک منتقل شده و در اتاقک رشد با تناوب ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و ۸ ساعت تاریکی بادمای ۲۰ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۷۰٪ به مدت یک هفته نگهداری شدند.

آلوده سازی ژنوتیپ‌های گندم با *Bgt* و تعیین شدت حساسیت ژنوتیپ‌ها

برای آلوده سازی ارقام گندم از روش آیشمن و

جدول۱ - مشخصات و مبداء ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه در این تحقیق

Table 1 - characteristics and origin of studied wheat genotypes

شماره No	نام ژنوتیپ Genotype	تیپ رشدی Growth type	مبداء Origin	شماره No	نام ژنوتیپ Genotype	تیپ رشدی Growth type	مبداء Origin
۱	مروارید	بهاره	کرج-دورگ	۲۱	N-80-19	بهاره	سیمیت
۲	بولانی	بهاره	زابل-بومی	۲۲	سپاهان	بهاره	کرج-دورگ
۳	موراکو	بهاره	مراکش	۲۳	زرین	زمستانه	سیمیت و ایکاردا
۴	دریا	بهاره	سیمیت	۲۴	گاسپارد	زمستانه	فرانسه
۵	گنبد	بهاره	کرج-دورگ	۲۵	الموت	زمستانه	کرج-دورگ
۶	فلات	بهاره	سیمیت	۲۶	آزادی	بهاره	کرج-دورگ
۷	میلان	بهاره	سیمیت	۲۷	کرج ۱	بهاره	کرج- دورگ
۸	تجن	بهاره	سیمیت	۲۸	قدس	بهاره	کرج-دورگ
۹	ارتا	بهاره	کرج-دورگ	۲۹	توس	زمستانه	سیمیت
۱۰	مغان۱	بهاره	سیمیت	۳۰	خزر	بهاره	کرج- دورگ
۱۱	مغان۲	بهاره	سیمیت	۳۱	استار	بهاره	فرانسه
۱۲	مغان۳	بهاره	سیمیت	۳۲	گلستان	بهاره	سیمیت
۱۳	نای شصت	بهاره	سیمیت	۳۳	زارع	زمستانه	سیمیت
۱۴	اروم	زمستانه	کرج-دورگ	۳۴	سیروان	بهاره	کرج-دورگ
۱۵	میهن	زمستانه	کرج-دورگ	۳۵	گاسکوجن	زمستانه	فرانسه
۱۶	البرز	بهاره	سیمیت	۳۶	پارسی	بهاره	کرج-دورگ
۱۷	بم	بهاره	کرج-دورگ	۳۷	شانگهای	بهاره	سیمیت
۱۸	کویر	بهاره	کرج- دورگ	۳۸	ER-89-13	بهاره	سیمیت
۱۹	سیستان	بهاره	کرج-دورگ	۳۹	ER-89-20	بهاره	سیمیت
۲۰	ارگ	بهاره	کرج-دورگ	۴۰	ER-89-15	بهاره	سیمیت

همکاران و بابایی زاد و همکاران (Eichmann *et al.* 2006, Babaeizad *et al.* 2009) پیروی شد. برگ اول گیاهچه های یک هفته ای بریده شد و در سه تکرار در قالب طرح بلوک کاملا تصادفی روی محیط آب آگار ۰/۵ درصد حاوی ۲۰میلی گرم در لیتر بنزیمیدازول داخل تشتک های پتری پخش شدند. نمونه های آماده شده داخل اتاقک مکعبی با اسپورهای *Bgt* (به نسبت ۵ اسپور در میلیمتر مربع) آلوده شده و پس از آن به اتاقک رشد منتقل شدند. یک هفته بعد از آلوده سازی، تعداد کلنی رشد یافته در سطح ۲/۵ سانتی‌متر مربع هر برگ شمارش و داده ها در صفحه Excel ثبت شدند.

تعیین نرخ پاسخ های دخیل در مقاومت

در این بررسی برگ‌های بریده شده گیاهچه‌های یک هفته‌ای با غلظت بالای اسپورهای *Bgt* (به نسبت ۵۰ اسپور در میلی‌متر مربع) آلوده شده و به اتاقک رشد منتقل

شدند. بعد از ۴۸ ساعت برگ‌ها بـه محلـول $1mg\ ml^{-1}$ از DAB (pH 4) منتقل شده و به مدت ۵ ساعت رنگ آمیزی شـدند (Thordal-Christensen *et al.* 1997). سـپس، نمونه‌ها بـه مـدت ۲۴ سـاعت در محلـول ۴:۱ (کلروفـرم: اتانول) حاوی ۰/۱۵درصد تری‌کلرواسـتیک اسـید (TCA) رنگ بری شدند. سپس نمونه‌ها در محلـول گلیسـیرین ۵۰ درصد نگهداری شدند. برگ‌های رنگ بری شده بـه مـدت یک دقیقه در محلول مرکب چین (۹۲ میلی لیتر آب مقطـر حاوی ۷ میلی لیتر اسید استیک و ۱ میلی لیتر جـوهر آبـی) رنگ آمیزی شده سپس در زمینه میکروسـکوب UV/Vis مشاهده و پاسخ های مختلف گیاه در مقابل *Bgt* مشاهده و فراوانـی هـر کـدام ثبـت شـد (Babaeizad *et al.* 2009, Hückelhoven *et al.* 1999). در تمـامی مراحـل جهـت تجزیـه واریـانس و مقایسـه میـانگین از نـرم افـزار SAS استفاده گردید.

همزیست نمودن گیاهان و آلوده سازی با قارچ سـفیدک پودری جهت بررسی الگوی بیان ژن

جدایه WP2 قارچ میکوریز *P. indica* توسط پروفسور کوگل از موسسه بیماری شناسی و جانور شناسی کاربردی دانشگاه گیسن آلمان اهدا شـد و در محـیط کشـت جامـد اختصاصی CM کشت و تکثیـر شـد. جهـت انـدازه‌گیـری الگوی بیان ژن، ریشه‌چه‌های حساس‌تـرین ژنوتیـپ گنـدم انتخابی (فلات)، پس از جوانه‌زنی با سوسپانسیون (5×10^5 در میلی لیتر) اسپور قارچ *P. indica* تلقیح و به مـدت ۱۲ ساعت بر روی شیکر با سـرعت ۱۰۰ دور در دقیقـه قـرار گرفت تا امکان برقراری اتصال اسپورهای قارچ با ریشه‌ها فراهم گردد. سپس گیاهچـه‌هـا در گلـدان‌هـای پلاسـتیکی حاوی پرلیت و ماسه استریل در سه تکـرار کاشـته شـدند. برای تیمارهای شاهد گیاهچه‌های جوانه زده بدون تلقیح با اسپور قارچ در گلدان حاوی بسـتر کشـت شـدند. پـس از کشـت، تمـامی گیاهچـه‌هـا در اتاقـک رشـد در شـرایط ۱۶ساعت روشنـایـی و ۸ سـاعـت تاریکـی، دمـای $^{\circ}C$ ۲۸-۲۴ و رطوبت نسـبی ۶۰٪، بـه مـدت سـه هفتـه قـرار گرفتند و به وسیله محلول هوگلند آبیاری شدند. سه هفتـه پس از تلقیح *P. indica* به ریشه، جهت ردیـابی و اثبـات همزیستی قارچ با ریشه، چند گیاه به طور تصادفی انتخاب شدند و ریشه آنها از خاک خارج و چند مرتبه با آب شسته شد. ریشه‌ها پس از رنـگ آمیـزی بـه روش ویرهایلیـک و همکـاران (Vierheilig *et al.* 1998)، بـه وسـیله میکروسکوپ مورد بررسی قرار داده شدند. همچنین جهت اثبات همزیستی مولکولی پس از ضدعفونی ریشـه گیاهـان تیمار شده و شاهد، اسـتخراج DNA بـه روش دلاپورتـا و همکاران (Dellaporta *et al.* 1983) انجـام شـد. پـس از استخراج DNA برای ردیابی قارچ میکوریز از آغازگرهـای اختصاصـی (F-5' ACC GTC TTG GGG TTG TAT CC 3' و R-5' TCG TCG CTG TCA ACA AGA TG 3') ژن *Tef* قـارچ *P. indica* (Accession No. AJ249911)، با برنامه PCR شامل ۴ دقیقـه در $^{\circ}C$۹۴ و بـه دنبال آن ۳۵ چرخه در شرایط ۳۰ ثانیه در $^{\circ}C$۹۴ ، ۳۰ ثانیـه در $^{\circ}C$۵۴ و ۴۵ ثانیـه در $^{\circ}C$۷۲ و سـپس ۱۰ دقیقـه در $^{\circ}C$۷۲ استفاده گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مواد و ترکیبات استفاده شده شامل: 10X (1X) PCR buffer، 50 mM $MgCl_2$ (1.5 mM)، 2 mM of each dNTP (0.2 mM)، 10 pM of each primer (0.4 pM)، Taq DNA polymerase (1u) ،5u/µl و ddH_2O و ۱۰۰ng دی ان ای قالب بود.

پس از اثبات همزیستی، برگ‌های رقـم حسـاس فـلات همزیست شده به همراه گیاهان فاقد *P. indica* ، به وسیله

جدول ۲- توالی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Nucleotide sequence of used primers in this study

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (F 5'→3') Forward primer	توالی آغازگر (R 5'→3') Reverse primer	منبع آغازگرها Primer refrence
TaActin	GGA AAA GTG CAG AGA GAC ACG	TAC AGT GTC TGG ATC GGT GGT	DN551593
TaPAL	CCA ATG TTC TGT CCG TCC TT	GAG CTT CCC TCC AAG ATG TG	AY005474.1
Ta PR1	ACT ACG ACT ACG GGT CCA ACA	TCG TAG TTG CAG GTG ATG AAG	AJ007348
Ta PR2	AGC AGA ACT GGG GAC TCT TCT	CAC ATA CGT ACC GCA TAC ACG	Z22874
Ta PR5	CAG GAC TTC TAC GAC ATC TCG	TCT GGT AGT TAT TAT TGC CAC TGC	X58394.1 و AF389883.1
Tef	ACC GTC TTG GGG TTG TAT CC	TCG TCG CTG TCA ACA AGA TG	Deshmukh *et al*. 2006

قارچ عامل سفیدک پودری (*Bgt*) در غلظت ۵۰ کنیدیوم در هر میلی متر مربع آلوده گردیدند. در تمامی مراحل گیاهان شاهد نیز با محلول آب و توئین ۲۰، تیمار شده و در اتاقک کشت نگهداری شدند. سپس، در زمان های ۰، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی از هر رقم، ۱۰ برگ اول در هر مرحله انتخاب و در فریزر 80°C- جهت استخراج Total RNA نگهداری شدند.

استخراج RNA از نمونه‌ها و ساخت cDNA

جهت استخراج RNA از نمونه‌های برگی از کیت RNX-plus شرکت سیناژن (Cat, No: RN7713C) استفاده گردید. سپس کیفیت آر ان ای استخراج شده، در ژل آگاروز ۱/۵ درصد ارزیابی شد. آنگاه نمونه‌های RNA بوسیله کیت (Fermentas Cat. DNaseI, RNase-free kit No: EN0525 تیمار شده و cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis فرمتاز، ساخته شد. تمامی این مراحل طبق دستورالعمل هر کیت انجام گرفت.

اندازه‌گیری الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه

بررسی بیان ژن (qRT-PCR) با استفاده از دستگاه C1000™ Thermal Cycler (BioRad) و کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (فرمنتاز، Cat. No: K0221) انجام شد. هر واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر رفت (Forward primer) و برگشت (Reverse primer) ، ۳۰۰ نانوگرم از سی دی ان ای الگو رقیق شده و آب عاری از نوکلئاز بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس سپس ۴۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سلسیوس) بود. پس از اتمام واکنش PCR، برای رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ۹۵-۶۰ درجه سلسیوس با اختلاف ۵ درجه در هر چرخه انجام گرفت. به منظور استاندارد نمودن داده‌ها، نمونه‌ها بوسیله ژن خانه‌دار Actin نرمال گردیدند. لیست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ آمده است. این آغازگرها پس از هم ردیف نمودن توالی‌های بدست آمده از بانک ژنی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) بوسیله نرم افزارهای BioEdit 7.0.9.0 و OligoExplorer V1.4 طراحی گردیدند. نرخ بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) اندازه‌گیری شد.

جدول۳- تجزیه واریانس ۴۰ ژنوتیپ گندم از نظر نرخ حساسیت به سفیدک پودری گندم (*Bgt*) بر اساس تعداد کلنی رشد یافته در ۲/۵ سانتی‌متر مربع از سطح برگ

Table 3. Analysis of variance of 40 wheat genotypes related to the rates of susceptibility to powdery mildew in wheat based on colony number in 2.5 cm^2 of leaves

منبع تغییرات	درجه آزادی(df)	مجموع مربعات(SS)	میانگین مربعات(MS)	F
تیمار	۳۹	۲۳۴۹۱/۴	۶۰۲/۳	۵۵/۰۹^{xx}
بلوک	۲	۱۹۷/۱۷	۹۸/۵	۹/۰۲^{xx}
خطا	۷۸	۸۵۲/۷۹	۱۰/۹	
کل	۱۱۹	۲۴۵۴۱		
CV	۴/۵	R^2	۰/۹۶	

^{x} و ^{xx} به ترتیب معنی‌دار در سطوح ۵و ۱ درصد *,**=significant at 0/05 and 0/01 level respectively

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

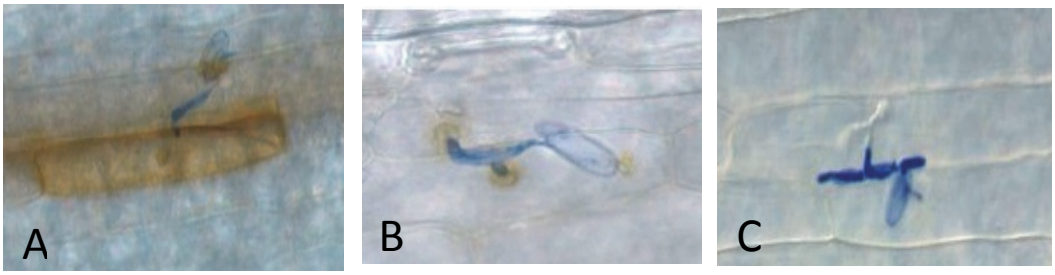
این آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام گردید و پس از محاسبه بیان ژن‌های مورد مطالعه برای هر نمونه، انحراف معیار آن‌ها محاسبه و نتایج با استفاده از آزمون t بررسی شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ارزیابی ژنوتیپ‌ها در مقابل قارچ عامل سفیدک پودری نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها در سطح ۱٪ اختلاف معنی داری در میزان حساسیت به *Bgt* وجود داشت. این امر نشان دهنده وجود تفاوت ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ های مورد بررسی از نظر حساسیت در مقابل بیمارگر است. کم بودن میزان ضریب تغییرات (CV=۴/۵) نشان دهنده دقت کافی در آلوده‌سازی و اندازه گیری است که این نتیجه با مقدار بالای ضریب تشخیص (R^2 =۰/۹۶) منطبق بود (جدول۳). نتیجه ارزیابی میزان حساسیت ارقام مختلف گندم به *Bgt* نشان داد که ارقام شانگهای، فلات، ارگ، بولانی و آرتا با بیشترین میزان کلنی در ۲/۵ cm^2 بعنوان حساسترین و ارقام زارع، گاسکوجن، تجن، سیروان و ER-89-13 با کمترین میزان کلنی بعنوان مقاوم‌ترین ارقام به بیماری سفیدک پودری شناسایی گردیدند (داده‌های منتشر نشده). به منظور بررسی دقیق‌تر از چگونگی پاسخ گیاه به عامل بیماری، ژنوتیپ‌های فلات و شانگهای به عنوان ارقام حساس جهت بررسی‌های میکروسکوپی و در نهایت شناسایی حساس‌ترین ژنوتیپ جهت تلقیح با قارچ میکوریز *P. indica* انتخاب شدند (شکل۱). ارزیابی میانگین پاسخ های دخیل در مقاومت دو رقم مورد مطالعه در مقابل عامل بیماری سفیدک پودری (*Bgt*) حاکی از اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ های فلات و شانگهای بود، بطوریکه فلات، نرخ بالایی از نفوذ (>53%) را نسبت به شانگهای نشان داد. در حالیکه شانگهای با میزان پاپیل بیشتر و نفوذ کمتر از مقاومت بیشتری نسبت به فلات برخوردار می‌باشد. لذا جهت مطالعه امکان القاء مقاومت و الگوی بیان ژن، فلات به عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ انتخاب گردید (شکل ۲).

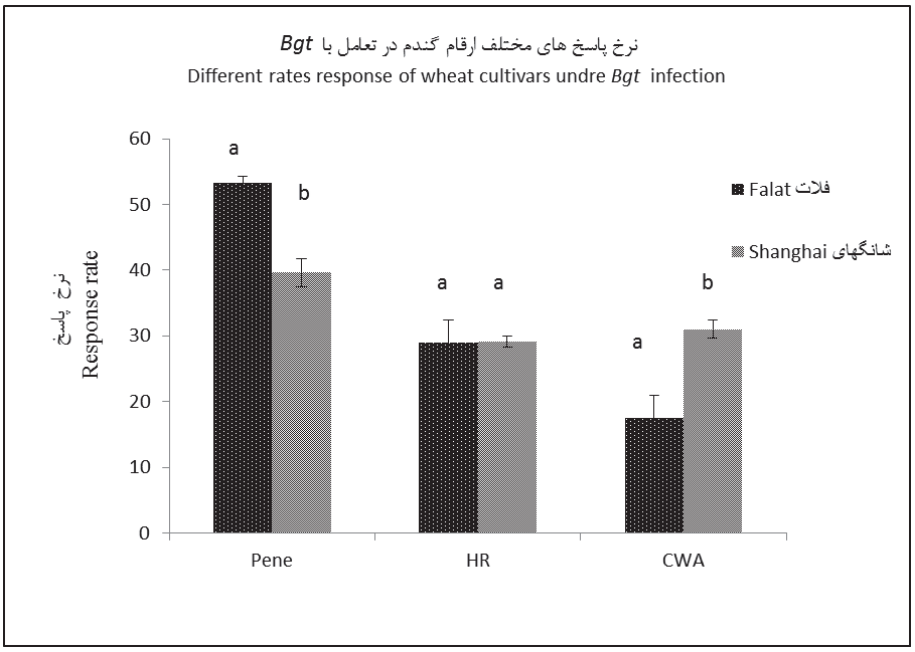
وضعیت میزان استقرار قارچ میکوریز *Piriformospora indica* در ریشه گندم

بررسی میکروسکوپی ریشه گیاهان تلقیح شده با اسپور



شکل ۱- پاسخ‌های مختلف مقاومت گیاه گندم در مقابل قارچ *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. A = مرگ سریع سلولی (واکنش فوق حساسیت)، B = تشکیل پاپیلا و C = تشکیل مکینه قارچ

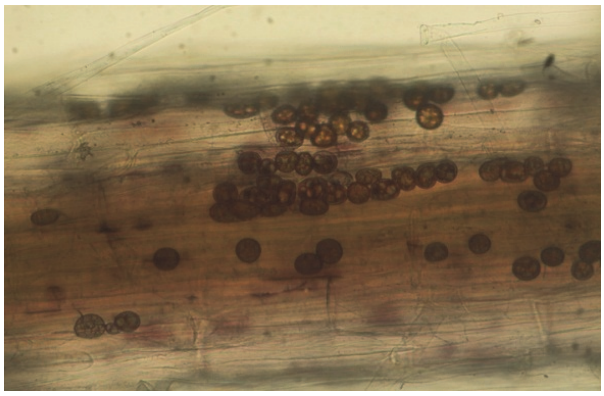
Fig 1. Different resistance responses of wheat against *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* . A = Hypersensitive response(HR), B = Papilla formation and C = Haustorium formation



شکل۲- مطالعه میکروسکوپی نرخ پاسخ‌های دخیل در مقاومت در دو رقم فلات و شانگهای گندم در مقابل قارچ *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* و مقایسه میانگین به روش LSD در سطح ۱درصد

Fig 2. Microscopic study on resistance responses rate in Falat and Shanghai cultivars to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and comparison of means using LSD Test at 1% level.
Pene= Penetration, HR=Hypersensitive response and CWA=cell wall appositions .

(کلامیدوسپور) قارچ *P. indica* حاکی از توانایی بالای این قارچ در کلنیزه نمودن ریشه گیاه میزبان می‌باشد، بطوریکه انبوهی از ریسه های برون ریشه‌ای حاصل از رشد اسپورهای قارچ در سطح خارجی و بخش کورتکس ریشه مشاهده شد. در داخل کورتکس ریشه، *P. indica* علاوه بر توسعه ریسه، انبوهی از اندام‌های اختصاصی به نام کلامیدوسپور را تولید نمود که به صورت کروی تا گلابی شکل و به حالت زنجیره‌ای مشاهده شدند (شکل ۳). در بررسی مولکولی با آغازگرهای اختصاصی *Tef*، قطعه ای از DNA معادل ۱۶۰ جفت باز مربوط به *P. indica* در نمونه‌های تلقیح شده با قارچ تکثیر گردید. در حالیکه در نمونه‌های ریشه گیاهان شاهد این قطعه مشاهده نشد



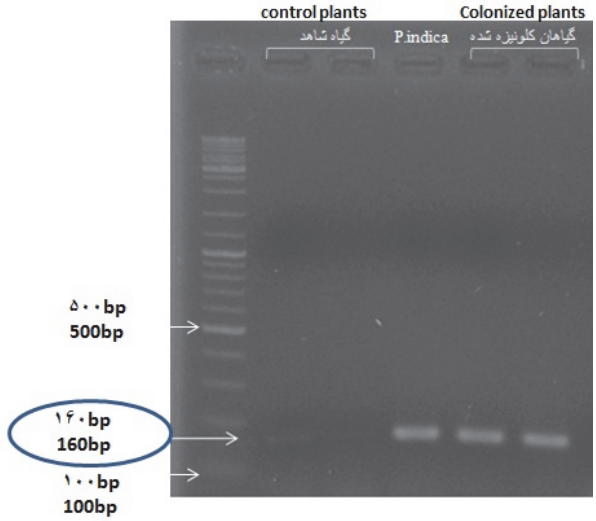
شکل۳- تشکیل کلامیدوسپورهای قارچ *Piriformospora indica* روی ریشه گندم همزیست شده

Fig 3. Formation of *Piriformospora indica* chlamydospores on colonized wheat root

(شکل ۴). نتایج میکروسکوپی و مولکولی بیانگر استقرار مناسب و پایدار قارچ *P. indica* در ریشه گندم بود.

ارزیابی توانایی قارچ میکوریز در القاء مقاومت به سفیدک پودری

بمنظور بررسی توانایی قارچ اندوفیت *P. indica* در القاء مقاومت در گندم علیه *Bgt*، برگ‌های گیاهان همزیست شده به همراه گیاهان همزیست نشده در محیط آب آگار حاوی ۲۰میلی گرم در لیتر بنزومیدازول در تشتک‌های پتری قرار گرفتند. نمونه‌های برگی در اتاقک مکعبی شکل بوسیله قارچ *Bgt* با نسبت ۵ اسپور در میلیمتر مربع آلوده شده و سپس در اتاقک رشدی قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته از آلوده‌سازی، تعداد کلنی رشد یافته در ۲/۵ سانتیمتر مربع از هر برگ شمارش گردید. بررسی‌ها نشان داد که تعداد کلنی رشد یافته در برگ گیاهان همزیست شده ۴۷ درصد نسبت به گیاهان شاهد کاهش(معنی‌دار) داشت (شکل ۵). این نتایج حاکی از آن است که مقاومت القاء شده توسط *P. indica* نقش مهمی در مقاومت گندم علیه سفیدک پودری و کاهش



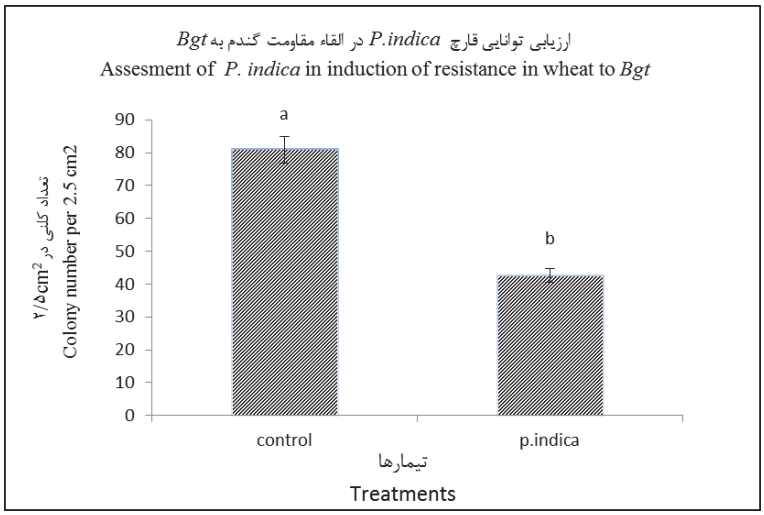
شکل ۴- محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی *Tef* روی ژل آگاروز ۱/۵٪ . قطعه دی ان ای ۱۶۰ جفت بازی مورد انتظار تنها در قارچ *Piriformospora indica* و گیاهان همزیست شده با قارچ قابل مشاهده است.

Fig.4. PCR product with *Tef* specific primers on 1.5% agarose gel. The expected 160 bp DNA band is observed only in *Piriformospora indica* and colonized plants .

پیشرفت بیماری ایفا می‌کند. اشتاین و همکاران (Stein *et al.* 2008) و والر و همکاران (Waller *et al.* 2005) نیز نتایج مشابهی را به ترتیب در آرابیدوپسیس و جو گزارش نمودند.

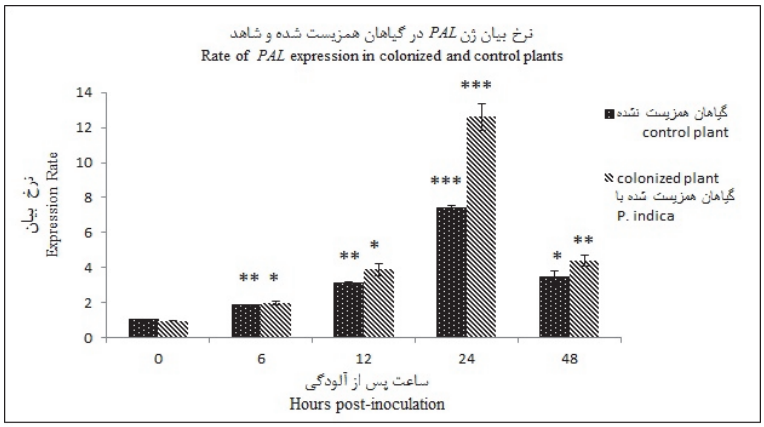
وضعیت الگوی بیان ژن فنیل آلانین آمونیالاز (*PAL*)

بررسی وضعیت الگوی بیان ژن فنیل آلانین آمونیالاز نشان داد که افزایش میزان بیان ژن *PAL* در گیاهان همزیست شده با *P. indica*، ۱۲ ساعت بعد از آلودگی با قارچ *Bgt* بطور معنی‌داری با گیاهان همزیست نشده متفاوت بود. بیشینه بیان ژن *PAL* در گیاهان شاهد و تیمار شده ۲۴ ساعت بعد از اعمال آلودگی به سفیدک پودری بود. نرخ بیان ژن *PAL* در این ساعت در گیاهان همزیست شده با *P. indica*، ۱۲/۵۹ برابر و در گیاهان همزیست



شکل ۵ - ارزیابی توانایی قارچ *Piriformospora indica* در القاء مقاومت در گندم به *Bgt* بر اساس تعداد کلنی‌های رشد یافته در $2/5\ cm^2$ از برگ گیاهان همزیست شده با *P.indica* و گیاهان همزیست نشده (control). مقایسه میانگین به روش LSD در سطح ٪۱

Fig 5- Assesment of *Piriformospora indica* ability in induction of resistance to *Bgt* in wheat, based on the colony number in 2.5 cm^2 of leaves in colonized plants with *P.indica* and noncolonized plants (control). Comparisons of means using LSD Test at 1%.



شکل ۶ - سطح بیان ژن *PAL* در گیاهان همزیست شده با *Piriformospora indica* و گیاهان همزیست نشده تحت آلودگی با *Bgt* و *= P value < 0/05 ، **= P value< 0/01 و ***= P value<0/001 در آزمون T student test

Fig.6. Expression levels of *PAL* gene in *Piriformospora indica* colonized and control plants in challenging with *Bgt* ,*= indicate P value<0/05 , **= indicate P value<0001 and *= indicate P value<0/001(T test).**

نشده ۷/۴ برابر نسبت به گیاهان شاهد مربوطه افزایش یافت. این اختلاف بین گیاهان همزیست شده و گیاهان شاهد معنی‌دار بود. همچنین مقایسه میزان بیان ژن *PAL* در هر دو گروه از این گیاهان در زمان اوج بیان نشان داد که در گیاهان تیمار شده با *P. indica* میزان رونوشت ژن *PAL* حدود ۱/۷ برابر بیشتر از گیاهان تیمار نشده بود (شکل ۶).

در بررسی های متعددی نقش ژن *PAL* به عنوان ژن دخیل در مقاومت با تاثیر مستقیم در افزایش تولید سالسیلیک اسید، فعال کردن ژن *NPR1* و به دنبال آن بیان

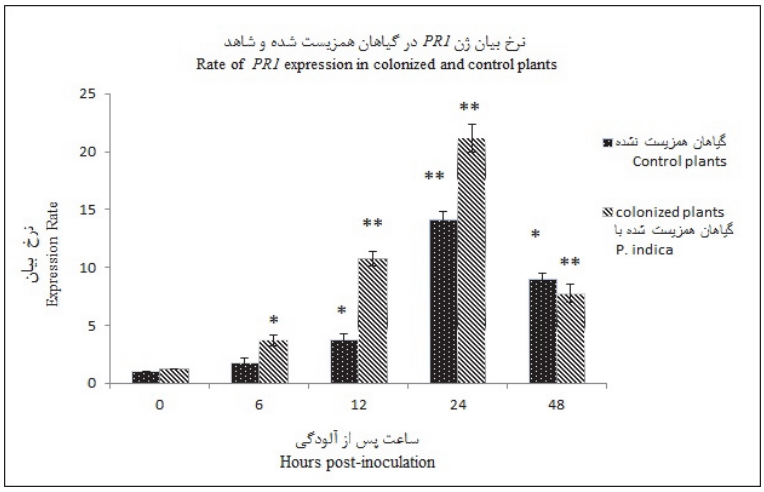
ژن های *PR* و نیز القای مرگ سریع سلولی (Shah *et al.* 1999, Rate *et al.* 2001, Fitzgerald *et al.* 2004) به اثبات رسیده است. *PAL* اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز منولیگنول و فنیل پروپانوئید می‌باشد (Bhuiyan *et al.* 2009). مسیر فنیل پروپانوئید که واحدهای منولیگنول را جهت ساخت لیگنین فراهم می‌کند بعد از آلودگی با بیمارگر یا الیسیتور به میزان زیادی افزایش می‌یابد تا با رسوب‌گذاری ترکیبات فنیل پروپاونوئیدی سبب تقویت دیواره سلولی شده و از نفوذ قارچ به بافت‌های گیاهی جلوگیری نماید (Jaeck *et al.* 1992). بررسی نتایج الگوی بیان ژن *PAL* حاکی از آن است که در گیاهان همزیست شده افزایش بیان ژن در ساعات اولیه (۱۲ ساعت) بعد از آلودگی، سبب القا سریعتر ژن های مقاومت در گیاه شده تا از نفوذ و رشد قارچ در سلول‌های گیاهی جلوگیری نماید و این افزایش بیان، ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بیشینه رونوشت خود رسید تا از توسعه بیشتر ریسه های قارچ در سلول‌های گیاهی جلوگیری نماید (Eichmann and Hückelhoven 2008). پس از آن بیان این ژن در ۴۸ ساعت پس از آلودگی روند کاهشی را نشان داد ولی این کاهش در گیاهان شاهد بیشتر از گیاهان همزیست شده بود. افزایش بیان ژن *PAL* در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی طی مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Koutaniemi *et al.* 2007, Bhuiyan *et al.* 2009). این افزایش بیان به دلیل تلاش لوله تندشی ثانویه (AGT) جهت نفوذ به سلول‌های میزبان در۲۴-۱۶ ساعت بعد از آلوده سازی می‌باشد (Collinge *et al.* 2002). نتایج بیانگر آن است که *P. indica* از طریق مکانیسم مقاومت سیستمیک سبب القاء بیان ژن *PAL* شده تا از گیاه در برابر خسارات ناشی از *Bgt* محافظت نماید.

وضعیت بیان ژن مرتبط با بیماری زایی 1b (*PR1b*)

Pathogenicity- related gene 1b

میزان بیان ژن *PR1* در ساعات اولیه (۶ساعت) پس از اعمال آلودگی با *Bgt* افزایش یافت بطوریکه گیاهان همزیست شده با *P. indica* با ۲ برابر افزایش بیان، اختلاف معنی‌داری را نسبت به گیاهان همزیست نشده نشان دادند. این افزایش بیان در ۱۲ ساعت پس از آلودگی در هر دو گروه از گیاهان به وضوح مشاهده شد، بطوری‌که گیاهان همزیست شده ۱۰/۹ برابر نسبت به زمان صفر افزایش بیان نشان دادند که این افزایش رونوشت در گیاهان همزیست نشده فقط حدود ۳/۷ برابر بود. بیشینه بیان در گیاهان شاهد و در گیاهان همزیست شده با *P. indica* ، ۲۴ ساعت پس از اعمال آلودگی بوده است. میزان رونوشت ژن *PR1* درگیاهان همزیست شده، ۲۱/۱۸ برابر و در گیاهان همزیست نشده ۱۴/۰۴ برابر نسبت به شاهد (زمان صفر) مربوطه افزایش یافت. مقایسه میزان رونوشت در زمان اوج بیان در گیاهان همزیست شده حدود ۱/۵ برابر گیاهان همزیست نشده بود (شکل ۷). پس از آن میزان رونوشت ژن *PR1* , ۴۸ ساعت بعد از آلودگی نسبت به ۲۴ ساعت روند کاهشی را نشان داد.

نقش ضد قارچی *PR1* در سیستم دفاعی گیاه تا حد بسیار زیادی پذیرفته شده است. بنابراین بیان ژن‌های *PR1* می‌تواند القاکننده فعالیت سیستم دفاعی گیاه باشد (Sels *et al.* 2008). افزایش بیان ژن *PR1* به عنوان یکی از نشانه‌های مقاومت غلات به بیماری سفیدک پودری شناخته شده است (Schulthesis *et al*. 2003). به نظر می‌رسد این پروتئین روی غشاء بیمارگر موثر باشد ولی مکانیسم دقیق ضد میکروبی آن مشخص نشده است (Van Loon and Van Strien 1999). فراوانی پروتئین‌های PR1 نشان دهنده این است که این پروتئین یک منشأ تکاملی



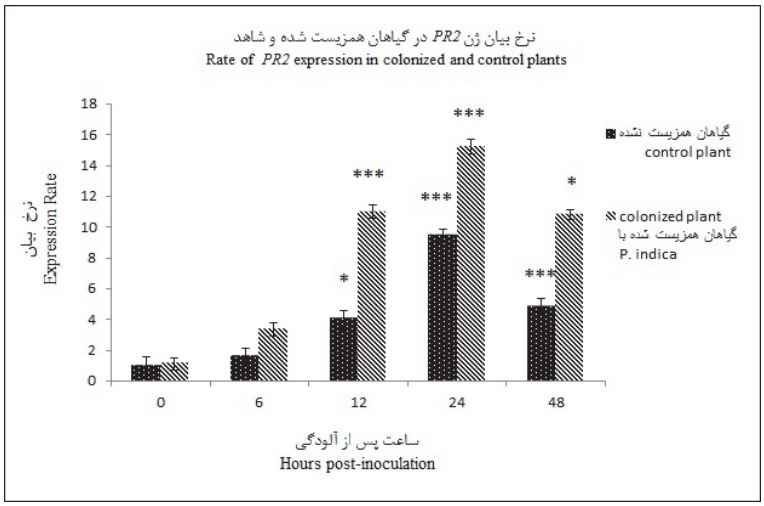
شکل ۷ – سطح بیان ژن *PR1* در گیاهان همزیست شده با *Piriformospora indica* و گیاهان همزیست نشده تحت آلودگی با *Bgt* و $P\ value < 0/05 = ^{*}$ ، $P\ value < 0/01 = ^{**}$ و $P\ value < 0/001 = ^{***}$ در آزمون T student test

Fig.7. Expression levels of *PR1* gene in *Piriformospora indica* colonized and control plants in challenging with *Bgt* ,*= indicate P value<0/05 , **= indicate P value<0001 and *= indicate P value<0/001(T test).**

داشته و دارای فعالیت ضروری در عملکرد و زندگی موجودات زنده است (Hernandez *et al*. 2005). بررسی الگوی بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با *P. indica*، نشان دهنده افزایش بیان در ۶ ساعت بعد از آلودگی با *Bgt* بود که میزان رونوشت در ۱۲ ساعت بعد از آلودگی نسبت به زمان ۶ ساعت حدود ۲/۹ برابر افزایش یافت و در زمان ۲۴ ساعت بعد از آلودگی به اوج میزان خود رسید. اگرچه بیشینه بیان ژن در هر دو گروه از گیاهان یکسان بوده است ولی ژن *PR1* در گیاهان همزیست شده در ۱۲ ساعت بعد از آلودگی به میزان زیاد و سریعتر در گیاه القا گردید. این افزایش سریع و بالای ژن دفاعی *PR1* جهت مقابله با تشکیل مکینه در زمان اوج حمله قارچ به سلول‌های گیاهی می‌باشد (Aist and Bushnell 1991 , Ellingboe 1972). افزایش بیان ژن *PR1* در اثر آلودگی و افزایش زودهنگام و بالای بیان این ژن در گیاهان همزیست شده، توسط مولیتور و همکاران (Molitor *et al*. 2011) و اشتاین و همکاران (Stein *et al*. 2008) و کویلیس و همکاران (Quilis *et al*. 2008) نیز گزارش شده است.

وضعیت الگوی بیان ژن *PR2*

تشریح وضعیت الگوی بیان ژن *PR2* حاکی از آن بود که در گیاهان همزیست شده با *P. indica*، و گیاهان همزیست نشده میزان رونوشت در ساعات اولیه (۶ ساعت) بعد از آلودگی شروع به افزایش یافت. بطوریکه در گیاهان همزیست شده میزان رونوشت ژن ۱/۹۳ برابر بیشتر از گیاهان همزیست نشده بود. این افزایش بیان ژن *PR2* در ساعات بعد از آلودگی با *Bgt*، افزایش چشمگیری داشت، به طوری که ۱۲ ساعت بعد از آلودگی، میزان رونوشت ژن در گیاهان همزیست شده با ۲/۰۵ برابر، اختلاف معنی‌داری را با گیاهان همزیست نشده نشان داد. بیشینه بیان ژن *PR2* در گیاهان همزیست نشده و گیاهان همزیست شده با *P. indica*، ۲۴ ساعت پس از آلودگی با *Bgt* بوده است. میزان بیشینه رونوشت در گیاهان همزیست شده ۱۹/۱۵ برابر و در گیاهان همزیست نشده ۱۱/۲۳ برابر نسبت به شاهد مربوطه افزایش یافت. مقایسه گیاهان شاهد با گیاهان همزیست شده در زمان اوج بیان نشان داد که



شکل ۸ - سطح بیان ژن *PR2* در گیاه همزیست شده با *Piriformospora indica* و گیاه همزیست نشده تحت آلودگی با *Bgt* و P value < 0/05=* ، P value< 0/01= و P value<0/001=*** در آزمون T student test**

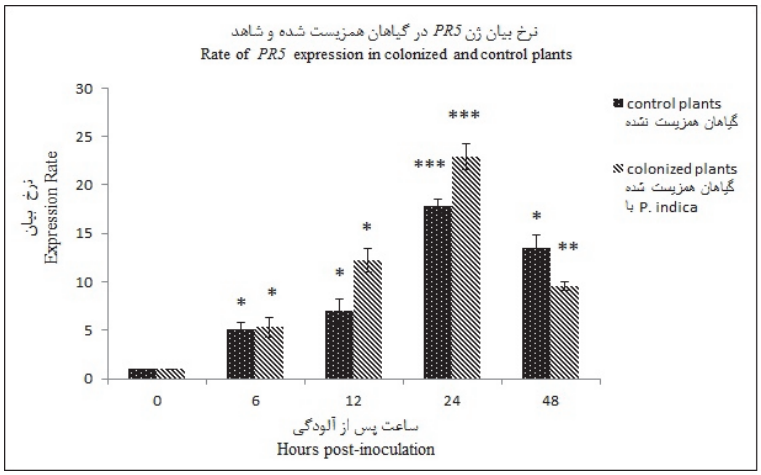
Fig.8. Expression levels of *PR2* gene in *Piriformospora indica* colonized and control plants in challenging with *Bgt* ,*= indicate P value<0/05 , **= indicate P value<0001 and *= indicate P value<0/001(T test).**

میزان رونوشت ژن *PR2* در گیاهان همزیست شده حدود ۱/۷ برابر بیشتر از گیاهان همزیست نشده بود (شکل ۸). بررسی الگوی بیان ژن *PR2* حاکی از آن بود که میزان رونوشت ژن در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی در هر دو گروه از گیاهان سیر نزولی را نشان داد.

نقش پروتئین *PR2* درمقاومت به بیماری های مختلف ثابت شده است. این آنزیم از طریق هضم بتا ۱،۳ دی گلیکوزیدیک موجود در بتا ۱،۳گلوکان که همراه با کیتین ساختمان اصلی دیواره سلولی قارچ‌ها را تشکیل می‌دهند، سبب تخریب این پلی‌ساکاریدها و در نهایت از بین رفتن قارچ‌ها می‌گردند (Simmons 1994). همچنین *PR2* پروتئینی است که در تشکیل پاپیلا در محل نفوذ قارچ نیز نقش دارد (Hu and Rijkenberg 1998). بررسی نتایج الگوی بیان ژن *PR2* حاکی از آن است که در گیاهان همزیست نشده این ژن با روند نسبتاً آرامی به بیشینه بیان خود رسید تا با نفوذ ریسه های قارچ در سلول‌های گیاه جلوگیری نماید. درحالیکه در گندم‌های همزیست شده با قارچ *P. indica*، بیان سریع و بالای ژن *PR2* در ساعات اولیه (۶ ساعت) بعد از آلودگی با *Bgt* مشاهده گردید که میزان آن در ساعات ۲۴-۱۲ ساعت بعد از آلودگی به بیشینه مقدار خود رسید، بطوریکه در گیاهان همزیست شده افزایش بیان ۲/۶ برابر، در ۱۲ ساعت نسبت به ۶ ساعت بعد از آلودگی بیانگر آن است که قارچ *P. indica* از طریق القا سریع و زودهنگام ژن *PR2* از گیاه در برابر خسارات ناشی از قارچ *Bgt* محافظت می‌نماید. افزایش بیان ژن *PR2* بعد از آلودگی طی مطالعات قبلی (Molitor 2006, Malnoy *et al.* 2007, Makandar *et al.* 2011) نیز تایید شده است.

وضعیت الگوی بیان ژن *PR5*

الگوی بیان ژن *PR5* حاکی از افزایش رونوشت ژن در ساعات اولیه (۶ساعت) پس از اعمال آلودگی با *Bgt* بود. بطوریکه میزان رونوشت در گیاهان همزیست شده با *P. indica* حدود ۵/۳ برابر و گیاهان همزیست نشده ۵ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت. این افزایش بیان در



شکل ۹ – سطح بیان ژن *PR5* در گیاهان همزیست شده با *Piriformospora indica* و گیاهان همزیست نشده تحت آلودگی با *Bgt* و * P value < 0/05 ، ** P value< 0/01 و *** P value<0/001 در آزمون T student test

Fig.9. Expression levels of *PR5* gene in *P. indica* colonized and control plants in challenging with *Bgt* ,*= indicate P value<0/05 , **= indicate P value<0001 and *= indicate P value<0/001(T test).**

ساعات بعدی نیز در هر دو گروه از گیاهان به وضوح مشاهده شد، بطوریکه گیاهان همزیست شده در ۱۲ ساعت بعد از آلودگی با افزایش ۱/۷۶ برابری اختلاف معنی‌داری را نسبت به گیاهان همزیست نشده نشان دادند. بیشینه بیان در گیاهان شاهد و در گیاهان همزیست شده با *P. indica* ، ۲۴ ساعت پس از اعمال آلودگی بود. میزان رونوشت ژن *PR5* درگیاهان همزیست شده، ۲۲/۸ برابر و در گیاهان شاهد ۱۷/۸ برابر نسبت به زمان صفر مربوطه افزایش یافت. مقایسه میزان رونوشت در زمان اوج بیان در گیاهان همزیست شده حدود ۱/۲۸ برابر گیاهان همزیست نشده بود (شکل ۹). میزان رونوشت ژن *PR5* , ۴۸ ساعت بعد از آلودگی نسبت به ۲۴ ساعت روند کاهشی را نشان داد.

پروتئین‌های متعلق به خانواده PR5 به دلیل شباهت توالی و ساختاری با پروتئین گیاه *Thaumatococcus daniellii* به پروتئین‌های شبه تاماتین هم معروف هستند (Linthorst 1991). این پروتئین رابطه نزدیکی با پروتئین-های پرماتین، اسموتین و زآماتین دارد. ایزوفرم‌های مختلف PR5 نقش‌های متنوعی مثل فعالیت‌های ضد قارچی و حفاظت در برابر استرس‌های غیر زیستی دارند (Hon *et al.* 1995 , Kononowicz *et al.* 1992). پروتئین‌های PR5 با ممانعت از رشد ریسه ، جوانه زدن اسپور و یا جلوگیری از توسعه ریسه تندشی در صورت جوانه زدن اسپور از رشد و توسعه قارچ در سلول میزبان جلوگیری می‌نمایند (Chan *et al.* , Xu and Reddy 1997 , 1999 Velazhahan *et al* . 1998). نتایج این بررسی نشان داد که بیان ژن *PR5* در گیاهان همزیست شده و شاهد روند صعودی را طی نمود و در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی به بالاترین میزان رونوشت خود رسید تا از نفوذ ریسه های قارچ در سلول‌های میزبان جلوگیری نماید و سپس در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی کاهش یافت. درحالیکه در گیاهان همزیست شده با قارچ *P. indica* ، افزایش سریع و بالای ژن *PR5* در ساعات اولیه (۱۲ ساعت) بعد از آلودگی مشاهده گردید. بطوریکه میزان رونوشت در ۱۲ ساعت بعد از آلودگی با افزایش ۲/۳ برابری نسبت به ساعت ۶ به میزان بالایی القاء گردید و در ۲۴ساعت به اوج میزان رونوشت خود رسید. این نتیجه بیانگر این است

که قارچ *P. indica* از طریق مکانیسم مقاومت سیستمیک سبب القاء سریع و زودهنگام ژن *PR5* در گیاه می‌گردد تا از میزبان در برابر خسارات ناشی از قارچ *Bgt* محافظت نماید. مولیتور و همکاران (Molitor *et al*. 2011) طی مطالعات خود در جوهای همزیست شده با *P.indica* افزایش بالایی از ژن *PR5* را تحت آلودگی با سفیدک سطحی پودری مشاهده نمودند. فیتزجرالد و همکاران (Fitzgerald *et al*. 2004) و زو و همکاران (Xu and Reddy 1997) نیز طی مطالعاتی فعالیت ضد قارچی *PR5* را در گیاه آرابیدوپسیس طی آلودگی با قارچ‌های ورتیسیلیوم و فوزاریوم مشاهده نمودند که با نتایج مطابقت داشت.

بررسی های محققان قبلی نشان داد که عوامل بیمارگر بیوتروف برای موفقیت در ایجاد بیماری نیاز به سلول های زنده میزبان داشته و پس از نفوذ نیز به کمک بعضی ازمواد و آنزیم‌ها، پاسخ‌های دخیل در مقاومت موجود در سلول ها و بافت‌های گیاهان میزبان تحت حمله را خنثی می‌کنند (Eichmann and Bindschedler *et al*. 2009, Spanu *et al*. 2010, Hückelhoven 2008, Hückelhoven *et al*. 1999). برعکس این پدیده درگیاهان مقاوم به عوامل بیوتروف، گیاه میزبان عمدتاً با مکانیسم‌های مرگ سریع سلولی، محکم کردن دیواره سلولی (تشکیل پاپیلا) در محل نفوذ بیمارگر و با افزایش تولید بعضی از پروتئین‌های ضد میکروبی مثل *PR proteins* از نفوذ و توسعه بیمارگر در خود جلوگیری می‌کنند (Glazebrook 2005, Van loon *et al*. 2006). *P.indica* از قارچ‌های اندوفیت است که از اثرات مثبت همزیستی آن القاء مکانیسم مقاومت در گیاه می‌باشد که سبب افزایش توان تحمل گیاه به استرس‌های زیستی و بیماری‌های مختلف می‌گردد. از آنجاییکه در مکانیسم مقاومت سیستمیک گیاه در برابر عوامل بیماریزا، میزان و سرعت بیان ژن‌های دفاعی نقش اساسی در مقاومت و کاهش خسارات ناشی از بیماری دارد. *P. indica* در راستای القاء مکانیسم مقاومت سیستمیک، در طی فاز نفوذ *Bgt* بیان سریع و زود هنگام ژن‌های دفاعی را در برگ‌های گیاهان همزیست شده القا می‌کند (Molitor *et al*. 2011). در این مطالعه بیشینه بیان ژن‌های *PR1*، *PR2*، *PR5* و *PAL* در گیاهان تیمار شده با قارچ مایکوریز *P. indica* و گیاهان بدون مایکوریز در ۲۴ ساعت پس از آلودگی با *Bgt* بود. ولی نتایج مطالعات بیانگر این است که پاسخ‌های دفاعی در گیاهان همزیست شده سریعتر از گیاهان بدون مایکوریز القا گردید. بطوریکه گیاهان همزیست شده با *P. indica*، بیان زودهنگام و بالایی از ژن‌های دفاعی را در ۶ ساعت به خصوص ۱۲ ساعت بعد از آلودگی با *Bgt*، نشان دادند که این افزایش بیان بر تشکیل مکینه در ۲۴-۱۶ ساعت بعد از آلودگی پیشی گرفت (Aist and Bushnell 1991). این نتیجه بیانگر اهمیت برقراری همزیستی گندم با قارچ *P. indica* در القاء مقاومت به بیماری سفیدک پودری می‌باشد. زیرا این قارچ میکوریز از طریق القاء مقاومت سیستمیک سبب بیان زود هنگام و سریع در گیاه شده تا با افزایش بیان ژن‌های *PR* و *PAL* سبب القا مقاومت در گیاه گردد. تمامی ژن‌های مورد بررسی ۴۸ ساعت بعد از آلودگی با *Bgt* روند کاهشی را نشان دادند که این نشان دهنده سرکوب شدن موثر آن‌ها بدنبال تشکیل مکینه می‌باشد (Bindschedler *et al*. 2009, Molitor *et al*. 2011, Spanu *et al*. 2010).

P. indica در غیاب بیمارگر سبب تغییر قابل ملاحظه‌ای در بیان ژن‌های مورد بررسی نسبت به گیاه شاهد نگردید ولی به محض آلودگی با *Bgt* بیان ژن‌ها را در همان ساعات اولیه بعد از آلودگی در گیاه همزیست شده

سریعاً القاء نمود. لذا نتایج این تحقیق نشان داد که قارچ *P. indica* با اثرات سیستمیک ماهرانه سبب آمادگی (Priming) گیاه در جهت افزایش سریع ژن‌های دفاعی به محض آلودگی به *Bgt* می‌شود. از آنجاییکه رونوشت ژن-های *PR* و *PAL* نیز برای پروتئین‌های ضد قارچی کد می‌گردند این می‌تواند نشان دهنده یک مکانیزم مسئول برای کاهش نفوذ *Bgt* در برگ گیاهان همزیست شده با *P. indica* باشد. کاهش تعداد کلنی در گیاهان همزیست شده نسبت به گیاهان شاهد نیز تایید کننده این مطلب می-باشد. لذا پیشنهاد می‌شود که امکان استفاده از قارچ همزیست *P. indica* جهت کاهش خسارت بیماری و کم نمودن آثار سوء استفاده از مواد شیمیایی در سطح مزرعه بررسی گردد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (۱۷۰-۱۷۲) متن انگلیسی مراجعه شود.