

ارزیابی نقش مسیرهای انتقال سیگنال فنیل پروپانوئید و اکتادکانوئید و برخی از ترکیبات دیواره سلولی مرتبط با دفاع در برهمکنش ارقام گندم با گونه‌های قارچ *Fusarium**

نیما خالدی^۱، پریسا طاهری^{۲*} و ماهرخ فلاحتی رستگار^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲۰)

چکیده

دو گونه قارچ *Fusarium culmorum* و *Fusarium graminearum* از عوامل اصلی بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم در جهان می‌باشند. در حال حاضر، اطلاعات محدودی در مورد مسیرهای سیگنالی دفاعی و مکانیسم‌های درگیر در مقاومت ارقام گندم علیه *Fusarium spp.* وجود دارد. دو آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (Phenyl alanine ammonia lyase; PAL) و لیپوکسیژناز (Lipoxygenase; LOX)، به‌عنوان نشانگرهای اصلی مسیرهای انتقال سیگنال فنیل پروپانوئید (phenylpropanoid) و اکتادکانوئید (octadecanoid)، ممکن است در واکنش‌های دفاعی در گیاهان نقش داشته باشند. در این پژوهش، فعالیت دو آنزیم PAL و LOX و بیان ژن‌های کدکننده آن‌ها و نیز تولید ترکیبات دفاعی نظیر مواد فنلی و لیگنین در برگ و خوشه دو رقم گندم حساس (فلات) و نسبتاً مقاوم (گاسکوژن) مایه‌زنی شده با دو گونه قارچ *F. culmorum* و *graminearum* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت این دو آنزیم و تولید ترکیبات فنلی و لیگنین در برگ و خوشه رقم گاسکوژن در مقایسه با رقم فلات بالاتر است. تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های PAL و LOX ارتباط مستقیم بین فعالیت آنزیم‌ها و بیان ژن‌های مربوطه را نشان داد. در اغلب زمان‌های مورد بررسی پس از مایه‌زنی، سطوح بالاتری از فعالیت آنزیم‌ها، بیان ژن‌ها و تولید ترکیبات فنلی و لیگنین در تعامل گندم با قارچ *F. culmorum* مشاهده شد. استفاده از مهارکننده‌های دو آنزیم PAL و LOX موجب افزایش توسعه بیماری در هر دو رقم شد. این نتایج اطلاعات جدیدی را درباره نقش بیوشیمیایی و مولکولی مسیرهای انتقال سیگنال فنیل پروپانوئید و اکتادکانوئید در مقاومت گندم در برابر گونه‌های قارچ *Fusarium* ارائه می‌دهد.

کلیدواژه: فنیل آلانین آمونیا لیاز، لیپوکسیژناز، مقاومت، *Fusarium culmorum*، *Fusarium graminearum*

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: p-taheri@um.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳. استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

Evaluating the role of phenylpropanoid and octadecanoid signal transduction pathways and some components of cell wall-associated defense in wheat cultivars- *Fusarium* species interaction *

N. Khaledi¹, P. Taheri^{2**}, and M. Falahati-Rastegar³

(Received: 16.5.2016; Accepted: 11.8.2017)

Abstract

Two species of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* are the main causal agents of wheat head blight worldwide. Currently, there is limited knowledge about the defense-signaling pathways and mechanisms involved in wheat cultivars basal resistance against *Fusarium* spp. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and lipoxygenase (LOX) enzymes, as main markers of phenylpropanoid and octadecanoid signal transduction pathways, may be involved in plant defense responses. In this research, the activity of two enzymes of PAL and LOX and expression of corresponding genes, also production of defense compounds such as phenolics and lignin were investigated in the leaves and spikes of susceptible (Falat) and partially resistant (Gaskozhen) wheat cultivars inoculated with two species of *F. graminearum* and *F. culmorum*. The results of this study showed that the activity of these two enzymes and production of phenolic compounds and lignin in leaves and spikes of Gaskozhen cultivar was higher than Falat. Expression analysis of the PAL and LOX genes revealed a direct correlation between enzymes activity and expression of the corresponding genes. In most of the studied times after inoculation, higher levels of enzymes activity, gene expression and phenolics and lignin production were observed in wheat-*F. culmorum* interaction. Application of PAL and LOX inhibitors increased disease development in both cultivars. These results provide novel information about the biochemical and molecular role of phenylpropanoid and octadecanoid signal transduction pathways in resistance of wheat against *Fusarium* spp.

Keywords: *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, Lipoxygenase, Phenylalanine ammonia lyase, Resistance

* Part of Ph.D. Thesis of The First Author Submitted to Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

**Corresponding author's E-mail: p-taheri@um.ac.ir

1. PhD Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

مقدمه

گیاهان برای مقابله با تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی ممکن است از استراتژی‌های تکامل‌یافته و پیچیده‌ای از جمله شناسایی بیمارگر، فعال‌سازی مسیرهای انتقال سیگنال و تولید پروتئین‌ها و متابولیت‌های با نقش‌های مختلف دفاعی استفاده کنند (Adom & Liu, 2002). پس از شناسایی بیمارگر توسط میزبان، پاسخ‌های دفاعی پایه منجر به فعال شدن چندین مکانیسم مقاومت از جمله تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) (Motallebi et al. 2008; Desmond et al. 2015b; al. 2015b)، آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی (Motallebi et al. 2015a; Zhang et al. 2012; Gherbawy et al. 2012; et al. 2015)، هورمون‌های گیاهی مانند اسید سالیسیلیک (SA)، جاسمونیک اسید (JA)، اتیلن (ET)، آبسزیک اسید و اکسین (Pieterse et al. 2009; al. 2012; Pieterse et al. 2009) تقویت دیواره سلولی گیاه از طریق تولید ترکیبات فنلی (Siranidou et al. 2011; Bollina & Kushalappa 2002; Kang et al., 2008) و لیگنین (Ellinger et al. 2014) می‌شوند.

فعال‌سازی مسیرهای سیگنالی دفاعی با توجه به شیوه زندگی بیمارگر، برای اطمینان از پاسخ دفاعی مناسب و مؤثر با تداخل مثبت یا منفی بین مسیرهای مختلف تنظیم می‌شود (Glazebrook 2005). در حالیکه SA در دفاع فعال علیه بیمارگرهای بیوتروف و همی بیوتروف نقش دارد، JA و ET عمدتاً در دفاع علیه بیمارگرهای نکروتروف و حشرات جونده حائز اهمیت می‌باشند (Petti et al. 2008; Spoel & Dong 2012; et al. 2012).

جاسمونیک اسید و مشتقات آن (Farmer et al. 2003)، از طریق مسیر اکتادکانوئید از اکسیداسیون اولیه اسید لینولنیک غشاء کلروپلاست توسط آنزیم لیپوکسیژناز (LOX) در گیاهان آزاد می‌شوند (Balbi & Devoto

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله (Fusarium head blight) که توسط گونه‌های مختلف قارچ فوزاریوم به‌ویژه دو گونه *F. culmorum* و *Fusarium graminearum* ایجاد می‌شود، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های غلات دانه‌ریز در مناطق گرم و مرطوب جهان به‌شمار می‌رود (Nicholson et al. 1998; Parry et al. 1995). این بیماری علاوه بر کاهش قابل توجه عملکرد محصول، از طریق تولید میکوتوکسین‌های مختلف از جمله دی‌اکسی-نیوالنول (deoxynivalenol)، نیوالنول (nivalenol) و زرالنون (zearalenone) کیفیت دانه را نیز کاهش می‌دهد (Pasquali & Migheli 2014; Pasquali et al. 2010).

در ایران این بیماری علاوه بر آنکه در شمال ایران به صورت بومی وجود دارد، از برخی نقاط دیگر یعنی هرمزگان، اردبیل (دشت مغان)، فارس و خوزستان نیز گزارش شده است (Bernusi et al. 2002; Malhipoor et al. 2000; Golzar 1989; al. 2000). خسارت ناشی از این بیماری در مزارع گندم ایران از ۳۰ تا ۷۰ درصد برآورد شده است (Malhipoor et al. 2000).

تاکنون روش‌های مختلفی که جهت کنترل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله استفاده شده، چندان مؤثر نبوده است. بیش‌تر محققین عقیده دارند که بهترین راه مقابله درازمدت با این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل به بیماری و با صفات زراعی برتر است. به هر حال مقاومت کامل به این بیماری در هیچ رقمی از گندم دیده نشده است و در صورت مساعد بودن شرایط جوی (دما و رطوبت) برای توسعه بیماری، وجود زادمایه قارچ عامل بیماری و کشت ارقام حساس، کنترل این بیماری ممکن است بسیار مشکل باشد.

مهمی در کنترل آلودگی به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله در گندم دارد (Makandar et al. 2012; Ding et al., 2011; Li & Yen 2008). بر اساس گزارش‌های قبلی و مطالعات ریزآرایه‌ها نشان داده است که فعالیت و بیان ژن‌های گندم دخیل در متابولیسم اکسی‌لیپین‌های حاصل از مسیر اکتادکانوئید شامل ژن‌های *LOX* در سنبله گندم آلوده به *F. graminearum* در مراحل مختلف فرآیند آلودگی گیاه تغییر می‌کند (Nalam et al. 2015; Sorahinobar et al. 2015; Motallebi et al. 2015b; Beccari et al. 2015; Li & Yen 2008). ترکیبات فنلی و لیگنین نیز به‌عنوان عامل مقاومت گندم در برابر بیماری بلایت فوزاریومی سنبله نقش دارند (Lionetti et al. 2015; Gunnaiah & Kushalappa 2014; Forrer et al. 2014; Purwar et al. 2013).

با وجود اهمیت اقتصادی بیماری بلایت فوزاریومی سنبله و خطرات بهداشتی میکوتوکسین‌های حاصل از آن در گندم، اطلاعات ما از پاسخ‌های دفاعی گندم در برابر قارچ‌های عامل این بیماری محدود است. پژوهش حاضر به‌منظور درک برخی مکانیسم‌های بیوشیمیایی و مولکولی دخیل در مقاومت دو رقم گندم در برابر دو گونه قارچ *Fusarium* عامل این بیماری انجام شد. هدف از این مطالعه (۱) تعیین نقش مسیرهای اکتادکانوئید و فنیل پروپانوئید دو رقم گندم مورد مطالعه در برابر دو گونه قارچ *Fusarium* عامل بیماری و (۲) بررسی و مقایسه میزان تولید لیگنین و محتوای فنل کل محلول و نامحلول در دو رقم گندم مایه‌زنی شده با دو گونه قارچ گفته شده در بالا در مراحل مختلف رشد گیاه و زمان‌های مختلف پس از آلودگی به بیمارگرها بود.

LOX آنزیم حیاتی در مکانیسم‌های دفاعی پایه است و می‌تواند مولکول‌های سیگنالی را تولید کند که به تنظیم بیوستتر JA کمک کند. گیاهان همچنین قادر به فعال‌سازی تولید و تجمع ترکیبات دفاعی مختلف مشتق شده از مسیر فنیل پروپانوئید برای کنترل نفوذ و گسترش بیمارگرها هستند (Fraser & Chapple 2011; Vogt 2010). ترکیبات فنیل پروپانوئید به‌دست‌آمده از مسیر اسید شیکمیک شامل ترکیبات فنلی، لیگنین، فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، آنتوسیانین، تانن، کومارین‌ها، استیلین‌ها و غیره می‌باشند (Vogt 2010). فنیل آلانین آمونیاک‌لیاز (PAL) یک آنزیم کلیدی در مسیر فنیل پروپانوئید است که با دامیناسیون غیر اکسیداتیو آمینواسید L- فنیل آلانین، آن را به شکل ترانس سینامیک اسید و یک یون آمونیوم آزاد تبدیل می‌کند (Bagal et al. 2012; Vogt 2010). افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر فنیل پروپانوئید منجر به افزایش تولید لیگنین در سلول‌های گیاه می‌شود. لیگنین ترکیب پیچیده فنلی موجود در دیواره سلولی است که از پلیمریزاسیون اکسیداتیو مونولیگنول‌ها حاصل می‌شود (Wang et al. 2013). بیوستتر و رسوب لیگنین در سلول‌های گیاهی یک استراتژی دفاعی مهم و اصلی است که یک مانع فیزیکی را در برابر پیشرفت اولیه عوامل بیماری‌زا در بافت‌های آلوده فراهم می‌کند (Purwar et al. 2009; Bhuiyan et al. 2013). ترکیبات فنلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت غیر آنزیمی با توجه به در دسترس بودن هیدروژن فنلی خود ممکن است به کالوز، پروتئین‌ها و پلی ساکاریدهای دیواره‌های سلولی متصل شوند به‌طوری که موجب مهار نفوذ بیمارگر و محدود شدن جذب مواد مغذی توسط آن می‌گردند (Boutigny et al. 2009, 2010).

طبق گزارش‌های محققان مسیر انتقال سیگنال JA نقش

مواد و روش‌ها

ارقام گندم مورد استفاده و کشت بذرها در گلخانه

برای انجام تحقیق حاضر دو رقم گندم فلات و گاسکوژن به ترتیب به عنوان ارقام حساس و نسبتاً مقاوم دارای مقاومت نوع دو در برابر بیماری (Sorahinobar *et al.* 2015; Motallebi *et al.* 2015b; Soltanloo *et al.* 2011) از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی واقع در مشهد، ایران تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفتند. پس از ضدعفونی بذرها با محلول یک در صد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱ دقیقه آن‌ها را با آب مقطر استریل چند بار شستشو و به مدت ۵ روز در انکوباتور بر روی کاغذ صافی استریل مرطوب در دمای 25°C قرار دادیم. بذور جوانه‌زده در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۵ سانتی‌متر حاوی خاکی که در 121°C به مدت ۳۰ دقیقه در فشار ۱۰۰ کیلو پاسکال (PSI ۱۵) در ۲ روز متوالی اتوکلاو شده بود، در گلخانه در شرایط دمایی $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. خاک مورد استفاده در این آزمایش، ترکیبی از خاک رس، ماسه و کود دامی به نسبت حجمی ۱:۲:۱ بود.

جدایه‌های قارچ و تهیه مایه تلقیح

جدایه‌های FHI از *F. graminearum* و FH9 از *F. culmorum* از کلکسیون آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. این دو جدایه قبلاً از خوشه‌های گندم آلوده تهیه شده از مزارع گندم استان گلستان به دست آمده و ضمن شناسایی آن‌ها به روش مورفولوژیکی و مولکولی، بیماری‌زایی آن‌ها بر روی رقم حساس فلات نیز اثبات شده بود. جدایه‌ها در دمای 25°C با چرخه متناوب از ۱۲ ساعت نور/تاریکی

بر روی محیط کشت آگار سیب‌زمینی دکستروز (Potato Dextrose Agar; PDA) کشت شده و مایه تلقیح قارچ به ترتیب در محیط مایع ماش (Mung Bean Broth; MBB) و محیط مصنوعی مغذی آگار (Synthetic Nutrient Agar; SNA) با استفاده از روش شرح داده‌شده توسط ژانگ و همکاران (Zhang *et al.* 2013) و کخا و همکاران (Kocha *et al.* 2013) تهیه شد. سوسپانسیون اسپورها در غلظت $10^8 \times 1$ اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ تهیه شد و برای مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفت.

مایه‌زنی گیاهان و نمونه‌برداری

مایه‌زنی جدایه‌ها بر روی برگ گیاهچه ۴ هفته‌ای و خوشه گندم در مرحله گلدهی به ترتیب اسپری کردن سوسپانسیون اسپور قارچهای بیمارگر و به روش شرح داده‌شده توسط یوشیدا و همکاران (Yoshida *et al.* 2007) و شین و همکاران (Shin *et al.* 2014) انجام شد. نمونه‌برداری از گیاهچه ۴ هفته‌ای، در ساعت‌های مختلف پس از مایه‌زنی انجام شد. همچنین نمونه‌برداری از خوشه گندم در مرحله گلدهی (Anthesis) ۳ روز پس از مایه‌زنی، شیری شدن (Milk)، خمیری شدن (Dough) و رسیدگی کامل (Ripening) انجام شد. نمونه‌ها در فریزر با دمای 20°C - نگهداری و جهت بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی تغییرات میزان لیگنین، ترکیبات فنلی و میزان کل پروتئین

استخراج و ارزیابی تغییرات میزان لیگنین در بافت برگ و خوشه گندم با استفاده از روش سوزوکی و همکاران (Suzuki *et al.* 2009) انجام شد. ارزیابی محتوای فنلی

روش طاهری و طریقی (Taheri & Tarighi 2011) استفاده شد. برای این منظور، قطعات برگی دو ساعت قبل از تلقیح با مهارکننده‌های اختصاصی PAL در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار آلفا-آمینوآکسی-بتا-فنیل پروپیونیک اسید (α -aminooxy- β -phenylpropionic acid; AOPP) و LOX در غلظت ۲۰ میکرو مولار ۵،۸،۱۱،۱۴-ایکوساتترانوئیک اسید (5,8,11,14-eicosatetraenoic acid; ETYA) تیمار شدند. برای حل کردن AOPP و ETYA از محلول آب همراه متانول استفاده شده و جهت اطمینان از عدم تأثیر متانول در شاخص بیماریزایی در نمونه‌های کنترل همان حجم متانول به آب مقطر اضافه شد. علائم بیماری ۷ روز پس از آلودگی مورد بررسی قرار گرفت و شاخص بیماریزایی محاسبه شد (Taheri & Tarighi 2010). هر تیمار دارای چهار تکرار در هر بار انجام آزمایش بود و آزمایش دو بار تکرار شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با رونویسی معکوس

استخراج RNA از بافت برگ و خوشه ارقام فلات و گاسکوژن با استفاده از معرف تریزول (TRI Reagent[®], Sigma Aldrich) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از آن، تیمار نمونه‌ها با RNase-Free DNase Set (Dena Zist, Mashhad, Iran) به منظور حذف DNA از نمونه‌های RNA انجام شده و میزان RNA در هر نمونه به وسیله اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت نمونه‌های RNA در ژل آگارز یک درصد بررسی شد. سپس DNA مکمل با استفاده از آغازگر oligo(dT)₁₈ و آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase (Cinnagen, Iran) تهیه گردید. مخلوط واکنش ۲۵ میکرو لیتر شامل ۵ میکرو لیتر از cDNA، ۱۳/۵ میکرو لیتر آب، ۲/۵ میکرو

کل محلول و نامحلول در برگ و خوشه ارقام فلات و گاسکوژن به ترتیب به روش دی‌اسنسائو و دابری (De Ascensao & Dubery 2003) و هکانن و همکاران (Hukkanen et al. 2007) و ارزیابی مقدار آنها بر اساس تغییر رنگ عصاره فنلی توسط معرف فولین (Li et al. 2007) انجام شد. ارزیابی میزان کل پروتئین موجود در عصاره برگ و خوشه ارقام گندم فلات و گاسکوژن مورد آزمایش با استفاده از روش برادفورد (Bradford 2007) انجام شد. هر تیمار دارای چهار تکرار در هر بار انجام آزمایش بود و آزمایش دو بار تکرار شد.

ارزیابی میزان فنیل آلانین آمونیاکاز (PAL) و لپوکسیژناز (LOX)

بررسی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاکاز در برگ و خوشه ارقام فلات و گاسکوژن، به عنوان آنزیم تبدیل‌کننده L-فنیل آلانین به اسید ترانس سینامیک، با استفاده از روش شرح داده شده توسط دیکرسون و همکاران (Dickerson et al. 1984) در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام شد. ارزیابی فعالیت آنزیم لپوکسیژناز در این بررسی نیز به روش دودرر و همکاران (Doderer et al. 1992) بر پایه افزایش جذب در ۲۳۴ نانومتر در اثر ترکیب دیان‌های تشکیل شده ناشی از اکسیداسیون لینولئیک اسید در حضور آنزیم لپوکسیژناز انجام شد. هر تیمار دارای چهار تکرار در هر بار انجام آزمایش بود و آزمایش دو بار تکرار شد.

بررسی نقش مسیر فنیل پروپانوئید و اکتادکانوئید در مقاومت گندم در برابر بیماری

برای تعیین نقش مسیرهای فنیل پروپانوئید و اکتادکانوئید در تعامل ارقام گندم با گونه‌های *Fusarium* از مهارکننده‌های آنزیم‌های کلیدی PAL و LOX با توجه به

جدول ۱. ارزیابی بیماری ناشی از جدایه‌های *Fusarium spp.* بر روی خوشه و برگ ارقام گندم

Table 1. Evaluation of the disease caused by *Fusarium spp.* on the spike and leaf of wheat cultivars.

Isolate	Cultivar	Lesions length (mm)	FHB index
<i>Fusarium graminearum</i> FH1	Falat	39±1.1 a	69.3±0.3 a
	Gaskozhen	26.1±1.5 c	19.7±0.2 c
FH9 <i>Fusarium culmorum</i>	Falat	31±0.9 b	42.5±0.6 b
	Gaskozhen	18.2±0.5 d	15.7±0.8 d

FHB index: Fusarium head blight index

Average ± standard error,

Different letters indicate significant differences according to Duncan analysis using SPSS software (P = 0.05), each experiment was repeated two times with similar results

استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 23) و بر اساس آنالیز غیر پارامتریک و آزمون مقایسه‌ای Mann-Whitney در سطح $P = 0.05$ انجام شد. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 استفاده گردید.

نتایج

مقایسه داده‌های به دست آمده از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *Fusarium spp.* روی برگ و خوشه گندم در گلخانه نشان داد که گونه‌های مختلف مورد بررسی بیماری‌زایی متفاوتی دارند. کمترین میزان طول زخم برگ به میزان $18/2 \pm 0/5$ میلی‌متر و بیماری‌زایی خوشه به میزان $15/7 \pm 0/8$ روی رقم گاسکوژن مربوط به جدایه *F. culmorum* FH9 بود. همچنین جدایه *F. graminearum* FH1 موجب بیشترین میزان طول زخم برگ و بیماری‌زایی خوشه گندم به ترتیب به میزان $69/3 \pm 0/3$ میلی‌متر و $39 \pm 1/1$ در رقم فلات شد (جدول ۱).

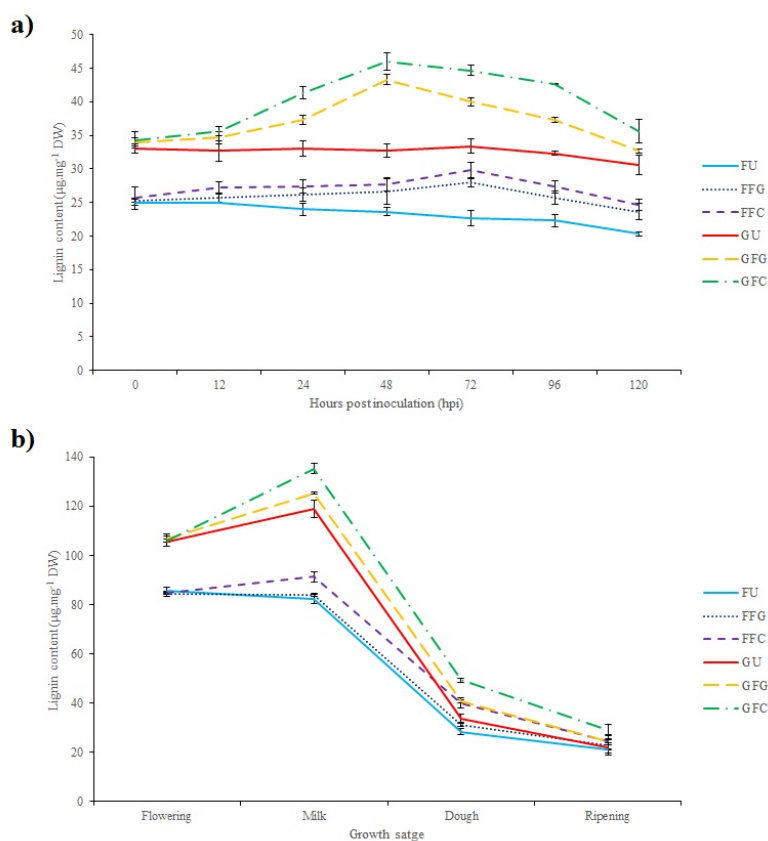
ارزیابی تغییرات میزان لیگنین

نتایج این بررسی نشان داد که در برگ‌های آلوده رقم گاسکوژن، تولید لیگنین (lignification) ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی به حداکثر مقدار خود رسید و پس از آن روند

لیتر بافر، ۱ میکرو لیتر $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرو لیتر dNTP، ۱ میکرو لیتر آغازگر روبه جلو (۰/۰۳ میلی مول)، ۱ میکرو لیتر آغازگر برگشتی (۰/۰۳ میلی مول) و ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم Taq DNA polymerase بود. در مرحله بعد آغازگرهای اختصاصی PAL (ژن *Wpalt1*؛ شماره دسترسی: *Coram et al.* 2008؛ CK163994)، *LOX* (ژن *LPX-2*؛ شماره دسترسی: *Beccari et al.* CN009858.1؛ 2011) و اکتین به‌عنوان ژن کنترل (شماره دسترسی: *Ji et al.* 2011؛ KC775780.1) مورد بررسی قرار گرفتند. اختصاصی بودن هر آغازگر برای بررسی بیان ژن مربوطه به‌وسیله انجام آنالیز BLAST در NCBI مورد تأیید قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای $95^\circ C$ ، سپس ۴۰ سیکل در مرحله واسرشت ۱۵ ثانیه در $95^\circ C$ ، مرحله اتصال (برای *PAL*: ۳۰ ثانیه در $59^\circ C$ ، برای *LOX*: ۲۰ ثانیه در $60^\circ C$ و برای اکتین: ۳۰ ثانیه در $58^\circ C$) و مرحله گسترش در $72^\circ C$ (برای *PAL*: ۳۰ ثانیه، برای *LOX*: ۲۰ ثانیه و برای اکتین: ۴۵ ثانیه) و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای $72^\circ C$ بود.

محاسبات آماری

آنالیز آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف با



شکل ۱. سطوح لیگنین در برگ (a) و خوشه‌های (b) ارقام گندم در زمان‌های مختلف بعد از آلودگی با جدایه‌های *Fusarium spp.* میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد ارائه شده‌اند. آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد. اختصارات تمامی اشکال: GFG، گاسکوژن آلوده با *F. graminearum*؛ GFC، گاسکوژن آلوده با *F. culmorum*؛ FFG، فالات آلوده با *F. graminearum*؛ FFC، فالات آلوده با *F. culmorum*؛ GU، فلات آلوده با *F. graminearum*؛ FU، فلات آلوده با *F. culmorum*؛ FFG؛ - - - FFC؛ ——— GU؛ ——— GFG؛ - · - GFC

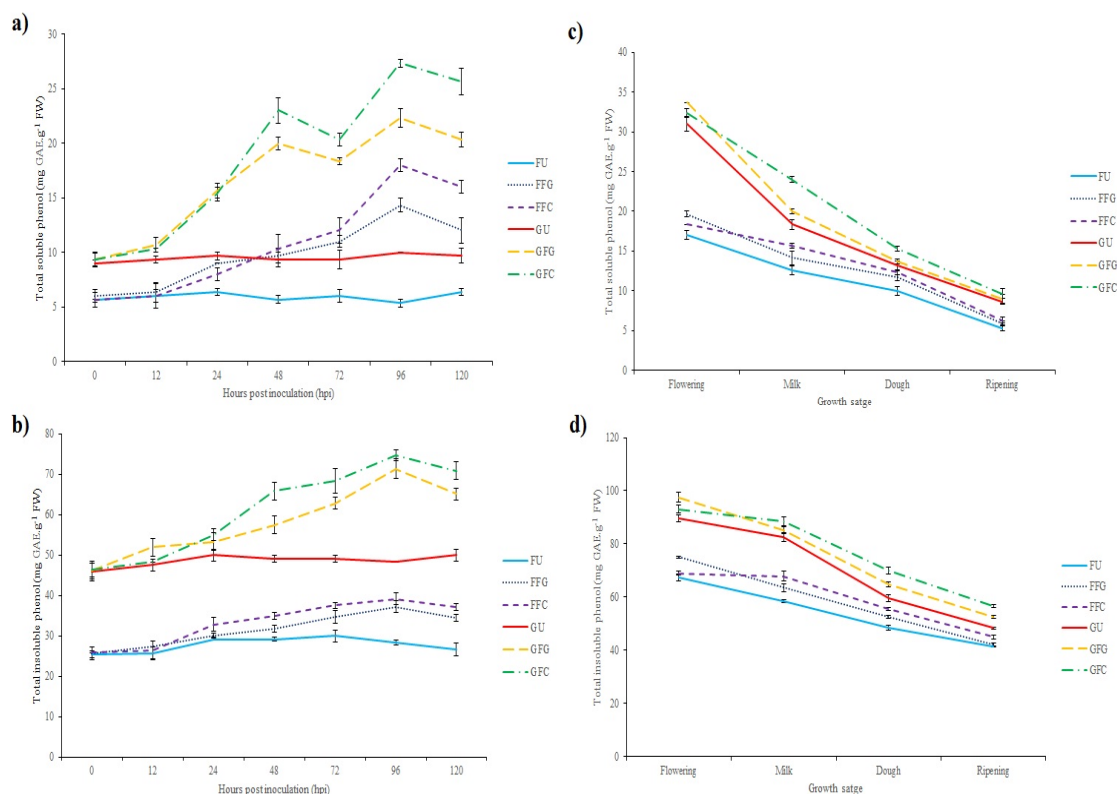
Figure 1. Lignin levels in leaves (a) and spikes (b) of wheat cultivars at various time points after inoculation with *Fusarium spp.* Data are means \pm standard error. The experiment was repeated two times with similar results. Abbreviations in all figures: GFG, Gaskozhen inoculated by *F. graminearum*; GFC, Gaskozhen inoculated by *F. culmorum*; FFG, Falat inoculated by *F. graminearum*; and FFC, Falat inoculated by *F. culmorum*. ——— FU; FFG; - - - FFC; ——— GU; ——— GFG; - · - GFC.

با *F. graminearum* یا تعامل رقم فلات مایه‌زنی شده با هر دو گونه قارچ بود (شکل ۱).

بررسی محتوای فنلی کل محلول و نامحلول

نتایج نشان داد که در میزان کل ترکیبات فنلی بین ارقام نسبتاً مقاوم و حساس، تحت شرایط غیر آلوده و آلوده تفاوت وجود دارد. در برگ‌های آلوده رقم گاسکوژن و فلات، میزان فنل کل محلول بالاتر از گیاهان غیر آلوده در

کاهشی داشت. برعکس، در گیاهان فلات مایه‌زنی شده با قارچ‌های مذکور، میزان تجمع لیگنین در برگ‌ها با اندکی تأخیر (۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی) با میزانی کمتر مشاهده شد (شکل ۱a). در خوشه گندم نیز افزایش سطوح لیگنین در گیاهان آلوده به هریک از گونه‌های قارچ بیمارگر نسبت به گیاهان سالم شد (شکل ۱b). در کل، میزان لیگنین تولید شده در برگ و خوشه گندم در تعامل رقم گاسکوژن با گونه *F. culmorum* بالاتر از تعامل این رقم



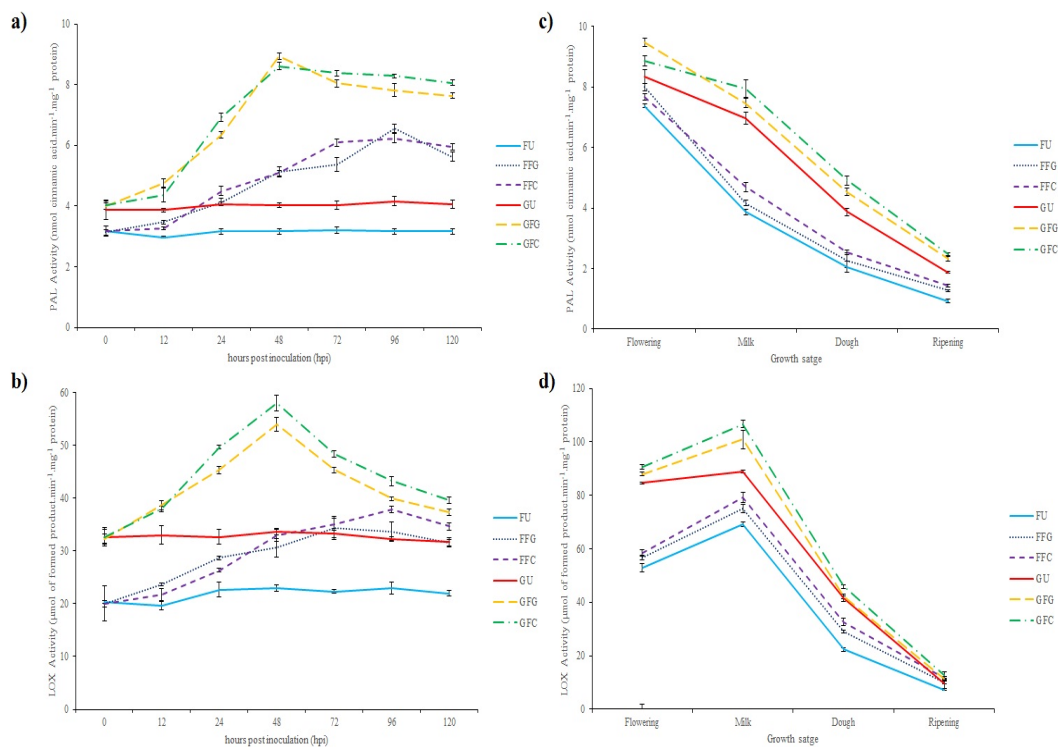
شکل ۲. میزان فنل کل محلول (a و c) و نامحلول فنل در برگ و خوشه ارقام گندم در زمان‌های مختلف بعد از آلودگی با جدایه های *Fusarium spp.* میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد ارائه شده‌اند. آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد. — FU؛ FFG؛ - - - FFC؛ — GU؛ - - - GFG؛ - - - GFC؛

Figure 2. Total soluble phenolics (a and c) and insoluble phenolic content (b and d) in leaves and spikes of wheat cultivars at various time points after inoculation with *Fusarium spp.* Data are means \pm standard error. The experiment was repeated two times with similar results. — FU; FFG; - - - FFC; — GU; - - - GFG; - - - GFC.

از آن کاهش یافت. تولید ترکیبات فنلی محدود به دیوار سلولی پس از آلودگی در رقم گاسکوژن به حداکثر میزان خود در ۹۶ ساعت پس از آلودگی رسید، به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از رقم فلات بود (شکل ۲b). در هر دو رقم، ترکیبات فنلی پس از آلودگی با جدایه های *Fusarium spp.* در مرحله گلدهی کمی افزایش و پس از آن کاهش یافت، اما هنوز هم بالاتر از گیاهان غیر آلوده بود (شکل ۲c و ۲d). به‌طور کلی، در اغلب زمان‌های مورد بررسی پس از آلودگی گیاه سطوح بالاتری از ترکیبات فنلی در تعامل رقم گاسکوژن با *F. culmorum* در مقایسه

تمام زمان‌های مورد بررسی بود. تجمع فنل کل محلول در رقم گاسکوژن در ۴۸ ساعت پس از آلودگی به‌عنوان اولین اوج تشخیص داده شد. پس از آن، نرخ ترکیبات فنل کل محلول تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی در این رقم کاهش یافت و به دنبال آن اوج دوم در ۹۶ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد. در برگ‌های آلوده رقم فلات، میزان این ترکیبات تا ۹۶ ساعت پس از آلودگی افزایش و پس از آن کاهش یافت (شکل ۲a).

در برگ‌های آلوده هر دو رقم مشاهده شد که میزان فنل نامحلول تا ۹۶ ساعت پس از آلودگی افزایش داشته و پس



شکل ۳. فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیلایز (PAL; a و c) و لیپوکسیژناز (LOX; b و d) در برگ و خوشه ارقام گندم در زمان‌های مختلف بعد از آلودگی با جدایه های *Fusarium spp.* میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد ارائه شده‌اند، آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد. — FU; FFG; - - - FFC; — GU; - - - GFG; - - - GFC.

Figure 3. The activity of Phenylalanine ammonia lyase (PAL; a and c) and Lipoxygenase (LOX; b and d) in leaves (a) and spikes (b) of wheat cultivars at various time points after inoculation with *Fusarium spp.* isolates. Data are means \pm standard error. The experiment was repeated two times with similar results. — FU; FFG; - - - FFC; — GU; - - - GFG; - - - GFC.

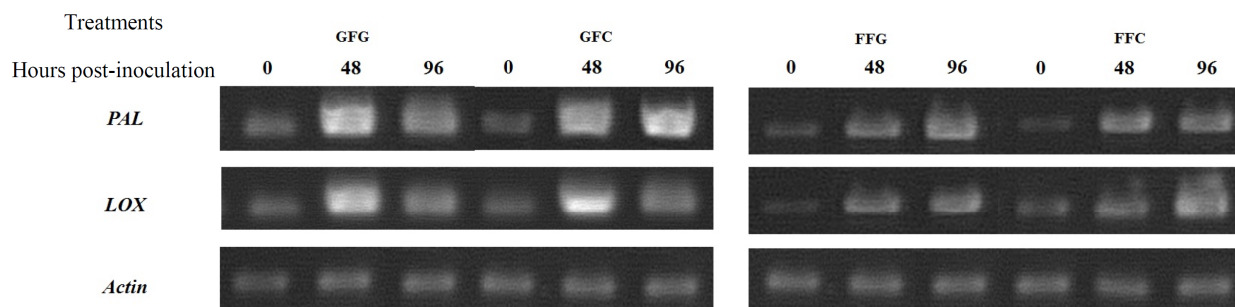
دنبال آن، بعد از ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی به ترتیب در رقم گاسکوژن و فلات کاهش یافت (شکل ۳a). در ۴۸ ساعت پس از آلودگی، سطح بالایی از فعالیت LOX در رقم گاسکوژن مایه‌زنی در مقایسه با رقم فلات مشاهده شد. فعالیت LOX در رقم فلات در مقایسه با رقم گاسکوژن، تا حد پایین‌تر و با تأخیر افزایش یافت و در ۹۶ ساعت پس از آلودگی به حداکثر میزان خود رسید (شکل ۳b).

در مرحله خوشه‌دهی، فعالیت PAL کمی پس از آلودگی، ۳ روز پس از مایه‌زنی با جدایه های *Fusarium spp.* در مرحله گلدهی در بیشترین حد بود و سپس

با سایر نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد (شکل ۳).

بررسی فعالیت آنزیمی و بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیلایز و لیپوکسیژناز

فعالیت آنزیم‌های PAL و LOX در برگ و خوشه ارقام گندم برای ارزیابی نقش این آنزیم‌ها در مقاومت ارقام گندم علیه *F. culmorum* و *F. graminearum* مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله گیاهچه‌ای، فعالیت PAL و LOX در گیاهان آلوده نسبت گیاهان غیر آلوده پس از آلودگی افزایش یافت (شکل ۳a و ۳b). فعالیت PAL پس از آلودگی با جدایه های *Fusarium spp.* افزایش و به



شکل ۴. بررسی بیان ژن‌های *LOX*، *PAL* و اکتین در طی تعامل ارقام گاسکوژن و فلات گندم با گونه‌های *Fusarium spp.* با استفاده از روش RT-PCR

Figure 4. Expression of *PAL*, *LOX* and *actin* genes in Gaskozhen and Falat wheat cultivars during interaction with *Fusarium spp.* using RT-PCR method.

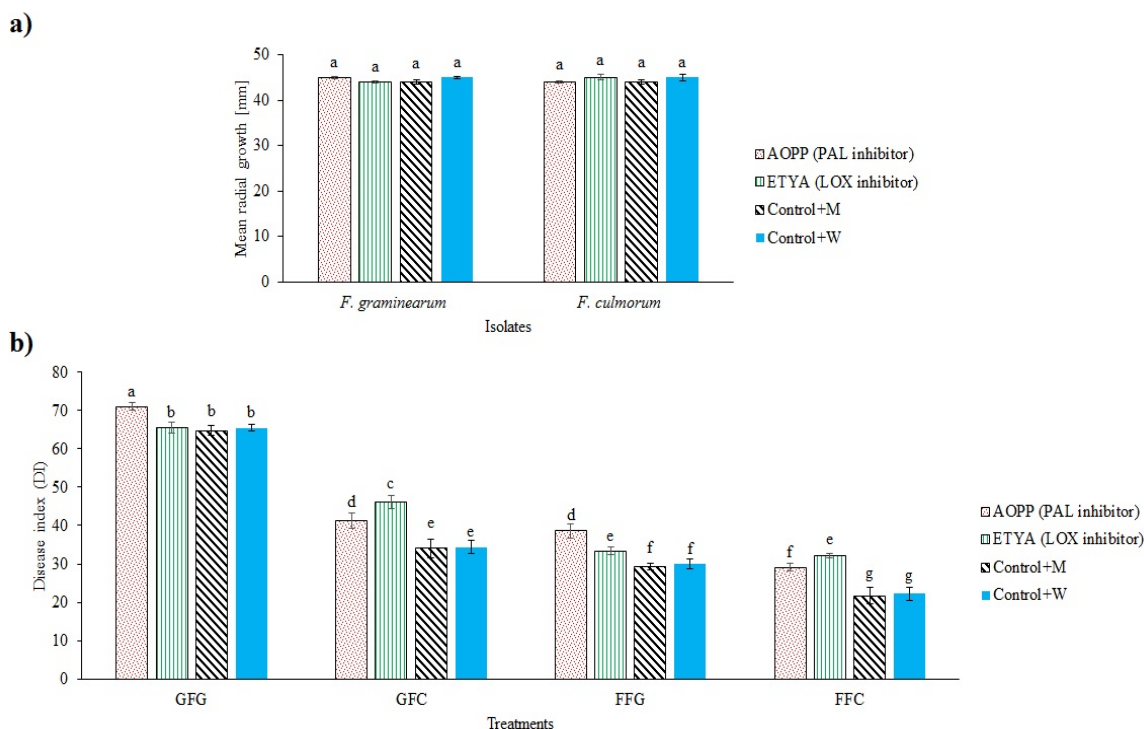
ترتیب برای رقم گاسکوژن و فلات پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی، مشاهده شد. در رقم گاسکوژن، میزان بیان ژن *PAL* و *LOX* نسبت به رقم فلات بیشتر بود. همچنین، تغییر در سطح القای پس از آلودگی با جدایه های *Fusarium spp.* در تجزیه و تحلیل بیان ژن مشاهده شد. شدت باندهای *PAL* و *LOX* از نظر بصری در گیاهان آلوده رقم گاسکوژن بیشتر از گیاهان مایه‌زنی شده رقم فلات بود (شکل ۴).

نقش مسیرهای فنیل پروپانوئید و اکتادکانوئید در مقاومت پایه در طی تعامل ارقام گندم با گونه‌های *Fusarium spp.*

به منظور بررسی دقیق تر نقش مسیرهای انتقال سیگنال فنیل پروپانوئید و اکتادکانوئید از AOPP به عنوان مهارکننده *PAL* و *ETYA* به عنوان مهارکننده *LOX*، برای تیمار قطعات برگ استفاده شد. بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که AOPP و *ETYA* در غلظت مورد استفاده هیچ اثر مستقیمی بر رشد گونه‌های فوزاریوم نداشتند (شکل ۵a). هر دو مهارکننده اثر موثری بر مقاومت پایه برگ گندم به گونه‌های *Fusarium spp.* داشتند و به طور قابل توجهی حساسیت به بیماری را در هر دو رقم افزایش دادند

روند کاهشی داشت. اما افزایش فعالیت *LOX* تا مرحله شیری ادامه داشت و پس از آن کاهش یافت (شکل ۳c و ۳d). به طور کلی، سطح بالاتری از فعالیت آنزیم‌ها در رقم گاسکوژن نسبت به رقم فلات مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده، فعالیت *PAL* در برگ و خوشه گندم در اغلب زمان‌های مورد بررسی پس از آلودگی طی تعامل رقم گاسکوژن با *F. culmorum* بالاتر از تعامل ارقام گندم با گونه‌های مورد مطالعه بود (شکل ۳a و ۳c). فعالیت *LOX* در برگ و خوشه گندم در طی تعامل رقم گاسکوژن با *F. culmorum* بالاتر از تعامل رقم فلات مایه‌زنی شده با گونه‌های فوزاریوم یا رقم گاسکوژن مایه‌زنی شده با *F. graminearum* بود (شکل ۳b و ۳d).

تجزیه و تحلیل RT-PCR نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های *PAL* و *LOX* بین گیاهان آلوده و غیر آلوده در بسیاری از زمان‌های مورد بررسی وجود داشت. با توجه به نتایج، ارتباط مستقیمی بین میزان بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های مربوطه مشاهده شد. به عبارتی در تیمارهایی که فعالیت آنزیمی بالاتر بود سطح بالاتری از بیان ژن‌های مربوطه مشاهده شد. در تیمارهای آلوده بیان ژن‌های *PAL* و *LOX* به میزان بالاتری در هر دو رقم، به



شکل 5. اثر مهارکننده‌های آنزیمی (AOPP، مهارکننده PAL؛ ETYA، مهارکننده LOX) بر شاخص بیماری‌زایی ناشی از جدایه‌های *Fusarium* spp. بر روی ارقام گندم. اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در سطح 5 درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. هر آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد. کنترل + W: قطعات برگ تیمار شده با آب. کنترل + M: قطعات برگ تیمار شده با آب حاوی متانول.

Figure 5. Effect of enzymatic inhibitors (AOPP, PAL inhibitor; ETYA, LOX inhibitor) on disease index caused by *Fusarium* spp. on wheat cultivars. Different letters indicate significant differences ($P=0.05$). Each experiment was repeated two times with similar results: Control+W: leaf segments treated with water; Control+M: leaf segments treated with water containing methanol.

جمله مواد فنلی و لیگنین در واکنش‌های دفاعی ارقام گندم علیه قارچ‌های *F. culmorum* و *F. graminearum* بررسی شد. دیواره سلولی گیاهان به‌عنوان سدی مانع از نفوذ بیمارگر شده و تقویت آن منجر به محدود شدن پیشرفت بیمارگر در بافت گیاه میزبان می‌شود (Underwood 2012). تغییر در خواص مکانیکی و شروع مسیرهای سیگنالی باعث تغییر در ترکیب دیواره سلولی می‌شود که می‌تواند بر روی توسعه گیاه و پاسخ به عوامل بیماری‌زایی تأثیر داشته باشد (Pogorelko 2013). القای پاسخ‌های دفاعی گیاهان به حمله بیمارگرها با اصلاح دیواره سلولی

(شکل 5b). در هر دو تیمار، هیچ تفاوت معنی‌داری بین قطعات برگ کنترل (تیمار شده با آب) و قطعات برگ تیمار شده با محلول آب همراه متانول (به میزان استفاده شده برای حل کردن AOPP و ETYA) مشاهده نشد، در نتیجه متانول تأثیری در شاخص بیماری در دو رقم مورد استفاده نداشت (شکل 5b).

بحث

در این پژوهش، نقش مسیرهای سیگنالی اکتادکانوئید و فیل پروپانوئید و ترکیبات تولیدشده در این مسیرها از

لیگنین در دیواره‌های سلولی بافت خوشه آلوده در رقم Xiaoyan نسبتاً مقاوم Sumai3 در مقایسه با رقم حساس Menden وجود دارد. همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند که محتوای لیگنین در دیواره‌های سلولی ارقام گندم مقاوم پس از آلودگی با *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* با افزایش یافت. تیمار بذر با کیتوزان به‌طور قابل‌توجهی موجب بهبود کنترل آلودگی بذر زاد *F. graminearum* و افزایش جوانه‌زنی بذر با القای تشکیل فنولیک اسید و لیگنین گردید (Bhaskara Reddy et al. 1999).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، ترکیبات فنلی نامحلول متصل به دیواره سلولی و محلول در برگ و خوشه ارقام گندم نسبتاً مقاوم و حساس آلوده به گونه‌های *Fusarium* spp. افزایش یافت. به‌طور کلی، سطح بالاتری از تجمع ترکیبات فنلی در گاسکوژن در مقایسه با رقم فلات در شرایط آلوده مشاهده شد. این نتایج مشابه با نتایج گزارش‌شده توسط سایر محققان بود. Motallebi و همکاران (۲۰۱۵b) گزارش کردند که محتوای فنلی کل در رقم تا حدی مقاوم Sumai3 نسبت به رقم حساس فلات پس از آلودگی با *F. culmorum* افزایش یافت. همچنین آن‌ها گزارش دادند که بالاترین میزان آن در ۹۶ ساعت پس از آلودگی در رقم Sumai3 دیده می‌شد. ترکیبات فنلی گندم به‌عنوان متابولیت مرتبط با مقاومت به FHB در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس بالاتر بود (Bollina et al. 2008; Hamzehzarghani et al. 2010). همکاران (۲۰۰۲) گزارش دادند که فنل نقش مهمی را در مقاومت گندم به *F. culmorum* ایفا می‌کند. Sorahinobar و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده کردند که محتوای فنل در سنبلیچه‌های آلوده رقم Sumai3 به *F. graminearum* افزایش‌یافته است. Sorahinobar و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که فنل و محتوای فلاونوئید به‌طور

از طریق رسوب کالوز، تولید لیگنین، تجمع فنل، و برخی از ترکیبات دفاعی مانند فیتوالکسین‌ها و پروتئین‌های مربوط با بیماری‌زایی همراه است (Nafisi et al. 2015; Bellincampi et al. 2014).

نتایج این پژوهش نشان داد که میزان لیگنین پس از آلودگی با جدایه‌های *Fusarium* spp. نسبت به گیاهان غیر آلوده افزایش یافت. تجمع لیگنین در برگ و خوشه گندم در رقم نسبتاً مقاوم گاسکوژن بالاتر از رقم حساس فلات بود. این نتیجه مطابق با گزارش Siranidou و همکاران (۲۰۰۲) بود که مشاهده کردند سطح بالاتری از محتوای لیگنین در دیواره‌های سلولی رقم مقاوم Frontana آلوده به *F. culmorum* در مقایسه با رقم حساس Agent وجود دارد. Gunnaiah و Kushalappa (۲۰۱۴) مشاهده کردند که مقادیر بالاتری از مونولیگنول گلوکوزید و پیش‌سازهای لیگنین سیرنگل در محور خوشه رقم Sumai3 پس از آلودگی با *F. graminearum* وجود دارد. همچنین آن‌ها گزارش دادند که مونولیگنول‌ها پلیمریزه شده و تولید لیگنین می‌کنند. این فرآیند موجب افزایش ضخامت دیواره سلولی و محدود شدن گسترش بیمارگر می‌شود که با نتایج ما مطابقت دارد. مقاومت در ارقام گندم به‌طور عمده با ضخیم شدن دیواره سلولی و محدود کردن حرکت و پیشرفت *F. graminearum* به دلیل رسوب هیدروکسی سینامیک اسیدها، فنولیک گلیکوزید، فلاونوئیدها و لیگنین در ارتباط است (Gunnaiah et al. 2012). Lionetti و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده کردند که تجمع مقادیر بالاتری از لیگنین در گندم دوروم مقاوم به *F. graminearum* نسبت به رقم حساس وجود دارد.

مشاهدات ما نشان داد که میزان لیگنین در خوشه آلوده در مقایسه با خوشه‌های غیر آلوده افزایش یافت. Kang و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که چگالی بالاتری از

در بافت‌های گیاهی تجمع می‌یابد (Noorbakhsh & Taheri 2015). در مقایسه با فنل کل محلول، تولید ترکیبات فنلی نامحلول نظیر فنولیک اسید و اسید فرولیک بیشتر است که این نتایج مشابه با نتایج گزارش شده توسط Zhou و همکاران (۲۰۰۷)، Adom و Liu (۲۰۰۲) است. افزایش محتوای فنلی کل و لیگنین در ارقام گندم می‌تواند نقش مهمی را در مقاومت و دفاع علیه گونه‌های *Fusarium* داشته باشد.

روند آلودگی *F. graminearum* شامل یک مرحله بیوتروفی کوتاه مدت ۶ ساعت پس از آلودگی است که با فعال شدن Ca^{2+} و مسیر SA در این دوره اتفاق می‌افتد. مرحله دوم، که احتمالاً قبل از ۲۴ ساعت پس از آلودگی شروع می‌شود، مرحله نکروتروفی است و با فعال شدن مسیر JA همراه است (Ding et al. 2011). قارچ *F. culmorum* به‌عنوان قارچی نکروتروف ممکن است یک‌فاز بیوتروفی مختصر اولیه در بافت‌های گیاهی داشته باشند، اما ۶ ساعت پس از آلودگی از طریق تولید مایکوتوکسین‌ها بخصوص تریکوتسین‌ها و آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلول سریعاً وارد مرحله نکروتروفی می‌شود (Scherm et al. 2013; Petti et al. 2012; Ding et al. 2011). مطالعات قبلی به نقش احتمالی JA و اکسین در تنظیم مقاومت پایه آراییدوپسیس و گندم علیه *F. culmorum* اشاره کرده‌اند (Motallebi et al. 2015a; Petti et al. 2012; Cuzick et al. 2009).

برای درک بهتر مکانیسم‌های مقاومت علیه گونه‌های *Fusarium* spp، فعالیت‌های PAL و LOX به‌عنوان آنزیم‌های کلیدی در تولید SA و JA مورد بررسی قرار گرفت. در ارقام مورد بررسی گندم، فعالیت آنزیم‌ها به‌طور قابل توجهی پس از آلودگی با گونه‌های *Fusarium* spp افزایش یافت. بیشترین سطح فعالیت PAL و LOX در

قابل توجهی در هر دو رقم تحت درمان با عصاره *F. graminearum* افزایش یافته است، اما در کولتوپتیل رقم Sumai3 نسبت به رقم حساس فلات بالاتر بود. از جمله ترکیبات فنلی محلول می‌توان به فلاونوئیدها و تانن و همچنین از ترکیبات فنلی نامحلول می‌توان به فنولیک اسیدها، اسید فرولیک، کومارین‌ها، لیگنین و اسید سیناپیک می‌توان اشاره نمود (Lou et al. 2014; Dai & Mumper 2010). به در پاسخ به آلودگی به بیمارگر، ترکیبات فنلی نامحلول به‌ویژه فنولیک اسیدها می‌توانند به‌سرعت تجمع و در دیواره سلولی در محل آلودگی به فرم استری آزاد شوند (Nicholson & Hammerschmidt 1992; Matern & Kneusel 1988). فنولیک اسیدهای استخراج شده از بذور ژنوتیپ‌های مقاوم گندم به FHB نسبت به ارقام حساس دارای آنتی‌اکسیدان طبیعی و فعالیت‌های رادیکالی به‌طور قابل توجهی بالاتری هستند (Zhou et al. 2007). ترکیبات فنلی نامحلول مانند اسید فرولیک نه تنها موجب کاهش زیست‌توده *F. culmorum* می‌شوند همچنین با توجه به خواص پرو-اکسیدان و خواص آنتی‌اکسیدانی باعث بیوستنز تریکوتسین‌های تولید شده توسط آن‌ها می‌شوند (Boutigny et al. 2010; Boutigny et al. 2009). فرولیک اسید نقش مهمی در ارتباط با لیگنین و فلاونوئیدها و سایر متابولیت‌های ساختاری مرتبط با مقاومت در کاهش رشد *F. graminearum* و بیوستنز تریکوتسین‌ها بازی می‌کند (Bollina & Kushalappa 2011; Boutigny et al. 2009).

مانند آنچه در فنل کل محلول مشاهده شد، مقدار ترکیبات فنلی نامحلول در هر دو رقم گندم آلوده با گونه‌های فوزاریوم افزایش یافته است. پس از حمله بیمارگرها، ترکیبات فنلی متصل به دیواره سلولی و محلول

PDF2.2) و مسیر فنیل پروپانوئید (*PAL1*, *PAL2* و *PAL3*) و همچنین نقش هومولوگ فاکتور رونویسی *WRKY33* در آلودگی گندم به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه توسط Sahu و همکاران (۲۰۱۶) ارزیابی شده است. Purwar و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که ژن *PAL* به‌طور کلی در هر دو رقم مقاوم HD-29 و حساس WH-542 بیان می‌شود که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد. با این حال، فعالیت در همه مراحل رشد و نمو در ژنوتیپ‌های مقاوم به *Tilletia indica* در مقایسه با گیاهان حساس بالاتر بود، که مشابه با یافته‌های ما در برهمکنش گندم و *Fusarium spp.* می‌باشد. Ameye و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که دفاع گیاه علیه *F. graminearum* به ترتیب توسط SA و JA در طول مراحل اولیه و بعد از آلودگی تنظیم می‌شود. همچنین، آن‌ها گزارش کردند که تیمار با Z-3-hexenyl acetate موجب افزایش دفاع وابسته به JA در مرحله آلودگی نکروتروفی قارچ *F. graminearum* شده اما موجب سرکوب دفاع وابسته به SA در مرحله بیوتروفی آن می‌شود.

برای تعیین نقش *PAL* و *LOX* به‌عنوان دو آنزیم مهم در مسیرهای فنیل پروپانوئید و اکتادکانوئید در مقاومت پایه ارقام گندم علیه گونه‌های *Fusarium spp.* از AOPP و ETYA به‌عنوان مهارکننده‌های قوی فعالیت‌های *PAL* و *LOX* که قبلاً در چندین پاتوسیستم مختلف گزارش شده بود استفاده شد (Noorbakhsh & Taheri 2016; Ruiz- Lopez et al. 2015).

در این تحقیق، استفاده از AOPP و ETYA به‌عنوان مهارکننده آنزیم‌ها *PAL* و *LOX* موجب کاهش مقاومت پایه ارقام گندم به گونه‌های *Fusarium spp.* می‌شود. تیمار ETYA منجر به کمی افزایش شاخص بیماریزایی در مقایسه با AOPP در برگ ارقام گندم آلوده به قارچ

برگ و خوشه گندم در رقم نسبتاً مقاوم گاسکوژن مشاهده شد که با سطح بالاتری از مقاومت در این رقم در مقایسه با رقم فلات در ارتباط می‌باشد. نتایج ما با مشاهدات Motallebi و همکاران (۲۰۱۵b) مطابقت داد. آن‌ها مشاهده کردند که فعالیت‌های *PAL* و *LOX* در ارقام گندم آلوده به *F. culmorum* در مقایسه با گیاهان غیر آلوده افزایش داشته است. همچنین بالاترین سطح فعالیت آنزیم‌های *PAL* و *LOX* به ترتیب در ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی در رقم Sumai3 و فلات مشاهده شد. Zhang و همکاران (۲۰۱۳) گزارش دادند که سطح بالاتری از فعالیت *PAL* در رقم مقاوم Hongyouzi نسبت به رقم حساس Wo0102 وجود دارد.

Sorahinobar و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که بالاترین سطح فعالیت و بیان ژن *PAL* پس از آلودگی *F. graminearum* در سنبلچه‌های رقم نسبتاً مقاوم در مقایسه با حساس مشاهده شد. Sorahinobar و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که عصاره *F. graminearum* باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت و بیان ژن *PAL* در ارقام گندم می‌شود. Motallebi و همکاران (۲۰۱۵a) گزارش کردند که در گیاهچه‌های آلوده به *F. culmorum*، سطوح بالاتری از بیان ژن‌های *PAL*، *LOX*، *PR3*، *PR4* و *P450* در رقم نسبتاً مقاوم Sumai3 نسبت به رقم حساس فلات مشاهده شد. با این حال، در گیاهان فلات آلوده تا حدی این افزایش پایین‌تر و با تأخیر مشاهده شد. Beccari و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که بیان ژن‌های مرتبط دفاعی میزبان از جمله *PAL*، *LOX*، *PR1*، *Wheatwin 1*، *PR1.1* و *PR3* در اوایل آلودگی با *F. culmorum* افزایش و در مراحل بعدی کاهش می‌یابد. بررسی بیان ژن‌های مرتبط با مسیر دفاعی SA (*JCS1*، *NPRI-3*، *PR1.1* و *PR3*)، JA (*MYC2*، *LOX2*، *AOS*، *OPR3*) و

فیل آلانین، جاسمونیک اسید و کوماریک اسید به عنوان متابولیت مرتبط با مقاومت در ارقام مقاومت به FHB شناسایی شده‌اند که می‌تواند به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای مقاومت به FHB استفاده شوند (Bollina & Kushalappa 2011; Kumaraswamy et al. 2011).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مسیر فیل پروپانویید و ترکیبات تولیدشده در آن از جمله فنل و لیگنین نقش مهمی در مقاومت به FHB ایفا می‌کنند. اغلب تبادل اطلاعات در میان مسیرهای سیگنالی مختلف درگیر در مکانیسم رشد، توسعه، تولیدمثل و دفاع در گیاهان رخ می‌دهد. تبادل اطلاعات بین مسیرهای دفاعی سیگنالی بستگی به شیوه زندگی بیمارگر و ژنتیک تعاملات میزبان با بیمارگر دارد (Robert-Seilaniantz et al. 2011; Glazebrook 2005)، که با نتایج ما مطابقت دارد. مشاهدات ما نشان داد که علاوه بر ترکیبات تولیدشده از طریق مسیر فیل پروپانویید، آنزیم LOX و مسیر اکتادکانوئید در تعامل *F. culmorum* با ارقام گندم در مقایسه با *F. graminearum* اهمیت بالاتری را دارد. بنابراین، SA و JA نقش مهمی را در مقاومت پایه به FHB دارند. به طور کلی، تبادل اطلاعات بین سیگنال‌های SA و JA، و دیگر مسیرهای هورمونی گیاه باعث ایجاد بروز پاسخ‌های دفاعی در گیاه علیه عوامل بیمارگرهای مختلف می‌شود (Gimenez-Ibanez & Solano 2013)، که با نتایج ما مطابقت دارد.

پژوهش حاضر نشان داد که افزایش فعالیت آنزیم‌ها و بیان ژن‌های اصلی مسیرهای فیل پروپانویید و اکتادکانوئید باعث تولید ترکیبات دفاعی و پاسخ‌های دفاعی مرتبط با دیواره سلولی می‌شود. نتایج نشان داد که الگوهای متفاوتی در پاسخ‌های بیوشیمیایی و مولکولی علیه آلودگی به گونه‌های *Fusarium spp.* در ارقام حساس و نسبتاً مقاوم

نکروتروف *F. culmorum* گردید. از سوی دیگر، مشاهده شد که شاخص بیماریزایی بالاتری در قطعات برگی هر دو رقم تیمار شده با AOPP و مایه‌زنی شده با *graminearum* *F.* نسبت به شاهد وجود دارد که نشان‌دهنده اهمیت بالاتر AOPP در مقایسه با ETYA در سرکوب مقاومت پایه ارقام گندم به قارچ همی بیوتروف *F. graminearum* است. این اولین گزارش در مورد دستکاری مصنوعی آنزیم‌ها PAL و LOX در ارقام گندم و اثر آن بر مقاومت پایه علیه گونه‌های *Fusarium spp.* است. این نتایج مشابه با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان در برهمکنش گندم - *Bipolaris sorokiniana* (Sahu et al. 2016)، گوجه‌فرنگی - *Rhizoctonia solani* (Noorbakhsh & Taheri 2016)، برنج - *R. solani* (Taheri & Tarighi 2010)، ارزن مرواریدی - *Sclerospora graminicola* (Geetha et al. 2005) و همچنين جو - *Erysiphe graminis f. sp. hordei* (Carver et al. 1994) است. نتایج ما با گزارش‌های دیگر محققان در مورد نقش مهم هر دو ژن PAL و LOX در مقاومت پایه گندم و پاسخ دفاعی آن به آلودگی با *F. graminearum* (Sorahinobar et al. 2010; Makandar et al. 2012; Makandar et al. 2015) و *F. culmorum* (Motallebi et al. 2015a 2015b; Beccari et al. 2011) مطابقت دارد.

مقدار بالای ترکیبات فنلی در رقم مقاوم در پاسخ به گونه‌های *Fusarium spp.* مطابق با تغییرات در فعالیت و بیان ژن PAL بودند. آنزیم PAL نقش مهمی را در سنتز فنل و افزایش ارتباط بین ژن PAL، بیان پروتئین و تجمع ترکیبات فنلی در پاسخ به تنش‌های مختلف ایفا می‌کند (Boudet 2007). افزایش فعالیت PAL در پاسخ دفاعی گیاه از طریق بیوستنز متابولیت‌های فعال ممکن است با مسیرهای دفاعی گیاه مرتبط باشد (Mandal et al. 2010).

مکانیسم مسئول برای تنظیم مقاومت در ارقام گندم به FHB ارائه می‌دهد و امکان طراحی روش‌های نوین جهت مدیریت بیماری با تغییر و اصلاح مسیرهای دخیل در مقاومت ارقام گندم را فراهم می‌کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه فردوسی مشهد برای حمایت مالی از این پژوهش با شماره پروژه ۳۱۴۷۷ مصوب ۱۳۹۳/۰۴/۱۱ تشکر و قدردانی می‌کنند.

گندم وجود دارد. پژوهش حاضر دیدگاه‌های جدیدی در تعامل ارقام گندم با جدایه‌های *Fusarium spp.* همچنین تجزیه و تحلیل فعالیت و بیان *LOX* و *PAL* را در مسیرهای سیگنالی دفاعی و ترکیبات تولیدشده مرتبط با آن‌ها در گیاهچه و خوشه گندم ارائه می‌دهد. این یافته‌ها نقش مسیرهای فنیل پروپانوئید و اکتادکانوئید را در القای متابولیسم فنیل پروپانوئید که منجر به تجمع لیگنین و ترکیبات فنلی به‌عنوان مکانیسم مقاومت در گندم در طی تعامل با گونه‌های *Fusarium spp.* شده را نشان می‌دهد. نتایج فعلی می‌تواند دیدگاه جدیدی را برای شناخت بهتر

منابع

- Adom, K.K. and Liu, R.H. 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6182-6187.
- Ameye, M., Audenaert, K., De Zutter, N., Steppe, K., Van Meulebroek, L., Vanhaecke, L., De Vleeschauwer, D., Haesaert, G. and Smagghe, G. 2015. Priming of wheat with the green leaf volatile z-3-hexenyl acetate enhances defense against *Fusarium graminearum* but boosts deoxynivalenol production. *Plant Physiology* 167: 1671-1684.
- Bagal, U.R., Leebens-Mack, J. H., Lorenz, W.W. and Dean, J.F.D. 2012. The *phenylalanine ammonia lyase (PAL)* gene family shows a gymnosperm-specific lineage. *BMC Genomics* 13(Suppl 3), S1.
- Balbi, V. and Devoto, A. 2008. Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist* 177: 301-318.
- Beccari, G., Covarelli, L. and Nicholson, P. 2011. Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology* 60: 671-684.
- Bellincampi, D., Cervone, F. and Lionetti, V. 2014. Plant cell wall dynamics and wall related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* 5: 228.
- Bernusi, I., Ghanadha, M.R., Omid, M., Samadi, B.Y. and Hosseinzadeh, A. 2002. Inheritance of resistance to fusarium within a spike of wheat. *Pajouhesh and Sazandegi* 63: 57-62. (In Farsi).
- Bhaskara Reddy, M.V., Arul, J., Angers, P. and Couture, L. 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1208-1216.
- Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y. and King, J. 2009. Role of lignification in plant defense. *Plant Signaling & Behavior* 4: 158-159.
- Bollina, V. and Kushalappa, A.C. 2011. In vitro inhibition of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum* by resistance-related endogenous metabolites identified in barley. *Mycology* 2: 291-296.
- Bollina, V., Kumaraswamy, G.K., Kushalappa, A.C., Choo, T.M., Dion, Y., Rioux, S., Faubert, D. and Hamzehzarghani, H. 2010. Mass spectrometry-based metabolomics application to identify quantitative resistance-related metabolites in barley against *Fusarium* head blight. *Molecular Plant Pathology* 11: 769-782.
- Boudet, A.M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68: 2722-2735.
- Boutigny, A.L., Atanasova-Pénichon, V., Benet, M., Barreau, C. and Richard-Forget, F. 2010. Natural phenolic

- acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis *in vitro* by repressing Tri gene expression. *European Journal of Plant Pathology* 127: 275-286.
- Boutigny, A.L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M.N., Pinson-Gadais, L. and Richard-Forget, F. 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research* 113: 746-753.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Carver, T.L.W., Zeyen, R.J., Bushnell, W.R. and Robbins, M.P. 1994. Inhibition of phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D. C.). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44: 261-272.
- Coram, T.E., Wang, M.N. and Chen, X.M. 2008. Transcriptome analysis of the wheat-*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction. *Molecular Plant Pathology* 9: 157-169.
- Cuzick, A., Maguire, K. and Hammond-Kosack, K.E. 2009. Lack of the plant signalling component SGT1b enhances disease resistance to *Fusarium culmorum* in Arabidopsis buds and flowers. *New Phytologist* 181: 901-912.
- Dai, J., and Mumper, R.J. 2010. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352.
- De Ascensao, A.R.F.D.C. and Dubery, I. A. 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytochemistry* 63: 679-686.
- Desmond, O.J., Manners, J.M., Stephens, A.E., MacLean, D.J., Schenk, P.M., Gardiner, D.M., Munn, A.L. and Kazan, K. 2008. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology* 9: 435-445.
- Dickerson, D. P., Pascholati, S. F., Hagerman, A. E., Butler, L. G. and Nicholson, R. L. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. *Physiological Plant Pathology* 25: 111-123.
- Ding, L., Xu, H., Yi, H., Yang, L., Kong, Z., Zhang, L., Xue, S., Jia, H. and Ma, Z. 2011. Resistance to hemibiotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS ONE* 6: e19008.
- Doderer, A., Kokkelink, I., Van der Veen, S., Valk, B.E., Schram, A.W. and Douma, A.C. 1992. Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from germinating barley. *Biochimica et Biophysica Acta* 1120: 97-104.
- Ellinger, D., Sode, B., Falter, C. and Voigt, C. A. 2014. Resistance of callose synthase activity to free fatty acid inhibition as an indicator of *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Plant Signaling & Behavior* 9 pii: e28982.
- Farmer, E.E., Alm eras, E. and Krishnamurthy, V. 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 372-378.
- Forrer, H.R., Musa, T., Schwab, F., Jenny, E., Bucheli, T. D., Wettstein, F. E. and Vogelgsang, S. 2014. *Fusarium* head blight control and prevention of mycotoxin contamination in wheat with botanicals and tannic acid. *Toxins* 6: 830-849.
- Fraser, C.M. and Chapple, C. 2011. The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* 9: e0152.
- Geetha, N.P., Amruthesh, K.N., Sharathchandra, R.G. and Shetty, H.S. 2005. Resistance to downy mildew in pearl millet is associated with increased phenylalanine ammonia lyase activity. *Functional Plant Biology* 32: 267-275.
- Gherbawy, Y.A., El-Tayeb, M.A., Maghraby, T.A., Shebany, Y.M. and El-Deeb, B.A. 2012. Response of antioxidant enzymes and some metabolic activities in wheat to *Fusarium* spp. infections. *Acta Agronomica Hungarica* 60: 319-333.
- Gimenez-Ibanez, S. and Solano, R. 2013. Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Frontiers in Plant Science* 4: 72.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual*

- Review of Phytopathology 43: 205-227.
- Golzar, H. 1989. Wheat head blight disease Investigation on the Causal agent, methods of infection and contamination via seed. *Plant Disease* 25: 17-25.
- Gunnaiah, R. and Kushalappa, A.C. 2014. Metabolomics deciphers the host resistance mechanisms in wheat cultivar Sumai-3, against trichothecene producing and non-producing isolates of *Fusarium graminearum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 83: 40-50.
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A.C., Duggavathi, R., Fox, S. and Somers, D.J. 2012. Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 7(7): e40695.
- Hamzehzarghani, H., Paranidharan, V., Abu-Nada, Y., Kushalappa, A.C., Dion, Y., Rioux, S., Comeau, A. and Marshall, W.D. 2008. Metabolite profiling coupled with statistical analyses for potential high-throughput screening of quantitative resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30: 24-36.
- Hukkanen, A.T., Kokko, H.I., Buchala, A.J., McDougall, G.J., Stewart, D., Karenlampi, S.O. and Karjalainen, R.O. 2007. Benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1862-1870.
- Ji, X., Dong, B., Shiran, B., Talbot, M.J., Edlington, J. E., White, R. G., Gubler, F. and Dolferus, R. 2011. Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant Physiology* 156: 617-662.
- Kang, Z., Buchenauer, H., Huang, L., Han, Q. and Zhang, H. 2008. Cytological and immunocytochemical studies on responses of wheat spikes of the resistant Chinese cv. Sumai 3 and the susceptible cv. Xiaoyan 22 to infection by *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology* 120: 383-396.
- Kocha, A., Kumara, N., Weber, L., Kellerc, H., Imania, J. and Kogela, K.H. 2013. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110: 19324-19329.
- Kumaraswamy, K. G., Kushalappa, A. C., Choo, T. M., Dion, Y. and Rioux, S. 2011. Mass spectrometry based metabolomics to identify potential biomarkers for resistance in barley against fusarium head blight (*Fusarium graminearum*). *Journal of Chemical Ecology* 37: 846-856.
- Li, G. and Yen, Y. 2008. Jasmonate and ethylene signaling pathway may mediate *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Crop Science* 48: 1888-1896.
- Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F. and Jiang, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102: 771-776.
- Lionetti, V., Giancaspro, A., Fabri, E., Giove, S. L., Reem, N., Zabolina, O.A., Blanco, A., Gadaleta, A. and Bellincampi, D. 2015. Cell wall traits as potential resources to improve resistance of durum wheat against *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biology* 15: 6.
- Lou, S.N., Lin, Y.S., Hsu, Y.S., Chiu, E.M. and Ho, C.T. 2014. Soluble and insoluble phenolic compounds and antioxidant activity of immature calamondin affected by solvents and heat treatment. *Food Chemistry* 161: 246-53.
- Makandar, R., Nalam, V., Chaturvedi, R., Jeannotte, R., Sparks, A.A. and Shah, J. 2010. Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in Arabidopsis interaction with *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 23: 861-870.
- Makandar, R., Nalam, V.J., Lee, H., Trick, H.N., Dong, Y. and Shah, J. 2012. Salicylic acid regulates basal resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 25: 431-439.
- Malihipoor, A., Okhovat, M. and Alizadeh, A. 2000. Analysis of development of wheat *Fusarium* head blight disease in the controlled environment using the epidemiologic models. *The journal of science and research of plant diseases experts' society of Iran* 36: 1-2
- Mandal, S. M., Chakraborty, D. and Dey, S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior* 5: 359-368.
- Matern, U. and Kneusel, R.E. 1988. Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica* 16: 153-170.
- Menden, B., Kohlhoff, M. and Moerschbacher, B.M. 2007. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry* 68: 513-520.

- Motallebi, P., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Hashemi, M., Pisi, A., Prodi, A., Tonti, S. and Nipoti, P. 2015a. Methyl jasmonate strengthens wheat plants against root and crown rot pathogen *Fusarium culmorum* infection. *Journal of Plant Growth Regulation* 34: 624-636.
- Motallebi, P., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Tahmasebi Enferadi, S., and Hashemi, M., 2015b. The effect of methyl jasmonate on enzyme activities in wheat genotypes infected by the crown and root rot pathogen *Fusarium culmorum*. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 237.
- Nafisi, M., Fimognari, L. and Sakuragi, Y. 2015. Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry* 112: 63-71.
- Nalam, V.J., Alam, S., Keereetawee, J., Venables, B., Burdan, D., Lee, H., Trick, H.N., Sarowar, S., Makandar, R. and Shah, J. 2015. Facilitation of *Fusarium graminearum* infection by 9-lipoxygenases in Arabidopsis and wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 28: 1142-1152.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D.W. and Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 53(1): 17-37.
- Nicholson, R.L. and Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.
- Parry, D.W., Jenkinson, J. and Mcleod, I. 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant pathology* 44: 207-238.
- Pasquali, M. and Migheli, Q. 2014. Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing Fusaria. *International Journal of Food Microbiology* 189: 164-182.
- Pasquali, M., Giraud, F., Lasserre, J.P., Planchon, S., Hoffmann, L., Bohn, T. and Renaut, J. 2010. Toxin induction and protein extraction from *Fusarium* spp. cultures for proteomic studies. *Journal of Visualized Experiments* 16(36) pii: 1690.
- Petti, C., Reiber, K., Ali, S. S., Berney, M. and Doohan, F. M. 2012. Auxin as a player in the biocontrol of Fusarium head blight disease of barley and its potential as a disease control agent. *BMC Plant Biology* 12: 224.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wees, S.C.M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
- Pieterse, C.M.J., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. and Van Wees, S.C. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 489-521.
- Pogorelko, G., Lionetti, V., Bellincampi, D. and Zabolina, O. 2013. Cell wall integrity: targeted post-synthetic modifications to reveal its role in plant growth and defense against pathogens. *Plant Signaling and Behaviour* 8: 1-8.
- Purwar, S., Sundaram, S., Sinha, S., Gupta, A., Dobriyall, N. and Kumar, A. 2013. Expression and in silico characterization of Phenylalanine ammonium lyase against karnal bunt (*Tilletia indica*) in wheat (*Triticum aestivum*). *Bioinformation* 9: 1013-1018.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. and Jones, J.D.G. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49: 317-343.
- Ruiz-Lopez, N., Haslam, R.P., Usher, S., Napier, J.A. and Sayanova, O. 2015. An alternative pathway for the effective production of the omega-3 long-chain polyunsaturates EPA and ETA in transgenic oilseeds. *Plant Biotechnology Journal* 13: 1264-1275.
- Sahu, R., Sharaff, M., Pradhan, M., Sethi, A., Bandyopadhyay, T., Mishra, V.K., Chand, R., Chowdhury, A.K., Joshi, A.K. and Pandey, S.P. 2016. Elucidation of defense-related signaling responses to spot blotch infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *The Plant Journal* 86: 35-49.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M. and Migheli, Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology* 14: 323-341.
- Shin, S., Kim, K.H., Kang, C.S., Cho, K.M., Park, C.S., Okagaki, R., and Park, J.C. 2014. A simple method for the assessment of fusarium head blight resistance in Korean wheat seedlings inoculated with *Fusarium graminearum*. *The Plant Pathology Journal* 30: 25-32.
- Siranidou, E., Kang, Z. and Buchenauer, H. 2002. Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defense responses in wheat cultivars differing in resistance to fusarium head blight. *Journal of Phytopathology* 150: 200-208.

- Soltanloo, H., Ghadirzade Khorzoghi, E., Ramezanpour, S.S. and Kalateh Arabi, M. 2011. Genetic analysis of *Fusarium* head blight resistance in bread wheat. *Australasian Plant Pathology* 40: 453-460.
- Sorahinobar, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Soltanloo, H., Behmanesh, M. and Tahmasebi Enferadi, S. 2015. Central role of salicylic acid in resistance of wheat against *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Growth Regulation* 1-15.
- Sorahinobar, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Soltanloo, H., Moradi, B. and Bahram, M. 2016. Lack of association between *Fusarium graminearum* resistance in spike and crude extract tolerance in seedling of wheat. *European Journal of Plant Pathology* 144: 525-538.
- Spoel, S.H. and Dong, X. 2008. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host & Microbe* 3: 348-351.
- Suzuki, S., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Hattori, T., Sakamoto, M. and Umezawa, T. 2009. High-throughput determination of thioglycolic acid lignin from rice. *Plant Biotechnology* 26: 337-340.
- Taheri, P. and Tarighi, S. 2010. Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. *Journal of Plant Physiology* 167: 201-208.
- Taheri, P. and Tarighi, S. 2011. A survey on basal resistance and riboflavin-induced defense responses of sugar beet against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Plant Physiology* 168: 1114-1122.
- Underwood, W. 2012. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science* 3: 85.
- Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3: 2-20.
- Wang, Y., Chantreau, M., Sibout, R. and Hawkins, S. 2013. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Frontiers in Plant Science* 4: 220.
- Yoshida, M., Kawada, N. and Nakajima, T. 2007. Effect of infection timing on *Fusarium* head blight and mycotoxin accumulation in open and closed-flowering barley. *Phytopathology* 97: 1054-1062.
- Zhang, P., Zhou, M.P., Zhang, X., Huo, Y. and Ma, H.X. 2013. Change of defensive-related enzyme in wheat crown rot seedlings infected by *Fusarium graminearum*. *Cereal Research Communications* 41: 431-439.
- Zhang, Z.Q., Xiang, J.J. and Zhou, L. M. 2015. Antioxidant activity of three components of wheat leaves: ferulic acid, flavonoids and ascorbic acid. *Journal of Food Science and Technology* 52: 7297-7304.
- Zhou, K., Hao, J., Griffey, C., Chung, H., O'Keefe, S.F., Chen, J. and Hogan, S. 2007. Antioxidant properties of *Fusarium* head blight-resistant and -susceptible soft red winter wheat grains grown in Virginia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3729-3736.