مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

استفاده از عصاره گیاهی به منظور ارزیابی مقاومت نسبی ارقام گندم نسبت به قارچ *Mycosphaerella graminicola* در شرایط درون شیشه ای

محمد رضا اصلاحی [1]، ناصر صفایی [1*]، عباس سعیدی [2]، مسعود شمس بخش [1]

[1] گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
[2] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

تاریخ دریافت: 1391/04/14، تاریخ پذیرش: 1392/10/15

چکیده

سوختگی برگ گندم که بوسیله قارچ Mycosphaerella graminicola ایجاد می شود، یکی از بیماریهای مخرب گندم در سراسر جهان است. واکنش های متفاوت ارقام مختلف نسبت به بیماری، ناشی از زمان و مقدار بیان ژن های دفاعی آنها می باشد که می تواند پایه ای برای توسعه یک روش درون شیشه ای در جهت ارزیابی مقاومت نسبت به این بیمارگر باشد. از میان 40 ژنوتیپ گندم مایه زنی شده با *M. graminicola* ارقام مرودشت و چمران، مقاوم و داراب 2 و تجن به عنوان حساس انتخاب شدند. دو تیمار شامل القاء برگها با خراش و عدم القا بدون ایجاد خراش برای هر رقم در نظر گرفته شد. عصاره گیاهان هر رقم 24 و 48 ساعت پس از اعمال تیمار، استخراج و تاثیر آنها بر اسپورزایی و جوانه زنی اسپورهای قارچ بیمارگر بررسی گردید. نتایج نشان داد که افزایش جمعیت اسپور در محیط کشت‌های حاوی عصاره ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس کمتر بود. درصد جوانه زنی اسپور ها در محیط های کشت حاوی عصاره ارقام مقاوم القایی و غیرالقایی در مقایسه با محیط کشت های حاوی عصاره ارقام حساس کمتر بود. با استفاده از روش AFLP-cDNA مشخص شد که بیان ژن های پروکسیداز3 و8 به ترتیب در رقم چمران و مرودشت 48 ساعت پس از خراش دادن افزایش می یابد. بنابراین به نظر می رسد که می توان از عصاره گیاهی برای بررسی مقاومت ارقام نسبت به عامل بیماری سوختگی برگ گندم در شرایط آزمایشگاه استفاده کرد.

کلمات کلیدی: عصاره برگ ارقام حساس و مقاوم گندم، جمعیت اسپور، قارچ سپتوریا، AFLP-cDNA، ژن‌های دفاعی.

*نویسنده مسئول: ناصر صفایی تلفن: 48292346 Email: nsafaie@modares.ac.ir

مقدمه

بیماری سوختگی برگ گندم ناشی از قارچ Mycosphaerella graminicola با شکل غیر جنسی Zymoseptoria tritici (Quaedvlieg et al., 2011)یکی از بیماریهای مهم گندم است. این بیماری در مناطق وسیعی از جهان وجود دارد و خسارات سنگینی به محصول گندم وارد می کند (Eyal et al., 1987). علائم بیماری به صورت زخم های کلروز و نکروز می باشد که در روی آنها اندام های غیر جنسی به نام پیکنید بوجود می آید (Cohen and Eyal, 1993). این بیماری بوسیله ارقام مقاوم و یا استفاده از قارچکش ها کنترل می شود (Cowger et al., 2000). با توجه به تغییرات فراوانی که در جمعیت بیمارگر در مزرعه اتفاق می افتد و نیز محدودیتهای استفاده از قارچکش ها به علت نگرانی های زیست محیطی، توسعه ارقام اصلاح شده و مقاوم برای مدیریت بیماری را ضروری ساخته است (Adhikari *et al*., 2007). هم آسکسپورها و هم پیکنیدیوسپورهای قارچ روی برگ گندم در رطوبت بالا جوانه می زنند (Shaw, 1991). نفوذ قارچ از طریق روزنه ها اتفاق می افتد و هیفهای آلوده کننده به صورت بین سلولی رشد کرده و بدون تولید هوستوریوم یا هر اندام تغذیه کننده دیگر در تماس با سلول های مزوفیل باقی می مانند(Kema *et al*., 1996). تماس بین قارچ و یک سلول مزوفیل زنده برای انتقال یک سیگنال از بیمارگر به سلول میزبان و القاء مقاومت ضروری و لازم است (Kema *et al*., 2000). بیشتر تجزیه وتحلیل ها نشان می دهد بیوماس قارچی که بوسیله کمیت سنجی DNA تخمین زده می شود، هم در ارقام مقاوم و هم در ارقام حساس تا 12 الی 15 روز بعد از مایه زنی پایین باقی می ماند اما در ارقام حساس 2 الی 3 روز بعد از مایه زنی به یکباره به طور تصاعدی افزایش می یابد (Adhikari *et al*., 2004). رشد سریع پاتوژن در ارقام حساس در حدود 12 الی 15 روز بعد از تلقیح ممکن است نشان دهنده تغییر روش تغذیه ای از بیوترفیک به نکروتروفیک باشد که ظاهراً از این تغییر روش تغذیه ای در میزبان های مقاوم جلوگیری می شود (Adhikari *et al*., 2007). واکنش های متفاوت ارقام مختلف نسبت به بیماری، ناشی از زمان و مقدار بیان ژن های دفاعی آنها می باشد(Gracia-Brugger *et al*., 2006). این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره های القایی و غیرالقایی ارقام حساس و مقاوم روی رشد وجوانه زنی اسپورهای قارچ عامل بیماری برای توسعه ی یک روش درون شیشه برای ارزیابی مقاومت نسبی ارقام گندم نسبت به M. graminicola انجام شد. همچنین بیان برخی از ژن‌های دفاعی پس از القاء نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در مزرعه آزمایشی مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی خوزستان، 40 رقم و

لاین گندم در مرحله بلوغ و برای انتخاب 2 رقم حساس و 2 رقم مقاوم مورد بررسی قرار گرفتند. بذور هر رقم به طور خطی در 2 خط یک متری با فاصله 30 سانتی متر با 3 تکرار در قالب یک طرح بلوک کامل تصادفی کشت گردیدند. مایه زنی مصنوعی در مرحله پنجه زنی و مرحله پنجه زنی تا شکم خوش[1] به ترتیب با پخش کردن بقایای گیاهی آلوده سال قبل روی بو ته های رشد یافته و پاشیدن سه مرتبه سوسپانسیون اسپور با غلظت 106 اسپور در میلی لیتر، انجام گرفت. در بین هر 5 رقم و اطراف مزرعه یک رقم حساس (فلات) به عنوان شاهد کشت شد. عکس العمل ارقام با روش تغییر یافته ساری و پرسکات با مقیاس دو رقمی (99-00) مورد ارزیابی قرار گرفت (Eyal *et al.*, 1987). رقم سمت چپ ارتفاع نسبی پیشرفت بیماری و رقم سمت راست درصد شدت بیماری را نشان می دهد. بر این اساس ارقام گندم به صورت ایمن (00)، خیلی مقاوم (14-11)، مقاوم (34-15)، نیمه حساس (64-46)، حساس (84-65) و خیلی حساس (99-88) گروه بندی شدند. در ادامه برای تایید مقاومت و حساسیت ارقام تعداد 10 بذر گندم ارقام مرودشت، چمران، داراب 2 و تجن در گلدانهایی به قطر 10 سانتی متر حاوی خاک و پیت ماس (به نسبت 1 به 1) کاشته شدند. حدود 25 روز پس از کاشت، گیاهان با مخلوطی از سوسپانسیون اسپورهای 14 جدایه بیماریزا با غلظت 106×4 مایه زنی شدند (Brading *et al.*, 2002). برای هر رقم دو تیمار مایه زنی با اسپور قارچ و مایه زنی با آب بعنوان شاهد در سه تکرار در قالب یک طرح کامل تصادفی در نظر گرفته شد. گیاهچه های مایه زنی شده به مدت 72 ساعت در زیر یک پوشش پلاستیکی قرار داده شدند و رطوبت نسبی 100 درصد در زیر پوشش پلاستیکی در طول این مدت بوسیله یک دستگاه رطوبت ساز مدل LAICA تامین گردید . پس از گذشت 72 ساعت گلدان ها بر روی سکوهای گلخانه و در زیر پوشش پلاستیکی شفاف منتقل شدند. در طول مدت آزمایش در زیر پوشش پلاستیکی در روز دما بین 20 تا 25 درجه سلسیوس و در شب 18 تا 20 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی حدود 75 درصد بود. ارزیابی بیماری حدود 21 روز پس از مایه زنی با استفاده از مقیاس 5-0 به صورت زیر انجام گردید (Grieger *et al.*, 2005): ایمن (0) عدم تشکیل پیکنید، فاقد علایم بیماری یا گاهی لکه های کوچک ناشی از واکنش فوق حساسیت؛ خیلی مقاوم (1) عدم تشکیل پیکنید یا گاهی تولید پیکنیدهای منفرد بخصوص در بافت های مسن تر برگ، لکه های ناشی از فوق حساسیت در بافت های جوان تر برگ؛ مقاوم (2) تشکیل پیکنید خیلی ضعیف، اتصال بعضی لکه ها به همدیگر بخصوص در قسمت نوک برگ و بافت-های مسن برگ؛ حد واسط (3) تشکیل پیکنید خفیف، اتصال لکه ها به همدیگر در قسمت حواشی برگ ها و نیز جاهای دیگر برگ؛ حساس (4) تشکیل پیکنید متوسط، الحاق بیشتر لکه ها؛

[1] - booting

خیلی حساس(5) تشکیل پیکنید زیاد، الحاق لکه ها به همدیگر به صورت گسترده.

همه گیاهچه های یک گلدان بررسی و مقیاس آنها به عنوان داده آن گلدان یادداشت شد. برای انجام آزمایش اثر عصاره ارقام مختلف روی رشد جمعیت و جوانه زنی اسپورهای قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی، ابتدا بذور دو رقم مقاوم چمران و مرودشت و دو رقم حساس تجن و داراب 2 در گلدانهایی به قطر 25 سانتی متر کاشته شدند و در شرایط گلخانه با دمای میانگین 25 درجه سلسیوس در روز و 20 درجه سلسیوس در شب نگهداری گردیدند. پس از گذشت 35 روز از کاشت، دو تیمار در نظر گرفته شد. در یک تیمار سطح برگها بوسیله سوزن هایی با نوک بسیار باریک و تیز خراش داده شدند و در تیمار دیگر هیچگونه ایجاد زخمی صورت نگرفت. مدت زمان 24 و 48 ساعت بعد از خراش دادن سطح برگها، گیاهان از قسمت قاعده با قیچی بریده شده و هر رقم به طور جداگانه در داخل کیسه های پلاستیکی گذاشته شدند و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. گیاهان مربوط به هر رقم جداگانه با قیچی به صورت نواری شکل، خرد و سپس ریز ریز شدندو در دمای 20- درجه سلسیوس به مدت چهار روز نگهداری گردیدند. سپس گیاهان خرد شده به طور جداگانه بوسیله سانتریفوژ یخچال دار مدل HERMLE z323k در 10 هزار دور به مدت 15 دقیقه عصاره گیری شدند. عصاره به دست آمده از هر رقم پس از عبور از فیلتر میلی پور به نسبت 2 درصد جداگانه به یک ارلن حاوی 30 میلی لیتر محیط کشت مایع اتوکلاوشده YMDB 1 (4 گرم عصاره مخمر، 4 گرم عصاره مالت، 10 گرم گلوکز و 10 میلی گرم آنتی بیوتیک جنتامایسین در یک لیتر آب مقطر) اضافه گردید و اسیدیته محیط کشت روی 7 تنظیم شد. برای هر تیمار رقم یک ارلن فقط حاوی محیط کشت YMDB بدون عصاره به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ارلن ها با 500 میکرولیتر سوسپانسیون اسپور (106 کنیدی در میلی لیتر) که از یک کشت چهار روزه قارچ بدست آمده بود تلقیح شدند (Guo and Verreet, 2008). سپس ارلن ها روی شیکر مدل Laboshake LS2020 با سرعت 130 دور در دقیقه و در دمای 18 تا 20 درجه سلسیوس با طول دوره نوری 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی قرار داده شدند. جمعیت اسپور تولید شده در هر ارلن هر 12 ساعت یکبار به مدت 4 روز بوسیله لام هماسیتومتر شمارش گردید و میزان رشد جمعیت قارچ در ارلن های حاوی عصاره گیاهان مقاوم و سالم از هر دو تیمار بررسی شد. در آزمایش دیگر، عصاره بدست آمده از تیمارهای قبلی پس از عبور دادن از فیلتر میلی پور به طور جداگانه به نسبت 5 درصد به تشتک پتری حاوی محیط کشت 2YMDA اضافه شد. عصاره ها زمانی که هنوز محیط کشت کاملاً بسته نشده بود به تشتک های پتری اضافه گردیدند. پس از سرد شدن و بسته شدن محیط های کشت 200 میکرولیتر از

[1]- Yeast Malt Dextrose Broth
[2]- Yeast Malt Destrose Agar

سوسپانسیون اسپور قارچ (103 کنیدی در میلی لیتر) به آرامی روی محیط کشت پخش گردید (Guo and Verreet, 2008). برای هر تیمار 3 تکرار و یک شاهد فاقد عصاره و در نظر گرفته شد. هر دو آزمایش فوق در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. تشتک های تلقیح شده در انکوباتور با دمای 18 تا 20 درجه سلسیوس و دوره نوری 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی قرار گرفتند. تشتک ها پس از گذشت 72 ساعت از نظر میزان و درصد جوانه زنی اسپورهای قارچ با استفاده از دستگاه پرگنه شمار1 و از طریق شمارش تعداد کلنی ها و مقایسه با شاهد و با استفاده از فرمول زیر مورد بررسی قرار گرفتند.

$$\frac{\text{تعدادکلنی در شاهد بدون عصاره} - \text{تعدادکلنی در تیمار}}{\text{تعداد کلنی در شاهد بدون عصاره}} \times ۱۰۰$$

بررسی بیان ژن ها با روش cDNA-AFLP

تغییر بیان ژن ها بعد از اعمال تیمار القایی با آزمون cDNA-AFLP ۲ مطابق روش (Bachem *et al*., 1996; Vos *et al* ., 1995) انجام شد. به همین منظور ابتدا برگهای ارقام مرودشت و چمران، 48 ساعت پس از تیمار القاء با استفاده از ازت مایع خرد شدند و RNA کل و سپس mRNA با استفاده از کیت شرکت کیاژن از آنها استخراج گردید. در ادامه cDNA با استفاده از کیت شرکت ویوانتیس۳ ساخته شد. پس از انجام cDNA-AFLP باندهایی که بین تیمارهای القاء شده و القاء نشده تمایز نشان می-دادند، با استفاده از کیت جداسازی DNA از ژل شرکت ویوانتیس جداسازی و با استفاده از دستگاه توالی یاب، تعیین توالی شدند. توالی هر یک از قطعات مشتق از رونوشت جدا شده با استفاده از الگوریتم BLASTx در پایگاه اطلاعاتی NCBI مطابقت داده شد.

نتایج

بررسی مقاومت نسبی ارقام

نتایج ارزیابی 40 ژنوتیپ نشان داد که همه ارقام در سطح یک درصد به طور معنی داری با هم تفاوت داشتند (جدول 1). بر اساس آزمون دانکن در سطح 5 درصد، ارقام چمران و مرودشت به ترتیب با مقیاس 32 و 34 بعنوان ارقام با مقاومت بالا و ارقام داراب2 با مقیاس 79 و تجن با مقیاس 78 به عنوان ارقام بسیار حساس در نظر گرفته شدند (جدول 2). در ارزیابی عکس العمل ارقام نسبت به عامل بیماری بر اساس مقیاس صفر تا 5(5-0) پس از 21 روز از تاریخ مایه زنی گیاهچه ها، روی برگ های پایینی ارقام مرودشت و چمران پیکنیدهای خیلی خفیفی ایجاد شد بنابراین دو رقم مذکور با قرار گرفتن در یک سطح به عنوان مقاوم با مقیاس 2 در نظر گرفته شدند. همچنین در روی برگهای دو رقم تجن و داراب 2 پیکنیدهای زیادی مشاهده گردید. بنابراین این دو رقم نیز با قرار گرفتن در یک سطح دیگر با مقیاس 5 به عنوان رقم خیلی

[1]- ColonyCounting
[2]- cDNA-AFLP
3 - Vivantis

حساس انتخاب گردیدند. این نتایج، آزمایش قبلی را که در مزرعه انجام شده بود، تایید کرد و بنابراین ارقام مرودشت، چمران، داراب 2 و تجن برای آزمون های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی اسپورزایی قارچ عامل بیماری

در آزمایش اثر عصاره ارقام بر روی جمعیت و رشد قارچ عامل بیماری، به طور کلی روند افزایش جمعیت در محیط کشت های حاوی عصاره ارقام مقاوم نسبت به عصاره ارقام حساس و همچنین نسبت به شاهد (محیط کشت فاقد عصاره گیاهی) چه در تیمارهایی که زخم اعمال شده بود و چه در تیمارهایی که زخم نشده بودند پایین تر بود (شکل 1 الی 5). در ارقام حساس جمعیت اسپورهای قارچ بعد از روز سوم به یکباره حالت تصاعدی به خود گرفت (شکل 3 و 4). در ارقام مقاوم چمران و هم در مرودشت نتایج تقریباً مشابه هم بود به این صورت که در هر دو رقم روند افزایش اسپور در محیط کشت های حاوی عصاره گیاهان زخم شده کمتر از زمانی بود که گیاهان زخم نشده بودند. به همین ترتیب روند افزایش اسپور در محیط کشت های حاوی عصاره گیاهان زخم شده که پس از 48 ساعت از زخم شدن عصاره گیری شده بودند کمتر از محیط کشت هایی بود که حاوی عصاره گیاهان زخم شده بود که 24 ساعت بعد از زخم شدن عصاره گیری شده بودند (شکل 1 و 2).

جدول 1- تجزیه واریانس بررسی عکس العمل 40 ژنوتیپ گندم نسبت به *M. graminicola* .

Table 1- Analysis of variation of 40 genotypes reaction to *M. graminicola.*

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean of squares	F value
تیمار Treatment	39	18674.592	478.836	378.4751**
خطا Error	78	98.683	1.265	
کل Total	119	18774.592		

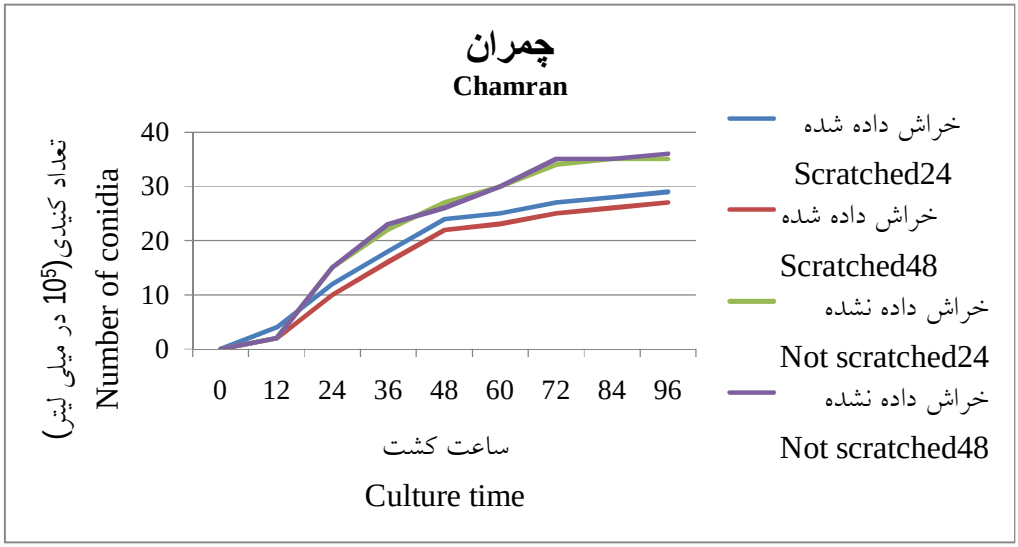
Coefficient of Variation = 1.71% ***معنی دار در سطح 1 درصد**

جدول 2 – مقایسه میانگین های بیماری بر اساس مقیاس دو رقمی (99-00) روی 40 ژنوتیپ گندم

Table 2- Comparison of disease means on 40 wheat genotypes based on double digit scale (00-99)

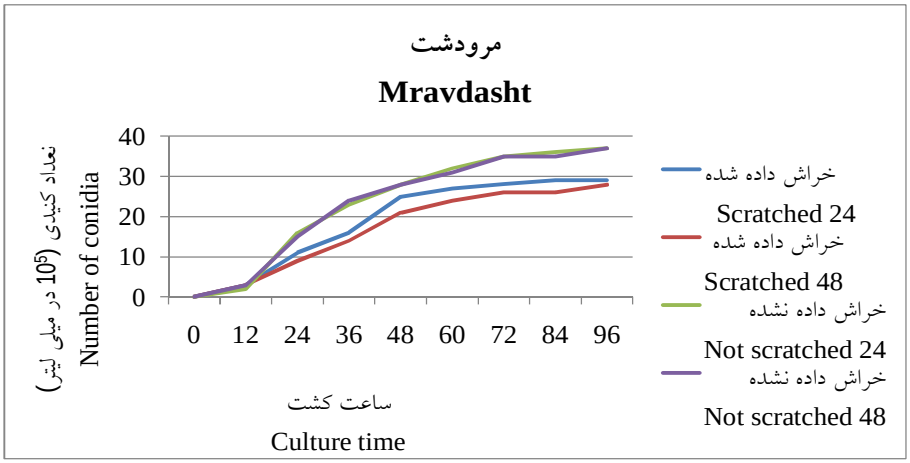
رقم cultivar	میانگین بیماری Mean of disease	مقایسه میانگین Mean comparison	رقم cultivar	مقایسه میانگین Mean of disease	مقایسه میانگین Mean comparison
داراب2 Darab2	79	A	اس79-10 S79-10	72.67	FG
تجن Tajan	78	AB	چناب Chenab	72	FG
اترک Atrak	76	BC	اس78-11 S 78-11	72	FG
سیستان Sistan	76	BC	فونگ Fong	72	GH
بولانی Bolani	76	BC	سیوند Sivand	71	H
فلات Falat	75.67	BCD	تارو Taro	71	H
هامون Hamoon	74.67	CDE	سیمره Simare	68	I
شیراز Shiraz	74.67	CDE	شوا Shova	56	J
اروند Arvand	74	CDEF	پارس Pars	55	JK
مهدوی Mahdavi	74	CDEF	مارون Maroon	54.67	JKL
دز Dez	74	CDEF	آریا Arya	54	KLM
شیرودی Shiroodi	73.67	DEFG	شهریار Shahryar	53.33	KLM
پیشتاز Pishtaz	73.67	DEFG	دریا Darya	52.67	LM
کویر Kavir	73.67	DEFG	زاگرس Zagros	52.33	LM
الوند Alvand	73.67	DEFG	کرخه Karkhe	52	M
اس75-11 S75-11	73.33	EFG	بهار Bahar	52	M
کوهدشت Kohdasht	73.33	EFG	یاواروس Yavaros	47.33	N
ویناک Veinak	73	EFG	دنا Dena	42	O
تریتیکاله Triticale	73	EFG	چمران Chamran	34	P
زرین Zarin	72.67	EFG	مرودشت	32	Q

اما، روند افزایش اسپور در محیط کشت های حاوی عصاره ارقام حساس تجن و داراب 2، چه آنهایی که زخم شده بودند و چه آنهایی که زخم نشده بودند با هم تفاوتی نمی کرد به طوریکه در پایان روز چهارم تقریباً 107× 7/5-6/5 کنیدی در میلی لیتر شمارش گردید (شکل 3 و 4). در محیط کشت های حاوی عصاره ارقام مقاوم القاء شده روند افزایش اسپور نسبت به شاهد (محیط کشت فاقد عصاره) منفی بود در حالیکه این روند در ارقام حساس نسبت به شاهد صعودی و در 48 ساعت بعد از کشت تصاعدی شد (شکل 5).



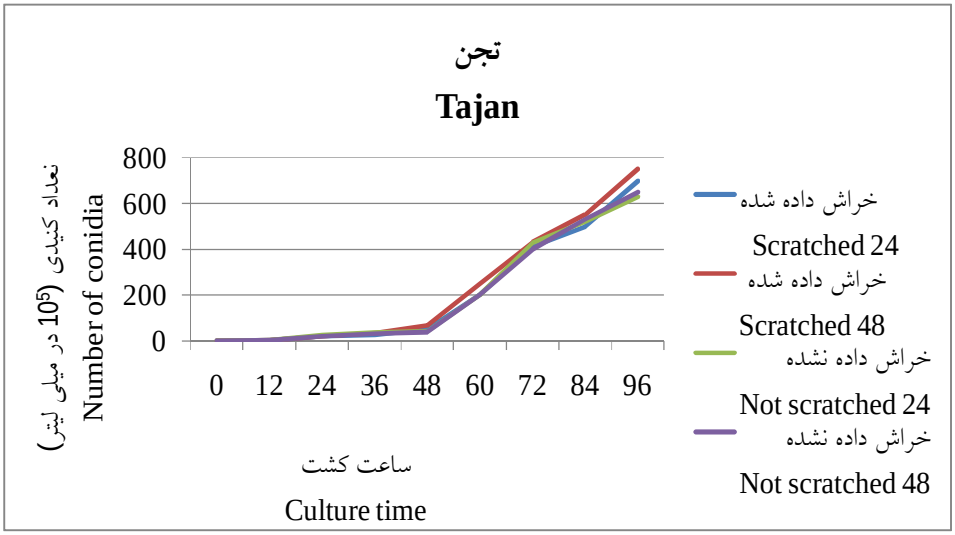
شکل 1- روند افزایش تعداد اسپورهای *Mycosphaerella graminicola* در محیط کشتهای حاوی عصاره رقم چمران القاء شده (خراش داده شده) پس از گذشت 24 و 48 ساعت از خراش دادن در مقایسه با شاهد القاء نشده (خراش داده نشده)

Figure 1- Increasing trend of *Mycosphaerella graminicola* spore number in culture media containing extract of induced cv. Chamran (scratched) 24 and 48 hour after scratching as compared to non-induced (not scratched) control.



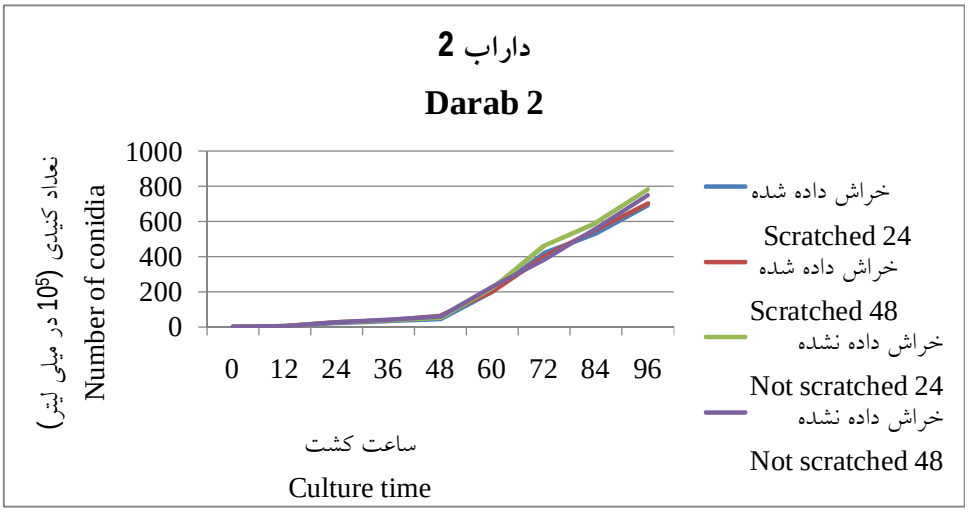
شکل 2- روند افزایش تعداد اسپورهای *Mycosphaerella graminicola* در محیط کشتهای حاوی عصاره رقم مرودشت القاء شده (خراش داده شده) پس از گذشت 24 و 48 ساعت از خراش دادن در مقایسه با شاهد القاء نشده (خراش داده نشده).

Figure 2- Increasing trend of *Mycosphaerella graminicola* spore number in culture media containing extract of induced cv. Marvdasht (scratched) 24 and 48 hour after scratching as compared to non-induced (not scratched) control.



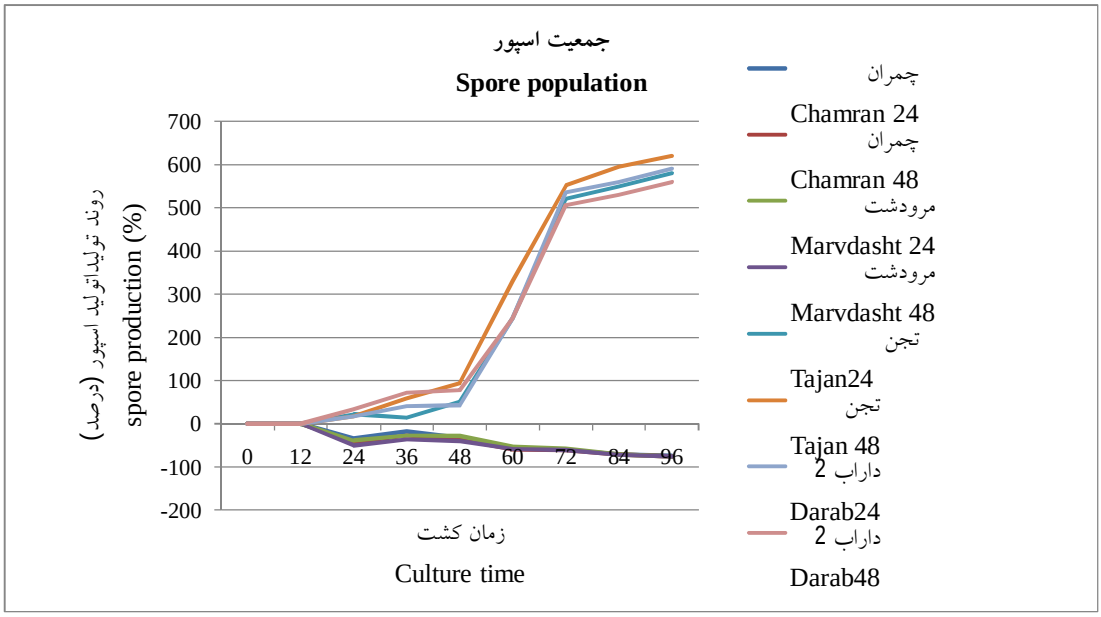
شکل 3- روند افزایش تعداد اسپورهای *Mycosphaerella graminicola* در محیط کشتهای حاوی عصاره رقم تجن القاء شده (خراش داده شده) پس از گذشت 24 و 48 ساعت از خراش دادن در مقایسه با شاهد القاء نشده (خراش داده نشده).

Figure 3- Increasing trend of *Mycosphaerella graminicola* spore number in culture media containing extract of induced cv. Tajan (scratched) 24 and 48 hour after scratching as compared to non-induced (not scratched) control.



شکل 4- روند افزایش تعداد اسپورهای *Mycosphaerella graminicola* در محیط کشتهای حاوی عصاره رقم داراب 2 القاء شده (خراش داده شده) پس از گذشت 24 و 48 ساعت از خراش دادن در مقایسه با شاهد القاء نشده (خراش داده نشده).

Figure 4- Increasing trend of *Mycosphaerella graminicola* spore number in culture media containing extract of induced cv. Darab2 (scratched) 24 and 48 hour after scratching as compared to non-induced (not scratched) control.

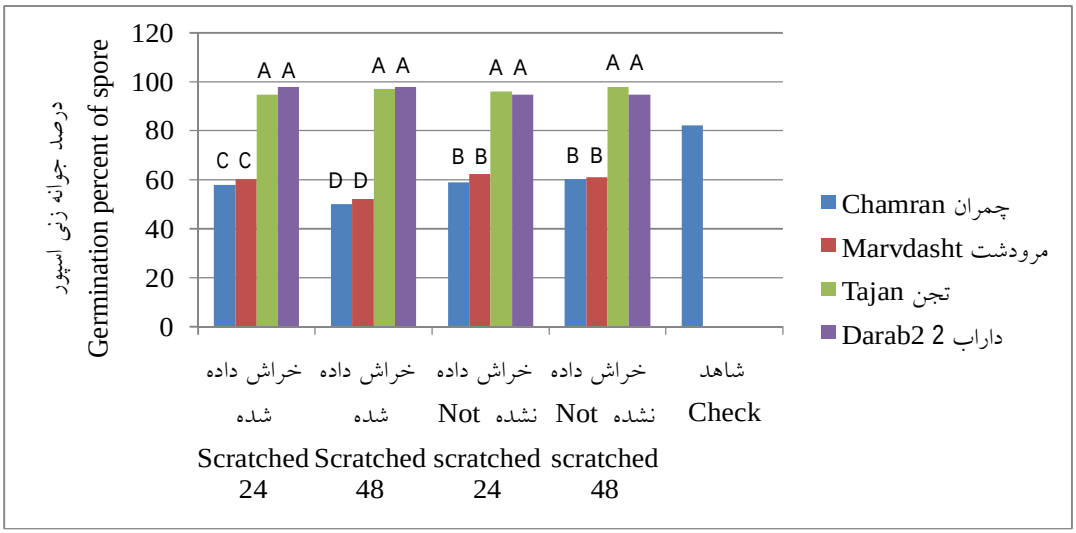


شکل 5 – مقایسه جمعیت اسپورهای *Mycosphaerella graminicola* در محیط کشت های حاوی عصاره تیمار القایی نسبت به شاهد (محیط کشت بدون عصاره گیاهی) پس از 24 و 48 ساعت از القاء.

Figure 5- Comparison of *Mycosphaerella graminicola* spore population in culture media containing extracts of induced cultivars, 24 and 48 after scratching.

بررسی درصد جوانه زنی اسپورهای بیمارگر

نتایج بدست آمده از آزمایش درصد جوانه زنی کنیدی ها که از طریق شمارش کلنی های تشکیل یافته انجام شد، نتایج به دست آمده از آزمایش اول را تایید کرد (شکل 6). درصد جوانه زنی روی محیط کشت حاوی عصاره ارقام خیلی حساس (خراش داده شده و خراش داده نشده) و ارقام مقاوم (خراش داده شده و خراش داده نشده) در سطح یک درصد با هم تفاوت معنی داری داشتند. به طوریکه درصد جوانه زنی در روی محیط کشت های حاوی عصاره ارقام حساس (خراش داده شده و خراش داده نشده) با هم تفاوتی نداشت و در مقایسه با شاهد بدون عصاره بسیار بالا بود (سطح A) ولی در روی محیط کشتهای حاوی عصاره ارقام مقاوم در مقایسه با شاهد روند کاهشی داشت و حتی درصد جوانه زنی در روی محیط های حاوی عصاره ارقام مقاوم که خراش داده شده بودند (سطح C) نیز از محیط هایی که حاوی عصاره ارقامی که خراش داده نشده بودند نیز پایین تر بود (سطح D).



شکل 6 – درصد جوانه زنی کنیدی های *Mycosphaerella graminicola* روی محیط کشتهای حاوی عصاره ارقام مقاوم(چمران و مرودشت) و حساس (تجن و داراب2) القاء شده و القاء نشده در مقایسه با شاهد.

Figure 6- Germination percent of *Mycosphaerella graminicola* spores on culture media containing induced and non-induced resistant (cvs. Chamran and Marvdasht) and susceptible (cvs. Tajan and Darab2) extracts in comparison with check.

تجزیه و تحلیل قطعات cDNA-AFLP

از برگهای ارقام چمران و مرودشت 48 ساعت پس از اعمال تیمار القایی در مقایسه با تیمار القا نشده، 29 قطعه متمایز جداسازی و تعیین توالی گردیدند. قعطات جدا شده با استفاده از Blastx تشابه قابل توجهی را با برخی از ژنهای شناخته شده درگیر در سیستم دفاعی گیاه مانند پراکسیدازهای[1] 3 و 8 در گندم نشان دادند (جدول 3). بر این اساس توالی های بدست آمده در سطح اسیدآمینه با پراکسیدازهای 3 و 8 به ترتیب 63 و 86 درصد تشابه نشان دادند.

بحث

پایین بودن روند افزایش جمعیت در محیط های کشت حاوی عصاره ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس به طور کلی چه در تیمارهایی که زخم اعمال شده بود و چه در تیمارهایی که زخم نشده بودند و همچنین پایین بودن درصد جوانه زنی اسپورها در محیط کشت های حاوی عصاره ارقام مقاوم نسبت به محیط کشت‌های حاوی عصاره ارقام حساس در تیمار های زخم شده و روند کاهشی درصد جوانه زنی اسپورها در محیط کشت های حاوی عصاره ارقام مقاوم نسبت به شاهد نشان می دهد که احتمالاً در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس قبل از آلودگی باید ترکیباتی از قبیل مواد و آنزیم های

[1]- Peroxidase

ضد میکروبی وجود داشته باشد که در جلوگیری از رشد قارچ نقش دارند و تولید این ترکیبات پس از آلوده شدن و زخم شدن با گذشت زمان بیشتر می شود و باعث القاء بیشتر مقاومت در ارقام مقاوم نسبت به عامل بیماری می گردد. اما در ارقام حساس، این مواد وجود ندارد و یا خیلی دیر القاء می شوند و بنابراین نرخ رشد قارچ عامل بیماری زیاد و تصاعدی بوده و به همین دلیل بیماری می تواند در مناطقی که ارقام حساس کشت شده اند و شرایط محیطی مناسب است به شکل اپیدمی در بیاید. نتایج بدست آمده نشان می دهد که می توان از عصاره گیاهی برای بررسی مقاومت ارقام نسبت به عامل بیماری سوختگی برگ گندم در شرایط آزمایشگاه استفاده کرد. روش cDNA-AFLP یک روش بسیار حساس برای مشاهده و بررسی الگوی بیان ژن هایی است که با فراوانی کمی بیان می شوند (Yin *et al.*, 2010). در این مطالعه، الگوی بیان ژنی دو رقم چمران و مرودشت 48 ساعت پس از انجام تیمار خراش دادن بررسی شد و 29 قطعه متمایز جداسازی گردید. در بین قطعات جدا شده دو ژن با عملکرد دفاعی شامل پراکسیداز 3 و8 به ترتیب در چمران و مرودشت مشاهده شد. مطالعات زیادی القاء ژنهای پراکسیداز را پس از زخم شدن در گیاهان نشان می دهند (Almagro *et al.*,2009). با توجه به اینکه این ترکیبات از مواد بازدارنده رشد بیمارگر می باشند. لذا، نتایج مشاهده در آزمون های مربوط به اثرات عصاره ها روی رشد و جوانه زنی اسپورها را توضیح می-دهد. بنابراین با القا این ژنها بوسیله اعمال تیمار خراش در برگهای ارقام مقاوم، سیستم دفاعی فعال شده و ترکیبات ضد میکروبی تولید می شود که باعث جلوگیری از اسپورزایی و جوانه زنی اسپورهای بیمارگر می گردد و پژوهش های دیگر نیزآن را تایید می نماید(Kema *et al.*, 1996). بنابراین، نتایج حاصل از این پژوهش نشان می-دهد که می توان از این روش برای بررسی مقاومت نسبی ارقام گندم نسبت به قارچ Mycosphaerella graminicola در شرایط درون شیشه ای استفاده کرد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت محترم علمی و فناوری ریاست جمهوری، معاونت پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی و معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است که نویسندگان صمیمانه از همکاری آنها تشکر می‌نمایند.

جدول 3- مقایسه قطعات جدا شده با روش cDNA- AFLP با ژنهای شناخته شده موجود در بانک ژن.

Table 3- Comparison of isolated fragments by cDNA- AFLP to known genes deposited in GenBank.

شماره قطعه Fragment number	طول Length(bp)	تشابه با ژنهای شناخته شده Similarity to known genes	درصد تشابه (BLASTx)	E-value
Ch-1	361	*Triticum monococcum* peroxidase 3 (POX3) (AY857757)	93	1e-08
Ma-1	416	*Triticum monococcum* peroxidase 8 (POX8) (AY857762)	86	6e-108

منابع

Adhikari TB, Balaji B, Breeden J, Goodwin SB (2007). Resistance of wheat to *Mycosphaerella* graminicola involves early and late peaks of gene expression. Physiological and Molecular Plant Pathology 71: 55–68.

Adhikari TB, Wallwork H, Goodwin SB (2004) Microsatellite markers linked to the Stb2 and Stb3 genes for resistance to Septoria tritici blotch in wheat. Crop Science 44: 1403-1411.

Almagro L, Go´mez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barcelo A, Pedren MA (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. Journal of Experimental Botany 60: 377–390.

Bachem CW, Hoeven RS, Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. Plant Journal 9: 745–75.

Brading PA, Verstappen ECP, Kema GHJ, Brown JKM (2002). A gene-forgene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* blotch pathogen. Phytopathology 92: 439–45.

Cohen L, Eyal Z (1993). The histology processes associated with the infection of resistance and susceptible wheat leaves by *Septoria tritici*. Plant Pathololgy 42:737-743.

Cowger C, Hoffer ME, Mundt CC (2000). Specific adaptation by Mycosphaerella graminicola to a vertically resistant wheat cultivar. Plant Pathololgy 49: 445–51.

Eyal Z, Scharen AL, Prescott JM, Van Ginkel M (1987). The Septoria Disease of Wheat : Concepts and Methods of Disease Management . CIMMYT Mexico, DF. 45pp.

Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourqoue S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Molecular Plant-Microbe Interactions 19: 711-724.

Guo JR, Verreet JA (2008). Formation and germination of Septoria tritici secondary conidia as affected by environmental factors. Phytopathology 156: 635–637.

Kema GHJ, Yu D, Rijkenberg FHJ, Shaw MW Baayen RP (1996). Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Phytopathology 86:777-786.

Kema GHJ, Verstappen ECP, Waalwijk C (2000). Avirulence in the wheat *Septoria tritici* leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* is controlled by a single locus. Molecular Plant–Microbe Interactions 13: 1375-1379.

Shaw MW (1991) Interacting effects of interrupted humid periods and light on infection of wheat leaves by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*). Plant Pathology 40: 595-607.

Quaedvlieg W, Kema GHI, Groenewald JZ, Verkley GJM, Seifbarghi S, Razavi M, Mirzadi A, Mehrabi R, Crous PW (2011). *Zymoseptoria* gen. nov.: A new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. Persoonia 26: 57–69.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407–4414.

Yin J, Wang G, Xiao J, Ma F, Zhang H, Sun H, Diao Y, Huang J, Guo Q, Liu D (2010). Identification of genes involved in stem rust resistance from wheat mutant D51 with the cDNA-AFLP technique. Molecular Biology Reports 37: 1111–1117.

In vitro plant extract test for screening relative resistance of wheat cultivars against *Mycosphaerella graminicola*

M. R.Eslahi[1], N. Safaie[*1], A. Saidi[2] and M. Shams-Bakhsh[1]

[1]Department of Plant Pathology, College of Agriculture, University of Tarbiat Modares
[2]Department Biotechnology, College of New Technology and Engineering, Shahid Beheshti University

Abstract

Septoria tritici blotch (STB) caused by *Mycosphaerella graminicola*, is one of the most devastating disease of wheat worldwide. Due to time and rate of defense genes expression, cultivar reaction to disease is different. So time and rate of defense genes expression can lead to develop an in vitro test for screening relative resistance of cultivars against pathogen. Forty wheat genotypes were screened by artificial infection and Marvdasht and Chamran as a resistant and Darab2 and Tajan as a susceptible cultivar were selected. Two treatments including scratched and not scratched leaves were considered for each cultivar. The soluble components were extracted 24 and 48 h after scratching the leaves and effect of extracts on sporulation and germination of *M.graminicola* spores was investigated. Increment of spore population in resistant cultivars was lower than susceptible ones. Also germination percent on media with resistant cultivars extract was lower as compared with media with extracts of very susceptible cultivars extract. The cDNA-AFLP experiment showed that expression of peroxidase 3 and 8 genes was increased in Chamran and Marvdasht cultivars respectively 48 hour after scratching the leaves. So it seems that we can use in vitro plant extract for screening relative resistance of wheat cultivars against M.graminicola.

Keywords: *leaf extract of resistant and sensitive wheat cultivar, spore population, Septoria, cDNA-AFLP, defense genes*

[*] Corresponding Author: Safaie N. Tel: +982148292346 Email: nsafaie@modares.ac.ir