بررسی میزان بیان ژن‌های *NPR1*، *MLO* و *BI-1* در گندم حساس به سفیدک سطحی تحت تیمار با القا کننده کیتوزان

مرجان خاتمی[۱]، لیلا آهنگر[۱*]، فاختک طلیعی طبری[۱] و حسین صبوری[۱] و ولی‌اله بابایی زاد[۲]

[۱] گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گروه تولیدات گیاهی

[۲] ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاهپزشکی

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۲۷

چکیده

بیماری سفیدک سطحی با عامل *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) از جمله بیماری‌های مهم گندم به شمار می‌رود که در سراسر جهان از جمله ایران سالانه میزان زیادی خسارت به این محصول وارد می‌کند. در سال های اخیر کاربرد القا کننده های دفاعی به میزان زیادی استقبال شده لذا در این مطالعه به منظور بررسی نقش کیتوزان به عنوان یک محرک زیستی مکانیسم دفاعی، رقم فلات به عنوان یک رقم حساس به سفیدک سطحی انتخاب و در مرحله دو برگی بوسیله کیتوزان اسپری برگی شد، سپس گیاهان تیمار شده به همراه گیاهان شاهد، توسط قارچ *Bgt* مایه‌زنی شدند. تمامی مراحل آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۵ در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه گنبد کاووس انجام گرفت. در نهایت الگوی تظاهر ژنهای *MLO*، *BI-1* و *NPR1* با استفاده از تکنیک qRT-PCR در چهار بازه زمانی در سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در هر دو گروه از گیاهان تیمار شده با کیتوزان و شاهد روند تظاهر ژن های مورد بررسی پس از اعمال آلودگی به صورت افزایشی بوده، به طوری که گیاهان تیمار شده القای زودهنگام و بالای ژن *NPR1* را در ساعات اولیه بعد از آلودگی با *Bgt* نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند و ۲۴ ساعت پس از آلودگی به حداکثر بیان خود رسیدند. اما میزان افزایش در ژن های *BI-1* و*MLO* در گیاهان تیمار شده کمتر از گیاهان شاهد بود، به طوریکه این گیاهان بر خلاف گیاهان شاهد در ۲۴ ساعت پس از آلودگی کمترین میزان بیان را نشان دادند که این نشان دهنده این است که این ژنها با کاهش سطح بیان خود در جهت افزایش سطح گونه های اکسیژن فعال سبب القا مرگ سلولی در گیاه شده تا از این طریق سبب ممانعت از رشد و توسعه قارچ در مراحل اولیه آلودگی گردند. علاوه بر این در این مطالعه مشخص شد که گیاهان تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، سطوح بیانی بهتری را نشان دادند، لذا می توان کاربرد کیتوزان را به خصوص در میزان کمتردر القای مقاومت سیستمیک در گندم علیه بیماری سفیدک سطحی موثر دانست.

واژه های کلیدی: گندم، کیتوزان، سفیدک سطحی، مقاومت

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۱۷۳۳۳۳۵۱۱۷ ، پست الکترونیکی: L.ahangar63@gmail.com

مقدمه

بیماری سفیدک سطحی که به وسیله قارچ انگل اجباری به نام *Blumeria graminis f. sp . tritici* (*Bgt*) ایجاد می‌گردد یکی از بیماری‌های مهم گندم است که موجب کاهش چشمگیر عملکرد کیفی و کمی در مزارع گندم می‌شود (۱۴). امروزه استفاده از روش‌های شیمیایی به دلیل ضعف در کارایی، آلودگی محیط زیست و ایجاد مقاومت در بیمارگر چندان مورد توجه قرار نمی‌گیرد. بنابراین محققان به دنبال استفاده از مواد بیولوژیک به عنوان یکی از استراتژی‌های مقاومتی در گیاهان هستند تا با کاربرد این ترکیبات بتوانند مکانیزم‌های دفاعی گیاه را قبل از مواجهه با عامل بیمارگر فعال کنند(۴۳). در سال‌های اخیر کاربرد ترکیبات شیمیایی تحت عنوان فعال کننده به میزان زیادی

مورد توجه قرار گرفته و در این بین کیتوزان به یک تمرکز اصلی پژوهش در کشاورزی تبدیل شده است. کیتوزان یک فعال کننده زیستی تجزیه‌پذیر و مشتق شده از پوست سخت پوستان است که امروزه به عنوان ماده افزایش دهنده قدرت دفاعی گیاهان علیه آلودگی‌های قارچی به کار می‌رود (۳۵). کیتوزان بوسیله پدیده مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) که یکی از انواع مقاومت‌های القایی است، منجر به تحریک فعالیت ژن‌های پاسخ دهنده به بیمارگر و القای مقاومت نسبت به عوامل بیماری‌زا خواهد شد (۴۳). شواهد حاکی از آن است که اسپری برگی کیتوزان با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر در گندم سبب کاهش رشد قارچ *Fusarium graminearum* شده است (۳). پاسخ مقاومت القایی علیه *Botrytis cinerea* در برگ های خیار تیمار شده با غلظت ۰/۲ گرم در لیتر کیتوزان نیز گزارش شده است (۸). ناندیش کومار و همکاران (۳۲) نیز با تیمار بذرها آفتاب گردان با محلول ۵٪ کیتوزان توانستند بیماری کپک زدگی را توسط قارچ *Plasmopara hastedii* ایجاد می‌گردد را به میزان ۴۶-۵۲ درصد به ترتیب در شرایط گلخانه و مزرعه کنترل نمایند. گزارش‌ها همچنین نشان داد که ارزن تیمار شده با نانوذرات کیتوزان بیان بالایی از ژن‌های *PAL*، *PR1*، *PR5*، پراکسیداز و فنیل اکسیداز پس از تیمار با اومایسیت بیوتروف *Sclerospora graminicola* نشان دادند (۳۷).

گیاهان دارای یک سیستم امنیتی بسیار قوی بوده و در مواجهه با هر نوع تنشی، گروهی از پروتئین‌ها تحت عنوان پروتئین‌های مرتبط با بیمارگر (PR) را تولید می نمایند. پروتئین‌های PR گروه متنوعی از پروتئین‌های گیاهی هستند که موجب تخریب دیواره‌های سلول قارچی، ایجاد اختلال در غشاهای سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماری‌زایی و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می‌شوند (۴۲). نسخه بیان نشده ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی *Non-expresser of PathogensisRelated genes 1*(*NPR1*)، به عنوان واسطه کلیدی در مقاومت القایی شناخته شده است (۳۹). مطالعات نشان داد که وجود *NPR1* برای آشکار سازی SAR جهت القای مکانیسم دفاعی علیه طیف وسیعی از بیمارگرها مورد نیاز می‌باشد (۱۴ و ۹). پروتئین NPR1 تحت شرایط نرمال به صورت الیگومریک غیرفعال در سیتوزول سلول وجود دارد، اما به محض آلودگی گیاه به بیمارگر وضعیت اکسایشی سلول تغییر یافته و پروتئین NPR1 بوسیله شکستن پیوندهای دی‌سولفید خود به فرم مونومری تبدیل شده (۳۱) که می‌تواند بوسیله کنش با نوع خاصی از فاکتورهای تنظیم کننده رونویسی (TGA)، بیان ژن‌های دفاعی PR را القاء کند (۳۱ و ۲۲). NPR1 همچنین بوسیله تنظیم سیگنال‌های پایین دست سالسیلیک اسید (SA) بر مسیر SAR تاثیر می‌گذارد (۱۴ و ۱۳). به طوری که موتانت‌های *npr1* آرابیدوپسیس، فاقد توانایی القای ژن‌های *PR* و افزایش SAR حتی پس از تیمار با SA می‌باشند. درحالیکه انتقال ژن *NPR1* به این نوع گیاهان موتانت، نه تنها سبب رفع شدن تاثیر جهش می‌شود بلکه پاسخ به عوامل تحریک کننده SAR را با بیان بالای ژن *PR*، به حالت اول بر گردانده و سبب مقاومت به آلودگی *Pseudomonas syringae* می‌شود (۱۱).

مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (PCD = Programmed Cell Death) یکی از مکانیسم‌های دفاعی گیاهان و حیوانات علیه عوامل بیماری‌زا است. پدیده PCD در حیوانات است بوسیله اعضای خانواده پروتئین BAX (BCL2- Associated X protein) تنظیم می‌گردد (۲۰). اگرچه تاکنون هیچ همولوگی از پروتئین BAX در ژنوم گیاهی شناسایی نگردید، اما محققین ژن دیگری که به عنوان مهارکننده *BAX* (*BI-1*)(BAX- inhibitor) است را در گیاهان شناسایی نمودند (۱۶ و ۶) که بیان بالای آن در گیاهان منجر به حساسیت به بیمارگر بیوتروف و افزایش مقاومت به بیمارگر نکروتروف می‌شود (۲۱ و ۶). علاوه بر این، یکی دیگر از ژن‌هایی که نقش مهمی در حمایت از مرگ سلولی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایفا

می‌نماید، ژن *MLO* (*Mildew Resistance Locus O*) است (۳۴ و ۲۶). پروتئین MLO یک پروتئین غیرعادی تراغشایی است که آلل وحشی آن، تنظیم کننده منفی مرگ سلولی در گیاه بوده (۲۶) به طوریکه بیان بالای ژن *MLO* در گیاه جو سبب حساسیت بسیار بالای این گیاهان به سفیدک سطحی (*Bgh*) و افزایش میزان نفوذ قارچ در دیواره سلولی و تشکیل هاستوریوم گردید (۲۴). شواهد همچنین نشان داده است که میزان بیان ژن *MLO* در طی پیری برگ به طور موثری کاهش می‌یابد (۳۴). همچنین رینستادلر و همکاران (۳۶) با استفاده از آلل موتانت *mlo* در جو نشان دادند که پروتئین MLO برای القای حساسیت به سفیدک بسیار مهم می‌باشد. به طوری که مطالعات نشان داده است که بیان ژن‌های *BI-1* و *MLO* در موتانت *mlo5* جو از طریق تخریب مکان تجمع پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و سرکوب نمودن پاسخ‌های دفاعی سبب تسهیل در نفوذ قارچ *Bgh* و حساسیت در گیاه گردید (۱۵).

کیتوزان یک الیسیتور زیستی است که در تحقیق حاضر به منظور کاهش اثرات مخرب قارچ‌کش‌ها بر سلامت موجودات زنده و محیط زیست، از تاثیر القا کنندگی آن در گندم نسبت به بیماری سفیدک سطحی استفاده گردید. از سویی با توجه به اینکه تاکنون مطالعات خاصی در مورد تاثیر کیتوزان بر میزان بیان ژن‌های *MLO*، *BI-1* و *NPR1* در بیماری سفیدک سطحی گندم صورت نگرفته است. لذا در این مطالعه به بررسی تاثیر این القاکننده بر تغییرات نسبی این گروه از ژن ها در گندم آلوده به *Bgt*، پرداخته شد.

مواد و روشها

در این تحقیق رقم فلات به عنوان رقم حساس به بیماری سفیدک سطحی انتخاب شد (۳). بذرهای این رقم از ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبد تهیه گردید. جدایه قارچ *Blumeria graminis* F. sp. *tritici (Bgt)* نیز از بخش تحقیقات پاتولوژی غلات موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه و به دلیل بیوتروف بودن، عامل بیماری در اتاقک رشد روی رقم حساس بولانی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰٪ در طول مدت این بررسی تکثیر و نگهداری شد (۳۰).

ارزیابی کاربرد کیتوزان در القای مقاومت به بیماری سفیدک سطحی: به منظور بررسی کاربرد کیتوزان در القای مقاومت در گندم در برابر بیماری سفیدک پودری، برگ گیاهان حساس، ۲۴ ساعت پس از تیمار با غلظت های مختلف کیتوزان به همراه گیاهان کنترل در محیط آب آگار حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بنزیمیدازول در تشتک‌های پتری قرار داده شدند. یک هفته پس از مایه‌زنی، تعداد کلنی رشد یافته در ۲/۵ سانتیمتر مربع هر برگ شمارش گردید. آزمایش با پنج تکرار برای هر تیمار انجام شد (۷ و ۲). سپس نتایج حاصله با آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) تجزیه و تحلیل گردید.

تیمار نمودن گیاهان و آلوده سازی با قارچ سفیدک پودری جهت بررسی الگوی بیان ژن: برای بررسی تأثیر القاکننده کیتوزان در مقابل عامل بیماری، بذرها گندم رقم فلات به مدت یک دقیقه با محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شده و پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر روی کاغذ فیلتر مرطوب در تشتک پتری قرارداده شدند. پس از جوانه‌زنی، بذرها به گلدان حاوی خاک مزرعه و ماسه (۱:۱) ضدعفونی شده منتقل شده و در اتاقک رشد با تناوب ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و هشت ساعت تاریکی با دمای ۲۰ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی۷۰ درصد نگهداری شدند. پس از گذشت دو هفته، گیاهچه‌ها به‌وسیله محلول کیتوزان (Sigma Alderich/ MMW) با غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسپری برگی شدند(۳). برای حل نمودن کیتوزان ابتدا آن را با اسید استیک یک درصد حل نموده و سپس به حجم مورد نظر رسانیده شد. گیاهان شاهد نیز با محلول آب و اسید استیک، تیمار شده و در اتاقک کشت

نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار گیاهان با کیتوزان، برگ‌های گیاهان تیمار شده به همراه گیاهان شاهد، به وسیله اسپورهای قارچ عامل بیماری در غلظت ۵۰ کنیدیوم در میلی‌متر مربع مایه‌زنی شدند. نمونه‌برداری از گیاهان شاهد و آلوده در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی، انجام شد و نمونه‌های برگی در فریزر ۸۰°C- جهت استخراج RNA کل نگهداری شدند.

استخراج RNA از نمونه‌ها، ساخت cDNA و اندازه‌گیری الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه: برای استخراج RNA از نمونه‌های برگی، از کیت RNX-plus شرکت سیناژن (Cat, No: RN7713C) استفاده گردید. سپس کیفیت RNA استخراج شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد ارزیابی شد. آنگاه نمونه‌های RNA، جهت زدودن DNA بوسیله آنزیم DNase 1 سیناکلون (cat. No: MO5401) تیمار شده و cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis سیناکلون (cat. No: RT5201) ساخته شد. تمامی این مراحل طبق دستورالعمل هر کیت انجام گرفت. بررسی بیان ژن (qRT-PCR) با استفاده از دستگاه C1000™ Thermal Cycler (AB) و کیت Sina SYBR Blue HS- qPCR Mix (Cat. No: MM2171)(2X) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۷ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس سپس ۴۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سلسیوس و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس) بود. پس از اتمام واکنش PCR، برای رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ۹۵-۶۰ درجه سلسیوس با اختلاف ۰/۵ درجه در هر چرخه انجام گرفت. به منظور استاندارد نمودن داده‌ها، نمونه‌ها بوسیله ژن خانه‌دار *Actin* نرمال گردیدند. لیست آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. این آغازگرها پس از هم ردیف نمودن توالی‌های بدست آمده از بانک ژنی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) بوسیله نرم‌افزارهای BioEdit 7.0.9.0 و OligoExplorer V1.4 طراحی شدند.

نرخ بیان ژن نیز به روش $\Delta\Delta$ CT = (CT target gene – CT actin)$_{sample}$ – (CTtarget gene – CT actin)$_{calibrator}$ اندازه‌گیری شد(۲۸). 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 حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) ارزیابی شدند.

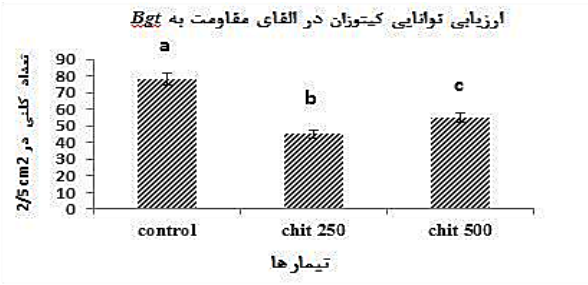
جدول ۱- لیست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

منبع آغازگر	اندازه محصول	آغازگر برگشت	آغازگر رفت	نام آغازگر
DN551593	bp 150	AGTGTCTGGATCGGTGGTTC	AGCCCAATCATAGGAAAAG TGC	***TaActin***
KM017011	bp 149	GTA GTC CAC CTT GGT GAC C	TAC CAG TTC GCA AAT GAT CCT G	***TaMLO***
FJ705442, GU564292	bp 149	AGA CTG GCA CCG AGA ACA TC	CCA CCT CAA GCT CGT TTA CC	***TaBI-1***
KMo17012	bp 157	GAA CAG TAT AAC CTC TTG GGT TTC	GCT TGT CAG GAT GCT GCT C	***TaNPR1***

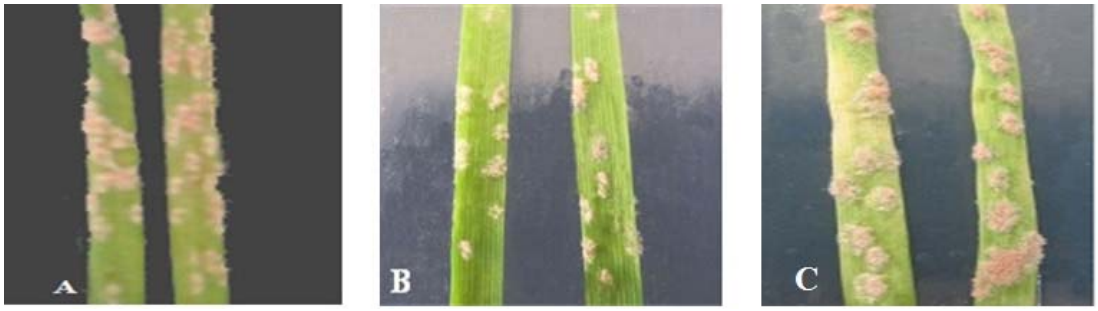
نتایج

ارزیابی فنوتیپی اجزای مقاومت در نتیجه کاربرد کیتوزان: بر اساس نتایج به دست آمده تعداد کلنی رشد یافته در برگ گیاهان تیمار شده با سطوح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۴۳ و ۲۹/۴ درصد نسبت به

گیاهان شاهد، کاهش معنی‌داری را نشان دادند (شکل۱). این نتایج بیانگر آن است که مقاومت القاء شده توسط کیتوزان نقش مهمی در مقاومت گندم علیه سفیدک پودری و کاهش پیشرفت بیماری ایفا می‌کند (شکل۲). نتایج حاصله با نتایج فائورو و همکاران (۱۷) و کورس وهمکاران (۲۵) مبنی بر کاهش بیماری سفیدک سطحی جو مطابقت داشت. آمبوراب و همکارن (۵) نیز بیان کردند که کیتوزان بدلیل ماهیت پلی کاتیونی خود باعث تخریب ساختمان سلولی و تراوش الکترولیت‌ها و پروتئین‌ها شده و بدین ترتیب می‌تواند از رشد بیمارگر ممانعت نماید. از سویی نتایج حاکی از تاثیر معنی دار کیتوزان ۲۵۰ نسبت به کیتوزان ۵۰۰ میلی گرم در لیتر در کاهش شدت بیماری بود.



شکل ۱- ارزیابی توانایی کیتوزان در القای مقاومت در گندم به قارچ *Bgt* بر اساس تعداد کلنی‌های رشد یافته در $۲/۵cm^2$ در برگ گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر و تیمار نشده (شاهد). مقایسه میانگین به روش LSD در سطح ۱٪ انجام گرفت.

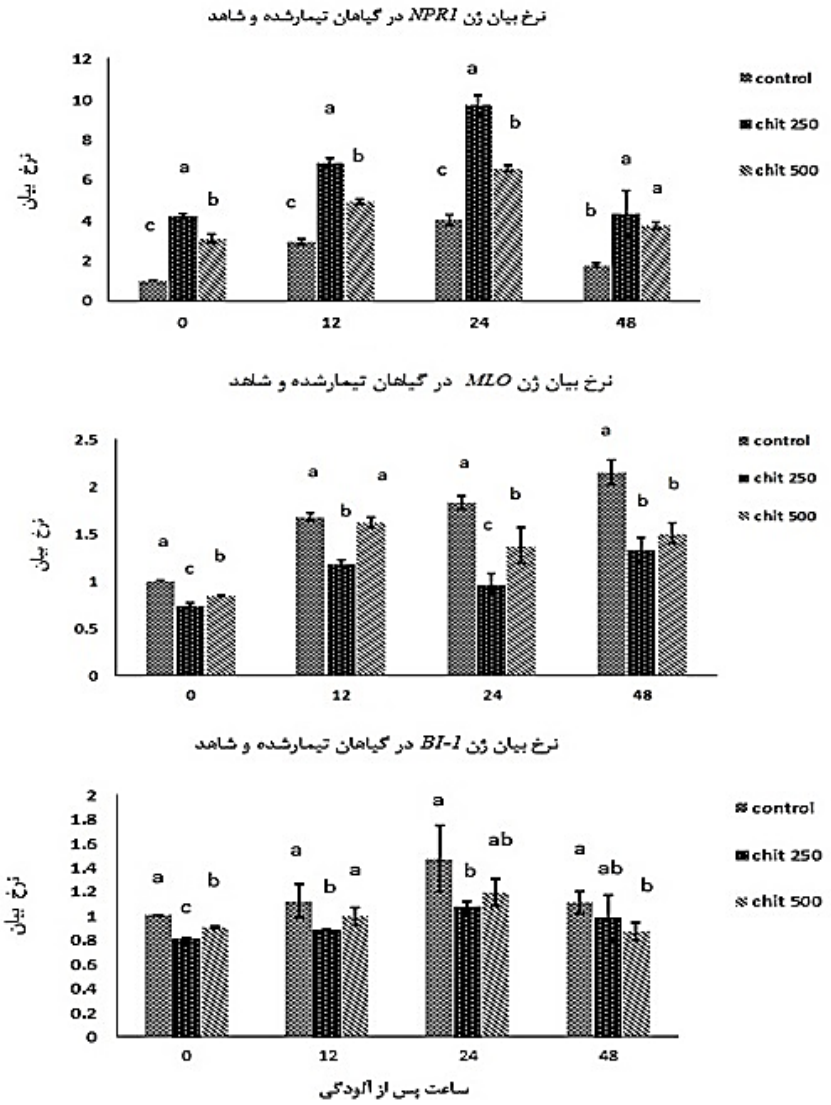


شکل ۲- تعداد کلنی‌های رشد یافته در برگ گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ (**B**) ، کیتوزان ۵۰۰ (**C**) میلی گرم در لیتر و گیاهان شاهد (**A**).

اندازه‌گیری الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه در گندم تحت تیمار با کیتوزان:

ژن *NPR1* : آنالیز qPCR نشان داد که میزان بیان ژن *NPR1* در گیاهان تیمار شده با کیتوزان قبل اعمال بیماری روند افزایشی داشته، به طوری‌که گیاهان تیمار شده در ۲۴ ساعت پس از تیمار با کیتوزان ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب با میزان بیان ۴/۲و ۳/۱ افزایش معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نسبت به گیاهان کنترل نشان دادند (شکل ۳). همچنین آنالیز بیان ژن پس از اعمال آلودگی نیز حاکی از روند افزایشی میزان رونوشت ژن *NPR1* در گیاهان پیش تیمار شده و کنترل بود ولی روند افزایشی بیان ژن در گیاهان پیش تیمار شده به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان شاهد بوده است. گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم، ۱۲ ساعت پس از آلودگی به ترتیب با افزایش میزان بیان ۲/۳ و ۱/۶۸ برابری نسبت به گیاه کنترل، تفاوت معنی‌داری نشان دادند. سپس این گیاهان در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به ترتیب با میزان بیان ۹/۷ و ۶/۵ برابری نسبت به زمان صفر به بیشترین میزان بیان ژن *NPR1* رسیدند. از سویی گیاهان کنترل نیز روند افزایشی ولی آرامی از بیان را نشان دادند و سپس در ۲۴ ساعت پس از آلودگی با ۴ برابر افزایش بیان نسبت به زمان صفر به حداکثر بیان خود رسیدند. اگرچه هر دو گروه از گیاهان در یک بازه به بیشینه بیان رسیدند ولی مقایسه میزان بیان در زمان اوج بیان نشان داد که در گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم میزان بیان به ترتیب ۲/۴ و ۱/۶۳برابر بیشتر از گیاهان کنترل می‌باشد که این افزایش بیان معنی‌دار بود. سپس در ساعات بعدی (۴۸ ساعت) پس از آلودگی میزان بیان روند کاهشی را نشان داد، در حالی‌که

میزان کاهش در گیاهان کنترل به طور معنی‌داری کمتر از گیاهان پیش تیمار شده بود. از سویی نتایج نشان داد که سطح بیان ژن *NPR1* در گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار ۵۰۰ میلی گرم کیتوزان بود.



شکل ۳ –سطح بیان ژن‌های *NPR1* ، *MLO* و *BI-1* در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و گیاهان کنترل پس از آلودگی با *Bgt* . مقایسه میانگین بین تیمارها در هر بازه زمانی با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد انجام گرفت. میل بارها نشان دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می‌باشد.

NPR1 یکی از تنظیم کننده‌های کلیدی مقاومت القایی در گیاه می‌باشد که بوسیله تاثیر در نواحی پایین دست مسیر سیگنال‌دهی SA، سبب فعال سازی بیان ژن‌های *PR*، القای مرگ سلولی و در نهایت مقاومت به طیف وسیعی از بیمارگرها می‌شود (۳۹ و ۱۰). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن *NPR1* در گیاهان پیش تیمار شده و کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافت. به طوری‌که این گیاهان در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی، همزمان با نفوذ میخ رخنه و رشد هاستوریوم (۱۶) به بیشترین میزان بیان خود رسیدند. همچنین گزارش شد که

کیتوزان سبب القای مکانیسم SAR در گیاه شده که این مکانیسم به فعال شدن *NPR1* با موقعیت درون هسته‌ای نیاز دارد (۱۴ و ۱۳)، لذا با توجه به نتایج حاصله چنین استنباط می‌گردد که اسپری کردن کیتوزان بر روی برگ رقم فلات نقش موثری در القای مقاومت از طریق افزایش آمادگی در گیاه حساس دارد. به این دلیل گیاهان پیش تیمار شده به محض آلودگی، بیان بالا و سریعی از ژن *NPR1* را نشان داده تا با القای SAR از نفوذ و گسترش بیماری در گیاه جلوگیری نمایند که با نتایج فیتزا و همکاران (۱۸) و لاندی و همکاران (۲۷) مطابقت داشت. همچنین با توجه به اینکه ژن *NPR1* در ساعات اولیه پس از آلودگی به طور معنی‌داری در فلات تیمار شده افزایش یافته، می‌توان چنین تصور نمود که ژن *NPR1* می‌تواند به عنوان شاخصی برای القای مقاومت به بیمارگر در نظر گرفته شود. نقش *NPR1* در مقاومت گندم به فوزاریوم (۲۹)، آرابیدوپسیس به سفیدک سطحی (۳۸) تایید شده است. ماکاندار و همکاران (۲۹) نیز طی مطالعاتی بوسیله انتقال ژن *AtNPR1* به گندم حساس سبب افزایش بیان ژن *NPR1*، فعال نمودن SAR و افزایش مقاومت به *Fusarium graminearum* گردیدند.

ژن *MLO* : نتایج آنالیز بیان ژن *MLO* نشان داد که پس از محلول پاشی کیتوزان، سطح تظاهر این ژن به طور قابل توجهی کاهش یافت، بطوری‌که گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب با میزان بیان ۰/۷۴ و ۰/۸۳ نسبت به زمان کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۳). همچنین بررسی تغییرات الگوی بیان ژن *MLO* پس از آلودگی با بیمارگر نشان داد بیان این ژن در ۱۲ ساعت پس از آلودگی در گیاهان تیمار شده و شاهد نسبت به زمان صفر القا گردید ولی گیاهان پیش تیمار شده به خصوص در تیمارکیتوزان ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر با کاهش ۱/۴۲ برابری نسبت به گیاهان کنترل، تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. از سویی ارزیابی میزان بیان این ژن در ۲۴ ساعت پس از آلودگی حاکی از متفاوت بودن روند تغییرات در گیاهان تیمار شده و کنترل بود. به طوریکه گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب با میزان بیان ۰/۹۵ و ۱/۳ برابری نسبت به زمان کنترل به حداقل بیان بعد از آلودگی رسیدند، در حالیکه گیاهان کنترل با میزان بیان ۱/۸ برابری نسبت به زمان صفر سیر صعودی از بیان ژن را نسبت به گیاهان پیش تیمار شده نشان دادند. مقایسه سطح تظاهر این ژن در بازه ۲۴ ساعت پس از آلودگی حاکی از آن است که میزان بیان در گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب ۱/۹ و ۱/۳ برابر کمتر از گیاهان کنترل می‌باشد. از سویی نتایج الگوی بیان حاکی از کاهش معنی‌دار سطح بیان این ژن در تمامی بازه‌های زمانی در گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ نسبت به تیمار ۵۰۰ میلی گرم در لیتر بود.

پروتئین MLO ، گیرنده‌های غشاء پلاسمایی می‌باشند که فرم وحشی ژن آن تنظیم کننده منفی مرگ سلولی در گیاه می باشد (۲۶). آنالیز بیان ژن *MLO* در رقم حساس پس از تیمار با سطوح کیتوزان نشان داد که سطح تظاهر این ژن پس از محلول پاشی به طور قابل توجهی کاهش یافت که این نتیجه بیانگر تاثیر منفی این القا کننده شیمیایی در القای بیان این ژن می‌باشد. در حالی‌که پس از اعمال آلودگی با قارچ *Bgt* سطح بیان ژن در گیاهان تیمار شده و کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافت که این نتیجه می‌تواند به دلیل درک اولیه گیاه از حمله قارچ سفیدک سطحی باشد، در حالی‌که میزان بیان در گیاهان پیش تیمار شده به طور معنی‌داری کمتر از گیاهان کنترل بود. از این کاهش بیان چنین تصور می‌شود که گیاهان القا شده همراه با کاهش سطح ژن *MLO*، تولید H_2O_2 را که مرتبط با فرآیندهای دفاعی و مرگ سلولی در گیاه است (۱۲) در همان ساعات اولیه پس از آلودگی جهت مقابله با لوله تندشی اولیه و اپرسوریوم قارچ آغاز می‌کنند (۴۰). سپس گیاهان تیمار شده برخلاف گیاهان کنترل، در ۲۴ ساعت پس از آلودگی، اقدام به کاهش سطح بیان ژن *MLO* نموده، به طوریکه در

این بازه زمانی بیشترین تفاوت معنی‌دار بین دو گروه (تیمار شده و کنترل) از گیاهان مشاهده گردید. همانطور که ذکر شد ژن *MLO* واکنش دفاعی را سرکوب نموده و سبب القای حساسیت به بیمارگرهای بیوتروف می‌گردد، لذا فقدان و یا کاهش بیان این ژن، سبب القای مرگ سلولی، تشکیل پاپیلا، پیری زودرس و بیان ژن‌های *PR* در پاسخ به بیمارگر می‌گردد (۳۴). بنابراین، کاهش قابل ملاحظه‌ی بیان ژن *MLO* در ۲۴ ساعت پس از آلودگی همزمان با نفوذ میخ رخنه و توسعه هاستوریوم قارچ را می‌توان بدین صورت توجیه نمود. مطالعات نشان داد که H_2O_2 تولید شده می‌تواند از سویی در تشکیل پاپیلا و از سویی در مرگ سلولی نقش داشته باشد، لذا تلقیح کیتوزان بر روی گیاه با القای کاهش سطح بیانی ژن *MLO* در جهت افزایش میزان H_2O_2 سبب القای مسیر SAR و پاسخ‌های مقاومتی و مرگ سلولی در محل حمله قارچ شده و بدین ترتیب از گیاه در برابر توسعه قارچ بیوتروف حمایت می‌نماید. نتایج حاصله با نتایج آهنگر و همکاران (۱) مبنی بر کاهش بیان ژن *MLO* در گندم تیمار شده با سالسیلیک اسید تحت بیماری *Bgt* مطابقت داشت. ژو و همکاران (۴۵) *گزارش نمودند که ژن MLO در خیار سبب حساسیت به بیماری سفیدک سطحی شده است. در حالیکه* پسینا و همکاران (۳۳) نیز با سرکوب نمودن ژن *MLO* در انگور توانستند حساسیت به *Erysiphe necator را کاهش دهند.* اولین گزارش از تاثیر کیتوزان در سرکوب بیان ژن *MLO* در گندم آلوده به *Bgt* می‌باشد.

ژن *BI-1* : پروتئین BI-1 یکی از تنظیم کننده‌های منفی مرگ سلولی است که دارای نقش همه جانبه در پاسخ به استرس می‌باشد (۲۶ و ۱۹). به طوریکه شواهد بیانگر این بود که بیان بالای این ژن از مرگ سلولی ایجاد شده توسط H_2O_2 و SA نیز جلوگیری می‌نماید (۲۳). پروتئین BI-1 همچنین در کنار کنترل مرگ سلولی، قادر خواهد بود مقاومت غیراختصاصی جو در موتانت *mlo* را از بین برده و سبب نفوذپذیری این گیاهان به ایزوله‌های مختلف قارچ سفیدک سطحی گردند (۱۵). تجزیه و تحلیل بیان ژن *BI-1* نشان داد که گیاهان پیش تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب با میزان بیان ۰/۸و ۰/۹ برابری نسبت به زمان صفر کاهش معنی‌داری را نسبت به گیاه کنترل نشان دادند (شکل ۳). در حالیکه نتایج آنالیز بیان ژن *BI-1*، پس از اعمال آلودگی حاکی از افزایش بیان این ژن همراه با روندی متفاوت در گیاهان پیش تیمار شده و کنترل بود. بیان این ژن در هر دو گروه از گیاهان در ۱۲ ساعت پس از آلودگی القاء گردید ولی تفاوت معنی‌داری بین کیتوزان ۵۰۰ با گیاهان کنترل مشاهده نشد. در حالیکه گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ میلی گرم در لیتر، با کاهش ۱/۳ برابری نسبت به گیاه کنترل تفاوت معنی‌دار را نشان دادند . این گیاهان (تیمار کیتوزان ۲۵۰) نهایتاً در ۲۴ ساعت پس از آلودگی با میزان بیان ۱/۰۷ برابری نسبت به زمان صفر به بیشترین بیان خود رسیدند. در حالیکه گیاهان کنترل روند افزایشی سریع‌تری از میزان بیان ژن *BI-1* را پس از آلودگی نشان داده و در نهایت در ۲۴ ساعت پس از آلودگی با میزان بیان ۱/۴۷ برابری نسبت به زمان صفر به بیشینه بیان خود رسیدند. بررسی الگوی بیان ژن نشان داد که اگرچه اوج بیان ژن *BI-1* در گیاهان پیش تیمار شده و کنترل در یک بازه زمانی (۲۴ ساعت) رخ داده ولی میزان بیان در گیاهان کنترل ۱/۳۷ برابر بیشتر از گیاهان پیش تیمار با کیتوزان ۲۵۰ بود که این میزان افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. در حالی‌که مجددا تفاوت معنی داری بین گیاهان کنترل و تیمار شده با ۵۰۰ میلی گرم کیتوزان ددر این بازه زمانی مشاهده نشد. سپس هر دو گروه از گیاهان در ۴۸ ساعت پس از آلودگی روند کاهشی بیان را در پیش گرفتند به طوری‌که گیاهان تیمار شده با کیتوزان سطوح کمتری از بیان را نشان دادند.

به طور کلی بررسی روند تغییرات بیان ژن *BI-1* در نمونه-های برگی رقم فلات پس از محلول پاشی با کیتوزان حاکی از القا میزان بیان این ژن در ساعات پس از آلودگی بود، در حالیکه گیاهان تیمار شده کاهش معنی‌داری را

نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. مطالعات قبلی نشان داد که ژن *BI-1* ممکن است همانند *MLO* به عنوان یک تنظیم کننده منفی مرگ سلولی پاسخ‌پذیر به شرایط اکسایشی درگیر در فرآیند پیری برگ عمل نماید (۳۴). لذا تصور می‌گردد همانند ژن *MLO*، فقدان و یا کاهش ژن *BI-1* نیز می‌تواند به دلیل ارتباط با مرگ سلولی و القای پاسخ‌های مقاومتی سبب مقاومت بالای گیاه به ایزوله‌های قارچ سفیدک سطحی گردد. از سویی نتایج مطالعات ایشمن و همکاران (۱۴) نیز نشان داد که بیان بالای ژن *HvBI-1* در جو سبب کاهش انفجار H_2O_2 در دیواره سلولی ژنوتیپ مقاوم *mlo* و حمایت از توسعه هاستوریوم قارچ در گیاه می‌گردد. در حالیکه هوکلهوفن و همکاران (۲۰) نشان دادند که کاهش بیان ژن *BI-1* سبب مرگ سلولی و افزایش نواحی نکروزه در محل‌های آلوده شده می‌گردد. بنابراین کاهش سطح بیان این ژن در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان کنترل در بازه‌های زمانی مصادف با نفوذ میخ رخنه و توسعه هاستوریوم قارچ در گیاه یعنی ۲۴ ساعت پس از آلودگی می تواند بیانگر تاثیر مثبت پیش تیمار کردن کیتوزان بر روی برگ گندم حساس به *Bgt*، باشد. به طوری‌که کیتوزان از طریق القای آمادگی می‌تواند در افزایش پتانسیل مقاومتی در رقم حساس بسیار موثر باشد، لذا این گیاهان پس از اعمال آلودگی با قارچ *Bgt* بوسیله کاهش سطح بیان ژن *BI-1* ، سبب افزایش تجمع H_2O_2 و متعاقباً القای مرگ سلولی در سلول‌های مورد حمله شده تا از نفوذ و توسعه بیشتر قارچ در سلول میزبان ممانعت نمایند. به طوری که مطالعات نشان داد که بیان بالای ژن *BI-1* در گندم سبب متوقف شدن مرگ سلولی گردید (۴۴). بر اساس بررسی منابع موجود این اولین گزارش از تاثیر کیتوزان در سرکوب بیان ژن *BI-1* در گندم آلوده به بیماری *Bgt* می‌باشد که با نتایج آهنگر و همکاران (۱) مبنی بر کاهش بیان ژن *BI-1* در گندم تیمار شده با سالسیلیک اسید و قارچ *Piriformospora indica* تحت آلودگی با *Bgt* مطابقت دارد.

در کل بر اساس مطالعات انجام شده پیشنهاد می‌گردد که پروتئین BI-1 می‌تواند به عنوان یک واسطه کلیدی عمل نموده که می‌تواند واکنش‌های مرگ سلولی را در طی کنش با انواع مختلفی از بیمارگرها تنظیم کند. از سویی مطالعه و بررسی این ژن در کنار ژن *MLO* می‌تواند به عنوان مارکر مناسبی برای ارزیابی میزان حساسیت ژنوتیپ‌های گندم به قارچ سفیدک سطحی مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این در شکل ۴، منحنی ذوب مربوط به ژن‌های مورد بررسی نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود هیچ نوع یک اضافی که حاکی از تکثیر غیر اختصاصی ژن مورد نظر و وجود آغازگر دایمر باشد دیده نمی‌شود.

بحث و نتیجه گیری

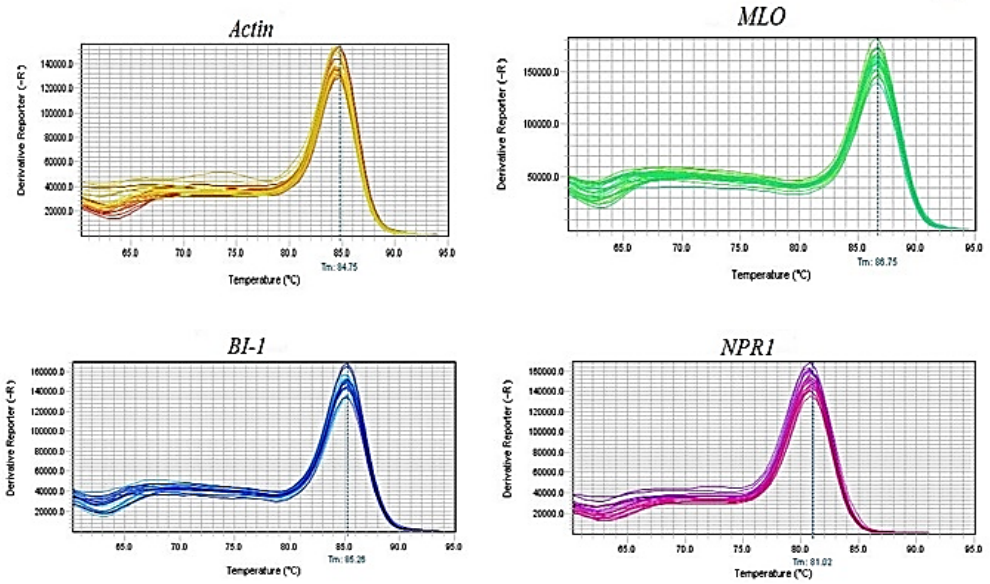
کاربرد خارجی کیتوزان بوسیله القای مکانیسم مقاومتی SAR سبب القا بیان ژن‌های دفاعی در بافت‌های تیمار شده با این فعال کننده می‌گردد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سطح بیان ژن دفاعی*NPR1* پس از ۲۴ ساعت تیمار با کیتوزان افزایش معنی‌داری را نشان داده، در حالی‌که دو ژن کنترل کننده منفی مرگ سلولی *MLO* و *BI-1*، کاهش معنی‌داری را نسبت به گیاه کنترل نشان دادند. همچنین پس از اعمال آلودگی نیز گیاهان پیش تیمار شده با بیان زود

هنگام خود تفاوت معنی‌داری را نسبت به گیاهان کنترل نشان دادند که این نتایج بیانگر موثر بودن نقش کیتوزان در القای ژن‌های مسیر مقاومت می‌باشد. به طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که کاربرد خارجی کیتوزان بوسیله افزایش سطح SA در گیاه، القای SAR، بیان *PR* پروتئین‌ها، *MLO* و *BI-1*، و دیگر محصولات ژن‌های دفاعی سبب افزایش مقاومت در گیاه به بیماری می‌گردد.

از سویی میزان بیان ژن های دفاعی در گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۲۵۰ در سطوح بالا و مناسب تری نسبت به گیاهان تیمار شده با کیتوزان ۵۰۰ میلی گرم در لیتر بود. به نظر

می سد یکی از دلایل مشاهده این نتایج اثرات سمی کیتوزان در غلظت بالا باشد، لذا توصیه می گردد سطوح بالای کیتوزان مصرف نگردد. بنابراین بر اساس این مطالعه در مقاومت به سفیدک کاربرد سطح ۲۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان توصیه می گردد.

از نتایج بدست آمده چنین استنباط می‌گردد یک همبستگی بین زمان و فعالیت ژن‌های*NPR1*، *MLO* و *BI-1* و مقاومت یا تحمل به بیماری سفیدک سطحی وجود دارد. با توجه به تغییرات مشاهده شده در الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه و نقش آنها در مقاومت، تصور می‌شود این ژن‌ها در ارتباط با پاسخ‌های دفاعی گندم نسبت به بیمارگر نقش بسیار مهمی را ایفا می‌نمایند. بنابراین این ژن‌ها می‌توانند به عنوان ژن‌های کاندید، برای مطالعات بیشتر در جهت تولید ارقام مقاومی که دارای سطح بیان بیشتری از این ژن‌ها باشند، محسوب شوند. به طور کلی نتایج حاصل از الگوی بیان ژن، بهبود خصوصیات مرفولوژیکی و شمارش کلنی‌های رشد یافته بیانگر موثر بودن نقش کیتوزان در القای مقاومت گندم حساس به قارچ *Bgt* بود. از سویی با در نظر گرفتن مزایای زیست محیطی کیتوزان و نیز هزینه‌های فراوان کودهای شیمیایی از نظر اقتصادی و هزینه‌های جبران ناپذیر زیست محیطی، کیتوزان را می‌توان در جهت کاهش خسارت بیماری و کم نمودن آثار سوء استفاده از مواد شیمیایی مورد استفاده قرار داد.



شکل۴ – منحنی ذوب ریل تایم برای ژن‌های *Actin* (A) ، *NPR1* (B)، *MLO* (C) و *BI-1* (D) در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و گیاهان کنترل قبل و پس از آلودگی با *Bgt*. آنالیز مرحله ذوب نشان دهنده وجود تنها یک پیک با دمای ذوب مشخص می‌باشد که در واقع تاییدی بر تک محصوله بودن آغازگرهای مورد استفاده می‌باشد.

منابع

۱. آهنگر، ل. ۱۳۹۳. بررسی سلولی و مولکولی چند رقم گندم در تعامل با قارچ سفیدک سطحی و بررسی امکان القای ژن‌های مقاومت پس از تیمار با اسید سالسیلیک و قارچ اندومایکوریز *Piriformospora indica*. رساله دکتری. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۲. آهنگر، ل.، رنجبر، غ.ع.، بابایی زاد، و.، نجفی زرینی، ح و بیابانی، ع. ۱۳۹۳. 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. بیماری گیاهی. ۴(۵۰): ۳۸۴-۳۶۹

۳. قاضی محسنی، ق. و صباغ، س.ک. ۱۳۹۴. اثر کیتوزان در بیان ژن و فعالیت آنزیم های موثر در القای مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشه گندم. دانش گیاهپزشکی ایران. ۴۶(۲): ۳۷۱-۳۶۳

4. Aist, J.R., and Bushnell, W.R. 1991. Invasion of plant hosts by powdery mildew fungi and cellular mechanism of resistance. In: Cole GT, Hoch HC (Eds) The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Plenum Press, New York 321-345.

5. Amborabe, B. E., Bonmort, J., Fleurat-Lessard, P. and Roblin. G. 2008. Early events induced by chitosan in plant cells. Journal Experimental Botany. 59: 2317-2324.

6. Babaeizad, V. 2009. Generation and molecular analyses of transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) in response to relevant pathogens. Msc Thesis. Agriculture Justus Liebig university Gieben. pp: 103

7. Babaeizad, V., Imani, J.G., Kogel, K. H., Eichmann, R. and Hückwlhoven, R. 2009. Over-expression of the cell death regulator *BAX inhibitor*-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. Theortical Applied Genetic. 118: 455-463.

8. Ben-Shlom N and Fallik, E.. 2003. Further suppression of *Botrytis cinerea* disease in cucumber seedlings by chitosan–copper complex as compared with chitosan alone. Phytoparasit. 31: 99–102.

9. Chaturvedi, R. and Shah, J. 2007. Salicylic acid in plant disease resistance. Pp: 335-370 in: Salicylic Acid—A Plant Hormone. Hayat S. and Ahmad, A. eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

10. Chern, M. C., Fitzgerald, H. A.. Canals, P. E., Navarre, D. A. and Ronald, P. C. 2005. Overexpression of a rice *NPR1* homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light . Molecular Plant Microbiology Interaction. 18: 511–520

11. Clarke, S. M., Mur, L. A. Wood, J. E. and Scott, I. M. 2004. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermo tolerance but is not essential for acquired thermo tolerance in Arabidopsis thaliana. Plant Journal. 38:432-447

12. Doke, N., Miura, Y. Sanchez, L.M. Park, H.J. Noritake, T. Yoshioka. H..and Kawakita, K.. 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defense: areview. Gene. 179:45–51.

13. Dong, X. 2004. *NPR1*, all things considered. Current Opinion in Plant Biology, 7: 547-552.

14. Durrant, W. E., and Dong, X.. 2004. Systemic Acquired Resistance. Annual Review of Phytopathology. 42:185-209.

15. Eichmann, R., Bischof, M., Weis, C., Shaw, J., Lacomme, C., Schweizer, P., Duchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J. and Huchelhoven, R. 2010. *BAX INHIBITOR-1* is required for full susceptibility of barley to powdery mildew.. Molecular Plant Microbe Interaction. 23: 1217-1227.

16. Eichmann, R., Holger, S., Kogel, K. H. and Hückelhoven, R. 2004. The barley apoptosis suppressor homologue *Bax inhibitor-1* compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Molecular Plant–Microbe Interactions. 17:484–490.

17. Faoro F., Maffi, D., Cantu, D. and Iriti, M. 2008. Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzothiadiazole. Bio Control. 53: 387–401.

18. Fitza, K. N. E., Payn, K. G., Steenkamp, E. T., Myburg, A. A. and Naidoo, S. 2013. Chitosan application improves resistance to *Fusarium circinatum* in *Pinus patula* . *Elsevier. 85: 70-78.*

19. Hückelhoven, R. 2004. *BAX inhibitor-1*, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. Apoptosis 9: 299–307.

20. Hückelhoven, R., Dechert, C. and Kogel. K. H. 2003. Overexpression of barley *BAX inhibitor 1* induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 100: 5555–5560.

21. Imani. J., Baltruschat, H., Stein, E., Jia, G., Vogelsberg, J., Kogel, K. H. and Hückelhoven. R. 2006. Expression of barley *BAX inhibitor-1* in carrots confers resistance to *Botrytis cinerea*. Molecular Plant Pathology. 7: 279-284.

22. Johnson ,C., Boden. E. and Arias. J. 2003. Salicylic acid and *NPR1* induce the recruitment of trans-activating TGA factors to adefense gene promoter in Arabidopsis. Plant Cell. 15:1846–58

23. Kawai-Yamada, M., Ohmori, Y. and Uchimiya, H. 2004. Dissection of Arabidopsis *Bax inhibitor-1* suppressing *Bax*-, hydrogen

peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. The Plant Cell. 16:21–32.

24. Kim, M. C., Panstruga, R., Elliott, C., Müller, J., Devoto, A., Yoon, H. W., Park, H., Cho, M. J. and Schulze-Lefert, P. 2002. Calmodulin interacts with *MLO* to regulate defence against mildew in barley. Nature. 416:447-450.

25. –Koers, S., Guzel-Deger, A., Marten, I. and Roelfsema. M. R. 2011. Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels. Plant. J. 68:670-80.

26. Lam, E., Kato, N. and Lawton, M. 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. Nature. 411: 848–853.

27. Landi, L., De Miccolis Angelini, R.M., Pollastro, S., Feliziani, E., Faretra, F. and Romanazzi, G. 2017. Global Transcriptome Analysis and Identification of Differentially Expressed Genes in Strawberry after Preharvest Application of Benzothiadiazole and Chitosan. Front Plant Science. 8: 235- 247.

28. Livak, K.J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta}$CTmethod. Methods. 25: 402-408.

29. Makandar, R., Essig, J. S., Schapaugh, M. A., Trick H. N. and Shah. J. 2006. Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of Arabidopsis *NPR1*. Molecular Plant- Microb Interaction. 19: 123-139.

30. Molitor, A., Zajic, D., Voll, L. M., Pons-Hückelhuven, J., Samans, B., Kogel, K. H. and Waller, F. 2011. Barley Leaf Transcriptome and Metabolite Analysis Reveals New Aspects of Compatibility and *Piriformospora indica*–Mediated Systemic Induced Resistance to Powdery Mildew . Molecular Plant-Microbe Interaction. 24: 1427–1439.

31. Mou, Z., Fan, W. and Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate *NPR1* function through redox changes. Cell. 113: 935–944.

32. Nandeeshkumar, P., Sudisha, J., Ramachandra, K. K., Prakash, H. S., Niranjana. S. R. and Shekar, S. H. 2008. Chitosan induced resistance to *Downy mildew* in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. Journal Physiology Molecular Plant Pathology. 72: 188-94.

33. Pessina, S., Luisa, L., Perazzoli, M., Campa, M., Costa, L. D., Urso, S., Vale, G., Salamini, F., Velasco, R. and Malnoy, M. 2016. Knockdown of *MLO* genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine. Hortic Research. 3: 160-166

34. Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N.C., Panstruga, R. and Schulze-Lefert. P. 2002. The barley *MLO* modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. Plant Physiology. 129: 1076–1085.

35. Propagdee, B., Kotchdat, A., Kumsopa, A. And Visarathanonth, N. 2006. The role of chitosan in protection of soybean from suolden death syndrome caused by Fusarium solani f. sp. Glycines. Bioresource Technology. 98: 1353-1358.

36. Reinstädler, A., Müller, J., Czembor, J. H. Piffanelli, P. and Panstruga, R. 2010. Novel induced *mlo* mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barely MLO protein. BMC Plant Biology. 10: 31-44.

37. Siddaiah, Ch. N., Harish Prasanth, K.V., Raj Satyanarayana, N., Mudili, V., Gupta, V. K., Kalagatur, N. K., Satyavati, T., Feng Dai, X., Chen, J. Y., Mocan, A., Singh, B.P. and Srivastav, R. K. 2018. Chitosan nanoparticles having higher degree of acetylation induce resistance against pearl millet downy mildew through nitric oxide generation. Scientific Report. 8: 1-14

38. Stein, E., Molitor, A. Kogel. K. H. and Waller, F. 2008. Systemic resistance in Arabidopsis conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of *NPR1*. Plant Cell Physiology. 49:1747-51.

39. Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-MuhktarMou, K. Z., Song, J. *et al*. 2008. Plant immunity requires conformational changes of *NPR1* via S-nitrosylation and thioredoxins. Science. 321:952–56

40. Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D. B. 1997. Subcellular localization of H_2O_2 in plants: H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. Plant Journal. 11:1187–1194

41. Van Hulten, M., Pelser, M., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J. and Ton, J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*.

Proceeding of the National Academy of Science USA. 103: 5602-5607.

42. Van Loon, L.C., Rep M. and Pieterse, C. M. J. 2006. Significance of Inducible Defense-related proteins in infected plants. Phytopathology. 44: 135-162.

43. Vlot, A.C., Dempsey, D. A. and Klessig, D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annual Review of Phytopathology. 47: 177-206.

44. Wang, X., Tang, C., Huang, X., Li, F., Chen, X., Zhang, G., Sun, Y., Han. D. and Kang, Z. 2012.Wheat *BAX inhibitor-1* contributes to wheat resistance to *Puccinia striiformis*. Journal Experial Botany. 63: 4571-4584

45. *Zhou, S. J., Jing, Z. and Shi. J. L. 2013.* Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the *MLO* gene family in Cucumis sativus. Genet Molecular Research. 12: 6565-6578.

Assay of *NPR1*, *MLO* and *BI-1* genes expression in susceptible wheat to powdery mildew after treatment with chitosan

Khatami m.[1], Ahangar L.[1], Taliei F.[1], Sabouri H.[1] and Babaei zad V.A.[2]

[1] Plant Production Dept., Faculty of Agriculture & Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, I.R. of Iran

[2] Plant Pathology Dept., Agriculture Science and Natural Resource University, Sari, I.R. of Iran

Abstract

Powdery mildew caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) is one of the most important diseases of wheat that make yield damage annually. In recent years, the use of induction elicitors has been widely welcomed. Therefore, in this research in order to examine the ability of chitosan as a biotic elicitor, Flat were selected as susceptible cultivar to *powdery mildew*, and the leaves were sprayed with chitosan in the two-leaf stage. Then treated plant together control plants were inoculated with *Bgt* pathogen. All stages of the were conducted in 2016 in the genetic laboratory in Gonbad-e Kavouse University. Finally, T*he* expression rate of *MLO*, *B-I1* and *NPR1* genes was examined in using Real Time PCR technique at 4 time courses and in 3 independent replicates. Results showed that in both chitosan treated plants and the controls, rate of gene expression were increased after infection for all genes, So that, in the first hours after inoculation, treated plants showed *NPR1* expression more rapidly than control. Maximum expression level of this gene was observed at 24 hours after infection. But, in treated plants, the expression rate of *BI-1* and *MLO* were less than the control and they showed minimum expression at 24 hours after infection. These results indicated these genes by decreasing their expression rate in order to increase the level of active oxygen species causes induction of cell death in the plant to inhibition of fungal growth and development in the early stages after infection. The gene expression rate in plants treated with 250 mg/L was more indicative than those treated with chitosan 500 mg/L. Overall; results showed that chitosan could induce systemic resistance in susceptible wheat against powdery mildew in low concentration.

Key words: Wheat, Chitosan, Powdery mildew, Resistance