کنترل بیماری سوختگی دانه رست گندم ناشی از *Fusarium graminearum* از طریق پرایمینگ بذرها با سالیسیلیک اسید

منا صراحی نوبر[۱]، اکبر جاهدی[۲]، وحید نیکنام[۱]، بابک مرادی[۳]، ناصر صفایی[۲،*]، حسن ابراهیم زاده[۱] و مهرداد بهمنش[۴]

[۱] ایران، تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، قطب تبارزایی موجودات زنده ایران

[۲] ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری شناسی گیاهی

[۳] ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

[۴] ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۵

چکیده

سوختگی فوزاریومی دانه رست یکی از بیماری های گندم و سایر غلات می باشد که توسط گونه های مختلفی از قارچ فوزاریوم از جمله *فوزاریوم گرامیناروم* (*Fusarium graminearum*) ایجاد می شود. بر خلاف فوزاریوم سوختگی سنبله به موضوع کنترل فوزاریوم سوختگی دانه رست توجه کمتری شده است. استفاده از مواد شیمیایی القا کننده که از یک سو سبب فعالسازی سازوکارهای دفاعی گیاه قبل از رویایی با عوامل بیماری زا شوند و از سویی دیگر خطرات زیست محیطی نداشته باشند در سالهای اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. لذا در این تحقیق اثر پیش تیمار بذرهای گندم با سالیسیلیک اسید (SA) بر کنترل بیماری فوزاریومی دانه رست ناشی از *فوزاریوم گرامیناروم* و امکان القای مقاومت میزبان در مقابل بیماری زا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از موثر بودن این تیمار در بهبود علایم ناشی از این بیماری در هر دو رقم مورد مطالعه است. تیمار سالیسیلیک اسید در هر دو رقم بیان ژن کیتیناز را نسبت به شاهد افزایش داد. سطح افزایش در رقم فلات پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید، بیشتر از رقم سومایی تری تیمار شده با سالیسیلیک اسید بود. بر اساس نتایج افزایش بیان ژن و پروتئین کیتیناز با کاربرد سالیسیلیک اسید، می تواند در القای مقاومت میزبانی در مقابله با بیماری سوختگی دانه رست ناشی از *فوزاریوم گرامیناروم* نقش داشته باشد.

واژه های کلیدی: گندم، سوختگی فوزاریومی دانه رست، سالیسیلیک اسید، *Fusarium graminearum*، پرایمینگ

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۳۶ ، پست الکترونیکی: m-amir@nigeb.ac.ir

مقدمه

بیماری فوزاریومی گندم به عنوان یکی از بیماری های مهم گندم در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب جهان به شمار می رود (۵). بیماری فوزاریومی بیماری قارچی است که می تواند در تمام غلات دانه ریز اتفاق بیفتد. در اثر این بیماری محصولی نامرغوب با دانه های ریز و چروکیده به وجود می آید که کاهش ارزش اقتصادی محصول را موجب می گردد. این بیماری در شرایط اپیدمی نه تنها باعث از دست رفتن کیفیت و راندمان محصول تا ۵۰٪ آن می گردد بلکه با ایجاد توکسین قارچی عوارض خطرناکی را برای انسان و جانوران به دنبال دارد (۴). گونه های مختلفی از قارچ فوزاریوم در ایجاد این بیماری نقش دارند که *فوزاریوم گرامیناروم* از مهم ترین گونه های آن است. این قارچ قادر به تولید مایکوتوکسین هایی از قبیل داکسی نیوالنول است که برای مصرف انسان و دام مضر می باشد. بیماری‌های

ناشی از این بیماری زا در ایران یکی از مهم ترین بیماری های گندم در استان های مازندران و گرگان و منطقه دشت مغان می باشد. بر خلاف سوختگی فوزاریومی سنبله به موضوع کنترل سوختگی فوزاریومی دانه رست توجه کمتری شده است که دلیل آن اهمیت بالای آلودگی بذرها به مایکوتوکسین های تولید شده توسط این قارچ در سنبله می باشد.

در سال های اخیر استفاده از روش های غیر شیمیایی در مدیریت بیماری های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. فرضیه استفاده از مواد شیمیایی به عنوان فعال کننده های سیستم دفاعی گیاهان بعد از آزمایش های White (۱۹۷۹) که نشان دهنده تاثیر کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید روی گیاه توتون علیه ویروس موزاییک توتون بود شدت گرفت. سالیسیلیک اسید در ایجاد تحمل به تنش های محیطی نقش کلیدی دارد، به طوری که در فرآیند مقاومت به بیماری ها بیشترین تاثیر در گیاهان مربوط به این هورمون است (۱۱). سالیسیلیک اسید بیان ژن های دفاعی را از طریق پروتئین تنظیمی NPR1 که یک مولکول کلیدی واسطه مقاومت اکتسابی سازگانی است، افزایش می دهد (۸). میزان سالیسیلیک اسید پس از آلودگی گیاه توسط بیمارگرها افزایش می یابد؛ که این امر منجر به تولید انواع اکسیژن فعال در گیاه می شود. نتیجه افزایش محتوای انواع اکسیژن فعال، انتقال NPR1 از سیتوپلاسم به هسته می باشد. NPR1 در هسته به همراه عوامل رونویسی سبب بیان برخی از ژن های مرتبط با سازوکارهای تحمل در گیاه می شود (۲۰)، که از جمله این ژن ها می توان به پروتئین های مرتبط با بیماری زایی (PRPs) اشاره کرد. طبق نظر Yedidia و همکاران (۲۰۰۰) بیان ژن های دفاعی مانند ژن های کد کننده پروتئین های مرتبط با بیماری زایی به عنوان یکی از شاخص های مقاومت به کار می رود. از جمله این نوع پروتئین ها، کیتینازها هستند که همراه با سایر آنزیم های دفاعی مانند β- ۱و۳ گلوکوناز و پراکسیداز و غیره در فعالیت های دفاعی موثرند.

در این پژوهش برای اولین بار از پیش تیمار بذرهای ارقام فلات و سومایی تری با مقادیر مختلف سالیسیلیک اسید به منظور القای مقاومت علیه بیماری فوزاریومی دانه رست استفاده شد.

مواد و روشها

تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ *فوزاریوم گرامیناروم*: اسپور قارچ *فوزاریوم گرامیناروم* جدایه F-42 برای این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه اینوکلوم قارچ فوزاریوم از روش Makandar و همکاران (۲۰۰۶) استفاده گردید.

شرایط کاشت: این پژوهش در شرایط گلخانه واقع در آزمایشگاه بیماری شناسی تربیت مدرس در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. مخلوطی از خاک مزرعه، پرلیت و پیت ماست به نسبت مساوی مخلوط شد و به منظور سترون سازی دو بار در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو گردید. سپس مایه تلقیح به نسبت ۲ درصد وزنی به طور یکنواخت با خاک مخلوط گردید و داخل گلدان های پلاستیکی ۲ لیتری منتقل شدند. در نمونه های شاهد به جای مایه تلقیح از آب ماش سترون (محیط کشت سوسپانسیون قارچی) استفاده شد.

بذرهای دو رقم فلات و سومایی تری با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی سطحی شد و سپس توسط آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند. هر تیمار شامل ۱۰ تکرار بود و در هرگلدان ۶ بذر کاشته شد که در مرحله دو برگی وجین شده و به ۵ عدد کاهش یافت. بذرها تحت شرایط رژیم دمایی ۲۱ و ۱۸ درجه سلسیوس به ترتیب در طول روز و شب قرار گرفتند.

در آزمایش های مربوط به بررسی اثر سالیسیلیک اسید پیش تیمار کردن بذرها با سالیسیلیک اسید در دو سطح انجام گرفت. برای انجام پیش تیمار پس از تهیه غلظت های مورد نظر شامل سطوح صفر، ۱ و ۲ میلی مولار،

بذرهای دو رقم گندم در تیمارهای ذکر شده به مدت ۲۴ ساعت در داخل محلول غوطه ور شدند و نمونه های شاهد در آب مقطر قرار گرفتند سپس از محلول خارج و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند تا رطوبت بذرها کاملا خارج و به سطح اولیه و قبل از تیمار برگردانده شوند (۳). سپس بذرها برای کاشت در گلدان ها استفاده شد. بر این اساس گلدان‌ها به چهار گروه تقسیم شدند:

گروه ۱) نمونه شاهد (C)، گروه ۲) نمونه تیمار شده با پاتوژن *فوزاریوم گرامیناروم* (F.g.)، گروه ۳) نمونه پرایمینگ شده با سالیسیلیک اسید (SA)، گروه ۴) نمونه پرایمینگ شده با سالیسیلیک اسید و تیمار شده با پاتوژن (F.g.+SA)

بررسی بیماری زایی بیمارگر: به منظور بررسی بیماری زایی بیمارگر در گیاهچه های مورد مطالعه، به مدت ۳۵ روز پس از آلودگی در دوره های زمانی منظم، میزان و نرخ آسیب دیدگی در ریشه ها ثبت گردید. علایم بیماری سوختگی فوزاریومی دانه رست با مقیاس ۰ تا ۶ ثبت گردید.

۰: بدون علائم؛ ۱: ۲۰-۱ درصد قهوه ای شدگی؛ ۲: ۴۰-۲۱ درصد قهوه ای شدگی؛ ۳: ۶۰-۴۱ درصد قهوه ای شدگی؛ ۴: ۸۰-۶۱ درصد قهوه ای شدگی؛ ۵: ۱۰۰-۸۱ درصد قهوه ای شدگی؛ ۶: بوته میری (۹).

نمونه برداری برای آنالیزهای مولکولی: نمونه برداری به منظور بررسی‌های مولکولی نمونه‌های تیمار شده با قارچ، تیمار شده با هورمون (SA) و تیمار شده با قارچ و هورمون در ۳ هفته (زمان بروز آلودگی) پس از کاشت بذرها انجام شد.

استخراج RNA کل از بافت گیاه و واکنش های زنجیره ای پلی مراز: RNA کل با استفاده از کیت RNA-Plus (سیناکلون- ایران) به همراه تیمار DNase I (سیناکلون- ایران) به منظور از بین بردن هرگونه حضور DNA ژنومی مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. پس از استخراج RNA کل، کیفیت و کمیت آن به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز و نانودراپ بررسی گردید. روش ساخت cDNA بر اساس دستورالعمل کیت سیناکلون انجام شد. جهت طراحی آغازگرها از نرم افزار Gene Runner و Oligo 7 استفاه شد. به منظور اطمینان از مناسب بودن آغازگرها از جهت درصد GC ، Tm و نداشتن دایمر با یکدیگر، آغازگرها با برنامه Gene Runner بررسی شدند. پس از این مرحله آغازگرهای طراحی شده از شرکت Bioneer کره تهیه شد (جدول ۱). واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از تکنولوژی رنگ Sybr Green 1 انجام شد. جهت انجام Real-Time PCR از چرخه حرارتی ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس ، ۴۰ سیکل شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس ، ۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده های حاصل از اندازه گیری بیان ژن های مورد مطالعه با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ انجام شد (۱۴).

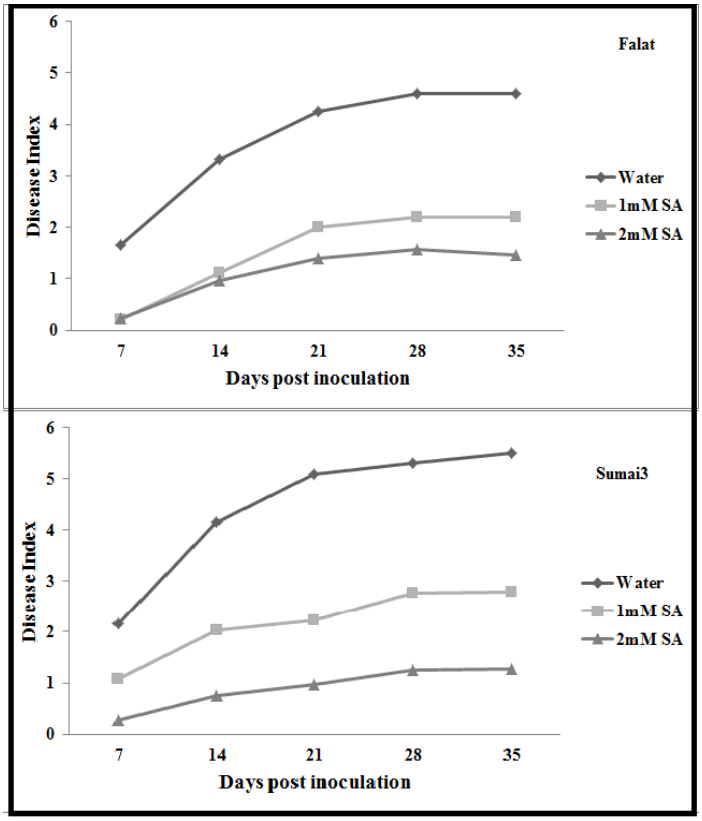
بررسی وسترن بلات: پس از استخراج پروتئین از بافت گیاه با بافر استخراج ،Tris-HCl، ۱ مولار و تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد (۶)، مقدار ۲۰ میکروگرم پروتئین روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شد. محدوده نواری پروتئین مورد نظر به همراه مارکر بعد از اتمام فرآیند الکتروفورز برش داده شد و فرآیند انتقال به کاغذ PVDF به مدت یک ساعت در ولتاژ ۲۰ ولت و ۳۰۰ میلی آمپر با استفاده از دستگاه Semi- Dry Transfer Cell صورت پذیرفت. به منظور کاهش باندهای غیر اختصاصی غشای PVDF پس از دریافت پروتئین ها با شیر ۵٪ بلوکه شدند و سپس به مدت یک شب در دمای ۴ درجه با آنتی بادی اولیه موسوم به کیتیناز (KD) (محصول شرکت Agrisera) که با نسبت ۱ به ۱۰۰۰ رقیق شده بود، انکوبه شد و متعاقب آن غشا به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق با آنتی بادی ثانویه همیوغ با HRP که با نسبت ۱ به ۱۰۰۰ رقیق

شده بود، انکوبه شد. باندها توسط کیت کمولومینسانس (محصول شرکت Roch) مرئی شده و فیلم ها به مدت ۵ تا ۲۰ ثانیه در معرض آن قرار گرفت و در پایان فیلم ها اسکن شد.

تحلیل های آماری: طرح آماری این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تحلیل آماری نتایج بر اساس آزمون دانکن در سطح $P\leq 0/05$ با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گرفت. معنی دار بودن تفاوت میانگین ها در تیمارها، زمان ها و ارقام مختلف نیز توسط روش One-Way Analysis of Variance بررسی شد.

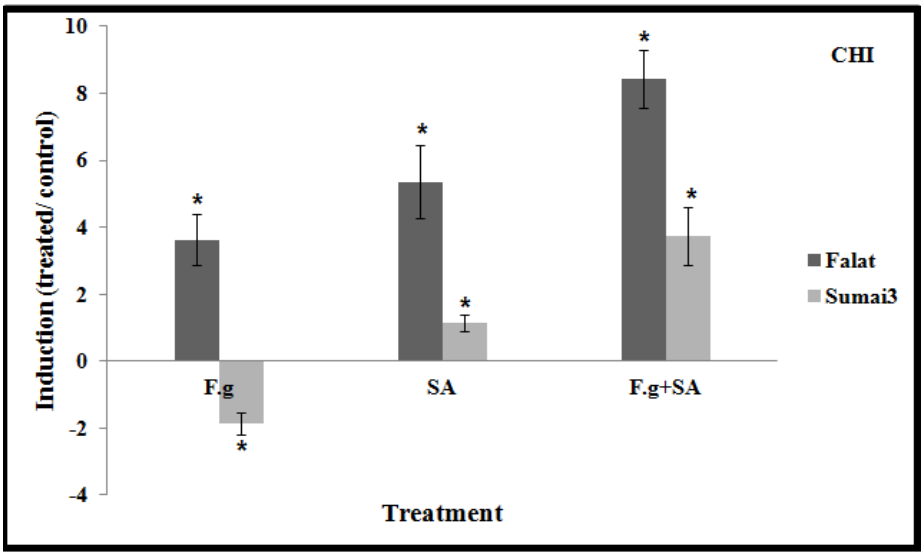
تعیین شدت بیماری در گیاهچه های گندم: هر دو رقم مورد مطالعه نتوانستند در مقابل آلودگی و گسترش بیماری فوزاریوم سوختگی دانه رست مقاومت نمایند (شکل ۱). البته از سویی دیگر استفاده از پیش تیمار سالیسیلیک اسید به طور معنی داری باعث کاهش شدت علایم بیماری در هر دو رقم مورد مطالعه گردید. پیش تیمار با غلظت های یک و دو میلی مولار سالیسیلیک اسید توانست در مهار بیماری به گیاه کمک کند. مهار بسیار زیادی در نفوذ این قارچ با کاربرد مقدار ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید حاصل شد به نحوی که گیاه علایم بسیار کمی از بیماری را نشان داد.

نتایج

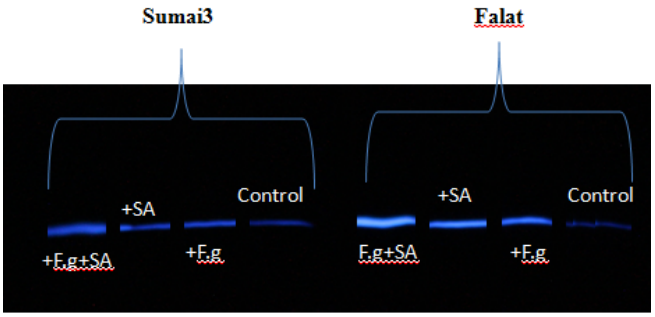


شکل ۱- نمودار میزان بیماری‌زایی *فوزاریوم گرامیناروم* در دانه‌رست های گندم و ایجاد سوختگی فوزاریومی دانه‌رست در حالت‌های تیمار شده و تیمار نشده با سالیسیلیک اسید. تیمار با سالیسیلیک اسید مقاومت را در هر دو رقم موردمطالعه افزایش می‌دهد. شدت بیماری‌زایی به‌صورت : ۰: بدون علائم، ۱: ۲۰-۱ ٪ قهوه‌ای شدگی ، ۲: ۴۰-۲۱٪ قهوه‌ای شدگی، ۳: ۶۰-۴۱٪ قهوه‌ای شدگی، ۴: ۸۰-۶۱٪ قهوه‌ای شدگی، ۵: ۱۰۰-۸۱٪ و ۶ : بوته میری

بررسی بیان ژن کیتیناز در دانه رست های گندم: الگوی تغییرات کمی بیان ژن کیتیناز در دو رقم حساس و مقاوم گندم در شکل۲ نشان داده شده است. ژن کیتیناز الگوی بیانی متفاوتی را در دو رقم سومایی تری و فلات گندم، در پاسخ به *Fusarium graminearum* نشان داد. در رقم سومایی تری پس از تیمار با قارچ (F.g.)، کاهش ۱/۸۶ برابری بیان ژن کیتیناز را نسبت به نمونه شاهد نشان داد؛ در حالی که تیمار با قارچ در رقم فلات منجر به افزایش ۳/۶۲ برابری ژن کیتیناز نسبت به شاهد گردید. تیمار سالیسیلیک اسید در هر دو رقم بیان ژن کیتیناز را نسبت به شاهد افزایش داد. سطح افزایش در رقم فلات پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید (در حدود ۵ برابر)، بیشتر از رقم سومایی تری تیمار شده با سالیسیلیک اسید (حدود ۱ برابر) بود. همچنین بیان ژن کیتیناز در هر دو رقم در تیمار سالیسیلیک اسید قارچ (F.g.+SA) به صورت معنی داری افزایش نشان داد. مقایسه بیان ژن کیتیناز در نمونه های F.g.+SA با F.g.، نشان داد تیمار توام قارچ و سالیسیلیک اسید بیان ژن کیتیناز را در رقم فلات ۷/۴۴ برابر و در رقم سومایی تری ۲/۳ افزایش داد.



شکل۲- بررسی تغییرات میزان بیان ژن کیتیناز (*CHI*) در گیاهچه‌های تحت تیمار قارچ و سالیسیلیک اسید رقم (فلات و سومای‌تری. اعداد میانگین سه بار تکرار می‌باشند. ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین نمونه شاهد و تیمار شده می‌باشد ($P \leq 0.05$) . F.g. (گیاهان تحت تیمار با سوسپانسیون قارچ فوزاریوم) ، SA (گیاهان پیش تیمار شده با ۲میلی مولار سدیم سالیسیلات) ، F.g+SA (گیاهان پیش‌تیمار شده با ۲میلی مولار سدیم سالیسیلات و آلوده‌شده با *فوزاریوم گرامیناروم*).



شکل ۳- وسترن بلات پروتئین کیتیناز در گیاهچه‌های دو رقم سومای‌تری و فلات گندم تحت تیمارهای مختلف.

بررسی وسترن بلات برای پروتئین کیتیناز در گیاهچه های گندم تحت تیمار هورمون و قارچ فوزاریوم: برای بررسی این که آیا مقدار این پروتئین تحت تاثیر تیمارهای مختلف در دو رقم مورد مطالعه قرار گرفته است یا خیر و همچنین آیا ارتباطی بین تغییرات در سطح بیان ژن این آنزیم با بیان پروتئین آن تحت تیمارهای مورد مطالعه وجود دارد یا خیر از روش وسترن بلات استفاده شد. تیمار با قارچ سبب افزایش مقدار پروتئین کیتیناز در هر دو رقم شد(شکل ۳). لازم به ذکر است این افزایش محتوا در رقم فلات نسبت به سومایی تری بیشتر بود. علاوه بر این تیمار با SA نیز بیان این پروتئین را افزایش داد به طوری که با مقایسه محتوای این پروتئین در رقم فلات تحت .F.g با رقم فلات F.g.+SA نشان داد محتوای این پروتئین تحت اثر SA افزایش بیان بیشتری نسبت به سومایی تری نشان داد.

بحث

القای سازوکارهای دفاعی گیاهان توسط پیش تیمار گیاه با یک القا کننده زیستی یا بیوشیمیایی به عنوان یک استراتژی جدید و تازه حفاظت گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. سالیسیلیک اسید در ایجاد تحمل به تنش های محیطی نقش کلیدی دارد، به طوری که در فرایند تحمل به بیماری ها بیشترین تاثیر در گیاهان مربوط به این هورمون است (۱۱). در این پژوهش از پیش تیمار سالیسیلیک اسید به عنوان القا کننده مقاومت در گیاه گندم علیه فوزاریوم، منجر به افزایش سطح زنده مانی دانه رست‌ها در حضور بیمارگر گردید. در پاتوسیستم های دیگر نیز تاثیر سالیسیلیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفته است. به طور مثال القای مقاومت القایی علیه باکتری بیمارگر *Xanthomonas vasicatoria* در گیاه گوجه فرنگی گزارش شده است (۷). کاهش علایم بیماری سوختگی برگ گندم تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید توسط زمانی و همکاران (۱۳۹۵) گزارش شده است. همچنین کاهش علایم بیماری سوختگی دانه رست ناشی از فوزاریوم در دانه رست های گیاه جو با پیش تیمار بذرهای گیاه با سالیسیلیک اسید توسط Wiśniewska و همکاران (۱۹۹۹) گزارش شده است. Sarwar و همکاران (۲۰۱۰) همچنین نشان داده اند که پیش تیمار بذرهای گیاه نخود با سالیسیلیک اسید منجر به کاهش علایم بیماری ناشی از قارچ *Fusarium wilt* شده است. در مطالعه دیگر، Sorahinobar و همکاران (۲۰۱۵) نشان داده اند که آبیاری گیاهان گندم دو رقم فلات و سومایی تری با سالیسیلیک اسید یک روز قبل از تلقیح با *فوزاریوم گرامیناروم* باعث کاهش معنی دار بیماری شده است. که این نتایج همگی در توافق با نتایج به دست آمده در این تحقیق می باشد.

کیتینازها توسط تعدادی ازمیکروارگانیسم ها شامل باکتری ها و قارچ های مختلف ترشح شده و در بسیاری از موارد ظاهرا در کنترل زیستی قارچ های بیمارگر دخالت دارند. یکی از نقش هایی که به کیتینازها نسبت داده می شود، دخالت در سازوکارهای دفاعی گیاهان عالی در برابر حمله بیمارگرها به ویژه قارچ ها است، زیرا بیان کیتینازها پس از آلودگی به صورت معنی داری افزایش می یابد (۲۱، ۱). افزایش بیان سریع کیتیناز می تواند باعث تجزیه سریع کیتین دیواره سلولی قارچ ها شده و از طریق جلوگیری از رشد بیمارگر و ایجاد الیگومرهای کیتین به عنوان محرک سازوکارهای دفاعی از قبیل بیان ژن های مرتبط با دفاع عمل کند (۲۳). همچنین برخی از کیتینازها فعالیت لیزوزیمی داشته و می توانند پپتیدوگلیکان های دیواره یاخته باکتری ها را هیدرولیز نمایند (۱۵) و برخی نیز دارای فعالیت اگزو هیدرولایتیک می باشند (۱۷). کیتینازها تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله آلودگی به ویروس ها، سالیسیلیک اسید، اجزای دیواره سلولی قارچ ها و پلی ساکاریدهای پکتینی و زخم های مکانیکی القا می شوند. Jongedijk و همکاران (۱۹۹۵) گزارش داده اند که فعالیت سینرژیستی کیتینازها در گوجه فرنگی تراریخت موجب افزایش مقاومت به فوزاریوم شده است. Toyota و همکاران (۱۹۹۴) نشان داده اند که تزریق مستقیم کیتیناز به

داخل سلول های اپیدرمی بر روی توسعه هوستوریم های درون سلولی قارچ اثر بازدارندگی داشته است. Nitzsche (۱۹۸۳)، کیتیناز را به عنوان یک عامل احتمالی مقاومت به بیماری زنگ زرد در گندم معرفی نمود. همچنین با بررسی فرآیندهای مختلف در جریان آلودگی به زنگ دریافتند که لوله تندشی بیماری زا مولد زنگ نسبت به فعالیت کیتیناز حساس می باشد. همه این داده ها با نتایج به دست آمده در این پژوهش انطباق دارد. نتایج در هر دو رقم تاثیر معنی دار القایی سالیسیلیک اسید را در بیان ژن و پروتئین کیتیناز نشان داد. بیان ژن کیتیناز با پاسخ های مقاومت سیستمیک (SAR) در گیاهانی مانند خیار و تنباکو ارتباط داده شده است (۱۸،۲۴، ۱۲). بررسی تیمار سالیسیلیک اسید در گیاه پنبه نشان داد که این ترکیب می تواند با القای تجمع کیتیناز باعث مقاومت به توکسین در تعامل با قارچ *V.dahlia* می شود (۱۳). زمانی و همکاران (۱۳۹۵) نشان داده اند که تیمار با سالیسیلیک اسید و همچنین آلودگی با قارچ عامل سوختگی برگی سپتوریایی بیان این ژن را در گیاه گندم افزایش داده است .

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق به نظر می رسد که کیتیناز هم در سطح بیان ژن و هم در سطح بیان پروتئین می تواند در مقاومت به سوختگی دانه رست حاصل از فوزاریوم گرامیناروم در گیاه گندم نقش داشته باشدو همچنین کاربرد سالیسیلیک اسید می تواند با القای افزایش بیان تولید این آنزیم باعث القای مقاومت میزبانی شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه تربیت مدرس و همچنین دانشگاه تهران برای فراهم آوردن امکانات این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱- آهنگر، ل، بابایی زاد ، غلامعلی، ر، زرینی، ح و بیابانی، ع. ۱۳۹۴. الگوی بیان ژن های دفاعی ارقام حساس و مقاوم گندم در پاسخ به آلودگی به سفیدک سطحی. مجله ژنتیک نوین. ۴۶-۳۳

۲- زمانی، ا، سنجریان، ف، محمدی گل تپه، ا و صفایی، ن. ۱۳۹۵. بررسی بیان ژن های کیتیناز و گلوکاناز در گندم تیمار شده با اسید سالیسیلیک و باکتری Pseudomonas flourescense در برهمکنش با قارچ عامل سوختگی برگ گندم. زیست فناوری گیاهان زراعی. ۱۳ ،۱۲-۱

۳- شکاری، ف، بالجانی، ر، صبا، ج و افصحی، ک. ۱۳۸۹. تاثیر پرایمینگ با سالیسیلیک اسید بر خصوصیات رشد گیاهچه گاوزبان (Boragi officinalis). مجله دانش نوین کشاورزی. ۱۸ ،۵۳-۴۷.

4- Bai, G. Shaner, G. 2004. Management and resistance in wheat and barley to Fusarium head blight 1. Annual Review of Phytopathology. 42:135-161.

5- Bozac, P. Dorica, B. Sorina, P. B. Oana, C. and Ersilia, A. 2014. Distribution of Fusarium species in Timis County (Western Romania) in relation with environmental conditions. Journal of Horticulture Forestry and Biotechnology. 18(2):137-140.

6- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72(1-2):248-254..

7- Cavalcanti-Adam, E. A. Micoulet, A. Blümmel, J. Auernheimer, J. Kessler, H. and Spatz J. P. 2006. Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. European Journal of Cell Biology. 85(3):219-224.

8- Dong, X. 2004. NPR1, all things considered. Current Opinion in Plant Biology. 7(5):547-552.8-

9- Grey, W. and Mathre, D. 1984. Reaction of spring barleys to common root rot and its effect on yield components. Canadian journal of plant science. 64(2):245-253.

10- Jongedijk, E. Tigelaar, H. Van Roekel, J. S. Bres-Vloemans, S. A. Dekker, I. van den Elzen, P. J. Cornelissen, B. J. and Melchers, L. S. 1995. Synergistic activity of chitinases and β-1, 3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica 85(1-3):173-180..

11- Kogel, K. H. & Langen G. 2005. Induced disease resistance and gene expression in cereals. Cellular Microbiology .7(11):1555-1564.

12- Lawton, K. A. Beck, J. Potter, S. Ward, E. and Ryals, J. 1994. Regulation of cucumber class III chitinase gene expression. Molecular Plant-Microbe Interactions. 7(1):48-57.8-48

13- Li, Y. z. Zheng, X. h. Tang, H. l. Zhu, J. w. and Yang, J. M. 2003. Increase of ß-1, 3-glucanase and chitinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of Verticillium dahliae. Acta Botanica Sinica. 45(7):802-808.

14- Livak, J. and Thomas, D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods 25: 402-408.

15- Majeau, N. Trudel, J. and Asselin, A. 1990. Diversity of cucumber chitinase isoforms and characterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. Plant Science. 68(1):9-16.

16- Makandar, R. Essig, J.S. Schapaugh, M.A. Trick, H.N. Shah, J. 2006. Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR1 Molecular Plant-Microbe Interactions. 19:123-129.

17- Mauch, F. Mauch-Mani, B. Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β-1, 3-glucanase. Plant Physiology. 88(3):936-942.

18- Metraux, J. Burkhart, W. Moyer, M. Dincher, S. Middlesteadt, W. Williams, S. Payne, G. Carnes, M. and Ryals. J. 1989. Isolation of a complementary DNA encoding a chitinase with structural homology to a bifunctional lysozyme/chitinase. Proceedings of the National Academy of Sciences. 86(3):896-900.

19- Nitzsche,W. 1983. Chitinase as a possible resistance factor for higher plants. Theoretical and Applied Genetics. 65(2):171-172..

20- Pieterse, C. M. and Van Loon L. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology. 7(4):456-464.

21- Punja, Z.K. and Zhang, Y.Y. 1993. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. Journal of Nematology. 25(4):526.

22- Sarwar, N. Ch, Z. Hayat, M. and Haq, I. 2010. Seed treatments induced systemic resistance in chickpea against Fusarium wilt in wilt sick field. Pakistan Journal of Botany. 42(5):3323-3326.

23- Sharma, N. Singh, N. Singh, O. Pandey, V. and Verma, P. 2011. Oxidative stress and antioxidant status during transition period in dairy cows. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 24(4):479-484.

24- Shinshi, H. Neuhaus, J.M. Ryals, J. and Meins, F. 1990. Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. Plant Molecular Biology. 14(3):357-368.

25- Sorahinobar, M. Niknam, V. Ebrahimzadeh, H. Soltanloo, H.Behmanesh, M. and Enferadi, S. 2016. Central Role of Salicylic Acid in Resistance of Wheat Against Fusarium graminearum. Journal of Plant Growth Regulation. 35(2):477-491.

26- Toyota, K. Miyashita, K. and Kimura, M. 1994. Introduction of a chitinase gene into Pseudomonas stutzeri A18 isolated from the surface of chlamydospores of Fusariumm oxysporum f. sp. Soil Biology and Biochemistry. 26(3):413-416.

27- Wiśniewska, H. and Chełkowski, J. 1999. Influence of exogenic salicylic acid on Fusarium seedling blight reduction in barley. Acta Physiologiae Plantarum. 21(1):63-66.

28- Yedidia, I. Benhamou, N. Kapulnik, Y. Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite Trichoderma harzianum strain T-203. Plant Physiology and Biochemistry. 38: 863–873.

Control of wheat seedling blight caused by *F.graminearum* through seeds priming with salicylic acid

Sorahinobar M.[1], Jahedi A.[2], Niknam V.[1], Moradi B.[3], Safaei N.[2], Ebrahimzadeh H.[1], Behmanesh M.[4]

[1] Dept. of Plant Biology, and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms in Iran, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

[2] Dept. of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[3] Dept. of Plant Biology, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[4] Dept. of Genetic, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Fusarium seedling blight is a disease of cereal crops caused by a group of trichothecene producing *Fusarium* species such as *Fusarium graminearum*. Control of seedling blight has received less attention than control of Fusarium head blight. Application of chemicals which activate plant defense mechanisms before pathogen attack without environmental side effects of protective chemical agents have stimulated great deal of researches in this area. Hence in this study, the effect of seed priming with salicylic acid on Fusarium seedling blight incidence and severity was investigated. According to our results seed priming with salicylic acid improved wheat defense against Fusarium seedling blight in both cultivars. Salicylic acid treatment induced chitiniase gene expression in both cultivars as compared to their controls; however, this increase was much higher in salicylic acid treated Falat than salicylic acid treated Sumai3. Based on the results, increase in gene and protein expression of chitinase could induce host resistance against Fusarium seedling blight caused by *F.graminearum*.

Key words: wheat, Fusarium seedling blight, salicylic acid, *Fusarium graminearum*, priming