



## بررسی الگوی بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی در القای مقاومت به بیماری سفیدک سطحی در رقم حساس گندم پس از تیمار با اسید سالیسیلیک

لیلا آهنگر<sup>۱</sup>، ولی الله بابایی‌زاد<sup>۲</sup>، غلامعلی رنجبر<sup>۳</sup>، حمید نجفی زربینی<sup>۲</sup> و عباس بیابانی<sup>۴</sup>

۱- استادیار، دانشگاه گنبد کاووس، (نویسنده مسئول: l.ahangar63@gmail.com)

۲ و ۳- استادیار و دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- دانشیار، دانشگاه گنبد کاووس

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۴

### چکیده

گندم نان یکی از محصولات مهم زراعی در تغذیه جمعیت دنیا می‌باشد. تولید این محصول همواره با چالش‌های متعددی روبه‌رو بوده است. از جمله بیماری سفیدک سطحی در گندم که از راه عامل (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (Bgt) ایجاد می‌گردد، یکی از بیماری‌های مهم گندم به شمار می‌رود. روش‌های مختلفی برای کنترل این بیماری وجود دارد ولی کاربرد القا کننده‌ها از جمله اسید سالیسیلیک (SA) که می‌توانند مقاومت را به صورت سیستمیک در گیاهان القا نمایند، نیز از اهمیت خاصی برخوردار است. در این تحقیق به منظور بررسی توانایی SA در القای مقاومت در گندم در مقابل بیماری سفیدک سطحی، رقم فلات از حساس‌ترین ژنوتیپ به Bgt انتخاب شده و پس از تیمار به همراه گیاهان شاهد در معرض قارچ Bgt قرار گرفت. سپس الگوی تظاهر ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی *PR1*، *PR2*، *PR3* و *PR5* با استفاده از تکنیک Real Time PCR در پنج بازه زمانی و سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در هر دو گروه از گیاهان تیمار شده با SA و شاهد، روند تظاهر تمام ژن‌های مورد بررسی قبل و پس از اعمال آلودگی به صورت افزایشی بوده و حداکثر بیان آن‌ها تا ۲۴ ساعت بعد از زمان آلودگی مشاهده شد. روند افزایشی در گیاهان شاهد تدریجی بود، در حالی که در گیاهان تیمار شده القای زود هنگام و بالای ژن‌های دفاعی در ساعات اولیه بعد از آلودگی با Bgt به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد قابل توجه بود. این نتیجه نشان داد که SA با القای مقاومت سیستمیک سبب بیان زود هنگام و سریع در گیاه گندم شد و با افزایش بیان ژن‌های دفاعی سبب القای مقاومت در گیاه گردید. در هر دو گروه از گیاهان آزمایشی، ۴۸ ساعت بعد از آلودگی، روند کاهشی در بیان ژن‌های مورد مطالعه مشاهده شد که می‌تواند به دلیل جلوگیری از تظاهر مؤثر این ژن‌ها به دنبال تشکیل مکنه باشد. در نتیجه، این مطالعه مشخص شد که القا کننده SA با بیان بالای ژن‌های دفاعی در رقم حساس و کاهش تعداد کلنی رشد یافته قارچ Bgt در واحد سطح می‌تواند از کاندیدهای ایجاد مقاومت در رقم حساس به بیماری Bgt باشد.

واژه‌های کلیدی: گندم، اسید سالیسیلیک، بیان ژن، القای مقاومت

### مقدمه

کل پروتئین‌های برگ را تشکیل می‌دهد (۷). این پروتئین دارای اثرات ضد قارچی است به گونه‌ای که در شرایط آزمایشگاهی، PR-1 سبب کاهش جوانه‌زنی اسپور و کاهش طول لوله تندشی قارچ *Phytophthora infestans* و در شرایط طبیعی نیز سبب کاهش سطح آلودگی حاصل از قارچ اومایست<sup>۲</sup> شد (۳۲). در مطالعات میکروآرای در گندم تحت آلودگی با سفیدک سطحی ۴۶ ژن به عنوان پروتئین‌های PR شناسایی شدند که در هر دو ژنوتیپ حساس و مقاوم پس از آلودگی با بیمارگر افزایش یافتند. در میان این PRها ژن *PR1* با بیان ۶۲ برابری افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (۳۷). بنا به عنوان پروتئین‌های PR تحت عنوان PR2 شناخته می‌شوند، دومین گروه از PR پروتئین‌ها می‌باشد که بعد از حمله بیمارگر به گیاه و یا تحت تنش‌های زیستی یا غیرزیستی مختلف در گیاه القا می‌گردند و معمولاً به صورت سینرژیکی با آنزیم کیتیناز عمل می‌کند (۲۷). طبق بررسی‌هایی مشخص گردید، گندم‌های تراریخت شده با ژن کیتیناز جو به تنهایی یا همراه با ژن گلوکاناز

پروتئین‌های مرتبط با بیمارگر<sup>۱</sup> (PR) گروه متنوعی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در پاسخ به حمله بیمارگرها بیان می‌شوند (۳۲). این پروتئین‌ها 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 (۶). این پروتئین‌ها معمولاً در شرایط نرمال به مقدار کم در گیاهان توزیع شدند اما میزانشان در پاسخ به تنش یا حمله بیمارگرها به میزان زیادی افزایش می‌یابد (۳۱). در بررسی‌های مختلف ثابت شد که القای بیان ژن‌های PR در گیاهان از جمله غلات باعث افزایش مقاومت به بیمارگرها با رفتارهای مختلف بیماری‌زایی شد (۳۷، ۲۸، ۱۵). در میان همه PR پروتئین‌ها، *PR1* از مهم‌ترین آن‌ها در مقاومت به بیمارگرهای مختلف از جمله سفیدک سطحی می‌باشد (۳۲). این پروتئین بیشترین میزان را در میان سایر پروتئین‌های خانواده PR به خود اختصاص داده‌اند، به‌طوری‌که ۱-۲ درصد از

جو مقاومت بالایی را نسبت به گیاهان کنترل به آلودگی سفیدک سطحی گندم نشان دادند (۱۵). هم‌چنین سود و همکاران (۲۸) نیز بیان بالایی از ژن‌های *PR3* و *PR2* را در برنج تیمار شده با SA و BTH گزارش نمودند. علاوه بر این، از دیگر پروتئین‌هایی که مانع فعالیت ضدقارچی می‌شوند پروتئین‌های *PR5* می‌باشند. پروتئین‌های متعلق به این خانواده به دلیل شباهت توالی و ساختاری با پروتئین گیاهی *Thaumatooccus daniellii*، به پروتئین‌های شبه تاماتین<sup>۱</sup> (TLPs) هم معروف هستند (۱۸). پروتئین *PR5* در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضدقارچی داشته و مطالعات نشان دهنده آن بود که این پروتئین در گیاهان تراریخته باعث تأخیر بیماری در برابر بیمارگرهای مختلف مانند *Rhizoctonia*، *Fusarium*، *Botrytis* و *Sclerotinia* می‌گردد (۲۳). هم‌چنین بررسی میزان فعالیت این پروتئین در تلفیق با کیتیناز و بتا ۱، ۳-گلوکاناز نشان‌دهنده افزایش میزان فعالیت لیتیکی آن برای غلبه بر فعالیت قارچ می‌باشد (۳۶). زو و ردی (۳۸) نیز طی مطالعاتی بیان بالایی از ژن *PR5* را در گیاه آرابیدوپسیس پس از آلودگی با بیمارگرهای *A. solani* و *F. oxysporium* گزارش نمودند.

بیماری سفیدک سطحی گندم که به‌وسیله یک قارچ انگل اجباری به نام *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) ایجاد می‌گردد، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌ها در شرایط آب و هوایی معتدل بوده که به کاهش شدید عملکرد در مزارع گندم منجر می‌شود (۵). امروزه استفاده از ترکیبات قارچ‌کش به دلیل ضعف در کارایی، آلودگی محیط زیست و ایجاد مقاومت در بیمارگر چندان مورد توجه قرار نمی‌گیرد. از این رو کاربرد ترکیبات طبیعی و نیز استفاده از عوامل القاء‌کننده‌های مقاومت مثل ترکیبات شیمیایی (اسید سالیسیلیک) و عوامل بیولوژیکی (قارچ‌های هم‌زیست) که می‌توانند مقاومت را به صورت سیستمیک در گیاهان القا نمایند، از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند (۳۵). بر اساس مکانیسم‌های مختلفی که در ایجاد مقاومت القایی دخیل‌اند انواع مختلفی از مقاومت القایی تعریف شده است (۳۲). پدیده مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) که نیاز به تجمع مولکول‌های اسید سالیسیلیک (SA) دارد نوعی مقاومت القایی است که به تحریک فعالیت ژن‌های پاسخ‌دهنده به بیمارگر و القای مقاومت نسبت به عوامل بیماری‌زا منجر خواهد شد (۳۵). اسید سالیسیلیک یک مولکول علامت‌دهنده شناسایی شده است که می‌تواند نقش محوری در القای مقاومت گیاهان نسبت به عوامل بیماری‌زا داشته باشد (۳۵). تجمع SA در بافت‌های گیاهی به القای مستقیم بیان ژن‌های *PR*

در بافت‌ها به صورت سیستمیک و موضعی منجر می‌شود (۳۲). در پژوهشی نشان داد که گیاه آرابیدوپسیس موتانت (NahG) که به دلیل عدم توانایی در تولید یا تجمع SA قادر به القای SAR نبوده و حساسیت بالایی را به قارچ *Peronospora parasitica* نشان داد (۸). به طور کلی، کاربرد SA که ماده علامت‌دهنده است سبب تغییرات اکسایشی سلول، فعال کردن مکانیسم دفاعی سلول، القا نمودن ژن‌های کد کننده در ساختارهای دفاعی مختلف، تحریک پاسخ‌های دفاعی پایین دست، ایجاد SAR، فعال نمودن بیان ژن‌های دفاعی، تغییر آنزیم‌ها و پروتئین‌های دفاعی می‌گردد (۳). بنابراین چنان‌چه اشاره شد سفیدک سطحی یکی از یکی از بیماری‌های مهم گندم بوده که در تمامی مراحل رشدی گیاه به ویژه در مرحله خوشه‌دهی سبب ایجاد خسارات جبران‌ناپذیر می‌شود و کنترل شیمیایی آن علاوه بر صرف هزینه، در سلامت محیط زیست نیز مسئله ساز است. اگر چه از SA هنوز به صورت تجاری در سطح وسیع استفاده نمی‌شود ولی در چند مورد از آن در سطح گل‌خانه و مزرعه و باغ استفاده شد که نتایج آن تأثیر معنی‌داری را در کاهش خسارت بیماری‌ها نشان داد (۹،۴،۱). بنابراین در این پژوهش نیز به‌منظور بررسی تأثیر القاکننده شیمیایی SA در القای مقاومت در گندم حساس به *Bgt*، میزان بیان نسبی ژن‌های مسیر مقاومت شامل: *PR1*، *PR2*، *PR3* و *PR5* در گیاهان تیمار شده و شاهد پس از آلودگی به بیمارگر مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و نحوه تهیه و نگهداری قارچ سفیدک سطحی

در این بررسی ژنوتیپ فلات گندم تهیه شده از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، که رقم حساس به سفیدک سطحی گندم به شمار می‌آید مورد استفاده قرار گرفت. جدایه قارچ عامل بیماری (*Bgt*) نیز از بخش تحقیقات پاتولوژی غلات این مؤسسه تهیه و در آزمایشگاه روی یکی از ارقام نسبتاً حساس گندم به نام بولانی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰٪ در طول مدت این بررسی تکثیر و نگهداری شد (۲۰).

تیمار گیاهان حساس به قارچ *Bgt* با اسید سالیسیلیک برای بررسی تأثیر القاکننده SA در مقابل عامل بیماری، بذور مورد نیاز رقم حساس فلات به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شده و روی کاغذ فیلتر مرطوب در تشتک پتری قرار داده شدند. پس از جوانه زنی، بذور به گلدان حاوی خاک منتقل شده و در اتاقک رشد با تناوب ۱۶ ساعت

1- Thaumatin-Like Proteins

#### اندازه‌گیری الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه

بررسی بیان ژن (qRT-PCR) با استفاده از دستگاه *C1000™ Thermal Cycler* (BioRad) *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (2X) (فرمنتاز، Cat. No: K0221) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ۴ ژن مورد بررسی (*PR2*، *PR1*، *PR3* و *PR5*) شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ده دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس سپس ۴۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، یک دقیقه در ۶۰ 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 به‌وسیله ژن خانه‌دار *Actin* نرمال گردیدند. لیست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است. این آغازگرها پس از هم ردیف نمودن توالی‌های به‌دست آمده از بانک ژنی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) به‌وسیله نرم‌افزارهای *BioEdit 7.0.9.0* و *OligoExplorer V1.4* طراحی گردیدند. نرخ بیان ژن با استفاده از روش  $2^{-Ct}$  اندازه‌گیری شد (۱۹). این آزمایش در سه تکرار زیستی و دو تکرار آزمایشگاهی انجام گردید و پس از محاسبه بیان ژن‌های مورد مطالعه برای هر نمونه، انحراف معیار آن‌ها محاسبه و در نهایت نتایج برای مقایسه بین ساعات پس از آلودگی در گیاه تیمار شده با گیاه کنترل با استفاده از آزمون *t* آنالیز شدند.

#### نتایج و بحث

##### ارزیابی توانایی اسید سالیسیلیک در القای مقاومت

نتایج حاصل از بررسی القای مقاومت با استفاده از SA در گندم حساس فلات به قارچ *Bgt* بیان‌گر کاهش ۴۲ درصدی تعداد کلنی رشد یافته در برگ گیاهان تیمار شده با SA نسبت به گیاهان شاهد بود (شکل ۱). این نتایج حاکی از توانایی SA در القای مقاومت در گندم حساس به قارچ *Bgt* از طریق ممانعت از توسعه بیماری بود که با نتایج کائو و همکاران (۴) و سود و همکاران (۲۸) مطابقت داشت.

روشنایی با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و هشت ساعت تاریکی بادمای ۲۰ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۷۰٪ نگهداری شدند. پس از گذشت دو هفته، گیاهچه‌ها به‌وسیله محلول SA در غلظت ۳ mM تیمار شدند. برای حل نمودن SA ابتدا آن را با اتانول (۱۰٪ حجمی) حل نموده سپس با آب مقطر به حجم رسانیده شد (۲۱). به منظور بررسی دقیق‌تر گیاهان شاهد نیز به‌وسیله آب مقطر حاوی اتانول (۱۰٪ حجمی) تیمار گردیدند. ارزیابی توانایی اسید سالیسیلیک در القاء مقاومت به سفیدک سطحی

به‌منظور بررسی توانایی SA در القای مقاومت در گندم حساس به قارچ *Bgt*، برگ گیاه حساس ۴۸ ساعت پس از تیمار با SA به‌همراه گیاهان کنترل در محیط آب آگار حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بنزومیدازول در تشتک‌های پتری دیش قرار گرفتند. یک هفته پس از زمان آلوده‌سازی، تعداد کلنی رشد یافته در ۲/۵ سانتی‌متر مربع هر برگ شمارش گردید.

##### مابه‌زنی گیاهان تیمار شده و شاهد با قارچ *Bgt*

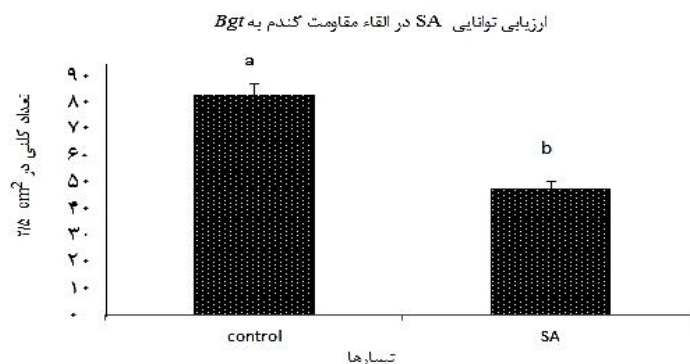
حدود ۴۸ ساعت پس از تلقیح با SA، گیاهان تیمار شده به‌همراه گیاهان تیمار نشده (شاهد) به‌وسیله قارچ سفیدک سطحی با غلظت ۵۰ کنیدیوم در میلی‌مترمربع آلوده شدند. پس از آلوده‌سازی گیاهچه‌ها مجدداً به اتاقک رشدی با شرایط ذکر شده منتقل شدند. سپس، در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی از هر رقم کشت شده در گلدان، ۱۰ برگ اول در هر مرحله انتخاب و در فریزر  $-۸۰^{\circ}\text{C}$  برای استخراج RNA نگهداری شدند.

##### استخراج RNA از نمونه‌ها و ساخت cDNA

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 به‌وسیله کیت *DNaseI*, *RNase-free kit* (Fermentas) *EN0525* (Cat. No: EN0525) تیمار شده و cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis* (فرمنتاز، ساخته شد. تمامی این مراحل طبق دستورالعمل هر کیت انجام گرفت.

جدول ۱- لیست آغازگرهای مورد استفاده به همراه محصول نهایی

Genes	Sequence Primer	Product
<i>TaActin</i>	F: GGA AAA GTG CAG AGA GAC ACG R: TAC AGT GTC TGG ATC GGT GGT	۱۵۰
<i>Ta PR1</i>	F: ACT ACG ACT ACG GGT CCA ACA R: TCG TAG TTG CAG GTG ATG AAG	۱۵۴
<i>Ta PR2</i>	F: AGC AGA ACT GGG GAC TCT TCT R: CAC ATA CGT ACC GCA TAC ACG	۱۵۰
<i>Ta PR3</i>	F: CCC TAC ACA TGG GGC TAC TG R: CCT GCC CGT AGT TGT AGT TGT	۱۴۵
<i>Ta PR5</i>	F: CAG GAC TTC TAC GAC ATC TCG R: TCT GGT AGT TAT TAT TGC CAC TGC	۱۴۳



شکل ۱- ارزیابی توانایی SA در القای مقاومت در گندم به قارچ *Bgt* بر اساس شمارش تعداد کلنی در  $2/5\text{cm}^2$  در برگ گیاهان تیمار شده (SA) و گیاه تیمار نشده (control). مقایسه میانگین به روش LSD در سطح ۱٪ انجام گرفت.

رونوشت حاکی از آن بود که میزان بیان در گیاهان تیمار شده حدود  $2/2$  برابر بیشتر از گیاهان کنترل بوده و این افزایش بیان در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. سپس در ۴۸ ساعت پس از آلودگی هر دو گروه از گیاهان روند کاهشی از بیان ژن را نشان دادند. در جو و سایر غلات بیان ژن خانواده *PR1*، معمولاً نشان‌گر قابل قبولی هستند که در مقاومت گیاه به بیماری سفیدک سطحی و سایر بیمارگرها به کار برده می‌شود (۲۵). در این بررسی آنالیز الگوی بیان ژن *PR1b* بیانگر افزایش قابل ملاحظه این ژن در گیاهان تیمار شده با SA قبل و پس از آلودگی به قارچ *Bgt* بود. به طوری که این گیاهان بیان بالایی از ژن *PR1b* را در همان ساعات اولیه پس از آلودگی نشان داده و سپس در زمان اوج حمله قارچ (۲۴ ساعت پس از آلودگی) به حداکثر میزان رونوشت خود رسیدند. بنابراین استنباط می‌گردد SA با القای بالای ژن *PR1* نقش بسیار مهمی را در کنترل نفوذ و گسترش هاستوریوم قارچ سفیدک ایفا می‌نماید که با نتایج گلازبروک (۱۰) و برودرسون و همکاران (۲) منطبق می‌باشد. از سویی دیگر افزایش سطح رونوشت ژن *PR1b* در تمامی ساعات نمونه‌برداری در گیاهان تیمار شده در مقایسه با گیاه کنترل را می‌توان به نقش مؤثر این ژن در کنار ژن‌های اصلی در

#### بررسی بیان ژن‌های *PR* توسط RT-PCR کمی وضعیت الگوی بیان ژن *PR1*

نتایج بررسی بیان نشان داد که میزان بیان ژن *PR1b* در گیاهان تیمار شده با SA روند افزایشی داشته است، به طوری که این گیاهان ۴۸ ساعت پس از تیمار با میزان بیان  $2/8$  برابری نسبت به گیاه کنترل به بیشترین میزان بیان خود رسیدند که در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۲a). تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن *PR1b* پس از آلودگی با قارچ *Bgt* نیز حاکی از افزایش بیان این ژن در گیاهان تیمار شده و کنترل بوده، ولی روند افزایشی بیان ژن در گیاهان تیمار شده به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان کنترل بود. این گیاهان در همان ساعات اولیه (۶ ساعت) پس از آلودگی با ۲ برابر افزایش بیان نسبت به گیاهان کنترل اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان دادند (شکل ۲a). بیان این ژن در بازه‌های بعدی پس از آلودگی دارای روندی افزایشی بود به طوری که در ۱۲ ساعت پس از آلودگی  $21/6$  برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت درحالی که گیاهان کنترل تنها  $9/8$  برابر افزایش بیان را نسبت به زمان کنترل خود نشان دادند. سپس هر دو گروه از گیاهان در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بیشترین میزان بیان خود رسیدند. ولی مقایسه میزان

می‌شود که پس از درک آن محرکی است که سبب فعال شدن پاسخ‌های دفاعی ثانویه با تولید فیتوالکسین‌ها در برای مقابله با بیمارگر می‌گردد (۱۱). بنابراین بیان سریع و بالای ژن *PR2b* در ارقام القا شده نسبت به رقم حساس فلات مؤثر بودن این ژن را در القای مسیر مقاومت تأیید می‌نماید. از سویی بیان بالای این ژن در ۲۴ ساعت پس از آلودگی بیانگر این است که این ژن با القای بیشینه بیان خود سبب القای HR در سلول‌های آلوده میزبان شده تا با آزاد سازی آنزیم‌های هیدرولیتیکی موجود در سلول، سبب تخریب قارچ *Bgt* و حمایت از گیاه در برابر حمله و توسعه بیمارگر گردد.

#### وضعیت الگوی بیان ژن کیتیناز (*PR3*)

پروتئین‌های کیتیناز گروهی از اندوکیتینازها می‌باشند که رشد قارچ را به‌وسیله تجزیه ساختار کیتین دیواره قارچ محدود می‌نمایند (۲۸). نتایج این بررسی نشان داد تیمار کردن SA روی برگ رقم حساس فلات سبب افزایش میزان بیان نسبی ژن *PR3* گردید به‌طوری‌که این گیاهان پس از تیمار با بیشینه بیان ۴/۷ برابری نسبت به زمان کنترل، اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان دادند (شکل ۲c). همچنین آنالیز qPCR پس از آلودگی با قارچ *Bgt* نیز حاکی از افزایش میزان بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با SA در همان ساعات اولیه پس از آلودگی بود. به‌طوری‌که این گیاهان در ۶ و ۱۲ ساعت پس از آلودگی به ترتیب با میزان بیان ۲/۵ و ۲/۹ برابری نسبت به گیاهان کنترل، افزایش معنی‌داری نشان دادند. سپس در ۲۴ ساعت پس از آلودگی، با میزان بیان ۳۷/۵ برابری نسبت به زمان صفر به بیشترین میزان بیان خود رسیدند. درحالی‌که گیاهان کنترل در مقایسه با گیاهان تیمار شده روند آرامی از بیان ژن *PR3* را نشان داده و همانند گیاهان تیمار شده در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به اوج بیان خود رسیدند. ولی مقایسه میزان بیان در زمان اوج بیان نشان داد که میزان رونوشت در گیاهان تیمار شده حدود سه برابر بیشتر از گیاهان کنترل بود که این افزایش بیان در سطح پنج درصد معنی‌دار می‌باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که پس از کاربرد خارجی SA روی برگ‌های رقم فلات سطح تظاهر ژن *PR3* در گیاهان تیمار شده بیشتر از گیاهان کنترل می‌باشد که این نشان دهنده این است که بیان این ژن تحت تأثیر SA قرار دارد که با نتایج سود و همکاران (۲۸) مطابقت داشت. از سویی بیان بالای ژن *PR3* در گیاهان تیمار شده پس از آلودگی بیانگر فعال بودن مقاومت القایی SAR در آن‌ها می‌باشد به طوری‌که این گیاهان از توانایی بالایی در مقابله با بیمارگر برخوردار بوده لذا پس از دریافت اولین سیگنال مبنی بر حضور بیمارگر شروع به بیان ژن‌های مسیر مقاومتی از جمله *PR3* می‌نمایند.

القای مقاومت گندم به قارچ *Bgt* نسبت داد و این که ژن *PR1* در گندم را می‌توان نشان‌گر مطمئنی برای مقاومت به بیماری *Bgt* در نظر گرفت. به طوری‌که نقش ضدقارچی *PR1* در سیستم دفاعی جو از سوی شولتسیس و همکاران (۲۵) و گندم از طرف زین و همکاران (۳۷) برای جلوگیری از نفوذ سفیدک سطحی تأیید شد.

#### وضعیت الگوی بیان ژن *PR2*

پروتئین‌های *PR2* که به بتا ۱-۳ گلوکانازها شهرت دارند دومین گروه از پروتئین‌های PR بوده که معمولاً در نوک هیف‌های قارچ تجمع می‌یابند. این پروتئین از طریق هضم گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ، سبب تخریب این پلی‌ساکاریدها، آزاد شدن الیگوساکاریدها، مرگ سلولی و در نهایت از بین رفتن قارچ‌ها می‌گردد (۱۱). تجزیه و تحلیل بیان ژن *PR2b* نشان داد که ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی، گیاهان تیمار شده با میزان بیان ۳/۱۳ برابری نسبت به زمان کنترل به بیشترین میزان بیان خود رسیدند (شکل ۲b). پس از مایه زنی با قارچ *Bgt*، نیز میزان بیان ژن *PR2b* در گیاهان تیمار شده و کنترل دارای روند افزایشی است ولی میزان افزایش در گیاهان تیمار شده کاملاً قابل ملاحظه می‌باشد. به‌طوری‌که میزان بیان در گیاهان تیمار شده با SA در ۶ ساعت پس از آلودگی القا گردید. این گیاهان در ۱۲ ساعت پس از آلودگی با ۳/۸ برابر افزایش بیان نسبت به گیاه کنترل تفاوت معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان داده و سپس در ۲۴ ساعت پس از آلودگی با میزان بیان ۱۶/۴ برابری نسبت به زمان صفر به بیشترین سطح رونوشت خود رسیدند. در مقابل گیاهان کنترل نیز با روند نسبتاً آرامی در همین بازه زمانی به اوج بیان خود رسیدند، ولی مقایسه میزان بیان نشان داد که گیاهان تیمار شده با میزان رونوشت ۱/۷ برابری نسبت به گیاهان کنترل تفاوت معنی‌داری را سطح یک درصد نشان دادند.

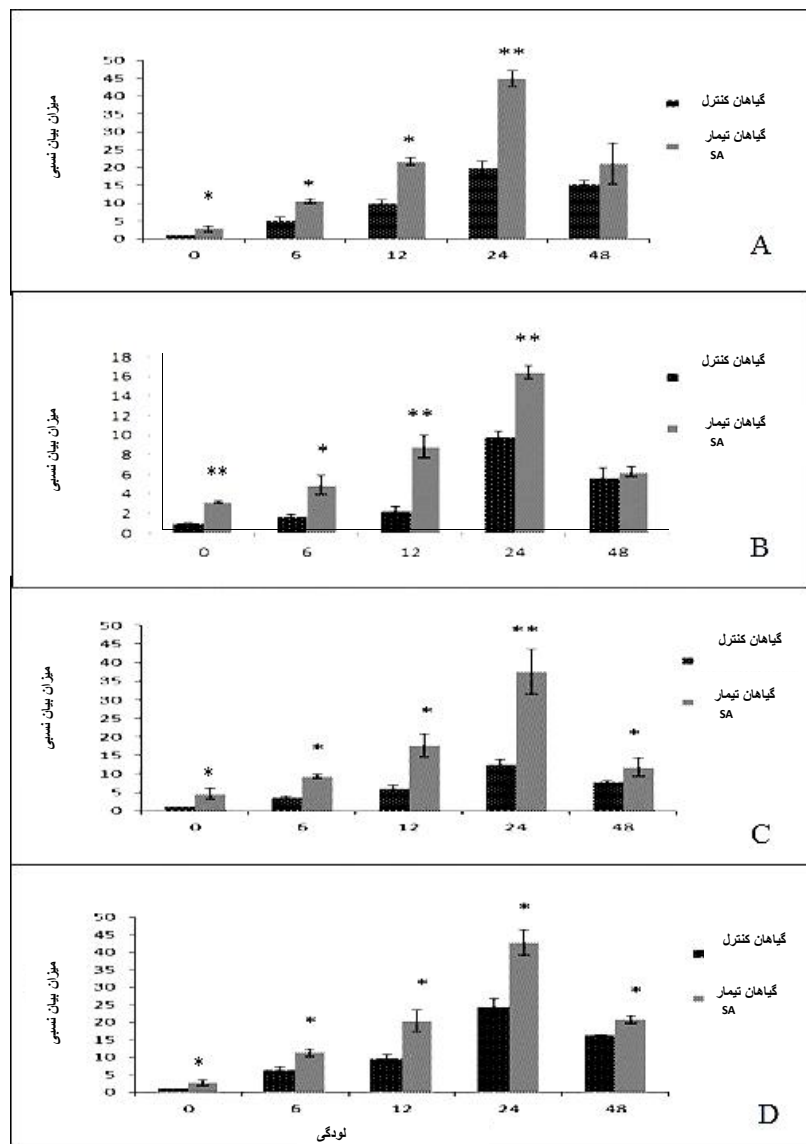
به طور کلی آنالیز الگوی بیان ژن *PR2b* در رقم حساس فلات پس از تیمار با SA و بیماری، حاکی از تأثیر بالای این القاکننده در فعال کردن مکانیسم مقاومتی و افزایش بیان ژن مورد نظر در گیاه می‌باشد. به طوری‌که این گیاهان با افزایش سطح بیان این ژن پس از آلودگی تلاش می‌کنند از نفوذ میخ رخنه و گسترش هاستوریوم قارچ در سلول‌ها جلوگیری نموده تا از گیاه در برابر بیمارگر *Bgt* حمایت نمایند که این یافته با نتایج سود و همکاران (۲۸) و ینگ‌ژانگ و همکاران (۳۹) مطابقت داشت. نتایج مطالعات نشان داد که *PR2*‌ها در تشکیل پاپیلا نقش بسزایی را در گیاه ایفا می‌نمایند (۱۳). از طرفی این پروتئین به‌وسیله تخریب دیواره سلولی قارچ سبب آزادسازی الیگوساکاریدها

از سویی با توجه به نحوه عملکرد *PR3* به نظر می‌رسد که این آنزیم نیز همانند آنزیم بتا ۱،۳ گلوکاناز پس از دریافت سیگنال حمله بیمارگر و انتقال آن به داخل سلول، پاسخ‌های دفاعی ثانویه و تولید فیتوالکسین‌ها را در گیاه القا نموده و در نهایت با ایجاد مرگ سلولی سبب آزادسازی آنزیم‌های کیتینازی واکوئلی می‌گردد تا با تجزیه دیواره سلولی قارچ سبب انهدام بیمارگر شوند. بنابراین بیان بالای این ژن در گیاهان تیمار شده پس از آلودگی را می‌توان به نقش ضد قارچی این ژن در سیستم دفاعی گیاه نیز نسبت داد که با نتایج کانگ و بوشناتور (۱۶) و کالینینا و همکاران (۱۵) مطابقت داشت.

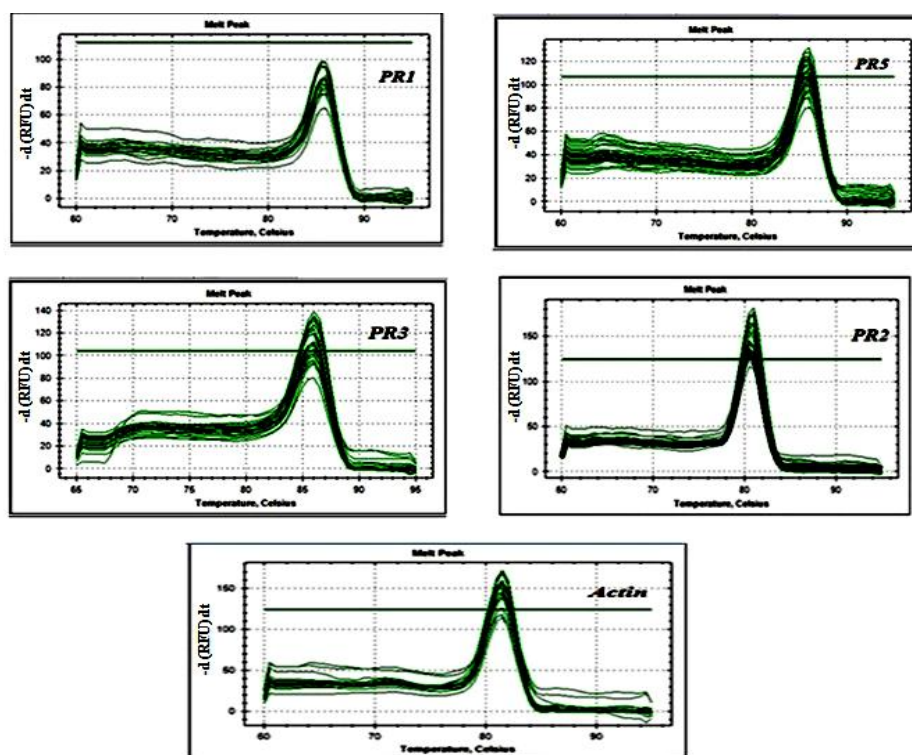
#### وضعیت الگوی بیان ژن *PR5*

آنالیز الگوی تغییرات ژن *PR5* نشان داد که میزان بیان این ژن نیز همانند سایر *PR*های مورد بررسی پس از تیمار با *SA* افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاه کنترل نشان داد (شکل ۲d). همچنین پس از اعمال آلودگی نیز سطح بیان این ژن در این گیاهان در همان ساعات اولیه پس از آلودگی به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان کنترل افزایش یافته است. به طوری که این گیاهان در ۱۲ ساعت پس از آلودگی افزایش بیان ۲/۲ برابری را نسبت به گیاه کنترل نشان داده و سپس در ۲۴ ساعت پس از آلودگی با میزان بیان ۴۲/۷ برابری نسبت به زمان صفر به اوج بیان خود رسیدند. در حالی که گیاهان کنترل روند افزایشی ولی آرامی از میزان بیان ژن *PR5* را پس از آلودگی نشان داده و نهایتاً در ۲۴ ساعت پس از آلودگی با میزان بیان ۲۴/۴ برابری نسبت به زمان صفر به بیشینه بیان خود رسیدند. مقایسه میزان رونوشت در این بازه زمانی نشان داد که میزان رونوشت در گیاهان تیمار شده با افزایش ۱/۸ برابری نسبت به گیاهان کنترل تفاوت معنی‌داری را در سطح پنج درصد نشان دادند. آنالیز الگوی بیان ژن

*PR5* در این مطالعه نشان داد که میزان بیان در گیاهان تیمار شده در همان ساعت اولیه پس از آلودگی القا گردید و سپس در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بیشینه بیان خود رسید. این نتیجه بیانگر تأثیر بالای القاکننده *SA* در افزایش بیان این ژن می‌باشد که با مطالعات انجام شده توسط آکنس و همکاران (۳۰) و زو و ردی (۳۸) مطابقت داشت. پروتئین‌های متعلق به خانواده *PR5* دارای ایزوفرم‌های مختلفی است که نقش‌های متنوعی مثل فعالیت‌های ضد قارچی و حفاظت در برابر استرس‌های غیرزیستی را دارند (۳۳،۳۲). بنابراین بر اساس نحوه عملکرد این پروتئین بیان بالای این ژن در ساعات اولیه آلودگی که مصادف با نفوذ قارچ می‌باشد احتمالاً به دلیل فعالیت بالای این پروتئین در از بین بردن قارچ و جلوگیری از جوانه‌زنی اسپور قارچ می‌باشد. به طوری که مطالعات انجام شده در زمینه موقعیت مکانی این پروتئین نیز حاکی از شناسایی یک *PR5* بازی، در دیواره سلولی قارچ *P. infestans* و در دانه‌های نشاسته کلروپلاست‌ها و در پایلای برگ‌های گوجه فرنگی بیان‌کننده *SAR* بود (۱۴) همچنین مطالعات نشان داد که پروتئین *PR5* از طریق تأثیر بر غشای قارچ سبب تراوایی غشای سلولی قارچ و افزایش جذب سایر ترکیبات ضدقارچی در آن‌ها و در نهایت از بین رفتن قارچ می‌گردند (۳۴). لذا بیان بالای این ژن در بازه‌های زمانی بعدی پس از آلودگی مصادف با رشد قارچ و تولید هاستوریوم احتمالاً حاکی از فعالیت ضد قارچی بالای این پروتئین در از بین بردن قارچ *Bgt* و لیز شدن دیواره سلولی آن در گیاه می‌باشد. علاوه بر این در شکل ۳، منحنی ذوب مربوط به ژن‌های مورد بررسی نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود هیچ نوع پیک اضافی که حاکی از تکثیر غیراختصاصی ژن مورد نظر و وجود آغازگر دایمر باشد دیده نمی‌شود.



شکل ۲- سطح بیان ژن‌های *PR1* (A)، *PR2* (B)، *PR3* (C) و *PKD* (D) در گیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک و گیاهان کنترل پس از آلودگی با *Bgt*. \* و \*\*: به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار در سطوح ۵ و ۱ درصد در آزمون t می‌باشد. میل بارها (I) نشان‌دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می‌باشد.



شکل ۳- منحنی ذوب ریل تایم برای ژن‌های (A) *PR1*، (B) *PR2*، (C) *PR3* و (D) *PR5* در گیاهان تیمار شده با اسید سالسیلیک و گیاهان کنترل قبل و پس از آلودگی با *Bgt*. آنالیز مرحله ذوب نشان‌دهنده وجود تنها یک پیک با دمای ذوب مشخص می‌باشد که در واقع تأییدی بر تک محصوله بودن آغازگرهای مورد استفاده می‌باشد.

ادامه داده و نهایتاً در ۲۴ ساعت پس از آلودگی هر دو گروه به بیشینه بیان خود رسیدند. در حالی که نتایج مطالعات حاکی از وجود تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان کنترل در این بازه زمانی می‌باشد که این نتایج بیانگر مؤثر بودن نقش *SA* در القای ژن‌های مسیر مقاومت می‌باشد. از سویی تمامی ژن‌های مورد بررسی ۴۸ ساعت پس از آلودگی با *Bgt* روند کاهشی بیان را نشان دادند ولی میزان کاهش در رقم حساس فلات مشهودتر می‌باشد که این کاهش بیان می‌تواند به دلیل استقرار هاستوریوم قارچ در سلول میزبان باشد (۲۰، ۲۹). در حالی که گیاهان تیمار شده بیان بالاتری را نسبت به رقم حساس نشان دادند که این بیانگر این است که این گیاهان هم‌چنان با حفظ نسبتاً بالای بیان ژن‌ها تلاش می‌نمایند که به‌وسیله کنترل رشد قارچ از خسارت‌های ناشی از آلودگی‌های ثانویه معافیت نمایند.

شواهد هم‌چنین نشان‌دهنده این است که ترکیبات *SA* یا *BTH* دارای دو اثر مهم روی گیاه می‌باشند. آن‌ها در ابتدا، سبب فعال‌سازی سریع ژن‌های مرتبط با دفاع مثل *PR*ها شده و در نهایت با آماده سازی ژن‌های دفاعی سبب تقویت دیواره سلولی و متعاقباً القای مرگ

اسید سالسیلیک یک هورمون درون‌زا است که سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را طی تنش‌های زنده و محیطی تنظیم می‌کند (۲۴، ۱۲). کاربرد *SA* و آنالوگ‌های آن مانند *BTH*، به‌وسیله القای مکانیسم مقاومتی *SAR* سبب افزایش بیان ژن‌های دفاعی در بافت‌های تیمار شده می‌گردد (۲۴). با توجه به این که *SAR* یک هدف عالی برای کنترل خسارت بیماری‌های گیاهی از جمله قارچ‌ها می‌باشد، شناخت بهتر این مسیر می‌تواند منجر به ایجاد روش‌های مطمئن‌تری برای حفاظت از محصول شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سطح بیان تمامی ژن‌های دفاعی مورد مطالعه، ۴۸ ساعت پس از تیمار با محلول ۳mM از *SA* افزایش معنی‌داری را نشان داده که این نتیجه بیانگر القای بیان این ژن‌ها تحت تأثیر *SA* می‌باشد. هم‌چنین پس از اعمال آلودگی نیز گیاهان تیمار شده با بیان بالا و زود هنگام خود تفاوت معنی‌داری را با گیاهان کنترل نشان دادند. به طوری که میزان بیان ژن‌های دفاعی در گیاهان تیمار شده در ساعات اولیه پس از آلودگی مصادف با رشد لوله تندشی اولیه به طور معنی‌داری القا گردید. سپس با تفاوت معنی‌دار در ۱۲ ساعت پس از آلودگی مصادف با نفوذ میخ رخنه به روند افزایشی خود



اساس نتایج حاصله پیشنهاد می‌شود که القا کننده SA با در نظر گرفتن مزایای زیست محیطی آن‌ها و نیز هزینه‌های فراوان کودهای شیمیایی از نظر اقتصادی و هزینه‌های جبران ناپذیر زیست محیطی، کاهش خسارت بیماری و کم نمودن آثار سوء استفاده از سم‌های شیمیایی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین بر اساس یافته‌های سایر محققین و نتایج این بررسی ضرورت مطالعه در امکان استفاده از SA در سطح مزرعه در برای مدیریت سفیدک سطحی در مراحل بحرانی بیماری در گندم را تأیید می‌کند. علاوه بر این در این راستا، بیماری شناسان گیاهی ضمن ارایه سیستم‌های مدیریت تلفیقی بیماری‌های گیاهان، در این نظر متفق‌القول‌اند که هدف نهایی کاربرد القاکننده‌ها مهار کامل بیماری نیست و تنها کاهش خسارت ناشی از بیماری‌ها با حداقل خسارت به محیط زیست مدنظر می‌باشد. از این رو به جرأت می‌توان گفت که القای مقاومت یک پدیده امید بخش بوده و نیاز به آن یک ضرورت تمام می‌باشد. بنابراین تصور می‌شود که القای مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان از طریق القاکننده‌ها یک استراتژی جدید برای حفاظت از گیاه در برابر استرس‌های زیستی و غیرزیستی باشد. کاربرد القاکننده‌ها برای حفاظت از محصول و مدیریت آفت، هنوز در مراحل اولیه پیشرفت خود می‌باشد، اما ممکن است به دلیل اثر بخشی اقتصادی و زیست محیطی به جای آفت‌کش‌های شیمیایی رایج مورد استفاده قرار گیرند.

سلولی طی HR در صورت حمله بیمارگر می‌گردند (۱۷). از سویی بیمارگر *Bgt* یک قارچ بیوتروف بوده که سبب فعال‌سازی مسیر SAR در گیاه می‌شود (۳۰). بنابراین بر اساس نتایج حاصله می‌توان چنین استنباط نمود که کاربرد خارجی SA روی برگ رقم حساس فلات با القای آماده‌باش در گیاه حساس سبب القای مکانیسم SAR با پتانسیل بالاتر در گیاه و به دنبال آن بیان بالای ژن‌های مسیر مقاومتی از جمله *PR*‌ها و نهایتاً ایجاد مقاومت به بیمارگر سفیدک سطحی در گیاه می‌گردند. به طوری که گیاهان پیش تیمار شده به محض تماس بیمارگر و دریافت سیگنال‌های مربوطه، به‌وسیله القای بالا و سریع ژن‌های دفاعی در مراحل اولیه رشد لوله تندشی و میخ‌رخنه از نفوذ قارچ جلوگیری نموده و همچنین با القای مرگ سلولی در زمان اوج حمله قارچ (۲۴-۱۶ ساعت پس از آلودگی) از رشد و توسعه هاستوریوم جلوگیری می‌نمایند. به طوری که کاهش تعداد کلنی رشد یافته در گیاهان پیش تیمار شده نسبت به گیاهان کنترل تأییدکننده این مطلب می‌باشد. نتایج حاصله با مطالعات سیاهپوش و همکاران (۲۶)، ناندی همکاران (۲۲) و کو و همکاران (۴) مبنی بر نقش SA در حفاظت از گندم به بیماری *Bgt* مطابقت داشت.

به‌طور کلی نتایج حاصل از الگوی بیان ژن و شمارش کلنی‌های رشد یافته حاکی از مؤثر بودن نقش SA در القای مقاومت در گندم حساس به قارچ *Bgt* بود. لذا بر

## منابع

- Alkahtani, M., S.A. Omer, M.A. El-Naggar, E.M. Abdel-Kareem and M.A. Mahmoud. 2011. Pathogenesis-related protein and phytoalexin induction against Cucumber Powdery Mildew by elicitors. International Journal of Plant Pathology, 2: 63-71.
- Brodersen, P., F.G. Malinovsky, K. Hématy, M.A. Newman and J. Mundy. 2005. The role of salicylic acid in the induction of cell death in Arabidopsis acd11. Plant Physiology, 138: 1037-45.
- Buchanan, B.B. 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland, pp: 610-628.
- Cao, J.K., K.F. Zeng and W.B. Jiang. 2006. Enhancement of postharvest disease resistance in Ya Li pear (*Pyrus bretschneideri*) fruit by salicylic acid sprays on the trees during fruit growth. European Journal Plant Pathology, 114: 363-370.
- Conner, R.L., A.D. Kuzyk and H. Su. 2003. Impact of powdery mildew on the yield of soft white spring wheat cultivars. Canadian Journal Plant Science, 83: 725-728.
- Dahleen, L., P.A. Okubara and A.E. Blech. 2001. Transgenic Approaches to Combat Fusarium Head Blight in Wheat and Barley. Crop Science, 41: 628-637.
- Datta, K., S. Muthukrishnan and S.K. Datta. 1999. Expression and function of PR- proteins genes in transgenic plants. In: Datta, S.K., Pathogenesisrelated proteins in plants. CRC Press, Boca Raton, 261-291.
- Donofrio, N.M. and T.P. Delaney. 2001. Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised Arabidopsis *nim1-1* and salicylate hydroxylase plants Molec. Plant-Microbe Interaction, 14: 439-50.
- Du, Q., W. Zhu, Z. Zhao, X. Qian and Y. Xu. 2011. Novel benzo-1,2,3-thiadiazole-7-carboxylate derivatives as plant activators and the development of their agricultural applications. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60: 346-353.
- Glazebrook, J. 1999. Genes controlling expression of defense response in Arabidopsis. Current Opinion Plant Biology, 2: 280-286.
- Hernández, H., M. Figueredo, N. Garrido, L. Sánchez and J. Sarracent. 2005. Intranasal immunisation with a 62 kDa proteinase combined with cholera toxin or CpG adjuvant protects against *Trichomonas vaginalis* genital tract infections in mice. International Journal for Parasitology, 35: 1333-1337.
- Horvath, E., G. Szalai and T. Janda. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. Journal of Plant Growth Regulation, 26: 290-300.

13. Hu, G. and F.H.J. Rijkenberg. 1998. Subcellular localization of  $\alpha$ -1,3-glucanase in *Puccinia recondita* sp. *tritici*-infected wheat leaves. *Planta*, 204: 324-334.
14. Jeun, Y. Ch. and H. Buchenauer. 2001. Infection structures and localization of pathogenesis-related protein AP24 in leaves of tomato plants exhibiting systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* after pre-treatment with 3-aminobutyric acid or tobacco necrosis virus. *Journal of Phytopathology*, 149: 141-153.
15. Kalinina, O., S.L. Zeller and B. Schmid. 2011. Competitive Performance of Transgenic Wheat Resistant to Powdery Mildew. *Plos One*, 6: 1-11.
16. Kang, Z. and H. Buchenauer. 2002. Immunocytochemical localization of  $\alpha$ -1,3-glucanase and chitinase in *Fusarium culmorum*-infected wheat spikes. *Physiological and molecular plant pathology*, 60: 141-153.
17. Kohler, A., S. Schwindling and U. Conrath. 2002. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPRI/NIMI* Gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 128: 1046-1056.
18. Linthorst, H.J.M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Review Plant Science*, 10: 123-150.
19. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta C_T}$  method. *Methods*, 25: 402-408.
20. Molitor, A., D. Zajic, L.M. Voll, J. Pons-Hückelhoven, B. Samans, K.H. Kogel and F. Waller. 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.
21. Muchembled, J., A. Loune's-Hadj Sahraoui, A. Grandmougin-Ferjani and M. Sancholle. 2006. Changes in lipid composition of *Blumeria graminis* sp. *tritici* conidia produced on wheat leaves treated with heptanoyl salicylic acid. *Phytochemistry*, 67: 1104-1109.
22. Nandi, B., K. Kundu, N. Banerjee and S.P.S. Babu. 2003. Salicylic acid induced suppression of *Meloidogyne incognita* infestation of okra and cowpea. *Nematology*, 5: 742-752.
23. Punja, K.Z. 2002. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens a review of progress and future prospects. *Canadian Journal Plant Pathology*, 23: 216-235.
24. Senaranta, T., D. Teuchela, E. Bumm and K. Dixon. 2000. Acetylsalicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30: 157-161.
25. Schultheiss, H., C. Dechert, L. Király, J. Fodor, K. Michel, K.H. Kogel and R. Hückelhoven. 2003. Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science*, 165: 1275-1280.
26. Siahpoush, S., N. Sahebani and H. Aminian. 2011. Change of some defense compounds of cucumber treated with *Bacillus cereus* and salicylic acid against *Meloidogyne javanica*. *African Journal of Plant Science*, 5: 829-834.
27. Simmons, C.R. 1994. The physiology and molecular biology of plant 1,3-b-d-glucanases and 1,3;1,4-b-d-glucanases. *Critical Review Plant Science*, 13: 325-387.
28. Sood, N., B.S. Sohal and J.S. Lore. 2013. Foliar Application of Benzothiadiazole and Salicylic Acid to Combat Sheath Blight Disease of Rice. *Rice Science*, 20: 349-355.
29. Spanu, P.D., J.C. Abbott, J. Amselem and T.A. Burgis. 2010. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science*, 330: 1543-1546.
30. Uknes, S., B. Mauch-Mani, M. Moyer, S. Potter, S. Williams, S. Dincher, D. Chandler, A. Slusarenko, E. Ward and J. Ryals. 1992. Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 4: 645-656.
31. Van Loon, L.C. and E.A. Van Strien. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 85-97.
32. Van Loon, L.C., M. Rep and C.M.J. Pieterse. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Phytopathology*, 44: 135-162.
33. Velazhahan, R., S.K. Datta and S. Muthukrishnan. 1999. The PR-5 family: thaumatin-like proteins. In: S.K. Datta and S. Muthukrishnan (ed.), *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp: 107-129.
34. Vigers, A.J., S. Wiedemann, W.K. Roberts, M. Legrand, C.P. Selitrennikoff and B. Fritig. 1992. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Science*, 83: 155-161.
35. Vlot, A.C., D.A. Dempsey and D.F. Klessig. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 177-206.
36. Woloshuk, C.P., E.J.S. Meulenhoff, M. Sela-Buurlage, P.J.M. Van den Elzen and B.J.C. Cornelissen. 1991. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 3: 619-628.
37. Xin, T., X. Wang, H. Peng, Y. Yao, Ch. Xie, Y. Han, Zh. Ni and Q. Sun. 2012. Transcriptome Comparison of Susceptible and Resistant Wheat in Response to Powdery Mildew Infection. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 10: 94-106.
38. Xu, H. and A.S.N. Reddy. 1997. Cloning and expression of aPR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Molecular Biology*, 34: 949-959.
39. Ying-Zhang, L., Z. Xiao-Hua and T. Hai-Lin. 2003. Increase of  $\beta$ -1, 3-glucanase and chitinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of *Verticillium dahliae* Kleb. *Acta Botanica Sinica*, 45: 802-808.

## Study of *PR* Gene Expression Pattern related to in Induced Resistance to Powdery Mildew in Susceptible Wheat Genotype after Treating with Salicylic Acid

Leila Ahangar<sup>1</sup>, Valiollah Babaezad<sup>2</sup>, Gholam Ali Ranjbar<sup>3</sup>,  
Hamid Najafi Zarrini<sup>2</sup> and Abbas Biabani<sup>4</sup>

---

1- Assistant Professor, Gonbad Kavous University (Corresponding author: l.ahangar63@gmail.com)

2 and 3- Assistant Professor and Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

4- Associate Professor, Gonbad Kavous University

Received: January 24, 2015

Accepted: March 18, 2015

---

### Abstract

Bread wheat is one of the most important food crops which has main position in nutrition of the world's population. The production of this crop were always been faced to a variety of challenges. Powdery mildew, caused by the biotrophic pathogen *Blumeria graminis* f.sp *tritici* (*Bgt*), known as a destructive disease of wheat worldwide. There are several methods to control the disease, but use of inducers as of SA, able to induce a systemic resistance in plants are very important. In order to examination the ability of SA for inducing resistance in wheat against *Bgt* fungus, Flat was selected as susceptible cultivar and treated with SA and then exposed to *Bgt* fungi together with control plants. Then examine the expression rate of *PR1*, *PR2*, *PR3* and *PR5* genes using Real Time PCR technique in response to *Bgt* was carried out at 5 time courses and in 3 independent replicates. Results indicated that in both groups of treated and control plants, levels of gene expression were increased after infection for all genes. Maximum expression level of genes were observed at 24 hours after infection. This process was observed slowly in control plants but caused early and faster induction of plant defense genes in treated plants early hours after infection rather than control plant. At 48 hours after inoculation, transcript levels of induced genes started to dampen in both groups of experimental plants, indicating effective suppression of defense associated genes upon haustorium development. Overall, results indicated that SA inducer because of able to induce resistance in susceptible cultivar through overexpression of resistance genes and reducing number of colonies grown on *Bgt* fungus per unit area can one of the candidate of induced resistance in susceptible cultivar.

**Keywords:** Gene Expression, Induction Resistance, Salicylic Acid, Wheat