بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده :.کشاورزی

رساله دکتری رشته: بیماری شناسی گیاهی گرایش: قارچ شناسی

عنوان رساله:

بررسی بیان ژنهای دخیل در سیستم دفاعی گندم نسبت به *Mycosphaerella graminicola* با استفاده از cDNA-AFLP

نام دانشجو:

محمد رضا اصلاحی

استاد راهنما(اصلی):

دکتر ناصر صفایی

استاد راهنما(دوم):

دکتر عباس سعیدی

استاد مشاور(اول):

دکتر مسعود شمس بخش

استاد مشاور(دوم):

دکتر حسین جعفری

بهمن ۱۳۹۱

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته **بیماری شناسی گیاهی** است که در سال**۱۳۹۱** در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی /جناب آقای دکتر ناصر صفایی و جناب آقای دکتر عباس سعیدی و مشاوره جناب آقای دکتر شمس بخش و جناب آقای دکتر حسین جعفری از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **محمد رضا اصلاحی** دانشجوی رشته **بیماری شناسی گیاهی** مقطع دکتری تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: **محمد رضا اصلاحی**

ریخ و امضا: ۱۳۹۱/۱۱/۲۵

تقدیم به پدرم:

به او که نمی دانم از بزرگی اش بگویم یا از مردانگی ، سخاوت، سکوت، مهربانی و.....

تقدیم به مادرم:

آنکه آفتاب مهرش در آستانه قلبم، همچنان پابرجاست و هرگز غروب نخواهد کرد.

تقدیم به همسرم :

که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد، او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود.

و

تقدیم به یگانه دخترم کیمیا :

که همانا برق چشمان معصومش، خستگی را از تنم می‌زداید.

تشکر و قدردانی

اکنون که به لطف و عنایت الهی این مرحله از تحصیل را پشت سر گذاشتم، ضمن حمد و سپاس بی حد خداوند متعال، برخود لازم می دانم از زحمات، راهنمایی ها و کمک های عزیزانی که مرا در این راه یاری کردند تشکر و قدردانی نمایم.

ازآقای دکتر ناصر صفایی که از مساعدت های بی دریغ و راهنمایی های ارزشمندشان در اجرای این رساله بهره مند بودم و در طول مدت تحصیل در مقطع دکتری از علم و دانش ایشان استفاده کردم، تشکر و قدردانی می نمایم.

از آقای دکتر عباس سعیدی که در اجرای این پروژه یاریمان کردند سپاسگزاری می نمایم.

ازآقای دکتر مسعود شمس بخش که در تمام مراحل اجرای رساله همواره اینجانب را مرهون الطاف خویش ساختند، کمال تشکر و سپاس را دارم.

از آقای دکتر حسین جعفری که صمیمانه در انجام پروژه با ایده هایشان روشنگر راه بودند قدردانی می نمایم.

از آقایان دکتر واهه میناسیان، دکتر ابراهیم محمدی گل تپه، دکتر سید علی موسوی جرف و سرکار خانم دکتر خدیجه رضوی که زحمت بازخوانی این رساله بر عهده ایشان بود کمال تشکر را دارم.

از سرکار خانم الهام کریمی و شیده موجرلو به پاس مساعدت و یاریشان سپاسگزاری می نمایم.

بالاخره از همسرم و دخترم به خاطر تحمل و همراهی هایشان صمیمانه تشکر می نمایم.

چکیده

cDNA-AFLP یک ابزار قدرتمند برای تشخیص رونوشت هایی با فراوانی کم است و می تواند بعنوان یک روش کارآمد برای جداسازی ژنهایی که بطور متمایز بیان می شوند، بکار رود. بنابراین القا متمایز ژنها در گندم (رقم چمران و مرودشت) در پاسخ به قارچ *M.graminicola* بوسیله آنالیز cDNA-AFLP مورد مطالعه قرار گرفت . در ابتدا گیاهان بوسیله بیمارگر مایه زنی شدند. نمونه برداری در ۶ نقطه زمانی(۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) بعد از مایه زنی انجام شد و نمونه ها بلافاصله در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. با مقایسه الگوی بیانی گیاهان مایه زنی شده و گیاهان شاهد رقم های چمران و مرودشت به ترتیب ۲۷۶ و ۲۷۰ قطعه متمایز جداسازی و تعیین توالی شد. توالی های بدست آمده با استفاده از الگوریتم Blast X مورد بررسی قرار گرفتند و در گروه های عملکردی مختلف شامل دفاع، متابولیسم، انرژی، نسخه برداری، انتقال سیگنال، پاسخ به تنش، انتقال دهنده ها، متابولیسم ثانویه و توالی های ناشناخته قرار گرفتند. ۸ ژن مرتبط با بیماریزایی شامل Lipoxygenase, Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase(PAL), β-1-3 Chitinase, PR-1, Thaumatin-like protein, glucanase, Disulfide isomerase, Methionine sulfuxide reductase ۱۲ تا ۲۴ ساعت بعد از مایه زنی در این ارقام القا شدند. ژنهای Executer1 protein, Non specific lipid transferase, ADP – Chalcone ,Peptidyl prolyl isomerase ,Putative xylanase inhibitor, synthase, NBS- LRR protein, Putative agmatin coumaryl glucose pyrophospholylase, Allen oxide synthase, Serine carboxy Putative protease inhibitor, transferase, Glucosyltransferase , peptidase, NADHoxidase و Catalase در زمانهای دیرتری القا گردیدند (۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از مایه زنی) . نتایج نشان داد که بیان ژنهای مرتبط با بیماریزایی در ۲۴ ساعت پس از مایه زنی افزایش می یابد . بنابراین می توان نتیجه گرفت که این ژنها نقش مهمی در دفاع گیاه بر علیه *M.graminicola* ایفا می کند. *بیان* ژنهای lipoxygenase, Glycosyltransferase, Thaumatin like protein, Putative xylanase inhibitor, EXECUTER1 protein, Non specific lipid transfer protein, NADH oxidase, Putative protease inhibitor, Allen oxide synthase, ADP – glucose pyrophospholylase برای اولین بار است که در این پاتوسیستم گزارش می شود.

کلید واژه ها: گندم، *Mycosphaerella graminicola*، ژنهای دفاعی، cDNA-AFLP

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست جدول ها..... الف

فهرست شکل ها..... ب

فصل اول : مقدمه..... ۱

فصل دوم: بررسی منابع..... ۵

۲-۱ اهمیت گندم..... ۶

۲-۲ چالش های تولید گندم..... ۹

۲-۳ سوختگی برگ گندم..... ۱۰

۲-۴ قارچ عامل بیماری..... ۱۱

۲-۵ علائم بیماری..... ۱۲

۲-۶ چرخه بیماری و اپیدمیولوژی *Mycosphaerella graminicola*..... ۱۲

۲-۷ دامنه میزبانی..... ۱۴

۲-۸ فرایند آلودگی و هیستولوژی *M. graminicola*..... ۱۶

۲-۹ تخصص یافتگی فیزیولوژیکی *M.graminicola*..... ۱۷

۲-۱۰ روش ارزیابی بیماری..... ۲۰

۲-۱۱ روشهای کنترل بیماری سوختگی برگ گندم..... ۲۳

۲-۱۱-۱ روش های زراعی..... ۲۳

۲-۱۱-۲ کنترل شیمیایی..... ۲۵

۲-۱۱-۳ استفاده از ارقام مقاوم..... ۲۷

۲-۱۲ ژنتیک مقاومت به بیماری..... ۲۹

۲-۱۲-۱ مقاومت تک ژنی..... ۲۹

۲-۱۲-۲ مقاومت نسبی یا چند ژنی..... ۳۲
۲- ۱۳ تحمل..... ۳۴
۲-۱۴ سیستم دفاعی گیاه..... ۳۶
فصل سوم: مواد و روشها..... ۴۴
۳-۱ تعیین مناسب ترین محیط کشت..... ۴۵
۳-۲ ارزیابی مقاومت ارقام و انتخاب ارقام مقاوم و حساس..... ۴۶
۳-۲-۱ تهیه زاد مایه..... ۴۶
۳-۲-۲ مایه زنی و انجام آزمایشات مزرعه ای..... ۴۷
۳-۲-۳ روش ارزیابی واکنش ارقام در شرایط مزرعه..... ۴۸
۳-۲-۴ مایه زنی و انجام آزمایشات گلخانه ای..... ۴۸
۳-۲-۵ روش ارزیابی ارقام در شرایط گلخانه..... ۴۹
۳-۳ استفاده از عصاره گیاهی به منظور ارزیابی مقاومت نسبی ارقام گندم نسبت به قارچ
Mycosphaerella graminicola در شرایط درون شیشه ای..... ۴۹
۳-۳-۱ اثر عصاره ارقام مختلف روی رشد جمعیت اسپورهای قارچ *M.graminicola*..... ۵۰
۳-۳-۲ اثرعصاره ارقام مختلف روی جوانه زنی اسپورهای قارچ *M.graminicola*..... ۵۱
۳-۴ بررسی الگوی بیان ژن ها در عکس العمل گندم نسبت به *M.graminicola*..... ۵۱
۳-۴-۱ ارقام گندم / شرایط گلخانه ای..... ۵۱
۳-۴-۲ تهیه زاد مایه قارچ..... ۵۲
۳-۴-۳ مایه زنی گیاهان در گلخانه..... ۵۲
۳-۴-۴ نمونه برداری..... ۵۳
۳-۴-۵ استخراج Total RNA..... ۵۳
۳-۴-۶ الکتروفورز Total RNA روی ژل آگارز ۱/۲ درصد..... ۵۴

۳-۴-۷ جداسازی mRNA از Total RNA با استفاده از کیت شرکتMacherey nagel.... ۵۵
۳-۴-۸ سنتز DNA تک رشته با استفاده از کیت شرکت QIAGEN..... ۵۶
۳-۴-۹ سنتز رشته دوم DNA..... ۵۷
۳-۴-۱۰ روش cDNA-AFLP..... ۵۸
۳-۴-۱۰-۱ هضم cDNA..... ۵۸
۳-۴-۱۰-۲ الحاق آداپتورها به cDNA..... ۵۹
۳-۴-۱۰-۳ واکنش تکثیر اولیه..... ۵۹
۳-۴-۱۰-۴ واکنش تکثیر انتخابی..... ۶۰
۳-۴-۱۱ الکتروفورز در ژل اکریل آمید..... ۶۱
۳-۴-۱۲ رنگ آمیزی با نیترات نقره..... ۶۲
۳-۴-۱۳جداسازی باندهای متمایز..... ۶۳
۳-۴-۱۴ بررسی توالی قطعات جدا شده..... ۶۴
فصل چهارم: نتایج و بحث..... ۶۵
۴-۱ تعیین بهترین محیط کشت برای تولید اسپور..... ۶۶
۴-۱-۱ نتایج..... ۶۶
۴-۱-۲ بحث..... ۷۰
۴-۲ ارزیابی مقاومت ژنوتیپ ها..... ۷۱
۴-۲- ۱ نتایج..... ۷۱
۴-۲-۲ بحث..... ۷۵
۴-۳ استفاده از عصاره گیاهی به منظور ارزیابی مقاومت نسبی ارقام گندم..... ۷۷
۴-۳-۱ نتایج..... ۷۷
۴-۳-۱-۱ بررسی اسپورزایی بیمارگر..... ۷۷

۴-۳-۱-۲ بررسی درصد جوانه زنی اسپورهای بیمارگر..... ۸۰
۴-۳-۲ بحث..... ۸۱
۴-۴ بررسی بیان ژنها در واکنش ارقام گندم در برابر قارچ *M. graminicola*..... ۸۳
۴-۴-۱ نتایج..... ۸۳
۴-۴-۱-۱ استخراج Total RNA و سنتز ds cDNA..... ۸۳
۴-۴-۱-۲ پیش تکثیر محصول مرحله اتصال..... ۸۷
۴-۴-۱-۳ تکثیر انتخابی محصول مرحله پیش تکثیر..... ۸۸
۴-۴-۱-۴ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی روی ژل اکریل آمید و تعیین توالی قطعات DNA مشتق از رونوشت..... ۸۹
۴-۴-۲ بحث..... ۱۳۹
۴-۴-۲-۱ ژن های کاندیدای سیستم دفاعی..... ۱۳۹
۴-۴-۲-۲ زمان بیان ژن ها ی کاندیدای سیستم دفاعی..... ۱۵۷
۵- نتیجه گیری کلی و پیشنهادات..... ۱۶۳
۵-۱ نتیجه گیری کلی..... ۱۶۳
۵-۲ پیشنهادات..... ۱۶۴
منابع..... ۱۶۵

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱ میزان تولید۲۰ کشور مهم تولید کننده گندم در سال ۲۰۱۰..... ۸

جدول۲-۲ مشخصات ژنهای مسئول مقاومت در گندم های نان بهاره و زمستانه..... ۳۵

جدول۲-۳ پروتئین های مرتبط با بیماریزایی و خصوصیات آنها..... ۳۸

جدول ۳-۱ ارقام مورد استفاده برای ارزیابی مقاومت در شرایط مزرعه..... ۴۷

جدول ۳- ۲ محتویات و مقادیر لازم برای سنتز DNA تک رشته..... ۵۷

جدول ۳-۳ توالی آغازگرها و آداپتورهای مورد استفاده در مرحله پیش تکثیر و تکثیر انتخابی..... ۶۱

جدول ۳-۴ مقادیر مورد استفاده برای تهیه ۶۰۰ میلی لیتر ژل اکریل آمید ۶ درصد..... ۶۲

جدول ۴-۱ تجزیه واریانس بررسی عکس العمل۴۰ ژنوتیپ گندم نسبت به *M. graminicola*..... ۷۲

جدول ۴-۲ مقایسه میانگین های بیماری بر اساس مقیاس (۹۹-۰۰) روی ۴۰ ژنوتیپ..... ۷۳

جدول ۴-۳ فهرست قطعات جدا سازی از رونوشت القا شده در گندم رقم چمران در واکنش به قارچ *M.graminicola* و مشابهت آنها با توالی اسیدآمینه قطعات ثبت شده با استفاده از الگوریتم BLASTx در پایگاه اطلاعاتیNCBI..... ۱۰۳

جدول ۴-۴ فهرست قطعات جدا سازی از رونوشت القا شده در گندم رقم مرودشت در واکنش به قارچ *M.graminicola* و مشابهت آنها با توالی اسیدآمینه قطعات ثبت شده با استفاده از الگوریتم BLASTx در پایگاه اطلاعاتیNCBI..... ۱۲۰

جدول ۴-۵ گروه های شناخته شده Pathogen related proteins..... ۱۴۰

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱ تولید جهانی محصولات کشاورزی در سال ۲۰۱۰..... ۷

شکل ۲-۲ سطح زیر کشت گندم ، کل تولید ، میزان محصول در هکتار..... ۷

شکل۲- ۳ آخرین نقشه سوءتغذیه جهانی..... ۹

شکل۲-۴ ایجاد لکه های کلروتیک و نکروتیک روی برگ و بروز پیکنیدها روی آنها..... ۱۳

شکل ۲-۵ چرخه زندگی *M. graminicola* روی گندم..... ۱۵

شکل ۲-۶ نمایش شماتیک پاسخ دفاعی میزبان در عکس العمل بیمارگر – میزبان..... ۳۹

شکل ۲-۷ مراحل شماتیک روش cDNA-AFLP..... ۴۳

شکل ۴-۱ میزان اسپور تولید شده روی محیط کشت های (الف) جامد و (ب) مایع..... ۶۶

شکل ۴-۲ تشکیل اسپور سوزنی شکل روی محیطYMSA ۶۷

شکل ۴-۳ تشکیل اسپور سوزنی شکل روی محیطYMDA ۶۷

شکل ۴-۴ تشکیل کنیدی های ثانویه..... ۶۸

شکل ۴-۵ تشکیل همزمان کنیدی های ثانویه و اسپورهای سوزنی شکل قارچ روی محیط YMDA ۶۸

شکل۴-۶ تشکیل توده میسلیومی سیاه رنگ روی محیط MA..... ۶۹

شکل۴-۷ تشکیل توده ابری شکل و آرد مانند به رنگ صورتی روشن از اسپورها در ته ارلن حاوی محیط مایع YMGB ۷۰

شکل۴-۸ مراحل پیشرفت علایم بیماری سوختگی برگ گندم در گلخانه..... ۷۴

شکل۴-۹ مقیاس بندی ۵-۰ در ژنوتیپ های گندم ۲۱ روز پس از مایه زنی..... ۷۵

شکل۴-۱۰روند افزایش اسپور در محیط کشتهای حاوی عصاره رقم چمران القا شده و القا نشده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از خراش دادن..... ۷۸

شکل ۴- ۱۱روند افزایش اسپور در محیط کشتهای حاوی عصاره رقم مرودشت القا شده و القا نشده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از خراش دادن..... ۷۸

شکل ۴- ۱۲روند افزایش اسپور در محیط کشتهای حاوی عصاره رقم تجن القا شده و القا نشده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از خراش دادن..... ۷۹

شکل ۴- ۱۳روند افزایش اسپور در محیط کشتهای حاوی عصاره رقم داراب ۲ القا شده و القا نشده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از خراش دادن..... ۷۹

شکل ۴-۱۴مقایسه جمعیت اسپور در محیط کشت های حاوی عصاره تیمار القایی نسبت به شاهد (محیط کشت بدون عصاره گیاهی) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از القا..... ۸۰

شکل۴-۱۵درصد جوانه زنی کنیدی ها روی محیط کشتهای حاوی عصاره ارقام مقاوم وحساس(القا شده و القا نشده در مقایسه با شاهد)..... ۸۱

شکل ۴-۱۶ اندازه گیری میزان و خلوص RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ..... ۸۵

شکل ۴- ۱۷ الکتروفورز Total RNA های استخراج شده با استفاده محلول RNX-plus شرکت سیناکلون در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶) ساعت پس از مایه زنی قارچ *M.graminicola* از ارقام گندم در مقایسه با شاهد مایه زنی شده با آب بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد با استفاده از بافر TBE×۱ و نشانگر kb ۱ شرکت Invitrogen..... ۸۵

شکل ۴-۱۸ اندازه گیری میزان و خلوص DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ..... ۸۶

شکل ۴- ۱۹الکتروفورز محصول cDNA دو رشته ای بدست آمده از ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت پس از مایه زنی ارقام گندم چمران و مرودشت با قارچ *M.graminicola*) روی ژل آگارز ۱/۲ درصد و نشانگر kb ۱ شرکت Invitrogen..... ۸۷

شکل ۴- ۲۰ الکتروفورز محصول مرحله پیش تکثیر نمونه های cDNA روی ژل آگارز ۲ درصد به همراه نشانگر bp plus ۱۰۰ شرکت QIAGEN..... ۸۸

شکل ۴- ۲۱ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی با استفاده از ترکیب آغازگری EcoR I-

AAC+ Tru 9 I- CAG روی ژل آگارز ۲ درصد..... ۸۹

شکل ۴- ۲۲ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی رقم چمران با استفاده از ترکیب پرایمری EcoR I-AAC+ Tru 9 I- CTG سمت چپ و EcoR I-ACA+ Tru 9 I- CAG سمت راست در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ساعت) پس از مایه زنی با قارچ *M.graminicola* ۹۱

شکل ۴- ۲۳ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی رقم چمران با استفاده از ترکیب پرایمری EcoR I-AAC+ Tru 9 I- CAG سمت چپ و EcoR I-ACA+ Tru 9 I- CTG سمت راست در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ساعت) پس از مایه زنی با قارچ *M.graminicola* ۹۲

شکل ۴- ۲۴ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی رقم چمران با استفاده از ترکیب پرایمری EcoR I-AAC+ Tru 9 I- CCA سمت چپ و EcoR I-AGT+ Tru 9 I- CTG سمت راست در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ساعت) پس از مایه زنی با قارچ *M.graminicola* ۹۳

شکل ۴- ۲۵ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی رقم چمران با استفاده از ترکیب پرایمری EcoR I-ACA+ Tru 9 I- CCA سمت چپ و EcoR I-AGT+ Tru 9 I- CAG سمت راست در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ساعت) پس از مایه زنی با قارچ *M.graminicola* ۹۴

شکل ۴- ۲۶ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی رقم چمران با استفاده از ترکیب پرایمری EcoR I-AGT+ Tru 9 I- CCA در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ساعت) پس از مایه زنی با قارچ *M.graminicola* ۹۵

شکل ۴- ۲۷ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی رقم مرودشت با استفاده از ترکیب

پرایمری EcoR I-AAC+ Tru 9 I- CTG سمت چپ و EcoR I-ACA+ Tru 9 I- CAG سمت راست در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ساعت) پس از مایه زنی با قارچ *M.graminicola* ۹۶

شکل ۴- ۲۸ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی رقم مرودشت با استفاده از ترکیب پرایمری EcoR I-AAC+ Tru 9 I- CAG سمت چپ و EcoR I-ACA+ Tru 9 I- CTG سمت راست در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ساعت) پس از مایه زنی با قارچ *M.graminicola* ۹۷

شکل ۴- ۲۹ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی رقم مرودشت با استفاده از ترکیب پرایمری EcoR I-AAC+ Tru 9 I- CCA سمت چپ و EcoR I-AGT+ Tru 9 I- CTG سمت راست در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ساعت) پس از مایه زنی با قارچ *M.graminicola* ۹۸

شکل ۴- ۳۰ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی رقم مرودشت با استفاده از ترکیب پرایمری EcoR I-ACA+ Tru 9 I- CCA سمت چپ و EcoR I-AGT+ Tru 9 I- CAG سمت راست در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ساعت) پس از مایه زنی با قارچ *M.graminicola* ۹۹

شکل ۴- ۳۱ الکتروفورز محصول تکثیر انتخابی رقم مرودشت با استفاده از ترکیب پرایمری EcoR I-AGT+ Tru 9 I- CCA در ۶ نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ساعت) پس از مایه زنی با قارچ *M.graminicola* ۱۰۰

شکل ۴- ۳۲ الکتروفورز تعدادی از قطعات مشتق شده از رونوشت در ژل آگارز ۲ درصد پس از خالص سازی بوسیله کیت استخراج DNA از ژل ۱۰۱

شکل ۴-۳۳ توزیع کارکردی قطعات القا شده در واکنش گندم رقم چمران به قارچ *M.graminicola* ۱۰۱

شکل ۴-۳۴توزیع کارکردی قطعات القا شده در واکنش گندم رقم مرودشت به قارچ *M.graminicola* ۱۰۲

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) وگندم دوروم (*Triticum turgidum* L.ssp.*durum*) مهمترین گیاهان زراعی دنیا هستندکه غذای اصلی بیش از یک سوم مردم جهان را تشکیل می دهند (یزدی صمدی و عبدمیشانی، ۱۳۷۵). در سال ۲۰۱۰ میزان تولید گندم در جهان به بیش از ۶۵۰ میلیون تن با ارزشی معادل تقریباً ۸۱ بیلیون دلار رسید. ایران با تولید تقریباً ۱۵ میلیون تن با ارزشی معادل ۱/۹ بیلیون دلار در رده دوازدهم کشورهای مهم تولید کننده گندم قرار گرفت (FAOATST, 2012).

تنش های زنده و غیر زنده متعددی تولید گندم را تحت تاثیر قرا می دهند. بیماری سوختگی برگ[1] گندم یکی از مهمترین و مخربترین بیماریهای گندم است (Eyal *et al.*, 1985). این بیماری بوسیله قارچ *Mycosphaerella graminicola* (Fückl) J.Schröt.in Cohen با شکل غیرجنسی *Zymoseptoria tritici* (Quaedvlieg *et al.*, 2011) ایجاد می گردد. *M. graminicola* یک بیمارگر[2] همی بیوتروفیک [3] است که هم به صورت جنسی و هم به صورت غیر جنسی تولید مثل می کند(Shetty *et al.*, 2007). آسکسپورها اسپورهای جنسی هستند که هوازاد بوده و همچنین در مناطقی که مرحله جنسی در چرخه زندگی قارچ اتفاق می افتد به عنوان زاد مایه[4] اولیه عمل میکنند. مرحله جنسی این بیماری اولین بار در نیوزیلند (Sanderson, 1972) و به دنبال آن در استرالیا (Brown *et al.*, 1978)، انگلستان (Scott *et al.*, 1988)، ایالات متحده آمریکا (Garcia and Marshall, 1992)، فرانسه (Halama, 1996) و کانادا (Hoorne *et al.*, 2002) گزارش شد. پیکنیدیوسپورها اسپورهای غیر جنسی هستند که می توانند توسط قطرات باران در مسافتهای کوتاه پراکنده شوند. این بیماری با کشت وسیع ارقام مکزیکی زودرس، نیمه پاکوتاه و حساس به بیماری که به دلیل عملکرد بالا و مقاومت به زنگ ها در سطح وسیعی در کشورهای مختلف مورد استفاده قرار گرفتند، اهمیت زیادی پیدا کرده است. با بروز اپیدمی های شدید، میزان خسارت و

[1]- speckled leaf blotch
[2]- pathogen
[3]- hemibiotriphic
[4]- inoculum

کاهش محصول بین ۲۵ تا ۵۰ درصد گزارش شده است (Eyal *et al.*, 1987; Eyal *et al.*, 1985 ; King *et al.*, 1983). در سالهای اخیر این بیماری در بعضی از استانهای کشور ازقبیل خوزستان و گلستان به صورت اپیدمی های شدید بروز کرد (خلقتی بنا و دادرضایی، ۱۳۸۳ ؛ رجایی و همکاران، ۱۳۸۳؛ کیا وترابی، ۱۳۸۷). با بررسی میزان خسارت ناشی از این بیماری بر روی تعدادی از ارقام متداول، کاهش محصول در استان های خوزستان و گلستان تا حدود ۴۴ درصد برآورد شده است (دادرضایی و اصلاحی،۱۳۸۳؛ دادرضایی و همکاران، ۱۳۸۲؛ کیا وترابی، ۱۳۸۷).

روشهای مختلف زراعی از قبیل تناوب، شخم، و استفاده از مخلوط ارقام می تواند به کنترل بیماری کمک نماید. علاوه بر روشهای زراعی از قارچکش ها نیز برای کنترل بیماری استفاده می گردد (Cowger *et al.*, 2000). مصرف بی رویه سموم قارچکش های گروه استروبیلورین ها و آزول ها منجر به وقوع پدیده مقاومت در جدایه های قارچ عامل بیماری شده است (Cools *et al.*, 2004 ; Fraaije *et al.*, 2005). در حالیکه روشهای زراعی و استفاده از قارچکش ها می توانند به کنترل بیماری کمک نمایند، اما از نظر اقتصادی و زیست محیطی، استفاده از ارقام مقاوم به عنوان بهترین و موثرترین راه کنترل بیماری توصیه شده است (Eyal, 1981). مقاومت ژنتیکی در ارقام مختلف به دو صورت کمی وکیفی گزارش شده است (Narvaez and Caldwell, 1957). مطالعات نشان می دهد که مقاومت با ژنهای بارز کنترل می گردد (Mccartney *et al.*, 2003; Brading *et al.*, 2002 ; Somasco *et al.*, 1996; Rosielle and Brown, 1979). صفاتی از قبیل ارتفاع گیاه، طول میانگره ها، مورفولوژی برگها و زمان به سنبله رفتن با مقاومت به بیماری مرتبط هستند (Arraiano *et al.*, 2009). در دهه های اخیر ژنهای مقاومت به *M. graminicola* در گندم های هگزاپلوئید مکان یابی و تاکنون ۱۸ ژن مقاومت (*Stb 1- Stb 18*) شناسایی و معرفی شده اند (Tabib Ghaffary *et al.*, 2011; Tabib Ghaffary *et al.*, 2012). موفقیت در برنامه های مدیریت بیماری و نیز برنامه های اصلاحی برای مقاومت به بیماری مستلزم وجود اطلاعات کافی و دقیق در زمینه ساختار ژنتیکی جمعیت های قارچ عامل بیماری، شناسایی منابع مقاومت موثر و در نهایت نحوه کنترل

ژنتیکی مقاومت در ارقام مقاوم است. همسانه سازی ژنهای*stb* به دلیل ژنوم بزرگ گندم مشکل است (Somasco *et al.*, 1996; Adhikari *et al.*, 2003). بنابراین توسعه تکنولوژی های جدید مبتنی بر مکانسیم دفاعی گیاه می تواند در برنامه های اصلاحی مفید واقع شود. به این منظور، ابتدا با انجام آزمایشات مزرعه ای و گلخانه ای، دو رقم گندم نان شامل چمران و مرودشت به عنوان ارقام مقاوم انتخاب و سپس بیان ژنهای دخیل در سیستم دفاعی در این دو رقم پس از مایه زنی با قارچ *M. graminicola* با روش cDNA-AFLP [1] در ۶ نقطه زمانی مورد بررسی قرار گرفت .

[1]- complementary DNA- amplified fragment length polymorphism