الگوی بیان ژن‌های درگیر در مقاومت به بیماری سپتوریوز در گندم نان

Expression Patterns of Genes Involved in Septoria Leaf Blotch REsistance in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.)

لیلا خدائی[۱]، علیرضا طالعی[۲]، محسن مردی[۳]، محمدرضا نقوی[۴]، لاله کریمی فرساد[۵] و عزت‌اله صداقت‌فر[۶]

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۵

چکیده

سپتوریوز برگی گندم که توسط قارچ *Mycosphaerella graminicola* ایجاد می‌شود، یکی از بیماری‌های مهم گندم در سراسر دنیاست. از نظر زیست محیطی بهترین روش مقابله با این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. ژن‌های متعددی در پاسخ گیاه به پاتوژن فعال یا خاموش می‌شوند و یا بیان آنها افزایش یا کاهش می‌یابد. در این تحقیق با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی (Real Time-PCR) الگوی بیان پنج توالی مربوط به ژن‌های درگیر در مقاومت به بیماری سپتوریوز در گندم بررسی شد. پس از آلوده سازی گیاهان رقم مقاوم ونگ‌شوبای و رقم حساس فلات با قارچ عامل سپتوریوز، بیان ژن‌های موردنظر در یازده نقطه زمانی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفته و الگوی بیان آنها نسبت به ژن مرجع ریبوزومی 18s در زمان مشخص گردید. مقایسه توالی‌های مورد بررسی با توالی‌های پایگاه‌های اطلاعات توالی مشخص نمود که این توالیها به ژن‌های نئومنتول دهیدروژناز، آلفا ۱-۴-گلوکان فسفوریلاز، پروتئین کیناز حاوی تکرارهای غنی از لوسین، پروتئین شبه‌توبی (TULP) و نرمپ (NRAMP) تعلق دارند. ژن‌های آلفا ۱-۴-گلوکان فسفوریلاز و پروتئین کیناز حاوی تکرارهای غنی از لوسین سه ساعت پس از آلوده‌سازی، حداکثر بیان را پیدا می‌کنند و ژن نئومنتول دهیدروژناز دوازده ساعت پس از آلوده‌سازی بیشترین بیان را دارد. در ابتدا، رونوشت‌های ژن نرمپ نیز مانند آلفا ۱-۴-گلوکان فسفوریلاز و پروتئین کیناز حاوی تکرارهای غنی از لوسین سه ساعت پس از آلوده سازی، حداکثر بیان را پیدا می‌کند ولی سپس دچار کاهش بیان شده و در روز دوم مجدداً بیان آن افزایش می‌یابد. ژن مربوط به پروتئین شبه‌توبی پس از ۳ ساعت پس از آلوده‌سازی القا شده و به مقدار قابل توجهی می‌رسد، ولی اوج بیان آن سه روز پس از تلقیح است، بنابراین می‌توان آن را دو اوجی نامید. نتایج نشان داد برخی ژن‌ها در پاسخ به آلودگی گیاه توسط قارچ عامل سپتوریوز خیلی زود در رقم مقاوم القا شده و افزایش بیان معنی‌داری دارند، اما برخی دیگر حتی پس از چند روز پس از آلودگی افزایش بیان نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: لکه سپتوریوز برگی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی، گندم

۱. دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج
۳. دانشیار پژوهشکده زیست فن‌آوری کشاورزی کرج
۴. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۵. کارشناس پژوهشکده زیست فن‌آوری کشاورزی
۶. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
*: نویسنده مسئول **Email**: lkhodaei@ut.ac.ir

مقدمه

سپتوریوز برگی گندم (Septoria leaf blotch) یکی از بیـماری‌های مهم گندم نان و گندم دوروم در سراسر جهان است. این بیماری توسط قارچ *Mycosphaerella graminicola* (آنامورف: *Septoria tritici*) ایجاد می‌شود (*آدیکاری* و همکاران، ۲۰۰۷). در آب و هوای معتدل با بارندگی زیاد توسعه این بیماری شدیدتر است. در شرایط اپیدمی این بیماری باعث کاهش عملکرد به میزان ۲۵-۵۰ درصد می‌شود (*مک کارتنی* و همکاران، 2002). سپتوریوز در ایران نیز به مزارع گندم خسارت وارد می‌کند. در سال‌های اخیر در استان‌های خوزستان، فارس، گلستان و اردبیل اپیدمی این بیماری دیده شده است (*محرابی* و همکاران، 2010).

مقاومت به سپتوریوز می‌تواند اختصاصی یا کمی باشد. مقاومت اختصاصی تقریباً کامل و الیگوژنیک است و از رابطه ژن برای ژن تبعیت می‌کند (*بردینگ* و همکاران، 2002). درصورتی‌که مقاومت کمی یا نسبی، ناقص و پلی‌ژنیک است (جیبن و همکاران؛ 1994، سیمون و کردو، 1998) و نسبت به جدایه قارچ اختصاصی نیست (*سوماسکو* و همکاران، 1996؛ *آریانو* و همکاران، 2001؛ *مک کارتنی* و همکاران، 2002، *چارترین* و همکاران، 2004 و 2005).

کنترل این بیماری از طریق استفاده از قارچ‌کش و کاربرد ارقام مقاوم است (*آدیکاری و همکاران*، 2007). مورد اخیر اقتصادی‌ترین، بهترین و از نظر زیست محیطی، سالم‌ترین روش مقابله با این بیماری است. دانش ژنتیک مقاومت برای اصلاح گندم مقاوم به بیماری سپتوریوز از اهمیت زیادی برخوردار است. تفاوت اصلی گیاهان حساس و مقاوم، شناسایی به موقع پاتوژن مهاجم و فعال‌سازی سریع و مؤثر مکانیسم‌های دفاعی گیاه است (*وانگ* و همکاران، 2010). تاکنون ۱۷ ژن برای مقاومت به سپتوریوز شناسایی شده است (*آدیکاری* و همکاران، 2003 *و* 2004؛ *الف، ب، ج، آریانو و براون*، 2006؛ *بردینگ* و همکاران، 2002؛ *مک کارتنی* و همکاران، 2003؛ *چارترین* و همکاران، 2005؛ *الف و ب*، *2009*، *آریانو* و همکاران، 2001 *و* 2007، *طبیب غفاری* و همکاران، 2011 *الف و ب*). مقاومت یا حساسیت گیاه نسبت به پاتوژن، حاصل ترکیب ژنوتیپ‌های گیاه و پاتوژن و وابسته به ترکیبی از تبادل پیام‌ها و پاسخ نسبت به شرایط ایجاد شده است (*وانگ* و همکاران، *۲۰۱۰*). ژن‌های متعددی در پاسخ گیاه به پاتوژن فعال یا خاموش می‌شود و یا بیان آنها افزایش یا کاهش می‌یابد. بررسی بیان متمایز ژن‌ها یکی از روش‌های مهم برای مشخص کردن اساس زیستی سیستم‌های بیولوژیک است (*وانگ و همکاران*، *۲۰۰۹*). روش‌های مختلفی برای بررسی الگوی بیان ژن‌ها وجود دارد، یکی از این روش‌ها واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی (Real Time-PCR) است که می تواند روند تغییرات کمی بیان ژن‌ها را طی یک فرایند بیولوژیک مشخص نماید.

چندین توالی بیان‌شده درگیر با مقاومت گندم به بیماری سپتوریوز با روش cDNA-AFLP در آزمایشگاه بخش ژنومیکس پژوهشکده زیست فن‌آوری کشاورزی کرج شناسایی گردیده که پنج توالی بر اساس عملکردشان در پاسخ‌های مقاومت گیاه انتخاب شدند و در این تحقیق، نحوه تغییرات بیان این ژن‌ها در برهم کنش گیاه گندم-پاتوژن عامل سپتوریوز از طریق Real Time-PCR در یک دوره زمانی ۲۱ روزه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت در گلخانه

در این پژوهش از دو رقم فلات و ونگ شوبای به‌عنوان رقم حساس و مقاوم به سپتوریوز استفاده شد. ونگ شوبای یک گندم بهاره (*Triticum aestivum* L.) و بومی چین است که دارای سطح مقاومت بالا نسبت به بیـماری فـــوزاریوم می‌باشد (*مردی* و همکاران، 2005).

رقم فلات یک گندم بهاره است که در مرکز تحقیقات سیمیت (CIMMYT) ایجاد شده است. رقم گندم فلات با وجود خصوصیات مطلوب زراعی و سطح زیر کشت زیاد در ایران، نسبت به سپتوریوز برگی بسیار حساس می‌باشد (*طالبی* و همکاران، 2010). ونگ شوبای در آزمایشات گلخانه‌ای مقاومت بسیار بالایی به سپتوریوز برگی نشان داده است.

بذرهای رقم های فلات و ونگ شوبای در گلخانه بخش ژنومیکس پژوهشکده زیست‌فن‌آوری کشاورزی کرج کشت گردیدند. به این منظور گلدان‌هایی با قطر پنج سانتی‌متر با مخلوط پیت و ماسه پر شدند. در هر گلدان ۱۰ بذر کشت گردید. گلدان‌ها بر روی میزهای گلخانه قرار داده شدند تا زمانی‌که آلوده سازی انجام شود. دمای گلخانه در روز ۲۲ و در شب ۱۸ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت بود. یازده روز پس از کشت، گیاهچه ها وارد مرحله دو برگی شده و آماده آلوده‌سازی شدند.

تهیه مایه تلقیح و آلوده سازی گیاهان

به‌منظور تهیه مایه تلقیح کافی جهت آلوده‌سازی، از جدایه ۱۹ (جمع آوری شده از کرمانشاه- ایران) قارچ *M.graminicolla*

استفاده شد. قطعه کوچکی از کشت مادری قارچ به مدت پنج روز بر روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) قرار داده شده و در انکوباتور با دمای ۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد زیر نور فلورسنت نگهداری شد. سپس در محیط کشت مایع YG (Yeast Glucose) واکشت شد. ارلن‌های حاوی کشت قارچ برای پنج روز به انکوباتور شیکردار با دور 30 rpm با دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. پس از پنج روز که قارچ به اندازه کافی رشد کرده بود، اسپورهای قارچ رسوب داده شدند، سپس فاز مایع خالی شده و اسپورهای رسوب کرده، در آب مقطر حل شدند. غلظت اسپور با استفاده از لام هموسایتومتر تعیین گردید و غلظت نهایی به حدود $۱۰^{۷}$ اسپور در هر میلی لیتر رسانده شد. به ازای هر لیتر سوسپانسیون ۱۰ قطره توویین۲۰ به سوسپانسیون اضافه گردید. این کار باعث چسبندگی اسپورها و باقی ماندن آنها روی برگ در هنگام اسپورپاشی می‌شود. اسپورپاشی توسط افشانه دستی انجام گرفت. بعد از اسپورپاشی، گیاهان به‌مدت ۴۸ ساعت در داخل پاکت‌های پلاستیکی جهت تأمین رطوبت گذاشته شدند و روی آن‌ها با پلاستیک سیاه پوشیده شد. بعد از ۴۸ ساعت گیاهان از پلاستیک خارج شده و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۶-۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۵-۹۰٪ و حداقل ۱۶ ساعت روشنایی در روز قرار داده شدند. در مورد گیاهان شاهد تیمار با استفاده از آب مقطر انجام گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی(Real Time-PCR)

پنج توالی درگیر در مقاومت گندم به بیماری سپتوریوز که با روشcDNA-AFLP در آزمایشگاه بخش ژنومیکس پژوهشکده زیست فن‌آوری زیستی کرج شناسایی شده است (نتایج منتشر نشده)، انتخاب گردید و نرم افزار Oligo5 جهت طراحی آغازگرها مورد استفاده قرار گرفت (جدول۱). معیارهای مورد استفاده برای طراحی آغازگرها عبارتند از: طول ۱۸-۲۲ جفت باز، دمای ذوب ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد، تفاوت دمای ذوب آغازگرهای رفت و برگشت حداکثر یک درجه سانتی‌گراد، محتوای GC، ۵۰ تا ۶۰ درصد و طول محصول ۱۹۰-۱۹۸۰۰ جفت باز.

در این واکنش از سایبرگرین (iQ™ SYBR® Green Supermix) و پلیت ۹۶تایی دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی (Detection System MyiQ™ Single Color Real time-PCR, Bio-rad, USA) استفاده شد. هر واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر سایبرگرین، ۱۰پیکو مول آغازگر رفت ، ۱۰پیکومول آغازگر برگشت، ۲۰ نانوگرم cDNA و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. شرایط PCR به این شرح بود: یک چرخه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه جهت واسرشته‌سازی اولیه، ۴۵ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشته‌سازی، دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای گسترش قطعات در حال تکثیر و در ادامه یک چرخه شامل دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه برای گسترش نهایی و بلافاصله برای تجزیه منحنی ذوب برای آزمون عملکرد اختصاصی آغازگرها نمونه‌ها در دمای ۵۰°C به مدت ۱۰ ثانیه قرار گرفتند و سپس در طی ۲۰ دقیقه دما به ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و سپس منحنی ذوب بر اساس تغییرات فلورسنت در هر دما ترسیم گردید.

تجزیه داده‌ها

به‌منظور تجزیه داده‌های Real Time-PCR از نرم‌افزار طراحی شده توسط شرکت Bio-Rad بر اساس مقدار threshold cycle (Ct) واکنش‌ها استفاده شد. برای استاندارد کردن Real Time-PCR، ابتدا PCR با سری‌های رقت cDNA برای هر آغازگر انجام گرفت و منحنی استاندارد هر ژن رسم گردید. تغییرات بیان هر ژن به صورت نسبت بیان ژن موردنظر به ژن رفرنس محاسبه شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه الگوهای بیان ژن‌های متناظر با توالی‌های KHO15، KHO59، KHO77، KHO78 و KHO61 درگیر در مقاومت گندم به بیماری سپتوریوز مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه این توالی‌ها با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI به آنالیز BLAST مشخص نمود که این توالی‌ها به ژن‌های نئومنتول دهیدروژناز (neomenthol dehydrogenase) ، آلفا ۱-۴ گلوکان فسفوریلاز-(alpha 1,4-glucan phosphorylase)، پروتئین کیناز حاوی تکرارهای غنی از لوسین(Lucine rich repeat protein kinase)، پروتئین شبه‌توبی (TULP: Tubby-like F-box protein) و نرمپ (NRAMP: natural resistance-associated macrophage protein) تعلق دارند (جدول۲).

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی

Table 1: The primer sequences used for Real Time-PCR

Name نام	Primer sequence توالی آغازگر	Product size اندازه باند	Tm (°C) گرمای ذوب	GC% محتوی (GC)
KHO61	GCTCTACAGCAACCTATCCTCC GGTGTCGAACAACCGATAGAG	100	59.39 59.6	54.54 52.38
KHO15	CCTGCATGTACGCAGTCAGT CGTCCCCTGGATACAATACG	113	59.93 60.21	55 55
KHO59	ATGAGCATCTTGGCTCCGTA GTTCAACGAGATCGACACCA	81	60.77 59.68	50 50
KHO77	AGACTAGAACTGAGCAGATATC GCTGGAGGAGATTAGGGAG	152	62 60	40.9 57.9
KHO78	GCGTTCAAGAAGCAGTGTAC CTCAAGACCTATGTTATCAGC	140	60 60	50 42.9

جدول ۲: شباهت توالی‌های مورد بررسی با توالی‌های ثبت شده در پایگاه NCBI

Table 2: Similarity of interested sequences with submitted data in NCBI data base

TDFs قطعه حاصل از رونویسی	Length (bp) اندازه (جفت باز)	Description توضیح	Homology with blastN or blastX شباهت با blastN or blastX	Species گونه‌ها	*E*-value ارزش E
KHO15	293	Plastidic alpha 1,4-glucan phosphorylase	AAQ63570.1	*Triticum aestivum*	2e-21
KHO59	198	neomenthol dehydrogenase gene	XP_003575324.1	*Brachypodium distachyon*	3e-27
KHO61	111	mRNA for predicted protein Tubby-like F-box protein	AK376816.1	*Hordeum vulgare*	6e-31
KHO77	168	leucine-rich repeat receptor-like protein kinase	BAJ92441.1	*Hordeum vulgare*	1e-06
KHO78	183	integral membrane protein NRAMP	CAD55951.1	*Hordeum vulgare*	7e-32

با تعیین نمودار الگوی بیان ژن‌ها مشخص شد که بیان آنزیم نئومنتول دهیدروژناز در رقم مقاوم، از زمان صفر تا ۶ ساعت پس از آلوده‌سازی به تدریج افزایش می‌یابد (شکل ۱) و در ۱۲ ساعت پس از تلقیح به اوج می‌رسد (حدود ۲۵ برابر ژن مرجع) و سپس دوباره کاهش می‌یابد تا اینکه در روز سوم بیان بسیار کمی پیدا می‌کند. در رقم حساس فلات در تمام دوره ۲۱ روزه بیان این ژن در حد پایین بود (کمتر از ۳ برابر ژن مرجع)، به‌طوری که در طی زمان هیچ تغییر قابل ملاحظه ای در بیان آن دیده نشد. در زمان صفر هر دو رقم مقاوم و حساس بیان کمی داشتند.

شدت تغییرات بیان ژن پروتئین کیناز حاوی تکرارهای غنی از لوسین نسبت به ژن نئومنتول دهیدروژناز کمتر است (شکل ۲) به‌طوری که در شدیدترین حالت (اوج بیان) به ۸-۹ برابر ژن مرجع می‌رسد. این حالت در ۳ ساعت پس از تلقیح پدیدار شد. پس از آن بیان کاهش یافته و روز اول پس از تلقیح بیان آن به حالت اولیه باز می‌گردد. همانند ژن نئومنتول دهید روژناز الگوی بیان این ژن هم در رقم حساس در بیشتر زمان‌های نمونه‌برداری بیان کم و یکنواختی را نشان داد. در زمان صفر هم بیان کمی مشاهده می‌شود که در رقم مقاوم بیشتر است، در این زمان در رقم مقاوم افزایش بیان در حدود دو برابر ژن مرجع است.

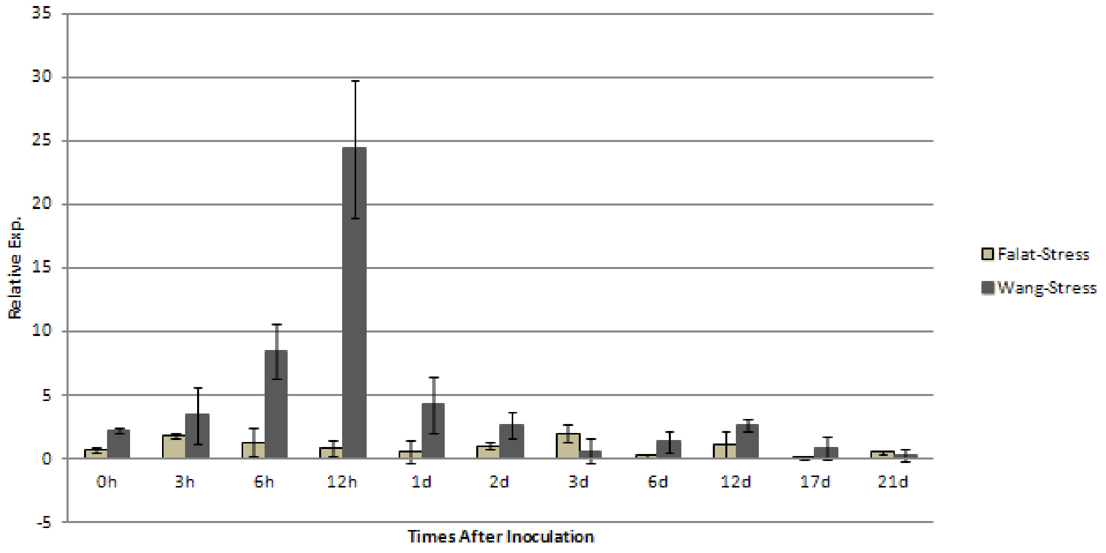
پروتئین نرمپ الگوی بیان نامنظمی دارد (شکل۳)، در رقم مقاوم این ژن دو اوج در زمان‌های ۳ ساعت و ۲ روز پس از تلقیح داشت. این ژن ابتدا در ۳ ساعت بیانش تا بیش از ۸ برابر افزایش یافت ولی پس از آن تا روز دوم دچار کاهش شد. در ۲ روز پس از تلقیح دوباره اوج دیگری را نشان داد (با حدود ۷ برابر افزایش بیان)، سپس مجدداً کاهش یافت. در رقم حساس مانند دو ژن قبلی بیان در همه ۱۱ زمان کمتر از ۲ برابر است و در هیچ زمانی کاهش یا افزایش معنی‌داری نشان نمی‌دهد. به عبارت دیگر روند تغییرات یکنواختی برای این رقم مشاهده شد. در زمان صفر برای هر دو رقم مقدار کمی بیان دیده می شود ولی این مقدار برای رقم مقاوم بیشتر بود.

نتایج Real Time-PCR پروتئین شبه‌توبی نشان داد که این ژن ۳ ساعت پس از آلوده‌سازی به اوج می‌رسد (شکل ۴) ولی دوباره بیان آن کاهش می‌یابد و سپس بیان آن در ۳ تا ۶ روز افزایش می‌یابد به‌طوری که بیان آن حتی از زمان ۳ ساعت پس از تلقیح هم بیشتر می‌شود. در سایر زمان‌ها تفاوت بیان این پروتئین در رقم مقاوم ناچیز بود. در تمام ۲۱ روز بیان در رقم حساس در دامنه نزدیک صفر تا ۲ برابر است و مانند سایر ژن‌های بررسی شده در این مطالعه الگوی بیان یکنواختی دارد. در زمان صفر بیان در هر دو رقم خیلی کم است.

آنزیم گلوکان‌فسفوریلاز (شکل ۵) در زمان صفر هم بیان شده ولی بیان آن بسیار کم است (بویژه در رقم حساس) و می‌توان گفت، در رقم ونگ‌شوبای این ژن در ۳ ساعت تا یک روز القا شده است. پس از یک روز تا آخر نمونه‌برداری بیان کمی دیده می‌شود. در رقم حساس مانند سایر ژن‌ها، این ژن هم بیان خیلی کمی در همه زمان‌ها دارد و الگوی بیان یکنواختی داشت.

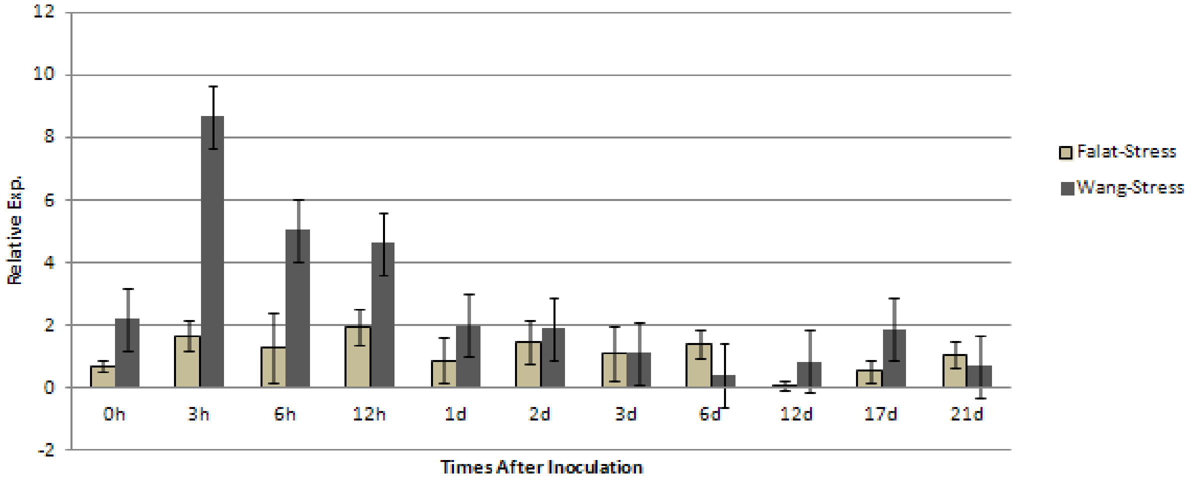
هر پنج ژن مورد بررسی خیلی زود القا می‌شوند. ژن پروتئین کیناز حاوی تکرارهای غنی از لوسین، ژن کدکننده پروتئین‌های نرمپ، شبه‌توبی و گلوکان‌فسفوریلاز در ساعت سوم پس از آلوده‌سازی افزایش بیان نشان می‌دهند و ژن کدکننده نئومنتول دهیدروژناز پس از ۱۲ ساعت به اوج بیان می‌رسد. برای نرمپ الگوی بیان شامل دو اوج، یکی در ساعت ۳ و دیگری در روز دوم پس از آلوده سازی است. ژن کدکننده پروتئین شبه‌توبی هم یک بار در ساعت سوم و بار دیگر در روز سوم پس از آلوده‌سازی به اوج بیان دست می‌یابد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان الگوی بیان ژن‌های نرمپ و شبه-توبی را دوگانه نامید زیرا هم زود و هم دیر بیان می‌شوند.

آدیکاری و همکاران (2007) معتقدند که القا ژن‌ها در میزبان مقاوم شامل دو اوج است: یکی در مراحل ابتدایی تماس پاتوژن با گیاه (۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از آلوده‌سازی) و دیگری در زمان ۱۲-۱۸ روز پس از آلوده‌سازی که با افزایش بیومس قارچ در ارقام حساس همبستگی دارد. برخلاف این نظریه *رای* و همکاران (2004) معتقد هستند که ژن‌های پاسخ دفاعی در گندم پس از حمله قارچ عامل سپتوریوز، بسیار زود حتی قبل از نفوذ قارچ به داخل گیاه فعال می شوند. در نتایج بدست آمده این تحقیق فعالیت ۶ روز پس از تلقیح ژن‌ها نیز مشاهده شد. مشخص شده است که در برهم کنش گندم--سپتوریوز، صرف‌نظر از ژنوتیپ، جوانه‌زدن کنیدی روی سطح برگ‌ها در حدود ۲ ساعت پس از تلقیح شروع می‌شود (*کوهن و ایال*، 1993). بنابراین پاسخ‌های اولیه میزبان ممکن است به وسیله آزادشدن موادی از اسپورهای جوانه‌نزده و جوانه‌های اسپور در یک ماتریکس خارج سلولی تحریک شود (*دانکن و هووارد*، 2000).



شکل ۱: الگوی بیان ژن نئومنتول دهیدروژناز در رقم فلات و رقم ونگ شوبای در زمان‌های مختلف (۰،۳ ، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت و ۲، ۳، ۶، ۱۲، ۱۷، ۲۱ روز پس از آلوده سازی)

Fig 1: expression patern of neomenthol dehydrogenase gene in Falat and Wang shui bai cultivars in different sampling times (0, 3, 6, 12, 24 h and 2, 3, 6, 12, 17 and 21 days after inoculation)



شکل ۲: الگوی بیان ژن کدکننده پروتئین کیناز حاوی تکرارهای غنی از لوسین در رقم فلات و رقم ونگ شوبای در زمان‌های مختلف (۰،۳ ، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت و ۲، ۳، ۶، ۱۲، ۱۷، ۲۱ روز پس از آلوده‌سازی)

Fig 2: Expression patern of leucine-rich repeat kinase gene in Falat and Wang shui bai cultivars in different sampling times (0, 3, 6, 12, 24 h and 2, 3, 6, 12, 17 and 21 days after inoculation)

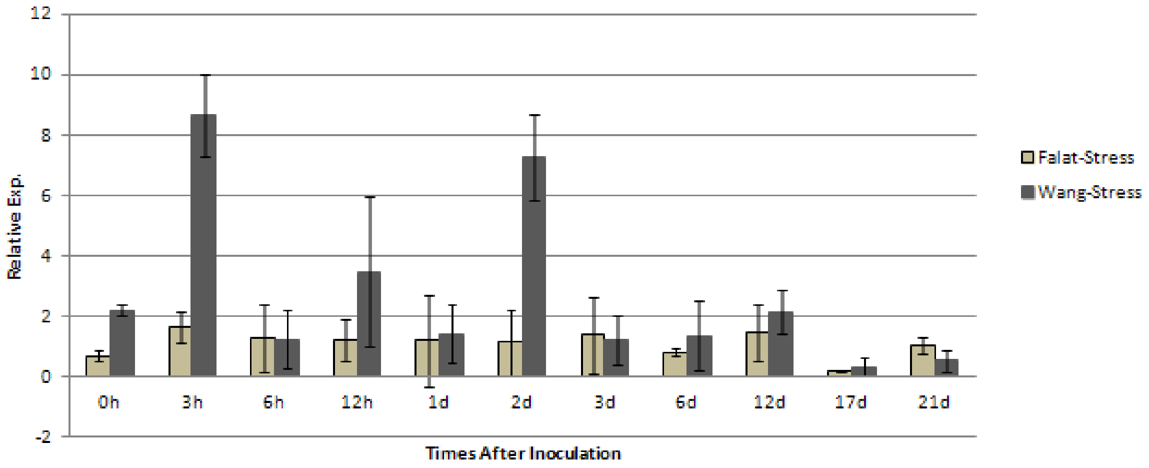
آنزیم گلوکان‌فسفوریلاز در ارتباط با تنش‌های غیرزیستی گندم گزارش شده است و با متابولیسم و انرژی سلولی در ارتباط است (*کمال* و همکاران، 2010). در گیاهان گلوگان فسفوریلازها نشاسته را متابولیز می‌کنند. این آنزیم انتقال برگشت‌پذیر یک واحد گلیکوزیدی از انتهای غیرکاهنده یک آلفا ۱-۴ الیگو یا پلی‌گلیکان را به ارتوفسفات کاتالیز می‌کند (*شوپ وزیگلر*، 1997). شیم و همکاران در سال ۲۰۰۴ این ژن را پس از آلوده‌سازی *Oryza minuta* به قارچ *Magnosporthe grisea* شناسایی کردند. در مطالعه دیگری چو و همکاران، *2005* در مطالعه آنالیز رونوشت‌های بیانی متمایز در *Oryza minuta* مورد هجوم ملخ مشخص کردند که بیان این ژن پس از حمله افزایش یافته است.

ژن نئومنتول‌دی‌هیدروژناز در بیوسنتز مونوترپنوئیدها دخالت دارد. منوترپنوئیدها از متابولیت‌های‌ثانویه هستند. گیاهان همواره انواع مختلفی از متابولیت‌های‌ثانویه سنتز می‌کنند که به آن‌ها در محافظت از هجوم پاتوژن‌ها و حمله حشرات کمک می‌کند (*اسبورن* و همکاران، 2003؛ *کیبنشتین*، 2004). علاوه بر این در پاسخ به حمله پاتوژن و تنش‌های دیگر، متابولیت‌های‌ثانویه القا می‌شوند (*لیواک و مانسون*، *1998*؛ آریمورا و همکاران،2000؛ *بیر* و همکاران، 2004).

گیاهان تقریباً ۵۰۰۰۰ متابولیت‌ثانویه تولید می‌کنند که شامل ۳۰۰۰۰ ترپنوئید، ۱۲۰۰۰ آلکالوئید، ۲۵۰۰ فنیل پروپانوئید و ۲۵۰۰ تا از سایر ترکیبات است. تقریباً ۲۵ درصد از کل ژن‌های کدکننده پروتئینی در ساخت متابولیسم‌های ثانویه نقش دارند. در میان این متابولیت‌ها ترپنوئیدها بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین گروه هستند که شامل منتول، اسید آبسیزیک، کلروفیل، جیبرلین، بتاکاروتن و رزین است (*دیویس و کروتو*، 2000). ترپنوئیدها تولیدات طبیعی علیه پاتوژن‌ها هستند (*لیواک و مانسون*، 1998؛ *کوبو و همکاران*، *1993*). اهمیت ترپنوییدها در مقاومت گیاهان به بیماریها در تعدادی از برهم‌کنش‌های گیاه-پاتوژن مشاهده شده است (*چو* و همکاران، 2008).

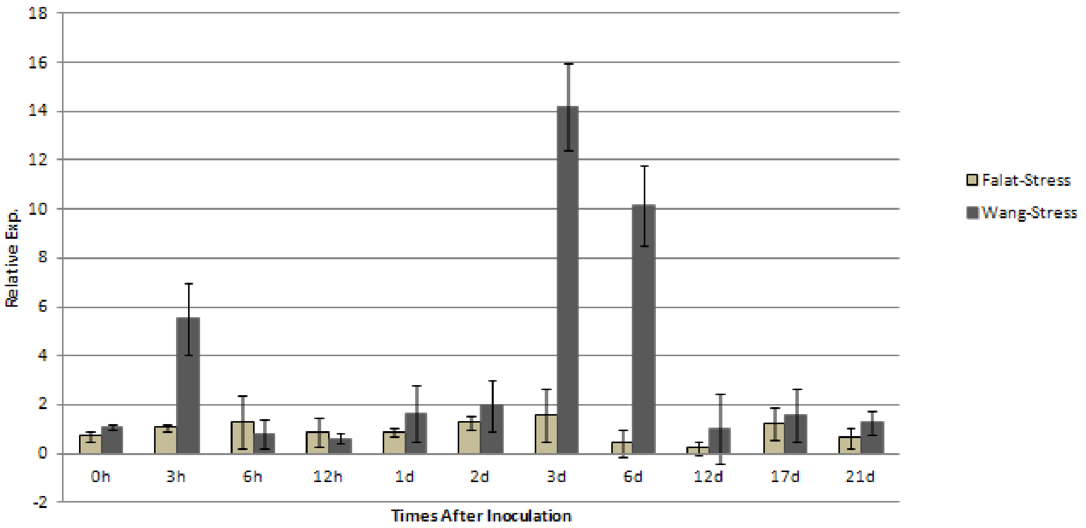
چو و همکاران، 2008 با خاموش‌کردن ژن نئومنتول ریداکتاز۱ (CaMNR1) نشان دادند که بیان این ژن برای القا ژن‌های مرتبط با مقاومت مهم است و گیاهان فلفل که این ژن در آنها خاموش شد به پاتوژن باکتریایی *Xanthomonas campestris* و قارچ *Colletrichum coccodes* حساسیت بیشتری نشان دادند. چو و همکاران همچنین نشان دادند که ژن نئومنتل‌ریداکتاز بیان پروتئین‌های مربوط به بیماریزایی ATPR1 و ATPDF1 را تحریک می‌کند. در آرابیدوپسیس القا ATPR1 از طریق یک مسیر وابسته به اسیدسالیسیلیک اتفاق می‌افتد (*اوکنس* و همکاران، *1992*) در حالی‌که القا ATPDF1 وابسته به اسیدجاسمونیک است (*پنینکس* و همکاران، ۱۹۹۸). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که نئومنتل‌ریداکتاز۱ نقش حیاتی در تنظیم ژن‌های پروتئین‌های مربوط به بیماریزایی از طریق مسیر اسیدسالیسیلیک و اسید جاسمونیک دارد(چو و همکاران، ۲۰۰۸).

پروتئین‌های شبه‌توبی (TULP) در تک‌سلولی‌ها و چند سلولی‌های یوکاریوتی موجود است. ویژگی عمومی این پروتئین‌ها حضور یک ناحیه (Domain) تقریباً ۲۷۰ اسیدآمینه‌ای در ناحیه انتهای کربوکسیلی است و تنوع زیادی در ناحیه انتهای آمینی در حیوانات دارند اما در گیاهان در آن ناحیه یک دمین (Domain) محافظت‌شده F-box وجود دارد (*گاگن* و همکاران،2002). حفاظت زیاد دمین‌توبی در بین گونه‌ها نشان‌دهنده عمل زیستی مهم این پروتئین‌ها است (*ایکدا* و همکاران، 2002). علاوه بر عمل پروتئین‌های شبه‌توبی در تنظیم رونویسی در گیاهان، این پروتئین‌ها با داشتن دمین F-box، در القا سیگنال نیز نقش دارند. آنالیز بیان زیاد این پروتئین یا سرکوب بیان آن در گیاه آرابیدوپسیس نشان داده است که حداقل یکی از نقش‌های پروتئین شبه توبی در تنظیم مسیر اسید آبسیزیک است (*لای و همکاران*، ۲۰۰۴). مشخص شده است که بیان پروتئین شبه توبی ۷۲ ساعت بعد از تنش خشکی در گیاه نخود افزایش می‌یابد (*بوشان و همکاران*، ۲۰۰۷). در این تحقیق نیز مشخص شده است که بیان این ژن در شرایط تنش بیماری سپتوریوز افزایش می‌یابد.
توالی‌های تکرارهای غنی از لوسین در بسیاری فرایندهای شناسایی مولکولی نظیر پیام‌رسانی، اتصال سلول‌ها، حرکت سلولی، تعمیر DNA و پردازش RNA نقش دارند (کوب و دیزنهوفر، ۱۹۹۴؛ لی و چوری، ۱۹۹۷). پروتئین کینازهای حاوی تکرارهای غنی از لوسین توسط بسیاری ژن‌های مقاومت نظیر Cf-2 (*دیکسونت* و همکاران، 1996)، Cf-9 (*جونز* و همکاران، *1994*) در گوجه فرنگی و Xa21 در برنج (*سانگ* و همکاران، *1995*) کد می‌شوند که تصور می‌شود در انتقال پیام‌های پاتوژن شرکت می‌کنند و باعث مقاومت گیاه به پاتوژن می‌شوند (*لی و چوری*، 1997). در این پروتئین‌ها قطعه LRR خارج سلولی الیسیتور پاتوژن را شناسایی می‌کند و پیام آن را از طریق فسفوریلاسیون خودبه‌خودی به‌وسیله دمین سرین/ترئونین کیناز به داخل سیتوپلاسم منتقل می‌کند (*هولت تری* و همکاران، 2000؛ *سانگ* و همکاران، *1995*؛ *لیوارت وکلارک*، 2004). پنگ و همکاران (2009) با استفاده از تکنیک RNAi ۵۹ ژن پروتئین کیناز حاوی تکرارهای غنی از لوسین برنج را خاموش کردند و یک ژن جدید (*OsBRR1*) شناسایی کردند که با پاسخ‌های دفاعی برنج مرتبط بود.



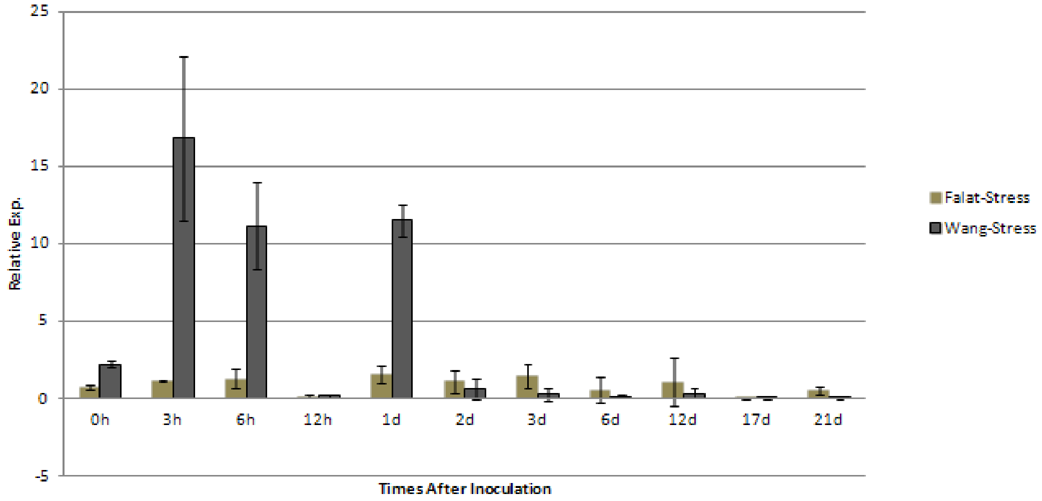
شکل ۳: الگوی بیان ژن نرمپ در رقم فلات و رقم ونگ شوبای در زمان‌های مختلف (۳،۰، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت و ۲، ۳، ۶، ۱۲، ۱۷، ۲۱ روز پس از آلوده سازی)

Fig 3: Expression patern of NRAMP gene in Falat and Wang shui bai cultivars in different sampling times (0, 3, 6, 12, 24 h and 2, 3, 6, 12, 17 and 21 days after inoculation)



شکل ۴: الگوی بیان ژن شبه توبی در رقم فلات و رقم ونگ شوبای در زمان‌های مختلف (۳،۰، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت و ۲، ۳، ۶، ۱۲، ۱۷، ۲۱ روز پس از آلوده‌سازی)

Fig 4: Expression patern of TULP gene in Falat and Wang shui bai cultivars in different sampling times (0, 3, 6, 12, 24 h and 2, 3, 6, 12, 17 and 21 days after inoculation)



شکل ۵: الگوی بیان ژن گلوکان فسفوریلاز در رقم فلات و رقم ونگ شوبای در زمان‌های مختلف (۰، ۳ ، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت و ۲، ۳، ۶، ۱۲، ۱۷، ۲۱ روز پس از آلوده‌سازی)

Fig 5: expression patern of Glucan phosphorylase gene in Falat and Wang shui bai cultivars in different sampling times (0, 3, 6, 12, 24 h and 2, 3, 6, 12, 17 and 21 days after inoculation)

سرکوب این ژن باعث حساسیت برنج به بلاست برنج (*Magnasporthe oryzae*) می‌شود و بیان افزایش یافته (overexpression) آن، افزایش مقاومت را به همراه دارد. ژن *OsBRR1* قبل از آلودگی بیان عادی داشته ولی پس از آلودگی به شدت افزایش بیان نشان داده است. *پنگ* و همکاران از این یافته‌ها نتیجه گرفتند که ژن *OsBRR1* در پاسخ مقاومت گیاه برنج به قارچ عامل بلاست دخیل است. *بوزورت* و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ در مطالعه‌ای برای معرفی ژن‌های دخیل در مقاومت گندم به بیماری زنگ زرد، ژن پروتئین کینازهای حاوی تکرارهای غنی از لوسین را شناسایی کردند. در مطالعه حاضر نیز پس از آلودگی گیاهان با قارچ عامل سپتوریوز بیان پروتئین کینازهای حاوی تکرارهای غنی از لوسین افزایش یافته است که نشان‌دهنده نقش این پروتئین‌ها در مقاومت به سپتوریوز است.

توالی KHO78 شباهت معنی‌داری با پروتئین‌های نرمپ (natural resistance-associated macrophage protein) دارد. پروتئین‌های نرمپ (NRAMP) خانواده محافظت‌شده پروتئین‌های داخل غشایی هستند که در انتقال فلزات نقش دارند و در باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و جانوران یافت می‌شوند. پروتئین نرمپ اولین بار در موش شناسایی شد که در مقاومت میزبان در ارتباط با پروتئین ماکروفاژی داخل سلولی شامل *Leishmania*، *Mycobacterium* و *Salmonella* نقش دارد. این پروتئین با افزایش بیان ژن‌ها به نفع عمل فاگوسیتوز است (گومز و همکاران، 2007). ژن‌های نرمپ گروهی از ناقل‌های فلزات را کد می‌کنند که هم در پروکاریوتها و هم یوکاریوتها موجود است. در حیوانات ژن نرمپ برای مقاومت طبیعی میزبان به آلودگیهای بیماریزای داخل سلولی مهم است. *سگوند* و همکاران گزارش کردند که نرمپ۳ در برگ‌های آرابیدوپسیس تلقیح شده با پاتوژنهای باکتریایی *Pseudomonas syringae* و *Erwinia chrysanthemi* افزایش می‌یابد.

با تعیین میزان بیان توالی‌های ژن پروتئین کیناز حاوی تکرارهای غنی از لوسین، ژن کدکننده پروتئین نرمپ، شبه توبی و گلوکان‌فسفوریلاز مشخص شد که این توالی‌ها در شرایط آلودگی گیاه مقاوم به سپتوریوز در گندم افزایش می‌یابند و عملکرد آنها با ایجاد مقاومت به این بیماری نیز در ارتباط است. در پاسخ مقاومت گندم به سپتوریوز برخی پروتئین‌ها در ۲۴ ساعت اول پس از آلودگی تأثیرگذار هستند و برخی دیگر نظیر پروتئینهای شبه‌توبی چند روز بعد نیز بیان موثری دارند و در کامل نمودن مقاومت نقش دارند. این اطلاعات می‌تواند در شناخت بیشتر برهمکنش گیاه و پاتوژن و همچنین ژنتیک مقاومت کمک نماید.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱۷-۱۵ متن انگلیسی مراجعه شود.

Expression Patterns of Genes Involved in Septoria Leaf Blotch Resistance in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.)

Khodaei[1]*, L., Taleei[2], A., Mardi[3], M., Naghavi[4], M. R., Karimi Farsad[5], L. and Sedaghatfar[6], E .

Abstract

Septoria tritici blotch (STB), caused by *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*), is one of the most important diseases of wheat (*Triticum aestivum*) world wide. planting resistant cultivars is the best method to manage STB environmentally. Many plant genes are induced or repressed and many others are up regulated or down-regulated to response a pathogen. In this study, Real time PCR were used to analysis of expression patterns of five genes involved in septoria leaf blotch resistance in wheat. After inoculation of resistant (Wang shui bai) and susceptible (Falat) cultivars with *M. graminicola* fungus, expression of these genes were investigated at 11 time points in 3 replications and the expression patterns of them were determined as relative to 18s reference gene. Comparision of these sequences using NCBI data base showed that these sequences had homology to neomenthol dehydrogenase, Lucine rich repeat protein kinase, natural resistance-associated macrophage protein, alpha 1,4-glucan phosphorylase and Tubby-like F-box protein. The peak expression for 1,4-glucan phosphorylase and Lucine rich repeat protein kinase were at 3 hours after inoculation and for neomenthol dehydrogenase the peak is at 12h. For natural resistance-associated macrophage protein the peak was at 3h but it was decreased and then increased again at second day. Tubby-like F-box protein was induced at 3h and had significant expression in this time but the peak expression for this gene was at 3 day after inoculation and we can call this pattern, a bimodal one. Some of these genes were induced early after inoculation and their expression increased significantly, but some others showed an induced expression several days after inoculation.

Keywords: *Septoria tritici* blotch, Real time PCR, Wheat

References

Abrinbana, M., Mozafari, J., Shams-bakhsh, M. and Mehrabi, R. 2010. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations in Iran. Plant Pathology, 59: 829-838.

Adhikari, T. B., Balaji, B., Breeden, J. and Goodwin S. B. 2007. Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. Physiological and Molecular Plant Pathology, 71: 55-68.

Arimura, G., Ozawa, R., Shomoda, T., Nishioka, T., Boland, W. and Takabayashi, J. 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. Nature, 406: 512-515.

1. PhD student, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj
2. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj
3. Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj
4. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj
5. Laboratory Technician, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj
6. Assistant Professor, Azad University, Arak Branch, Arak
*: Corresponding Author **Email**: lkhodaei@ut.ac.ir

Arraiano, L. S., Worland, A. J., Ellerbrook, C. and Brown J. K. M. 2001. Chromosomal location of a gene for resistance to *septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the hexaploid wheat 'Synthetic 6x'. Theoretical and Applied Genetics, 103: 758-764.

Arraiano, L. S., Chartrain, L., Bossolini, E., Slatter, H. N., Keller, B. and Brown, J. K. M. 2007. A gene in European wheat cultivars for resistance to an African isolate of *Mycosphaerella graminicola* . Plant Pathology, 56: 73-78.

Bachem, C. W. B. 2002. cDNA-AFLP, A tool for transcriptome analysis. www.plantbreeding.wur.nl.

Bhushan, D., Pandey, A., Choudhary, M. K., Datta, A., Chakraborty, S. and Chakraborty, N. 2007. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. Molecular Cell Proteomics, 6: 1868-84.

Biere, A., Marak, H. B. and Van Damme, M. M. 2004. Plant chemical defense against herbivores and pathogens: generalized defense or trade-offs? Oecologia, 140: 430-441.

Bozkurt, O., Hakki, E. E. and Akkaya, M. S. .2007. Isolation and sequence analysis of wheat NBS-LRR type disease resistance gene analogs using degenerate PCR primers. Biochemical Genetics, 45: 469-86.

Brading, P. A., Verstappen, E. C., Kema, G. H. and Brown, J. K. .2002. A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola* , the *Septoria tritici* Blotch Pathogen. Phytopathology, 92: 439-45.

Cho, S. K., Jung, K. W., Jeung, J. U., Kang, K. H., Shim, K. S., You, M. K., Yoo, K. S., Ok, S. H. and Shin, J. S. 2005. Analysis of differentially expressed transcripts from plant hopper-infested wild rice (*Oryza minuta*). Plant Cell Reports, 24: 59-67.

Choi, H. W., Lee, B. G., Kim, N. H., Park, Y., Lim, C. W., Song, H. K. and Hwang, B. K. .2008. A role for a menthone reductase in resistance against microbial pathogens in plants. Plant Physiology, 148: 383-401.

Cohen, L. and Eyal, Z. 1993. The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. Plant Pathololology, 42:737-43.

Davis, E. M. and Croteau , R. 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. Topics Current Chemistry, 209: 53-95.

Dievart, A. and Clark, S. E. 2004. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. Development, 131: 251-61.

Dixon, M. S., Jones, D. A., Keddie, J. S., Thomas, C. M., Harrison, K. and Jones, J. D. G. 1996. The tomato *Cf-2* disease resistance locus. comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. Cell, 84: 451-459.

Duncan, K. E. and Howard, R. J. 2000. Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Mycological Research, 104:1074-82.

Gagne, J. M., Downes, B. P., Shiu, S. H., Durski, A. and Vierstra, R. D. 2002. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse super family of genes in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99: 11519-11524.

Gomez, M. A., Li, S., Tremblay, M. L. and Olivier, M. 2007. NRAMP-1 expression modulates protein-tyrosine phosphatase activity in macrophages: impact on host cell signaling and functions. Journal of Biological Chemistry, 282:36190-36198.

Holt III, B. F., Belkhadir, Y. and Dangl, J. L. 2005. Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. Science, 309: 929-932.

Ikeda, A., Nishina, P. M. and Naggert, J. K. 2002. The tubby like proteins, a family with roles in neuronal development and function. Journal of Cell Science, 115: 9-14.

Jlibene, M., Gustafson, J. P. and Rajaram, S. 1994. Inheritance of resistance to *Mycosphaerella graminicola* in hexaploid wheat. Plant Breeding, 112:301-310.

Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J. and Jones, J. D. J. 1994. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. Science, 266: 789-793.

Kamal, A. H. M., Kim, K. H., Shin, K. H., Choi, J. S., Baik, B. K., Tsujimoto, H., Heo, H. Y., Park, C. S. and Woo, S. H. 2010. Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. Australian Journal of Crop Science, 4: 196-208.

Kliebenstein, D. J. 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. Plant, Cell and Enviroment, 20: 675-684.

Kobe, B. and Deisenhofer, J. 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. Trends in Biochemical Sciences, 19:415-421.

Kubo, I. H., Muroi, H., Himejima, M. 1993. Combination effects of antifungal nagilactones against Candida albicans and two other fungi with phenylpropanoids. Journal of Natural Products, 56: 220-226.

Lai, C. P., Lee, C. L., Chen, P. H., Wu, S. H., Yang, C. C. and Shaw, J. F. 2004. Molecular analysis of the Arabidopsis TUBBY-like protein gene family. Plant Physiology, 134: 1586-1597.

Li, J. and Chory, J. 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. Cell, 90: 929-38.

Litvak, M. E. and Monson, R. K. 1998. Patterns of induced and constitutive monoterpene production in conifer needles in relation to insect herbivory. Oecologia, 144: 531-540.

Mardi, M., Pazouki, L., Delavar, H., Kazemi, M. B., Ghareyazie, B., Steiner, B., Nolz, R., Lemmens, M. and Buerstmeyr, H. 2006. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a 'Frontana'-derived population. Plant Breeding, 125: 313-317.

McCartney, C. A., Brule-Babel, A. L. and Lamari, L. 2002. Inheritance of race-specific resistance to *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Phytopathology, 92: 138-44.

Osbourn, A. E., Qi, X., Townsend, B. and Qin, B. 2003. Dissecting plant secondary metabolism-constitutive chemical defenses in cereals. New Phytologists, 159: 101-1.

Peng, H., Zhang, Q., Li, Y., Lei, C., Zhai, Y., sun, X., Sun, D. and Lu, T. 2009. A putative leucine-rich repeat receptor kinase, OsBRR1, is involved in rice blast resistance. Planta, 230: 377-385.

Penninckx, I. A., Thomma, B. P., Buchala, A., Me´traux, J. P. and Broekaert, W.F. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. Plant Cell, 10: 2103-2114.

Ray, S., Anderson, J. M., Urmeev, F.and Goodwin, S. B. 2003. Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Plant Molecular Biology, 53: 701-714.

Schupp, N. and Ziegler, P. 2004. The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. Plant Cell Physiology, 45: 1471-1484.

Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S. and Expert, D. 2009.NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. The Plant Journal, 58: 195-207.

Shim, K. S., Cho, S. K., Jeung, J. U., Jung, K. W., You, M. K., Ok, S. H., Chung, Y. S., Kang, K. H., Hwang, H. G., Choi, H.C., Moon, H. P. and Shin,J. S. 2004. Identification of fungal (*Magnaporthe grisea*) stress-induced genes in wild rice (*Oryza minuta*). Plant Cell Reports, 22: 599-607.

Simon, M. R. and Cordo, C. A. 1998. Diallel analysis of four resistance components to *Septoria tritici* in six crosses of wheat (*Triticum aestivum*). Plant Breeding, 117: 123-126.

Somasco, O. A., Qualset, C. O. and Gilchrist, D. G. 1996. Single-gene resistance to Septoria tritici blotch in the spring wheat cultivar ‘Tadinia’. Plant Breeding, 115: 261-267.

Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhao, W. X., Zhu, L. H., Fauquet, C. and Ronald, P. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. Science, 270: 1804-806.

Tabib Ghaffary, S. M., Faris, J. D., Friesen, T. L., Visser, R. G., van der Lee, T. A., Robert, O. and Kema G. H. 2012. New broad-spectrum resistance to *septoria tritici* blotch derived from synthetic hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetics, 124: 125-42.

Tabib Ghaffary, S. M., Robert, O., Laurent, V., Lonnet, P., Margale, E., van der Lee, T. A., Visser, R. G. and Kema, G. H. 2011. Genetic analysis of resistance to *septoria tritici* blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache. Theoretical and Applied Genetics, 123: 741-54.

Talebi, R., Mardi, M., Babaeian jelodar, N. A., Razavi, M., Pirseyedi, S. M., Kema, G., Mehrabi, R., Ebrahimi, M. and Marcel, T.C. 2010. Specific resistance gene in wheat Chinese landrace Wangshuibai against two Iranian *Mycosphaerella graminicola* isolates. International Journal of Biology, 2: 181-188.

Ukness, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. and Ryals, J. 1992. Acquired resistance in Arabidopsis. Plant Cell, 4: 645-656.

Wang , X., Liu, W., Chen, X., Tang, C., Dong, Y., Ma, J., Huang, X., Wei, G., Han, Q., Huang, L. and Kang, Z. 2010. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. BMC Plant Biology, 10: 9-23.

Wang, X., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, C., Liu, B., Qu, Z., Zhao, J., Han, Q., Huang, L., Chen, X. and Kang, Z. 2009. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striiformis f. sp. tritici.* BMC Genomics, 10: 289-300.