دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴ (ص ۸۶-۷۹)

بررسی حضور ژن حساسیت *Tsn1* در تعدادی از لاین‌های گندم و واکنش آنها نسبت به تزریق توکسین ToxA تولیدشده توسط *Pyrenophora tritici-repentis*

رحیم مهرابی[1*]، نسیم کرمی[2] و محمد ترابی[3]
۱. استادیار مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر، بخش تحقیقات غلات، کرج
۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، دانشکدهٔ کشاورزی
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۲)

چکیده

لکه‌خرمایی گندم که توسط قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* ایجاد می‌گردد، به عنوان یک بیماری مهم گندم همه ساله خسارات فراوانی به بار می‌آورد. استفاده از تکنیک‌های دقیق، سریع و کم‌هزینه برای ارزیابی لاین‌های گندم نسبت به بیماری‌های مهم همواره مورد توجه به‌نژادگران بوده است. در این تحقیق واکنش ۲۰ لاین گندم نسبت به ToxA که مهم‌ترین فاکتور بیماری‌زایی *P. tritici-repentis* است، با استفاده از تزریق توکسین ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ۹ لاین به همراه رقم Grandin به عنوان شاهد حساس، علائم نکروز را ۴۸ ساعت پس از تزریق توکسین نشان داد و به عنوان لاین‌های حساس به ToxA و بقیهٔ لاین‌ها به عنوان لاین‌های مقاوم به توکسین شناسایی شدند. همچنین آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن حساسیت *Tsn1* انجام گردید. نتایج نشان داد که لاین‌های حساس قادر به تکثیر باند به اندازهٔ bp ۳۸۰ بودند که بیانگر وجود ژن حساسیت *Tsn1* است. همهٔ لاین‌های مقاوم در آزمون تزریق توکسین، در آزمون PCR نیز قادر به تکثیر ژن *Tsn1* نبودند که مؤید نتایج تزریق توکسین بود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، از این روش می‌توان برای غربال‌گری مقدماتی لاین‌های گندم به عنوان انتخاب منفی برای شناسایی لاین‌های حساس و حذف آنها از برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: توکسین ToxA، ژن حساسیت، لکه خرمایی گندم، *Pyrenophora tritici-repentis*، *Tsn1*.

مقدمه

بیماری لکه‌خرمایی گندم که ناشی از قارچ نکروتروف *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (anamorph: *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem.) است، به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در بسیاری از مناطق جهان مطرح است. این بیماری در آمریکای شمالی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و علی‌رغم تلاش برای مدیریت و کنترل آن، وقوع و شدت بیماری از دهۀ ۶۰ تا اواخر دهۀ ۹۰ میلادی برای بیش از سه دهه در حال افزایش بود (Pfender & Wootke, 1987; Raymond *et al.*, 1985). گسترۀ این بیماری در استرالیا، آسیا (ژاپن، هند، نپال)، آفریقا (اوگاندا، کنیا، تانزانیا، اتیوپی)، اروپا (بریتانیا، آلمان، چک و اسلواکی، سوئد، قبرس)، آمریکای جنوبی

* تلفن: ۰۲۶-۳۶۷۰۱۱۰۵
E-mail: Rahim.Mehrabi@gmail.com

(بولیوی)، آمریکای شمالی (کانادا، ایالات متحدهٔ آمریکا) دیده شده و باعث کاهش چشمگیر محصول از طریق کاهش فتوسنتز و در نتیجه کاهش تعداد سنبله و سنبلچه، کاهش وزن دانه و چروکیدگی دانه می‌شود (De Wolf *et al.*, 1998; Shabeer & Bockus, 1988). خسارت این بیماری در بسیاری از مناطق کشت گندم کمتر از میزان واقعی آن تخمین زده می‌شود (Duveiller *et al.*, 2005). به‌طور متوسط، این بیماری باعث کاهش ۵ تا ۱۰ درصدی محصول می‌گردد، اما به هر حال، تحت شرایط مناسب برای بیماری تا ۵۰٪ کاهش محصول نیز گزارش شده است (Rees *et al.*, 1988; Shabeer & Bockus, 1988; Lamari & Strelkov, 2010). لکه‌خرمایی همچنین از طریق ایجاد لکه‌های سیاه روی بذر و رنگ‌پریدگی باعث کاهش کیفیت دانهٔ گندم تولیدشده می‌گردد (De Wolf *et al.*, 1998). بیماری لکه‌خرمایی در آمریکای جنوبی به عنوان سریع‌ترین بیماری در حال گسترش مطرح است و در آرژانتین، برزیل و پاراگوئه خسارت‌های زیادی به محصول وارد کرده است (Ciuffetti & Tuori, 1999). در مناطق شمالی استرالیا این بیماری مهم‌ترین بیماری برگی شناخته شده است و در سال ۱۹۸۶ از آسیای مرکزی گزارش شده و به‌سرعت به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم مطرح گردیده است (Postnifova & Khashanova, 1998). لکه‌خرمایی گندم در مناطق شمالی کشور به‌شدت در حال گسترش است و زادمایهٔ بیماری سال‌به‌سال در مزارع استان گلستان بیشتر شده است؛ به‌طوری که در سال‌های اخیر این بیماری به یکی از بیماری‌های مهم گندم منطقه تبدیل گردیده است (Rajabpour *et al.*, 2014).

با توجه به اهمیت این بیماری، ارزیابی مقاومت به بیماری لکه‌خرمایی در موارد متعددی انجام گرفته است. Chu *et al.* (2008) ۶۸۸ تودهٔ گندم تتراپلویید را نسبت به این بیماری ارزیابی کردند. این مطالعات نشان داد که حدود ۲۵ توده نسبت به لکه‌خرمایی مقاومت خوبی نشان می‌دهند. ارزیابی مقاومت ۱۲۰ رقم سینتتیک هگزاپلویید نشان داد که بیش از نیمی از آنها به این بیماری مقاوم‌اند، در حالی که بیشتر ارقام تتراپلویید به این بیماری حساس بودند (Xu *et al.*, 2004). از میان ۱۹۹ لاین گندم نان، ۶۵ لاین مقاوم به بیماری لکه‌خرمایی بودند (Oliver *et al.*, 2008). در آمریکای شمالی ۲۲۶ لاین الیت گندم نسبت به سه نژاد قارچ عامل بیماری تحت ارزیابی قرار گرفتند که تنها چهار لاین نسبت به همهٔ نژادها مقاوم بودند (Singh *et al.*, 2006).

این قارچ قادر به تولید توکسین‌های اختصاصی و غیراختصاصی بوده که با تولید کلروز و نکروز در ارقام حساس مرتبط است. تاکنون سه توکسین تولیدشده توسط قارچ به نام‌های ToxA، ToxB و ToxC شناسایی شده‌اند. از این سه توکسین، دو توکسین در سطح مولکولی توالی‌یابی و شناسایی شده است که مهم‌ترین آنها ToxA است. گزارش‌های متعدد از نقش ToxA در ایجاد حساسیت به *P. tritii-repentis* و نقش آن در بیماری‌زایی حکایت می‌کند (Ciuffetti *et al.*, 1997). توکسین اختصاصی ToxA یک توکسین پروتئینی با وزن 13.2 KD است که توسط نژادهای ۱، ۲، ۷ و ۸ تولید می‌شود و عامل اصلی بروز علائم نکروز در گیاهان حساس است. ژنتیک حساسیت به توکسین‌های تولیدشده توسط عامل بیماری لکه‌خرمایی توسط جایگاه‌های ژنی مختلف در میزبان که آلل‌های غالب یا مغلوب دارند کنترل می‌گردد (Lamari & Bernier 1991). مکان ژنی مغلوب *tsn1* که روی بازوی بلند کروموزوم 5B است، باعث مقاومت به نژادهای تولیدکنندهٔ ToxA می‌گردد (Stock *et al.*, 1996). به عبارت دیگر، آلل غالب ژن *Tsn1* در ژنوتیپ‌های گندم به عنوان گیرندهٔ سلولی ToxA عمل کرده و بنابراین باعث ایجاد حساسیت گندم می‌گردد و از این نظر به عنوان ژن حساسیت شناخته شده است. اخیراً ژن حساسیت *Tsn1* توالی‌یابی گردیده است (Faris *et al.*, 2010). با توجه به اینکه توالی ژن *Tsn1* کاملاً مشخص است، می‌توان با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نسبت به وجود یا نبود آن در ارقام گیاهی اقدام کرد. همانند بقیهٔ بیماری‌ها، به‌کارگیری مقاومت ژنتیکی اقتصادی‌ترین و کم‌خطرترین روش از نظر زیست‌محیطی برای کنترل این بیماری است. به همین دلیل یافتن منابع مقاومت و به‌کارگیری آنها در بسیاری از برنامه‌های به‌نژادی از اولویت برخوردار است. با توجه به اطلاعات موجود از برهم‌کنش

مولکولی بیمارگر و میزبان، در تحقیق حاضر امکان استفاده از توکسین ToxA برای تفکیک ارقام مقاوم از حساس در تعدادی از لاین‌های گندم، از طریق تشکیل نکروز در برگ و شناسایی ژن حساسیت *Tsn1* در ارقام حساس بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی تحت آزمایش شامل ۱۸ لاین گندم بود که از سوی بخش تحقیقات غلات، مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر تأمین شد (جدول ۱).کاشت بذرهای گندم به میزان ۱۰-۷ بذر درون گلدان‌های پلاستیکی ۱۰ سانتی‌متری حاوی مخلوط پیت‌ماس و خاک به نسبت ۱:۱ صورت گرفت و سپس گلدان‌ها به میزان مورد نیاز آبیاری شدند و در گلخانه با دمای ۲±۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی در طی شبانه روز قرار گرفتند. همچنین در این آزمایش‌ها از رقم BR34 به عنوان رقم شاهد مقاوم و رقم Grandin به عنوان رقم شاهد حساس استفاده شد. آزمایش در ۵ تکرار انجام گرفت.

جدول ۱. نام و شجرهٔ لاین‌های گندم مورد استفاده، واکنش آنها نسبت به تزریق ToxA و بررسی حضور ژن حساسیت *Tsn1* در آنها. علامت مثبت بیانگر ایجاد نکروز در آزمون تزریق توکسین و در آزمون PCR بیانگر تکثیر باند مرتبط است.

No.	Genotype	Pedigree	Response to ToxA infiltration (Replication)					PCR results	
			R1	R1	R3	R4	R5	18s	*Tsn1*
1	MS-84-13	GF-gy54/Attila	+	+	+	+	+	+	+
2	MS-85-17	Sakha 8/Darab#2//1-66-22	–	–	–	–	–	+	–
3	MV-17	Slaviya/3/Krasnodari 1/ Bezostaya//3Zg.4431	–	–	–	–	–	+	–
4	N-85-5	ATRAK/WANG-SHUI-BAI	+	+	+	+	+	+	+
5	N-86-4	Milan CM75118//KA CM 75118/K1/3/Tajan (DH)	+	+	+	+	+	+	+
6	S-83-3	Attila 50Y//Attila/Bcn	+	+	+	+	+	+	+
7	S-84-14	PASTOR/3/KAUZ*2/OPATA//KAUZ	+	+	+	+	+	+	+
8	S-85-19	INQALAB91*2/KUKUN	–	–	–	–	–	+	-
9	CB-338	E2-131-T	+	+	+	+	+	+	+
10	S-87-18	CBRD-3/STORK X DICOCCOIDES	–	–	–	–	–	+	–
11	S-87-19	ATTILA-3//CARP/KAUZ'S'	–	–	–	–	–	+	–
12	Vee/Nac	Vee/nac	–	–	–	–	–	+	–
13	WS-85-10	PRL/2*PASTOR	+	+	+	+	+	+	+
14	S-83-4	F60314.76/MRL//CNO79/3/KA/NAC/4/STAR	–	–	–	–	–	+	–
15	M-79-6	Bow"S"/Vee"S"//1-60-3	+	+	+	+	+	+	+
16	DN-11	Attila * 2 / PBW65	–	–	–	–	–	+	–
17	MS-87-12	Hys/Drc*2/7c/3/2*Rsh/4/Zagros	+	+	+	+	+	+	+
18	MS-85-15	Ormbu/A/armo//Mahooti/3/1-66-22	–	–	–	–	–	+	–
19	Grandin[1]	Susceptible control	+	+	+	+	+	+	+
20	BR34[2]	Resistant control	–	–	–	–	–	+	–

۱. رقم کنترل مثبت (شاهد حساس) ۲. رقم کنترل منفی (شاهد مقاوم)

تولید توکسین توسط مخمر *Pichia pastoris*

ژن تولیدکنندهٔ ToxA در یک سازه به نام pRM-ToxA هم‌سانه‌سازی شد و سازهٔ مذکور برای تولید پروتئین به مخمر *P. pastoris* کلون گردید (Mehrabi, 2014). برای تولید توکسین ToxA از محیط کشت عصارهٔ مخمر- پپتون- دکستروز YPD (Yeast extract-Pepton-Dexterose) استفاده شد. ابتدا ۱۰ گرم عصارهٔ مخمر با ۲۰ گرم پپتون در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر

حل شد و محیط کشت مایع استریل گردید. سپس ۲۰۰ گرم دکستروز وزن شد و با آب مقطر استریل به حجم یک لیتر رسید و محلول تهیه‌شده (۲۰٪ دکستروز) از فیلتر ۲۵ میکرومتری عبور داده شد تا استریل شود. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول دکستروز ۲۰٪ به بطری حاوی ۹۰۰ میلی‌لیتر YPD اضافه گردید. محیط کشت مذکور به ارلن منتقل شد، قارچ مخمر *P. pastoris* حاوی سازهٔ pRM-ToxA به آن مایه‌زنی گردید و به مدت ۴ روز روی شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد در ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. بعد از سپری شدن این زمان، محتوای ارلن به فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از مرحلهٔ سانتریفیوژ، مایع رویی (حاوی محیط کشت مایع و توکسین) به تیوب دیگری منتقل شد و برای تزریق گیاهان به‌کار رفت.

نحوهٔ آزمون واکنش ژنوتیپ‌های گندم نسبت به تزریق توکسین

پس از رشد ژنوتیپ‌ها در گلخانه، تزریق به‌وسیلهٔ سرنگ ۱ میلی‌لیتری به برگ دوم گیاهچهٔ ۱۰روزه انجام گرفت. آن قسمت از برگ که پس از تزریق و وارد شدن توکسین دچار آب‌سوختگی شده بود، به‌وسیلهٔ ماژیک مشخص شد و بعد از ۴۸ ساعت ارزیابی گردید. برای اطمینان از اینکه علائم فقط در اثر تزریق توکسین بوده است، تیمار شاهدی با تزریق محیط کشت YPD و همچنین با آب مقطر استریل در نظر گرفته شد.

شناسایی ژن حساسیت *Tsn1*

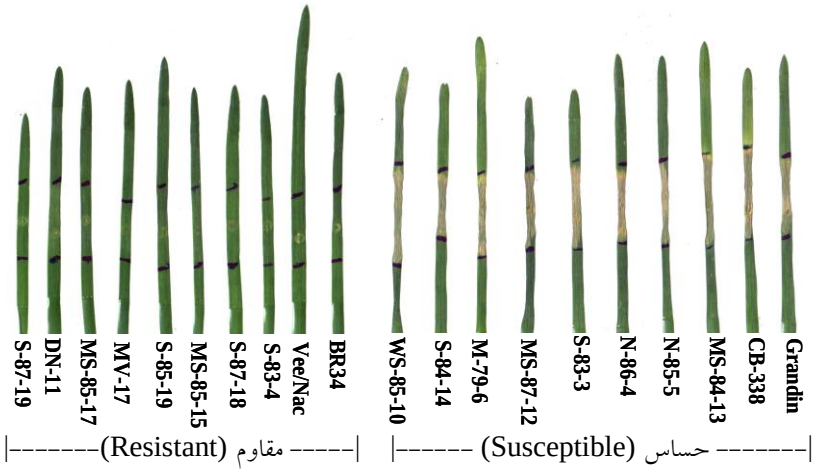
استخراج DNA از برگ‌ها با استفاده از روش معمول CTAB با اندکی تغییر انجام گرفت (Saghai-Maroof *et al.*, 1984). بدین منظور ابتدا قطعات برگی از هر ژنوتیپ گندم جدا و درون هاون چینی در ازت مایع پودر شده و بلافاصله به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (Tris-HCl pH=8 (100mM، EDTA (50mM)، NaCl (1.4M)، 2β.mercaptoethanol (2%)، CTAB (2%) منتقل شد و به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس هم‌حجم آن محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴:۱) به میکرتیوب‌ها اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه مخلوط حاصل هم زده شد و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. فاز رویی به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و برای حذف RNA از محیط، ۳ میکرولیتر RNase به هر تیوب اضافه شد و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس استات سدیم ۵ مولار (pH=5.2) به نسبت یک دهم حجم به نمونه‌ها اضافه گردید و معادل ۰/۸ حجم آن نیز ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد و تیوب‌ها به آرامی سر و ته شدند تا کلاف DNA ظاهر شود. به منظور تشکیل رسوب DNA تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و در نهایت فاز مایع دور ریخته و رسوب DNA با استفاده از اتانول ۷۰٪ شسته و در دمای اتاق خشک گردید. رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE ,(10mM) Tris-HCl pH=7] [EDTA (1mM) حل شد. کیفیت DNA استخراج شده از نظر خصوصیات کمی و کیفی شامل غلظت، شکستگی و وجود یا نبود RNA همراه مولکول‌های DNA توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

با توجه به اینکه توالی ژن *Tsn1* کاملاً مشخص است، از پرایمرهای اختصاصی برای بررسی وجود یا نبود این ژن در ژنوتیپ‌های گیاهی اقدام گردید (Faris *et al.*, 2010). در این آزمایش از پرایمرهای اختصاصی این ژن با توالی 5′-CTATTCGTAATCGTGCCTTCCG-3′ و 5′-CCTTCTCTCTCACCGCTATCTCATC-3′ استفاده گردید. همچنین برای اطمینان از کیفیت و کمیت DNA و واکنش PCR از آغازگرهای ژن 18S ریبوزومی با توالی 5′-GTGACGGGTGACGGAGAATT-3′ و 5′-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3′ به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (Faris *et al.*, 2010). آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *Tsn1* و 18S ساخت شرکت IDT کشور بلژیک با استفاده از DNA جداشده از لاین‌های گندم تحت نظر انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر (برای هر واکنش با استفاده از بافر PCR (1X)، آغازگرهای اختصاصی هر کدام با غلظت ۰/۲ میکرومولار، آنزیم تگ

پلیمراز (۱ واحد)، dNTPs (۰/۲ میلی‌مولار)، کلرید منیزیم (۲/۵ میلی‌مولار) و DNA (۱۰ نانوگرم)) انجام گردید. برنامهٔ حرارتی برای واکنش PCR به‌صورت یک چرخهٔ واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در خاتمه یک چرخهٔ بسط نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه تنظیم شد. برای الکتروفورز فرآورده‌های تکثیرشدهٔ PCR از ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد استفاده شد.

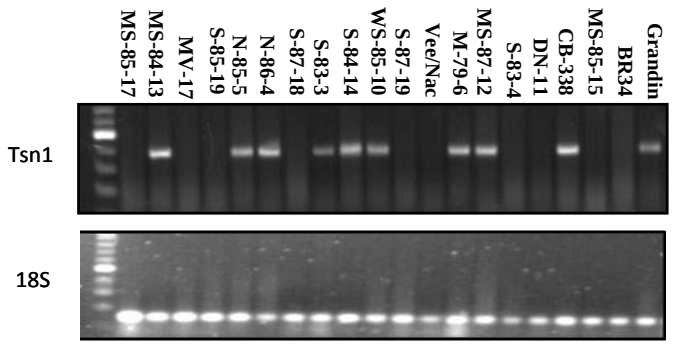
نتایج و بحث

در این تحقیق واکنش ۲۰ لاین نسبت به ToxA، ۴۸ ساعت پس از تزریق توکسین ارزیابی شد. لاین‌هایی که علائم نکروز را نشان دادند و واکنش آنها به تزریق توکسین مثبت بود، حاوی ژن حساسیت‌اند و به عنوان لاین‌های حساس به ToxA شناسایی شدند (شکل ۱). لاین‌هایی که علائم مورد نظر را نشان ندادند، به عنوان لاین‌های مقاوم به ToxA شناخته شدند (شکل ۱). از بین ژنوتیپ‌های بررسی شده، واکنش لاین‌های S-87-19، DN-11، MS-85-17، S-85-19، MV-17، MS-85-15، S-87-18، S-83-4، Vee/Nac و BR34 به تزریق توکسین در آزمایش‌های گلخانه‌ای منفی بود و به عنوان لاین‌های مقاوم به ToxA شناسایی شدند (شکل ۱). همچنین واکنش لاین‌های WS-85-10، S-84-14، M-79-6، MS-87-12، S-83-3، N-86-4، N-85-5، MS-84-13، CB-338 و Grandin به تزریق توکسین در آزمایش‌های گلخانه‌ای مثبت بود و به عنوان لاین‌های حساس به ToxA شناسایی شدند (شکل ۱).



شکل ۱. واکنش تعدادی از لاین‌های گندم ۴۸ ساعت پس از تزریق توکسین ToxA. سمت چپ لاین‌های مقاوم به همراه شاهد مقاوم (BR34) و سمت راست لاین‌های حساس به همراه شاهد حساس (Grandin) نمایش داده شده است. منطقهٔ تزریق توکسین به‌وسیلهٔ خطوط سیاه رنگ علامت زده شده است.

آزمایش‌های مولکولی نشان داد با استفاده از آغازگرهای 18S همهٔ لاین‌های تحت بررسی قادر به تکثیر به اندازهٔ ۱۵۱ bp اند. این نتیجه نشان‌دهندهٔ وجود DNA با کیفیت مناسب برای تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است (شکل ۲). همچنین آزمون PCR نشان داد که لاین‌های حساس قادر به تکثیر باند به اندازهٔ ۳۸۰ bp اند که بیانگر وجود ژن حساسیت *Tsn1* است (شکل ۲). تکثیر نشدن ژن *Tsn1* در لاین‌های مقاوم شناسایی‌شده در آزمون تزریق توکسین گیاهان بیانگر نبود ژن حساسیت *Tsn1* و در نتیجه مقاومت به توکسین تولیدشده است. در مجموع آزمون مولکولی تأییدی بر صحت آزمایش‌ها تزریق توکسین است.



شکل ۲. قطعات تکثیرشده برای تعدادی از لاین‌های گندم با استفاده از آغازگرهای ژن *Tsn1* و ژن *18s*. در قسمت بالای تصویر لاین‌های حساس قادر به تکثیر باند به اندازهٔ bp ۳۸۰ اند که بیانگر وجود ژن حساسیت *Tsn1* است. در قسمت پایین تصویر همهٔ لاین‌های تحت بررسی قادر به تکثیر به اندازهٔ bp ۱۵۱ اند که نشان‌دهندهٔ وجود DNA با کیفیت مناسب برای تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است.

پس از مقایسهٔ نتایج، مشخص شد که نتایج آزمایش تزریق ToxA و همچنین نتایج حاصل از آزمون مولکولی وجود یا نبود *Tsn1* در ژنوتیپ‌های گیاهی مطابقت و هم‌خوانی کاملی با یکدیگر دارند. بدین معنی که ژنوتیپ‌هایی که پاسخ آنها به تزریق ToxA مثبت بوده، در آزمون مولکولی همگی حاوی ژن حساسیت *Tsn1* بودند. با توجه به نتایج، تکنیک تزریق توکسین برای تشخیص سریع حضور ژن حساسیت مناسب به نظر می‌رسد.

ارزیابی منابع مقاومت به بیماری لکه‌خرمایی می‌تواند در مزرعه یا گلخانه انجام پذیرد. آلودگی در مزرعه عموماً توسط کاه و کلش آلوده، یا مایه‌زنی اسپور به‌وسیلهٔ اسپری کردن و پوشش دادن گیاهان آلوده شده برای تأمین رطوبت انجام می‌گیرد (Lamari & Bernier, 1989). به هرحال، ارزیابی منابع مقاومت در مزرعه به دلیل وجود مشکلات در کنترل شرایط آلودگی به عنوان روش قابل اعتماد شناخته نشده است (Brule-Babel & Lamari, 1992). از جملهٔ این مشکلات می‌توان به تهیهٔ زادمایهٔ قارچ به اندازهٔ کافی، فراهم آوردن رطوبت مناسب برای استقرار بیماری، همگن نبودن آلوده‌سازی و استقرار بیماری در نقاط مختلف در یک مزرعه و کنترل نشدن آلودگی‌های طبیعی به نژادهای مختلف قارچ عامل بیماری اشاره کرد. از طرف دیگر، از آن جا که این بیماری در مزرعه همراه با بقیهٔ بیماری‌های برگی ظاهر می‌شود، ارزیابی را بعضاً با مشکل مواجه می‌کند (Gilbert & Woods, 2001; Lamari & Bernier, 1989). در مقایسه با ارزیابی مزرعه‌ای، ارزیابی در مرحلهٔ گیاهچه‌ای به‌وسیلهٔ مایه‌زنی مصنوعی در گلخانه، اجازهٔ ارزیابی در شرایط همسان را فراهم آورده است و بنابراین مشکلات کمتری دارد و از این نظر به ارزیابی مزرعه‌ای ترجیح داده می‌شود.

استفاده از روش‌های مولکولی به عنوان ابزاری دقیق، سریع و کم‌هزینه همواره مورد توجه پژوهشگران به‌نژادگر بوده است. اصلاح‌کنندگان گندم علاقه‌مند به استفاده از ژن‌های مقاومت در برنامه‌های اصلاحی‌اند و تاکنون برای تعداد زیادی از ژن‌های مقاومت نشانگرهای مناسب شناسایی و در برنامه‌های به‌نژادی به‌کار گرفته شده است (Yu *et al.*, 2001). در به‌کارگیری ژن‌های مقاومت، مدل کلاسیک ژن برای ژن که توسط فلور در سال ۱۹۴۲ پیشنهاد شد، اساس به‌کارگیری بوده و بنابراین ژنوتیپ‌هایی که حاوی ژن یا ژن‌های مذکور باشند، در برنامه‌های به‌نژادی انتخاب می‌گردند. اما در مورد این بیماری لاماری (Lamari *et al.*, 2003) فرضیهٔ پاتوسیستم گندم- *P.tritici-repentis* را ارائه داد. در مدل توکسینی ژن برای ژن، برهم‌کنش بین گیاه میزبان و بیمارگر باعث حساسیت می‌گردد که این حساسیت ناشی از برهم‌کنش توکسین تولیدشده توسط بیمارگر و گیرندهٔ توکسین در میزبان در سطح مولکولی است که از این لحاظ مدل توکسینی ژن برای ژن عکس مدل کلاسیک ژن برای ژن است. در مدل کلاسیک ژن برای ژن برهم‌کنش ژن مقاومت در میزبان و ژن غیربیماری‌زا در بیمارگر باعث واکنش

مقاومت می‌گردد؛ درحالی‌که مقاومت در پاتوسیستم گندم- *P. tritici-repentis* به دلیل نبود ژن حساسیت یا ژن تولیدکنندهٔ توکسین است (Anderson *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2008). اخیراً ژن حساسیت *Tsn1* کلون شده است (Faris *et al.*, 2010). این ژن دارای ۸ اگزون بوده و اندازهٔ آن ۱۰۵۸۱ bp است. منطقهٔ کدکنندهٔ پروتئین (ORF) آن حاوی ۴۴۷۳ bp بوده که پروتئینی به طول ۱۴۹۰ اسید آمینه را کد می‌کند (Faris *et al.*, 2010). ToxA نیز اولین توکسین قارچی بود که شناسایی و جداسازی شد (Ballance *et al.*, 1989). این پروتئین یک پروتئین با وزن مولکولی پایین در حدود ۱۳/۲ KDa است. پروتئین حاصل قادر است بعد از تزریق (Infiltration) روی ارقام حاوی ژن حساسیت *Tsn1* به‌سرعت ظرف ۴۸ ساعت نکروز تولید کند. در این زمینه Gamba & Lamari (1998) و Effertz *et al.* (2002) معتقدند که توکسین‌های مذکور یا عصارهٔ توکسینی کشت قارچ (culture filtrate) می‌توانند برای ارزیابی و شناسایی ارقام مقاوم به جای استفاده از مایه‌زنی با اسپور به‌کار روند (Singh & Hughes, 2006). سودمندی استفاده از توکسین‌ها یا عصارهٔ توکسینی کشت قارچ شایان توجه بوده و علاوه بر اینکه زمان کوتاهی برای ارزیابی مورد نیاز است، هزینهٔ بسیار اندکی دارد. علاوه بر این، پاسخ به تزریق توکسین قارچ شفاف‌تر است و ارقام حساس و غیرحساس به‌راحتی تمایزپذیرند و نیاز به تجربهٔ زیاد گلخانه‌ای ندارند. سادگی انجام کار همراه با تأثیر بسیار کم آزمایش از شرایط محیطی از مزایای دیگر این روش است. به دلایل اشاره‌شده، ژن تولیدکنندهٔ ToxA در یک سازه به نام pRM-ToxA هم‌سانه‌سازی و سازهٔ مذکور برای تولید پروتیین به مخمر *P. pastoris* کلون شد (Mehrabi, 2014). پروتئین حاصل قادر است بعد از تزریق (Infiltration) روی ارقام حاوی ژن حساسیت *Tsn1* به‌سرعت ظرف ۴۸ ساعت نکروز تولید کند. ژنوتیپ‌هایی که بعد از تزریق ToxA نکروز دادند حاوی ژن حساسیت *Tsn1* بودند و به عنوان ژنوتیپ حساس شناخته شدند و ژنوتیپ‌هایی که با تزریق ToxA تولید نکروز نکرده بودند، به عنوان ژنوتیپ مقاوم نسبت به جدایه‌های تولیدکنندهٔ ToxA شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری کلی

روش تزریق توکسین که برای اولین بار در ایران انجام گرفت، به عنوان یک روش آسان، سریع و یک تکنیک ساده برای آزمایش اولیه و غربال ژرم‌پلاسم گندم و شناسایی ارقام حساس و مقاوم است، به‌طوری که می‌توان طی مدت زمان کوتاهی تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها را بررسی کرد. از این روش می‌توان برای انتخاب منفی (Negative selection) ژنوتیپ‌ها استفاده کرد تا ارقام حساس از گردونهٔ برنامهٔ به‌نژادی برای مقاومت به این بیماری حذف شوند و تنها ارقام مقاوم به توکسین برای ارزیابی‌های دقیق‌تر و غربال‌گری‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای استفاده گردد.

سپاسگزاری

از مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر به خاطر فراهم آوردن امکانات انجام تحقیق حاضر تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Anderson, J. A., Effertz, R. J., Faris, J. D., Francl, L. J., Meinhardt, S. W. & Gill, B. S. (1999). Genetic analysis of sensitivity to *a Pyrenophora tritici-repentis* necrosis-inducing toxin in durum and common wheat. *Phytopathology*, 89, 293-297.
2. Balance, G. M., Lamari, L. & Bernier, C. C. (1989). Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 35, 203-213.
3. Brule-Babel, A. L. & Lamari, L. (1992). Evaluation of field screening techniques for tan spot resistance in spring wheat. In: Proceedings of the 2nd International Tan Spot Workshop, 25-26 Jun., North Dakota State University, Fargo, USA, p. 39-43.
4. Chu, C. G., Friesen, T. L, Faris, J. D. & Xu, S. S. (2008). Evaluation of seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in tetraploid wheat. *Crop Science*, 48, 1107-1116.
5. Ciuffetti, L. M., Tuori, R. P. & Gaventa, J. M. 1997. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. *Plant Cell*, 9, 135-144.

6. Ciuffetti, L. M. & Tuori, R. P. (1999). Advances in the characterization of the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *Phytopathology*, 89, 444-449.
7. De Wolf, E. D., Effertz, R. J., Ali, S. & Francl, L. J. (1998). Vistas of tan spot research. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20, 349-370.
8. Duveiller, E., Kandel, Y. R., Sharma, R. C. & Shrestha, S. M. (2005). Epidemiology of foliar blights (spot blotch and tan spot) of wheat in the plains bordering the Himalayas. *Phytopathology*, 95, 248-256.
9. Effertz, R. J., Meinhardt, S. W., Anderson, J. A., Jordahl, J. G. & Francl, L. J. (2002). Identification of a chlorosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* and the chromosomal location of an insensitivity locus in wheat. *Phytopathology*, 92, 527-533.
10. Faris, J. D., Zhang, Z. C., Lu., H. J., Lu., S. W. & Reddy, L. (2010). A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 13544-13549.
11. Gamba, F. M. & Lamari, L. (1998). Mendelian inheritance of resistance to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) in selected genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20, 408-414.
12. Gilbert, J. & Woods, S. M. (2001). Leaf spot diseases of spring wheat in southern Manitoba farm fields under conventional and conservation tillage. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 81, 551-559.
13. Lamari, L. & Bernier, C. C. (1991). Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology*, 81, 1092-5.
14. Lamari, L. & Bernier, C. C. (1989). Virulence of isolates *of Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of differential host reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11, 284-290.
15. Lamari, L. & Strelkov, S. E. (2010). The wheat/*Pyrenophora tritici-repentis* interaction: progress towards an understanding of tan spot disease. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32, 4-10.
16. Lamari, L., Strelkov, S. E., Yahyaoui, A., Orabi, J. & Smith, R. B. (2003). The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. *Phytopathology*, 93, 391-396.
17. Mehrabi, R. (2014). A gateway construction system to produce ToxA protein in *Pichia pastoris. Submitted.*
18. Oliver, R. E., Cai, X., Wang, R. C., Xu, S. S. & Friesen, T. L. (2008). Resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in wheat-alien species derivatives. *Plant Disease*, 92, 150-157.
19. Pfender, W. F. & Wootke, S. L. (1987). Production of pseudothecia and ascospores by *Pyrenophora tritici-repentis* in response to macronutrient concentrations. *Phytopathology*, 77, 1213-1216.
20. Postnifova, E. N. & Khasanov, B. A. (1998). Tan spot in central Asia. In: Duveiller, E., Dubin, H. J., Reeves, J. y Mc Nab, A. (Ed.), Heminthosporum blights of wheat: spot blotch and tan spot. (pp. 107-113). CIMMYT.
21. Rajabpour, M., Mehrabi, R., Torabi, M., Ebrahimi, A. (2014). Distribution and frequency to toxin producing genes (*ToxA* and *ToxB*) in populations of *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of wheat tan spot in North of Iran. *Seed and Plant Improvement Journal*, 30(1), 73-83. (in Farsi)
22. Raymond, P. J., Bockus, W. W. & Norman, B. L. (1985). Tan spot of winter-wheat - procedures to determine host response. *Phytopathology*, 75, 686-90.
23. Rees, R. G. & Platz, G. J. (1990). Sources of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in bread wheats. *Euphytica*, 45, 59-69.
24. Saghai-Maroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. & Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 8014-8018.
25. Shabeer, A. & Bockus, W. W. (1988). Tan spot effects on yield and yield components relative to growth stage in winter wheat. *Plant Disease*, 72, 599-602.
26. Singh, P. K., Mergoum, M., Ali, S., Adhikari, T. B. & Elias, E. M. (2006). Evaluation of elite wheat germplasm for resistance to tan spot. *Plant Disease*, 90, 1320-1325.
27. Singh, P. K. & Hughes, G. R. (2006). Inheritance of insensitivity to culture filtrate of *Pyrenophora tritici-repentis*, race 2, in wheat. *Plant Breeding*, 125, 206-210.
28. Singh, P. K., Mergoum, M., Ali, S., Adhikari, T. B. & Hughes, G. R. (2008). Genetic analysis of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* races 1 and 5 in tetraploid and hexaploid wheat. *Phytopathology*, 98, 702-708.
29. Stock, W. S., Brule-Babel, A. L. & Penner, G. A. (1996). A gene for resistance to a necrosis-inducing isolate of *Pyrenophora tritici-repentis* located on 5BL *of Triticum aestivum* cv. Chinese Spring. *Genome*, 39, 598-604.
30. Xu, S. S., Friesen, T. L., Mujeeb-Kazi, A. (2004). Seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in synthetic hexaploid wheats. *Crop Science*, 44, 2238-2245.
31. Yu, Z., Yang, X.J., Yang, J.L., Jeger, M.J. & Brown, J.K.M. (2001). Assessment of partial resistance to powdery mildew in Chinese wheat varieties. *Plant Breeding*, 120, 279-284.