مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

مطالعه نقش ژن‌های *PR2* و *PAL* در مقاومت گیاه برنج به باکتری *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae*

امیر مسعود حیدری نژاد*[1]، ولی اله بابایی زاد[2]، حشمت اله رحیمیان[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه گیاهپزشکی
[2]استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه گیاهپزشکی
[3]استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه گیاهپزشکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۵/۲٦

چکیده

بیماری‌های گیاهی یکی از محدودیت‌های بزرگ در تولید محصولات کشاورزی به شمار می‌روند. نواری قهوه‌ای باکتریایی برنج با عامل *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* از جمله بیماری‌های برنج است که در خزانه روی برگ و غلاف گیاهچه‌ها نوارهای آبسوخته و قهوه‌ای ایجاد می‌کند. گیاهان همواره برای مقابله با آفات و بیمارگرها مکانیسم‌های دفاعی مختلفی کسب کرده‌اند. در این میان ژن‌های مقاومت گیاه برنج (R genes)، از جمله پروتئین‌های در ارتباط با بیماری‌زایی نقش مهمی در تعامل برنج با عوامل بیماری‌زا دارند. هدف از این مطالعه بررسی نقش ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی *PR2* و *PAL* در دو رقم برنج طارم محلی و ساحل در طی تیمار با جدایه بیماری‌زای باکتری عامل نواری قهوه‌ای با استفاده از تکنیک Quantitative Real-time PCR است. نمونه برداری از برگ‌های تلقیح شده با سوسپانسیون باکتری در بازه‌های زمانی مختلف صورت گرفت. از نمونه‌ها RNA کل استخراج و DNA مکمل ساخته شد. بیان ژن‌های هدف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آماری حاصل از این پژوهش نشان داد که بیان ژن‌های *PR2* و *PAL* در رقم مقاوم ساحل نسبت به رقم حساس طارم محلی پس از مایه زنی به شکل معنی داری افزایش یافت. افزایش نرخ بیان دو ژن مورد بررسی، حاکی از نقش این دو ژن در مقاومت گیاه برنج به باکتری عامل بیماری نواری قهوه‌ای می‌باشد.

واژه های کلیدی: RNA، *برنج، بیان ژن، مقاومت، Real-Time PCR*.

* نویسنده مسئول: **امیر مسعود حیدری نژاد** تلفن: ۰۹۱۳٦۰۷۸۰۸۸ Email: amir.masoud_90@yahoo.com

مقدمه

برنج (*Oryza sativa L.*) از جنس *Oryza* متعلق به قبیله *Oryzeae* از خانواده *Poaceae* می باشد (Van Nguyen and Ferrero, 2004). از نظر مورفولوژیکی برنج گیاهی است علفی، یک ساله، ایستاده، دارای ریشه افشان، سطحی، قوی و به رنگ سفید می‌باشد. برنج غذای اصلی حدود ۲/۵ میلیارد نفر از جمعیت جهان می‌باشد که حدود ۲۰ درصد از انرژی مورد نیاز روزانه و پروتئین ۱۵ درصد از مردم دنیا را تامین می کند (Ghamar *et al*., 2013). بر اساس گزارش سازمان خوار و بار کشاورزی (FAO) میزان سطح زیرکشت برنج در جهان در سال ۲۰۱۲، ۱۹۳/۷ میلیون هکتار، یعنی ۳۰ میلیون هکتار بیش از کل مساحت کشور ایران می‌باشد.

بیماری نواری قهوه‌ای باکتریایی[1] برنج که نواری شدن باکتریایی هم نامیده می‌شود، در خزانه‌های تالابی و زمین‌های مرتفع، همچنین در جعبه‌های نشاء نیز رخ می دهد. علائم نواری قهوه‌ای باکتریایی توسط باکتری *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ایجاد و توسط بذر منتقل می‌شود. علائم شامل نوارهای آبسوخته روی برگ‌ها و غلاف‌های برگ است که در ادامه به رنگ قهوه‌ای در می‌آید. روی برگ‌ها نوارها در بین رگبرگ‌ها یا در طول رگبرگ اصلی یا در حاشیه برگ‌ها تشکیل می‌شوند(Sharifnabi, 2010). اندازه نوارها یا لکه‌ها تا 1mm × 1cm است، اما این ها ممکن است به هم متصل شوند و لکه‌های پهن‌تر و طویل‌تری تشکیل دهند. عامل بیماری همچنین می‌تواند به برگ‌های جوان و باز شده حمله کند و باعث پوسیدگی آن‌ها شود، که این ممکن است منجر به توقف رشد یا مرگ گیاهچه شود.

تمام گیاهان دارای سازوکارهای دفاعی هستند و مقاومت به بیماری استثنا نیست، بلکه یک قاعده است. بیمارگرهای باکتریایی در برخی از گیاهان، تحت شرایط خاص ایجاد بیماری می‌کنند. روش‌های جدید زیست شناسی مولکولی سعی در شناخت سازوکارهایی دارند که همکنش بیمارگر-گیاه را کنترل می‌کنند. بسیاری از همکنش‌های گیاه- باکتری اختصاصی عمل می‌کنند. این اختصاصی بودن به تشخیص مولکول های دو میکروارگانیسم در سطح سلولی بستگی دارد. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد همکنش باکتری-گیاه شامل فرایندهای تشخیص مولکولی بین گیاه و بیمارگر باکتریایی است. به عنوان مثال، ژن مقاومت *Pto* در گوجه فرنگی که باعث مقاومت گیاه در برابر باکتری *Psudomonas syringae* pv. *Syringae* می‌شود، یک پروتئین کیناز سیتوپلاسمی را رمزگذاری می‌کند که به نظر می‌رسد به طور مستقیم با پروتئین avr Pto که توسط باکتری مستقیما وارد سیتوپلاسم گیاه می‌گردد، واکنش می‌کند (Agrios, 2005). تبادل ممتد اطلاعات بین گیاه و باکتری مشخص می‌کند که آیا همکنش منجر به

[1]- Bacterial brown stripe

بیماری می‌شود یا در ایجاد مقاومت گیاه نقش دارد. گیاهان بیمارگر را تشخیص داده و ترکیبات شیمیایی دفاعی تولید می‌کنند. بیمارگرها نیز گیاهان میزبان را شناسایی کرده و سازوکارهایی را به کار می‌برند تا بر سازوکارهای دفاعی میزبان غلبه کنند. در طول همکنش مولوکول‌های مشتق شده از گیاه به عنوان سیگنال‌هایی عمل کرده که بیان ژن‌های باکتری را القا می‌کنند. محصولات این ژن‌ها نیز تغییراتی در بیان ژن‌های گیاهی ایجاد می‌کنند که در نهایت باعث تغییرات متابولیکی در گیاهان می‌شود. این نوع همکنش صرف نظر از سازگار یا ناسازگار بودن در اکثر همکنش‌های گیاه و باکتری مشاهده می‌شود (Vidhyasekaran, 2002). واکنش‌های گیاهان به حمله بیمارگرها پیچیده است و شامل تحریک ژن‌های بسیاری که پروتئین‌های متنوعی را کد می‌کنند، می‌باشند (Jwa *et al.*, 2006).

مقاومت القاء شده سرتاسری [1](SAR) و مقاومت سیستمیک القایی[2](ISR) مکانیسم‌های دفاعی گیاه هستند که به دنبال تحریک گیاه با بیمارگر یا عوامل القایی دیگر، در گیاه القا می‌شوند. این پاسخ دفاعی به صورت موضعی در محلی که مورد حمله پاتوژن قرار گرفته است و همچنین به صورت سیستمیک در بخش‌های دورتر غیر آلوده گیاهی که مورد حمله پاتوژن قرار گرفته است القا می شود (Zhang and Klessig, 1997). فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، ترانس سینامیک اسید[3] را ابتدا به ۲-هیدروکسی سینامیک اسید[4] و یا بنزوئیک اسید[5] و در نهایت به سالیسیلیک اسید تبدیل می‌کند. سالیسیلیک اسید باعث فعال شدن مسیر SAR می‌شود (Wildermuth *et al.*, 2001). ژن‌های *PR1* و *PR2* به طور عمده از مسیر SAR فعال می‌شوند (Agrios, 2005). در کنار دفاع ساختمانی، SAR در مقاومت گیاهان شرکت می‌کند و یک امتیاز انتخابی را برای بقا تدارک می‌بیند (Sticher *et al.*, 1997). این پاسخ دفاعی القا شونده شامل تغییرات سیتولوژیکی و بیوشیمیایی می‌باشد و به تولید سیگنال که از قسمت‌های دیگر گیاه منتقل می‌شود بستگی دارد. زمان مورد نیاز برای ایجاد SAR به گیاه و نوع ارگانیسم القا کننده بستگی دارد. میزان حفاظت نیز به ارگانیسم مورد استفاده برای آلودگی اولیه و به ویژه روی اندازه نکروز تولید شده بستگی دارد. فرایند SAR هم در تک لپه ای‌ها و هم دو لپه ای-ها القا می‌شود. شروع SAR اغلب به بیان پروتئین‌های [6](PR) منتهی می‌شود.

مقاومت القای سراسری (ISR) نوعی مقاومت است که در اثر سودوموناس ، رایزوباکترهای غیر بیماری زا، و همزیستی گیاهان با قارچ های همزیست نظیر *Piriformospora indica* القا می‌شود و حفاظت سراسری علیه قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها ایجاد می‌کند (Vleesschauwer *et al.*, 2008). در اکثر موارد

[1]- systemic acquired resistance
[2]- induced systemic resistance
[3]- Trans-cinnamic acid
[4]- 2- hydroxycinnamic acid
[5]- Benzoic acid
[6] - pathogenesis-related protein

پدیده ISR مستقل از تولید و تجمع سالیسیلیک اسید و نیازمند پاسخ‌های دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید و اتیلن است (Vleesschauwer *et al*., 2008). پروتئین لیپوکسی‌ژناز[1]، لینولئیک اسید[2] را به جاسمونیک اسید تبدیل می‌کند (Vick and Zimmerman, 1983)، و به نوعی در مسیر مقاومت سیستمیک القایی (ISR) نقش دارد. مکانیسم دقیق ISR کاملا مشخص نیست.

کلمه (PR) Pathogenesis related proteins شامل مجموعه پروتئین‌های القا شده توسط میکروب‌هاست که عموما به طور ترکیبی در اغلب آلودگی‌ها افزایش می‌یابند. این پروتئین‌ها ابتدا در واکنش فوق حساسیت برگ‌های توتون به *TMV* به وسیله دو گروه مستقل شناسایی و در ابتدا b-protein نامیده شدند (Gianinazzi *et al*, 1970; Vanloon, 1985). تصور می‌شد که این پروتیئن‌ها تنها در مقاومت گیاهان در واکنش فوق حساسیت به پاتوژن‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی معمول بیان می‌شوند. اما بعدها مشخص شد که این پروتئین‌ها تنها در مقاومت القا نمی‌شوند و حتی در تعامل سازگار گیاه و پاتوژن و حتی در مقابل فاکتورهای غیر زنده نیز بیان می‌شوند (Van Loon, 1985). می‌توان گفت که در گیاهان مقاوم سریع‌تر و به میزان بیشتر تولید می‌شوند. از زمان کشف اولین PRها در سال ۱۹۷۰ در گیاهان توتون آلوده به *TMV* تاکنون ۱۷ خانواده از آنها بر اساس توالی آمینواسیدی، روابط سرولوژیکی و فعالیت های بیولوژیکی و آنزیمی شناخته شده است (Van Loon *et al*, 2006).

این مطالعه با هدف بررسی نقش ژن‌های دخیل در القای مقاومت *PR2*[3] و *PAL*[4] در تعامل دو رقم حساس (طارم محلی) و مقاوم (ساحل) گیاه برنج با باکتری *A. Avenae* subsp. *Avenae* انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در تولید گیاهان برنج تراریخته مقاوم به عامل بیماری نوار قهوه‌ای برنج سودمند باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری عامل بیماری، جدا شده از گیاهچه‌های برنج مشکوک به علائم نواری قهوه ای از شالیزارهای شهرستان نکا، مورد مطالعه در آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دریافت شد.

بذور لاین‌های برنج مورد نظر از معاونت تحقیقات برنج کشور (مازندران، آمل) جمع‌آوری و جهت انجام پژوهش به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت استریل نمودن بذور از محلول کربوکسین – تیرام به نسبت ۲ در هزار استفاده شد (Hashemi *et al*, 2013). بذور درون پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب پخش و به اتاقک کشت با رطوبت نسبی نود درصد و دمای بیست و هشت درجه سلسیوس منتقل شدند. پنج روز بعد بذرها به خوبی جوانه زده و برای کاشت آماده شدند. حداکثر بیست عدد بذر درون هر گلدان حاوی خاک استریل کاشته شد. گیاهچه‌ها

[1] Lipoxygenase
[2] linoleic acid
[3] - β-glucanases
[4] - pehnylalanineammonia-lyase

در شرایط گلخانه با محدوده دمایی ۳۵-۳۰ درجه سلسیوس و دوره تناوبی ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در شرایط غرقابی نگهداری شدند (Hashemi *et al*, 2013).

در این تحقیق پس از انجام آزمون غربالگری و بررسی سطوح مقاومت، دو رقم طارم محلی و ساحل به عنوان ارقام انتخابی برای بررسی‌های مولکولی استفاده شد. سوسپانسیونی از باکتری تازه کشت شده با غلظت $۱۰^{۷}$ سلول در هر میلی لیتر، محاسبه شده با دستگاه اسپکتوفتومتر (در طول موج ٦۰۰ نانومتر)، تهیه و به گیاهچه ها تزریق شد. در هر گلدان ٤ گیاهچه توسط سرنگ استریل حاوی سوسپانسیون باکتری تلقیح و روی گلدان‌ها با نایلون مرطوب پوشیده شد. گیاهان در شرایط گلخانه نگهداری شدند. نمونه برداری از گیاهان تیمار شده در زمان های صفر (شاهد)، ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت پس از انجام آلودگی شد.

استخراج RNA از نمونه‌های نگهداری شده در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس با استفاده از بافر RNX-Plus (شرکت سیناژن) طبق دستور العمل مربوطه انجام شد. به منظور زدودن DNA ژنومی از نمونه های RNA از کیت DNase I, RNase-free ساخت شرکت Fermentas طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

نمونه‌ها با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE (40 mM Tris acetate 1 mM EDTA 1X) بررسی شدند. پنج میکرولیتر از RNA استخراج شده به همراه دو میکرولیتر رنگ (برم فنل بلو۲۵ میلی گرم، زایلن سیانول اف اف ۲۵ میلی گرم، گلیسرول ۳,۳ میلی لیتر و آب دوبار تقطیر ٦,۷ میلی لیتر) به چاهک های ژل انتقال داده و الکتروفورز در بافر TBE در ولتاژ ۸۰ به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. ژل در اتیدیوم بروماید (./5 µg /mL) به مدت پانزده دقیقه رنگ آمیزی و با نور UV دستگاه ژل خوان کداک (GEL LOGIC 200) از آن عکس‌برداری شد.

سنتز cDNA با استفاده از AccuPowerR CycleScript RT PreMix (dN6) kit و براساس دستورالعمل، از محتوی RNA کل استخراج شده ساخته شد. به منظور تایید صحت عملکرد cDNA سنتز شده، تکثیر قطعه انتخابی با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت اکتین و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) انجام شد. ارزیابی محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE صورت گرفت.

بررسی سطح بیان ژن های مورد مطالعه شامل *PR2* و *PAL* در گیاهان شاهد و مایه‌زنی شده در زمان‌های مختلف با استفاده از تکنیک QPCR و دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR شرکت Applied biosystems انجام شد. واکنش با استفاده از شناساگر SYBR green در حجم نهایی ۱۵ مایکرولیتر (جدول ۱) با آغازگرهای طراحی شده (جدول ۲) صورت گرفت. از آغازگر Actin به عنوان ژن خانه داری به منظور مقایسه سطح بیان ژن‌های هدف استفاده شد. واکنش زنجیر پلیمراز شامل واسرشت سازی اولیه ۱۰ دقیقه، ۹٤ درجه سلسیوس، مرحله

واسرشت سازی ۱۵ ثانیه، ۹٤ درجه سلسیوس و مرحله اتصال و گسترش ۱ دقیقه، ٦۰ درجه سلسیوس (طبق دستورالعمل شرکت سازنده) در٤۰ مرتبه تکرار بود. تمام واکنش‌های PCR در ۲ تکرار انجام گرفت.

جدول ۱- غلظت و مقادیر حجمی مواد بکار رفته در واکنش **Real time PCR**.

Table 1-Concentration and the volume of materials used in the Real time PCR reaction

اجزای واکنش Materials	حجم Volume
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	7.5 µl
Forward primer (10pmol/µl)	0.5 µl
Reverse primer (10pmol/µl)	0.5 µl
Template cDNA(≤500ng)	2 µl
Water, nuclease-free	4.5 µl
Total volume	15 µl

جدول ۲- نام ژن‌ها و توالی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه.

Table 2- Genes name and Primer pairs used in the present study.

نام ژن Genes name	توالی آغازگر Sequences	شماره دسترسی Accession number	طول قطعه Length/bp
Actin	F: 5'-GAGTATGATGAGTCGGGTCCAG -3' R: 5'-ACACCAACAATCCCAAACAGAG -3'	XM_006662696	143
PR2	F: 5'-AAGATTGTTCTGAGAAGAGATCGATCGA-3' R: 5'-GCTACGCGAAAATAGGTCTGGTAAACTT-3'	AK070677	200
PAL	F: 5'-CCGATGCGAGTTGTAACAGA -3' R: 5'-TGGTCAGAGACGACAGATCG -3'	X16099	168

آنالیز نتایج حاصل از واکنش Real Time-PCR با فرمول $۲^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد (Yuan *et al*, 2006).

برای زمان مورد) → ژن مرجع Ct – [1] ژن هدف Ct= Δ CT (ارزیابی و نمونه کنترل)

نمونه کنترل Δ Ct – زمان مورد ارزیابی Δ Ct= ΔΔ CT

ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft excel از مجموعه نرم افزارهای Microsoft office و تحلیل آماری داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS statistics 22 انجام شد.

نتایج

در این بررسی پس از انجام تست های اولیه سطوح حساسیت و بررسی توسعه باکتری در گیاه در بین ارقام موجود، دو رقم طارم محلی و ساحل به ترتیب به عنوان ارقام حساس و مقاوم برگزیده شدند (داده های منتشر نشده). پس از استخراج RNA از نمونه ها و ساخت cDNA، بررسی سطح بیان ژن‌های *PR2* و *PR10* در ۵ بازه زمانی مختلف، توسط تکنیک Quantitative Real Time-PCR با بهره گیری از فرمول $۲^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد.

نمونه های RNA به منظور بررسی کیفیت استخراج روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند. باندهای مربوط به قطعات rRNA به دلیل وجود نسخه‌های متعدد، روی ژل به خوبی تشکیل شد. (شکل ۱).

پس از سنتز cDNA نمونه ها به وسیله آغازگر ژن خانه‌داری[2] *Actin* به وسیله واکنش زنجیره پلیمراز تکثیر و بروی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد تایید قرار گرفت (شکل ۲).

الگوی بیان ژن *PR2* در دو رقم مورد مطالعه در طی بازه های زمانی مورد بررسی روند متفاوتی را نشان داد. بطوری که در رقم مقاوم ساحل اوج بیان ژن هدف طی بازه‌های زمانی مورد ارزیابی، در ساعت ۲٤ پس از تلقیح بیش از ٦ برابر زمان صفر بود. آزمون تی نمونه‌های مستقل (Two Independent Samples t Test) نیز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱٪ بین نرخ بیان این ژن در دو رقم را در این بازه زمانی نشان داد(P) value <0.01. در ادامه، در ساعت‌های بعدی پس از تلقیح بیان ژن مذکور روند نزولی را طی کرد. نرخ بیان این ژن در رقم ساحل در ساعات ٤۸ تا ۹٦ پس از تلقیح به ترتیب ۳/۲، ۲/۷ و ۱/۷ برابر نسبت به نمونه شاهد بود. در حالی که بیشنه بیان این ژن در رقم طارم محلی در ساعت ۹٦ پس از تلقیح کمتر از ٦ برابر زمان صفر بود. نرخ بیان این ژن در رقم طارم محلی در ساعت ۲٤ تا ۷۲ پس از تلقیح به ترتیب ۱/۲ ، ۲/۳، و ۳/٤ برابر نسبت به نمونه شاهد بود (شکل ۳).

الگوی بیان ژن *PAL* در دو رقم طارم محلی و ساحل روند مشابه ای را دنبال کرد. به طوری که بیشینه بیان ژن *PAL* در هر دو رقم مورد

[1] Threshold cycle

[2] Housekeeping gene

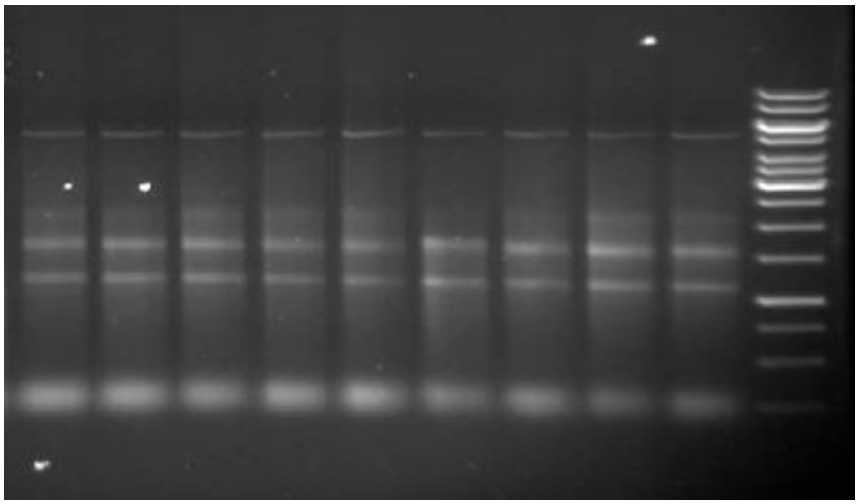
مطالعه تا ساعت ۹٦ پس از تلفیح باکتری *A.avenae* subsp. *avenae* به گیاهچه‌ها سیر صعودی را دنبال کرد. در این ساعت نرخ بیان ژن *PAL* در رقم طارم محلی و ساحل به ترتیب ۲/۷ و ۸/۵ برابر نسبت به زمان صفر (قبل از تلقیح) بود. در تمام ساعت مورد ارزیابی نرخ بیان ژن *PAL* در رقم ساحل به طور معنی داری بیشتر از رقم طارم محلی بود (P value <0.05 , P value <0.01). سطح بیان ژن *PAL* در رقم ساحل در ساعات ۲٤ تا ۷۲ پس از آلودگی به ترتیب ۳/۱، ٤/٦ و ۷ برابر نسبت به نمونه شاهد بود. سطح بیان این ژن در رقم محلی طارم در همین بازه زمانی به ترتیب ۱/٤، ۱/۹ و ۲/۳ برابر نسبت به نمونه شاهد بود (شکل٤).

بحث

نقش پروتئین‌های PR2 در مقاومت گیاهان

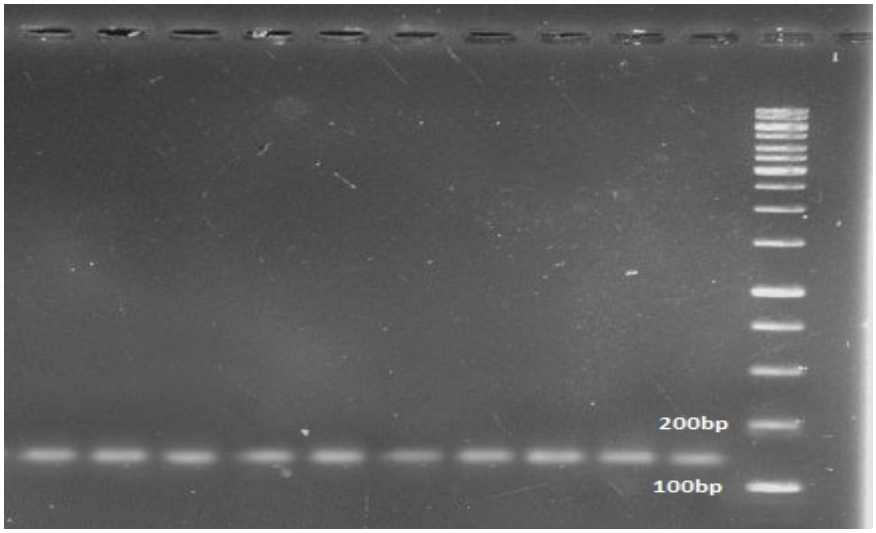
پروتئین‌های PR-2 (β-glucanases) فعالیت بتا-۱و۳-گلوکانازی نشان می‌دهند. بتا-۱و۳-گلوکاناز[1] (گلوکان اندو-۱و۳ بتا-گلوکوزیداز) باعث شکستن واحدهای ۱و۳-بتا – دی-گلوکوزیدی[2] در بتا-۱و۳-گلوکان‌ها می‌شود. این ترکیب در بافت‌های گیاهی وجود دارد و در تشکیل کالوز و در زوائد مویی ساقه و برگ، تارهای کشنده ریشه، دانه گرده، تخمک‌ها و سلول‌های پارانشیمی زخم نقش دارد (Vidhyasekaran, 2002). وزن مولکولی آن‌ها در حدود ۳۳ تا ۳٦ کیلو دالتون است (Van Loon *et al*, 2006). اولین نقشی که β-glucanases در تعامل باکتری-گیاه ایفا می‌کند مربوط به متلاشی و تجزیه نمودن دیواره سلولی بیمارگر می‌باشد که این خود به مرگ بیمارگر می‌انجامد. پخش شدن قطعات دیواره سلولی حاصل از متلاشی شدن باکتری به عنوان الیسیتور عمل نموده و سیستم دفاعی گیاه را فعال می‌نماید (Vidhyasekaran, 2002). در تحقیقات، خاصیت سینرژیستی پروتئین‌های این گروه به همراه گروه PR3 اثبات شده است (Stintzi, 1993). در تحقیقات تکمیلی نشان داده شد که در بعضی موارد این پروتئین در آزاد کردن مولکول‌های الیسیتور گیاهی از جمله ترکیبات فنولی، فیتوالکسین‌ها و سایر PR ها نقش دارد و افزایش مقاومت به علت عمل مستقیم این پروتئین نمی‌باشد (Vidhyasekaran, 2002). در مطالعه پیش رو، نرخ بیان ژن *PR2* در رقم حساس طارم محلی مطابق با مطالعات پیشین در ساعت‌های پس از آلودگی به طور متناوب افزایش یافته است. اما الگوی بیان این ژن در رقم مقاوم ساحل متفاوت بوده و سطح بیان آن در ساعات اولیه پس از تلقیح با باکتری *Aaa* به طور معنی داری بیشتر از رقم طارم محلی بوده است و در بازه‌های بعدی تجمع سطح رونوشت های این ژن کاهش یافت (شکل ۳).

[1] β-1,3-glucanase
[2] 1-3- beta-D-glucoside



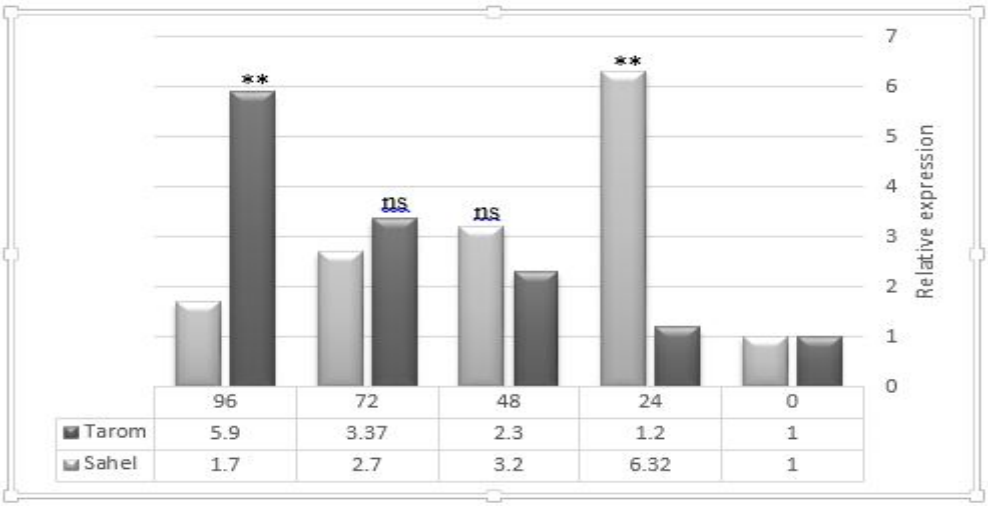
شکل ۱- بررسی کیفیت نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز 1 درصد. قطعات rRNA به خوبی از هم تفکیک شدند.

Figure 1- RNA analysis on 1% agarose gel. Different fragments of rRNA bands separated in gel.



شکل ۲- کیفیت cDNA حاصل از PCR با آغازگر Actin برای ده نمونه مورد بررسی در ژل آگارز ۱/۵ درصد. تشکیل باند مورد انتظار نشانه تکثیر قطعه هدف و کیفیت cDNA ساخته شده می باشد.

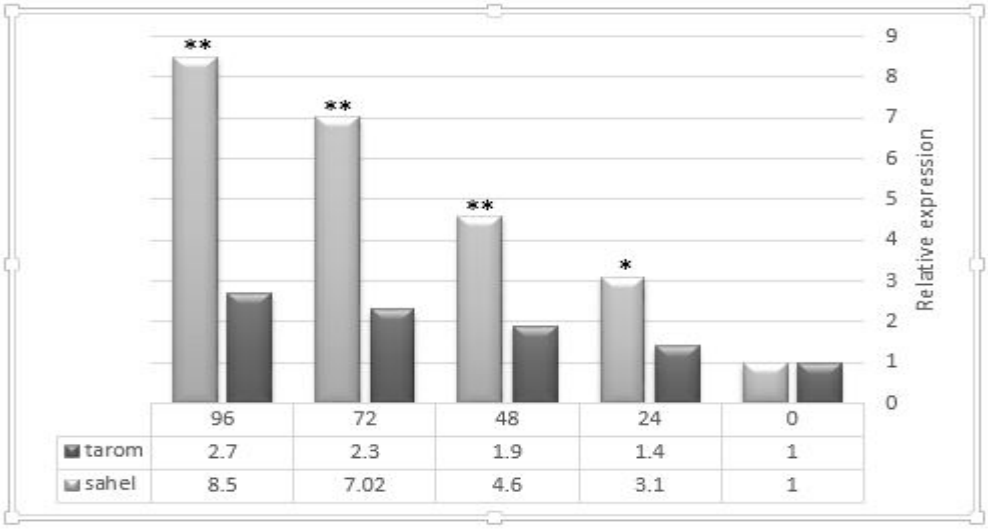
Figure 2- quality of ten synthesized cDNA samples using by Actin primer on 1.5% agarose gel. Formations of expected bands show the quality of synthesized cDNA.



شکل۳- نرخ بیان ژن *PR2* در گیاهچه‌های برنج آلوده شده به باکتری *Aaa* درپنج بازه زمانی مختلف.

ns و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد.

Figure 3- Expression rate of *PR2* gene in rice seedlings inoculated with *Aaa* at 5 different time course. (non-significant =ns, P<0.05=*).



شکل٤- نرخ بیان ژن *PAL* در گیاهچه‌های برنج آلوده شده به باکتری *Aaa* درپنج بازه زمانی مختلف.

*** و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.**

Figure 4- Expressionn rate of *PAL* gene in rice seedlings inoculated with *Aaa* at 5 different time cous. (P<0.01=, P<0.05=*).**

به نظر می رسد این نتایج، اهمیت بیان ژن *PR2* در ساعات ابتدایی پس از تلقیح و کارآیی آن را در مقاومت نشان می‌دهد. به خوبی روشن است القای به موقع این ژن با متلاشی نمودن دیواره سلولی باکتری در مراحل اولیه استقرار و نفوذ، در مقاومت رقم ساحل نقش بسزایی دارد. بیان بالای این ژن در برابر بیمارگرهای باکتریایی و قارچی در بررسی های گذشته نیز به اثبات رسیده است (Sharp *et al.*, 1984).

اخیرا نیز افزایش بیان این ژن را در برابر باکتری عامل بلایت برگی برنج *Xanthomonas (oryzae)* در برنج بررسی شده است (Nisha *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2012). در سال ۲۰۱۱ نیز در بررسی نقش این ژن در تعامل با شانکر مرکبات به افزایش این ژن در گیاه لیمو عمانی آلوده به شانکر پی برده شد. (Sharifi *et al.*, 2011).

نقش پروتئین‌های PAL در مقاومت گیاهان

فنیل آلانین آمونیالیاز فرایند دی آمینی شدن و تبدیل ال-فینیل آلانین به ترانس -سینامیک اسید را کاتالیز می کند. این تبدیل ، اولین مرحله مسیر فنیل پروپانوئید می باشد که پیش سازهای مواد فنولی ، لیگنین و فیتوآلکسین ها را فراهم می کند(Vidhyasekaran, 2002). مشخص شده است که افزایش مقدار mRNA ژن *PAL* مبنای افزایش فعالیت آن می باشد. عدم فعالیت ژن *فنیل آلانین آمونیالیاز* که برای سنتز سالیسیلیک اسید مورد نیاز است منجر به کاهش SAR می شود. PAL در مسیر بیوسنتز سالیسلیک اسید و دیگر ترکیبات وابسته دفاعی دخیل است و یک ترکیب کلیدی سیگنال دهی برای فعال نمودن ژن‌های وابسته دفاعی، کاتالیزکننده‌ها، پروتئین‌های رسپتور مانند و فاکتور رونویسی است. گیاهان تراریخت توتون که فعالیت PAL در آن‌ها کم می‌باشد، لیگنین کمتری در دیواره داشته و در مقایسه با گیاهان دستکاری نشده توتون ، نسبت به تهاجم بیمارگر حساس‌تر می‌باشند. بنابراین PAL نقش مهمی در مقاومت گیاه به بیماری دارد (Stotz*et al.*, 2009).

مطالعات گذشته حضور یک خانواده کوچک ژن‌های کدکننده *PAL* را در برنج نشان دادند، امروزه ۳ ژن *PAL* از برنج جداشده که *ZB8*, *GP-28*, *GP-GP-1* نامیده می‌شوند (Agrawal *et al.*, 2001). بیان ژن *OsPAL* در اثر تلقیح ایزوله ناسازگار باکتری *A.avenae* subsp. *avenae* به گیاهچه‌های برنج تا ٦ ساعت پس از آلودگی به صورت متناوب افزایش می‌یابد در صوتی که سطح بیان این ژن در اثر تلقیح ایزوله سازگاری از این باکتری (برهمکنش سازگار) تا ٦ ساعت پس از آلودگی روند تقریبا ثابتی را نشان می‌دهد. (Tanaka *et al.*, 2003). طاهری و طریقی (۲۰۰۹)، سیاری و همکاران (۲۰۱٤) نقش مثبت PAL را در تعامل گیاه برنج به قارچ *Rhizoctonia solani* را بررسی و تایید کردند. همچنین در تحقیقات اخیر نیز به افزایش

بیان ژن *PAL* در پاسخ به قارچ *Phytophthora parasitica* و زخم مکانیکی در پونسیروس پی برده شد (Bova *et al.*, 2011). نرخ بیان این ژن در آخرین بازه مورد ارزیابی در رقم مقاوم ساحل بیش از ۸ برابر در نمونه شاهد بود (شکل ٤). نتایج حاصل از این پژوهش نیز نقش ژن‌های *PAL* را در مقاومت گیاه برنج به باکتری *A.avenae* subsp. *avenae* را نشان می دهد.

نتیجه گیری

بیان ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش در رقم مقاوم ساحل نسبت به رقم طارم محلی در زمان پاسخ و همچنین سطح بیان سریع‌تر و به مقدار قابل توجهی بیشتر بود. اگرچه برخی از پروتئین‌های در ارتباط با بیماری‌زایی به طور طبیعی به مقدار اندکی در بافت‌های گیاه بیان می‌شوند، ولی افزایش بیان آن‌ها پس از عفونت با عامل بیماری‌زا و یا تنش‌های محیطی به میزان زیادی افزایش می‌یابد که خود دلیل محکمی بر نقش این پروتئین‌ها در پاسخ و مقاومت به آسیب‌هایی با منشاء زنده[1] و غیر زنده[2] می‌باشد. مهندسی ژنتیک همواره سعی بر دستیابی به گیاهانی دارد که حاوی ژن‌های مطلوب مقاومت به آفات و بیماری‌ها هستند. از آن‌جایی که استفاده از سموم شیمیایی محدودیت‌ها و خطرات خاص خود را دارد، استفاده از گیاهان تراریخت[3] کاهش هزینه، افزایش کیفیت و کمیت محصول، و کاهش صدمات وارده به منابع زیستی را به دنبال دارد. امید است نتایج حاصل این پژوهش و تحقیقات تکمیلی در شناسایی ژن‌های دخیل در مقاومت گیاهان برنج به باکتری عامل بیماری نوار قهوه‌ای، فوق بیان[4] آن‌ها در ارقام حساس و سایر گیاهان در تولید گیاهان مطلوب تراریخت موثر باشد.

[1] Biotic factors
[2] Abiotic factors
[3] Transgenic plants
[4] Overexpression

منابع

Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS, Agrawal VP (2001). Signaling molecules and blast pathogen attack activates rice *OsPR1a* and *OsPR1b* genes: a model illustrating components participating during defense/stress response. Plant Physiology 39**:** 1095-1103.

Agrios, GN. 2005. Plant pathology. 5th eds. New York: Academic Press, 922pp

Boava LP, Cristifani-Yaly M, Stuart RM, Machado MA **(**2011). Expression of defense-related genes in response to mechanical wounding and *Phytophthora parasitica* infection in Poncirus trifoliata and Citrus sunki. Physiological and Molecular Plant Pathology 76: 119-125

FAO. 2012. FAO. Statics division (2013). www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/en

Ghamar M, Siahpoosh M. R, Hassibi P (2013). Salinity tolerance assessment of rice sucrose transporter antisense lines (OsSUT1) at seedling stage (*Oryza sativa* var. TaiPai). Journal of Agricultural Biotechnology 11: 87-98. (in Persian)

Gianinazzi S, Martin C, VALLÉE J.-C (1970). Hyper-sensitivity to viral infection, temperature and soluble proteins in N. Xanthi nc Appearance of new macromolecules during suppression of viral synthesis. Compte Rendu Hebdomadaire des Seances de l'Academie des Sciences 270: 2383-2386.

Hashemi S, Babaeizad V, Tajik M. A, Rahimian H (2013). STUDYING OF SEVERAL Pathogenesis-related genes ROLE IN RICE RESISTANCE TO *Bipolaris oryzae.* Iranian Journal of Plant Pathology 49: 171-180. (in Persian)

Hou M, Xu W, Bai H, Liu Y, Li L, Liu L, Liu B, Liu G (2012). Characteristic expression of rice pathogenesis related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant cell reports 31: 895-904.

Jwa NS, Agrawal GK, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H, Rakwal R (2006). Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice selfdefense mechanisms. Plant Physiology. Biochemistry 44: 261- 273

Nisha S, Revathi K, Chandrasekaran R, Kirubakaran SA, Sathish-Narayanan S, Stout MJ, Senthil-Nathan S (2012). Effect of plant compounds on induced activities of defense-related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. Physiological and Molecular Plant Pathology 80: 1-9

Sayari M, Babaeizad V, Ghanbari MAT, Rahimian H (2014). Expression of the pathogenesis related proteins, NH-1, PAL, and lipoxygenase in the iranian Tarom and Khazar rice cultivars, in reaction to Rhizoctonia solani–the causal agent of rice sheath blight. Journal of Plant Protection Research, 54: 36-43.

Sharifi-Sirchi GR, Beheshti B, Hosseinipour A, Mansouri M **(**2011). Priming against Asiatic citrus canker and monitoring of PR genes expression during resistance induction. African Journal of Biotechnology 19: 3818-3823.

Sharifnabi B (2010). Disease of Field Crops in Iran. Isfahan University of Technology Publication Center. 440pp

Sharp JK, Valent B, Albersheim P (1984). Purification and partial characterization of a β-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean.The Journal of Biological Chemistry 259: 11312-11320.

Sticher L, Mani BM, Metraux JP (1997). Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 35: 235-70.

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie 75: 687-706.

Stotz HU, Thomson JG, Wang Y (2009). Plant defensins Defense, development and application. Plant Signaling & Behavior 4**:** 1010-1012.

Taheri P, Tarighi S (2009). A study on the effect of riboflavin as a defense activator in rice against *Rhizoctonia* diseases. Journal of Plant Protection 23: 68-80. (in Persian)

Tanaka N, Che FS, Watanabe N, Fujiwara S, Takayama S, Isogai A (2003). Flagellin from an Incompatible Strain of *Acidovorax avenae* Mediates H2O2 Generation Accompanying Hypersensitive Cell Death and Expression of *PAL*, *Cht-1*, and *PBZ1*, but Not of *LOX* in Rice. American Phytopathological Society 16: 422-428.

Van Loon LC (1985). Pathogenesis-related proteins. Plant Molecular Biology 4: 111-116.

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44: 135-62.

Van Nguyen N, Ferrero A (2004). Meeting the challenges of global rice production. Paddy and Water Environment 4: 1-9.

Vick BA, Zimmerman DC (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and biophysical research communications*, 111: 470-477.

Vidhyasekaran P (2002). Bacterial disease resistance in plants: molecular biology and biotechnological applications: Routledge. 322pp

Vleesschauwer DD, Djavaheri M, Peter AH, Bakker M, Monica H (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on Pseudobactin-mediated priming for a salicylic acidrepressible multifaceted defense response. Plant Physiology 148: 1996-2012.

Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414: 562-565.

Yuan Js, Reed A, Chen F, Stewart Jr CN (2006). Statistical analysis of real time PCR data, MBC Bioanformatic 7: 85.

Zhang S, Klessig DF (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. The Plant Cell Online 9: 809-824.

Studying *PR2* and *PAL* genes involvement in rice resistance against *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae*

Heydari-Nezhad A.M.*[1], Babaeizad V.[2], Rahimian H[3].

[1]MSc student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Department of Plant Protection.
[2]Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Department of Plant Protection.
[3]Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Department of Plant Protection.

Abstract

Plant diseases are one of the major constraints of agricultural productions. Rice bacterial brown stripe, caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* is recognized by producing water-soaked and brown stripes on leaves and sheaths of rice seedlings in nursery. Plants have several acquired defense mechanisms to deal with pests and pathogens. The rice plant resistance genes (R genes), such as pathogenesis related proteins play an important role in rice-pathogen interactions. This research aimed to study the role of *PR2* and *PAL* pathogenesis related genes in local Tarom and Sahel Rice cultivars inoculated with an incompatible strain of bacterial brown stripe using the Quantitative Real-time PCR technique. Sampling of leaves inoculated with bacterial suspensions was performed at different time courses. Total RNA extracted from samples then complementary DNA (cDNA) synthesized and target genes expression level were evaluated. The results of this study showed that the expression level of *PR2* and *PAL* genes has greatly increased in Sahel resistant cultivar in comparison to Tarom susceptible cultivar. Increased expression level of the aforesaid genes, proves the role of these genes in resistance of rice plants against bacterial brown stripe disease.

Key words*: RNA, Rice, Gene expression, Resistance, Real-Time PCR***.**

* Corresponding Author: Heydari-Nezhad A.M. Tel: 09136078088 Email: amir.masoud_90@yahoo.com