

تأثیر ماده محرک BTH بر بیان ژن PR2 و شدت بیماری آتشک در درخت به

Effect of the BTH Chemical Elicitor on Expression of the PR2 Gene and Fire blight Disease Severity in Quince

نسیم سرهنگی^۱، علی محمد شکیب^۲، منصوره کشاورزی^۳، محمدعلی ابراهیمی^۴ و
مانا احمد راجی^۵

۱ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران
۲ و ۵- به ترتیب دانشیار و کارشناس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
۳- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۸

چکیده

سرهنگی، ن.، شکیب، ع. م.، کشاورزی، م.، ابراهیمی، م. ع. و احمدراجی، م. ۱۳۹۴. تأثیر ماده محرک BTH بر بیان ژن PR2 و شدت بیماری آتشک در درخت به. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۱: ۲۶۴-۲۶۹.

استفاده از مواد محرک جهت القا ژن‌های دفاعی گیاه یکی از روش‌های مبارزه با بیماری‌ها است. این تحقیق با هدف بررسی اثر ماده محرک BTH بر بیان ژن PR2 و شدت بیماری آتشک در گیاه به و در شرایط باغی انجام شد. درختچه‌های دو ساله به ارقام اصفهان و ترش در اردیبهشت ماه با محلول BTH با غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر دوبار به فاصله چهار روز محلول پاشی شدند، سپس با سوسپانسیون سلولی باکتری عامل بیماری آتشک آلوده شده و چهار هفته بعد شدت بیماری اندازه‌گیری شد. از برگ درختان تیمار شده با BTH ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و شاهد (اسپری شده با آب مقطر) نمونه‌برداری انجام شد. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، بخشی از ژن PR2 با استفاده از آغازگرهای عمومی تکثیر و توالی آن تعیین شد. مقایسه توالی آن با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های DNA نشان داد که تشابه بالایی با ژن‌های شناخته شده گلوکاناز در گیاهان دیگر و از جمله سیب دارد. با طراحی آغازگرهای اختصاصی بر پایه توالی این ژن میزان تغییرات بیان آن از طریق واکنش real-time PCR ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بیان ژن PR2 پس از تیمار گیاه با BTH چندین برابر افزایش یافت. بررسی شدت آتشک نیز مبین ۲۱/۶۶٪ و ۱۳/۷۶٪ کاهش شدت آتشک به ترتیب در تیمارهای ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر BTH بود. این نتایج نشان می‌دهد کاهش شدت بیماری آتشک پس از ماده محرک BTH می‌تواند با القا بیان ژن‌های رمزکننده PR پروتئین‌ها و از جمله PR2 مرتبط باشد و از این ماده می‌توان در برنامه مبارزه تلفیقی با بیماری آتشک استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: به، آتشک، PR پروتئین‌ها، بیان ژن، real-time PCR.

مقدمه

بررسی واکنش تعدادی از ژنوتیپ‌های به کشور به بیماری آتشک تنوع در تحمل آن‌ها مشاهده شد و رقم اصفهان در گروه حساس طبقه‌بندی شد (Mehrabipour *et al.*, 2010). یکی از روش‌های مبارزه فعال‌سازی سریع و موثر واکنش‌های دفاعی گیاه با کاربرد مواد محرک است که سبب القای ژن‌های رمز کننده PR پروتئین‌ها می‌شوند (Schaller *et al.*, 2000). ترکیبات آلی و غیر آلی مختلفی می‌توانند واکنش مقاومت سرتاسری در برابر بیماری ایجاد کنند از جمله ترکیب thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methyl ester (acibenzolar-S-methyl, ASM or Actigard™ یا Bion® تحت عنوان Syngenta توسط شرکت تولید می‌شود و نقش آن به عنوان یک فعال کننده دفاع در تعدادی از گونه‌های گیاهی مانند آراییدوپسیس (Lawton *et al.*, 1996)، توتون (Friedrich *et al.*, 1996)، گندم (Gorlach *et al.*, 1996)، لویسا (Siegrist *et al.*, 1997)، ذرت (Morris *et al.*, 1998) و خیار (Narusuka *et al.*, 1999) نشان داده شده است. این ترکیب همچنین در درختان میوه مانند گلابی ژاپنی در برابر زنگ و لکه سیاه آتشک (Ishii *et al.*, 1999)، سیب در برابر آتشک (Brisset *et al.*, 2000)، Maxon-Stein *et al.*, 2002) و Bayasal and Zeller, 2004) تجربه شده

بیماری آتشک (Fire blight) با عامل *Erwinia amylovora* (Burril) Wislow از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار در سراسر جهان از جمله ایران است. میزبان‌های عمده بیماری آتشک جنس‌های به (Cydonia)، گلابی (Pyrus)، سیب (Malus)، ازگیل (Mespilus)، زالزالک (Crataegus)، پیراکانتا (Pyracanta) و شیرخشت (Cotoneaster) و به، گلابی و سیب از حساس‌ترین میزبان‌ها هستند (van der Zwet and Keil, 1979). این بیماری در تعدادی از کشورها گزارش شده است (van der Zwet and Bonn, 1991) و در ایران، برای اولین بار در بهار ۱۳۶۸ از کرج گزارش شد (Zakeri and Sharifnabi, 1991). در حال حاضر آتشک در حال پیشروی است و خسارات هنگفتی به باغ‌های مناطق مختلف مانند آذربایجان شرقی، قزوین، زنجان، خراسان، گیلان، فارس و تهران تحمیل کرده است (Zakeri and Sharifnabi, 1991)؛ Sahadpour and Ghasemi, 2004؛ Zohour, and Rahmani, 2004؛ Hassanzadeh, 1995).

روش‌های مبارزه متعددی برای مهار آتشک اعمال شده است ولی هیچ کدام به عنوان روش مبارزه قطعی مؤثر واقع نشده است (van der Zwet and Keil, 1979). انتخاب ارقام متحمل می‌تواند گزینه موثری باشد. در

(Baysal and Zeller, 2004) و حجم مساوی از آن‌ها با هم مخلوط و به عنوان مایه تلقیح به کار برده شد. چهار هفته پس از تزریق، شدت آلودگی به بیماری بر اساس نسبت طول بافت مرده به طول شاخه مایه‌زنی شده ($\times 100$)، با احتساب کلیه شاخه‌های مایه‌زنی شده، اندازه‌گیری شد (Le Lezec and Paulin, 1984). در تیمار شاهد، آب مقطر استریل به جای محلول BTH به کار برده شد.

برای جداسازی قطعه ژنی PR2، نمونه برگ درختان پنج روز پس از تیمارهای ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر BTH (قبل از مایه‌زنی باکتری) از گیاهان تیمار شده و شاهد برداشت شد. RNA کل با استفاده از کیت استخراج RNeasy plant Mini kit از شرکت BioRad با افزودن دو ماده شیمیایی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) ۴ درصد و دیتیوتریتول (DTT) استخراج و برای ساخت cDNA از کیت شرکت BioRad استفاده شد. قطعه ژنی مشابه PR2، با یک جفت آغازگر عمومی (5'-TAYATAGCIGTIGGIAAYGA-3' F و 3'-AACATIGCRAAIAGRTAIGT-5' R) بر اساس توالی‌های حفاظت شده گیاهان مختلف (Maxon-Stein *et al.*, 2002) توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر تکثیر شد. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس در هر چرخه

است. این تحقیق با هدف بررسی تاثیر ماده شیمیایی BTH بر شدت بیماری آتشک و بیان ژن PR2 در گیاه به در شرایط مزرعه انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی اثر ماده محرک BTH بر بیان ژن PR2 و شدت بیماری آتشک در به، نهال‌های دو ساله ارقام اصفهان و ترش کاشته شده در باغ تحقیقاتی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر در کرج مورد استفاده قرار گرفتند. نهال‌ها در زمان رشد سریع رویشی در اردیبهشت ماه با ماده محرک BTH با غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر دوبار به فاصله چهار روز محلول‌پاشی شدند. چهار روز پس از محلول‌پاشی دوم، آلوده‌سازی به صورت تزریق باکتری عامل به نوک شاخه‌های جوان با طول تقریبی ۳۰-۲۰ سانتی‌متر به وسیله سرنگ انسولین انجام شد. سویه‌های باکتری قبلاً از نمونه‌های برگ و میوه سیب و به آلوده از استان‌های البرز (سویه Ek از کرج)، خراسان (سویه En از نیشابور)، کردستان (سویه E4 از سنندج) و آذربایجان غربی (سویه EO1 از ارومیه) جداسازی و شناسایی شده بودند (Maleki Balajoo *et al.*, 2012). از کشت سه روزه سویه‌ها در محیط آگار مغذی نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. غلظت سوسپانسیون هر سویه توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۰ نانومتر روی ۰/۲ (معادل 10^8 سلول بر میلی‌لیتر) تنظیم شد

جهت تعیین غلظت مناسب cDNA انجام شد. میزان بیان با استفاده از مقادیر حدود آستانه حاصل از تکثیر ژن *PR2* روی نمونه‌های شاهد و تیمار شده با دو تکرار زیستی به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با نرم افزار مربوط به شرکت Bio-Rad محاسبه و به صورت نسبت بیان ژن بین گیاه تیمار شده و شاهد ارائه شد. مقادیر به دست آمده، با استفاده از نرم‌افزار Excell مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و نمودارهای مربوطه رسم شدند.

نتایج و بحث

بررسی شدت بیماری آتشک چهار هفته پس از آلوده‌سازی درختچه‌های به نشان داد که سطوح حساسیت دو رقم به اصفهان و ترش به این بیماری اختلاف معنی داری نداشتند (میانگین شدت آتشک به ترتیب ۷۹/۷۴۸ درصد و ۷۳/۱۸۲ درصد بود). اما شدت آتشک در تیمارهای ۳۰۰ میلی گرم در لیتر BTH و ۴۰۰ میلی گرم در لیتر BTH کم تر ($P \leq 0.05$) از شاهد (آب مقطر) بود که دلالت بر تاثیر BTH در کاهش شدت بیماری داشت. میانگین مقادیر شدت بیماری در دو رقم در تیمارهای ۴۰۰ میلی گرم در لیتر BTH، ۳۰۰ میلی گرم در لیتر BTH و آب مقطر به ترتیب ۷۰/۲۱۵، ۷۷/۲۹۵ و ۸۹/۶۳۱ درصد رویت شد که مبین ۲۱/۶۶٪ و ۱۳/۷۶٪ کاهش شدت آتشک به ترتیب در تیمارهای ۴۰۰ میلی گرم در لیتر و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر BTH بود. این تفاوت به تفکیک رقم نیز معنی دار بود (شکل ۱). نتایج

دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۴۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد و توسط کیت تخلیص فرمنتاز (Fermentas) از روی ژل خالص شد و در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T الحاق و با روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* سویه XL1Blue منتقل شد. برای تشکیل کلنی ۲۰ میکرولیتر مخلوط انتقال روی محیط کشت LB Agar حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر آمپی‌سیلین کشت شد. پلاسمید نو ترکیب با کشت یک کلنی استخراج شد و حضور قطعه ژن درون پلاسمید با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تایید و پس از توالی‌یابی با نرم‌افزارهای موجود با سایر توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات DNA مقایسه شد.

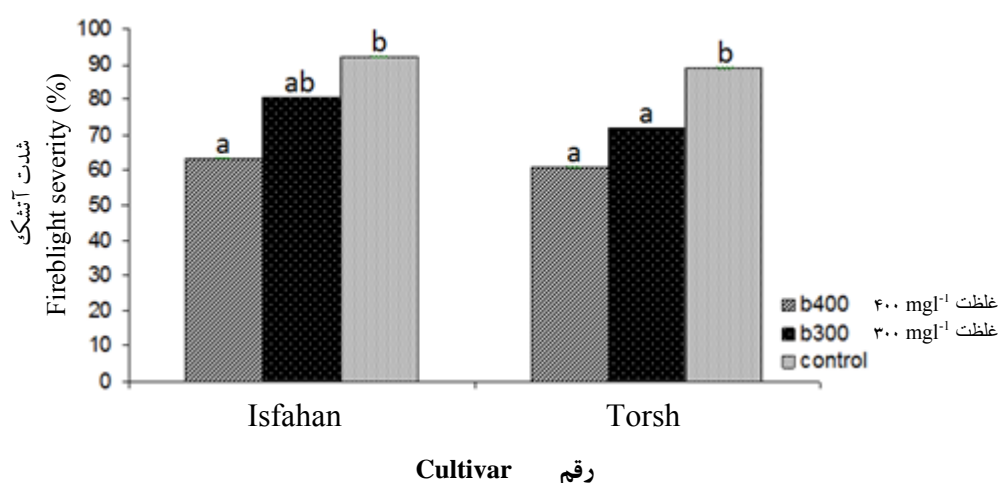
برای بررسی تغییرات بیان ژن *PR2*، آغازگرهای اختصاصی این ژن (بر اساس توالی آن) و ژن *Act* به (باشماره دسترسی KF981879) به عنوان ژن خانه‌دار (House keeping) با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی و سفارش شد (جدول ۱). تعیین غلظت مناسب آغازگرها و بهینه‌سازی برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت انجام real-time-PCR و همچنین رسم منحنی استاندارد با سری رقتی cDNA با آغازگرها

تأثیر ماده محرک BTH بر بیان ژن PR2 و شدت بیماری آتشک در درخت به

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن PR2 در درخت به پس از تیمار با ماده BTH

Table 1. Specifications of primers used for studying expression of the PR2 gene in quince after treatment with BTH

نام آغازگر	توالی آغازگرها
Primer name	Primer sequences
PR2 F	5'-TGGGAGAATTTTTGGGTGTC-3'
PR2 R	5'-CAACTGACGGAGCTGTGAAA-3'
Act F	5'-TGAGACATTCAACGCTCCTG-3'
Act R	5'-GAAGGAATAGCCACGCTCAG-3'



شکل ۱- مقایسه میانگین شدت آتشک در دو رقم به اصفهان و ترش پس از تیمار با غلظت‌های مختلف ماده محرک BTH

Fig. 1. Mean comparison of fire blight severity in two quince cultivars Isfahan and Torsh after treatment with different concentrations of BTH elicitor

مورد تأثیر BTH بر آتشک منتشر شده است (Thomson *et al.*, 1998a؛ Tsiantos *et al.*, 2003؛ Brisset *et al.*, 2000؛ Buban *et al.*, 2002). استفاده از این ماده به خصوص در کنترل آتشک سیب رقم گلدن دلشیز که رقم اصلی سیب کشور است، موثر گزارش شده است (Shahini *et al.*, 2010). این نتیجه با توجه به

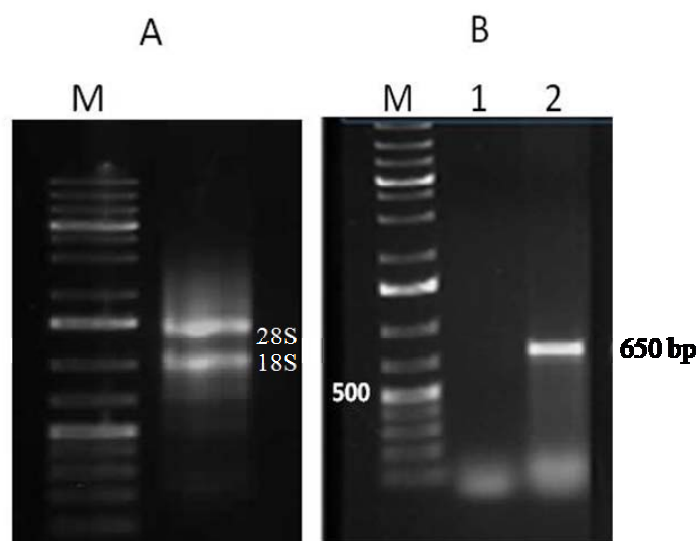
تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از ماده BTH روی درختان به ارقام اصفهان و ترش در شرایط باغی شدت بیماری آتشک را کاهش داد و دو رقم واکنش یکسانی به این ماده نشان دادند. کاربرد این ماده روی رقم اصفهان در شرایط گلخانه‌ای نیز شدت بیماری را کاهش داد (Maleki Balajoo *et al.*, 2012). در سیب و تا حدودی در گلابی گزارش‌های متعددی در

(beta-1,3-glucanase) بالاترین یکسانی (۸۹ درصد) را با توالی نظیر در *Malus hupehensis* (اکسشن gb|ADR71671.1) و *Malus domestica* (اکسشن emb|CAM82809.1) نشان داد. با توجه به نتایج توالی یابی و تعیین آغازگرهای اختصاصی مناسب برای انجام realtime-PCR برای ژن *PR2* واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد و تک باندهایی به طول ۱۶۵ جفت باز برای ژن *PR2* و ۲۲۹ جفت باز برای ژن اکتین حاصل شد (شکل ۴) که بر تکثیر کارآمد ژن‌های هدف و بهینه بودن شرایط واکنش دلالت داشت. پس از تعیین غلظت مناسب آغازگرها و بهینه‌سازی برنامه PCR میزان بیان ژن *PR2* با استفاده از آغازگرهای این ژن و ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی مورد سنجش قرار گرفت. تفاوت در آستانه تکثیر نمونه‌های تیمار شده با شاهد تفاوت در میزان بیان ژن بیان ژن *PR2* را نشان داد (شکل ۵). از آن جایی که رنگ Syber Green ممکن است تکثیرهای غیر اختصاصی و نیز پرایمر دایمر را نیز شناسایی کرده و گزارش کند (Morrison et al., 1998) وجود نمودار ذوب منفرد دلالت بر محصولات خالص و اختصاصی دارد (شکل ۶). آنالیز داده‌ها افزایش حدود ۱۰ برابری بیان ژن *PR2* در گیاهان تیمار شده با BTH را نسبت به شاهد نشان داد که می‌تواند مبین تاثیر این ماده در افزایش بیان ژن *PR2* در درختان به باشد.

عدم ثبت محلول‌پاشی استرپتومایسین برای کنترل آتشک در کشور حائز اهمیت است. در بسیاری از کشورها از استرپتومایسین برای کنترل آتشک استفاده می‌شود. بیست درصد باغات سیب و چهل درصد باغات گلابی در ایالات متحده با استرپتومایسین محافظت می‌شوند. اما در کشورهای اروپایی به جز آلمان، یونان و هلند، محلول‌پاشی استرپتومایسین مجاز نیست و جایگزینی آن با یک ماده بی‌خطر و موثر بسیار اهمیت دارد. یکی از روش‌های توصیه شده برای کنترل آتشک در اروپا کاربرد BTH (به جای استرپتومایسین) است (Deckers and Schoofs, 2003).

تاثیر ماده BTH بر بیان ژن *PR2*

پس از استخراج RNA از نمونه‌های گیاه به مناسب بودن کیفیت آن با کامل بودن دو باند 28S RNA و 18S RNA از روی آن cDNA ساخته شد. با استفاده از cDNA و آغازگرهای عمومی یک قطعه حدود ۶۵۰ جفت باز از ژن *PR2* تکثیر (شکل ۲) و پس از همسانه‌سازی توالی یابی شد. نتایج توالی‌یابی قطعه کلون شده در جستجو با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های DNA نشان داد که قطعه تکثیر شده تشابه بالایی در سطح اسید نوکلئیک با ژن‌های خانواده *PR2* سایر گیاهان از جمله سیب دارد (شکل ۳). این توالی با شماره بازیابی KF981878 در بانک اطلاعات DNA ثبت شد. پروتئین حاصل از این کلون ژنی در به



شکل ۲- الکتروفورز نمونه RNA استخراج شده (A) و تکثیر ژن *PR2* (B) از درخت به رقم اصفهان M: نشانگر؛ ۱: کنترل منفی (آب)؛ ۲: محصول PCR تکثیر ژن *PR2* پس از همسانه سازی روی ناقل پلاسمید

Fig. 2. Electrophoresis of extracted RNA sample (A) and amplification of the *PR2* gene (B) from quince cv. Isfahan. M: marker; 1: negative control (water); 2: PCR product of the *PR2* gene after cloning on a plasmid vector

سالیسیلیک مرتبط است و به مقاومت اکتسابی سرتاسری منجر می شود که از ویژگی آن افزایش در تولید اسید سالیسیلیک داخلی، افزایش نسخه برداری ژن های *PR* مانند *PR1*، *PR2*، *PR5* و گلوکاتایون-اس-ترانسفراز و حفاظت در برابر بیمار گره های بیوتروفیک است (Dewdney *et al.*, 2000). اسید سالیسیلیک نقش کلیدی در بسیاری فعالیت های گیاهی دارد (Vicente *et al.*, 2011) و در سطح وسیعی از گونه های گیاهی بیان می شود اما میزان سطح پایه آن در گونه های مختلف گیاهی تا چند ده برابر تفاوت نشان می دهد (Navarre and Mayo, 2004). چگونه گیاه ساخت اسید سالیسیلیک را تنظیم می کند؟

گیاهان به طور دائم در معرض انواع بیمارگرها قرار دارند که رشد و محصول آن ها را کاهش می دهند و از طریق چندین مسیر دفاعی خواه بصورت دائمی و یا القائی در برابر این عوامل بیماریزا مقاومت می کنند (Mang *et al.*, 2009). مسیر سیگنالی اسید سالیسیلیک، سیگنال اولیه در برابر بیمار گره های بیوتروفیک است، در حالی که اسید جاسمونیک، اتیلن و اسید اولئیک سیگنال های اولیه هستند که در برابر آلودگی های نکروتروفیک فعال می شوند (Diaz *et al.*, 2002؛ Ferrari *et al.*, 2003)؛ (Zhu, 2014). واکنش فوق حساسیت اغلب با فعال شدن مکانیزم های دفاعی وابسته به اسید

```

Mal   AAGATTCAAATACATTGCCGTAGGAAACGAAATCAAGCCCTCGGACTCGTCTGCGCAATT
Cyd   -----TATATCGCGGTGGGGAACGAAGTCAAGCCCTGACTCGTCTGCGCAATT
      * * * * *

Mal   TCTGGTCCC GGCCATGCGGAACATTCAAATGCGATTTCCAGTGCCGGTCTTGAAACCA
Cyd   TCTGGTCTCGGCCATGCGGAACATTCAAATGCGATTTCCAGTGCCGGTCTTGAAACCA
      *****

Mal   AATCAAAGTTTCCACCGCCATAGACACCGGTGTGCTTGAAATTCCTTTCTCCATCAAA
Cyd   AATCAAAGTTTCCACCGCCATAGACACCGAGTGTGCTTGAAATTCCTATTTCCATCAAT
      *****

Mal   AGGAGAATTTAGGGGTGACTATAGCCCAATTTGAATCCTGTTGTCGGTTCCTGGTGG
Cyd   GGGAGAATTTTGGGTGTCTATAGCCCAATTTGAATCCTGTTGTCGGTTCCTGGTGG
      *****

Mal   CAACAAATCTCCGCTACTTGTTAATTTGTATCCTTATTTTAGTTATATTGGCAACACTCG
Cyd   CAACAAATCTCCCCTACTCGTTAATTTGTATACTTATTTAGTTATATTAGCAACACTCG
      *****

Mal   TGACATTCGTCTAGACTATGCTCTTTTCACAGCTCAGTCAGTTGTAGTACAAGATGGCGA
Cyd   TGACATGCGTCTAGATTATGCTCTTTTCACAGCTCCGTCAGTTGTAGTACAAGATGACCA
      *****

Mal   ACGTGGTTATCGTAATCTTTTCGATGCCATTTGGGTGCTGTTACGCTGCGCTTGACAA
Cyd   ACTTGGTTATCGTAATCTTTTCGATGCCATTTGGATGCTTTTACGCTGCGCTTGACAA
      *****

Mal   GGTCGGTGGAGGATCTTTGGAAATTGTTGTATCGGAGAGTGGTTGGCCGACAGCTGGTGG
Cyd   GGTCGGTGGAGGATCTTTGGAAATTGTTATATCGGAGACTGGTTGGCCGACAGCTGGTGG
      *****

Mal   GACGGCAACAACAGTTGATAATGCGAGGACTTATAACTCGAATTTGGTTCAACATGTGAA
Cyd   GACGGCAGCAACAGTGGATAATGCGAGGACTTATAACTCGAATTTGATTCAACATGTGAA
      *****

Mal   GGGAGGGACTCCAAGGAAGCCTGGAAGGCCATTGAAACTTACATCTTGGCCATGTTTGA
Cyd   GGGTGGAACTCCAAGGAAGCCTGGAAGGCCATTGAAACTTACCTCTTCGCCATGTT---
      *****
    
```

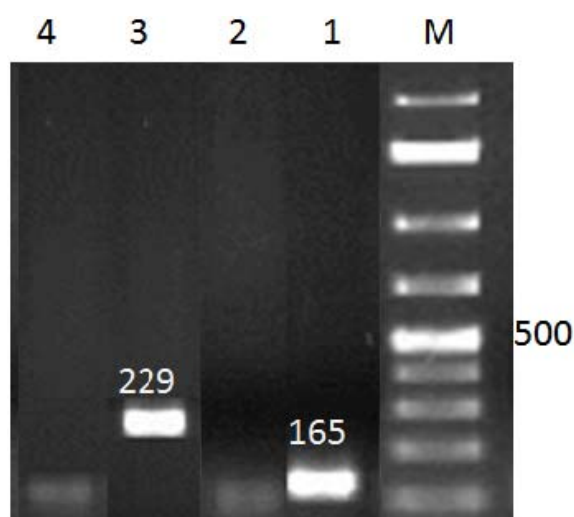
شکل ۳- هم ردیفی توالی نوکلوتیدی کلون ژنی *PR2* جداسازی شده از درخت به (Cyd) با توالی نظیر در سیب (Mal)

Fig. 3. Nucleotide sequence alignment of the *PR2* gene clone (588 bp) isolated from quince (Cyd) with its analogous gene in apple (Mal)

مقاومت اکتسابی سرتاسری (SAR) مرتبط است (Kuc, 2001؛ Van Loon, 1997)؛ Edreva, 2004, 2005). به طوری که *PR* ها در گیاهان تراریخته مقاوم، فعالیت ضد میکروبی بالایی را نشان دادند (Anand et al., 2004؛ Tonon et al., 2002). خانواده *PR2* از خانواده پروتئین‌های مرتبط با دفاع گیاهی یا همان $\beta(1,3)$ -glucanase ها در ایزوفرم‌های مختلفی در گیاهان گسترده هستند

استفاده از روش‌های ژنتیک معکوس نشان داده است که بعضی از پروتئین‌ها مانند SARSD1 و CBP60g به عنوان عامل نسخه‌برداری نقش کلیدی در ساخت اسید سالیسیلیک هنگام مواجهه گیاه با عوامل بیمارگر دارند. به طوری که در گیاهان موتانت فاقد بیان این دو ژن ساخت اسید سالیسیلیک به طور کامل متوقف می‌شود (Zhang et al., 2010). بیان ژن‌های *PR* در پائین دست اسید سالیسیلیک با القای

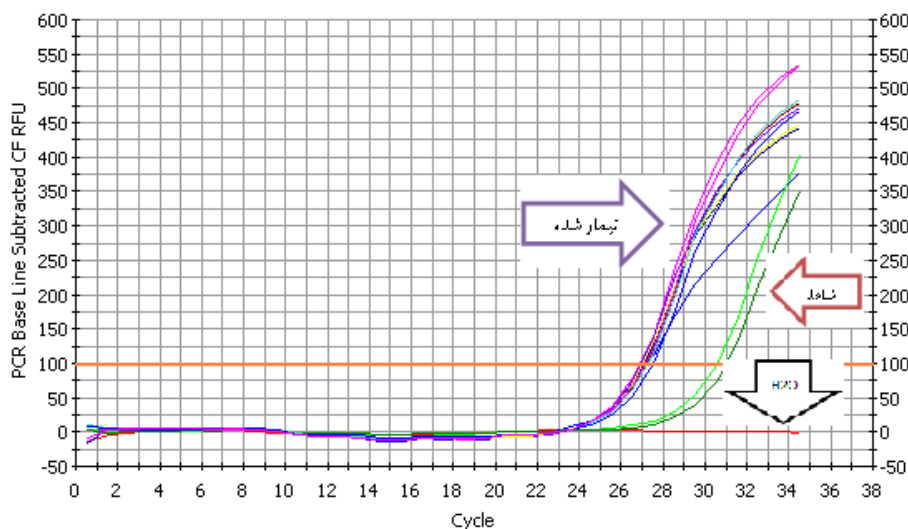
تأثیر ماده محرک BTH بر بیان ژن *PR2* و شدت بیماری آتشک در درخت به



شکل ۴- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن های *PR2* و *actin* با آغاز گره‌های اختصاصی

M: نشانگر وزن مولکولی؛ ۲ و ۴: کنترل منفی؛ ۱: *PR2*؛ ۳: *Actin*

Fig. 4. Electrophoresis of PCR products of *PR2* and *actin* genes using specific primers M: molecular weight marker; 2 and 4: negative control; 1: *PR2*, 3: *Actin*

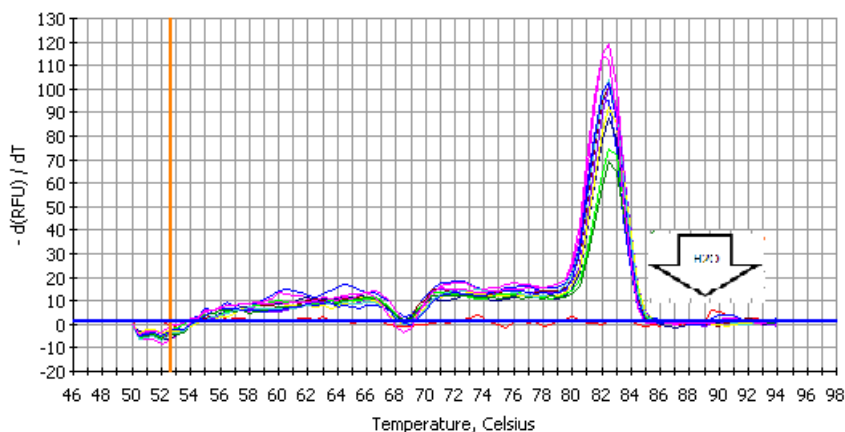


شکل ۵- تکثیر و حدود آستانه مربوط به تکثیر ژن *PR2* در گیاه تیمار شده و شاهد

Fig. 5. Amplification and limit for the *PR2* gene amplification in treated and control plants

پیوندهای گلوکانی در دیواره سلول گیاهی موجب مهار قارچ‌های مهاجم می‌شوند. به علاوه، مواد آزاد شده از هیدرولیز گلوکان‌ها

(Hoj *et al.*, 1995; Simmons, 1994).
بیشترین نقش این آنزیم در دفاع علیه قارچ‌ها بررسی شده و نشان می‌دهد که با هیدرولیز



شکل ۶- منحنی ذوب مربوط به تکثیر ژن PR2 در گیاه تیمار شده و شاهد

Fig. 6. Melting curves for the PR2 gene amplification in treated and control plants

در (Zhang *et al.*, 2005) بررسی نقش PR2 در لاین‌های تراریخته با و بدون بیان ژن PR2 در گیاه آراییداپسیس تحت تاثیر قارچ *Leptosphaeria maculans* و باکتری *Pseudomonas syringae* نشان داد که بیان این ژن از ایجاد کالوز (پلیمری از بتا-۱-۳ گلوکان) در گیاه ممانعت می‌کند. ایجاد کالوز احتمالاً در مسیر انتقال سیگنال اسید سالیسیلیک تداخل کرده و مانع از ایجاد مقاومت می‌شود بنابراین PR2 ممکن است به عنوان یک تنظیم‌کننده در پاسخ به کالوز یا پاسخ دفاعی در گیاه عمل کند (Oide *et al.*, 2013).

ماده BTH که مشابه (آنالوگ) اسید سالیسیلیک است می‌تواند دفاع سرتاسری در برابر بیمارگر را بدون تجمع اسید سالیسیلیک و با فعال‌سازی مسیر پائین دست اسید سالیسیلیک تحریک کند (Yashimoto *et al.*, 2009)؛ کاربرد ماده BTH در سیب نشان داد که افزایش

خود به عنوان محرک پاسخ‌های دفاعی گیاه عمل می‌کنند (Bowels, 1990). در بیماری‌های ویروسی نیز نشان داده شده که این آنزیم‌ها در پاسخ فوق حساسیت گیاهان در برابر ویروس‌ها به شدت افزایش می‌یابند (Antoniw *et al.*, 1980). در بیماری‌های باکتریایی، اشکال واکوئولی و خارج سلولی این آنزیم در دفاع توتون علیه باکتری *Pseudomonas syringae* دخالت دارند (van Den Bulcke *et al.*, 1998). ماده محرکی در عصاره تهیه شده از انگور یافت شده است که موجب برانگیزش گلوکانازها در توتون می‌شود (Goupil *et al.*, 2012). در توتون نشان داده شد که برخی مواد مترشحه از *Pseudomonas syringae* عامل بیماری wildfire موجب مهار دفاع گیاه از جمله کاهش بیان ژن PR2 می‌شوند (Lee *et al.*, 2013). آنزیم گلوکاناز سبب تشدید فعالیت آنزیم کیتیناز نیز می‌شود

مقاومت نسبت به عوامل بیماری‌زا را افزایش می‌دهند (Herman *et al.*, 2008)؛ (Francis *et al.*, 2009). به طور کلی می‌توان بیان کرد که استفاده از ماده محرک بیون، که می‌تواند سبب تحریک فرایند دفاع گیاهی و از جمله افزایش بیان PR پروتئین‌ها و کارکرد حفاظتی آن‌ها در برابر شرایط تنش در گیاه می‌شود، می‌تواند در برنامه مدیریت تلفیقی بیماری آتشک در گیاه به گنجانیده شود.

سطح مقاومت درختان نسبت به بیماری باکتریایی آتشک به طور ثابتی با فعال شدن آنزیم‌های پراکسیداز و گلوکاناز ارتباط دارد و تجمع آن‌ها حداقل تا ۱۷ روز پایدار بود (Brisset *et al.*, 2000). در سبب میزان بیان ژن PR2 پس از تیمار با BTH در شرایط گلخانه ۱۰۰ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت (Maxon-Stein *et al.*, 2002). استفاده از بعضی مواد القاکننده که باعث افزایش بیان برخی از ژن‌های PR در گیاهان می‌شوند،

References

- Anand, A., Lei, Z. T., Summer, L. W., Mysore, K. S., Arakane, Y., Backus, W. W., and Muthukrishnan, S. 2004. Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17: 1306-1317.
- Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S., and van Loon, L. C. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology* 47: 79-87.
- Baysal, O., and Zeller, W. 2004. Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to acibenzolar-S-methyl against fireblight (*Erwinia amylovora*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 305-315.
- Bowles, J. D. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59: 873-907.
- Brisset, M. N., Cesbron, S., Thomson, S. V., and Paulin, J. P. 2000. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 106: 529-536.
- Buban, T., Sallai, P., Hertelendy, L., and Obzsut-Truskovszky, E. 2002. Trials with applying chemical agents other than bactericides to control fireblight in pear orchards. *Acta Horticulturae* 590: 263-267

- Deckers, T., and Schoofs, H. 2003.** Control strategies of bacterial diseases in European pear growing. *Acta Horticulturae* 587: 639-645.
- Dewdney, J., Reuber, T, Wildermuth, M., Devoto, A., Cui, j., Stutius, L., Drummond, E., and Ausubel, F. 2000.** Three unique mutants of *Arabidopsis* identify *eds* loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *The Plant Journal* 24: 205-218.
- Diaz, J., 'en Have, A., and van Kan, J., 2002.** The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 129: 1341-1351.
- Edreva, A. 2004.** A novel strategy for plant protection: induced resistance. *Molecular and Cellular Biology* 3: 61-69.
- Edreva, A. 2005.** Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Genetics and Applied Plant Physiology* 31: 105-124.
- Ferrari, S., Plotnikora, J. M., De Lorenzo, G., and Ausubel, F. M. 2003.** *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves EDS4, and PAD2 but not SID2, EDS5 and PAD4. *Plant Journal* 35: 193-205.
- Francis, M. I., Redondo, A., Burns, J. K., and Graham, J. H. 2009.** Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *European Journal of Plant Pathology* 124: 283-292.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Manser, P., Specker, N., Gut, M., Meier, B., and Ryals, J. 1996.** A benzothiadiazole derivatives induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal* 10: 61-70.
- Gorlach, J., Volrath, S., Knauf, G., Hengy, G., and Ryals, J. 1996.** Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* 8: 629-643.
- Goupil, P., Benouaret, R., Charrier, O., Halle, A., Richard, C., Eyheraguibel, B., Thierry, D., and Ledoigt, G. 2012.** Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. *Ecotoxicology* 21: 1541-1549.
- Hassanzadeh, N. 1995.** Fireblight of Pear, Apple and Quince Trees. Agricultural Research, Education and Extension Organization Publication, Technical Issue No. 1: 18pp. (in Persian).

- Herman, M. A. B., Davidson, J. K., and Smart, C. D. 2008.** Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes. *Phytopathology* 98: 1226-1232.
- Høj, P. B., and Fincher, G. B. 1995.** Molecular evolution of plant β -glucan endohydrolases 1995. *Plant Journal* 7: 367-379.
- Ishii, H., Tomita, Y., Horio, T., Narusaka, Y., Nakazawa, Y., and Ivamoto, S. 1999.** Induced resistance of acibenzolar-S-methyl to cucumber and Japanese pear diseases. *European Journal of Plant Pathology* 105: 77-85.
- Kuc, J. 2001.** Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology* 107: 7-12.
- Lawton, K., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Kessmann, H., and Ryals, J. 1996.** Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal* 10: 71-82.
- Lee, S., Yang, D. S., Rao, S., Summer, L. W., and Mysore, K. S. 2013.** Suppression of plant defense responses by extracellular metabolites from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biology* doi:10.1186/1471-2229-13-65.
- Le Lezec, M., and Paulin, J. P. 1984.** Shoot susceptibility to fire blight of some apple cultivars. *Acta Horticulturae* 151: 277-287.
- Maleki Balajoo, O., Kesahavarzi, M., Zahabi, A., Danesh, Y. R., and Haghjuyan, R. 2012.** Protective effect of acibenzolr-s-methyl on fireblight severity in quince and characterization of the *Erwinia amylovora* strains involved. *Journal of Plant Pathology* 94: 211-214.
- Mang, H. G., Laluk, K. A., Parsons, E., Kosma, D., Cooper, B., Park, H., AbuGamar, S., Bocconelli, C., Myiazaki, S., Concigelio, S., Chilosi, G., Bohnert, H., Bressan, R., Mengiste, G., and Janks, M. 2009.** The *Arabidopsis* RESURRECTION1 gene regulates a novel antagonistic interaction in plant defense to biotrophs and necrotrophs. *Plant Physiology* 151: 290-305.
- Maxon-Stein, K., He, S., Hammerschmidt, R., and Jones, A. 2002.** Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fireblight and expression of pathogenesis related protein genes. *Plant Disease* 86: 785-790.

- Mehrabipour, S., Abdollahi, H., and Ghasemi, A. 2010.** Response of some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes from Guilan and Khorasan provinces to fireblight disease. Seed and Plant Improvement Journal 28-1: 67-84 (in Persian).
- Morris, S. W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C. C., Frederiksen, R. A., Bhandhufalck, A., and Uknes, S. 1998.** Induced resistance responses in maize. Molecular Plant-Microbe Interaction 11: 643-658.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., and Wittwer, C. T. 1998.** Quantification of low-copy transcripts by continuous Syber Green I monitoring during amplification. Bio Techniques 24: 954-962.
- Narusuka, Y., Narusuka, M., Horio, T., and Ishii, H. 1999.** Comparison of local and systemic induction of acquired disease resistance in cucumber plants treated with benzothiadiazoles or salicylic acid. Plant Cell Physiology 40: 388-395.
- Navarre, D. A., and Mayo, D. 2004.** Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. Physiological and Molecular Plant Pathology 64: 179-188.
- Oide, S., Bejai, S., Staal, J., Guan, N., Kaliff, M., and Dixelius, C. 2013.** A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. New Phytologist 200: 1187-1199.
- Sahadpour, A., and Ghasemi, A. 2004.** Outbreak of fire blight of pome fruits in Fars province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran. Page 423 (in Persian).
- Schaller, A. P., Roy, N., and Amrhein, H. 2000.** Salicylic acid- independent induction of pathogenesis- related gene expression by fusicoccin. Planta 210: 599-606.
- Shahini, S., Keshavarzi, M., Hasanzadeh, N., Hashemi, M., Abdollahi, H., and Tavooosi, M. 2010.** *In vitro* evaluation of acilbenzolar-S-methyl on inhibition of fireblight in apple cv Golden delicious. Iranian Journal of Plant Pathology 46: 77-79 (in Persian).
- Siegrist, J., Glenewinkel, D., Kolle, C., and Schmidtke, M. 1997.** Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal photogenes. Z. Pflanz. Pflanzen 104: 599-610.

- Simmons, C. R. 1994.** The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -glucanases and 1,3;1,4- β -D-glucanases. *Critical Review of Plant Sciences* 13: 325-387.
- Thomson, S. V., Brisset, M. N., Chartier, R., and Paulin, J. P. 1998a.** Induced resistance in apple and pear seedlings to fireblight by ASM and correlation with some defense-related enzymes. *Acta Horticulturae* 498: 583-588.
- Thomson, S. V., Gouk, S. C., and Pauline, J. P. 1998b.** Efficacy of Bion[®] (Actigard[®]) to control fire blight in pear and apple orchards in USA, New Zealand and France. *Acta Horticulturae* 489: 589-596.
- Tsiantos, J., Psallidas, P., and Chatzaki, A. 2003.** Efficacy of alternatives to antibiotic chemicals for the control of fireblight of pears. *Annal of Applied Biology* 143: 319-323.
- Tonon, C. G., Guevara, C., and Olive, G. 2002.** Isolation of a potato acidic 39 KDa β -1,3 glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance. *Journal of Phytopathology* 150: 189-195.
- van Den Bulcke, M., Bauw, G., Castresana, C., Van Montagu, M., and Vamdekerckhove, J. 1998.** Characterization of vacuolar and extracellular β (1,3)-glucanase of tobacco: evidence for a directly compartmentalized plant defense system. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 86: 2673-2677.
- van Loon, L. C. 1997.** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103: 753-765.
- van der Zwet, T., and Bonn, W.G. 1991.** Recent spread and current worldwide distribution of fireblight. *Acta Horticulturae* 489: 167-168.
- van der Zwet, T., and Keil, H. L. 1979.** Fireblight: A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. United States Department of Agriculture, Agricultural Handbook No. 510, Washington D. C., USA. 650pp.
- Vicente, M. R., and Plasencia, J. 2011.** Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 62: 3321-3338.
- Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X. 2006.** A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathogens* 2006, 2: e123. doi:10.1371/journal.ppat.0020123.

- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Hendrickson Culler, A., and Dong, X. 2007.** Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology* 17: 1784-1790.
- Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y., and Shirasu, K. 2009.** Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *The Plant Cell* 21: 2914-2927.
- Zakeri, Z., and Sharifnabi, B. 1991.** Fireblight of pear in Karaj. Proceedings of the 10th Iranian Plant Protection Congress, Kerman, Iran. Page 157 (in Persian).
- Zhang, S. Y., Wang, J. B., Wang, H. F., Shao, J. W., Li, G. L., and Li, X. D. 2005.** The relationship between activities of chitinase and β -1,3glucanase and resistance to rhizomania in sugar beet. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 31: 281-286.
- Zhang, Y., Xu, S., Ding, S., Wang, D., Cheng, Y., He, J., Gao, M., Xu, F., Li, Y., Zhu, Z., Li, X., and Zhang, Y. 2010.** Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 107: 18220-18225.
- Zhu, Z. 2014.** Molecular basis for jasmonate and ethylene signal interactions in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 65: 5743-5748.
- Zohour, E., and Rahmani Moghadam, N. 2004.** Occurrence of fireblight in Khorasan province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran. Page 423 (in Persian).