Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

# بررسی مقاومت دو رقم برنج در تعامل با قارچ عامل سوختگی غلاف، *Rhizoctonia solani* AG1-1A

**محمد سیاری[1]، ولی اله بابایی زاد*[2]، محمد علی تاجیک قنبری[2]، حشمت اله رحیمیان[3]**

[1]دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[2]دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[3]استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰٤/۰۷

## چکیده

برنج از مهم‌ترین گیاهان زراعی دنیا می‌باشد که سطح وسیعی از اراضی زراعی قابل کشت را به خود اختصاص داده است. *Rhizoctonia solani* یکی از قارچ های بیماریزا است که خسارت عمده ای به محصولات مختلف زراعی وارد می سازد. زیرگروه آناستوموزی AG1-1A این قارچ، برنج را مورد حمله قرار داده و باعث ایجاد بیماری سوختگی غلاف برنج می شود. این بیماری به عنوان یکی از مهمترین بیماری های قارچی در مناطق برنجکاری دنیا شناخته شده است. به دلیل آلودگیهای زیست محیطی توسط مصرف بی رویه آفت کش ها جهت کنترل این بیماری از یک سو و مقاومت پاتوژن به این مواد شیمیایی از سویی دیگر، مطالعه مستمر برای ارایه روش و یا روش های جدید و متفاوت جهت مقابله با این بیماری ضروری به نظر می رسد. ژن‌های مقاومت در گیاهان که منابع ژنتیکی با ارزشی هستند را می توان در این راستا استفاده کرد. بررسی های مولکولی جهت ردیابی میزان بیان ژن های فوق بسیار با ارزش است. این تحقیق با هدف آنالیز مولکولی دو رقم برنج بینام و خزر در مقابل با قارچ *Rhizoctonia solani* عامل سوختگی غلاف انجام شد. طول لکه های حاصل از تلقیح پاتوژن در رقم خزر به طور تقریبی دو برابر رقم بینام بود. در نتیجه رقم بینام به عنوان ژنوتیپ مقاوم و رقم خزر به عنوان ژنوتیپ حساس در مقابل بیماری سوختگی غلاف انتخاب شد. جهت تعیین نیم رخ ژنهای دخیل در مقاومت از برگ های گیاهچه های دو هفته ای در ساعات مختلف پس از تلقیح نمونه برداری شد. پروفایل ژن های مورد آزمایش توسط تکنیک Real time Q-PCR بررسی شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد بیان ژن های *PR-5*، *Proxidase*، *PR-10*، *Defensin*، *Thionin* و *NH-1* در رقم مقاوم بینام نسبت به رقم حساس خزر پس از مایه زنی به شدت افزایش یافت. در نتیجه به نظر می رسد ژن های فوق در مکانیسم های مقاومت گیاه برنج در تعامل با *R. solani* نقش داشته باشند.

**واژه های کلیدی**: ژن های مرتبط با بیماری زایی، بیان ژن، برنج، *NH1*، cDNA، Real-time Q-PCR.

*نویسنده مسئول: ولی اله بابایی زاد تلفن: ۰۱۱۳۳٦۸۷٥٦۷ Email: babaeizad@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID



**مقدمه**

برنج از مهم‌ترین گیاهان زراعی دنیا می‌باشد که سطح وسیعی از اراضی زراعی قابل کشت را به خود اختصاص داده است (Lin *et al*, 1995). گیاه برنج در طول دوره رشد به بیماری‌های مختلفی مبتلا می‌شود که اهمیت آنها در هر منطقه بستگی به نوع بیماری، ارقام برنج، محیط رشد، اعمال روش‌های زراعی و دامنه میزبانی عامل بیماری دارد. سوختگی غلاف برگ برنج با عامل *Rhizoctonia solani* Kühn از جمله بیماری-های قارچی است که از نظر بیماری‌زایی و زیان اقتصادی در شمال کشور اهمیت دارد (Balali *et al*., 2008). این بیماری به عنوان یک عامل بازدارنده در توسعه ارقام پرمحصول محسوب شده و خسارت بیماری در استان‌های شمالی قابل توجه می‌باشد.

آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مصرف بی رویه سموم شیمیایی جهت کنترل بیماری ها از یک سو و ظهور نژاد های مقاوم به قارچ کش ها از سویی دیگر، سبب ارایه روش های جدید و متفاوت جهت مقابله با بیمارگر ها شده است. مهمترین این روش ها، مبتنی بر مقاومت گیاهان می باشد. دفاع در گیاهان بر اساس سدهای دفاعی اولیه مختلف و پاسخ‌های القایی استوار است (Grover and Gowthaman, 2003). سدهای اولیه برای مثال شامل لایه کوتیکولی گیاه، دیواره سلولی میزبان و ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند. اولین پاسخ‌های دفاعی گیاهان شامل باز شدن کانالهای یونی ویژه‌ای در غشاء پلاسمایی، تولید سریع گونه‌های اکسیژن فعال (AOS) مثل $\bar{O}_2$، $H_2O_2$ و در نهایت فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین‌های خاص می‌باشد (Grover and Gowthaman, 2003). این واکنش‌های اولیه پیش نیاز آغاز شبکه‌های سیگنالی بوده که سبب راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی کلی می‌شود. بنظر می‌رسد پاسخ‌های دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید (JA) و اتیلن توسط نکروتروف‌ها و پاسخ‌های وابسته به سالیسیلیک اسید (SA) توسط بیوتروف‌ها فعال شود. به هرحال هم‌پوشانی بین مسیر های سیگنالی مختلف و گاهی اثرات هم افزایی بین این مسیرهای مختلف وابسته به SA، اتیلن و JA گزارش شده است (Thomma *et al*., 1998). هر سه مسیر دفاعی در ارتباط با افزایش نسخه‌های ژنهای دفاعی زیادی هستند. پروتئین های مرتبط با بیماری زایی[٤] معمولاً به‌عنوان پروتئین‌های خاص میزبانی بوده که در اکثر گونه‌های گیاهی در مقابل حملات پاتوژن‌ها و شرایط مشابه برانگیخته می‌شوند (Van Loon *et al*., 2006). از زمان کشف اولین PRها در 1970 در گیاهان توتون آلوده به ویروس موزاتیک توتون (TMV)، تاکنون ۱۸ خانواده از آنها بر اساس توالی آمینواسیدی، روابط سرولوژیکی و فعالیت‌های بیولوژیکی و آنزیمی‌شان شناخته شده اند (Van Loon *et al*., 1997 and 2006). پروتئین‌های متعلق به خانواده PR-5 به دلیل داشتن توالی مشابه پروتئین گیاهی تائوماتین به پروتئین‌های شبه تائوماتین معروف هستند



www.SID.ir

Archive of SID



(Velazhahan *et al.*, 1999). این پروتئین ها گروهی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در تنش های شوری نیز بیان می‌شوند (Velazhahan *et al.*, 1998). چندین گروه از PR-5 فعالیت موثری علیه قارچها از طریق ممانعت از رشد هیف، جوانه‌زدن اسپور و یا جلوگیری از توسعه لوله تندش در صورت جوانه زدن اسپور دارند (Velazhahan *et al.*, 1998). ژن PR-5 تاکنون از آرابیدوپیس، ذرت، سویا، برنج، گندم، جو، توتون، گوجه فرنگی و بسیاری گیاهان دیگر جدا شده است (Datta *et* Christensen *et al.*, 2002 ; Abad *et al.*, 1996 ; *al.*, 1999). ژن *Peroxidase (POX)* در ایزوفورم‌های مختلفی وجود داشته و در محدوده وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر متابولیسم اکسین، بیوسنتز اتیلن، تشکیل لیگنین، تنفس، پروسه‌های واسطه نوری، رشد و پیری نقش دارد (Barratt *et al.*, 1991). گروه پروتئین های PR-9 از دسته پراکسیدازهای تشکیل دهنده لیگنین هستند. این پروتیین ها با کاتالیز فرایند تولید لیگنین سبب تقویت دیواره سلولی گیاه و در نتیجه مقاومت علیه بسیاری پاتوژن ها می شوند (Passardi *et al.*, 2004). در برنج حداقل ٤٢ ژن *POX* شناخته شده است. ژن *POX* عمل اکسیداسیون NADH را کاتالیز می کند. افزایش فعالیت این ژن در برابر پاتوژن ها در گیاهان مختلف به دفعات گزارش شده است (Farkas *et al.*, 1966; Novacky *et al.*, 1968; Gholamnezhad *et al.*, 2015; Goudarzi *et al.*, 2015). بدلیل هومولوژی توالی خانواده PR-10 با ریبونوکلئاز گیاه جینسینگ، PR10 ها تحت عنوان Ribonuclease-like-function نامگذاری شده‌اند (Midoh *et al.*, 1996). در مطالعات (Kim *et al.*, 2001) میزان رونوشت های PR-10 در گیاهان برنج تیمار شده با *Magnaporthe grisea* به شدت افزایش یافت. گروهی دیگر از فعالان ضد میکروبی Defensinها هستند که پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین حدود پنج کیلو دالتون و با تکرارهای زیاد سیستئین می‌باشند. Defensin ها ممکن است توسط تغییر نفوذپذیری دیواره سلولی قارچها و یا ممانعت از بیوسنتز ماکرومولکولها فعالیت ضد قارچی داشته باشند. افزایش بیان Defensin در گیاهان تراریخت در تعامل با پاتوژن‌های بسیاری شامل *Alternaria* (Bohlmann *et al.*, 1994)، *Fusarium* (Epple *et al.*, 1997) ، به اثبات رسیده و ضمناً سبب افزایش مقاومت سیب‌زمینی به *Verticillium* تحت شرایط مزرعه می‌شوند (Lay *et al.*, 2005). تیونین ها (Thionins) در حال حاضر در گونه‌های تک‌لپه و دو لپه بدلیل فعالیت ضد میکروبی‌شان در گیاهان مورد توجه قرار گرفته‌اند (Florack and stiekema 1994). این پروتئین‌ها در دیواره‌های سلولی، واکوئل‌ها و اجسام پروتئینی حضور دارند و حدود پنج کیلو دالتون وزن دارند. تیونین هایی از جو و آرابیدوپیس از دسته ژنی بسیار کوچکی به خوبی شناسایی شده و در دفاع نقش دارند. ضمناً این ژنها در مسیر JA فعالیت دارند. اخیراً ژن *Thionin* از یولاف به گیاه برنج منتقل و منجر به



www.SID.ir

Archive of SID



مقاومت نسبت به دو باکتری مهم برنج شد (Carmona *et al.*, 1993; Florack *et al.*, 1993). محققان در این تحقیق از ژن *Thionin* یولاف برای یافتن نقش این ژن در برنج استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که بیان ژنهای *Thionin* اندوژن به تنهایی برای ممانعت از آلودگی‌های باکتریهایی در گیاهچه‌های برنج کافی نیست.

ژن *NH1* نسخه بیان نشده ژنهای مرتبط با بیماریزایی (*Nonexpresser of Pathogenesis- Related gene 1*) بوده که ضمناً تحت نام های (*Non-inducible immunity*) *NIMI* و (*SA- insensitive*) *SAI1* هم شناخته شده است (Shah *et al.*, 1999). این گروه جهت انتقال سیگنال SA برای فعال‌سازی ژنهای PR و در نتیجه تحریک SAR حیاتی می‌باشند و سبب مقاومت پایای گیاهان علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌ها می‌گردند. ژن *NPR1* اولین بار در آرابیدوپسیس شناسایی شد (Glazebrook *et al.*, 2005). افزایش بیان *NPR1* در آرابیدوپیس و بیانش در برنج، گوجه فرنگی، گندم و سیب سبب افزایش مقاومت گیاهان مذکور به پاتوژنها با افزایش میزان بیان PR ژنها شده است (Lin *et al.*, 1995; Chern *et al.*, 2005). ضمناً ثابت شده که القای مقاومت توسط بیان *NPR1* می‌تواند بدلیل بیان بیشتر و سریع‌تر PR ژنها باشد (Shah *et al.*, 1999). این تحقیق با هدف بررسی میزان تظاهر ژن های *PR-5*، *PR-9*، *PR-10*، *Defensin*، *Thionin* و *NH1* در مقاومت به بیماری سوختگی غلاف در ارقام برنج بینام و خزر انجام شد.

## مواد و روش ها

ارقام برنج مورد مطالعه در این تحقیق رقم‌های بینام و خزر بوده که بذور خالص ارقام مذکور از معاونت موسسه تحقیقات برنج کشور واقع در آمل تهیه گردید. بر اساس بررسی های مزرعه ای، رقم بینام به عنوان ژنوتیپ مقاوم و رقم خزر به عنوان رقم حساس انتخاب شد (Bahrami *et al.*, unpublished data).

بذرها به مدت ٤ ساعت در محلول ۵ در هزار کاربوکسین- تیرام ضدعفونی گردیدند. بذور پس از شستشو با آب مقطر استریل در پتری‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. پتری‌ها به مدت ٤-۳ روز تا زمان جوانه‌زنی بذور در انکوباتور و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. بذور جوانه‌زده سپس به گلدانهای پلاستیکی حاوی خاک استریل (نسبت رس: هوموس ۲:۱) منتقل و گلدانها به اتاقک رشد (با تناوب نوری ۱٦ ساعت نور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۸۵٪ و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۹۵٪) انتقال یافتند.

نمونه‌هایی شامل غلاف برگ و ساقه از ارقام مختلف برنج که علائم مشکوک سوختگی غلاف و برگ را نشان دادند، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. قسمت‌های آلوده به مدت ۵ دقیقه با جریان ملایم آب شسته شدند و به



www.SID.ir

Archive of SID



قطعاتی به اندازه ۱ – ۰/۵ سانتی‌متر بریده شدند. این قطعات به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی سطحی شده و سپس سه بار (هر بار ۱۰ دقیقه) در آب مقطر استریل شستشو و در محیط کشت Water Agar (آب + آگار) دو درصد و Potato Dextrose Agar (PDA) در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از چند روز قطعات مورد بررسی قرار گرفت و در صورت مشاهده اندام‌های قارچی، خالص‌سازی انجام شد. نمونه‌های جداشده در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ روز نگه‌داری و از قارچ‌های رشد یافته، روی محیط کشت آب آگار کشت نوک ریسه به روش جانی پور و همکاران (۱۳۸۸) تهیه شد. پس از شناسایی‌مورفولوژیکی از یک نمونه به‌عنوان نماینده استخراج DNA صورت پذیرفت و بخشی از ناحیه ITS آن با استفاده از جفت آغازگر های ITS4 و ITS5 تکثیر شد. پس از تعیین توالی و مقایسه نمونه با توالی های ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) به عنوان نمونه استاندارد و نشان دادن شباهت ۹۹ درصدی با *R. solani* AG 1-1 A در باقی مراحل آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

مایه‌زنی بر روی گیاهچه‌های ۲ هفته‌ای برنج و با استفاده از قرار دادن قرص های ۰/۵cm از حاشیه کشت‌های ۵ روزه قارچ در محل غلاف و سپس ثابت کردن آنها در محل با چسب نواری انجام شد. گیاهان مایه‌زنی شده سپس توسط نایلون‌های مرطوب پوشانده شده و گلدان‌ها مجدداً به اتاقک رشد برگردانده شدند. کیسه‌ها پس از ۳ روز برداشته شدند. نمونه‌برداری از برگ گیاهان آلوده در زمان‌های ۰ (شاهد)، ۱۲، ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۱۰۰ ساعت پس از آلودگی انجام شد و نمونه ها پس از پودر شدن با ازت مایع تا زمان استخراج RNA در فریزر با دمای ۸۰°C– نگهداری شدند.

برای بررسی توسعه بیماری از گیاهان ٦ هفته‌ای استفاده شد. طول لکه‌های ایجاد شده در گیاهچه‌های دارای علائم از هر لاین اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله توسط نرم‌افزار Excel و آزمون مقایسه‌ای T-studentدر سطح احتمال ۵٪ آنالیز شد.

Total RNA از برگهای نمونه‌برداری شده در زمان‌های مختلف با استفاده از ماده RNX plus (شرکت سیناژن) طبق روش Triant and Whitehead (۲۰۰۹) به دست آمد. به منظور زدودن DNA ژنومی از نمونه های RNA از کیت DNase I, RNase-free ساخت شرکت Fermentas طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید.

کیفیت RNA استخراجی بر روی تعدادی از نمونه ها با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE ( 40mM Tris acetate, 1 mM EDTA) و یا اسپکتروفتومتر ارزیابی شدند. میزان جذب در طول موج های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید.

ساخت اولین رشته cDNA هر نمونه RNA استخراجی با استفاده از پرایمر $oligo(dT)_{18}$ و



www.SID.ir

Archive of SID



آنزیم SuperScript Reverse Transcriptase توسط کیت Revert Aid first strand cDNA (شرکت Fermentase ) انجام گرفت. نمونه ها تا زمان استفاده در ۲۰°C- نگهداری شدند.

تکثیر قطعات cDNA با استفاده از واکنش زنجیره پلی مراز و جفت آغازگر ابی کوایتین انجام شد . ارزیابی محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBA (89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) صورت گرفت . ژل در اتیدیوم بروماید (0.5 µg/ml) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی و بعد از شستشو با آب مقطر با UV دستگاه ژل خوان کداک (GELLOGIC 200) از آن عکسبرداری شد. آزمون QRT-PCR (Quantitative Real Time PCR ) با استفاده از دستگاه M×3000P thermal cycler (BioRad) و کیت Syber green انجام شد. به حجم ۱ میکرولیتر از cDNA رقیق شده (شامل ۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) از هر نمونه به‌عنوان الگو در واکنش‌ها استفاده شد و به ترکیب یک میکرولیتر از هر پرایمر، ۱۰ میکرولیتر سایبرگرین، و آب تا حجم ۲۰ میکرولیتر افزوده شد. پارامترهای دمایی جهت تکثیر به‌صورت زیر بود:

مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ٤ دقیقه در دمای ۹٤°C، به همراه ٤۰ سیکل شامل واسرشت‌سازی به مدت ۵ ثانیه در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد، ۵ ثانیه در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد (Annealing/ Extension). لیست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است. در تمام آزمایشات از ژن ابی کوایتین به‌عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. تمام واکنش‌های PCR در ۲ تکرار انجام گرفت.

نرخ بیان ژن با استفاده از روش delta-delta (Livak *et al*, 2003) اندازه‌گیری شد. در ابتدا میانگین دو تکرار سیکل آستانه برای هر ژن محاسبه شد. سپس میانگین CT ابی‌کوای‌تین (Ubiquitin) از میانگین CT ژن هدف کم شده و شاخص $\Delta CT$ بدست آمد. نرخ بیان هر ژن با استفاده از فرمول $2^{\Delta CT}$ محاسبه شد. انحراف معیار داده‌ها با استفاده از اعداد بدست آمده برای هر ۲ تکرار محاسبه و نتایج توسط آزمون مقایسه‌ای T-student آنالیز شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از برنامه های آماری موجود در نرم افزار Microsoft Excel از مجموعه نرم افزارهای Microsoft office انجام گرفت.

## نتایج

پس از چهار هفته از آلوده سازی گیاهچه ها به قارچ *R. solani* میزان پیشرفت بیماری با اندازه گیری طول لکه ها در هر دو رقم مورد بررسی، محاسبه شد. نتایج بیانگر توسعه دو برابری بیماری در رقم حساس خزر در مقایسه با ژنوتیپ مقاوم بینام بود (شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن های دفاعی مختلف نشان داد میزان بیان تمامی ژن های مورد بررسی در رقم مقاوم بینام به طور معنی داری در مقایسه با ژنوتیپ حساس خزر بالاتر بود.



www.SID.ir

Archive of SID



**جدول ۱- جفت آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق به همراه توالی نوکلئوتیدی آن ها.**

**Table 1- Primer pairs used in this study and their nucleotide sequences.**

| ژن gene | آغازگر رفت (5'→3') Forward Primer (5'→3' ) | آغازگر برگشت (5'→3') Reverse primer (5'→3' ) | اندازه محصول Product size |
|---|---|---|---|
| *UBI* | GGCAAGACCATCACCCTTGAGG | TGGACTCCTTCTGGATGTTGTA | **234** |
| *PR-5* | ACCTCTTCCGCTGTCCTC | GAAGACGACTTGGTAGTTGC | **241** |
| *PR-10* | CATGCTACTGCTCACCTTTGA | TCACTCTAGGTGGGATATACT | **320** |
| *Defensin* | CCGGCGAACTGCGTGTAC | GGCGTCGAGCAGAATTGG | **230** |
| *Thionin* | AGGGTGGTGCTTCAGCTTGT | GGTGTTCTGCGAGGTGATGA | **300** |
| *PO-I* | CATGCTACTGCTCACCTTTGA | TCACTCTAGGTGGGATATACT | **220** |
| *NH1* | GAACCCGGGATGGACACCACCATTG | AAGGATCCTCAAGGTACCTCCAAACCAAG | **325** |

پس از جدا و خالص سازی در بررسی های اولیه میکروسکوپی تمامی نمونه ها مشخصات عمومی رایزوکتونیا را داشتند. تمامی جدایه ها قادر به آناستوموز با *R. Solani* AG1-1A عامل سوختگی غلاف برنج بودند. تعیین توالی نوکلئوتیدی حاصل از تکثیر ناحیه ITS و مقایسه آن با توالی های مشابه موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) نتایج آزمون های مورفولوژیکی را ثابت کرد.

رقم بینام به مراتب درجه بالاتری از مقاومت نسبت به رقم حساس خزر نشان داد. همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود مجموع طول لکه‌ها برای رقم خزر ۲ برابر رقم بینام بود. آنالیز داده‌ها با آزمون مقایسه‌ای T-test تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ بین ارقام مقاوم و رقم حساس نشان داد.

تمام ژن‌های مورد مطالعه در این آزمون در زمان اوج بیان در سطح احتمال ۱ درصد در رقم بینام در مقایسه با ژنوتیپ خزر به طور معنی داری افزایش بیان داشتند. سطح پایه‌ای بیان این ژن‌ها در گیاهان شاهد هر ۲ رقم مورد بررسی در این آزمایش بسیار پایین بود.

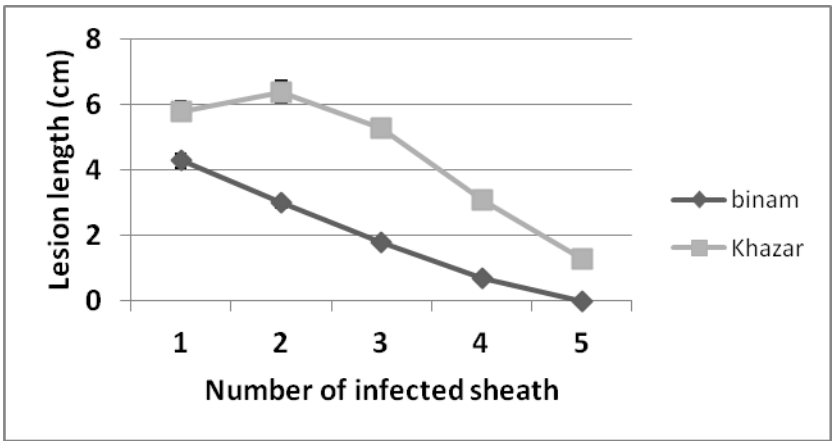
بیان ژن های *PR-5* و *Pox* در هر دو رقم الگوی مشابهی داشته و در ساعت ۲٤ پس از تلقیح افزایش معنی داری داشت، حال آنکه میزان بیان آن در زمان ٤۸ ساعت پس از مایه‌زنی به اوج خود رسید (شکل ۲-a و ۲-b). بیان این ژن سپس در هر دو رقم مورد بررسی تا زمان ۱۰۰ ساعت پس از آلودگی سیر نزولی طی کرد. میزان رونوشت‌های ژن *PR-5* در زمان بیشینه بیان در رقم بینام ۱۳ برابر و در رقم خزر ٤ برابر زمان صفر بود. ضمناً میزان بیان این ژن در رقم بینام به ترتیب ۳/٤ برابر در مقایسه با میزان بیان در ساعت ٤۸ بعد از آلودگی در رقم خزر بالاتر بود. مقدار بیان ژن *POX* در ساعت اوج (٤۸ ساعت پس از مایه‌زنی) در رقم بینام و خزر به ترتیب ۱۰ و ۳ برابر زمان صفر (شاهد) بود.



www.SID.ir

Archive of SID






**شکل A-1- تفاوت دو رقم در شدت بیماری ناشی از *R. solani* در هر برگ، توسط روش اندازه گیری طول لکه.**

**Figure 1 –A - Differences among two cultivars in severity of *R. solani* in each leaf performed by determination of lesion length.**

ضمناً نرخ بیان این ژن در رقم بینام ۳ برابر رقم خزر در زمان اوج بیان بود. آزمون مقایسه‌ای T student نیز در ساعات ۲٤ و ٤۸ که ساعات اوج بیان این دو ژن در دو رقم مورد مطالعه می-باشند تفاوت معنی‌داری (P <0.001) بین نرخ بیان این ژن ها در رقم مقاوم در برابر رقم حساس نشان داد (شکل a-۲ و b-۲). میزان رونوشت‌های ژن *PR-10* در رقم بینام در زمان ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی به شدت افزایش یافت. حال آنکه در رقم خزر بیشینه بیان در زمان ٤۸ ساعت پس از تلقیح مشاهده شد (شکل c-۲). بیان این ژن در ساعات ۲٤ و ٤۸ پس از تلقیح رو به کاهش گذاشته تا اینکه در ۱۰۰ ساعت پس از آلودگی افزایشی چشمگیر در بیان این ژن دیده شد. نرخ بیان ژن در ارقام بینام و خزر در زمان بیشینه بیان به ترتیب ۱۳ و ۲ برابر شاهد بود. ضمناً میزان بیان این ژن در ٤۸ ساعت پس از آلودگی در رقم بینام ۸ برابر بالاتر در مقایسه با رقم خزر بود. آزمون مقایسه‌ای T student نیز تفاوت معنی‌داری ( P value <0.001) در زمان ۱۲ ساعت پس از تلقیح بین نرخ بیان این ژن در رقم مقاوم در برابر رقم حساس نشان داد.

رونوشت‌های ژن های *PR12* و *PR-13* در زمان ۱۲ ساعت پس از آلودگی به شدت افزایش داشت و سپس تا زمان ۱۰۰ ساعت پس از تلقیح کاهش یافت (شکل d-۲ و e-۲). تنها مورد استثنا در مورد بیان ژن *Defensin* در رقم خزر بوده که بر خلاف رقم مقاوم بینام با اندکی تاخیر در ۲٤ ساعت پس از تلقیح مشاهده شد. بیشترین میزان بیان ژن *Defensin* در رقم بینام در ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی (زمان اوج) ۱٤ برابر زمان



www.SID.ir

Archive of SID



صفر بود، اما در رقم خزر بیشینه بیان این ژن در زمان اوج (ساعت ٢٤ پس از مایه‌زنی) حدود ٥ برابر زمان صفر بود (شکل d-٢). نرخ بیان ژن *PR-13* در رقم بینام و خزر در ١٢ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ١١ و ٤ برابر شاهد بود، ضمناً این میزان در رقم بینام در مقایسه با خزر ٨ برابر بالاتر بود. آزمون مقایسه‌ای T student نیز تنها در ساعت ١٢ که ساعت اوج بیان این ژن ها در دو ژنوتیپ مورد مطالعه می‌باشد تفاوت معنی-داری ($P <0.001$) را بین نرخ بیان این دو ژن در رقم مقاوم در برابر رقم حساس نشان داد.

نرخ بیان *NH1* در هر دو رقم مورد بررسی در زمان ٢٤ ساعت پس از مایه‌زنی به‌طور چشمگیری افزایش یافت (شکل f-٢) و در ارقام بینام و خزر به ترتیب ١٣ و ٢ برابر بالاتر از شاهد بود. نرخ بیان این ژن در رقم بینام در زمان اوج بیان ٩ برابر بالاتر از رقم خزر بود. آزمون مقایسه-ای T studentدر ساعت ٢٤ که ساعت اوج بیان این ژن در دو رقم مورد مطالعه می‌باشد تفاوت معنی‌داری را بین نرخ بیان این ژن در رقم مقاوم در برابر رقم حساس نشان داد ($P <0.01$). در بازه های ٤٨ و ٧٢ ساعت بعد از آلودگی با وجود کاهش در سطح بیان این ژن در هر دو رقم این نرخ در رقم مقاوم در مقایسه با رقم حساس اختلاف داشت که این اختلاف به ترتیب از نظر آماری در سطح احتمال ($P <0.001$) و ($P <0.01$) معنی دار بود. تفاوت معنی داری در نرخ بیان ژن *NH1* در بازه زمانی ١٠٠ ساعت بعد از آلودگی در بین دو رقم مورد مطالعه مشاهده نشد (شکل f-٢).

**بحث**

مقاومت گیاهان به بیماری ها جهت استفاده موفق از گونه های گیاهی در کشاورزی مدرن بسیار مهم است. در سال های اخیر گیاهان مقاوم به طور موفقیت آمیزی تولید شده اند. ظهور بیولوژی مولکولی ما را قادر کرده ژن های دخیل در مقاومت گیاهان را در سطح مولکولی آنالیز و ضمنا دریچه ای به روی ما گشوده تا بتوانیم ذره ای از پیچیدگی های پاسخ های دفاعی گیاهان در تعامل با پاتوژن ها را درک کنیم.

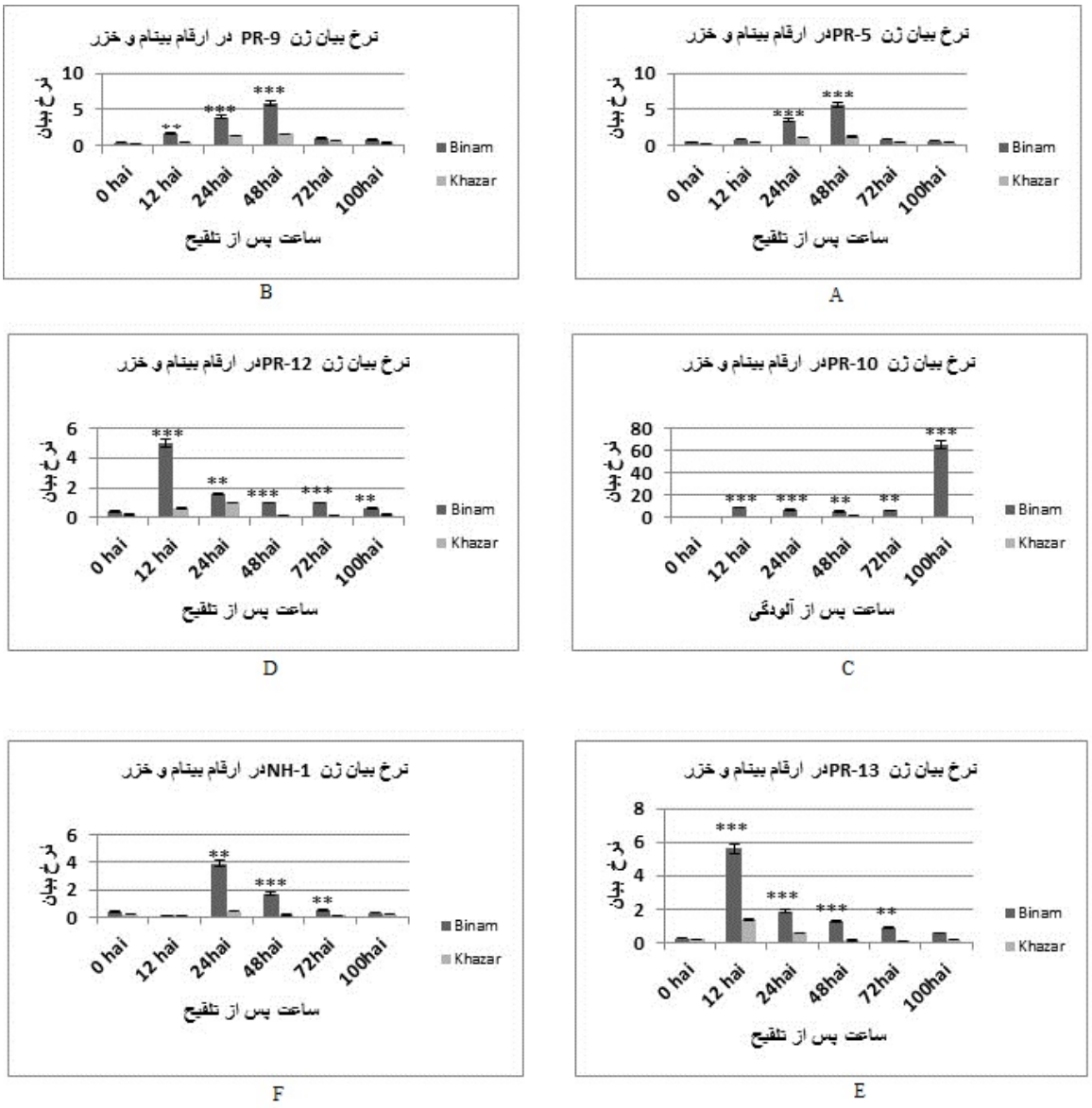
در غلات شمار بسیار زیادی از ژن های مقاومت به بیماری ها (R genes) از گیاهان برنج (*Oryze sativa*) ، گندم (*Triticum aestivum*) و ذرت (*Zea mays*) جدا شده است. این سه گونه گیاهی بیش از ٨٥ ٪ غلات جهان را تولید می کنند. البته اخیرا پیشرفت های خوبی در فهم اساس مولکولی تعامل جو (*Hordeum volgare*) با پاتوژن ها حاصل آمده است. به هر حال این ٤ گونه تنها غلاتی هستند که ژن های دخیل در مقاومت از آن ها جدا و تعیین هویت شده است.



www.SID.ir

Archive of SID






شکل ۲- نرخ بیان ژن های A: *PR-5* ، B: *POX*، C: *PR-10*، D: *PR-12*، E: *PR-13* و F: *NH-1* در رقم بینام در مقایسه با خزر در تعامل با *R. solani* در زمان های مختلف پس از تلقیح.

Figure 2 - The expression rate of A: *PR-5*, B: *POX*, C: *PR-10*, D: *PR-12*, E: *PR-13* and F: *NH-1* genes in Binam cv comparing with Khazar cv in challenge with *R. solani* at different time points after inoculation.

**خط نشان خطا، میانگین انحراف معیار بیان ژن را در دو آزمایش جداگانه نشان می‌دهد ،** و *** به ترتیب معنی دار بودن را در سطح احتمال ($P < 0.01$) و ($P < 0.001$) در آزمون مقایسه ای T student نشان می دهد.**

**Error bars represent standard error of the mean in two different experiments. ** and ***: indicates ($P < 0.01$), ($P < 0.001$) using t test.**



www.SID.ir

Archive of SID



پروتئین های شبه تائوماتین[1] سبب تغییر نفوذپذیری غشاء پلاسمایی قارچ‌ها شده و در نهایت سبب مرگ سلول قارچی می‌گردد. *موتوکریشنان و همکاران* (Muthukrishnan *et al.*, 2001) نقش این ژن را در افزایش مقاومت نسبت به *R. solani* در گیاه برنج گزارش کردند (Muthukrishnan *et al.*, 2001). در این بررسی بیان رونوشت های ژن *PR-5* از ۱۲ ساعت پس از آلودگی شروع، در ۲٤ ساعت پس از آلودگی افزایشی شدید داشته و در زمان ٤۸ ساعت پس از تلقیح به اوج خود رسید. به نظر می رسد شروع القای این ژن در ساعت ۱۲ به دلیل نفوذ بخشی از هیف ها به داخل پارانشیم می باشد. به نظر میرسد در ساعت ٤۸ پس از آلودگی که میزان بیان ژن *PR-5* به اوج خود رسیده قارچ از دیواره سلولی گیاه رد شده و در بافت پارانشیمی بوده که این حداکثر تحریک گیاه توسط نفوذ پاتوژن سبب افزایش بیان ژن مذکور می شود (Zhao *et al.*, 2008.) روند افزایش بیان این ژن در طی ساعات ذکر شده با نتایج بابایی زاد و همکاران (Babaeizad *et al.*, 2009) مطابقت دارد. در مطالعه ما نسخه‌های *PR-5* در ژنوتیپ مقاوم پس از آلوده‌سازی گیاهان با *R. solani* افزایش یافت که با یافته‌های قبلی (Muthukrishnan *et al.*, 2001) مطابقت داشته و نشان دهنده نقش این ژن در بروز مقاومت در برنج در مقابل *R. solani* می باشد.

به دلیل نقش فعال *POX* در محکم‌تر شدن دیواره سلولی گیاه با کاتالیز فرایند تولید لیگنین (Lignification)، که خود منجر به افزایش تحمل در برابر فعالیت آنزیمی نفوذ بیمارگر شده جایگاه این ژن را در مقاومت توجیه می کند (Passardi *et al.*, 2004). در مطالعات ما سطح بیان این ژن در ۱۲ ساعت اول افزایشی اندک داشت که به دلیل نفوذ هیف‌های اولیه در این زمان است. نسخه های این ژن در ساعت های ۲٤و ٤۸ پس از تلقیح روند افزایشی خود را ادامه داد که با نتایج بررسی های قبلی در مورد بیان*POX* در گیاه برنج پس از تلقیح با *Magnaporthe grisea* و *Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae* مطابقت دارد (Jaishree *et al.*, 1997). در این زمان اکثر هیف‌ها به بافت پارانیشم رخنه کرده و علائم بیماری در حال بروز است. نسخه های این ژن در رقم حساس (خزر) در مقایسه با رقم مقاوم بسیار کمتر بوده که نشان‌دهنده نقش فعال این ژن در بروز مقاومت رقم بینام می‌باشد. نقش این ژن در مقاومت گیاه برنج علیه بیماری سوختگی باکتریایی ناشی از *X. oryzae* pv. *oryzae* و دخالت آن در تولید لیگنین در گیاه بعنوان یکی از مکانیسم های دفاع گیاه پس از حمله بیمارگر بخوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Hilaire *et al.*, 2001).

با اینکه ژن *PR-10* اثرات ریبونوکلئازی و RNase دارد و نقش فعال آن در بروز مقاومت گیاهان علیه پاتوژنهای ویروسی اثبات شده است (Jwa *et al.*, 2001)، اما بیان این ژن در برابر

[1]. Thaumatin Like Proteins



www.SID.ir

Archive of SID



پاتوژنهای قارچی نیز افزایش می‌یابد. نتایج این بررسی نشان داد که سطح بیان این ژن در همان ساعات اولیه نفوذ افزایش داشت که با نتایج کیم و همکاران مطابقت دارد (Kim *et al.*, 2001). در ساعت ۱۰۰ پس از آلودگی نیز سطح بیان این ژن مجدداً در رقم مقاوم افزایش یافت که به دلیل تحریک ثانویه گیاه توسط هیف‌های ثانویه قارچ عامل بیماری می باشد. علاوه بر آن سطح بیان این ژن در رقم بینام به مراتب از رقم حساس خزر بیشتر بوده که نشان‌دهنده نقش این ژن در بروز مقاومت برنج علیه *R. solani* است. نتایج مشابهی در مورد نقش فعال *PBZ1* هومولوگ *PR10* در گیاه برنج در مقاومت علیه *R. solani* گزارش شده است (Midoh and Iwata, 1996). تخریب بخشی از سلولهای قارچی تحت تاثیر آنزیم های کیتیناز و بتا ۱،۳- گلوکاناز در داخل بافت گیاهی و به دنبال آن آزاد شدن مولکول های سیگنال دفاعی نظیر مونومر های کیتین و گلوکان دلیل احتمالی افزایش بیان این ژن است.

بیان ژن های *Defensin* و *Thionin* در رقم مقاوم بینام در ۱۲ ساعت اولیه پس از مایه‌زنی به اوج خود رسید. در حالیکه افزایش چندانی در رقم حساس خزر به چشم نمی‌خورد. این مشاهدات دلالت بر نقش احتمالی این دو ژن در بروز مقاومت ارقام برنج در تعامل با سوختگی غلاف دارد. بیان ژن *Defensin* در رقم حساس خزر بر خلاف رقم مقاوم در ٢٤ ساعت پس از آلودگی افزایش داشت که این نرخ در مقایسه با رقم مقاوم خیلی کمتر بود. تاخیر در بیان این ژن در رقم حساس می تواند دلیلی بر افزایش حساسیت این رقم در مقابل *R. solani* باشد. از نتایج فوق چنین بر می آید که افزایش بیان ژن های دخیل در مقاومت در زمان مناسب (نفوذ بیمارگر) سبب مقاومت موثر گیاه می گردد. ادروا و همکاران (۲۰۰۵) یک ژن شبه *Thionin* که در برگها و غلاف بطور مداوم بیان نمی‌شود و در برابر اکثر مولکولهای سیگنالی دفاعی مثل SA و JA القا نمی‌شود را کشف کردند. مطالعات بعدی نشان داد تیونین برنج (*OsThi1*) با JA در غلاف برنج القا و باعث مقاومت به بیماری باکتریایی ناشی از *Burkholderia plantarii* و *B. glumae* می‌گردد که با نتایج ما هم خوانی دارد( Iwai *et al.*, 2002). ثابت شده بیان ژنهای *defensin* در گیاهان از طریق مسیرهای وابسته به JA و اتیلن صورت می پذیرد و غیروابسته به SA می‌باشد (Thomma *et al.*, 1998). از این رو مسیر های وابسته به JA نقش فعالی در مکانیسم های مقاومت گیاه برنج علیه *R. solani* ایفا می کنند.

بنظر می‌رسد پاسخ‌های دفاعی وابسته به اتیلن و JA علیه نکروتروف‌ها و پاسخ‌های دفاعی وابسته به SA علیه عوامل بیوتروف در گیاهان در معرض حمله القا می‌شود. افزایش شدید بیان ژن *NH1* ٢٤ ساعت پس از آلودگی به قارچ *R. solani* این گفته را تایید می کند. برخی پاسخ‌های دفاعی وابسته به SA بطور مستقل از *NPR1* عمل می‌کنند. در نتیجه باید شاخه‌ای دیگر از مسیر سیگنال SA نیز وجود داشته باشد. ژن (*Arabidopsis thaliana AtWhy1*) توسط



www.SID.ir

Archive of SID



آلودگی *Phythophthora parasitica* و تیمار با SA بیان شده اما این افزایش بیان مستقل از *NPR1* است (Spoel *et al., 2003)* . نتایج این بررسی نشان می دهد که سطح بیان این ژن در رقم مقاوم در زمان اولیه نفوذ ( ۱۲ ساعت پس از آلودگی) کاهش ولی در ساعت های بعدی افزایش معنی داری در مقایسه با رقم حساس یافته است که نشان‌دهنده نقش *NH1* در مکانیسم‌های مقاومت رقم مقاوم در تعامل با پاتوژن مذکور می باشد. در مورد تعامل با نکروتروف‌ها در برنج برعکس بیوتروف‌ها *NH1* باعث تجمع بیشتر SA و در نتیجه SAR نمی‌شود (Greenberg *et al.*, 1994). احتمالاً افزایش بیان این ژن در ساعت ٢٤ پس از تلقیح به دلیل نقش دیگر آن پیرامون بسته‌بندی و انتقال پروتئین‌های سنتز شده گیاهی است که قبلا این نقش برای آن به اثبات رسید (Wang *et al.*, 2005).

## منابع


Abad L, Urzo D, Liu MP, Narasimhan D, Reuveni ML, Zhu M, Niu JK, Singh X, Hasegawa NK, Bressan RA (1996). Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. Plant Science 118: 11-23.

Babaeizad V, Imani JG, Kogel KH, Eichmann R, Hückelhoven R (2009). Over-expression of the cell death regulator *BAX Inhibitor-1* in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. Theoretical Applied Genetics 118: 455–463.

Balali GR, Rahimian M, Kosari M (2008). Study of genetic variation of *Rhizoctonia solani* AG 1-1A isolated from rice using pectic zymogram technique. Iranian Journal of Biology 21: 17-23.

Barratt DHP and Clark JA (1991). Proteins arising during the late stages of embryogenesis in *Pisum sativum* L. Planta. 184: 14–23.

Bohlmann, H. 1994. The role of thionins in plant protection. Critical Reviews in Plant Sciences 13:1–16.

Carmona MJ, Molina A, Fernandez JA, Lopez-Fando JJ, Garcia-Olmedo F (1993). Expression of the alpha-Thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. Plant Journal 3: 457-462.

Chern MS, Fitzgerald HA, Canlas PE, Navarre DA, Ronald PC (2005). Overexpression of a rice *NPR1* homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. Molecular Plant-Microbe Interactions 18: 511-520.

Christensen AB, Hocho B, Naesby M, Gregersen PL Brandt J (2002). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. Molecular Plant-Microbe Interactions 3: 135–44.

Datta R, Velazhahan N, Oliva I, Ona T, Mew GS, Kush T, Muthukrishnan, SK, Datta S (1999). Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to Rhizoctonia solani causing sheath blight disease, Theoretical Applied Genetics 98: 1138–1145.

Edreva, A. 2005. Pathogenesis- related proteins: Research progress in the last 15 years. Gen. Applied plant physiology 31: 105-124.

Epple P, Apel K, Bohlmann H (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. Plant Cell. 9: 509–20.

Farkas GL and Stahmann MA (1966). On the nature of changes in peroxidase isozymes in bean leaves infected by Southern Bean Mosaic Virus. Phytopathology 56: 669-677.




www.SID.ir

Archive of SID



Florack DEA, and Stiekema WJ (1994). Thionins: Properties, possible biological roles and mechanisms of actions. Plant molecular biology 26: 25-37.

Florack DEA, Visser BDE, Vries PH, Van Vuurde JWL, and Stiekema WJ (1993). Analysis of the toxicity of purothionins and hordothionins for plant-pathogenic bacteria. European Journal of Plant Pathology 99: 259-268.

Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi goltapeh E, Safaei N, Razavi KH (2015) Study of Wheat ESTs in its interaction with *Mycosphaerella graminicola*. Iranian Journal of Agricultural Biotechnology 7: 87-106.

Glazebrook J (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology 43:205-227.

Goudarzi A, Safaie N, Jafari M, Mahmoudi SB, Tohidfar M (2015) Transformation of sugar beet with a bean chitinase gene and enhanced resistance to *Alternaria alternate*. Iranian Journal of Agricultural Biotechnology 7: 175-200.

Greenberg JT, Guo A, Klessig DF, Ausubel FM (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated with multiple defense functions. Cell. 77:551–63.

Grover A, Gowthaman R (2003). Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. Current Science 84: 330–40.

Hilaire E, Young SA, Willard LH, McGee JD, Sweat T, Chittoor, JM, Guikema JA, Leach JE (2001). Vascular defense responses in rice: Peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. Molecular Plant-Microbe Interactions 14: 1411-1419.

Iwai T, Kaku H, Honkura R, Nakamura S, Ochiai H, Sasaki T, Ohashi Y (2002). Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial disease in transgenic rice overproducing an oat cell -wall – bound thionin. Molecular Plant-Microbe Interactions 15: 515-521.

Jaishree M, Chittoor J, Leach E, Frank F (1997). Differential Induction of a Peroxidase Gene Family During Infection of Rice by *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interactions 10: 861–871.

Jwa NS, Agrawal GK, Rakwal R, Park CH, Agrawal VP (2001). Molecular cloning and characterization of a novel jasmonate inducible pathogenesis-related class 10 protein gene, JIOsPR10, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves. Biochemical and Biophysical Research Communications 286: 973–983.

Kim S, Ahn P, Lee YH (2001). Analysis of genes expressed during rice-Magnaporthe grisea interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions 14: 1340–1346.

Lay FT and Anderson MA (2005). Defensins—components of the innate immune system in plants. Curr. Protein Pept. Sci 6: 85–101.

Lin W, Anuratha CS, Datta K, Potrykus I, Muthukrishnan S, and Datta SK (1995). Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. Nature Biotechnology 13: 686-691.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta}$CT Method. Methods 25: 402–408.

Midoh N and Iwata W (1996). Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. Plant Cell Physiology 37: 9–18.

Muthukrishnan S, George H, Harold N, Bikram S (2001). Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. Plant Cell Tissue and Organ Culture 64: 93–114.

Novacky A and Hampton RE (1968). Peroxidase isozymes in virus-infected plants. Phytopathology 58: 301-305.

Passardi F, Penel C, Dunand C (2004). Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. Trends in Plant Science 9: 534–40.

Shah J, Kachroo P, Klessig DF (1999). The Arabidopsis ssi1 mutation restores pathogenesis-related gene expression in npr1 plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. Plant Cell 11: 191–206.



www.SID.ir

Archive of SID



Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt J.A (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. Plant Cell 15: 760–70.

Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences 95: 15107–11.

Triant DA and Whitehead (2009). Simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from small tissue samples. Journal of Heredity 100: 246–250.

Van Loon LC (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal of Plant Pathology 103: 753–7.

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

Velazhahan R, Chen-Cole K, Anuratha CS, Muthukrishnan S (1998). Induction of thaumatin-like proteins (TLPs) in *Rhizoctonia solani*- infected rice and characterization of two new cDNA clones. Physiologia Plantarum 102: 21-28.

Zhao CG, Wang AR, Shi YJ, Wang LQ, Liu WD, Wang ZH, Lu GD (2008). Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*. Theoretical Applied of Genetics 116: 501–516.



www.SID.ir

Archive of SID



# Resistance of Two Rice Cultivars to the Sheath Blight Agent *Rhizoctonia solani* AG1-1A

**Sayari M.[1], Babaeizad V.[*2], Tajick-Ghanbari M.A.[2], Rahimian H.[3]**

[1]Postgraduate, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Department of Plant Protection.
[2]Associate 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

Contamination of ecosystems upon excessive use of pesticides and emergence of resistance in pathogens to these chemicals makes continuous research on development of new control methods and strategies to combat plant pathogens an essential task. Plant disease resistant genes are useful genetic resources that can be employed to develop resistant varieties as the best alternative to other control measures. The present investigation was carried out to analyze the interaction of two major rice cultivars grown in Northern provinces, with *Rhizoctonia solani*, the causative agent of rice sheath blight disease. Binam and Khazar known as the resistant and susceptible cultivars, respectively, were inoculated and their reaction to *R. solani* determined. The lesions in the sheath of the susceptible cultivar were twice in length compared to those on the resistant cultivar. Analysis of data by the Student's T test showed existence of significant difference (P value < 0.05) between the two cultivars. To determine the expression profile of the genes involved in resistance to *R. solani*, samples were taken from leaves of two weeks old seedlings in different time courses post inoculation. RNA was extracted from the samples and analyzed by quantitative real time PCR. Results of the present study indicated that expression rates of *PR-5*, *Proxidase*, *PR-10*, *Defensin*, *Thionin*, and *NH-1* in resistant genotype (Binam) increased greatly after inoculation with *R. solani* when compared to Khazar cultivar. The outcomes of this study also suggest that the genes under study are involved in resistance mechanisms of rice against sheath blight disease.

**Keywords**: *Pathogenesis-Related genes*, Gene expression, Rice, *NH1*, cDNA, Real-time Q-PCR

[*] Corresponding Author: Babaeizad V. Tel: 01133687567 Email: babaeizad@yahoo.com



www.SID.ir