Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

افزایش بیان ژن دفاعی *PR1* در گیاه به (*Cydonia oblanga*) با کاربرد ماده محرک بیون

نسیم سرهنگی[۱]، منصوره کشاورزی*[۲]، علی محمد شکیب[۳]، محمد علی ابراهیمی[۴]

[۱] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور تهران، تهران، ایران.

[۲]دانشیار پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

[۳] دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

[۴] دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۰۵

چکیده

یکی از روش‌های سالم مدیریت بیماری آتشک در گیاه به (*Cydonia oblanga*)، فعال سازی سیستم-های دفاعی درونزاد گیاه با استفاده از مواد محرک دفاعی از جمله بیون (Benzothiadiazole, Bion) است. هدف از این تحقیق، بررسی مکانیسم دفاع القا شده توسط بیون در گیاه به با تاکید بر تغییر بیان ژن‌های دفاعی گروه *PR1* بود.بدین منظور، ابتدا از برگ گیاهان تیمار که دو نوبت با محلول بیون (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر)محلول‌پاشی شدند و آب (شاهد) RNA استخراج شد و برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. سپس برای کنترل داخلی، یک قطعه ۷۵۰ جفت بازی از ژن خانه دار *actin* همسانه سازی و تعیین توالی شد. نتیجه توالی‌یابی نشان داد که ۹۹٪ تشابه بین ژن اکتین گیاه به با گیاه سیب(*Malus domesticus*) وجود دارد. بر اساس آن توالی، آغازگرهای اختصاصی برای گیاه به طراحی و سپس تغییرات ایجاد شده در بیان ژن *PR1* پس از تیمار درختان به با بیون توسط real-time PCR بررسی و با شاهد مقایسه شد. نتایج این واکنش نشان داد که تیمار بیون موجب ۱۰ بار افزایش بیان ژن PR1 می‌شود. بر این اساس، اثر ماده بیون در کنترل نسبی بیماری آتشک می‌تواند با فعالیت پروتئین‌های دفاعی گروه PR1 مرتبط باشد.

واژگان کلیدی: *به، پروتئین‌های دفاعی، actin، real-time PCR.*

*نویسنده مسئول: منصوره کشاورزی تلفن: ۰۹۱۲۲۶۴۰۰۴۶ Email: kmansureh@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری باکتریایی آتشک با عامل (Burrill) *Erwinia amylovora* (Wislow *et al*., 1920) از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه دار است و به‌خصوص در سیب، به و گلابی از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار است. روش-های مبارزه متعددی برای مهار این بیماری وجود دارد که از جمله می‌توان به فعال‌سازی سریع و موثر واکنش‌های دفاع درونزاد گیاه با استفاده از مواد محرک اشاره نمود(Maloni *et al*., 2005). ترکیبات آلی و غیرآلی مختلفی می‌توانند واکنش دفاعی گیاه را فعال کنند. از جمله این مواد محرک،Acibenzolar-S-methyl است که ترکیبی از Benzothiaduazole بوده و با نام تجاری بیون ®Bion تولید می‌شود. این ماده در ایالات متحده در سطح تجاری برای کنترل بیماری‌های لکه و اسپک باکتریایی گوجه‌فرنگی، سفیدک پودری اسفناج و کپک آبی توتون استفاده می‌شود (Moffat, 2001). همچنین در سطح آزمایشی، اثر آن در کاهش شدت برخی بیماری‌های قارچی، ویروسی و باکتریایی در گیاهان زراعی مانند شلغم (Godard *et al*., 1999)، خیار (Ishii *et al*., 1999) و سویا (Abdel-Monaim *et al*., 2012) و در گیاهان باغی از جمله در گلابی علیه لکه سیاه (Faize *et al*., 2004) و آتشک (Sparla*et al*., 2004) و در سیب علیه آتشک (Baysal *et al*., 2002; Brisset *et al*., 2000; Hassan *et al*., 2007; Maxson-Stein *et al*., 2002) اثبات شده است. همچنین نتایج تحقیقات انجام شده در ایران نیز نشاندهنده تاثیر ماده بیون در کنترل بیماری آتشک در سیب در شرایط برون تنی (Shahini*et al*., 2010) و در گیاه به در شرایط اسکرین هاوس (Balajoo *et al*., 2012) بوده است.

مکانیسم‌های القا شده با واسطه مواد محرک در بسیاری از موارد با افزایش بیان ژن-های دفاعی همراه بوده و منجر به افزایش سطوح مقاومتگیاه می‌شوند (Adrienne & Barbara, 2006; Durrant and Dung, 2004). بررسی-های قبلی نشان داده است که پروتئین‌های دفاعی (Pathogenesis-related proteins) در دفاع القایی با واسطه ماده بیون نیز نقش دارند (Francis *et al*., 2009; Herman *et al*., 2008). به‌عنوان مثال، در برنج، نسخه برداری ژن‌های کدکننده کینازها، پروتئین فسفاتازها و چندپروتئین دیگر در واکنش‌های دفاعی القا شده با بیون، افزایش می‌یابد (Cao *et al*., 2008; Li *et al*., 2008; Liu *et al*., 2008; Luo *et al*., 2005; Zhang *et al*., 2008). همچنین در گیاه به، مکانیسم ملکولی دفاع القا شده توسط بیون با افزایش نسخه‌برداری ژن‌های مسئول سنتز پروتئین‌های دفاعی گروه PR2 (بتاگلوکانازها) همراه بوده است (Sarhangi *et al*., 2015).

www.SID.ir

Archive of SID

تاکنون بیش از ۱۶ خانواده از پروتئین‌های دفاعی در گیاهان شناخته شده‌اند که یکی از گسترده‌ترین آن‌ها خانواده PR1 است. پروتئین-های این خانواده در پاسخ به آلودگی‌های قارچی و باکتریایی درسطوح بسیار بالایی بیان می‌شوند. به عنوان مثال، بیان ژن‌های کد کننده PR1 متعاقب شرایط تنش در توتون بیش از ۱۰۰۰ بار افزایش می‌یابد و به‌همراه سایر پروتئین‌های دفاعی (مانند گلوکانازها، کینازها، کیتینازها) و آنزیم‌های متابولیسم ثانویه (مانند آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز فیتوالکسین‌ها) موجب افزایش سطح مقاومت می‌شوند (Alexander *et al.*, 1993). برخی از اعضای این خانواده پروتئینی به‌عنوان بخشی در طی واکنش فوق حساسیت ترشح می‌شوند و با انتشار به بافت‌های سالم، در مسیر مقاومت اکتسابی سیستمیک نقش دارند (Abdel-Monaim *et al.*, 2012; Van Loon and Strain, 1999).

با وجود گستردگی پروتئین‌های PR1 و ارتباط آن‌ها با دفاع گیاه، مکانیسم عمل آن‌ها هنوز تا حدود زیادی ناشناخته مانده است.با توجه به اینکه این پروتئین‌ها همولوژی بالایی با برخی پروتئین‌های مشابه در مخمرها، حشرات و مهره‌داران دارند، بررسی مکانیسم عمل پروتئین‌های مشابه می‌تواند به شناخت مکانیسم عمل آنها در گیاهان کمک کند (Van Loon and Strain, 1999). برخی هومولوگ‌های پروتئین‌های PR1 در انسان فعالیت پروتئازی و RNase دارند (Yamakawa *et al.*, 1998) اما تا کنون فعالیت آنزیمی از PR1 های گیاهی گزارش نشده است. اولین نشانه غیر مستقیم اثر ضد میکروبی پروتئین های خانواده PR1 در لاین‌های تراریخته توتون حاوی تراژن PR1a بود که با افزایش مقاومت به Prenosporatabacina و Pparasitica. توام بود (Alexander *et al.*, 1993). همچنین پس از خاموش کردن ژن‌های PR1، حساسیت به Phytophthoraparasitica افزایش یافت (Riviere *et al.*, 2008).در شرایط برون تنی و در برگ، پروتئین‌های PR1 خالص‌سازی شده از گوجه فرنگی مانعجوانه زدن زئوسپور و کاهش شدت پوسیدگی ناشی از *Phytophthora infestans* شدند (Niderman *et al.*, 1995).

با توجه به مشاهدات قبلی مبنی بر کاهش شدت بیماری آتشک در گیاه به در اثر تیمار با ماده محرک بیون (Balajoo *et al.*, 2012) و روشن شدن نقش پروتئین‌های دفاعی خانواده PR2 در این دفاع القایی (Sarhangi *et al.*, 2015)، این تحقیق با هدفبررسی گسترده‌تر مکانیسم عمل بیون در گیاه به انجام گرفت و با توجه به گستردگی پروتئین‌های خانواده PR1، برای اولین بار تغییرات بیان ژن‌های این خانواده پس از دفاع القایی با واسطه بیون در این گیاه بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

در اواسط بهار، نهال‌های سه ساله به رقم اصفهان کاشته شده در ۲ تکرار (هر تکرار حاوی یک درخت) در باغ بیماری شناسی موسسه تحقیقات باغبانی کرجدر دو نوبت با فاصله چهار روز با محلول بیون (به غلظت ۴۰۰ میلی گرم در لیتر)(Syngenta, USA) محلول-پاشی شدند (Balajoo *et al.*, 2012). پنج روز پس از دومین محلول پاشی، از برگ‌های جوان نمونه برداری و در یخدان به آزمایشگاه و فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. RNA کل برگ با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen، هلند) استخراج و برای ساخت cDNA از کیت cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) استفاده شد. به منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های خانواده PR1 از توالی این ژن (شماره دسترسی JQ917106) استفاده شد. به منظور استفاده از ژن کنترل داخلی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی (real-time PCR)، ابتدا بر اساس هم ردیفی ژن‌های *actin* از گیاهان: سیب (شماره دسترسی GQ339778)، سویا (شماره بازیابی XM003547311)، لوبیا (شماره دسترسی KF033666) و توت فرنگی (شماره دسترسی XM004294460)، یک جفت آغازگر توسط نرم افزار Primer3 طراحی و توسط آن، بخشی از این ژن از گیاه به همسانه سازی و توالی یابی شد و سپس آغازگرهای اختصاصی برای ژن *actin* گیاه به طراحی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک مرحله وا سرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل: اتصال در دمای ۴۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر در دمای ژن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و سپس بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ برده شد و توسط کیت تخلیص Fermentas خالص شد. سپس قطعه مورد نظر در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T الحاق و با روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* سویه XL1Blue منتقل شد. جهت تشکیل کلونی،۲۰ میکرولیتر مخلوط انتقال بر روی محیط کشت LB agar حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت شد. پلاسمید نوترکیب با کشت یک کلونی استخراج و حضور قطعه ژن درون پلاسمید با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تایید و پس از توالی یابی، با نرم‌افزارهای موجود با سایر توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات DNA مقایسه شد.

غلظت مناسب آغازگرهای ژن‌های *PR1* و *actin*، بهینه سازی برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت انجام real-time و رسم منحنی استاندارد با رقت سریالی cDNA با آغازگرها جهت تعیین غلظت مناسب cDNA انجام گرفت. میزان بیان با استفاده از مقادیر حدود آستانه حاصل از تکثیر ژن *PR1* بر روی نمونه‌های شاهد و تیمار شده با دو تکرار زیستی به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با نرم افزار مربوط به

www.SID.ir

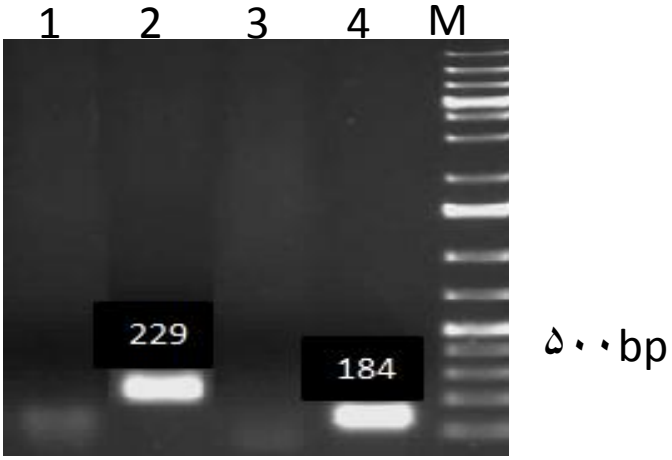
Archive of SID

شرکتBio-Rad محا سبه و به صورت ن سبت بیان ژن بین گیاه تیمار شده و شاهد آورده شد.

نتایج و بحث

در بررسی‌های کمی بیان ژن، به یک ژن کنترل داخلی نیاز است. یکی از ژن‌هایی که در این زمینه در گیاهان استفاده می‌شود، ژناکتین است. با استفاده از cDNA ساخته شده به عنوان الگو و آغازگرهای طراحی شده برای ژن اکتین، یک قطعه ۷۵۰ جفت بازی این ژن از گیاه به تکثیر شد که پس از خالص‌سازی و همسانه-سازی توالی آن تعیین شد. مقایسه توالی این قطعه با سایر توالی‌های موجود در بانک DNA نشان داد که بالاترین تشابه (٪۹۹) در سطح اسید نوکلئیک و پروتئین با ژن اکتین سیب (شماره دسترسیGQ339778.1) دارد. این توالی با شماره دسترسیKF981879 ثبت شد. بر اساس توالی قطعه تکثیر شده، یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی F:5'-TCACACGTTCTACAATGAAC-3' و R:5'-TACTTCCTCTCAGGTGGAGC-3´ طراحی و ساخته شد. از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از این جفت آغازگر، باند۲۲۹ جفت بازی برای ژن اکتین که مورد انتظار بود بدست آمد (شکل‌های ۱ و ۲).

بر اساس توالی ژن *PR1* گیاه به (شماره دسترسی JQ917106.1) آغازگرهای اختصاصی با توالی F:5'-CCAAGACACACCCCAAGACT-3' و R:5'-AGTGCTCATGGCAAGGTTTT-3' طراحی شد. از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از این آغازگر، یک باند۱۸۴ جفت بازی برای این ژن که مورد انتظار بود بدست آمد (شکل۱).

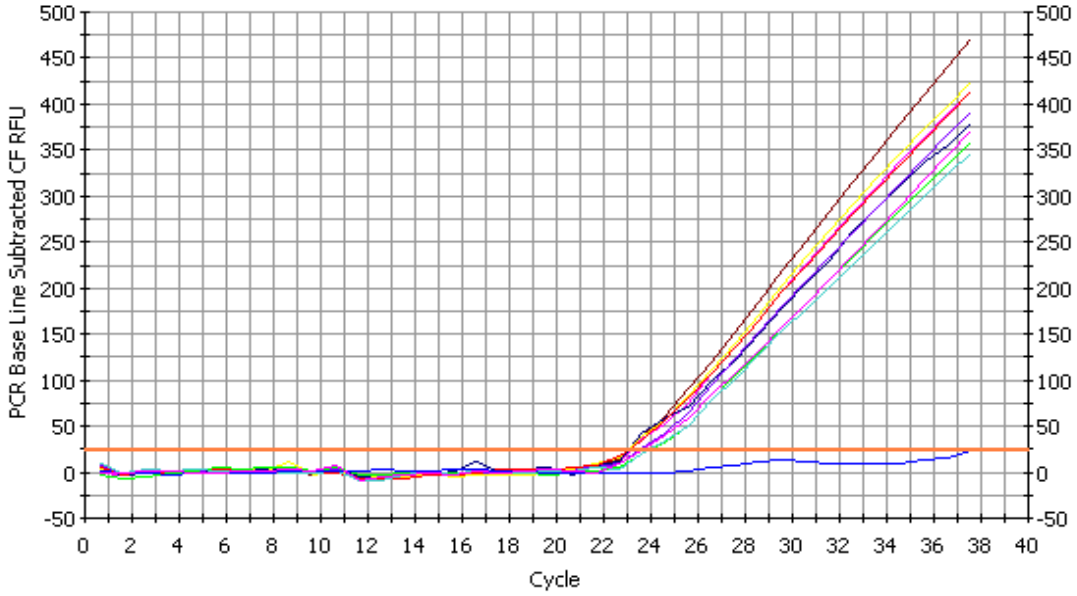


شکل۱- نقوش الکتروفورزی محصولات حاصل از تکثیر ژن‌های *PR1* و *actin*. چاهک‌های ۱ و ۳ کنترل منفی: چاهک‌های ۲ و۴ به ترتیب *PR1* و اکتین: M نشانگر وزن مولکولی 1kb.

Figure 1- Electrophoretic patterns of PCR products for *actin* and *PR1* genes. 1 and 3 lanes: negative control; 2 and 4 lanes: *PR1* and *actin* genes, respectively; M: 1kb DNA weight ladder.

www.SID.ir

میزان بیان ژن‌های *PR1* و اکتین در نمونه‌های تیمار شده و شاهد با استفاده از real-time PCR بررسی و نمودارهای حدود آستانه و ذوب رسم شدند (شکل‌های۲، ۳، ۴و۵). بررسی میزان بیان با استفاده از مقادیر حدود آستانه حاصل از تکثیر ژن *PR1* در نمونه‌های شاهد و تیمارشده نشان داد که تیمارماده بیون روی درختان به باعث افزایش ۱۰ برابری بیان ژن *PR1*می‌شود (شکل۶). در برخی درختان دیگر نیز واکنش‌های دفاعی با افزایش بیان ژن *PR1* توام بوده است. به عنوان مثال در سیب (*Malus domesticus*)، ماده بیون قادر به القای بیان ژن‌های خانواده *PR1* در برابر بیماری آتشک بود و سطح آن را تا ۱۰ بار افزایش داد (Maxson-Stein *et al.*, 2002). افزایش بیان ژن *PR1* در رز (*Rosa damascena*) در برابر عامل بیماری لکه سیاه (Suo and Leung, 2002)، در کلم (*Brassica oleracea*) در برابر عامل بیماری سفیدک پودری (Ziadi *et al.*, 2001) و در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) در برابر قارچ *Uromyces fabae* (Rauscher *et al.*, 1999) نیز گزارش شده است.

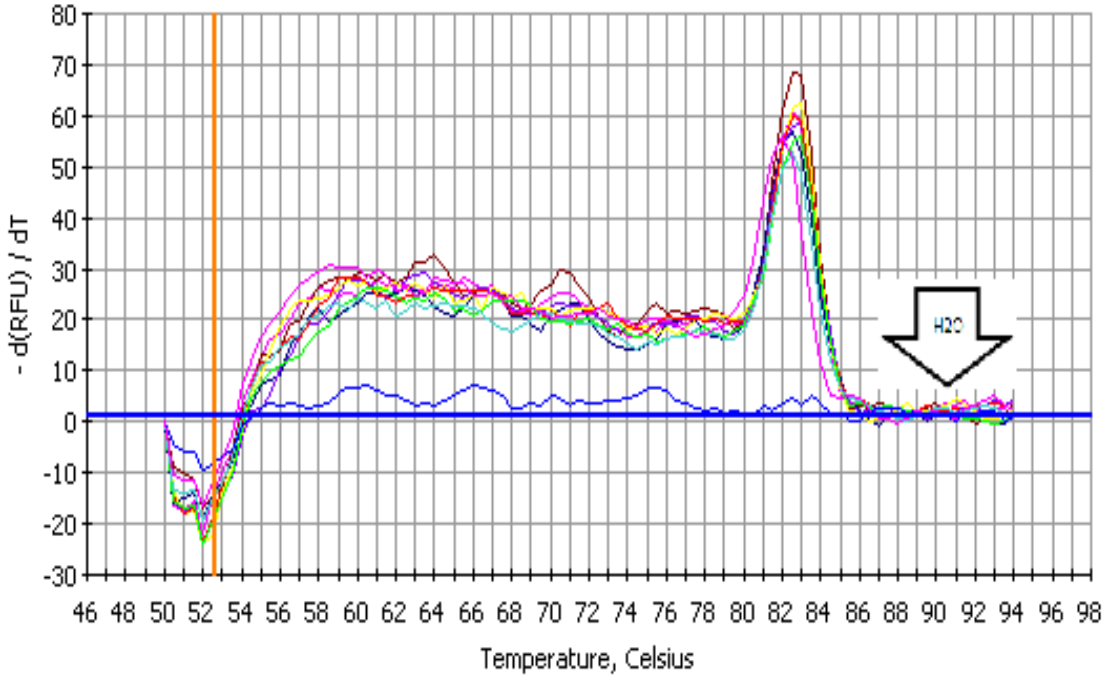


شکل ۲- نمودار تکثیر و حدود آستانه تکثیر ژن *actin* در گیاهان به تیمار شده با بیون و شاهد.

Figure 2- Graph for amplification and threshold value of the *actin* gene Bion-treated and control *Cydonia oblanga* plants.

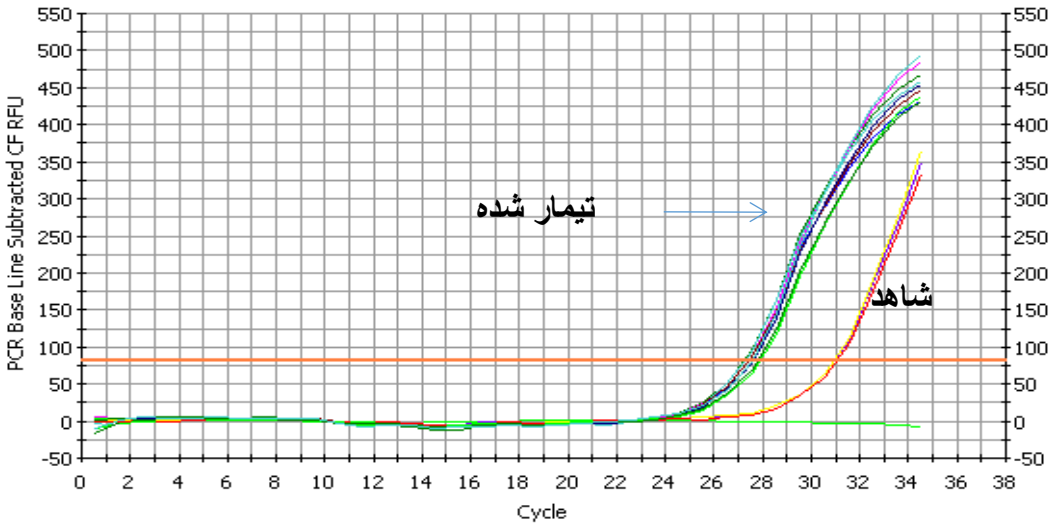
www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳- نمودار ذوب تکثیر ژن *actin* در گیاهانبه تیمار شده با بیون و شاهد.

Figure 3- Melting pattern for *actin* gene amplification in bion-treated and control *Cydonia oblanga* plants.

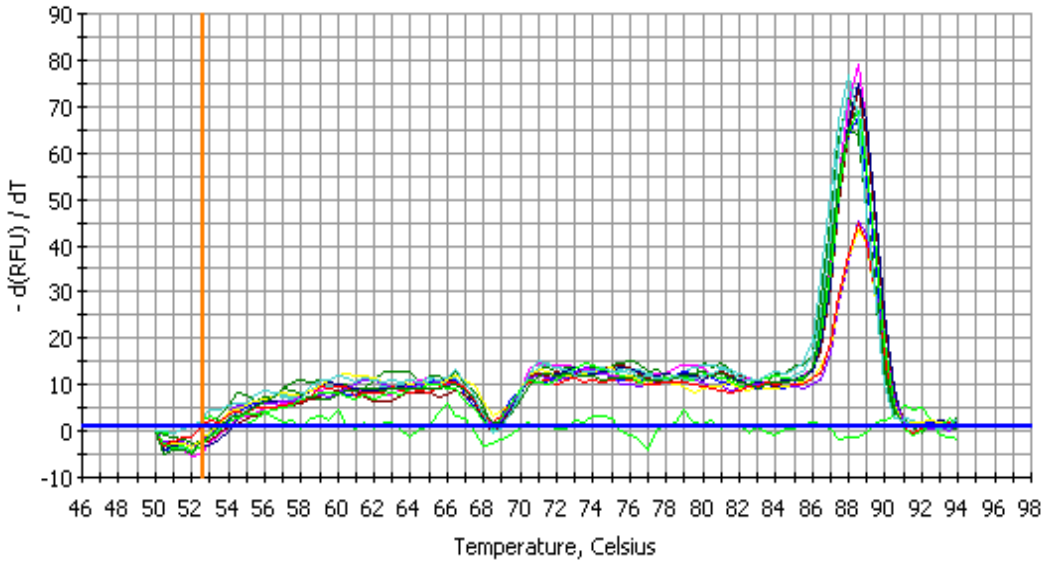


شکل۴- نمودار تکثیر و حدود آستانه ژن *PR1* در گیاهان به تیمار شده با بیون و شاهد.

Figure 4- Amplification and limit pattern for *PR1* gene in bion-treated and control *Cydonia oblanga* plants.

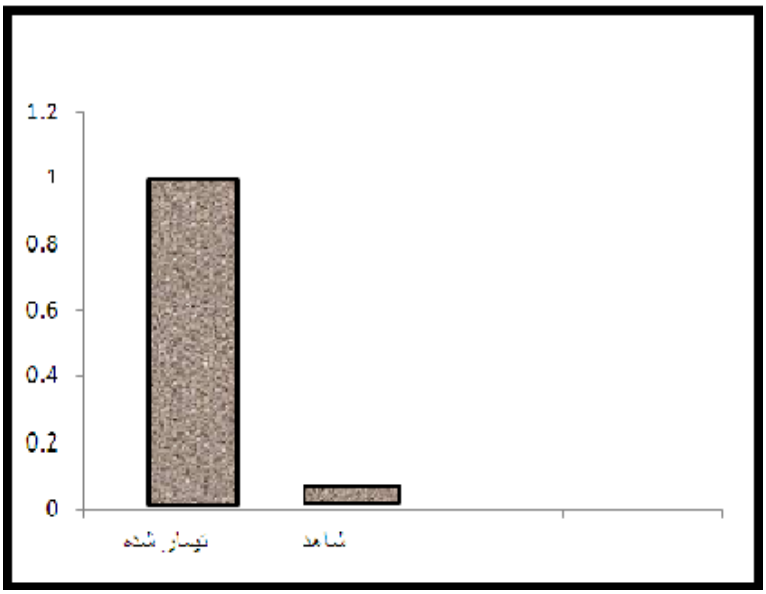
www.SID.ir

Archive of SID



شکل۵- نمودار ذوب تکثیر ژن *PR1* در گیاهان به تیمار شده با بیون و شاهد.

Figure 5- Melting pattern for *PR1* gene amplification in bion-treated and control *Cydonia oblanga* plants.



شکل۶-مقایسه بیان نسبی ژن *PR1* بین گیاهان به تیمار شده با بیون و شاهد.

Figure 6- Comparison of relative expression of *PR1* gene between bion-treated and control *Cydonia oblanga* plants.

در بررسی گیاهان تراریخته توتون که در آن پروتئین‌های PR1 اسیدی خاموش شده بودند، پس از تیمار با اسید سالسیلیک، بیان پروتئین PR1g بازی افزایش یافت و میزان فعالیت بتا-۱-۳ گلوکوناز (که توسط ژن *PR2* بیان می‌شود) در فضای بین سلولی بالا رفت اما

www.SID.ir

Archive of SID

میزان کالوز کاهش یافت. این گیاهان پس از تیمار با پروتئین PR1 نوترکیب، حالت برگشت نشان دادند (Riviere*et al*., 2008). این محققان نتیجه گرفتند که پروتئین‌های PR1 اسیدی نقش تنظیمی در کاهش پروتئین‌های بازی و کاهش فعالیت گلوکانازها در فضای خارج سلولی دارند که احتمالا با اتصال پروتئین‌های PR1 اسیدی با گلوکانازها صورت می‌گیرد. مطالعات در گیاه آرابیداپسیس نشان داد که فعال شدن PR1 از طریق NPR1 (Nonexpressor of pathogenesis-related proteins) و عناصر نسخه برداری گروه TGA2 صورت می‌گیرد (Rochon*et al*., 2006). سالیسیلیک اسید مسیرهای سیگنالی دفاعی را از طریق ملکول‌های سیگنال NPR1 فعال می‌کند. این مولکول‌هادر سیتوزول به‌صورت غیر فعال وجود دارد و اسید سالیسیلیک آن‌ها را احیا و فعال می‌کند. مولکول-های فعال شده از سیتوزول به هسته منتقل شده و بیان ژن‌های دفاعی را تحریک می‌کنند (Brosche and Kanagasjavi, 2012; Lindermayer *et al*., 2010; Tada *et al*., 2008). با افزایش اسیدسالیسیلیک، پروتئین NPR1 در هسته با فاکتور نسخه برداری TGA2 (که کنترل منفی بیان ژن *PR1* را برعهده دارد) واکنش نموده و با خارج کردن آن از روی DNAی هدف، آن‌را غیرفعال می‌کند که در نتیجه، بیان ژن‌های دفاعی از جمله PR1 فعال می‌شود (Boyle *et al*., 2009).

مکانسیم عمل پروتئین‌های دفاعی خانواده PR1 در گیاهان هرچه باشد، توالی یابی آن‌ها نشان می‌دهد که در گیاهان به‌شدت حفاظت شده و فراوان هستند که موید این است که از منشا تکوینی واحدی نشات گرفته‌و فعالیت آن‌ها برای بقای موجودات زنده ضروری است (Edreva, 2005; Van Loon, 2001). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که پروتئین‌های دفاعی خانواده PR1، بخشی از مکانیسم دفاعی القا شده در گیاه به هستند که نسخه برداری ژن‌های کدکننده آن‌ها متعاقب تحریک با مواد محرک دفاعی چندین بار افزایش می‌یابد. براین اساس، نقش و نحوه اثر ماده محرک بی‌خطر بیون در القای سیستم‌های درونزاد مقاومت گیاهی بیشتر مشخص می‌شود.

منابع

Abdel-Monaim MF, Ismail ME, Morsy KM (2012). Induction of systemic resistance in soybean plants against Fusarium wilts disease by seed treatment with Benzothiadiazole and humic acid. African Journal of Biotechnology 110: 2454-2465.

Adrienne CS, Barbara JH (2006). Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. Eukaryot Cell 5: 1941-1949.

Alexander DR, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein1a. Proceedings National Academyof Sciences U.S.A 90:7327-7331.

www.SID.ir

Archive of SID

Baysal O, Laux P, Zeller W (2002). Systemic acquired resistance (SAR) against fireblight. Acta Horticulturae 590: 269-272.

Balajoo OM, Kesahavarzi M, Zahabi A, Danesh YR, Haghjuyan R (2012). Protective effect of acibenzolar-s-methyl on fireblight severity in quince and characterization of the Erwiniaamylovora strains involved. Journal of Plant Pathology 94: 211-214.

Boyle P, Su E, Rochen A, Shearer H, Murmu S,Chu J, Fobert P,Despre C (2009). The BTB/POZ Domain of the Arabidopsis disease resistance protein NPR1 Interacts with the repression domain of TGA2 to Negate Its Function. Plant Cell 21: 3700-3713.

Brisset MN,Cesbron S,Thomson SV, Paulin JP (2000). Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fireblight. European Journal of Plant Pathology 106: 529-536.

Brosche M, Kangasjarvi J (2012). Low antioxidant concentrations impact on multiple signaling pathways in Arabidopsis thaliana partly through NPR1. Experimental Botany 63: 1849-1861.

Cao Y,Yang Y, Zhang H, Li D, Zheng Z (2008). Overexpression of a rice defense-related F-box protein gene OsDRF1 in tobacco improves disease resistance through potentiation of defense gene expression. Physiol Plant 134:440-452.

Durrant WE, Dong X (2004). Systemic acquired resistance. Annual Review ofPhytoPhatology 42: 158-209.

Edreva A (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. General and Applied Plant Physiology 31: 105-124.

Faize M, Faize L, Koike N, Ishizaka M, Ishii H (2004). Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiating of multiple defense responses. Phytopathology 94: 604-612.

Francis MI,Redondo A, Burns JK, Graham JH (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.

Godard JP,Ziadi S, Monot C, Le Corre D,Silue D (1999). Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (Brassica oleraceavar botrytis) to downy mildew of crucifers caused by Peronosporaparasitica. Crop Protection 18: 397-405.

Hassan MAE, Buchenauer H (2007). Induction of resistance to fire blight in apple by acibenzolar-S-methyl and DL-3-aminobutyric acid. Plant Diseases and Protection 114: 151-158.

Herman MAB, Davidson JK, Smart CD (2008). Induction of plant defense gene expression by plant activators and Pseudomonas syringaepv. tomato in greenhouse-grown tomatoes. Phytopathology 98:1226-1232.

Ishii H, Tomita Y, Hirio T, Narusaka Y, Nakazawa Y,Ivamoto S (1999). Induced resistance of Acibenzolar-S-methyl to cucumber and Japanese pear diseases. European Journal of Plant Pathology 105:77-85.

Li D, Liu H,Zhang H, Wang A, Song F (2008). OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defense responses against pathogen infection and oxidative stress. Experimenal Botany 59:2133-2146.

Lindermayr CS, Cell B, Muller B, Leister D,Duner J (2010). Redoxregulation of NPR1-TGA1 system of Arabidopsis thaliana by nitric oxide. Plant Cell 22: 2894-2907.

Liu H,Wang X, Zhang H, Yang Y, Ge X, Song F (2008). A rice serine carboxypeptidase-like gene OsBISCPL1 is involved in regulation of defense responses against biotic and oxidative stress. Gene 420:57-65.

LuoH, Song F, Goodman RM, Zheng Z (2005). Up-regulation of OsBIHD1, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses. Plant Biology 7:459-568.

www.SID.ir

Archive of SID

Maloni M, Venisse JS, Chevreau E (2005). Expression of a bacterial effector, harpinN, causes increased resistance to fire blight in Pyruscommunis. Tree Genetic Genomes 1: 41-49.

Maxon-Stein K, He ES, Hammerschmidt RJones A (2002). Effect of treating apple trees with Acibenzolar-S- methyl on fire blight and expression of pathogenesis related protein genes. Plant Disease 86:785-790.

Moffat AS (2001). Finding new ways to fight plant diseases. Science 292: 270-273.

Niderman T, Genetet I, Bruyère T, Gees R, Stintzi A,Legrand M,Fritig B, Mösinger E (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against Phytophthorainfestans. Plant Physiology 108: 17-27.

Rauscher M, Ádám AL, Wirtz S, Guggenheim R, Mendgen K, Deising HB (1999). PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. Plant Journal 19: 625-633.

Riviere M, Marais A, Ponchet M, Willats W, Glliana E (2008). Silensing of acidic pathogenesis-related PR1 genes increases extracellular (1-3)-glucanase activity at the onset of tobacco defense reactions. Experimental Botany 59: 1225-1239.

Rochon A,Boyle P, Wings T, Fobert PR, Despres C (2006). The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. Plant Cell 18: 3670-3685.

Sarhangi N, Shakib AM, Keshavarzi M, Ebrahimi MA, Ahmad-Raji M (2015). Effect of the BTH chemical elicitor on expression of the PR2 gene and fire blight disease severity in quince. Seed and Plant Journal 31: 249-262 (In Farsi).

Shahini S, Keshavarzi M,Hasanzadeh N, Hashemi M,Abdollahi H, Tavoosi M (2010). In vitro evaluation of Acilbenzolar-S-methyl on inhibition of fire blight in apple c.v. Golden delicious. Iranian Journal of Plant Pathology 46: 77-79. (In Farsi).

Sparla F, Rotino L, Valgimigli CM, Pupillo P, Trost P (2004). Systemic resistance induced by Benzothiadiazole in pear inoculated with the agent of fireblight. ScientiaHorticulturae 101: 269-279.

Suo Y, Leung DWM (2002). BTH-induced accumulation of extracellular proteins and blackspot disease in repse. BiologiaPlantarum 42: 273-279.

Tada Y,Spoel SH, Pajerowaka-Mukhtar K,Moo ZS, Song JQ, Wang C, Zuo JR, Dong XN (2008). Plant immunity erquires conformational charges of NPR1 via S-nitrosylation and thioredxins. Science 321: 952-956.

Van Loon LC (2001). The families of pathogenesis-related proteins. The6th International Workshop on PR-proteins. Spa, Belgium: 9-10.

Van Loon LC, Strrain EA (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their functionsand comparativeanalysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85-97.

Yamakawa T, Miyata S, Ogawa N, Koshikawa N, Yasumitsu H, Kanamori T, Miyazaki K (1998). cDNA cloning of a novel trypsin inhibitor with similarity to pathgenesis-realted proteins and its frequent expression in human brain cancer cells. Biochemica et BiophysicaActa 1395: 202-208.

Zhang W, Chen JJ, Zhang H, Song F (2008). Overexpression of a rice diacylglycerol kinase gene OsBIDK1 enhances disease resistance in transgenic tobacco. Molecular Cells 26:258–264.

Ziadi S, Barbedette S, Godard JF, Monot C, Corre DL, Silue D (2001). Production of pathogenesis related proteins in the cauliflower (Brassica oleracea var. botrytis)-downy mildew (Perenosporaparasitica) pathosystem treated with Acibenzolar-S-methyl. Plant Pathology 50:579-586.

www.SID.ir

Archive of SID

Increasing expression of the *PR1* gene in quince (*Cydonia oblanga*) by application of Bion elicitor

Sarhangi N.[1], Keshavarzi M.[2*], Shakib A.M.[3], Ebrahimi M.A.[4]

[1] Graduated M.Sc. Student, Payame Nour Univ., Karaj, Iran.
[2]Associate Professor, Horticultural Research Institute, Cold and Temperate Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.
[3]Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj
[4]Associate Professor, Payame Nour Univiversity, Karaj, Iran.

Abstract

One of the safe methods for fire blight disease management in quince plant (Cydonia oblanga) is through activating plant indigenous defense systems using defense elicitors such as Bion (Benzothiadiazole). Investigating the effect of PR1 defense genes group in induced defense mechanism by Bion in quince was the purpose of this study. For this, RNA was extracted from leaf tissues of bion-sprayed (400 mg/L) and water sprayed (control) plants was used for cDNA synthesis. First, a 750 bp fragment of the actin gene from quince, as a house keeping gene, was cloned and sequenced. The result of sequencing showed it has 99% homology with appleactin gene. Specific primers for quince actin gene were designed and used to study changes in PR1 gene expression in bion-treated comparing control plants using real-time PCR method. Based on the results, Bion treatment caused 10 times increase in the PR1 gene expression. Based of result, the effect of Bion in relative control of fire blight in quince can partly be related to PR1 defense proteins activities.

Keywords: *Quince, Actin, Defense proteins, Real-Time PCR.*

www.SID.ir