تاثیر متیل‌جاسمونیت روی الگوی بیان برخی ژن‌های کاندیدای پاسخ‌های دفاعی در برنج

سیّده حمیده کاروانکش[۱]، علی اعلمی*[۱]، رضا شیرزادیان خرم آباد[۱] و فریدون پاداشت[۲]

[۱]گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان و[۲]استادیار پژوهشی-موسسه تحقیقات برنج کشور.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۰)

چکیده:

جاسمونیک اسید از جمله تنظیم کننده‌های رشد گیاهی محسوب می‌شود که نقش مهمی در سازوکار دفاعی گیاهان نسبت به تنش های محیطی به خصوص القای ژن‌های دفاعی در مواجهه با عوامل بیماری‌زا دارد. پس از هجوم پاتوژن به گیاه، تغییر در میزان بیوسنتز هورمون‌های کلیدی سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن، القای ژن‌های دخیل در سنتز فیتوالکسین، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis Related Protein) و پروتئین‌های ناقل (ABC transporter) جزء مهم‌ترین واکنش های دفاع گیاهی است. بر این اساس، در این مطالعهتأثیرمصرف متیل جاسمونات بر بیان تعدادی از ژن‌های مرتبط با سازوکارهای دفاعی شامل PR1، PDF1.2، Thionin، NPR1، PDR3، PDR4، PDR5 وPDR8 با استفاده از تکنیک Real Time PCR در دو رقم خزر و هاشمی در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. نتایج نشان داد مصرف متیل جاسمونات سبب افزایش بیان همه ژن های مورد بررسی شد که این افزایش در ساعات مختلف به خصوص در ساعات ۱۲، ۲۴ و ۴۸ بین دو رقم متفاوت بود ولی بطور کلی میزان بیان در رقم خزر نسبت به هاشمی از اختلاف معنی داری برخودار بود. این نتایج نشان می‌دهد مصرف جاسمونیک اسید و یا القای سنتز این ترکیب در گیاه احتمالاً می‌تواند از طریق افزایش بیان ژن‌های دفاعی سبب القای مقاومت به بیماری در گیاه برنج شود. همچنین بیان ژن‌های دفاعی و سازوکار دفاعی تا حد زیادی به ماهیت ژنتیکی گیاه وابسته است.

واژه‌های کلیدی: برنج، پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی، پروتئین‌های ناقل، متیل جاسمونیت.

مقدمه:

متوسط تولید برنج در سال ۲۰۱۱ در حدود ۲/۹۷ تن در هکتار بوده که نسبت به سال ۲۰۰۹ با میزان ۲/۸۴ تن در هکتار، با افزایش تولید همراه بوده که این افزایش تا حدودی به مصرف بالای نهاده‌های کشاورزی مربوط می شود. اما مشکلی که جهان در تولید برنج با آن روبه رو است افزایش روز افزون مصرف ترکیبات و سموم شیمیایی و اثرات مخرب زیست محیطی آنها بر پیکره طبیعت می‌باشد (Tann *et al.*, 2012). لذا راهکار افزایش تولید محصولات زراعی با روش‌های مصرف حداقل نهاده های شیمیایی و استفاده از روش‌های مناسب به زراعی و به نژادی با هدف افزایش سطح مقاومت گیاهان به خصوص نسبت به آفات و بیماری‌ها توصیه می‌شود. امروزه تحقیقات گسترده‌ای برای شناخت ماهیت مقاومت، ترکیبات و عوامل مولکولی دخیل در مسیرهای تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی در حال اجرا است. تاکنون سه هورمون کلیدی سالسیلیک اسید (SA)، اتیلن (ET) و جاسمونیک اسید (JA) در گیاهان شناسایی شده‌اند که با

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: ali_aalami@guilan.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

شکل‌گیری شبکه انتقال پیام و راه اندازی مجموعه‌ای از واکنش‌ها، مسئول سازگاری فیزیولوژیکی گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌باشند (Memelink, 2009).

جاسمونات‌ها ترکیبات سیکلوپنتان مشتق شده از لیپید هستند که، با توجه به نقش آن‌ها به عنوان تنظیم‌کننده مؤثر در واکنش‌های مربوط به تنش‌های محیطی، در همه‌ی بخش‌های گیاهان حضور دارند. مطالعات نشان داده برخی تغییرات که در مجموعه‌ی ژن‌های بیان شده پس از بروز تنش‌ها رخ می‌دهد، مشابه تغییراتی است که پس از تیمار جاسمونیک اسید در گیاهان ایجاد می‌شود (Wasternack, 2004). جاسمونیت‌ها از جمله جاسمونیک اسید و متیل جاسمونیت از طریق تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها، آلکالوئیدها و فنیل پروپانوئیدها که دارای خصوصیات ضد قارچی می‌باشند در القای مقاومت به بیماری نقش تعیین کننده دارند. تولید فیتوآلکسین‌ها در برنج نمونه‌ای از تولید متابولیت‌های ثانویه بعد از تیمار با جاسمونیت‌ها می باشد (Zhao *et al.*, 2005). از جمله ژن‌های مهم در مسیر جاسمونیک اسید که با فرایندهای دفاع گیاهی مرتبطاند می‌توان به ژن تنظیم کننده *NPR1* و ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی (Pathogenesis Related Proteins) و هم‌چنین ژن‌های رمز کننده پروتئین های ABC-Transporter، به خصوص زیر خانواده *PDR* اشاره کرد. *NPR1* (Non-Expresser of Pathogenesis Related Genes 1)، یک ملکول کلیدی واسطه است که پس از بروز تنش از سیتوپلاسم به هسته مهاجرت کرده و به همراه فاکتورهای رونویسی سبب رونویسی ژن‌های دفاعی در گیاه می‌شود (McDowell and Woffenden, 2003). پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی شامل مجموعه‌ی پروتئین‌های القا شده توسط میکروب‌ها هستند که در زمان حمله بیمارگرها به گیاهان، به‌عنوان یکی از ترکیبات اساسی در مکانیسم دفاعی گیاه در نظر گرفته می‌شوند. این پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، توالی اسید آمینه، روابط سرولوژیکی و محل و نوع فعالیت بیولوژیکی به ۱۷ خانواده تقسیم شدند (Edreva, 2005; VanLoon, 2006) و نقش تعداد زیادی از این پروتئین‌ها در گیاهان بررسی شده است. این پروتئین‌ها بر اساس خانواده‌ای که به آن تعلق می‌گیرند، دارای خصوصیات ضد قارچی، کیتینازی، پروتئینازی، پراکسیدازی، ریبونوکلئازی و یا غیره می‌باشند (Sels *et al.*, 2008). دفنسین‌ها (Plant *PDF1.2:* Defensin) و تیونین‌ها (Thionin) گروه مهمی از پلی پپتید های ضد میکروبی هستند که به ترتیب به خانواده *PR12* و *PR13* تعلق دارند (VanLoon *et al.*, 2006). این پپتیدها در غلظت‌های کم و در شرایط درون شیشه ای (*In vitro*) فعالیت ضد قارچی در مقابل طیف وسیعی از قارچ‌ها نشان داده و از رشد طولی هیف جلوگیری نموده و باعث تغییر نفوذپذیری غشای سلول های قارچ می‌شوند (Portieles *et al.*, 2006). دفینسین‌هایی که در مقابل آلودگی بیمارگرها القا می‌شوند در نخود، تنباکو، آرابیدوبسیس و صنوبر شناسایی شده‌اند. علاوه بر تحریک توسط بیمارگرها، می‌توانند به وسیله تنش‌های محیطی و مولکول‌های سیگنال مانند متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید تحریک شوند (Castro and Fontes, 2005). ژن‌های *PDR* (resistance Pleiotropic drug)رمز کننده دسته بزرگی از خانواده ناقل‌های پروتئینی *ABC-Transporter* هستند که تاکنون ۲۳ عضو از آن‌ها در گیاه برنج کشف شده است. وظیفه‌ی این ناقل‌های پروتئینی که عمدتاً در غشای پلاسمایی قرار دارند انتقال ترکیبات ضد میکروبی همچون فیتوالکسین‌ها با مصرف انرژی می‌باشد. مطالعات نشان داده بیان این ژن‌ها عمدتاً پس از حمله پاتوژن و یا تیمار با تنظیم کننده‌های مسیرهای دفاع گیاهی تغییر می کند. به عنوان نمونه، بیان ژن *OsPDR3* بعد از تیمار برنج ژاپنی واریته نیپون بیر (*Nipponbare*) با جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید در بافت‌های برگی و هم‌چنین ریشه افزایش نشان داد (Moons, 2008). Jantasuriyarat و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که میزان بیان ژن‌های *OsPDR5* و *OsPDR8* بعد از تیمارهای هورمونی از جمله

Archive of SID

www.SID.ir

تیمار جاسمونیک اسید، در برگ‌های آلوده به قارچ عامل بیماری بلاست (*Pyricularia Oryzae*) افزایش یافت. همچنین Moons (۲۰۰۸) گزارش کرد که میزان بیان ژن *OsPDR4* در همه‌ی اندام‌های واریته نیپون بیر در گیاه برنج افزایش یافت. با توجه به مطالعات متعدد و تأیید نقش کلیدی هورمون متیل جاسمونات در مکانیسم دفاعی گیاهان، در پژوهش حاضر سعی شدتأثیراین ترکیب بر بیان چند ژن مهم مرتبط در سازوکارهای دفاعی مطالعه شده و ارتباط مولکولی متیل‌جاسمونیت در تنش‌های زیستی در دو رقم برنج ایرانی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها:

در پژوهش حاضر رقم هاشمی به عنوان رقم بومی و رایج منطقه و خزر به عنوان رقم اصلاح شده مورد بررسی قرار گرفتند. از خصوصیات مهم این دو رقم که سبب انتخاب آنها در این تحقیق شد، مقاومت به بیماری شایع بلاست برای رقم خزر و حساسیت برای هاشمی می‌باشد که بر اساس مطالعات موسسسه تحقیقات برنج کشور در رشت صورت گرفته است (موسی نژاد و همکاران، ۱۳۹۰). بذور دو رقم از موسسه تحقیقات برنج در رشت تهیه و پس از ضدعفونی و جوانه دار شدن به تعداد پنج عدد در هر گلدان پلاستیکی حاوی نسبت مشخصی از خاک مزرعه، کود برگی و پیت ماس در شرایط استریل کشت شد. گیاهان در مرحله چهار برگی از رشد تحت تیمار اسپری پاشی متیل جاسمونات (Duchefa) با غلظت مؤثر ۱۰۰ میکرومولار (Taheri and Tarighi, 2010; Peremarti *et al.*, 2010) اسپری پاشی قرار گرفته و در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار نمونه گیری از برگ انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

روش Real time PCR: ابتدا استخراج RNA مطابق دستورالعمل کیت RNX-plus ™ (سیناژن) انجام و پس از بررسی کمیت و کیفیت RNA با دستگاه اسپکتوفتومتر (Eppendorph AG 22331) و ژل آگارز ۱٪، cDNA مطابق با دستورالعمل First Strand cDNA Synthase (Fermentase) ساخته شد. جهت بررسی کیفیت cDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *18S rRNA*، cDNA مورد نظر در فرآیند PCR تکثیر شده و کیفیت ساخت cDNA توسط واکنش‌های کنترل منفی و مثبت روی ژل آگاروز مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق شامل *PR1*، *PDF1.2*، *Thionin*، *NPR1*، *PDR3*، *PDR4*، *PDR5* و *PDR8* بودند که میزان بیان آن‌ها با استفاده از تکنیک Real time PCR در گیاهان شاهد و تیمار شده مورد مقایسه قرار گرفت. از ژن *18s* ریبوزومی نیز به عنوان ژن مرجع جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. توالی آغازگرهای این ژن‌ها در جدول ۱ ذکر شده است. در این آزمایش از مخلوط واکنش SYBR Green شرکت فرمنتاز استفاده شد که اجزای واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط SYBR Green، ۲ میکرولیتر cDNA، ۲ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیشرو و پسرو ژن مورد نظر و آب دوبار تقطیر به میزان ۶/۵ میکرولیتر بوده و واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه تکثیر شامل یک دوره واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ دوره مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵°c به مدت ۱۰ ثانیه و اتصال آغازگر ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷ °c بود، هم‌چنین بسط آغازگر به مدت ۱۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. منحنی ذوب نیز در دمای ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد تهیه شد.

تجزیه داده ها: محاسبات داده‌های Real Time PCR بر اساس روش $\Delta\Delta$ ct (Hunt, 2006) و با داده‌های ژن مرجع نرمال شدند. سپس این داده‌ها بر اساس آزمایش اسپیلت پلات در زمان در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه شدند. برای رسم نمودارهای مربوطه نیز از برنامه Excell استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱- آغازگرهای مورد استفاده جهت qPCR

ژن	آغازگر	منابع
18s (ژن مرجع)	F:CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA R:ACACTTCACCGGACCATTCAA	(Jain *et al*., 2006)
NPR1	F:TGGCAGGTGAGAGTCTACGA R:AGGTGGATTTGCACCAGAAC	(Sugano *et al.,* 2010)
PDR3	F:TTGCTTGGAGCCACTTATGC R:CCTCTTTAGCTGCAAGTGGC	(Moons, 2008)
PDR4	F:GTACAATTTACTCGGAGCCACT R:TGTCTGTGCTATGCCATTGC	(Moons, 2008)
PDR5	F:TCCGTGAATGATCTGAACAATC R:GATTGACATCCTGCTGGACAC	(Moons, 2008)
PDR8	F:GAGCAGCTGGCATGTATTCAG R:GTCAAGAGGCAGGAAGCTCA	(Moons, 2008)
PR1	F:CGCTGTGTGTTTGTGTTATGTC R:CGTGGTTTTGTCTTTATTTCAATCC	(Mitsuhara *et al*., 2008)
PDF1.2	F:ATCACCCTTATCTTCGCTGC R:TGCTGGGAAGACATAGTTGC	(Qu et al., 2010)
Thionin	F:GCTAGGCTTAGTCCTGCAAC R:GGTGACAGTCTCAGCTTCCT	(Liu et al., 2008)

نتایج و بحث:

در این پژوهش اثر هورمون متیل جاسمونیت به عنوان یک عامل کلیدی در القای مقاومت و هم‌چنین تأثیر بر الگوی بیان ژن‌های دفاعی در دو رقم رایج برنج منطقه گیلان مورد بررسی قرار گرفت. وجود مقاومت به بیماری بلاست در رقم خزر و حساسیت در رقم هاشمی ویژگی قابل توجه‌ی دو رقم محسوب می‌شد که می‌توانست نتایج و عکس العمل‌های گیاه در پاسخ به متیل جاسمونیت را جالب و قابل توجه نماید. بر این اساس تأثیر مصرف متیل جاسمونات بر الگوی بیان چند ژن مرتبط با سازو کارهای دفاعی در این دو رقم مطالعه شدند.

نتایج آزمایش نشان داد بیان *PR1* به صورت معنی‌دار در رقم خزر نسبت به هاشمی افزایش یافته، به طوری که در ۲۴ ساعت بعد از تیمار به حداکثر میزان خود رسید (شکل ۱a). برطبق گزارشات Mitsuhara و همکاران (۲۰۰۸) و Crute و Pink (۱۹۹۶) تنها نسبت کمی از ژن های *PR1* از بین تعداد زیاد اعضای این خانواده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و اطلاعات نسبتاً کمی در این رابطه در گیاهان موجود است. به عنوان مثال در گیاه توتون ژن های *NtPR1* نوع *a*، *b* و *c* از گروه پروتئین‌های اسیدی و ژن‌های *NtPRB1* و *NtPRB1b* از گروه پروتئین‌های بازی گزارش شده است. هم‌چنین بیان ژن*PR1 (At14610)* در واکنش با پاتوژن در گیاه آرابیدوپسیس شناسایی شده است (Mitsuhara *et al.,* 2008).

نتایج حاصل از مطالعات Agrawal و همکاران (۲۰۰۱) القای بیان دو ژن *OsPR1a* و *OsPR1b* در گیاه برنج را پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری بلاست (*Pyricularia oryzae*) نشان داد، همچنین بیان این ژن ها در پاسخ به تنش‌های محیطی و تیمار مواد شیمیایی نیز گزارش شده است (Agrawal *et al.,* 2000). به عنوان مثال Mitsuhara و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که ژن *OsPR1* دارای بالاترین میزان بیان پس از تیمار با سالیسیلیک اسید نسبت به ترکیبات سیگنال دفاعی دیگر مانند ACC می‌باشد. این ژن به تیمار متیل جاسمونیت نیز واکنش داده اما در اثر ایجاد زخم در گیاه بیان نمی‌شود. بیان این ژن پس از آلودگی به قارچ بلاست و بلایت باکتریایی به ترتیب در ۳ و ۸ روز پس از تلقیح به حداکثر رسید که نشان‌دهنده ارتباط این ژن با سیستم دفاعی گیاه برنج برعلیه بیماری بلاست می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

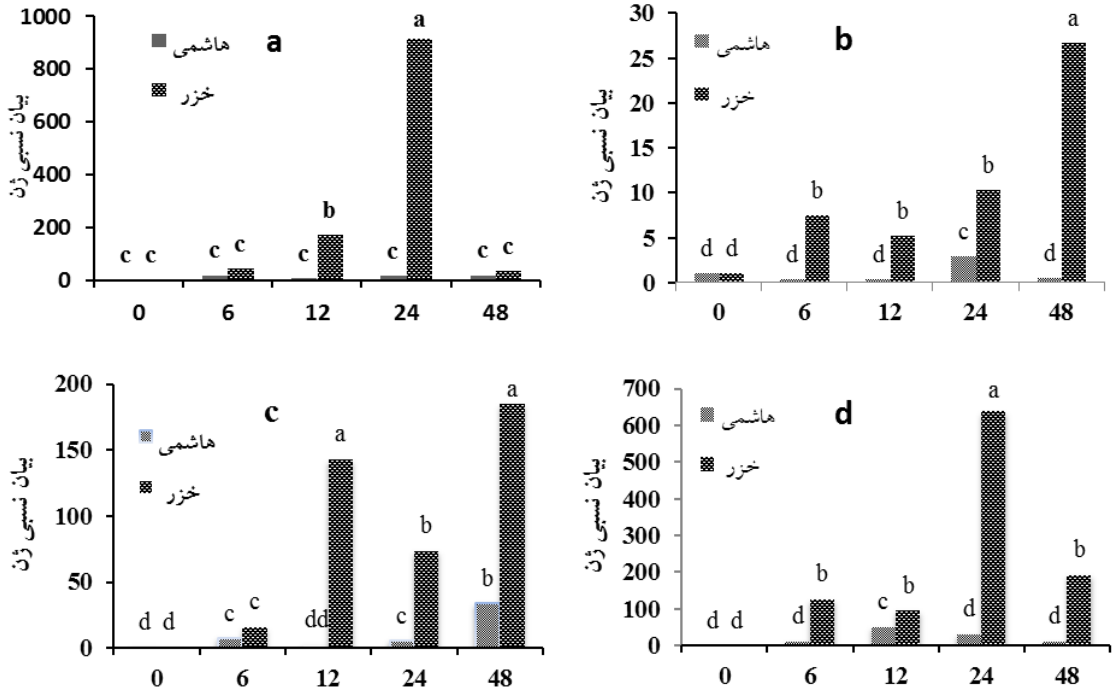
نتایج بدست آمده از بررسی بیان ژن *PDF1.2* (دفاعگر) در این آزمایش نشان داد که در اثر تیمار متیل جاسمونات در ابتدا سطح پایین‌تری از میزان بیان این ژن در ساعات اولیه ۶ و ۱۲ ساعت در هر دو رقم مشاهده شد اما به تدریج، بیان این ژن در ساعت ۲۴ در رقم هاشمی و سپس با تفاوت معنی‌داری در ساعت ۴۸ برای رقم خزر افزایش یافت (شکل 1b). ساداتی و همکاران (۱۳۹۱) در پژوهش مشابه‌ای الگوی بیان این ژن را در دو رقم خزر و طارم در برهم‌کنش با قارچ عامل بیماری بلاست بررسی نموده و نشان دادند بیان این ژن در ۲۴ ساعت پس از آلودگی در رقم خزر به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت که نشان‌دهنده تلاش گیاه در جهت جلوگیری از رشد هیف قارچ می‌باشد. دفاعگرهایی که در مقابل آلودگی بیمارگرها القا می‌شوند تا کنون در نخود، تنباکو، آرابیدوبسیس و صنوبر نیز شناسایی شده‌اند. علاوه بر تحریک توسط بیمارگرها، این ژن‌ها می‌توانند به وسیله تنش‌های محیطی و مولکول‌های سیگنال مانند متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید نیز تحریک شوند. Que و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند تیمار جاسمونیک اسید در آرابیدوپسیس سبب القای بیان ژن *PDF1.2* و افزایش مقاومت آرابیدوپسیس به قارچ *Botrytis cinerea* می شود. تحقیقات انجام گرفته پیرامون اثر دفاع‌گرها روشن نموده که این پروتئین‌ها دارای فعالیت ضد قارچی قوی بوده و با تغییر مورفولوژیکی در هیف قارچ-های هدف باعث توقف رشد و ایجاد اختلال در نفوذ آن‌ها به سلول‌های میزبان می‌شوند (Castro and Fontes, 2005).

نتایج بدست آمده از مقایسه بیان ژن تیونین نشان داد که تیمار متیل‌جاسمونات سبب افزایش بیان ژن تیونین در رقم هاشمی در ساعت ۱۲ پس از تیمار شده در حالیکه میزان بیان ژن مذکور در رقم خزر در ۲۴ ساعت پس از تیمار دارای بیش‌ترین مقدار بود. البته در مقایسه بیان این ژن در رقم خزر نسبت به هاشمی از مقدار بیشتری برخوردار بوده است (شکل 1c). ساداتی و همکاران (۱۳۹۱) نیز در تحقیق مشابهی بر روی گیاه برنج گزارش کردند میزان بیان ژن تیونین پس از تیمار با قارچ عامل بلاست افزایش یافته و در زمان ۴۸ ساعت دارای بیش ترین مقدار بود. نتایج حاصل از پژوهش‌های قبلی نیز نشان داد که بیان ژن تیونین در دفاع علیه بیمارگرها در گیاهان افزایش می‌یابد (Castro and Fontes, 2005). اولین گزارش فعالیت ضد میکروبی این پروتئین‌ها در سال ۱۸۹۵ به‌نقل از Li و همکاران (۲۰۰۲) بیان شد. در مطالعه‌ای Iwai و همکاران (۲۰۰۲) نیز گزارش کردند که تیونین با تأثیر بر غشای سلولی و نفوذپذیری آن در واکنش‌های دفاعی گیاه دخالت دارد. نتایج حاصل از سایر مطالعات نیز نشان داد که این پروتئین‌ها از رشد طولی هیف جلوگیری کرده و باعث تغییر نفوذپذیری غشای سلول‌های قارچ می شوند (Molina *et al.,* 1993; Portieles *et al.,* 2006).

ژن *NPR1* به عنوان یک ژن کلیدی نقطه ارتباطی بین مسیر سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید می‌باشد که افزایش بیان این ژن در مقاومت علیه بیمارگر شیت بلایت و قارچ عامل بلاست برنج نشان‌دهنده حضور آن در مسیرهای دفاعی در گیاه برنج می‌باشد (Bai *et al.,* 2011). پروموتر *NPR1* در گیاه برنج دارای عناصر اختصاصی پاسخ به هورمون‌های سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید، آبسیزیک اسید و دیگر عناصر پاسخ به زخم، خشکی، قارچ، جیبرلین و اکسین است (Hwang and Hwag, 2010). در مطالعه حاضر بیان این ژن در ساعات اولیه پس از تیمار در رقم خزر نسبت به هاشمی افزایش یافته و کاهش معنی داری در زمان ۲۴ در رقم هاشمی مشاهده گردید. بیش ترین میزان بیان این ژن در هر دو رقم در ۴۸ ساعت پس از تیمار اتفاق افتاد (شکل 1d). مطالعات زیادی نشان‌دهنده افزایش مقاومت علیه بیماری‌ها توسط ژن *OsNPR1* و ارتولوگ‌های آن در گونه‌های مختلف گیاهی می‌باشد (Cao *et al.,* 1994; Friedrich *et al.,* 2008; Chern *et al.,* 2001; Lin *et al.,* 2004; Chern *et al.,* 2005; Meur *et al.,* 2008; Le Henanff *et al.,* 2009). به‌عنوان نمونه Sugano و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که حضور ژن *OsNPR1* در مقاومت علیه قارچ بلاست برنج مؤثر بوده و

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱- تاثیر متیل جاسمونیت بر الگوی بیان ژن‌های *PR1(a)*، *PDF1.2(b)*، *Thionin (c)* و *NPR1(d)* در دو رقم برنج خزر و هاشمی. حروف متفاوت نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

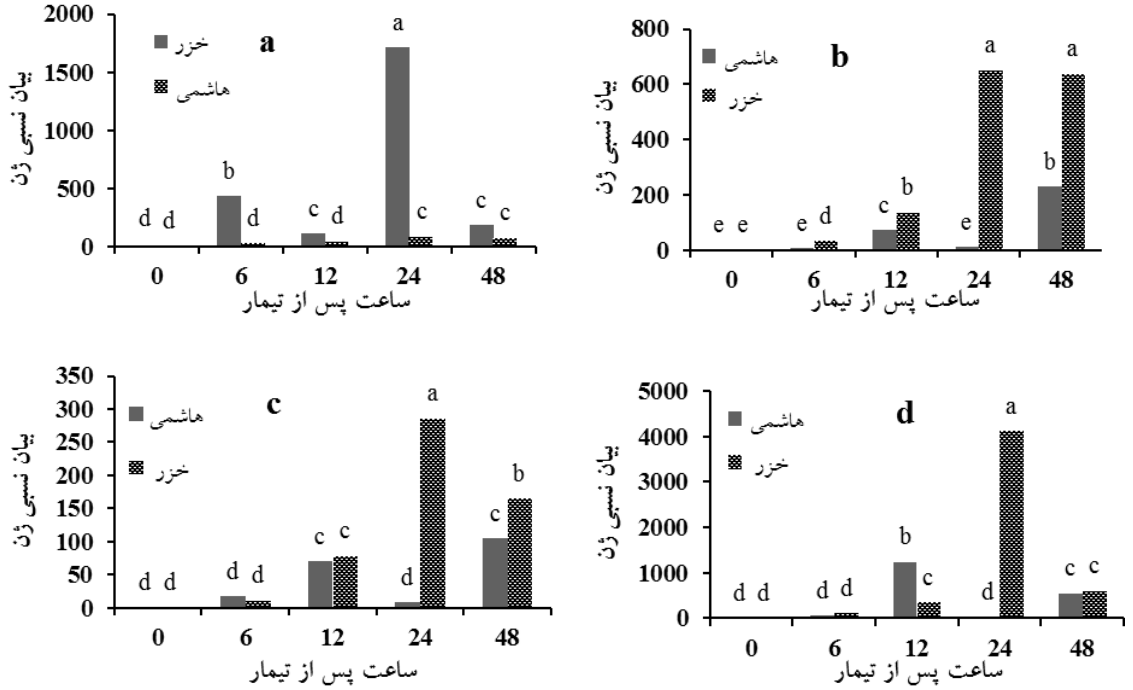
افزایش بیان این ژن پس از آلودگی به این قارچ مشاهده گردید. پژوهش‌های انجام شده در رابطه با ژن‌های مشابه با *NPR1* در گیاه برنج نیز نشان داد افزایش بیان *OsNPR1*، *OsNPR2* و *OsNPR3* سبب افزایش مقاومت به قارچ بلاست و شیت بلایت شدند (Bai *et al.*, 2011).

پروتئین‌های ABC-transporter در غشای سلولی همه جانداران شناسایی شده و مشخص شده با مصرف انرژی مواد را در خلاف جهت شیب غلظت منتقل می‌کنند. این ناقل‌ها قادرند مواد متنوعی شامل لیپیدها، یون‌های فلزات سنگین، اسیدهای غیرآلی، قندها، آمینواسیدها، پپتیدها و متابولیت‌های ثانویه متعددی از قبیل الکالوئیدها، ترپانوئیدها، پلی فنل‌ها و کوئنین‌ها را منتقل کنند. خانواده پروتئین‌های ABC-transporter دارای ۱۲۰ عضو در برنج و آرابیدوپسیس هستند که به ۳ زیر خانواده *PDR*، *MDR* و *MRP* تقسیم می‌شوند (Rea, 2007). یکی از مهم‌ترین وظایفی که برای زیر خانواده *PDR* بیان می‌شود تبادل ترکیبات ضد میکروبی یا فیتوآلکسین‌ها در سازوکارهای دفاعی گیاهان می‌باشد. *NtPDR1*, *NpABC1* و *SpTUR2* نمونه‌های بارزی از این دسته می‌باشند که در انتقال یک نوع ترپانوئید ضد قارچی مؤثر هستند. علاوه بر این مشخص شده که این ژن‌ها به وسیله تنظیم کننده‌های کلیدی سالیسیلیک اسید (SA)، متیل جاسمونیت (MJ) و اتیلن (ET) در مسیرهای پیام رسانی دفاع گیاهی القاء می شوند (Jasinski *et al.*, 2003; Moons, 2008). از جمله عوامل ضدمیکروبی که پس از حمله پاتوژن‌ها در گیاه تولید می‌شود و توسط ناقل‌های ABC منتقل می‌شود، فایتوالکسین‌ها هستند (Grayer and Kokubun, 2001). بر این اساس در این تحقیق الگوی بیان چهار ژن از زیر خانواده *PDR* مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج آزمایش نشان داد روند بیان ژن *PDR3* در هر دو رقم هاشمی و خزر صعودی بوده است به طوری که تقریباً در زمان ۲۴ بیش‌ترین میزان بیان و پس از آن کاهش معنی داری به خصوص برای رقم خزر در زمان ۴۸ مشاهده شد. (شکل ۲a). Moons (۲۰۰۸) در مطالعه مشابهی نشان داد

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲- تاثیر متیل جاسمونیت بر الگوی بیان ژن‌های *PDR3 (a)*، *PDR4 (b)*، *PDR5 (c)* و *PDR8 (d)* در دو رقم برنج خزر و هاشمی. حروف متفاوت نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

مصرف خارجی جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید سبب افزایش بیان ژن *OsPDR3* بعد از تیمار در بافت‌های برگی و هم‌چنین ریشه در رقم هندی پوکالی شد.

رونویسی از ژن‌های *PDR4* و *PDR5* از الگوی بسیار مشابه‌ای در هر دو رقم برخوردار بودند، بدین صورت که در ساعات اولیه روند بیان بسیار بطئی شروع شده و در ساعت ۱۲ پس از تیمار افزایش قابل توجه در رقم خزر مشاهده شد. پس از آن در ساعات ۲۴ و ۴۸ دارای بالاترین میزان بیان ژن در رقم خزر بود. البته افزایش بیان با سطح پایین‌تری در رقم هاشمی نسبت به رقم مقاوم خزر در ساعت ۴۸ مشاهده شد (شکل ۲ b و c). در تحقیق مشابه‌ای، Moons (۲۰۰۸) گزارش کرد که میزان بیان ژن *OsPDR4* در همه‌ی اندام‌های گیاه برنج در اثر تیمار با ترکیبات سیگنالینگ دفاعی افزایش می‌یابد، هم‌چنین بیان ژن *PDR5* در برگ‌های آلوده گیاه به قارچ عامل بیماری بلاست در این رقم به شدت زیاد می‌شود. مطالعه روابط فیلوژنی *OsPDR4* و *OsPDR5* نشان می‌دهد شباهت و همولوژی زیادی بین این دو پروتئین وجود دارد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت شباهت در الگوی کارکرد این دو می تواند با توجه به ساختار آنها قابل توجیه باشد (Moons, 2008). پژوهش دیگری در گندم نشان داد ژن *PDR5* به عنوان یک ژن کاندیدای مقاومت علیه بلایت فوزاریومی سنبله گندم پس از آلودگی به قارچ با افزایش بیان روبرو بود (Ehya *et al.*, 2005). بر اساس گزارش Jantasuriyarat و همکاران (۲۰۰۵) مشخص شد میزان بیان ژن *OsPDR5* بعد از تیمارهای هورمونی از جمله جاسمونیک اسید، در برگ‌های آلوده به قارچ بلاست افزایش یافت.

مطالعه بیان ژن *PDR8* در تحقیق حاضر نشان داد الگوی بیان این ژن نسبت به سه ژن قبلی متفاوت بود به طوری‌که در ساعت ۱۲ پس از تیمار افزایش بیان در رقم هاشمی بطور معنی‌داری از رقم خزر بیش‌تر بود اما در ساعات بعد این روند کاهش و در عوض برای رقم خزر سیر صعودی یافت (شکلd ۲). نتایج حاصل از پژوهش

Archive of SID

www.SID.ir

های مشابه بر بیان ژن *AtPDR8* در برگ‌های آرابیدوپسیس نشان داد که بیان این ژن در زمان حمله پاتوژن در مناطق آلوده افزایش یافته و مانع نفوذ قارچ می‌گردد (Stein *et al.,* 2006; Kobea *et al.,* 2006). این ژن هم چنین در مسیر مقاومت علیه تنش فلزات سنگین مانند کادمیوم نیز بیان می‌شود (Kim *et al.,* 2007). Jantasuriyarat و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند میزان بیان ژن *OsPDR8* بعد از تیمارهای هورمونی از جمله تیمار جاسمونیک اسید، در برگ‌های آلوده به قارچ بلاست افزایش یافت. براین اساس به نظر می رسد مصرف خارجی جاسمونیت اسید از طریق القای ژن های دفاعی احتمالا می تواند سبب افزایش مقاومت برنج به بیماری بلاست شود.

با توجه به مطالعات قبلی مبنی برتأثیرمتیل جاسمونیت بر بیان بسیاری از ژن‌های دفاعی، در این تحقیق نیز مشخص شد مصرف متیل جاسمونیت بر بیان ژن‌های دفاعی مهم شامل *NPR1*، *PR1*، *PDR3*، *PDR4*، *PDR5*، *PDR8*، *Thionin*، *PDF1.2* در گیاه برنج اثر گذار می‌باشد، که اینتأثیربا توجه به ماهیت و زمینه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها متفاوت می‌باشد، بطوری که در رقم هاشمی به عنوان یک رقم بومی منطقه که به بیماری بلاست حساس می‌باشد در اکثر موارد تفاوت‌ها اندک و بطئی بودند در حالی‌که بیان این ژن‌ها در رقم مقاوم خزر پس از اعمال تیمار تفاوت معنی‌دار و چشم‌گیری از خود نشان دادند. این نتیجه ضمن تاکید بر پیچیدگی سازوکارهای دفاعی در گیاهان و وابستگی واکنش های مربوطه به ریخته ژنتیکی گیاه، ممکن است به نحوی نمایان‌گر مقاومت ذاتی ژنوتیپ‌ها به بیماری باشد بدین مفهوم که احتمالا گیاهان مقاوم دارای سازوکار های از پیش تعیین شده می‌باشند که در هنگام آلودگی سبب فعال شدن سریع‌تر و به موقع ژن‌های دفاعی می‌شود. نکته دوم که از این آزمایش قابل نتیجه‌گیری است، مصرف خارجی جاسمونیک اسید و یا ترکیبات مشابه ارزان‌تر در سطح مزرعه می‌باشد که با توجه به شرایط محیطی از قبیل دما و رطوبت و پیش بینی اپیدمی بیماری قابل پیشنهاد است. البته با افزایش شناخت مسیر های متابولیکی و تکنیک های مهندسی ژنتیک، دستورزی و القای مسیرهای بیوسنتز جاسمونیک اسید با هدف افزایش سطح مقاومت گیاه نیز می تواند راهکار مناسبی در این راستا باشد. در نهایت پیشنهاد می‌شود جهت درک بهتر مسیرهای مولکولی مقاومت در این دو ژنوتیپ مهم برنج، بیان ژن‌ها در برهم-کنش با عامل بیماری بلاست و حتی سایر بیماری‌های شایع منطقه نیز بررسی شود. لازم به ذکر است تحقیق مشابه ای نیز با مصرف سالیسیلیک اسید جهت تکمیل اطلاعات در دست بررسی می‌باشد و مطمئنا تلفیق نتایج آن و سپس تعیین ارتباط و مقایسه با نتایج حاصل از اثر پاتوژن، درک روشن‌تری از ماهیت مقاومت و امکان برنامه ریزی جهت اجرای تحقیقات به‌نژادی با مقایسه اطلاعات و مکانیسم‌های مقاومت را فراهم می‌آورد.

منابع:

ساداتی، ز.، تاجیک قنبری، م.ا. بابائی‌زاد، و.ا. و رحیمیان، ح. ا. (۱۳۹۱) پپتیدهای ضد میکروبی دخیل در مقاومت برنج به قارچ عامل بلاست (*Magnaporthe grisea*). دوازدهمین کنگره ژنتیک، ۳-۱ خرداد، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

موسی‌نژاد، ص.، مومنی، ع. و جوان نیکخواه، م. (۱۳۹۰) مطالعه و بررسی ترکیبات مقاومت به بلاست در ارقام برنج ایرانی، بیماری‌های گیاهی ۳۶- ۲۳: ۴.

Agrawal, G. K., Rakwal, R. and Jwa, N. S. (2000) Rice (*Oryza sativa* L.) *OsPR1b* gene is phytohormonally regulated in close interactionwith light signals. Biochemistry Biophysical Research Communication 278: 290–298.

Agrawal, G. K., Rakwal, R., Jwa, N. S. and Agrawal, V. P. (2001) Signaling moleculesand blast pathogen attack activates rice OsPR1a and OsPR1b genes: a model illustrating components participating during defense/stress response. Plant Physiology Biochemistry 39: 1095– 1103.

Bai, W., Chern, M., Ruan, D., Canlas, P. E., Sze-to, W. H. and Ronald, P. C. (2011) Enhanced disease resistance and hypersensitivity to BTH

Archive of SID

www.SID.ir

Jasinski, M., Ducos, E. Martinoia, E. and Boutry, M. (2003) The ATP-binding cassette transporters: structure function and gene family comparison between rice and Arabidopsis. Plant Physiology 131:1169-1177.

Kim, D. Y., Bovet, L. Maeshima, M. Martinoia, E. and Lee, Y. (2007) The ABC transporter *AtPDR8* is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. Plant Journal 50:207–218.

Kobae Y, Sekino, T. Yoshioka, H. Nakagawa, T. Martinoia, E. and Maeshima, M. (2006) Loss of *AtPDR8*, a plasma membrane ABC transporter of Arabidopsis thaliana, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. Plant Cell Physiology 47:309–318.

Le Henanff, G., Heitz, T. Mestre, P. Mutterer, J. Walter, B. and Chong, J. (2009) Characterization of Vitisvinifera *NPR1* homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. BMC Plant Biology 9- 54.

Li, S., Gullbo, J. Lindholm, P. Larsson, R. Thunberg, E. Samuelsson, G. Bohlin, L. and Claeson, P. (2002) Plant Defense and Antimicrobial Peptides. Biochemistry Journal 366: 405-413.

Lin, W. C., Lu, C. F., Wu, J. W., Cheng, M. L., Lin, Y. M., Yang, N. S., Black, L., Green, S. K., Wang, J. F. and Cheng, C. P. (2004) Transgenic tomato plants expressing the Arabidopsis *NPR1* gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. Transgenic Research 13: 567–581.

Liu, X., Zhang, M. J., Duan and Wu, K. (2008) Gene expression analysis of germinating rice seeds responding to high hydrostatic pressure. Journal of plant physiology 165:1855-64.

McDowell, J. M. and Woffenden, B. J. (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. TRENDS in Biotechnology 12: 178-183.

Memelink, J. (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. Phytochemistry 70: 1560-1570.

Meur, G., Budatha, M. Srinivasan, T. Rajesh Kumar, K. R. Dutta Gupta, and A. Kirti, P. B. (2008) Constitutive expression of *Arabidopsis NPR1* confers enhanced resistance to the early instars of *Spodopteralitura* in transgenic tobacco. Physiology Plant 133: 765–775.

Mitsuhara, I., Iwai, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigasi, H., Hirose, S., Ohkawa, Y. and Ohashi, Y. (2008) Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds. Molecular Genet Genomics 279:415–427.

Molina, A., Goy, P. A., Fraile, A., Sanchez-Monge, R. and Garcia-Olmeda, F. (1993) Inhibition of by introduction of an *NH1/OsNPR1* paralog. Plant Biotechnology Journal 9:205-215.

Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S. and Dong, X. (1994) Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell 6: 1583–1592.

Castro, S. M. and Fontes, W. (2005) Plant Defense and Antimicrobial Peptides. Protein and Peptide Letters 12: 11-16.

Chern, M., Fitzgerald, H. A., Canlas, P. E., Navarre, D. A. and Ronald, P. C. (2005) Over-expression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. Mol. Plant Microbe Interact 18: 511–520.

Chern, M. S., Fitzgerald, H. A., Yadav, R. C., Canlas, P. E., Dong, X. and Ronald, P. C. (2001) Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis. Plant Journal 27: 101–113.

Crute, I. R. and Pink, D. A. C. (1996) Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. Plant Cell 8: 1747-1755.

Edreva, A. (2005) Pathogenesis related protein: Research progress in the last 15 year. Gen Applied Plant Phisiology 31: 105-124.

Ehya, F., Ghaffari, M. R., Mardi, M., Zaheri, S. and Ghareyazie, B. (2005) Development of PCR based marker for candidate Fusarium head blight resistance gene (*PDR5*) in wheat. Iranian Journal of Crop Science 6: 395 - 401. (In Persian with English abstract).

Friedrich, L., Lawton, K., Dietrich, R., Willitis, M. Cade, R. and Goellner Conrath, K. U. (2008) Priming: it's all the world to induce resistance. Europen Journal Plant Pathology 121:233–42.

Grayer, R. J. and Kokubun, T. (2001) Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. Phytochemistry 56:253–263.

Hunt, M. (2006) Real time pcr tutorial. University of south carolina. (Access on line: http: //pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm).

Hwang, S. H. and Hwang, D. J. (2010) Isolation and characterization of the rice *NPR1* promoter. Plant Biotechnology Report 4:29-35.

Iwai, T., Kaku, H., Honkura, R., Nakamura, S., Ochiai, H., Sasaki, T. and Ohashi, Y. (2002) plant defense and antimicrobial peptides. Mol. Plant Microbe Interact 15: 4-12.

Jantasuriyarat , C., Gowda, M., Haller, K., Hatfield, J., Lu, G., Stahlberg, E., Zhou, B., Li, H., Kim, H., Yu, Y., Dean, R. A., Wing, R. A., Soderlund, C. and Wang, G-L. (2005) Large-scale identification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interaction. Plant Physiology 138: 105–115.

Archive of SID

www.SID.ir

inappropriate pathogens that enter by direct penetration. Plant Cell 18:731–746.

Sugano, Sh., Jiang, C. J., Miyazawa, S. I., Masumoto, Ch., Yazawa, K., Hayashi, N., Shimono, M., Nakayama, A., Miyao M. and Takatsuji, H. (2010) Role of OsNPR1 in rice defense program as revealed by genomewide expression analysis. Plant Molecular Biology 74:549–562.

Taheri, P. and Tarighi, S. (2010) Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. Journal of Plant Physiology 167: 201–208.

Tann, H., Makhonpas, C., Utthajadee, A. and Soytong, K. (2012) Effect of good agricultural practice and organic methods on rice cultivation under the system of rice intensification in Cambodia. Journal of Agricultural Technology 8: 289-303.

VanLoon, L. C., Rep, M. and Pieterse, C. M. J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annul Review of Phytopathol 44: 135-162.

Wasternack, C. (2004) Plant Cell Death Processes. Elsevier, Inc.

Zhao, J., Davis L. C. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23: 283-333.

bacterial and fungal plant pathogens by *thionins* of types I and II. Plant Sci 92: 169-177.

Moons, A. (2008) Transcriptional profiling of the *PDR* gene family in rice roots in response to plant growth regulators, redox perturbations and weak organic acid stresses. Planta 229: 53-71.

Peremarti, A., Bassie, L. Yuan, D. Pelacho, A. Christou, P. and Capell, T. (2010) Transcriptional regulation of the rice arginine decarboxylase (*Adc1*) and S adenosyl methionine decarboxylase (*Samdc*) genes by methyl jasmonate. Plant Physiology and Biochemistry 48: 553-559.

Portieles, R., Ayra C. and Borras, O. (2006) Basic insight on plant defensins. Biotechnologia Aplicada 23: 75-78.

Qu, N. A., Gan, W. Bi, D. Xia, S. Li, X. and Zhang, Y. (2010) Two BTB proteins function redundantly as negative regulators of defense against pathogens in *Arabidopsis*. Botany 88:953-960.

Rea, P. A. (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. Annual Review Plant Biology 58:347–375.

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B., Cammue, B. and De Bolle, M. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry 46:941-950.

Stein, M., Dittgen, J., Sanchez-Rodriguez, C., Hou, B-H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V. and Somerville, S. (2006) Arabidopsis *PEN3/PDR8*, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to

Archive of SID

www.SID.ir