مطالعه نقش چند ژن مرتبط با بیماری‌زایی(Pathogenesis- Related genes) در مقاومت برنج به قارچ *Bipolaris oryzae* *

STUDYING OF SEVERAL *Pathogenesis-related genes* ROLE IN RICE RESISTANCE TO *Bipolaris oryzae*

ساره هاشمی، ولی اله بابایی‌زاد **، محمد علی تاجیک قنبری و حشمت الله رحیمیان[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۱۷)

چکیده

بیماری لکه قهوه ای برنج که عامل آن قارچ *Bipolaris oryzae* می‌باشد، در اغلب مناطق کشت این محصول پراکنش داشته و خسارت آن گاهی اهمیت اقتصادی دارد. گیاهان همواره در مبارزه با آفات و بیمارگرها هستند و در طول زمان برای بقا در برابر این مهاجمین مکانیسم‌های مختلفی کسب کردند. نظیر سایر گیاهان برنج نیز با استفاده از سدهای ساختمانی و سیستم دفاعی بر اساس پروتیین‌ها و سایر مواد ضد میکروبی در مقابل بیمارگرها مقاومت می‌کند. در این میان پروتیین‌های مرتبط با بیماری زایی (Pathogenesis- Related proteins) نقش برجسته ای دار ند. در این بررسی الگوی بیان چند ژن این گروه در دو ژنوتیپ مقاوم (خزر)و حساس (طارم) پس از آلودگی به عامل بیماری با استفاده از تکنیک Quantitative Real Time PCR مطالعه شد. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های *Thionin*، *Defensin*، *Allen oxide synthase* و *Proxidase* در هر دو ژنوتیپ پس از مایه-زنی نسبت به شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت و در تمامی ساعات مورد بررسی نرخ بیان این ژن‌ها در رقم مقاوم خزر نسبت به رقم حساس افزایش معنی‌داری داشت. این یافته‌ها بیانگر نقش فعال این ژن‌ها در مقاومت برنج به قارچ *B. oryzea* می‌باشد. این پژوهش می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده از این ژن‌ها برای افزایش بیان (Over expression) و ایجاد ارقام مقاوم برنج به عامل بیماری لکه قهوه‌ای باشد.

واژه‌های کلیدی: برنج، بیماری لکه قهوه‌ای ، PR پروتئین‌ها، QPCR

Archive of SID

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:babaeizad@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد ، استادیاران و استاد گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

www.SID.ir

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) نقش مهمی در رژیم غذایی جمعیت رو به رشد جهان به خصوص در آسیا دارد. بیماری‌ها از جمله مهم‌ترین فاکتورهای محدود کننده در تولید این محصول هستند. بیش از ۷۰ بیماری قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدی روی برنج گزارش شده است که سالانه منجر به از دست رفتن حداقل ۵ درصد محصول می‌شوند. بنابراین برای کنترل این بیماری‌ها کولتیوارهای مقاوم و کاربرد موادضدمیکروبی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zhang 2009) . از آنجایی که استفاده از مواد ضدمیکروبی خطرات زیست محیطی زیادی را به همراه دارد، توجهات به سوی توسعه گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری‌ها جلب شده است. پیشرفت‌های گسترده در علم بیولوژی مولکولی فهم بشر را از تعاملات میان گیاه - بیمارگر، ژن‌های دخیل در مقاومت و مسیرهای سیگنال‌دهی منتهی به مقاومت بهبود بخشیده است .این یافته‌ها می‌تواند راهکارهای ژنتیکی مناسب و کارامدی را به منظور افزایش مقاومت گیاهان به بیمارگرها پیش روی محققین قرار دهند (Kogel and Langen 2005). در این میان ژن‌های دخیل در مقاومت بیشترین توجهات را به خود جلب نموده‌اند. ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (*Pathogenesis-Related genes*, *PRs*) که در بافت‌های گیاهان در استرس های مختلف تجمع می‌یابند از جمله برجسته‌ترین ژن‌ها هستند که محققین بسیاری سعی نموده‌اند با افزایش بیان این ژن‌ها در گیاهان مختلف مقاومت آنها را به بیمارگرها بهبود بخشند (Poulsen 2001, Punja 2006, Makandar *et al*. 2006, Malnoy *et al*. 2007)

Thionin، defensin و Proxidase (POX) از جمله مهم‌ترین پروتئین‌های PR هستند که نقش آنها در مقاومت به عوامل میکروبی در گیاهان مختلف از جمله برنج به *Rhizoctonia solani Kuhn*، *Magnaporthe grisea (Hebert) Barr* و *Xanthamonas oryzae* pv. *oryzae* Ishiyama به خوبی اثبات شده است (Sasaki *et al.*, 2004 , Castro and Fontes 2005 , Hau and Rush 2009) .از سوی دیگر هورمون های گیاهی مثل Salicylic acid (SA) ، Etylene (Etyl.) و Methyl jasmonate گاهی به عنوان مولکول انتقال‌دهنده پیام در مسیر بیان ژن‌های مقاومت نقش مهمی در بر انگیختن مقاومت در برابر بیمارگرهایی با روش های مختلف زندگی (Lifestyle) در گیا هان میزبان دارند(Glazebrook 2005). به عنوان مثال نقش مولکول جاسمونیک اسید در مسیر سیگنال‌دهی در مقاومت برنج به بیماری‌های باکتریایی و قارچی تأیید شد (Ou 1985 & Glazebrook 2005). بررسی‌ها نشان داد که در برنج افزایش بیان ژن Allen oxide synthase (*OsAOS2*) که یک آنزیم کلیدی در مسیر سنتز جاسمونیک اسید است، منجر به بالا رفتن سطح جاسمونیک اسید و به دنبال آن بیان بیشتر ژن‌های *PR* و افزایش مقاومت به عامل بیماری بلاست (*Magnaporthe grisea*) شده است (Mei *et al*. 2006). با وجود این‌که بیماری لکه قهوه‌ای دومین بیماری مهم اقتصادی پس از بلاست در میان بیماری‌های شاخ و برگ برنج است (Ou 1985) و باعث ۴/۵۸ تا ۲۹/۱ درصد کاهش وزن دانه و ۱۱ تا ۳۷/۳ درصد از دست رفتن قدرت جوانه‌زنی می‌شود، کمتر مورد توجه و بررسی‌های بیولوژیکی و مولکولی قرار گرفته است (Padmanabhan 1977). از این رو، در این مطالعه به بررسی الگوی بیان ژن‌های *Thionin*، *Defensin*، *POX* و *AOS* در تعامل برنج با قارچ *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker

www.SID.ir

پرداخته شده است. امید است که این یافته‌ها مقدمه‌ای جهت پیشبرد اهداف تولید ارقام مقاوم به منظور کاهش استفاده از مواد شیمیایی و رسیدن به کشاورزی پایدار باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بذور ارقام برنج و تولید گیاهچه‌های همسان:
بذرهای لاین‌های برنج مورد نظر از معاونت موسسه تحقیقات برنج کشور (آمل، مازندران) جمع‌آوری و جهت انجام پژوهش به آزمایشگاه منتقل شد. بذرها در محلول کربوکسین تیرام دو در هزار به مدت پنج ساعت ضدعفونی، سپس سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. جهت جوانه‌زنی، بذور درون پتری‌دیش های حاوی کاغذ صافی استریل چیده شدند. تشتک‌ها به اتاقک رشد با رطوبت نسبی بالای نود و دو درصد و دمای بیست‌و هشت درجه سیلیسیوس منتقل شدند. پنج روز بعد گیاهچه ها در گلدان‌های حاوی خاک استریل منتقل و تحت شرایط گلخانه (در دوره تناوبی ۱۶ ساعت روشنایی با ۳۰ درجه سیلیسیوس و هشت ساعت تاریکی با ۲۵ درجه سیلیسیوس) رشد یافتند. گیاهان روزانه آبیاری و با $(NH_4)SO_4$ و $FeSO_4,7H_2O$ در روزهای هشت و پانزده روز بعد از کشت کوددهی شدند. گیاهچه‌های سه هفته جهت آلودگی به قارچ *B. oryzae* Shoem استفاده شدند.

تهیه نمونه قارچی
نمونه های دارای علایم بیماری لکه قهوه‌ای از مزارع استان مازندران جمع آوری و در پاکت های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت جداسازی قارچ قطعات آلوده برگ به اندازه نیم تا یک سانتی‌متر برش داده شدند و پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک تا دو دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل روی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) حاوی سولفات استرپتومایسین در تشتک پتری استریل پخش شدند. دو تا سه روز بعد از نگهداری در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سیلیسیوس با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی، نمونه‌های قارچی به‌دست آمده با استفاده از روش تک اسپور خالص شدند. پس از شناسایی‌های مورفولوژیکی و ژنتیکی قارچ *B. oryzae* Shoem. از میان جدایه های موجود یک جدایه پس از اثبات بیماری‌زایی انتخاب و در مراحل بعدی بررسی استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون اسپور جهت مایه زنی:
قارچ *B. oryzae* Shoem. جهت اسپورزایی روی محیط Water Agar (WA) کشت و در دمای بیست و هشت درجه سیلسیوس در تاریکی قرار داده شد. پس از پنج روز سطح میسلیوم‌ها در حجم بالا تولید اسپور شد. سوسپانسیون اسپور قارچ در آب مقطر با یک در هزار Tween-20 استریل به غلظت $۱٫۵\times۱۰^{۴}$ کنیدی در میلی‌لیتر تهیه شد.

آلوده‌سازی و نمونه برداری
سوسپانسیون اسپور توسط افشانه‌های کوچک دستی روی گیاهچه های سه هفته‌ای ارقام برنج موردآزمایش (خزر و طارم) مایه‌زنی شد و گیاهچه‌ها در اتاقک کشت با رطوبت نسبی ۹۰% و دمای سی درجه سیلیسیوس قرار داده شدند. نمونه‌گیری در فواصل زمانی ۰٫۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ انجام و نمونه‌ها داخل لوله‌های فالکون ۱۵ میلی لیتری منتقل و در ازت مایع نگه‌داری شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج RNA و تیمار با DNase

حدود ۵۰۰ میلی‌گرم از پودر بافت برگی نمونه زمان‌های مختلف جهت استخراج Total RNA با استفاده از بافر RNX^{TM}-Plus (Cinnagen company) و مطابق دستورالعمل مربوط برای استخراج RNA استفاده شد. نمونه‌های RNA سپس با RQ1Rnase-free DNase (Promega,Madison, WI) طبق دستورالعمل توصیف شده در کتابچه دستورالعمل‌های Promega (No.518) تیمار شدند و به منظور اطمینان از عاری بودن نمونه‌های RNA از DNA ژنومی از روش DD-PCR استفاده شد.

ساخت DNA مکمل

ساخت DNA مکمل (cDNA) از نمونه‌های RNA استخراجی با استفاده از پرایمر oligo(dT)$_{18}$ و آنزیم SuperScript Reverse Transcriptase از Total RNA انجام گرفت. نمونه ها تا زمان استفاده در ۲۰^{oC}- نگهداری شدند.

بررسی بیان ژن

بیان ژن‌های دفاعی مورد مطالعه در این بررسی در گیاهان مایه‌زنی شده در زمان‌های مختلف به روش QPCR و با استفاده از SYBR Green و پرایمر طراحی شده (جدول ۱) انجام گرفت. واکنش‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Green، یک میکرو لیتر پرایمر رفت (Forward Primer)، یک میکرو لیتر پرایمر برگشت (Reverse Primer) ، شش میکرو لیتر آب و دو میکرو لیتر از نمونه cDNA بود. واکنش های زنجیره‌ای پلی مراز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه پنج دقیقه ای در دمای ۹۴ ^{oC}، سپس ۳۵ سیکل (شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴^{oC}، ۳۰ ثانیه در ۶۰^{oC} و یک دقیقه در ۷۲ ^{oC}) و در نهایت مرحله گسترش نهایی به‌مدت هفت دقیقه در ۷۲ ^{oC} بود. در تمامی مراحل بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه، ژن *Ubiquitin* به عنوان ژن خانه زاد (House-keeping) استفاده شد.

آنالیز داده‌ها

نرخ بیان ژن‌های موردمطالعه با استفاده از روش دلتا- دلتا (delta –delta) محاسبه شد (Pfaffl 2001). بر این اساس، ابتدا برای هر نمونه میانگین سیکل آستانه(ΔCT) حاصل از دو تکرار محاسبه، سپس همین عمل برای ژن House-keeping مربوط به هر نمونه انجام شد و در نهایت میزان بیان ژن مورد نظر با استفاده از فرمول زیر حاصل شد:

Gene expression =2^ (ΔCT (House-keeping gene) - ΔCT (target gene))

این آزمایش در دو تکرار جداگانه انجام و پس از محاسبه بیان ژن‌های مورد نظر برای هر نمونه، standard deviation آنها تعیین و در نهایت نتایج با استفاده ازآزمون T- student test آنالیز شدند.

نتایج

در این بررسی به منظور مطالعه مولکولی تعامل بین برنج با قارچ .*B. oryzae* Shoem، رقم خزر به عنوان ژنوتیپ مقاوم و رقم طارم به عنوان ژنوتیپ حساس استفاده شد. گیاهچه‌های سه هفته‌ای هر دو رقم مورد مطالعه با سوسپانسیون اسپور قارچ عامل لکه قهوه‌ای تیمار و نمونه‌برداری در ساعات ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ پس از آلودگی انجام گرفت. Total RNA از نمونه‌های بافت برگی استخراج و پس از ساخت DNA مکمل، میزان بیان

www.SID.ir

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی

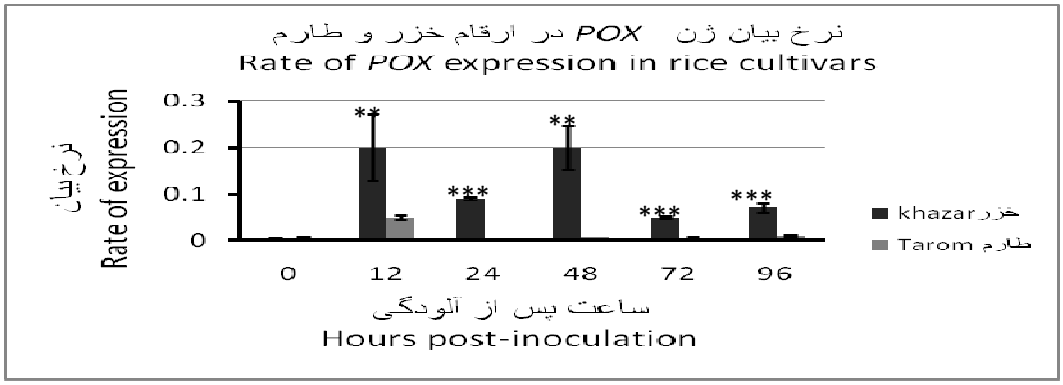
Nucleotide sequences of used primers in this study–Table 1

نام آغازگر	توالی آغازگر (′3→′5)
Thionin(R)	GGTGACAGTCTCAGCTTCCT
Thionin(F)	GCTAGGCTTAGTCCTGCAAC
defensin(R)	ATCACCCTTATCTTCGCTGC
defensin(F)	TGCTGGGAAGACATTAGTTGC
POX(R)	TCTGGAGAAATTGCCGATAAGTTC
POX(F)	GCCATCATGGACGGTTCTGT
AOS (R)	ACT CGA AGT ACT TGT CCT GC
AOS (F)	AGC TAG CTA GAA GAG AGT TAG
Ubiquitin(R)	GGCAAGACCATCACCC TTG AGG
Ubiquitin(F)	TGGACTCCTTCTGGATGTTGTA

چند ژن دخیل در مقاومت(ژن‌های *POX*، *AOS*، *Thionin* و *Defensin*) با استفاده از روش Quantitative real time PCR بررسی شد. میزان بیان اولیه ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش (شاهد/ زمان صفر) در هر دو کولتیوار اندک بود و سطح رونوشت‌های ژن‌های موردنظر در تمامی ساعات مورد بررسی در رقم مقاوم خزر بیش از رقم حساس طارم بود. تجمع رونوشت‌های ژن *POX* در هر دو رقم مقاوم و حساس در ۱۲ ساعت پس از آلودگی به حداکثر رسید و پس از یک کاهش معنی‌دار در ساعت ۲۴ ، رونوشت‌های این ژن مجددا در ۴۸ ساعت پس از آلودگی تجمع قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند. پس از یک کاهش ثانویه در ساعت ۷۲، نرخ بیان این ژن افزایش ۱۷/۵ و دو برابر را نسبت به شاهد در ساعت ۹۶ پس از تلقیح به ترتیب در رقم مقاوم و حساس نشان داد. افزایش بیان ژن *POX* در ساعات ۱۲ و ۴۸ در رقم مقاوم ۵۰ و ۲۵ برابر و در رقم حساس ده و دو برابر زمان صفر بود(شکل ۱) .الگوی بیان ژن *Thionin* در رقم مقاوم مشابه رقم حساس بود، بدین ترتیب که در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس بیان این ژن در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به اوج رسید و پس از کاهش، مجددا در ساعت ۷۲ افزایش قابل ملاحظه‌ای در تجمع رونوشت‌های ژن مذکور دیده شد. در ساعات اوج بیان که ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی بود، سطح رونوشت‌های ژن تیونین در رقم مقاوم به طور تقریبی ۱۰ برابر شاهد و در رقم حساس سه و ۴/۵ برابر زمان صفر محاسبه شد(شکل ۲). حداکثر بیان ژن *Defensin* در هر دو رقم مقاوم و حساس در ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی مشاهده شد و تقریباً ۷۷ و ۳۳ برابر شاهد بود. هم‌چنین افزایش مجدد رونوشت‌های این ژن در ۹۶ ساعت پس از آلودگی قابل توجه بود که در رقم مقاوم و حساس به ترتیب ۶۲ و ۲۶ برابر زمان صفر بود (شکل ۳). مطالعه روند بیان ژن *AOS* در دو رقم خزر و طارم نیز نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار نرخ رونوشت‌های این ژن در ۲۴ ساعت پس از آلودگی بود که به ترتیب تقریباً هفت و چهار برابر شاهد محاسبه شد. هم‌چنین در این ساعت بیان ژن *AOS* در رقم مقاوم خزر دو برابر رقم حساس طارم بود. میزان تجمع رونوشت‌های ژن مذکور پس از یک کاهش در ساعت ۴۸ سیر صعودی یافت و نرخ بیان این ژن در ساعت ۹۶ پس از آلودگی در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به ترتیب ۵۳ و ۱۰ برابر شاهد بود(شکل ۴).

Archive of SID

www.SID.ir

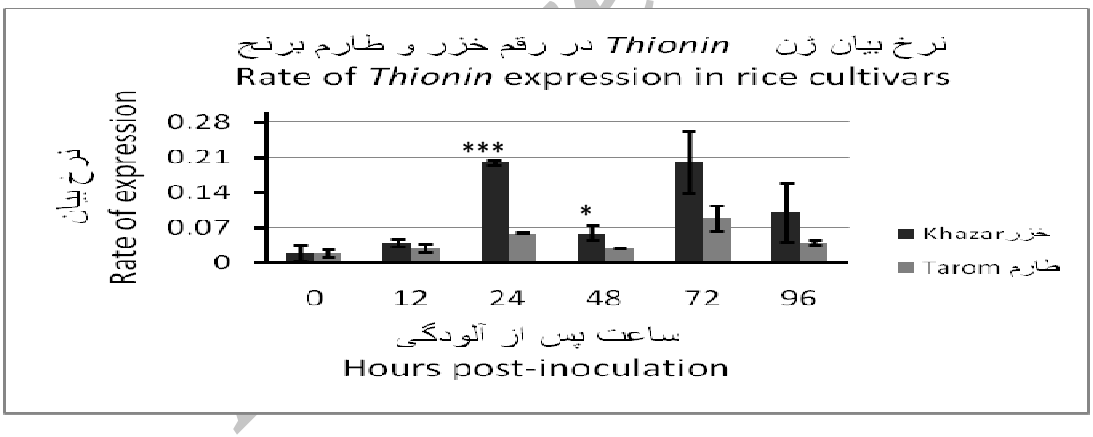


خط نشانه خطا، میانگین انحراف معیار بیان ژن را در دو آزمایش جداگانه نشان می‌دهد ،** = P value < 0.01 و *** = P value < 0.001 در آزمون مقایسه ای T student test است.

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

شکل ۱. نرخ بیان ژن *POX* در دو رقم خزر و طارم در واکنش با قارچ *B. oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker

Fig. 1. Expression rate of *POX* gene in Khazar and Tarom cultivars in response to *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker



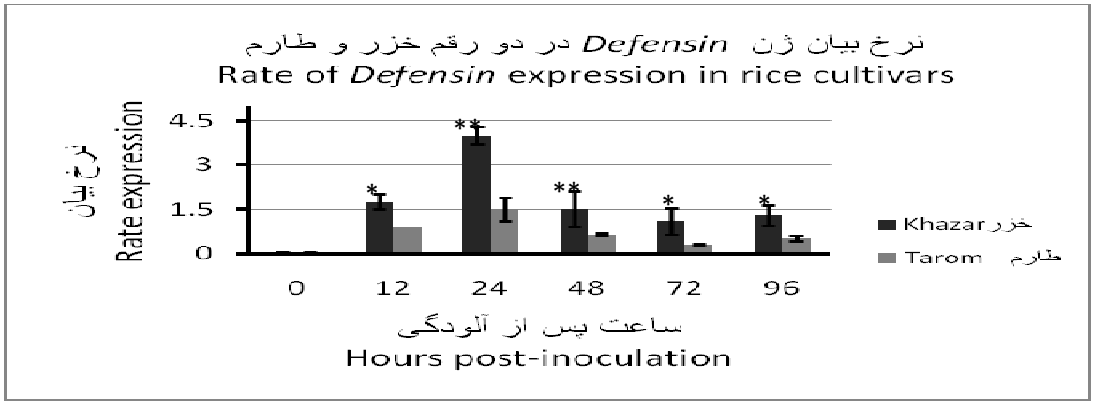
خط نشانه خطا، میانگین انحراف معیار بیان ژن را در دو آزمایش جداگانه نشان می‌دهد ،× = P value <0.05 و *** = P value <0.001 در آزمون مقایسه‌ای T student test است

Error bars represent standard error of the mean in two different experiments .* : indicates P value <0.05, ***: indicates P value < 0.001(t test)

شکل۲. نرخ بیان ژن *Thionin* در دو رقم خزر و طارم در واکنش با قارچ *B.oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker

Fig. 2. Expression rate of *Thionin* gene in Khazar and Tarom cultivars in response to *B.oryzae* (Breda de Han) Shoemaker

www.SID.ir

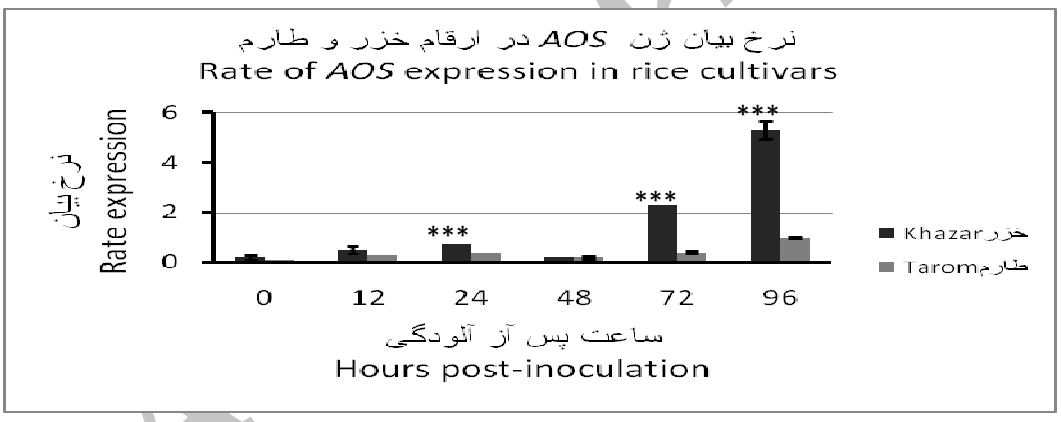


خط نشانه خطا، میانگین انحراف معیار بیان ژن را در دو آزمایش جداگانه نشان می‌دهد ،× = P value <0.05 , ×× = P value <0. 01 و *** = P value <0.001در آزمون مقایسه‌ای T student test است.

Error bars represent standard error of the mean in two different experiments .* : indicates P value <0.05, **: indicates P value < 0.01 and ***: indicates P value < 0.001 (t test)

شکل۳. نرخ بیان ژن *defensin* در دو رقم خزر و طارم در واکنش با قارچ *B. oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker

Fig. 3. Expression rate of *Defensin* gene in Khazar and Tarom cultivars in response to *B. oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker



خط نشانه خطا، میانگین انحراف معیار بیان ژن را در دو آزمایش جداگانه نشان می‌دهد*** =P value < 0.001 در آزمون مقایسه ای T student test است

Error bars represent standard error of the mean in two different experiments ,***: indicates P value < 0.001 (t test)

شکل ۴. نرخ بیان ژن *AOS* در دو رقم خزر و طارم در واکنش با قارچ *B.oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker

Fig. 4 . Expression rate of *Allen oxide synthase* gene in Khazar and Tarom cultivars in response to *B.oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker

www.SID.ir

بحث

در این مطالعه الگوی بیان ژن‌های *Thionin, defensin* , *POX* و *AOS* در گیاه برنج تحت تیمار قارچ *B. oryzae* Shoem. بررسی شد. نتایج Quantitative Real Time PCR نشان داد که نرخ بیان ژن‌های مورد مطالعه در این بررسی در ژنوتیپ مقاوم به طور قابل ملاحظه‌ای بیش از میزان بیان آن‌ها در ژنوتیپ حساس بود. بررسی الگوی بیان نشان از افزایش تدریجی سطح رونوشت‌های ژن‌های مورد مطالعه در ساعات پس از آلودگی داشت و در تمامی بررسی‌ها میزان بیان در ساعت مشخصی پس از آلودگی به حداکثر رسید، که این امر بیان کننده نقش فعال این ژن‌ها در مقاومت برنج به قارچ *B. oryzae* Shoem. می‌باشد. در زیر به تفسیر اجمالی الگوی بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه می‌پردازیم :

بررسی بیان ژن *defensin* در تعامل برنج با قارچ *B. oryzae* Shoem.

مطالعات نشان داده‌اند که دفنسین‌های گیاهی با تغییر نفوذپذیری غشای پاتوژن مهاجم منجر به توقف رشد آنها و درنتیجه مقاومت گیاه به پاتوژن می‌گردند (Castro 2005) . در این بررسی بیان ژن دفنسین برنج در ۲۴ ساعت پس از آلودگی که مصادف با توسعه قارچ در بافت پارانشیمی است (Hau and Rush 1985) ، افزایش قابل توجه‌ای در دو رقم نشان داد. هم‌چنین دیده شد که سطح بیان این ژن در رقم مقاوم در تمامی ساعات مورد بررسی در مقایسه با رقم حساس افزایش معنی‌داری داشت که نشان‌دهنده نقش فعال این ژن در مقاومت برنج به قارچ *B. oryzae* Shoem. می‌باشد. افزایش مجدد بیان این ژن در ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی نیز نشان از تحریک این ژن در پی نفوذ کنیدی‌های ثانویه دارد. مطالعات ثابت نموده‌اند که بیان ژن‌های دفنسین در گیاهان براساس مسیرهای وابسته به JA و اتیلن استوار بوده و غیر وابسته به SA می‌باشد (Thomma *et al*. 2002, Glazebrook 2005) از طرفی با توجه به این مطلب که مسیر JA در دفاع علیه پاتوژن‌های نکروتروف مؤثر می‌باشد (Glazebrook 2005) بیان قابل توجه ژن دفنسین در برنج در تعامل با قارچ *B. oryzae* Shoem. در ۲۴ ساعت پس از آلودگی بیانگر این مطلب است که قارچ پس از طی یک فاز بیوتروفی کوتاه‌مدت وارد فاز نکروتروفی شده و در پی آن مقاومت القایی وابسته به JA در گیاه فعال می‌شود. افزایش بیان این ژن در تعامل برنج با قارچ‌های *M. grisea* و *R. solani* (Thomma *et al*. , 1998; Hau 2009) قبلا گزارش گردیده است و این اولین گزارش از بیان آن در پاسخ برنج به قارچ *B. oryzae* Shoem. می‌باشد.

بررسی بیان ژن *Thionin* در تعامل برنج با قارچ *B. oryzae* Shoem.

نتایج بررسی‌ها نشان داد که خاصیت سمی تیونین‌ها بر روی بیمارگرها احتمالاً به دلیل اثر این پروتئین‌ها بر غشای سلولی پاتوژن بوده و پس از تغییر نفوذ پذیری آن منجر به بازداری از جذب قندها و نشست یون‌های پتاسیم، فسفر، پروتئین‌ها و نوکلئوتیدها از سلول می‌گردند (Bohlmann 1999, Iwai *et al*. 2002). تاکنون نقش این ژن در مقاومت برنج به دو باکتری بذرزاد (Iwai *et al*. 2002) و *R. solani* (Thomma *et al*. 1998)) ثابت شده است. در این بررسی نیز نقش این ژن در تعامل برنج با قارچ *B. oryzae* Shoem. مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به افزایش قابل توجه این ژن در دو رقم حساس و مقاوم در ۲۴ ساعت پس از آلودگی که هم‌زمان با توسعه قارچ در بافت پارانشیمی است

Archive of SID
www.SID.ir

(Hau and Rush 1985) و هم‌چنین با توجه به بیان بالای این ژن در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس می‌توان نتیجه گرفت که این ژن نقش موثری در دفاع برنج به قارچ عامل لکه قهوه‌ای دارد. هم‌چنین افزایش مجدد ژن تیونین در پی توسعه هیف‌های ثانویه در بافت پارانشیمی را نشان می دهد. از طرفی با توجه به این که یافته‌های قبلی این ژن را به عنوان یک شاخص ژنی برای واکنش‌های استرس/دفاع القا شده با جاسمونیک اسید معرفی نموده‌اند (Bohlmann 1999)، القای قابل توجه این ژن در ۲۴ ساعت پس از آلودگی در برنج در پاسخ به قارچ *B. oryzae* Shoem. فرضیه قبلی ما مبنی بر ورود پاتوژن *B. oryzae* Shoem. به فاز نکروتروفی و فعال شدن مسیرهای دفاعی وابسته به JA را در این زمان قوت می‌بخشد و در کل می‌توان استدلال کرد که مسیرهای وابسته به JA نقش فعالی را در مقاومت گیاه برنج به بیماری لکه قهوه‌ای بازی می‌کنند.

بررسی بیان ژن *POX* در تعامل برنج با قارچ *B. oryzae* Shoem.

بیان شده که *POX* از طریق دخالت درلیگنینی(Lignification) و سوبرینی(Suberization) نمودن دیواره سلولی، ایجاد پیوندهای عرضی(Crosslinking) بین پروتئین‌های دیواره، ضخیم نمودن دیواره آوند چوبی، تولید گونه‌های اکسیژن فعال، مهار هیدروژن پراکسید و سنتز فیتوالکسین در مقاومت به پاتوژن‌ها نقش دارد. علاوه بر این خود فعالیت ضد قارچی داشته و متابولیسم اکسین را برعهده دارد. مطالعات نشان دادند که فعالیت *POX* بعد از آلودگی به قارچ عامل بلاست، باکتری *Xanthamonas oryzae* pv. *oryzae* و زخم در برنج افزایش می‌یابد (Song and Goodman 2001). در این پژوهش میزان بیان ژن *POX* در برگ‌های تیمار شده در ۱۲ ساعت پس از آلودگی که همزمان با نفوذ قارچ به بافت پارانشیمی است به حداکثر رسید که با توجه به مطالب قبلی و عملکردهای پراکسیداز این افزایش بیان را می‌توان بدین صورت توجیه نمود که گیاه با فعال کردن ژن پراکسیداز سعی می‌کند تولید گونه‌های اکسیژن فعال را افزایش داده و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را به منظور توقف رشد قارچ که در این زمان در مرحله بیوتروفی قرار دارد ایجاد نماید. هم‌چنین بیان شده که فیتوالکسین‌ها یک نقش کلیدی را به عنوان ترکیبات درگیر در مکانیسم‌های دفاعی در برنج بازی می‌کنند (Sasaki *et al*. 2004). بنابراین افزایش بیان ژن *POX* در همان مراحل اولیه آلودگی را می توان به نقش آنها در سنتز فیتوالکسین‌ها نیز نسبت داد. بیان این ژن مجددا در ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی که همزمان با توسعه لکه‌های اولیه و آلودگی‌های ثانویه است افزایش معنی‌داری داشت که نقش این ژن را در ایجاد مرگ سلولی تایید می‌نماید. برگ‌های واریته - مقاوم در تمامی مراحل مقایسه بیشترین فعالیت پراکسیداز را نسبت به رقم حساس نشان دادند که بیانگر این مطلب است که پراکسیداز یک نقش مهم را در دفاع علیه *B. oryzae* Shoem. بازی می‌کند.این نتایج با یافته *چاتوپادهای و برا* مطابقت دارد (Chattopadhyay and Bera 1997).

بررسی بیان ژن *AOS* در تعامل برنج با قارچ *B. oryzae* Shoem.

AOS یک آنزیم کلیدی در سنتز جاسمونیک اسید توسط مسیر octadecanoic acid است و به عنوان یک مولکول سیگنال برای ایجاد مقاومت سیستماتیک القایی در گیاهان عمل می کند (Ahn 2008). در این بررسی بیان این ژن در

Archive of SID

www.SID.ir

۲۴ ساعت پس از آلودگی که هم‌زمان با ورود قارچ به فاز نکروتروفی و فعال شدن مسیرهای دفاعی وابسته به JA است به حداکثر رسید که موید دخیل بودن این ژن در مسیر سنتز جاسمونیک اسید و فعال نمودن این مسیر به منظور مقابله برنج با قارچ *B. oryzae* Shoem. است. هم‌چنین بیان این ژن در برگ‌ها در ساعت ۷۲ پس از مایه‌زنی که هم‌زمان با نفوذ ثانویه هیف‌ها و ایجاد آلودگی‌های جدید است مجدداً شروع به افزایش نمود و این افزایش تا ساعت ۹۶ پس ازآلودگی ادامه داشت. ژن *AOS* در آرابیدوبسیس، گوجه فرنگی، اسفناج، خیار و جو شناخته شده و به وسیله زخم‌ها، جاسمونیک اسید و اتیلن تحریک می‌شود. در برنج تحریک بیان این ژن در پی آلودگی با *M. grisea* گزارش شده است (Portieles *et al*. 2006). بالا بودن سطح بیان این ژن در رقم مقاوم خزر نسبت به رقم حساس طارم در تمامی ساعات موردبررسی در این مطالعه نیز نشان‌دهنده نقش فعال این ژن در دفاع علیه قارچ *B. oryzae* Shoem. است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (58-57) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir