

نقش چند ژن مرتبط با مقاومت در تعامل گیاه برنج با باکتری عامل بیماری نوار قهوه‌ای*

امیر مسعود حیدری نژاد**، ولی‌اله بابایی‌زاد و حشمت‌اله رحیمیان^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۲۱)

چکیده

نوار قهوه‌ای باکتریایی برنج که عامل آن باکتری *Acidovorax avenae subsp. avenae* است، از بیماری‌های برنج در خزانه است که روی برگ و غلاف گیاهچه‌ها نوارهای آسوخته و قهوه‌ای ایجاد می‌کند. به دلیل آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه سموم جهت کنترل بیماری‌های گیاهی و همچنین مقاومت پاتوژن به این مواد شیمیایی، مطالعه مستمر برای ارائه روش‌های جدید جهت مقابله با بیماری‌های گیاهی ضروری به نظر می‌رسد. در این بین می‌توان از ژن‌های مرتبط با مقاومت در گیاهان که منابع ژنتیکی با ارزشی هستند، استفاده کرد. این پژوهش با هدف مطالعه نقش پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی *PR1*، *POX*، *PR10* و پروتئین‌های *NHI* و *PDR20* در دو رقم ایرانی برنج در طی تیمار با جدایه بیماری‌زای باکتری عامل نوار قهوه‌ای با استفاده از تکنیک *Quantitative Real-time PCR* انجام شد. آزمون غربالگری از بین ۵ رقم ایرانی برنج انجام و دو رقم طارم محلی و ساحل، به ترتیب به عنوان ارقام حساس و مقاوم انتخاب شدند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیان ژن‌های مذکور در رقم مقاوم ساحل نسبت به رقم حساس طارم محلی پس از مایه زنی به شکل معنی داری افزایش یافت. افزایش نرخ بیان ژن‌های مورد بررسی، حاکی از نقش محصول پروتئینی آن‌ها در مقاومت گیاه برنج به باکتری عامل بیماری نوار قهوه‌ای می‌باشد.

کلیدواژه: بیماری‌زایی، پروتئین، حساسیت، مقاومت، *Real time PCR*

* بخشی از پایان نامه نگارنده اول، ارائه شده به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازنداران

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: amir.masoud_90@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازنداران

Role of *Resistance-related genes* in the Interaction of Rice with the Causal Agent of Bacterial Brown Stripe *

A.M. Heydari-Nezhad*, V. Babaeizad and H. Rahimian¹

(Received: 20.5.2015; Accepted: 13.10.2015)

Abstract

Rice bacterial brown stripe, caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* is recognized by producing water-soaked and brown stripes on leaves and sheaths of rice seedlings in nursery. 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 resistance genes are useful genetic resources that can be employed to develop resistant varieties as the best alternative to other control measures. This research aimed to study the role of *NH1*, *PR1*, *POX* and *PR10*, pathogenesis related proteins and *PDR20* gene in two Iranian rice cultivars inoculated with an incompatible strain of bacterial brown stripe using the Quantitative Real-time PCR technique. After Screening of 5 Iranian rice cultivars, Tarom and Sahel were selected as susceptible and resistant cultivars, respectively. The results of this study showed that the expression level of these genes has greatly increased in Sahel cultivar in comparison to Tarom (susceptible) cultivar. Increased expression level of the aforementioned genes, proves the role of these genes in resistance of rice plants against bacterial brown stripe disease.

Keywords: Cultivar, Gene expression, Real time PCR, RNA, Susceptible

* Part of Thesis of The First Author Submitted to Sari Agricultural Sciences And Natural Resources University, Mazandaran, Iran.

** Corresponding author's E-mail: Amir.masoud_90@yahoo.com

1. Former MSc. Student, Assistant Professor and Professor of Plant Protection Department of Sari Agricultural Sciences And Natural Resources University, Mazandaran, Iran.

مقدمه

اتیلن توسط عوامل نکروتروف و پاسخ‌های وابسته به سالیسیسیک اسید توسط بیوتروف‌ها فعال شود. به هر حال هم‌پوشانی بین پاسخ‌های سیگنالی مختلف و گاهی اثرات سینرژستی بین مسیره‌های وابسته به SA، اتیلن و JA گزارش شده است (Thomma et al. 1998). این مسیره‌های دفاعی در ارتباط با افزایش نسخه‌های ژن‌های دفاعی زیادی هستند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (*Pathogenesis Related Proteins*) معمولاً به‌عنوان پروتئین‌های خاص میزبانی بوده که اگر چه نه در تمام گونه‌های گیاهی اما در اکثر آن‌ها در مقابل حمله پاتوژن‌ها و شرایط مشابه برانگیخته می‌شوند (Van Loon et al. 2006).

پروتئین‌های PR1 اولین گروه از پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی هستند که در توتون، برنج، ذرت، گندم، جو و آرابیدوپسیس شناسایی شده‌اند. مکانسیم تاثیر پروتئین‌های گروه PR1 هنوز به طور کامل مشخص نشده است با این وجود به نظر می‌رسد این پروتئین بر روی غشاء موثر باشد و احتمالاً در ضخیم شدن دیواره سلولی و جلوگیری از گسترش بیمارگر در آپوپلاست نقش دارند. (Van Loon et al. 2006). گروه پروتئین‌های PR-9 از دسته پراکسیدازهای تشکیل دهنده لیگنین هستند. در بررسی‌های متعدد نشان داده شد که *POX* از طریق دخالت در لیگنینی و سوپرینی نمودن دیواره سلولی، ایجاد پیوندهای عرضی (*Cross-linking*) بین پروتئین‌های دیواره، ضخیم نمودن دیواره آوند چوبی، تولید گونه‌های اکسیژن فعال، مهار هیدروژن پراکسید، سنتز فیتوآلکسین در مقاومت به بیمارگرها نقش دارد (Hilaire et al. 2001, Passardi et al. 2004). پروتئین‌های PR-10 شامل پروتئین‌های دفاعی داخل سلولی می‌باشند که ساختاری شبیه ریونوکلئازها دارند. این پروتئین‌ها اولین بار در سلول‌های کشت شده

برنج (*Oryza sativa* L.) از جنس *Oryza* متعلق به خانواده *Poaceae* می‌باشد. برنج غذای اصلی حدود ۲/۴ میلیارد نفر از جمعیت جهان می‌باشد و حدود ۲۰ درصد از انرژی مورد نیاز روزانه آن‌ها را تامین می‌کند (Van Nguyen & Ferrero 2004). بر اساس گزارش سازمان خوار و بار کشاورزی (FAO) در سال ۲۰۱۲، از مجموع ۹۲۶ میلیون تن برنج تولید شده در جهان سهم ایران ۲/۴ میلیون تن بوده است.

بیماری نوار قهوه‌ای باکتریایی (*Bacterial brown stripe*) در خزانه‌های تالابی و زمین‌های مرتفع، همچنین در جعبه‌های نشاء نیز رخ می‌دهد. نشانه‌های نوار قهوه‌ای باکتریایی توسط باکتری *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ایجاد و توسط بذر منتقل می‌شود (Sharifnabi et al. 2010). نشانه‌ها شامل نوارهای آبرسوخته روی برگ‌ها و غلاف‌های برگ است که در ادامه به رنگ قهوه‌ای در می‌آید. روی برگ‌ها، نوارها در بین رگبرگ‌ها یا در طول رگبرگ اصلی یا در حاشیه برگ‌ها تشکیل می‌شوند (Kadota & Ohuchi 1983).

مقاومت القاء شده سرتاسری (*Systemic acquired resistance*) و مقاومت سیستمیک القایی (*Induced systemic resistance*) مکانسیم‌های دفاعی گیاه هستند که به دنبال تحریک گیاه با بیمارگر یا عوامل القایی دیگر، در گیاه القا می‌شوند. سالیسیلیک اسید باعث فعال شدن مسیر SAR می‌شود (Wildermuth et al. 2001). در اکثر موارد پدیده ISR مستقل از تولید و تجمع سالیسیلیک اسید و نیازمند پاسخ‌های دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید و اتیلن است (De Vleeschauwer et al. 2008). به نظر می‌رسد پاسخ‌های دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید و

بررسی نقش ژن‌های *POX22.3*, *PR1a*, *PDR20*, *NH1* و *PR10a* در طول تعامل گیاه با باکتری، در دو رقم برنج طارم محلی و ساحل انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده سازی و شناسایی عامل بیماری

باکتری عامل بیماری، جدا شده از گیاهچه‌های برنج مشکوک به علائم نواری قهوه ای از شالیزارهای شهرستان نکا، مورد مطالعه در آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دریافت شد. به منظور شناسایی سریع بیمارگر، پس از استخراج DNA از یک نمونه جدایه خالص به روش لیز قلیایی (Arabi et al. 2006)، ناحیه ژنومی 16s-23s (ribosomal RNA intergenic spacer) به وسیله واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) و جفت آغازگرهای ITS(F): GGCTGGATCACCTCCTT و ITS(R): TGCCAAGGCATCCACC تکثیر شد. قطعه تکثیر شده پس از تعیین توالی در بانک ژن بلاست و به عنوان باکتری *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* با شماره دسترسی (KF998585) ثبت شد.

جمع آوری نمونه گیاهی و تولید گیاهچه مناسب

بذور لاین‌های برنج مورد نظر از معاونت تحقیقات برنج کشور (مازندران، آمل) جمع‌آوری و جهت انجام پژوهش به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت استریل نمودن بذور از محلول کربوکسین - تیرام به نسبت ۲ در هزار استفاده شد (Hashemi et al. 2013). بذور درون پتری-دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب پخش و به اتاقک کشت با رطوبت نسبی نود درصد و دمای بیست و هشت درجه

جعفری تحت تیمار محرک‌ها کشف شدند (Jwa et al. 2006). اولین ژن *PR10* برنج پس از تیمار با Probenazol (PBZ) شناسایی و به همین دلیل *PBZ1* نامیده شد (Midoh et al. 1996). بعدها سه پروتئین *OsPR10 a-c* که اندازه آنها ۱۸-۲۰ کیلو دالتون است از گیاهان برنج تحت استرس شناسایی شد.

پروتئین *NPR1* (Nonexpresor of pathogenesis-related gene1) یک تنظیم کننده کلیدی می‌باشد که سبب مقاومت گیاهان علیه طیف وسیعی از بیمارگرها شده و نقش مهمی در SAR و ISR دارد. این ژن مسیر پائین دست سیگنال SA را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Bai et al. 2011). سطح بیان *NPR1* پس از القا توسط SA-3-Indole IAA (acetic acid) و BTH (Benzothiadiazole) بالا می‌رود. مطالعات مشخص نموده‌اند که تجمع *NPR1* در سیتوپلاسم به صورت اولیگومر است در طول SAR تحریک شده به وسیله SA یا پاتوژن این پروتئین به شکل مونومر درآمده و به هسته برای تحریک بیان *PR* ها حرکت می‌کند و این فرایند برای عملکردش ضروری است (Yuan et al. 2007). پمپ‌های ABC (ATP binding cassette) transporter از عوامل موثر در ایجاد تحمل می‌باشند. از جمله زیرخانواده‌های این پمپ‌ها می‌توان به PDR (Pleiotropic drug resistance) اشاره کرد که میزان بیان برخی از آنها پس از آلودگی گیاه با پاتوژن و به دنبال آن افزایش غلظت اسید سالیسیلیک، تغییر می‌کند (Jasinski et al. 2001). ژن‌های *PDR* فقط در قارچ‌ها و گیاهان مشاهده شده‌اند و پروکاریوت‌ها و جانوران فاقد این نوع ناقل‌ها می‌باشند (Nuruzzaman et al. 2014). این مطالعه با هدف بررسی سطوح حساسیت ۵ رقم ایرانی برنج (طارم محلی، ندا، ساحل، طارم دیلمانی، شیرودی) در برابر باکتری *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* و همچنین

میکرولیتر آب مقطر، رقیق و توسط سمپلر روی مرکز تشتک های کشت حاوی محیط NAG (Nutrient-agar-glucose) قرار داده شد. سپس توسط پاروی کشت استریل به صورت متوازن، قطره روی محیط پخش شد. تشتک ها به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس کلنی های یک دست رشد یافته، جدا شده از هر یک از ۵ رقم برنج مورد آزمایش توسط دستگاه کلنی شمار شمارش شدند.

بررسی مولکولی توسعه باکتری در گیاه

بدین منظور از نمونه DNA استخراج شده از بافت برگ گیاهچه های برنج تلقیح شده توسط باکتری حاوی علائم نوار قهوه‌ای استفاده شد. در ابتدا ردیابی باکتری در برگ با استفاده از تکنیک Multiplex PCR با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت ناحیه ژنومی *Actin* گیاه و ناحیه ITS باکتری *Aaa* همزمان در یک واکنش استفاده شد. بررسی توسعه باکتری در بافت با استفاده از دستگاه Real Time PCR و آغازگرهای ناحیه ITS باکتری و ژن *Actin* گیاه انجام شد.

مایه‌زنی و جمع آوری نمونه ها

سوسپانسیون از باکتری تازه کشت شده با غلظت 10^7 سلول در هر میلی لیتر، محاسبه شده با دستگاه اسپکتوفتومتر (در طول موج ۶۰۰ نانومتر)، تهیه و به گیاهچه ها تزریق شد. در هر گلدان ۴ گیاهچه توسط سرنگ استریل حاوی سوسپانسیون باکتری تلقیح و روی گلدان‌ها با نایلون مرطوب پوشیده شد. گیاهان در شرایط گلخانه نگهداری شدند. نمونه برداری از گیاهان تیمار شده در زمان های صفر (شاهد)، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس

سلسیوس منتقل شدند. پنج روز بعد بذرها به خوبی جوانه زده و برای کاشت آماده شدند. حداکثر بیست عدد بذر درون هر گلدان حاوی خاک استریل کاشته شد. گیاهچه‌ها در شرایط گلخانه با محدوده دمایی ۳۰-۳۵ درجه سلسیوس و دوره تناوبی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در شرایط غرقابی نگهداری شدند (Hashemi et al. 2013).

بررسی سطوح حساسیت ارقام برنج در برابر عامل بیماری

به منظور بررسی سطوح حساسیت از بین ارقام موجود، پنج رقم ندا، ساحل، طارم محلی، طارم دیلمانی و شیروودی به منظور بررسی نهایی، انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفتند. سوسپانسیون از باکتری تازه کشت شده با غلظت 10^7 سلول در هر میلی لیتر به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتری تهیه و به گیاهچه ها تزریق شد. گیاهان پس از تلقیح در گلخانه در شرایط دمایی و رطوبتی مناسب جهت رشد و توسعه باکتری نگهداری شدند. شروع علائم و گسترش نوارهای قهوه ای روی برگ ها در روز های ۴، ۶، ۸ و ۱۲ پس از تلقیح مشاهده و یادداشت برداری شد.

شمارش تعداد کلنی باکتری روی محیط کشت

جهت تعیین میزان توسعه باکتری در ارقام این بررسی، ۱۴ روز پس از آلودگی، قطعات برگ‌ی حاوی علائم نوار قهوه‌ای جدا و با تیغ استریل خرد شد. ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰ درصد و محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم (NaClO) به ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه و ۱ دقیقه انجام شد. سپس قطعات برگ‌ی در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل غوطه ور شد. ۵ میکرولیتر از سوسپانسون تهیه شده با ۴۵

محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE صورت گرفت.

پس از استخراج RNA از نمونه ها و ساخت cDNA، بررسی سطح بیان برخی ژن های دخیل در مقاومت در ۵ بازه زمانی مختلف، توسط تکنیک Quantitative Real Time-PCR با بهره گیری از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. از آزمون تی نمونه های مستقل (Two Independent Samples t Test) به منظور بررسی سطح معنی داری اختلاف بیان ژن های دفاعی، در بین دو رقم مورد مطالعه استفاده شد.

بررسی بیان ژن

بررسی سطح بیان ژن های مورد مطالعه در گیاهان شاهد و مایه زنی شده در زمان های مختلف با استفاده از تکنیک QPCR و دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR شرکت Applied biosystems انجام شد. واکنش با استفاده از شناساگر SYBR Green با آغازگرهای طراحی شده (جدول ۱) در حجم نهایی ۱۵ مایکرولیتر شامل ۷/۵ مایکرولیتر SYBR Green Master Mix، ۰/۵ مایکرولیتر آغازگر رفت (Forward Primer)، ۰/۵ مایکرولیتر آغازگر برگشت (Reverse Primer)، ۴/۵ مایکرولیتر آب و ۲ مایکرولیتر نمونه cDNA صورت گرفت. از آغازگر Actin به عنوان ژن خانه داری به منظور مقایسه سطح بیان ژن های هدف استفاده شد. واکنش زنجیر پلیمرز شامل واسرشت سازی اولیه ۱۰ دقیقه، ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله واسرشت سازی ۱۵ ثانیه، ۹۴ درجه سلسیوس و مرحله اتصال و گسترش ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سلسیوس (طبق دستورالعمل شرکت سازنده) در ۴۰ مرتبه تکرار بود. تمام واکنش های PCR در ۲ تکرار انجام گرفت.

از انجام آلودگی و نمونه ها پس از پودر شدن با ازت مایع تا زمان استخراج RNA در فریزر با دمای $80^{\circ}C$ - نگهداری شدند.

استخراج RNA و زدودن DNA ژنومی

استخراج RNA با استفاده از بافر RNX-Plus (شرکت سیناژن) طبق دستور العمل مربوطه انجام شد. به منظور زدودن DNA ژنومی از نمونه های RNA از کیت DNase I, RNase-free ساخت شرکت Fermentas طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

بررسی کیفیت RNA استخراجی

نمونه ها با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE (40 mM Tris acetate 1 mM EDTA 1X) بررسی شدند. پنج میکرولیتر از RNA استخراج شده به همراه دو میکرولیتر رنگ (برم فنل بلو ۲۵ میلی گرم، زایلن سیانول اف اف ۲۵ میلی گرم، گلیسرول ۳/۳ میلی لیتر و آب دوبار تقطیر ۶/۷ میلی لیتر) به چاهک های ژل انتقال داده و الکتروفورز در بافر TBE در ولتاژ ۸۰ به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. ژل در اتیدیوم بروماید ($0.5 \mu g / mL$) به مدت پانزده دقیقه رنگ آمیزی و با نور UV دستگاه ژل خوان کداک (GEL LOGIC 200) از آن عکس برداری شد.

ساخت cDNA و بررسی صحت عملکرد آن

سنتز cDNA با استفاده از AccuPowerR CycleScript RT PreMix (dN6) kit و براساس دستورالعمل، از محتوی RNA کل استخراج شده ساخته شد. به منظور تایید صحت عملکرد cDNA سنتز شده، تکثیر قطعه انتخابی با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت Actin و واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) انجام شد. ارزیابی

جدول ۱- نام ژن‌ها و توالی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1- Genes name and Primer pairs used in the present study

Gene	Primer pairs	Accession number	Length
<i>Actin</i>	F: 5'-GAGTATGATGAGTCGGGTCCAG -3' R: 5'-ACACCAACAATCCCAAACAGAG -3'	XM_006662696	143
<i>NH1/NPR1</i>	F: 5'-CTGATCCGTTTCCCTCGGA -3' R: 5'-GACCTGTCATTCTCCTCCTTG -3'	-*	114
<i>PR1a</i>	F: 5'-TCGTATGCTATGCTACGTGTTT -3' R: 5'-CACTAAGCAAATACGGCTGACA -3'	AJ278436	153
<i>POX22.3</i>	F: 5'-CCGACCAGGTGCTCTTCAA -3' R: 5'-CGCATCCCCTCATACTACTCC -3'	AF014467	202
<i>PR10/PBZ1</i>	F: 5'-CTCATCCTCGACGGCTACTT -3' R: 5'-ATCAGGAAGCAGCAATACGG -3'	AB127580	134
<i>PDR20</i>	F: 5'- AAGGAGCAATCAACAGGA -3' R: 5'- CAGTGCGTTCAACAGACA -3'	EU682752	116
<i>ITS</i>	F: 5'- GGAAGAAGTCGGTGCTAA -3' R: 5'- TTGGTTGGTGGAGGATGA -3'	KF998585	214

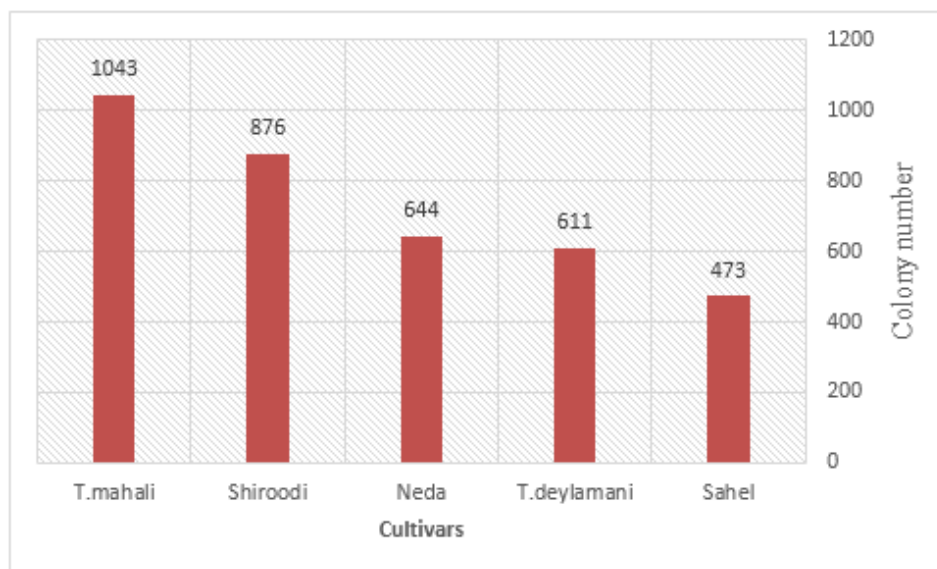
*برگرفته از (Bai et al. 2011)

آنالیز داده‌ها

نتایج

آنالیز نتایج حاصل از واکنش Real Time- PCR با فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد (Yuan et al. 2006). برای زمان مورد (\rightarrow ژن مرجع Ct - ژن هدف $\Delta CT = Ct$) (ارزیابی و نمونه کنترل) نمونه کنترل ΔCt - زمان مورد ارزیابی $\Delta\Delta CT = \Delta Ct$ ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft excel از مجموعه نرم افزارهای Microsoft office و تحلیل آماری داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS statistics 22 انجام شد.

شروع و گسترش علائم در حاشیه رگبرگ‌ها در روزهای ۴، ۶، ۸، و ۱۲ پس از تلقیح بررسی و یادداشت برداری شد. در روز چهارم روی برگ‌های گیاهچه‌های رقم طارم محلی نوارهای آبرسوخته در محل تلقیح مشاهده شد. در روز ششم گسترش نوارها روی رقم طارم محلی افزایش یافته و نوارهای آبرسوخته به تدریج قهوه‌ای رنگ شدند، در همین روز همچنین علائم روی رقم شیروودی، ندا و طارم دیلمانی در حال شکل‌گیری بود. بررسی‌ها در روز هشتم و دوازدهم حاکی از گسترش بیشتر علائم روی



شکل ۱- نمودار تعداد کلنی های رشد یافته، حاصل از کشت سوسپانسیون بافت آلوده در ۵ رقم مورد بررسی

Fig 1- Number of colonies grown, suspension obtained from culture of infected tissue, evaluated in 5 cultivars

الگوی بیان برخی ژن های دفاعی در طی آلودگی با باکتری *Aaa*

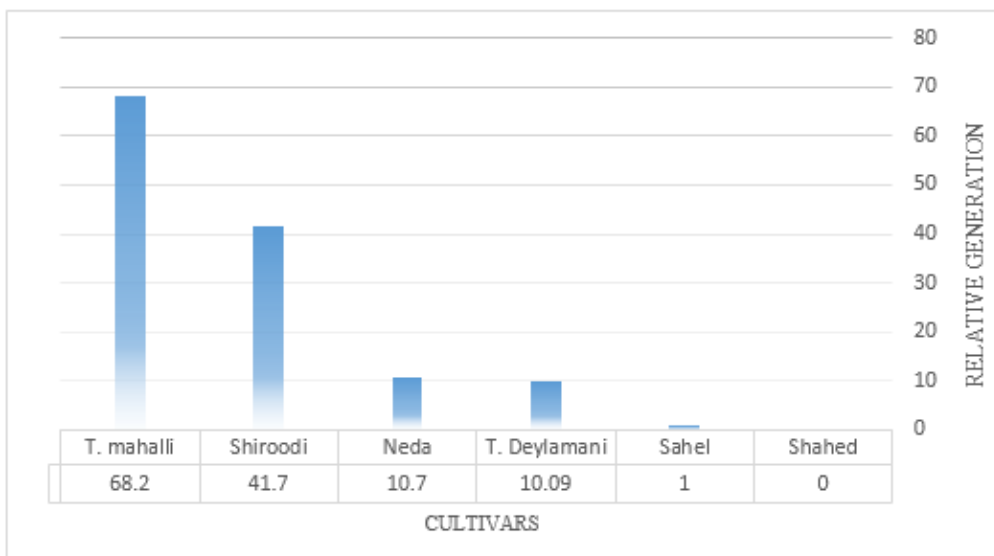
الگوی بیان ژن *NHI* در دو رقم ساحل و طارم محلی روند متفاوتی را نشان داد. در رقم محلی طارم بیان این ژن پس از افزایش نسبی در ساعت ۲۴ پس از تلقیح باکتری، پس از یک افست ناگهانی با شیب ملایمی تا ساعت ۹۶ پس از آلودگی افزایش یافت. بیشینه بیان این ژن در رقم محلی طارم در ساعت ۲۴ پس از آلودگی $1/9$ برابر نسبت به نمونه شاهد بود. در ساعات ۴۸ تا ۹۶ پس از آلودگی سطح بیان ژن مذکور به ترتیب $1/2$ ، $1/45$ و $1/6$ برابر نسبت به زمان صفر بود. نرخ بیان این ژن در رقم مقاوم ساحل تا ساعت ۷۲ پس از تلقیح با باکتری *Aaa* افزایش داشت و به ۵ برابر نسبت به زمان صفر رسید. در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۹۶ پس از تلقیح سطح بیان ژن مذکور به ترتیب $2/3$ ، $2/9$ و $2/4$ برابر نسبت به زمان صفر بود (شکل ۳).

الگوی بیان ژن *PR1a* در دو رقم ساحل و طارم محلی تا ساعت ۴۸ پس از تلقیح روند افزایشی را نشان

ارقام طارم محلی و شیروودی داشت در حالی که رقم ندا و طارم دیلمانی طول نوارهای قهوه ای کوتاه و با توسعه کمتری روی برگ مشاهده گردید. نوارهای آبسوخته روی رقم ساحل در این بازه بسیار خفیف و محدود بود. شمارش کلنی های رشد یافته روی تشتک های حاوی محیط غذایی NAG، جدا شده از هر رقم نیز مشاهدات فوق را تایید کرد (شکل ۱).

بررسی مولکولی سطح نسبی توسعه باکتری در گیاهچه ها با استفاده از تکثیر ناحیه ژنومی ITS باکتری انجام شد. تعداد نسخه های حاصل از تکثیر ژن هدف پس از ۴۰ سیکل در رقم حساس طارم محلی، ۶۸ برابر بیشتر از تکثیر این قطعه ۲۱۴ جفت بازی در رقم مقاوم ساحل بود (شکل ۲).

در این مطالعه پس از انجام آزمون های بررسی سطوح حساسیت و توسعه باکتری در گیاه در بین ارقام موجود، دو رقم طارم محلی و ساحل به ترتیب به عنوان ارقام حساس و مقاوم برگزیده شدند.



شکل ۲- تکثیر ناحیه ژنومی ITS باکتری تلقیح شده به گیاهچه ۵ رقم برنج با استفاده از تکنیک Real time-PCR.

Fig 2- Amplifying ITS Genomic region of the bacteria inoculated into 5 cultivars of rice seedling, using the Real time-PCR technique.



شکل ۳- نرخ بیان ژن NH1 در گیاهچه‌های برنج آلوده شده به باکتری Aaa در پنج بازه زمانی مختلف. ns, * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

Fig 3- Expression rate of NH1 gene in rice seedlings inoculated with Aaa at 5 different time course. (non-significant=ns, P<0.05=*, P<0.01=**).

زمانی ۲۴، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ۴/۸، ۳/۵ و ۲/۵ برابر بیشتر از نمونه شاهد و در رقم محلی طارم ۱/۵، ۱/۶ و ۱/۲ برابر بیشتر از نمونه تلقیح نشده بود (شکل ۴).

الگوی بیان ژن POX22.3 در رقم محلی طارم از

داد. همچنین بیان این ژن در رقم مقاوم ساحل در تمام بازه‌های زمانی مورد ارزیابی بیشتر از رقم محلی طارم بود. نرخ بیان این ژن در ساعت اوج بیان در رقم ساحل و طارم محلی به ترتیب ۱۶ و ۵/۵ برابر نسبت به زمان صفر بود. همچنین سطح بیان ژن PR1a در رقم ساحل در بازه‌های



شکل ۴- نرخ بیان ژن *PR1a* در گیاهچه‌های برنج آلوده شده به باکتری *Aaa* در پنج بازه زمانی مختلف. * و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

Fig 4- Expression rate of *PR1a* gene in rice seedlings inoculated with *Aaa* at 5 different time course. ($P < 0.05 = *$, $P < 0.01 = **$).

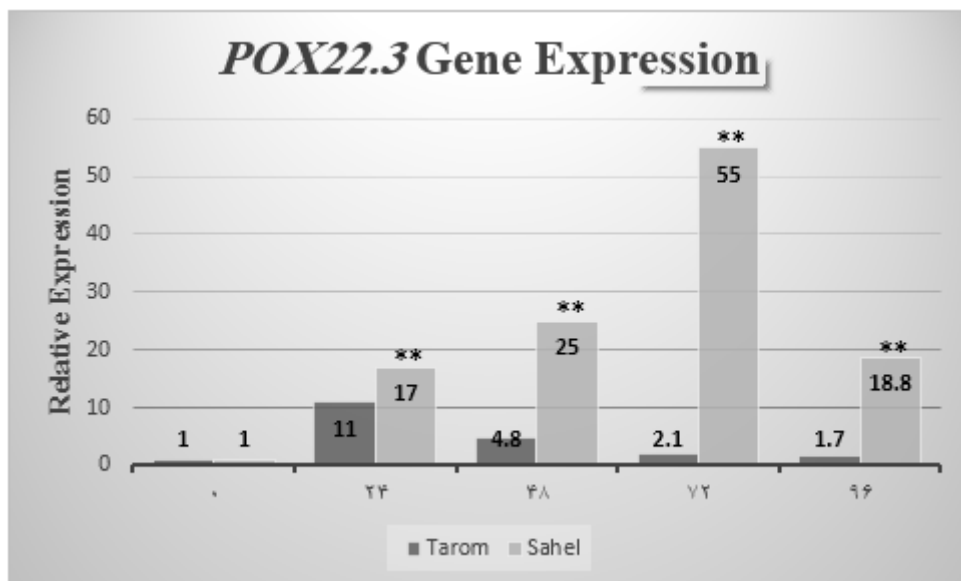
بیان این ژن در ساعات ۷۲ و ۹۶ پس از تلقیح به ترتیب ۱۷/۸ و ۴/۵ برابر نسبت به شاهد بود. این الگو در رقم طارم محلی روند صعودی را از ابتدا دنبال کرد، و در ساعت ۹۶ پس از

تلقیح در بیشینه حالت خود به ۴ برابر زمان صفر رسید. نرخ بیان این ژن در رقم مذکور در ساعات ۲۴ تا ۷۲ پس از آلودگی به ترتیب ۲/۳۴، ۳/۵ و ۳/۷ برابر نسبت به نمونه شاهد بود (شکل ۶).

الگوی بیان ژن *PDR20* در رقم محلی طارم از ساعت‌های ابتدایی پس از تلقیح در بازه‌های مورد بررسی روند نزولی را طی کرد. بیشینه بیان ژن مذکور در ساعت ۲۴ پس از آلودگی ۳/۲ برابر بیشتر از نمونه شاهد بود. سطح بیان این ژن در ساعات ۴۸ تا ۹۶ بعد از تلقیح با باکتری به ترتیب ۳، ۱/۶ و ۱/۴ برابر بیشتر از نمونه شاهد بود. الگوی بیان ژن *PDR20* در رقم ساحل بیشینه بیان این ژن را در ساعت ۴۸ پس از تلقیح نشان داد. در این ساعت

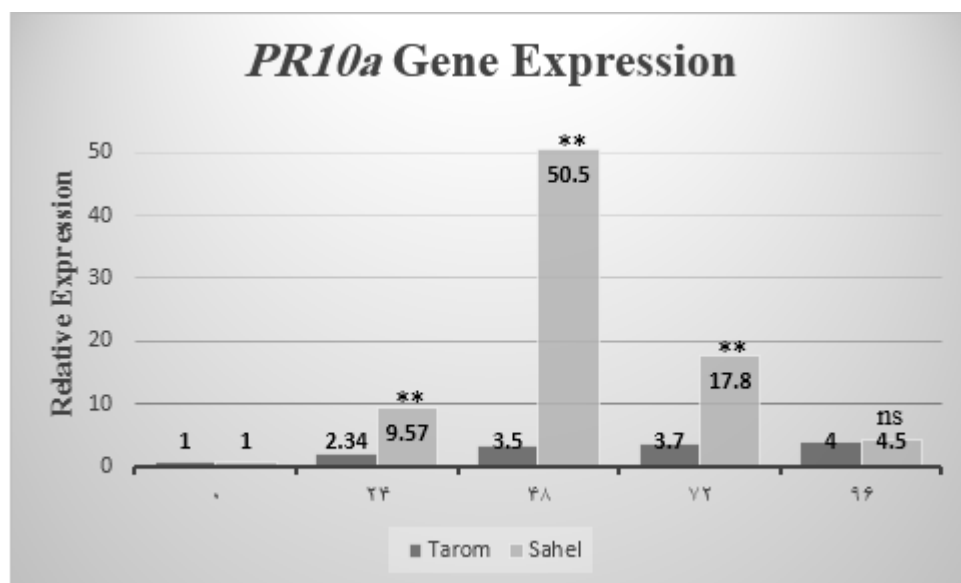
ساعت ۲۴ پس از تلقیح روند نزولی را تا آخرین بازه زمانی مورد بررسی طی کرد. اوج بیان این ژن در رقم مذکور در ساعت ۲۴ پس از آلودگی ۱۱ برابر نسبت به نمونه شاهد است. سطح بیان این ژن در بازه زمانی ۴۸ تا ۹۶ پس از آلودگی به ترتیب ۴/۸، ۲/۱ و ۱/۷ برابر نسبت به زمان صفر بود. بیان ژن *POX* در رقم ساحل تا ساعت ۷۲ پس از آلودگی افزایش داشت. اوج بیان بیان این ژن در این ساعت ۵۵ برابر بیشتر از زمان صفر بود. سطح بیان این ژن در ساعات‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ پس از تلقیح به ترتیب ۱۷، ۲۵ و ۱۸/۸ برابر بیشتر نمونه شاهد بود (شکل ۵).

الگوی بیان ژن *PR10a* در رقم ساحل متفاوت با الگوی بیان این ژن در رقم طارم محلی بود. در رقم ساحل در ساعت ۲۴ پس از تلقیح بیان ژن مذکور ۹/۵ برابر بیشتر از نمونه شاهد بود. بیشینه بیان این ژن در ساعت ۴۸ پس از تلقیح به بیش از ۵۰ برابر زمان صفر رسید. در ساعات بعد، این روند سیر نزولی به خود گرفت. به طوری که سطح



شکل ۵- نرخ بیان ژن *POX22.3* در گیاهچه‌های برنج آلوده شده به باکتری *Aaa* در پنج بازه زمانی مختلف **، معنی دار در سطح احتمال یک درصد

Fig 5- Expression rate of *POX22.3* gene in rice seedlings inoculated with *Aaa* at 5 different time course. ($P < 0.01 = **$).



شکل ۶- نرخ بیان ژن *PR10a* در گیاهچه‌های برنج آلوده شده به باکتری *Aaa* در پنج بازه زمانی مختلف ns و **، غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد

Fig 6- Expression rate of *PR10a* gene in rice seedlings inoculated with *Aaa* at 5 different time course. ($non-significant = ns$, $P < 0.01 = **$).

نرخ بیان این ژن ۸ برابر بیشتر از نمونه شاهد بود. نرخ بیان این ژن در ساعات ۲۴، ۷۲، و ۹۶ پس از تلقیح به ترتیب ۲، ۳/۴ و ۱/۴ برابر بیشتر از زمان صفر بود (شکل ۷).



شکل ۷- نرخ بیان ژن *PDR20* در گیاهچه‌های برنج آلوده شده به باکتری *Aaa* در پنج بازه زمانی مختلف ns و **، غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد

Fig 7- Expression rate of *PDR20* gene in rice seedlings inoculated with *Aaa* at 5 different time course. (non-significant=ns P, <0.01=**).

ژن *OsNHI* در برنج سبب افزایش حساسیت گیاهان تلقیح شده به قارچ *M. grisea* نشده است (Yuan et al. 2007). در تازه ترین مطالعه، دی و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که پاسخ‌های دفاعی گیاه جو تحت تاثیر تیمار با دو باکتری *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* و *Pseudomonas syringae* pv. *japonica* در مسیری مستقل از بیان ژن‌های *NPR1* فعال می‌شود و افزایش ترشح اتیلن و بیان فاکتورهای *WRKY* مستقل از مسیر *SAR* بوده است. به نظر می‌رسد پروتئین‌های *NHI* و مسیر مقاومت *SAR* بیشتر در برابر عوامل بیوتروف و در افزایش بیان ژن‌های *PR1* و *PR2* نقش دارد و در عوامل نکروتروف مسیر *ISR* با افزایش ترشح اتیلن و جاسمونیک اسید فعال می‌شود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد تفاوت سطح تجمع رونوشت این ژن در دو رقم، فقط در ساعات ۴۸ و ۷۲ معنی دار بود (شکل ۳). اگرچه سطح بیان این ژن در بازه‌های زمانی پس از آلودگی به شکل

بحث

در بررسی‌های مالنوئی و همکاران (۲۰۰۷) ثابت شد بیان ژن *AtNPR1* در سیب موجب القای مقاومت به عامل بیماری لکه سیاه سیب (*Venturia inaequalis*)، زنگ سیب (*Gymnosporangium juniperi-virginianae*) و باکتری عامل آتشک (*Erwinia amylovora*) می‌شود. کوپلیس و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که فوق بیان این ژن در برنج منجر به افزایش مقاومت به عامل باکتریایی بلایت (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) و بیماری قارچی بلاست (*Magnaporthe grisea*) شده است. مطالعات اخیر بابایی‌زاد و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که سرکوب ژن *HvNHI* در جو اگرچه باعث افزایش شدید حساسیت به عامل بیوتروف سفیدک سطحی (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) شد، ولی در میزان حساسیت به قارچ *Bipolaris* و *Fusarium* در گیاهان تراریخته تفاوتی مشاهده نشد. همچنین بیان شده است که خاموش کردن

رقم به طور معناداری متفاوت بود (شکل ۴). اگرچه تاثیر زخم حاصل از تلقیح ممکن است در افزایش سطح بیان ژن هدف تاثیرگذار بوده باشد، با این وجود نرخ بیان این ژن در تمام ساعت مورد ارزیابی در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بوده است و همچنین با استناد به نتایج مطالعات پیشین، می‌توان به این نتیجه دست یافت که گروه پروتئین PR1a نقش مثبتی در القای مقاومت گیاه برنج به باکتری عامل نوار قهوه ای داشته است.

سه ژن پراکسیداز *POX5.1*، *POX8.1* و *POX22.3* در برنج مقاوم به *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* شناسایی شده است. فقط دو ژن *POX8.1* و *POX22.3* در طول همکنش مقاوم بیان می‌شوند (Chittoor et al. 1997). ساساکی و همکاران (۲۰۰۴) افزایش بیان ژن‌های *OsPOX* تحت تاثیر تیمار با جاسمونیک اسید، قارچ عامل بلاست و همچنین تنش حاصل از زخم را به اثبات رساندند. کیم و همکاران (۲۰۰۴) و سیاری و همکاران (۲۰۱۴) نقش موثر ژن *POX* را در تعامل گیاه برنج به ترتیب با قارچ عامل بلاست و شیت بلایت (*Rhizoctonia solani*) به اثبات رساندند. در تمام بازه های زمانی مورد ارزیابی در این مطالعه سطح بیان ژن *POX22.3* در رقم مقاوم ساحل به طور معنی داری بیشتر از رقم طارم محلی بود. نکته قابل توجه افزایش نرخ بیان این ژن در ساعت ۷۲ پس از آلودگی است که تا ۵۵ برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود. به نظر می‌رسد افزایش غلظت پراکسیداز تا روز سوم پس از تلقیح با لیگنینی نمودن دیواره سلولی و تولید گونه های اکسیژن فعال در القای مقاومت در گیاه در برابر عامل بیماری نوار قهوه‌ای نقش داشته است. افزایش بیان این ژن در رقم محلی طارم در بیشینه حالت خود در ساعات ابتدایی پس از تلقیح باکتری ۱۱ برابر بیشتر از حالت پایه بوده است که این روند در ساعات بعدی به

رادیکالی افزایش نشان نداد، با این حال به نظر می‌رسد بیان این ژن در بالادست بیان برخی از ژن های مرتبط با بیماری‌زایی برنج در تعامل با باکتری *Aaa* نقش داشته است.

پروتئین‌های در ارتباط با بیماری‌زایی کلاس ۱، گروه غالب در میان PRها بوده و معمولاً به عنوان یک شاخص برای مقاومت القایی سیستمیک (SAR) مورد استفاده قرار می‌گیرند (Van loon et al. 2006). کیم و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که هر دو ژن *PR1a* و *PR1b* در برگ‌های برنج تلقیح شده با قارچ عامل بلاست و یا عامل بلایت باکتریایی بیان می‌شوند. ثابت شده است تیمار گیاهان برنج با سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و آبسزیک اسید سبب افزایش بیان ژن *OsPR1* می‌شود (Agrawal et al. 2001). در یک پژوهش جامع میتشوارا و همکاران (۲۰۰۸) دوازده گروه از خانواده *OsPR1* را مورد مطالعه قرار دادند و ثابت شد بیان ژن *PR1a* در اثر تلقیح با جدایه سازگار و ناسازگار قارچ عامل بلاست، باکتری عامل بلایت، تنش حاصل از ایجاد زخم، و تیمار با سالیسیک اسید و جاسمونیک اسید افزایش می‌یابد. همچنین در همین مطالعه عنوان شد گروه پروتئین *PR1a* به صورت طبیعی در ریشه، ساقه و برگ سطحی از بیان را نشان داده است. بخشی از نتایج این مطالعه توسط گروهی از محققان دیگر تکرار و تایید شد (Hou et al. 2012). نتایج مطالعات تاناکا و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که بیان این ژن تحت تاثیر تلقیح باکتری *Aaa* ثابت مانده است. نتایج مطالعه پیش رو نشان داد الگوی بیان ژن *PR1a* در هر دو رقم حساس و مقاوم روند کاملاً مشابهی رو دنبال کرده است، تجمع سطح رونوشت این ژن در هر دو رقم، در ساعت ۴۸ پس از تلقیح در بیشینه حالت خود قرار داشت، در این ساعت اختلاف سطح بیان این ژن، در دو

grandiglumis) نشان دادند *OgPR10* تحت تیمار مصنوعی با سالیسیک اسید و جاسمونیک اسید بیان نمی‌شود، ولی سایر محرک‌های از پیش معرفی شده، و همچنین تیمار با عصاره مخمر (Yeast extract) باعث افزایش بیان این ژن می‌شود. با توجه به جمیع مطالعات قبلی در مورد پروتئین PBZ1 در گیاه برنج می‌توان گفت اگرچه این پروتئین به طور طبیعی و تحت تاثیر زخم تحریک نمی‌شود، اما عوامل زنده (Biotic) و غیرزنده متعددی می‌تواند در القای بیان این ژن نقش داشته باشند. نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که در اثر تلقیح باکتری عامل نوار قهوه‌ای به گیاه برنج و با دریافت محرک‌های آزاد شده باکتری توسط گیرنده‌های گیاه، نرخ بیان ژن *OsPR10* افزایش می‌یابد و این پاسخ در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس سریعتر و بیشتر بوده است. به طوری که نرخ بیان این ژن در ساعت ۴۸ پس از آلودگی تا ۵۰ برابر نسبت زمان صفر افزایش یافت (شکل ۶) که خود مؤید نقش این ژن در مسیر مقاومت و سرکوب باکتری مهاجم می‌باشد.

حکمتی و همکاران (Hekmati et al. 2013) با مطالعه بر روی ۴ گروه از PDRها نشان دادند، تیمار گیاه با سالیسیک اسید با افزایش بیان ژن *OsPDR3* و *OsPDR4* در تعامل رقم مقاوم خزر به قارچ عامل بلاست برنج نقش دارد، در حالی که دو گروه *OsPDR5* و *OsPDR8* پاسخ معنی داری به تیمار با سالیسیک اسید در رقم خزر ندادند. ثابت شده است که سطح بیان ژن *OsPDR20* در اثر تیمار با سالیسیک اسید، جاسمونیک اسید، (DDT) dithiothreitol و glutathione در برگ و ریشه افزایش می‌یابد (Moons 2008). در بررسی‌های اخیر ثابت شده است که بیان ژن *TaPDR1* در دو رقم گندم *Fusarium* (*Triticum aestivum* L.) در اثر تلقیح با قارچ

سرعت کاهش یافت (شکل ۵). به نظر می‌رسد گروه شماره ۹ پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR9) نقش بسزایی در تعامل موفق گیاه برنج با باکتری *Aaa* داشته باشد.

پروتئین *OsPR10a* به طور طبیعی در برگ‌ها بیان نمی‌شود و به زخم‌ها عکس العمل نشان نمی‌دهد، اما بالقوه در سطح بالایی به وسیله جاسمونیک اسید (JA)، سالیسیک اسید (SA)، کانتاردین (CN)، اندوتال (EN)، اتفون (ET)، کیتسین (KN)، اوزون (O₃)، آب اکسیژنه (H₂O₂)، کیتوزان (chitosan) دی اکسید سولفور (SO₂) و همچنین تحریک توسط پاتوژن‌ها بیان می‌شود (Rakwal et al. 2001, Agarwal et al. 2002, Jwa et al. 2006). ثابت شده است که ژن‌های *OsPR10a* و *OsPR10b* در سطح بالایی به شکل موضعی به وسیله آلودگی با *M. grisea* بیان می‌شوند (McGee et al. 2001). تاناکا و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعات خود ثابت کردند بیان ژن *PBZ1* در برنج در اثر القای یک جدایه ناسازگار باکتری *A. avene* subsp. *avenae* در ۶ ساعت پس از آلودگی افزایش می‌یابد در حالی سطح بیان این ژن در برابر استرین سازگار همین باکتری پایین و ثابت مانده است. کیم و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که *OsPR10* تحت تاثیر تنش‌های غیر زنده (Abiotic) از جمله شوری، سرما و خشکی با غلظت بالایی در برگ‌ها و ساقه تجمع می‌یابد. همچنین گروهی از محققین ژاپنی با استفاده از تکنیک Real time-PCR و بررسی سطح تجمع رو نوشت ژن *PBZ1* نشان دادند نرخ بیان این ژن حتی با تلقیح پروتئین تاژک خالص شده از باکتری *Aaa* نیز نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت و این پروتئین به عنوان یک ایستور واکنش دفاعی گیاه را فعال کرد (Takai et al. 2007). شین و همکاران (۲۰۱۲) با تحقیق روی ژن *PR10* گونه وحشی برنج (*Oryza*)

پاسخ و همچنین سطح بیان سریع‌تر و به مقدار قابل توجهی بیشتر بود. اگرچه برخی از پروتئین‌های دخیل در مقاومت به طور طبیعی به مقدار اندکی در بافت‌های گیاه بیان می‌شوند، ولی افزایش بیان آن‌ها پس از عفونت با عامل بیماری‌زا و یا تنش‌های محیطی به میزان زیادی افزایش می‌یابد که خود دلیل محکمی بر نقش این پروتئین‌ها در پاسخ و مقاومت به آسیب‌هایی با منشاء زنده و غیر زنده می‌باشد. مهندسی ژنتیک همواره سعی بر دستیابی به گیاهانی دارد که حاوی ژن‌های مطلوب مقاومت به آفات و بیماری‌ها می‌باشند. از آنجایی که استفاده از سموم شیمیایی محدودیت‌ها و خطرات خاص خود را دارد، استفاده از گیاهان تراریخت (Transgenic plants) کاهش هزینه، افزایش کیفیت و کمیت محصول، و کاهش صدمات وارده به منابع زیستی را به دنبال دارد. این اولین گزارش از نقش ژن‌های *POX*، *NHI* و *PDR20* در تعامل گیاه برنج به باکتری *A. avenae* subsp. *avenae* بود. امید است نتایج حاصل این پژوهش و تحقیقات تکمیلی در شناسایی ژن‌های دخیل در مقاومت گیاهان برنج به باکتری عامل بیماری نوار قهوه‌ای و انتقال و یا افزایش بیان آن‌ها در ارقام حساس و سایر گیاهان در تولید گیاهان مطلوب تراریخت موثر باشد.

graminearum و توکسین مترشحه آن - دی اکسی نیوالنون (deoxynivalenol) - افزایش یافته و نرخ بیان این ژن در رقم مقاوم به مراتب بیشتر از رقم حساس بوده است (Muhovski et al. 2014). نتایج این پژوهش نشان داد سطح بیان گروه ۲۰ از زیر خانواده *OsPDR* ها در اثر تلقیح باکتری *Aaa* در هر دو رقم، در ساعات پس از آلودگی نسبت به گیاهان شاهد افزایش داشت. به نظر می‌رسد افزایش تولید پروتئین *PDR20* در ساعات اولیه پس از آلودگی در هر دو رقم ساحل و طارم محلی تحت تاثیر افزایش ترشح جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید بوده است. با این حال بیشینه بیان این ژن در ساعت ۴۸ پس از تلقیح در رقم ساحل ۸ برابر بیشتر از نمونه شاهد بود (شکل ۷). با توجه به این که ثابت شده است که اکثر ناقلین *PDR* که در گیاهان شناسایی شده اند توسط محرک های زیستی و غیرزیستی فعال می‌شوند و با مصرف انرژی مواد را برخلاف شیب غلظت منتقل می‌کنند (Amaral et al. 2007)، به نظر می‌رسد با انتقال مواد ضد میکروبی نظیر فیتوآلکسین‌ها و پروتئین‌های القایی در پاسخ به پاتوژن‌ها نقش داشته باشند.

به طور کلی بیان ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش در رقم مقاوم ساحل نسبت به رقم طارم محلی در زمان

منابع

- Agrawal G. K., Rakwal R., Jwa N. S. and Agrawal V. P. 2001. Signaling molecules and blast pathogen attack activates rice *OsPR1a* and *OsPR1b* genes: a model illustrating components participating during defense/stress response. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 1095-1103.
- Agrawal G.K., Rakwal R., Tamogami S., Yonekura M., Kubo A. and Saji H. 2002. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 1061-1069.
- Amaral A. M. D., Saito D., Formighieri E. F., Rabello E., Souza A. N. D., Silva-Stenico M. E. and Sui Mui T. 2007. Identification of citrus expressed sequence tags (ESTs) encoding pleiotropic drug resistance (PDR)-like proteins. *Genetics and Molecular Biology* 30: 857-865.
- Arabi F., Nikraves Z., Babaeizad V., Rezaeian V. and Rahimian H. 2006. Occurrence of bacterial leaf spot and blight of garden beet caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 42: 655-671. (in Persian with English Summary)
- Babaeizad, V., Imani J. G., Kogel K. H., Eichmann R., Hüchelhoven R. 2009. Over-expression of the cell death

- regulator *BAX Inhibitor-1* in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 455–463.
- 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 by introduction of an NH1/OsNPR1 paralog. *Plant Biotechnology Journal* 9: 205-15.
- Chittoor J. M., Leach J. E. and White F. 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.
- De Vleeschauwer D., Djavaheeri M., Peter A. H., Bakker M. and Monica H. 2008. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on Pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiology* 148: 1996-2012.
- Dey S., Wenig M., Langen G., Sharma S., Kugler K. G., Knappe C., Hause B., Bichlmeier M., Babaeizad V., Imani J., Janzik I., Stempf T., Hüchelhoven R., Kogel K., Mayer K and Volt A. 2014. Bacteria-Triggered Systemic Immunity in Barley Is Associated with WRKY and ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS But Not with Salicylic Acid. *Plant Physiology* 166: 2133-2151.
- FAO. 2012. FAO. Statics division 2013. : www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/en
- Hashemi S., Babaeizad V., Tajik M. A. and Rahimian H. 2013. STUDYING OF SEVERAL Pathogenesis-related genes ROLE IN RICE RESISTANCE TO *Bipolaris oryzae*. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49: 171-180. (in Persian with English Summary)
- Hekmati ZH., Alami A. and Sohani M. M. 2013. Effect of salicylic acid on expression of some defense-related genes in rice. *Modern Genetics Journal* 9: 363-372. (in Persian)
- Hilaire E., Young S. A., Willard L. H., McGee J. D., Sweat T., Chittoor J. M., Guikema J. A. and Leach J. E. 2001. Vascular defense responses in rice: Peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1411-1219.
- Hou M., Xu W., Bai H., Liu Y., Li L., Liu L., Liu B. and Liu G. 2012. Characteristic expression of rice pathogenesis related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Cell Reports* 31: 895-904.
- Jasiński M., Stukkens Y., Degand H., Purnelle B., Marchand-Brynaert J. and Boutry M. 2001. A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *The Plant Cell Online* 13: 1095-107.
- 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.
- Jwa N. S., Agrawal G. K., Tamogami S., Yonekura M., Han O., Iwahashi H. and Rakwal R. 2006. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self defense mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 261- 273.
- Kadota I. and Ohuchi A. 1983. Symptoms of bacterial brown stripe of rice seedlings in nursery boxes. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 49: 561-564.
- Kim S., Ahn I. P., Park C. H., Park S. G., Park S. Y., Jwa N. S. and Lee Y. H. 2001. Molecular characterization of the cDNA encoding an acidic isoform of PR-1 protein in rice. *Molecules and Cells* 11: 115-121.
- Kim S. T., Kim S. G., Hwang D. H., Kang S. Y., Kim H. J., Lee B. H., Lee J. J. and Kang K. Y. 2004. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* 4: 3569-78.
- Kim S. T., Yu S., Kang Y. H., Kim S. G., Kim J. Y., Kim S. H. and Kang K.Y. 2008. The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. *Plant Cell Reports* 27: 593-603.
- Malnoy M., Jin Q., Borejsza-Wysocka E. E., He S. Y. and Aldwinckle H. S. 2007. Over-expression of the apple *MpNPR1* gene confers increased disease resistance in *Malus X domestica*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 20: 1568-1580.
- McGee J., Hamer J. and Hodges T. 2001. Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 14: 877–886.
- Midoh N. and W Iwata. 1996. Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiology* 37: 9-18
- 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 (121/180). *Molecular Genetics and Genomics* 279: 415-427.
- 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.
- Muhovski Y., Jacquemin J.-M, and Batoko H. 2014. Identification and differential induction of *ABCG* transporter genes in wheat cultivars challenged by a deoxynivalenol-producing *Fusarium graminearum* strain. *Molecular Biology Reports* 41: 6181-6194.
- Nuruzzaman M., Zhang R., Cao H. Z., and Luo Z. Y. 2014. Plant Pleiotropic Drug Resistance Transporters: Transport Mechanism, Gene Expression, and Function. *Journal of Integrative Plant Biology* 56: 729-740
- Passardi F., Penel C. and Dunand C. 2004. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science – Cell* 9: 534-40.
- Quilis, J. P. J., Messegueur G., Brugidou C. and Segundo B. S. 2008. The Arabidopsis *AtNPR1* inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stress in transgenic rice. *Molecular Plant Microbe Interaction* 21: 1215-1231.
- Sasaki K., Iwai T., Hiraga S., Kuroda K., Seo S., Mitsuhara I., et al., 2004. Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. *Plant and Cell Physiology* 45: 1442-1452.
- Sayari M., Babaeizad V., Ghanbari M.A.T. and Rahimian H. 2014. Expression of the pathogenesis related proteins, NH-1, PAL, and lipoxygenase in the Iranian Tarom and Khazar rice cultivars, in reaction to *Rhizoctonia solani*—the causal agent of rice sheath blight. *Journal of Plant Protection Research* 54: 36-43.
- Sharifnabi B. 2010. Disease of Field Crops in Iran. Isfahan University of Technology Publication Center. 440pp.
- Shin S. H., Pak J.-H., Kim M. J., Kim H. J., Lee J. H., Kim D. H., et al., 2012. Cloning and characterization of pathogenesis-related gene 10a (OgPR10a) derived from wild rice (*Oryza grandiglumis*). *Korean Journal of Breeding Science* 44: 1-10.
- Takai R., Kaneda T., Isogai A., Takayama S. and Che F.-S. 2007. A new method of defense response analysis using a transient expression system in rice protoplasts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71: 590-593.
- Tanaka N., Che F. S., Watanabe N., Fujiwara S., Takayama S. and Isogai A. 2003. Flagellin from an Incompatible Strain of *Acidovorax avenae* Mediates H₂O₂ Generation Accompanying Hypersensitive Cell Death and Expression of *PAL*, *Cht-1*, and *PBZI*, but Not of *LOX* in Rice. *American Phytopathological Society* 16: 422-428.
- Thomma B.P., Cammue B. P. and Thevissen K. 2002. Plant defensins. *Planta* 216: 193-202.
- Van Loon L. C., Rep M. and Pieterse C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-62.
- Van Nguyen N. and Ferrero A. 2004. Meeting the challenges of global rice production. *Paddy and Water Environment* 4: 1-9.
- Wildermuth M. C., Dewdney J., Wu G. and Ausubel F.M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565.
- Yuan Y., Zhong S., Li Q., Zhu Z., Lou Y., Wang L., Wang J., Wang M., Li Q. and Yang D. 2007. Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility†. *Plant Biotechnology Journal* 5: 313-324.
- Yuan J. S., Reed A., Chen F. and Stewart Jr C. N. 2006. Statistical analysis of real time PCR data, *MBC Bioinformatic* 7: 85.