ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحه ۳۷۲- ۳۶۳

بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر الگوی بیان برخی از ژن‌های مرتبط با ساز و کارهای دفاعی در برنج

Effect of salicylic acid on expression of some defense-related genes in rice

ژاله حکمتی[۱]، علی اعلمی*[۱]، محمد مهدی سوهانی[۱]

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد و استادیاران، دانشگاه گیلان، ایران

Hekmati ZH[1], Aalami A*[1], Sohani MM[1]

1. MSc Student and Assistant Professors, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ali_aalami@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۸- تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱)

چکیده

اسید سالیسیلیک به عنوان یک عامل کلیدی در القای تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله بیماری‌ها نقش دارد. پس از هجوم پاتوژن‌ها به خصوص عوامل قارچی، گیاهان با القای مقاومت اکتسابی سیستمیک که با افزایش میزان اسید سالیسیلیک درونی گیاه همراه است مسیرهای پیام رسانی گسترده‌ای از قبیل رونویسی ژن-های رمزکننده پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی (Pathogenesis related proteins)، آنزیم‌های دخیل در سنتز فیتوالکسین‌ها و پمپ‌های ناقل ABC-transporter را فعال می‌سازند. در این پژوهش اثر اسید سالیسیلیک بر بیان تعدادی از ژن‌های مرتبط با سازوکار دفاعی شامل *PR1*، *PDF1.2*، *Thionin*، *NPR1*، *PDR3*، *PDR4*، *PDR5* و *PDR8* با استفاده از تکنیک Real time PCR در دو رقم خزر (مقاوم به بلاست) و هاشمی (حساس به بلاست) در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال اسید سالیسیلیک بررسی شد. نتایج نشان داد مصرف اسید سالیسیلیک سبب افزایش بیان ژن‌های مورد بررسی شده که این افزایش در زمان-های مختلف بین دو رقم متفاوت بود به‌طوری‌که *PR1*، *PDF1.2* و*PDR3* در رقم خزر افزایش بیان نشان دادند ولی در رقم هاشمی در هیچ زمانی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین بیان دو ژن *PDR5* و*PDR8* در رقم هاشمی نسبت به خزر در ۴۸ ساعت پس از تیمار افزایش معنی‌داری نشان داد. بنابراین مصرف اسید سالیسیلیک می‌تواند سبب افزایش بیان ژن‌های دفاعی و احتمالا القای تحمل گیاه در برابر حمله پاتوژن-ها شود. همچنین الگوی بیان ژن‌ها در اثر تیمار اسید سالیسیلیک تا حد زیادی وابسته به ماهیت ژنتیکی ژنوتیپ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

اسیدسالیسیلیک
برنج
پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی
پمپ‌های ABC

Archive of SID

مقدمه

عواملی از قبیل کمبود آب و غذا، شرایط غیرمتعادل آب و هوایی، آفات و عوامل بیماری‌زا هریک به نحوی رشد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهند و گیاهان در نتیجه بروز این تنش‌ها واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. از جمله سیستم‌های دفاعی گیاهان در مقابل بروز تنش‌ها مقاومت القایی است. در بین مقاومت‌های القایی، مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR)[1] بیشتر از انواع دیگر مطالعه شده است. حفاظت سیستمیک اغلب در مقابل پاتوژن‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی موثر است این حفاظت به اسید سالیسیلیک به عنوان یک ملکول سیگنال وابسته است. اسید سالیسیلیک در ایجاد تحمل به تنش‌های محیطی نقش کلیدی دارد به طوری که در فرایند تحمل به بیماری‌ها بیشترین تاثیر مربوط به این هورمون در گیاهان می‌باشد (Kogel and Langen 2005).

اسید سالسیلیک بیان ژن‌های دفاعی را از طریق پروتئین تنظیمی NPR1[2]، که یک ملکول کلیدی واسطه مقاومت اکتسابی سیستمیک در تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها می‌باشد، افزایش می‌دهد (Dong 2004). میزان اسید سالیسیلیک پس از آلودگی گیاه توسط پاتوژن‌ها افزایش می‌یابد، که این امر منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه می‌شود که نتیجه آن انتقال NPR1 از سیتوپلاسم به هسته می‌باشد. NPR1 در هسته به همراه عوامل رونویسی سبب بیان برخی از ژن‌های مرتبط با ساز و کارهای تحمل در گیاه می‌شود (Pieterse and Vanloon 2004)، که از جمله این ژن‌ها می‌توان به پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PRPs)[3] اشاره کرد. بیان برخی از ژن‌های رمز کننده پمپ‌های ABC-transporter نیز پس از افزایش اسید سالیسیلیک تغییر می‌کند (Moons 2008; Sugano et al. 2010). PRPsها از مهم‌ترین عوامل ایجاد تحمل در برابر پاتوژن‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی می‌باشند، ۱۷ خانواده از این پروتئین‌ها شناسایی شده و نقش تعداد زیادی از این پروتئین‌ها در گیاهان بررسی شده است. این پروتئین‌ها بر اساس خانواده‌ای که به آن تعلق می‌گیرند، دارای خصوصیات ضدقارچی، کیتینازی، پروتئینازی، پراکسیدازی، ریبونوکلئازی و ... می‌باشند (Sels et al. 2008). پمپ‌های ABC-transporter نیز از جمله عوامل دخیل در ایجاد تحمل می‌باشند که از زیر خانواده‌های این پمپ‌ها می‌توان به (PDR)[4]، اشاره کرد. این پمپ‌ها با مصرف انرژی، مواد را در خلاف جهت شیب غلظت منتقل می‌کنند و قادرند مواد متنوعی شامل: لیپیدها، یون‌های فلزات سنگین، اسیدهای غیرآلی، قندها، آمینواسیدها، پپتیدها و متابولیت‌های ثانویه را انتقال دهند (Jasinski et al. 2003; Moons 2008). از جمله عوامل ضدمیکروبی که پس از حمله پاتوژن‌ها در گیاه تولید می‌شود و توسط پمپ‌های ABC منتقل می‌شود، فایتوالکسین‌ها هستند (Grayer and Kokubun 2001).

گزارشات متعددی مبنی بر اهمیت نقش اسید سالیسیلیک بر کاهش اثرات ناشی از تنش‌ها به خصوص تنش‌های زیستی از طریق شکل‌گیری مقاومت اکتسابی سیستمیک، افزایش بیان برخی از ژن‌های مقاومت به بیماری از قبیل ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی وجود دارد. بر این اساس با توجه به نقش کلیدی اسید سالیسیلیک در این فرایندها در پژوهش حاضر اثر محلول پاشی اسید سالیسیلیک بر بیان برخی از ژن‌های مرتبط با ساز و کارهای دفاعی مقاومت به بیماری مانند *PRP* ها و *PDR* ها در دو رقم بومی و اصلاح شده برنج مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق ارقام هاشمی (رقم بومی و رایج منطقه) و خزر (رقم اصلاح شده) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مطالعات موسسه تحقیقات برنج کشور در رشت (Momeni et al. 2006)، رقم خزر مقاوم به بیماری شایع بلاست و رقم هاشمی به این بیماری حساس می‌باشد. قبل از کاشت، بذرها ضدعفونی شده و سپس در گلدان‌های حاوی خاک استریل کشت شدند.

تیمار گیاهان با هورمون اسید سالیسیلیک

برای اعمال تیمار از گیاهچه‌های برنج در مرحله سه برگی و قبل از ظهور برگ چهارم استفاده شد. برای این منظور از محلول اسید

[1] Systematic acquired resistance
[2] Non-expresser of pathogenesis related genes 1
[3] Pathogenesis related proteins
[4] Pleiotropic drug resistance

Archive of SID
www.SID.ir

سالیسیلیک (مرک- آلمان ۱۰۰۶۳۱) با غلظت موثر دو میلی‌مولار به صورت محلول پاشی در شرایط کنترل شده دمایی ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی استفاده شد (Daw et al. 2008). بدین صورت که ابتدا گیاهان کشت شده در گلدان به دو گروه مجزا با فاصله تقسیم و گروه اول با محلول اسید سالیسیلیک و گروه دوم که نمونه‌های شاهد محسوب می‌شدند با آب مقطر محلول‌پاشی شدند. سپس نمونه‌گیری در پنج مرحله زمانی شامل صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار در سه تکرار انجام شد. در هر نمونه‌گیری ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگی جدا شده، بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت و سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

بررسی بیان ژن‌ها به روش Real Time PCR

جهت بررسی بیان ژن‌ها در دو نمونه تیمار و شاهد مربوط به دو رقم هاشمی و خزر، استخراج RNA بر اساس دستورالعمل کیت RNX-Plus (شرکت سیناژن) انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر تایید و برای ساخت cDNA از کیت Fermrntas K1621 استفاده شد. پس از ساخت cDNA واکنش‌های کنترل مثبت و منفی به منظور بررسی صحت ساخت آن انجام شد و پس از تایید cDNA ساخته شده، میزان بیان برخی از ژن‌های مرتبط با ساز و کارهای تحمل شامل ژن تنظیم کننده مسیرهای پیام‌رسان، *NPR1*، سه پروتئین مهم مرتبط با بیماری‌زایی (PRP) از جمله *PR1*، دیفنسین (*PDF1.2*) و تیونین (*Thi2.1*) و چهار پمپ ABC ترانسپورتر *PDR3*، *PDR4*، *PDR5* و *PDR8* بررسی شد. جهت نرمال‌سازی داده‌ها نیز از *18S* ریبوزومی به عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول۱). واکنش‌های Real Time PCR با استفاده از محلول SYBR Green ساخت شرکت Fermentas در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix، ۶/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، دو میکرولیتر آغازگر پیشرو، دو میکرولیتر آغازگر پسرو و دو میکرولیتر cDNA، انجام شد. چرخه دمایی و برنامه زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه (۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی (۱۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، اتصال آغازگر (۴۵ ثانیه در ۵۷ درجه سانتی‌گراد)، بسط آغازگر (۱۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و پس از آن بسط نهایی (۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) بود.

داده‌های حاصل از Real Time PCR به صورت نسبی و بر اساس روش ΔΔct (Hunt 2006) با داده‌های ژن مرجع نرمال شدند. سپس این داده‌ها به صورت آزمایش اسپلیت پلات در زمان (ژنوتیپ در پلات اصلی و زمان در پلات فرعی) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال دار پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و برای رسم نمودارهای مربوطه نیز از برنامه Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

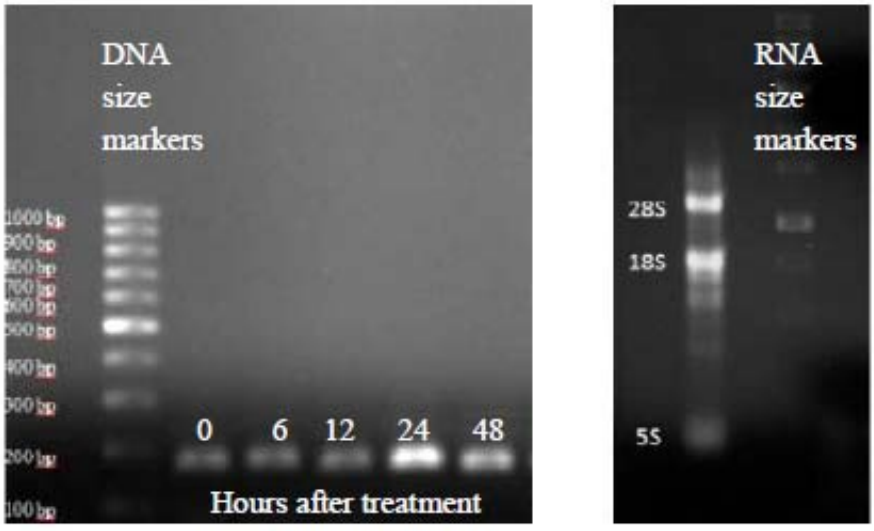
پس از استخراج RNA و ساخت cDNA جهت ارزیابی بیان ژن‌های مورد نظر ابتدا کیفیت RNA و cDNA نمونه‌ها روی ژل آگارز بررسی شدند. وجود باندهای واضح برای 28S و 18S نشان از کیفیت مناسب RNA و تک باندهای cDNA صحت ساخت آن را تایید کرد (شکل۱). نتایج حاصل از داده‌های Real Time PCR نشان داد که الگوی بیان ژن *OsNPR1* در رقم خزر و هاشمی در زمان‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد به نحوی که بیشترین میزان بیان این ژن در رقم خزر در زمان ۶ ساعت پس از تیمار با اسید سالیسیلیک اتفاق افتاد در حالی‌که در رقم هاشمی میزان بیان این ژن در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید (شکل۲- الف). پروتئین NPR1 تنظیم کننده کلیدی مسیر مقاومت اکتسابی سیستماتیک محسوب می‌شود، که در انتقال پیام توسط سالیسیلیک اسید در جهت فعال کردن بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی نقش اساسی دارد. NPR1 برای ایفای نقش تنظیم‌کنندگی خود، وارد هسته می‌شود ولی به طور مستقیم به DNA متصل نمی‌شود بلکه به همراه فاکتورهای رونویسی TGA[1] این عمل خود را کامل می‌کند (Pieterse and Van Loon 2004). در گزارشات قبلی نیز تیمار گیاه برنج با اسید سالیسیلیک یا بنزوتیادیازول (آنالوگ اسید سالیسیلیک) سبب افزایش بیان ژن *OsNPR1* و فاکتورهای رونویسی مرتبط با آن شد (Sugano et al. 2010)، همانطور که اشاره شد در این بررسی نیز بیان این ژن پس

[1] TGACG motif binding

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

ژن	شماره دسترسی	آغازگر (′۳-′۵)	دمای ذوب (°C)	منبع
18S rRNA	AK059783	F: CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA R: ACACTTCACCGGACCATTCAA	62.05 61.14	(Jain et al. 2006)
OsNPR1	AK120715	F: TGGCAGGTGAGAGTCTACGA R: AGGTGGATTTGCACCAGAAC	57.96 58.43	(Sugano et al. 2010)
OsPR1	AK121108	F: CGCTGTGTGTTTGTGTTATGTC R: CGTGGTTTTGTCTTTATTTCAATCC	57.66 60.70	(Mitsuhara et al. 2008)
PDF1.2	AY063779	F: ATCACCCTTATCTTCGCTGC R: TGCTGGGAAGACATAGTTGC	57.81 57.33	(Qu et al. 2010)
Thi2.1	AY080781.1	F: GCTAGGCTTAGTCCTGCAAC R: GGTGACAGTCTCAGCTTCCT	55.40 55.38	(sadati et al. 2012)
OsPDR3	AK121517	F: TTGCTTGGAGCCACTTATGC R: CCTCTTTAGCTGCAAGTGGC	59.80 58.67	(Moons 2008)
OsPDR4	AK108694	F: GTACAATTTACTCGGAGCCACT R: TGTCTGTGCTATGCCATTGC	56.05 59.26	(Moons 2008)
OsPDR5	AK105311	F: TCCGTGAATGATCTGAACAATC R: GATTGACATCCTGCTGGACAC	58.43 58.96	(Moons 2008)
OsPDR8	AK065988	F: GAGCAGCTGGCATGTATTCAG R: GTCAAGAGGCAGGAAGCTCA	59.44 59.11	(Moons 2008)



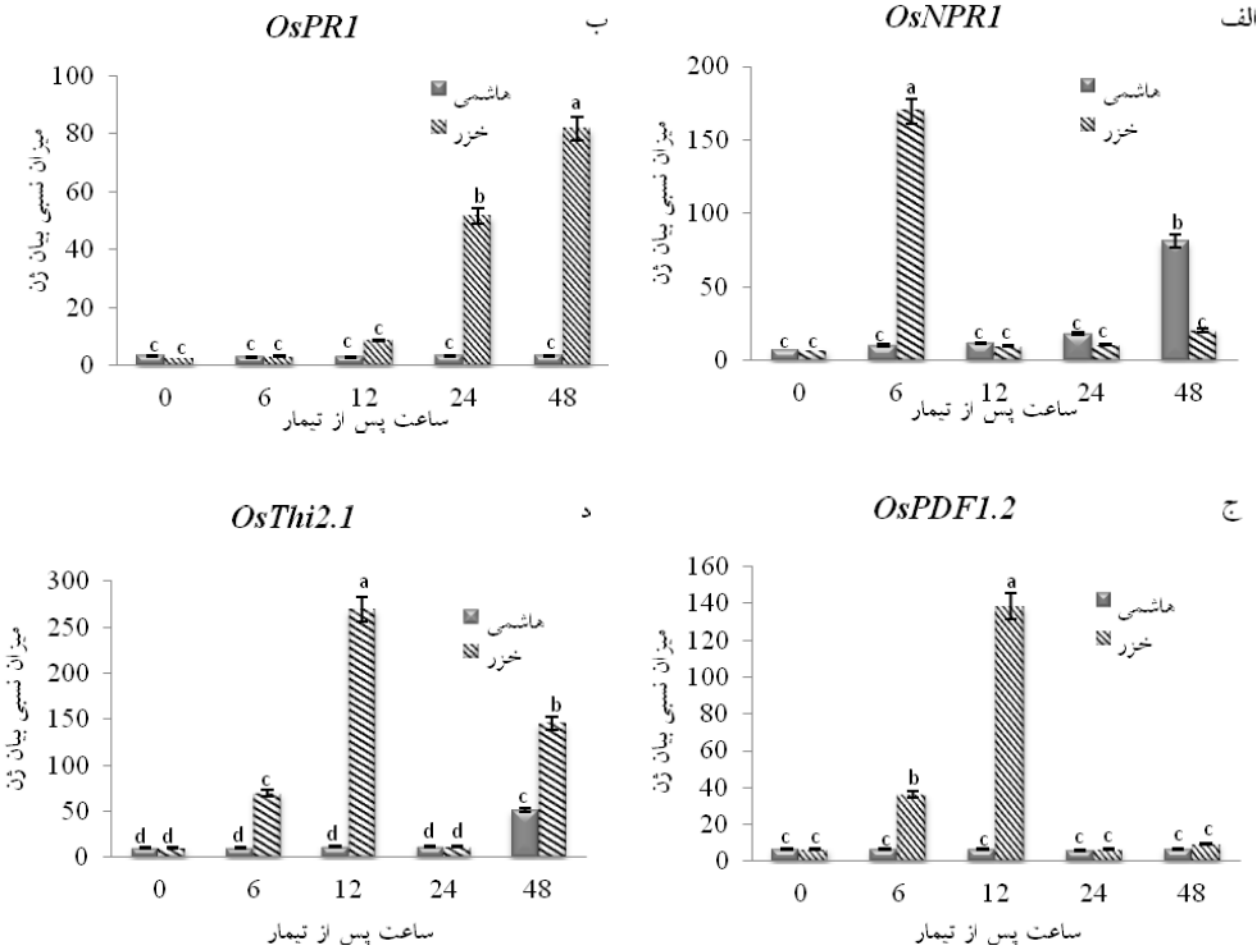
شکل۱- استخراج RNA (سمت راست) و تکثیر ژن 18S rRNA جهت ارزیابی صحت cDNA (سمت چپ)

www.SID.ir

از تیمار با اسید سالیسیلیک در هر دو رقم افزایش یافت که این افزایش در رقم مقاوم خزر زودتر و در سطح بالاتری نسبت به رقم حساس هاشمی رخ داد. این نتیجه احتمالا بیان می‌کند عکس العمل سریع و با شدت بیشتر در گیاه مقاوم سبب فعال-سازی به موقع و موثر ژن‌های دفاعی شده و در نتیجه سبب ممانعت از استقرار پاتوژن و شروع آلودگی در گیاه می‌شود (Vergne et al. 2007). PR1 از جمله پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی است که در دولپه‌ای‌هایی مثل سیب‌زمینی، گوجه - فرنگی و آرابیدوپسیس و تک‌لپه‌ای‌هایی مثل برنج شناسایی و بررسی شده است. این پروتئین‌ها جز ترکیبات ضد قارچی می-باشند که وزن ملکولی آن‌ها حدود ۱۵ kDa است (Edreva 2005). PR1 بلافاصله بعد از حمله پاتوژن، افزایش غلظت اسید سالیسیلیک و فعال شدن NPR1 و ورود آن به هسته بیان می‌شود و به عنوان نشانگری برای مقاومت اکتسابی سیستمیک شناخته شده است. هورمون‌های اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک، اتیلن و H_2O_2 روی میزان بیان این پروتئین‌ها اثر بسزایی دارند. در گزارشات قبلی تیمار گیاه برنج با اسید سالیسیلیک سبب افزایش بیان *OsPR1* شد، از طرف دیگر کاربرد اسید جاسمونیک و اسید آبسیزیک روی گیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک به طور موثری سبب کاهش بیان این ژن شد اما کاربرد اسید جاسمونیک و اسید آبسیزیک هر کدام به تنهایی سبب افزایش بیان ژن *PR1* شد، همچنین آلوده کردن گیاه برنج به عامل بیماری بلاست *Magnoporthe grisea* نیز سبب افزایش بیان این ژن شد (Agrawal et al. 2001). در این پژوهش، بررسی بیان ژن *OsPR1* نشان داد که بیان این ژن در رقم مقاوم خزر از زمان ۶ تا ۴۸ ساعت پس از تیمار با اسید سالیسیلیک به تدریج افزایش یافت به طوری‌که در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید که تایید کننده گزارشات قبلی است در حالی‌که بیان این ژن در رقم حساس هاشمی پس از تیمار تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۲- ب).

بررسی بیان ژن دیفنسین *OsPDF1.2* که به خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی شماره ۱۲ (*OsPR12*) منسوب است، نشان داد بیان این ژن در رقم مقاوم خزر ۶ ساعت پس از تیمار افزایش معنی‌داری یافت و پس از ۱۲ ساعت به حداکثر خود رسید و پس از آن کاهش یافت. میزان بیان این ژن در رقم محلی حساس هاشمی تفاوت معنی‌داری پس از تیمار با اسید سالیسیلیک نشان نداد (شکل۲- ج). دیفنسین‌ها از گونه‌های مختلف و همچنین بافت‌های مختلف گیاهی نظیر بذر، ساقه، ریشه و برگ جداسازی شده‌اند که این امر نشان‌دهنده طیف وسیع فعالیت آن‌هاست، این فعالیت‌ها شامل بستن کانال‌های یونی، فعالیت α-آمیلازی و فعالیت آنتی‌باکتریایی می‌باشد اما مشخص‌ترین فعالیت آن‌ها جلوگیری از رشد طیف وسیعی از قارچ‌ها است (Pellegrini and Franco 2005). دیفنسین با تحریک پاتوژن‌ها در گیاه تولید شده (Zimmerli et al. 2004) و میزان بیان آن با اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و اتیلن تنظیم می‌شود، بیان ژن دیفنسین در گیاه آرابیدوپسیس پس از افزایش غلظت داخلی اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و اتیلن که در نتیجه حمله پاتوژن‌ها اتفاق می‌افتد، افزایش می‌یابد (Glazebrook et al. 2003). در گیاه برنج نیز میزان بیان ژن دیفنسین *OsPDF1.2* پس از آلودگی با عامل بیماری بلاست *Magnoporthe grisea* در ارقام خزر (مقاوم به بلاست) و طارم (حساس به بلاست) افزایش داشت و افزایش بیان این ژن در رقم خزر بیشتر از رقم طارم بود (Sadati et al. 2012). تیونین-ها هم مثل دیفنسین‌ها کوچکند (5 kDa) و حاوی سیستئین می-باشند، این پروتئین‌ها برای اولین بار از غلات جداسازی شدند. در حدود ۱۰۰ توالی ژن تیونین در ۱۵ گونه گیاهی مختلف شناسایی شده است. این پروتئین‌ها در دسته پروتئین‌های مرتبط با بیماری-زایی قرار دارند و در خانواده PR13 طبقه‌بندی می‌شوند (Stec 2006). در این پژوهش الگوی بیان ژن تیونین در هر دو رقم خزر و هاشمی پس از تیمار با اسید سالیسیلیک افزایش پیدا کرد به طوری که در رقم مقاوم خزر، بیشترین میزان افزایش بیان ژن در زمان ۱۲ ساعت پس از تیمار و در رقم حساس هاشمی حداکثر میزان بیان این ژن ۴۸ ساعت پس از تیمار بود البته میزان افزایش بیان در خزر نسبت به هاشمی بیشتر بود (شکل۲- د). تحقیقات انجام شده در جو نشان داد که بیان ژن تیونین در برگ‌ها بعد از آلودگی با قارچ بلاست افزایش یافت (Bohlman et al. 1998). از خصوصیات اصلی تیونین‌ها فعالیت‌های ضدقارچی و ضدباکتریایی آن‌ها می‌باشد. گزارش‌ها حاکی از آن است که گیاهان تراریختی که حاوی ژن تیونین می‌باشند در مقابل حمله

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲- اثر اسید سالیسیلیک بر الگوی بیان ژن‌های *OsNPR1*، *OsPR1*، *OsPDF1.2* و *OsThi2.1* در ارقام خزر و هاشمی، حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P-value≤0.05) و خطوط عمودی روی نمودارها اشتباه معیار می‌باشند.

پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند. برای مثال افزایش بیان ژن *Thi2.1* آرابیدوپسیس در گوجه فرنگی تراریخت سبب افزایش مقاومت این گیاه نسبت به باکتری‌ها و قارچ‌های عامل پژمردگی شد (Chan et al. 2005)، همین‌طور افزایش بیان ژن تیونین جو در توتون تراریخت سبب مقاومت به *Pseudomonas syringae* و در برنج تراریخت سبب مقاومت به برخی از بیماری‌های باکتریایی شد (Iwai et al. 2002). در ضمن در بررسی دیگری روی گیاه برنج مشخص شد که بیان ژن تیونین *Thi2.1* در هر دو رقم خزر (مقاوم به بلاست) و طارم (حساس به بلاست) پس از آلودگی با قارچ بلاست افزایش یافت (Sadati et al. 2012). پروتئین‌های PDR زیرخانواده‌ای بزرگ از پمپ‌های ABC-transporter می‌باشند. این زیرخانواده شامل ۱۵ عضو در آرابیدوپسیس و ۲۳ عضو در برنج است که میزان بیان برخی از آن‌ها پس از آلودگی گیاه با پاتوژن و به دنبال آن افزایش غلظت اسید سالیسیلیک، تغییر می‌کند. ژن‌های *PDR* فقط در قارچ‌ها و گیاهان مشاهده شده‌اند و پروکاریوت‌ها و جانوران فاقد این نوع ناقل‌ها می‌باشند. اکثر ناقل‌های PDR که در گیاهان شناسایی شده‌اند در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی فعال می‌شوند که در انتقال ترکیبات ضدقارچی نظیر فایتوالکسین‌ها بر علیه پاتوژن‌ها نقش دارند (Amaral et al. 2007).

Archive of SID
www.SID.ir

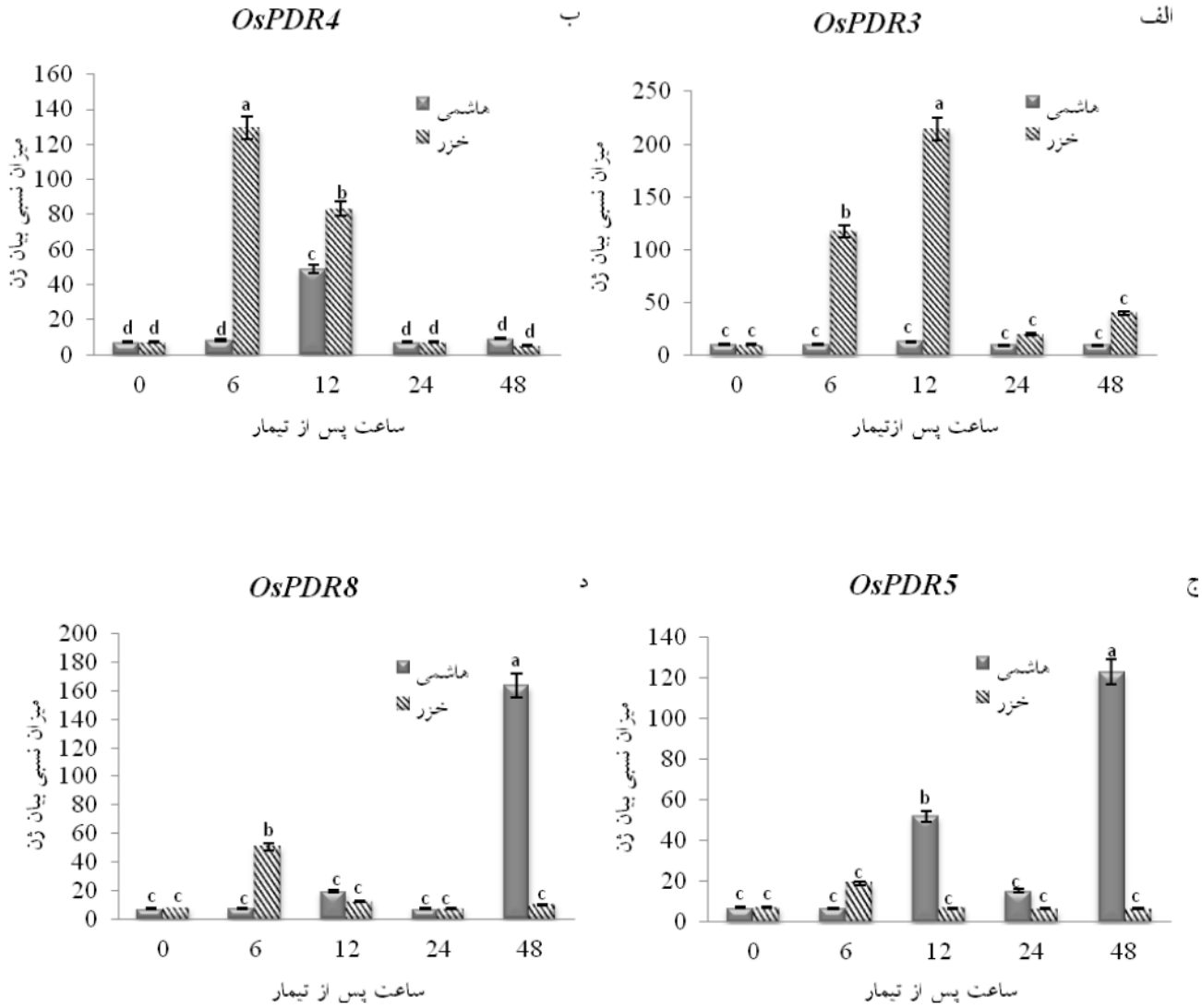
نتایج نشان داد که بیان ژن *OsPDR3* در رقم مقاوم خزر ۱۲ ساعت پس از تیمار با اسید سالیسیلیک به حداکثر مقدار خود می-رسد ولی رقم حساس هاشمی پس از تیمار با اسید سالیسیلیک تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل۳- الف). بیان ژن *OsPDR4* در رقم خزر ۶ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید در حالی‌که در رقم هاشمی بیشترین میزان بیان این ژن در زمان ۱۲ ساعت پس از تیمار بود (شکل۳- ب). الگوی بیان دو ژن *OsPDR5* و *OsPDR8* با الگوی بیان دو ژن قبلی در ارقام مورد مطالعه روند متفاوتی داشت. به نحوی که حداکثر میزان بیان ژن *OsPDR5* و *OsPDR8* در رقم خزر ۶ ساعت پس از تیمار رخ داد و پس از آن روند نزولی را دنبال کرد، در رقم هاشمی حداکثر بیان این دو ژن ۴۸ ساعت پس از تیمار اتفاق افتاد که این افزایش نسبت به رقم خزر از سطح بالاتری برخوردار بود (شکل۳- ج و د). این امر نشان می‌دهد احتمالا این دو ژن در فرایند مقاومت به این بیماری ارتباطی ندارند و افزایش بیان این دو ژن در اثر مصرف اسید سالیسیلیک در روند طبیعی فعال‌سازی ژن‌ها در اثر مصرف این هورمون می‌باشد. در حقیقت در اثر تیمار گیاهان با هورمون‌ها از قبیل اسید سالیسیلیک رونویسی از ژن‌های پاسخگو به این ترکیب آغاز می‌شود که الزاما همه این ژن‌ها در مسیر فرایند دفاع گیاهی برای یک بیماری خاص نیستند بلکه ممکن است این ژن‌ها در مقابله با تنش‌های دیگر حائز اهمیت باشند. در مطالعه‌ای مشابه، مصرف خارجی تنظیم کننده‌های رشدی از جمله اسید سالیسیک در ریشه یک رقم برنج هندی به نام پوکالی (صرف نظر از افزایش مقاومت برای بیماری) افزایش بیان چهار ژن *OsPDR3*، *OsPDR4*، *OsPDR5* و *OsPDR8* مشاهده شد (Moons 2008). تحقیقات زیادی بیان کرده‌اند که پروتئین‌های PDR در ساز و کارهای دفاعی گیاهان علیه پاتوژن‌ها، از طریق انتقال ترکیبات ضد قارچی و ضد باکتریایی به سطح سلول نقش مهمی دارند، به طور مثال پروتئین NpPDR1 از گیاه *Nicotiana plumbaginifolia* سبب انتقال دی‌ترپنوئیدهای ضدقارچی از سلول‌های اپیدرمی به سطح خارجی سلول می‌شود که در دفاع علیه پاتوژن‌ها اهمیت حیاتی دارد (Jasinski et al. 2001). در توتون، پروتئین NpPDR1 توسط جاسمونات‌ها و الیسیتورهای قارچی و باکتریایی افزایش می‌یابد (Sasabe et al. 2002)، در سویا، پروتئین GmPDR12 توسط اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک افزایش می‌یابد (Eichhom et al. 2006).

در تحقیق دیگری مصرف خارجی اسید سالیسیلیک در چهار لاین ایزوژنیک برنج که دارای ژن‌های مقاومت تا حساسیت به قارچ *Magnaporthe grisea* (عامل بیماری بلاست) برنج بودند نشان داد که مصرف اسید سالیسیلیک سبب کاهش علایم و افزایش مقاومت به عامل بیماری می‌شود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف این ماده سبب افزایش تولید فایتوالکسین‌های اورایزولاکسین[1]، مومیلاکتون[2] و ساکروانتین[3] در برنج می‌شود (Daw et al. 2008). از آنجا که تحقیقات متعدد به نقش ترابری پروتئین‌های PDR اشاره کرده‌اند بنابراین در تحقیق حاضر افزایش بیان این ژن‌ها پس از مصرف اسید سالیسیلیک می‌تواند احتمالا نمایانگر واکنش دفاعی و آمادگی گیاه برای ترابری ترکیبات ضدقارچی به موضع آلودگی باشد.

نکته دیگری که از تحقیق حاضر با توجه به نتایج مطالعات مختلف مبنی بر وجود کارایی و قابلیت‌های ذاتی موثر ژنوتیپ-های مقاوم در مواجهه با پاتوژن‌ها (Vergne et al. 2007; Daw et al. 2008) قابل استنباط است افزایش بیان نسبی بیشتر ژن‌های دفاعی در رقم خزر (مقاوم بیماری بلاست) نسبت به ژنوتیپ حساس هاشمی می‌باشد. این امر می‌تواند بیانگر توانایی ذاتی اولیه این ژنوتیپ در مواجهه با پاتوژن و ممانعت از استقرار و گسترش این قارچ باشد. اسید سالیسیلیک به عنوان یک ملکول سیگنال، نقش کلیدی در شکل‌گیری پاسخ‌های دفاعی گیاه در مقابل پاتوژن‌ها دارد، مقدار اسید سالیسیلیک پس از آلودگی گیاه توسط پاتوژن‌ها افزایش یافته و سبب افزایش بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و سایر ژن‌های دخیل در مقاومت و شکل‌گیری مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌شود. مقاومت به پاتوژن‌ها و تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، می‌تواند توسط اسید سالیسیلیک و استیل اسید سالیسیلیک حتی در غیاب موجودات

[1] Oryzalexins
[2] Momilactones
[3] Sakuranetin

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳- اثر اسید سالیسیلیک بر الگوی بیان ژن‌های *OsPDR3*، *OsPDR4*، *OsPDR5* و *OsPDR8* در ارقام خزر و هاشمی، حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P-value≤0.05) و خطوط عمودی روی نمودارها اشتباه معیار می‌باشند.

بیماری‌زا القا شود (Hayat et al. 2010). در این پژوهش نیز اسید سالیسیلیک سبب افزایش بیان تمام ژن‌های دفاعی بررسی شده در رقم خزر شد که تفاوت معنی‌داری با بیان این ژن‌ها در رقم هاشمی داشت که احتمال می‌رود با مقاومت این رقم به بلاست در ارتباط باشد. این نتایج و مطالعات دیگر نقش ترمیمی و تقویتی اسید سالیسیلیک از طریق القای بیان ژن‌های دخیل در ساز و کارهای دفاعی را تایید می‌کند و بر این اساس پیشنهاد می‌شود در تحقیقات بعدی ضمن بررسی اقتصادی قضیه، کاربرد اسید سالیسیک در مزارع برنج در مواقعی که شرایط آب و هوایی امکان بروز اپیدمی بیماری‌ها را پیش‌بینی می‌کند مورد ارزیابی واقع شود. همچنین دستکاری در مسیرهای بیوسنتز این هورمون در زمان حمله پاتوژن‌ها که سبب افزایش سطح درونی این هورمون شود، می‌تواند راهکار مناسبی برای افزایش مقاومت برنج در برابر پاتوژن‌های رایج باشد.

www.SID.ir

منابع

Agrawal G, Rakwal R, Jwa N, Agrawal V (2001) Signaling molecules and blast pathogen attack activates rice *OsPR1a* and *OsPR1b* genes: A model illustrating components participating during defence/stress response. Plant Physiology and Biochemistry 39: 1095-1103.

Amaral AM, Saito D, Formighieri EF, Rabello E, de Souza AN, Silva-Stenico ME, Tsai M (2007) Identification of citrus expressed sequence tags (ESTs) encoding pleiotropic drug resistance (PDR)-like proteins. Genetics and Molecular Biology 30: 857-865.

Bohlmann H, Clausen S, Behnke S, Giese H, Hiller C, Reimann PU, Schrader G, Barkholt V, Apel K (1998) Leaf-specific thionins of barley a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defense mechanism of plants. EMBO Journal 7: 1559-1566.

Chan YL, Prasad V, Sanjaya K, Chen KH, Liu PC, Chan MT, Cheng CP (2005) Transgenic tomato plants expressing an Arabidopsis thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. Planta 221: 386-393.

Daw DB, Zang LH, Wang ZZ (2008) Salicylic acid enhances antifungal resistance to *Magnaporthe grisea* in rice plants. Australian Plant Pathology 37: 637-644.

Dong X (2004) NPR1, all things considered. Current Opinion in Plant Biology 7:547-552.

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

Eichhorn H, Klinghammer M, Becht P, Tenhaken R (2006) Isolation of a novel ABC transporter genefrom soybean induced by salicylic acid. Journal of Experimental Botany 57: 2193-2201.

Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang H, Nawrath C, Metraux J, Zhu T, Katagiri F (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. Plant Journal 34: 217-228.

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

Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. Environmental and Experimental Botany 68: 14-25.

Hunt M (2006) Real Time PCR Tutorial. University of South Carolina. (Access on line: http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm).

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

Jasinski M, Stukens Y, Degand H, Purnelle B, Marchand J, Boutry M (2001) A plant plasma membrane ATP binding cassette transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. Plant Cell 13: 1095-1107.

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

Jain M, Nijhawan A, Tiagi AK, Purana PJ (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications 345: 646-651.

Kogel K, Langen G (2005) Induced disease resistance and gene expression in cereals. Cellular Microbiology 7:1555-1564.

Mitsuhara I, Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Hirosea S, Ohkawa Y, Ohashi Y (2008) Characteristic expression of 12 rice PR1 family gene in response to pathogen infection, wounding and defense related signal compounds (121/180). Molecular Gene Genomics 279: 415-427.

Momeni A, Padasht Dehkaie F, Mousa nejad S, Javan nikkhah M (2006) Determination of reducing resistance component in selected cultivar of rice. Agricultural knowledge 16: 135-144. (In Farsi).

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.

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

Pellegrini PB, Franco OL (2005) Plant g-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. Biochemistry and Cell Biology 37: 2239-2253.

Pieterse C, Van loon LC (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology 7:456-464.

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

Sadati Z, Ghanbari MA, Babaiezad V, Rahimian H (2012) The antimicrobial peptides thionin and defensin are involved in rice resistance against *Magnaporthe grisea* fungus. 12th Genetic congress. Iran, Tehran, Shahid Beheshti University (In Farsi).

Sasabae M, Toyoda K, shiraishi T, Inagaki Y, Ichinose Y (2002) cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor responsing gene. Federation of European Biochemical Societies 518: 164-168.

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

Archive of SID
www.SID.ir

Stec B (2006) Plant thionins-the structural perspective. Cellular and Molecular Life Sciences 63: 1370-1385.
Sugano Sh, Chang J, Miyazawa S, Masumoto C, Yazawa K, Hayashi N, Shimono M, Nakayama A, Miyao M, Takatsuji H (2010) Role of OsNPR1 in rice defense program as revealed by genome wide expression analysis. Plant Molecular Biology 74:549-562.
Vergne E, Ballini S, Marques B, Sidi Mammar G, Droc S, Gaillard S, Bourot R, DeRose D, Tharreau JL, Nottéghem MH, Lebrun J, Morel B (2007) Early and specific gene expression triggered by rice resistance gene Pi33 in response to infection by ACE1 avirulent blast fungus. New Phytologist 174: 159-171.
Zimmerli L, Stein M, Lipka V, Schulze-Lefert L, Somerville S (2004) Host and nonhost pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. Plant Journal 40: 633-646.

Archive of SID

www.SID.ir