



بررسی مقاومت دو رقم برنج در تعامل با قارچ عامل سوختگی غلاف، *Rhizoctonia solani* AG1-1A

محمد سیاری^۱، ولی اله بابایی زاد^{۲*}، محمد علی تاجیک قنبری^۲، حشمت اله رحیمیان^۳

^۱دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۲دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۳استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۰۷

چکیده

برنج از مهم‌ترین گیاهان زراعی دنیا می‌باشد که سطح وسیعی از اراضی زراعی قابل کشت را به خود اختصاص داده است. *Rhizoctonia solani* یکی از قارچ‌های بیماریزا است که خسارت عمده‌ای به محصولات مختلف زراعی وارد می‌سازد. زیرگروه آناستوموزی AG1-1A این قارچ، برنج را مورد حمله قرار داده و باعث ایجاد بیماری سوختگی غلاف برنج می‌شود. این بیماری به عنوان یکی از مهمترین بیماری‌های قارچی در مناطق برنجکاری دنیا شناخته شده است. به دلیل آلودگی‌های زیست محیطی توسط مصرف بی‌رویه آفت‌کش‌ها جهت کنترل این بیماری از یک سو و مقاومت پاتوژن به این مواد شیمیایی از سوی دیگر، مطالعه مستمر برای ارایه روش و یا روش‌های جدید و متفاوت جهت مقابله با این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. ژن‌های مقاومت در گیاهان که منابع ژنتیکی با ارزشی هستند را می‌توان در این راستا استفاده کرد. بررسی‌های مولکولی جهت ردیابی میزان بیان ژن‌های فوق‌بیابار با ارزش است. این تحقیق با هدف آنالیز مولکولی دو رقم برنج بینام و خزر در مقابل با قارچ *Rhizoctonia solani* عامل سوختگی غلاف انجام شد. طول لکه‌های حاصل از تلقیح پاتوژن در رقم خزر به طور تقریبی دو برابر رقم بینام بود. در نتیجه رقم بینام به عنوان ژنوتیپ مقاوم و رقم خزر به عنوان ژنوتیپ حساس در مقابل بیماری سوختگی غلاف انتخاب شد. جهت تعیین نیم‌رخ ژنهای دخیل در مقاومت از برگ‌های گیاهچه‌های دو هفته‌ای در ساعات مختلف پس از تلقیح نمونه برداری شد. پروفایل ژن‌های مورد آزمایش توسط تکنیک Real time Q-PCR بررسی شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد بیان ژن‌های *PR-5*، *Proxidase*، *PR-10*، *Defensin*، *Thionin* و *NH-1* در رقم مقاوم بینام نسبت به رقم حساس خزر پس از مایه زنی به شدت افزایش یافت. در نتیجه به نظر می‌رسد ژن‌های فوق در مکانیسم‌های مقاومت گیاه برنج در تعامل با *R. solani* نقش داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های مرتبط با بیماری زایی، بیان ژن، برنج، *NHI*، cDNA، Real-time Q-PCR.

مقدمه

پلاسمایی، تولید سریع گونه‌های اکسیژن فعال (AOS) مثل H_2O_2 ، O_2 و در نهایت فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین‌های خاص می‌باشد (Grover and Gowthaman, 2003). این واکنش‌های اولیه پیش نیاز آغاز شبکه‌های سیگنالی بوده که سبب راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی کلی می‌شود. بنظر می‌رسد پاسخ‌های دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید (JA) و اتیلن توسط نکروتروف‌ها و پاسخ‌های وابسته به سالیسیلیک اسید (SA) توسط بیوتروف‌ها فعال شود. به هر حال هم‌پوشانی بین مسیر های سیگنالی مختلف و گاهی اثرات هم‌افزایی بین این مسیرهای مختلف وابسته به SA، اتیلن و JA گزارش شده است (Thomma et al., 1998). هر سه مسیر دفاعی در ارتباط با افزایش نسخه‌های ژنهای دفاعی زیادی هستند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی^۴ معمولاً به‌عنوان پروتئین‌های خاص میزبانی بوده که در اکثر گونه‌های گیاهی در مقابل حملات پاتوژن‌ها و شرایط مشابه برانگیخته می‌شوند (Van Loon et al., 2006). از زمان کشف اولین PRها در 1970 در گیاهان توتون آلوده به ویروس موزاتیک توتون (TMV)، تاکنون ۱۸ خانواده از آنها بر اساس توالی آمینواسیدی، روابط سرولوژیکی و فعالیت‌های بیولوژیکی و آنزیمی‌شان شناخته شده اند (Van Loon et al., 1997 and 2006). پروتئین‌های متعلق به خانواده PR-5 به دلیل داشتن توالی مشابه پروتئین گیاهی تائوماتین به پروتئین‌های شبه تائوماتین معروف هستند

برنج از مهم‌ترین گیاهان زراعی دنیا می‌باشد که سطح وسیعی از اراضی زراعی قابل کشت را به خود اختصاص داده است (Lin et al, 1995). گیاه برنج در طول دوره رشد به بیماری‌های مختلفی مبتلا می‌شود که اهمیت آنها در هر منطقه بستگی به نوع بیماری، ارقام برنج، محیط رشد، اعمال روش‌های زراعی و دامنه میزبانی عامل بیماری دارد. سوختگی غلاف برگ برنج با عامل *Rhizoctonia solani* Kühn از جمله بیماری‌های قارچی است که از نظر بیماری‌زایی و زیان اقتصادی در شمال کشور اهمیت دارد (Balali et al., 2008). این بیماری به عنوان یک عامل بازدارنده در توسعه ارقام پرمحصول محسوب شده و خسارت بیماری در استان‌های شمالی قابل توجه می‌باشد.

آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مصرف بی رویه سموم شیمیایی جهت کنترل بیماری‌ها از یک سو و ظهور نژاد های مقاوم به قارچ کش‌ها از سوی دیگر، سبب ارایه روش‌های جدید و متفاوت جهت مقابله با بیمارگر ها شده است. مهمترین این روش‌ها، مبتنی بر مقاومت گیاهان می باشد. دفاع در گیاهان بر اساس سدهای دفاعی اولیه مختلف و پاسخ‌های القایی استوار است (Grover and Gowthaman, 2003). سدهای اولیه برای مثال شامل لایه کوتیکولی گیاه، دیواره سلولی میزبان و ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند. اولین پاسخ‌های دفاعی گیاهان شامل باز شدن کانالهای یونی ویژه‌ای در غشاء

گیاه جینسینگ، PR10 ها تحت عنوان Ribonuclease-like-function نامگذاری شده‌اند (Midoh *et al.*, 1996). در مطالعات (Kim *et al.*, 2001) میزان رونوشت های PR-10 در گیاهان برنج تیمار شده با *Magnaporthe grisea* به شدت افزایش یافت. گروهی دیگر از فعالان ضد میکروبی Defensin ها هستند که پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین حدود پنج کیلو دالتون و با تکرارهای زیاد سیستمین می‌باشند. Defensin ها ممکن است توسط تغییر نفوذپذیری دیواره سلولی قارچها و یا ممانعت از بیوستتز ماکرومولکولها فعالیت ضد قارچی داشته باشند. افزایش بیان Defensin در گیاهان تراریخت در تعامل با پاتوژن‌های بسیاری شامل *Alternaria* (Bohlmann *et al.*, 1994)، *Fusarium* (Epple *et al.*, 1997)، به اثبات رسیده و ضمناً سبب افزایش مقاومت سیب‌زمینی به *Verticillium* تحت شرایط مزرعه می‌شوند (Lay *et al.*, 2005). تیونین ها (Thionins) در حال حاضر در گونه‌های تک‌لپه و دو لپه بدلیل فعالیت ضد میکروبی‌شان در گیاهان مورد توجه قرار گرفته‌اند (Florack and stiekema 1994). این پروتئین‌ها در دیواره‌های سلولی، واکوئل‌ها و اجسام پروتئینی حضور دارند و حدود پنج کیلو دالتون وزن دارند. تیونین‌هایی از جو و آرابیدوپیس از دسته ژنی بسیار کوچکی به خوبی شناسایی شده و در دفاع نقش دارند. ضمناً این ژنها در مسیر JA فعالیت دارند. اخیراً ژن Thionin از یولاف به گیاه برنج منتقل و منجر به

(Velazhahan *et al.*, 1999). این پروتئین‌ها گروهی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در تنش های شوری نیز بیان می‌شوند (Velazhahan *et al.*, 1998) چندین گروه از PR-5 فعالیت موثری علیه قارچها از طریق ممانعت از رشد هیف، جوانه‌زدن اسپور و یا جلوگیری از توسعه لوله تندش در صورت جوانه زدن اسپور دارند (Velazhahan *et al.*, 1998). ژن PR-5 تاکنون از آرابیدوپیس، ذرت، سویا، برنج، گندم، جو، توتون، گوجه فرنگی و بسیاری گیاهان دیگر جدا شده است (Datta *et al.*, Christensen *et al.*, 2002). ژن *Peroxidase (POX)* در ایزوفورم‌های مختلفی وجود داشته و در محدوده وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر متابولیسم اکسین، بیوستتز اتیلن، تشکیل لیگنین، تنفس، پروسه‌های واسطه نوری، رشد و پیری نقش دارد (Barratt *et al.*, 1991). گروه پروتئین های PR-9 از دسته پراکسیدازهای تشکیل دهنده لیگنین هستند. این پروتئین ها با کاتالیز فرایند تولید لیگنین سبب تقویت دیواره سلولی گیاه و در نتیجه مقاومت علیه بسیاری پاتوژن ها می‌شوند (Passardi *et al.*, 2004). در برنج حداقل ۴۲ ژن *POX* شناخته شده است. ژن *POX* عمل اکسیداسیون NADH را کاتالیز می‌کند. افزایش فعالیت این ژن در برابر پاتوژن ها در گیاهان مختلف به دفعات گزارش شده است (Farkas *et al.*, 1966; Novacky *et al.*, 1968; Gholamnezhad *et al.*, 2015; Goudarzi *et al.*, 2015). بدلیل هومولوژی توالی خانواده PR-10 با ریونوکلئاز

بیماری سوختگی غلاف در ارقام برنج بینام و خزر انجام شد.

مواد و روش ها

ارقام برنج مورد مطالعه در این تحقیق رقم‌های بینام و خزر بوده که بذور خالص ارقام مذکور از معاونت موسسه تحقیقات برنج کشور واقع در آمل تهیه گردید. بر اساس بررسی های مزرعه ای، رقم بینام به عنوان ژنوتیپ مقاوم و رقم خزر به عنوان رقم حساس انتخاب شد (Bahrami et al., unpublished data).

بذرها به مدت ۴ ساعت در محلول ۵ در هزار کاربوکسین- تیرام ضد عفونی گردیدند. بذور پس از شستشو با آب مقطر استریل در پتری‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. پتری‌ها به مدت ۴-۳ روز تا زمان جوانه‌زنی بذور در انکوباتور و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. بذور جوانه‌زده سپس به گلدانهای پلاستیکی حاوی خاک استریل (نسبت رس: هوموس ۲:۱) منتقل و گلدانها به اتاقک رشد (با تناوب نوری ۱۶ ساعت نور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۵٪ و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۵٪) انتقال یافتند.

نمونه‌هایی شامل غلاف برگ و ساقه از ارقام مختلف برنج که علائم مشکوک سوختگی غلاف و برگ را نشان دادند، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. قسمت‌های آلوده به مدت ۵ دقیقه با جریان ملایم آب شسته شدند و به

مقاومت نسبت به دو باکتری مهم برنج شد (Carmona et al., 1993; Florack et al., 1993). محققان در این تحقیق از ژن *Thionin* یولاف برای یافتن نقش این ژن در برنج استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که بیان ژنهای *Thionin* اندوژن به تنهایی برای ممانعت از آلودگی‌های باکتریایی در گیاهچه‌های برنج کافی نیست.

ژن *NHI* نسخه بیان نشده ژنهای مرتبط با بیماری‌زایی (*Nonexpresser of I Pathogenesis- Related gene*) بوده که ضمناً تحت نام های *NIMI* (*Non-inducible immunity* و *SAIL* (*SA-insensitive*) هم شناخته شده است (Shah et al., 1999). این گروه جهت انتقال سیگنال SA برای فعال‌سازی ژنهای PR و در نتیجه تحریک SAR حیاتی می‌باشند و سبب مقاومت پایای گیاهان علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌ها می‌گردند. ژن *NPRI* اولین بار در آرآبیدوپسیس شناسایی شد (Glazebrook et al., 2005). افزایش بیان *NPRI* در آرآبیدوپسیس و بیانش در برنج، گوجه فرنگی، گندم و سیب سبب افزایش مقاومت گیاهان مذکور به پاتوژن‌ها با افزایش میزان بیان PR ژنها شده است (Lin et al., 1995; Chern et al., 2005). ضمناً ثابت شده که القای مقاومت توسط بیان *NPRI* می‌تواند بدلیل بیان بیشتر و سریع‌تر PR ژنها باشد (Shah et al., 1999). این تحقیق با هدف بررسی میزان تظاهر ژن های *PR-5*، *PR-9*، *PR-10*، *Defensin*، *Thionin* و *NHI* در مقاومت به

مجدداً به اتاقت رشد برگردانده شدند. کیسه‌ها پس از ۳ روز برداشته شدند. نمونه‌برداری از برگ گیاهان آلوده در زمان‌های ۰ (شاهد)، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۰۰ ساعت پس از آلودگی انجام شد و نمونه‌ها پس از پودر شدن با ازت مایع تا زمان استخراج RNA در فریزر با دمای -80°C نگهداری شدند.

برای بررسی توسعه بیماری از گیاهان ۶ هفته‌ای استفاده شد. طول لکه‌های ایجاد شده در گیاهچه‌های دارای علائم از هر لاین اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله توسط نرم‌افزار Excel و آزمون مقایسه‌ای T-student در سطح احتمال ۰.۵٪ آنالیز شد.

Total RNA از برگ‌های نمونه‌برداری شده در زمان‌های مختلف با استفاده از ماده RNX plus (شرکت سیناژن) طبق روش Triant and Whitehead (۲۰۰۹) به دست آمد. به منظور زدودن DNA ژنومی از نمونه‌های RNA از کیت DNase I, RNase-free ساخت شرکت Fermentas طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید.

کیفیت RNA استخراجی بر روی تعدادی از نمونه‌ها با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE (40mM Tris acetate, 1 mM EDTA و یا اسپکتروفتومتر ارزیابی شدند. میزان جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید.

ساخت اولین رشته cDNA هر نمونه RNA استخراجی با استفاده از پرایمر 18 oligo(dT) و

قطعاتی به اندازه ۱ - ۰/۵ سانتی‌متر بریده شدند. این قطعات به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلیت سدیم یک درصد ضد عفونی سطحی شده و سپس سه بار (هر بار ۱۰ دقیقه) در آب مقطر استریل شستشو و در محیط کشت Water Agar (آب + آگار) دو درصد و Dextrose Agar (PDA) در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از چند روز قطعات مورد بررسی قرار گرفت و در صورت مشاهده اندام‌های قارچی، خالص‌سازی انجام شد. نمونه‌های جدا شده در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ روز نگهداری و از قارچ‌های رشد یافته، روی محیط کشت آب آگار کشت نوک ریشه به روش جانی پور و همکاران (۱۳۸۸) تهیه شد. پس از شناسایی مورفولوژیکی از یک نمونه به‌عنوان نماینده استخراج DNA صورت پذیرفت و بخشی از ناحیه ITS آن با استفاده از جفت آغازگرهای ITS4 و ITS5 تکثیر شد. پس از تعیین توالی و مقایسه نمونه با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) به‌عنوان نمونه استاندارد و نشان دادن شباهت ۹۹ درصدی با *R. solani* AG 1-1 A در باقی مراحل آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

مایه‌زنی بر روی گیاهچه‌های ۲ هفته‌ای برنج و با استفاده از قرار دادن قرص‌های ۰/۵cm از حاشیه کشت‌های ۵ روزه قارچ در محل غلاف و سپس ثابت کردن آنها در محل با چسب نواری انجام شد. گیاهان مایه‌زنی شده سپس توسط نایلون‌های مرطوب پوشانده شده و گلدان‌ها

۱ آمده است. در تمام آزمایشات از ژن ابی کوایتین به عنوان ژن خانه دار استفاده شد. تمام واکنش‌های PCR در ۲ تکرار انجام گرفت. نرخ بیان ژن با استفاده از روش Δ -delta (Livak *et al*, 2003) اندازه‌گیری شد. در ابتدا میانگین دو تکرار سیکل آستانه برای هر ژن محاسبه شد. سپس میانگین CT ابی‌کوای‌تین (Ubiquitin) از میانگین CT ژن هدف کم شده و شاخص Δ CT بدست آمد. نرخ بیان هر ژن با استفاده از فرمول $2^{\Delta CT}$ محاسبه شد. انحراف معیار داده‌ها با استفاده از اعداد بدست آمده برای هر ۲ تکرار محاسبه و نتایج توسط آزمون مقایسه‌ای T-student آنالیز شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از برنامه های آماری موجود در نرم افزار Microsoft Excel از مجموعه نرم افزارهای Microsoft office انجام گرفت.

نتایج

پس از چهار هفته از آلوده سازی گیاهچه‌ها به قارچ *R. solani* میزان پیشرفت بیماری با اندازه گیری طول لکه‌ها در هر دو رقم مورد بررسی، محاسبه شد. نتایج بیانگر توسعه دو برابری بیماری در رقم حساس خزر در مقایسه با ژنوتیپ مقاوم بینام بود (شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن های دفاعی مختلف نشان داد میزان بیان تمامی ژن های مورد بررسی در رقم مقاوم بینام به طور معنی داری در مقایسه با ژنوتیپ حساس خزر بالاتر بود.

آنزیم SuperScript Reverse Transcriptase توسط کیت Revert Aid first strand cDNA (شرکت Fermentase) انجام گرفت. نمونه‌ها تا زمان استفاده در 20°C - نگهداری شدند. تکثیر قطعات cDNA با استفاده از واکنش زنجیره پلی‌مراز و جفت آغازگر ابی کوایتین انجام شد. ارزیابی محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBA (89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) صورت گرفت. ژل در اتیدیوم بروماید (0.5 $\mu\text{g/ml}$) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی و بعد از شستشو با آب مقطر با UV دستگاه ژل خوان کداک (GELLOGIC 200) از آن عکسبرداری شد. آزمون QRT-PCR (Quantitative Real Time PCR) با استفاده از دستگاه (BioRad) Mx3000P thermal cycler و کیت Syber green انجام شد. به حجم ۱ میکرولیتر از cDNA رقیق شده (شامل ۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) از هر نمونه به عنوان الگو در واکنش‌ها استفاده شد و به ترکیب یک میکرولیتر از هر پرایمر، ۱۰ میکرولیتر سایبرگرین، و آب تا حجم ۲۰ میکرولیتر افزوده شد. پارامترهای دمایی جهت تکثیر به صورت زیر بود: مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای 94°C ، به همراه ۴۰ سیکل شامل واسرشت‌سازی به مدت ۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (Annealing/ Extension). لیست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول

جدول ۱- جفت آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق به همراه توالی نوکلئوتیدی آن ها.

Table 1- Primer pairs used in this study and their nucleotide sequences.

اندازه محصول Product size	آغازگر برگشت (5'→3') Reverse primer (5'→3')	آغازگر رفت (5'→3') Forward Primer (5'→3')	ژن gene
234	TGGACTCCTTCTGGATGTTGTA	GGCAAGACCATCACCTTGAGG	UBI
241	GAAGACGACTTGGTAGTTGC	ACCTCTTCCGCTGTCCTC	PR-5
320	TCACTCTAGGTGGGATATACT	CATGCTACTGCTCACCTTGA	PR-10
230	GGCGTCGAGCAGAATTGG	CCGGCGAACTGCGTGTAC	Defensin
300	GGTGTCTGCGAGGTGATGA	AGGGTGGTGCTTACGCTTGT	Thionin
220	TCACTCTAGGTGGGATATACT	CATGCTACTGCTCACCTTGA	PO-I
325	AAGGATCCTCAAGGTACCTCCAAACCAAG	GAACCCGGGATGGACACCACCATTG	NHI

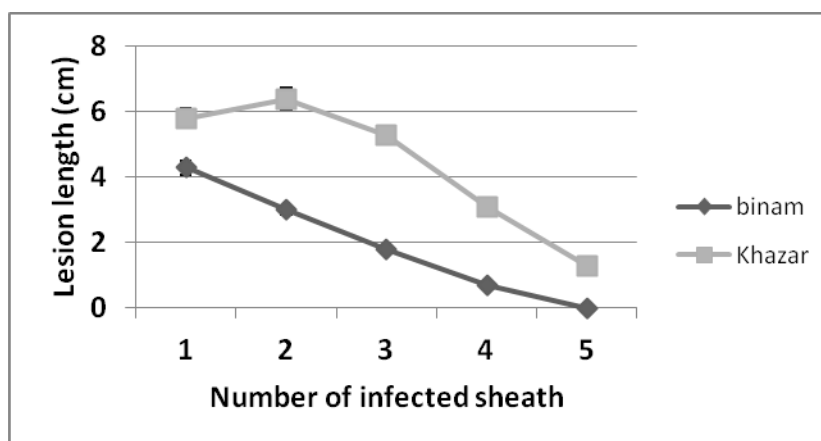
داری افزایش بیان داشتند. سطح پایه‌ای بیان این ژن‌ها در گیاهان شاهد هر ۲ رقم مورد بررسی در این آزمایش بسیار پایین بود.

بیان ژن های *PR-5* و *Pox* در هر دو رقم الگوی مشابهی داشته و در ساعت ۲۴ پس از تلقیح افزایش معنی داری داشت، حال آنکه میزان بیان آن در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی به اوج خود رسید (شکل ۲-a و ۲-b). بیان این ژن سپس در هر دو رقم مورد بررسی تا زمان ۱۰۰ ساعت پس از آلودگی سیر نزولی طی کرد. میزان رونوشت‌های ژن *PR-5* در زمان بیشینه بیان در رقم بینام ۱۳ برابر و در رقم خزر ۴ برابر زمان صفر بود. ضمناً میزان بیان این ژن در رقم بینام به ترتیب ۳/۴ برابر در مقایسه با میزان بیان در ساعت ۴۸ بعد از آلودگی در رقم خزر بالاتر بود. مقدار بیان ژن *POX* در ساعت اوج (۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی) در رقم بینام و خزر به ترتیب ۱۰ و ۳ برابر زمان صفر (شاهد) بود.

پس از جدا و خالص سازی در بررسی های اولیه میکروسکوپی تمامی نمونه ها مشخصات عمومی رایزوکتونیا را داشتند. تمامی جدایه ها قادر به آناستوموز با *R. Solani* AGI-1A عامل سوختگی غلاف برنج بودند. تعیین توالی نوکلئوتیدی حاصل از تکثیر ناحیه ITS و مقایسه آن با توالی های مشابه موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) نتایج آزمون های مورفولوژیکی را ثابت کرد.

رقم بینام به مراتب درجه بالاتری از مقاومت نسبت به رقم حساس خزر نشان داد. همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود مجموع طول لکه‌ها برای رقم خزر ۲ برابر رقم بینام بود. آنالیز داده‌ها با آزمون مقایسه‌ای T-test تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۰.۵٪ بین ارقام مقاوم و رقم حساس نشان داد.

تمام ژن‌های مورد مطالعه در این آزمون در زمان اوج بیان در سطح احتمال ۱ درصد در رقم بینام در مقایسه با ژنوتیپ خزر به طور معنی



شکل 1-A- تفاوت دو رقم در شدت بیماری ناشی از *R. solani* در هر برگ، توسط روش اندازه گیری طول لکه.

Figure 1 –A - Differences among two cultivars in severity of *R. solani* in each leaf performed by determination of lesion length.

شاهد بود. ضمناً میزان بیان این ژن در ۴۸ ساعت پس از آلودگی در رقم بینام ۸ برابر بالاتر در مقایسه با رقم خزر بود. آزمون مقایسه‌ای T student نیز تفاوت معنی‌داری (P value < 0.001) در زمان ۱۲ ساعت پس از تلقیح بین نرخ بیان این ژن در رقم مقاوم در برابر رقم حساس نشان داد.

رونوشت‌های ژن‌های *PR12* و *PR13* در زمان ۱۲ ساعت پس از آلودگی به شدت افزایش داشت و سپس تا زمان ۱۰۰ ساعت پس از تلقیح کاهش یافت (شکل ۲-d و ۲-e). تنها مورد استثنا در مورد بیان ژن *Defensin* در رقم خزر بوده که بر خلاف رقم مقاوم بینام با اندکی تاخیر در ۲۴ ساعت پس از تلقیح مشاهده شد. بیشترین میزان بیان ژن *Defensin* در رقم بینام در ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی (زمان اوج) ۱۴ برابر زمان

ضمناً نرخ بیان این ژن در رقم بینام ۳ برابر رقم خزر در زمان اوج بیان بود. آزمون مقایسه‌ای T student نیز در ساعات ۲۴ و ۴۸ که ساعات اوج بیان این دو ژن در دو رقم مورد مطالعه می‌باشند تفاوت معنی‌داری ($P < 0.001$) بین نرخ بیان این ژن‌ها در رقم مقاوم در برابر رقم حساس نشان داد (شکل ۲-a و ۲-b). میزان رونوشت‌های ژن *PR10* در رقم بینام در زمان ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی به شدت افزایش یافت. حال آنکه در رقم خزر بیشینه بیان در زمان ۴۸ ساعت پس از تلقیح مشاهده شد (شکل ۲-c). بیان این ژن در ساعات ۲۴ و ۴۸ پس از تلقیح رو به کاهش گذاشته تا اینکه در ۱۰۰ ساعت پس از آلودگی افزایش چشمگیر در بیان این ژن دیده شد. نرخ بیان ژن در ارقام بینام و خزر در زمان بیشینه بیان به ترتیب ۱۳ و ۲ برابر

بیان ژن *NHI* در بازه زمانی ۱۰۰ ساعت بعد از آلودگی در بین دو رقم مورد مطالعه مشاهده نشد (شکل f-۲).

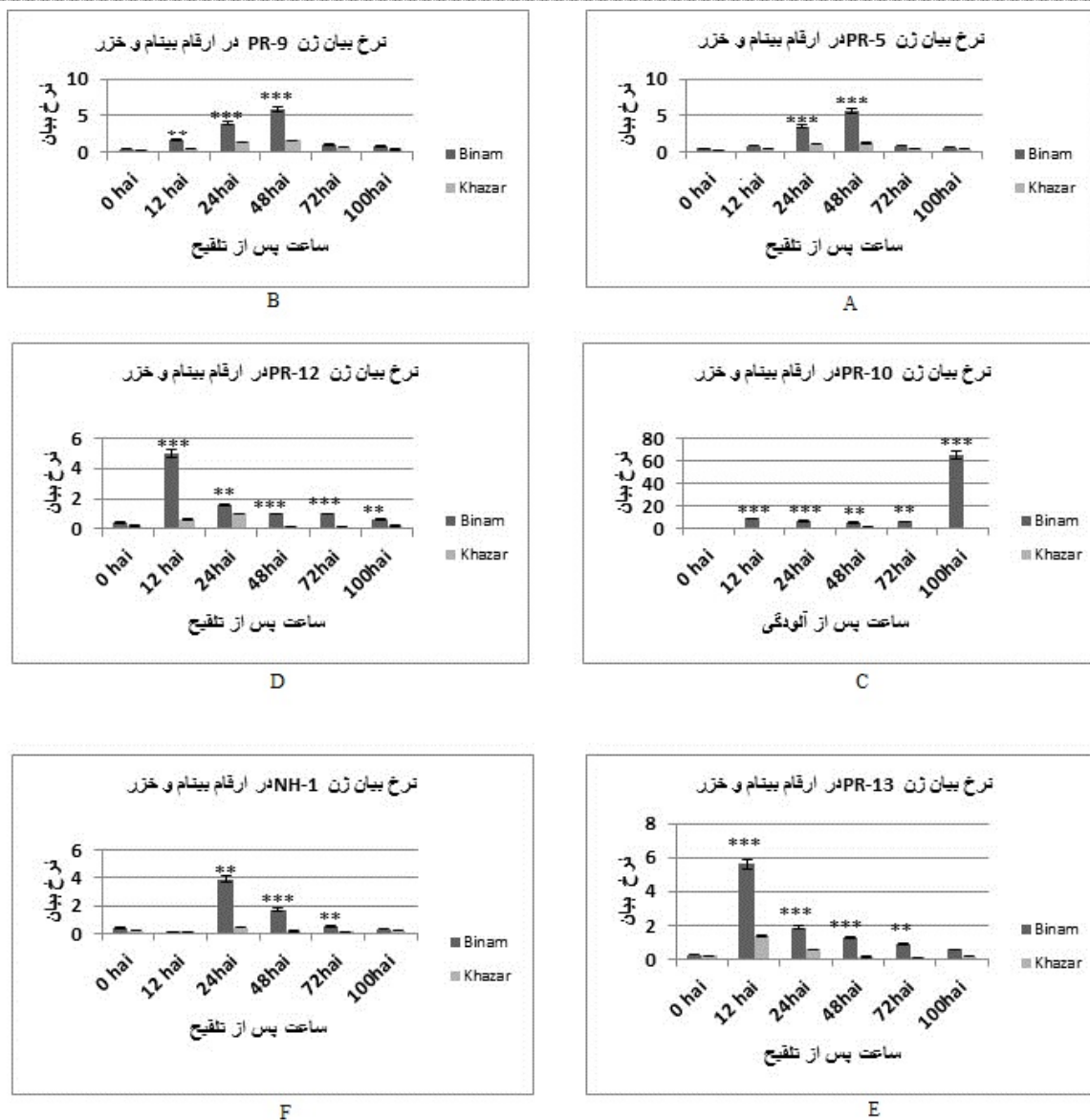
بحث

مقاومت گیاهان به بیماری‌ها جهت استفاده موفق از گونه‌های گیاهی در کشاورزی مدرن بسیار مهم است. در سال‌های اخیر گیاهان مقاوم به طور موفقیت آمیزی تولید شده‌اند. ظهور بیولوژی مولکولی ما را قادر کرده ژن‌های دخیل در مقاومت گیاهان را در سطح مولکولی آنالیز و ضمناً دریچه‌ای به روی ما گشوده تا بتوانیم ذره‌ای از پیچیدگی‌های پاسخ‌های دفاعی گیاهان در تعامل با پاتوژن‌ها را درک کنیم.

در غلات شمار بسیار زیادی از ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها (R genes) از گیاهان برنج (*Oryza sativa*)، گندم (*Triticum aestivum*) و ذرت (*Zea mays*) جدا شده‌است. این سه گونه گیاهی بیش از ۸۵٪ غلات جهان را تولید می‌کنند. البته اخیراً پیشرفت‌های خوبی در فهم اساس مولکولی تعامل جو (*Hordeum vulgare*) با پاتوژن‌ها حاصل آمده‌است. به هر حال این ۴ گونه تنها غلاتی هستند که ژن‌های دخیل در مقاومت از آن‌ها جدا و تعیین هویت شده‌است.

صفر بود، اما در رقم خزر بیشینه بیان این ژن در زمان اوج (ساعت ۲۴ پس از مایه‌زنی) حدود ۵ برابر زمان صفر بود (شکل d-۲). نرخ بیان ژن *PR-13* در رقم بینام و خزر در ۱۲ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ۱۱ و ۴ برابر شاهد بود، ضمناً این میزان در رقم بینام در مقایسه با خزر ۸ برابر بالاتر بود. آزمون مقایسه‌ای *T student* نیز تنها در ساعت ۱۲ که ساعت اوج بیان این ژن‌ها در دو ژنوتیپ مورد مطالعه می‌باشد تفاوت معنی‌داری ($P < 0.001$) را بین نرخ بیان این دو ژن در رقم مقاوم در برابر رقم حساس نشان داد.

نرخ بیان *NHI* در هر دو رقم مورد بررسی در زمان ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی به‌طور چشمگیری افزایش یافت (شکل f-۲) و در ارقام بینام و خزر به ترتیب ۱۳ و ۲ برابر بالاتر از شاهد بود. نرخ بیان این ژن در رقم بینام در زمان اوج بیان ۹ برابر بالاتر از رقم خزر بود. آزمون مقایسه‌ای *T student* در ساعت ۲۴ که ساعت اوج بیان این ژن در دو رقم مورد مطالعه می‌باشد تفاوت معنی‌داری را بین نرخ بیان این ژن در رقم مقاوم در برابر رقم حساس نشان داد ($P < 0.01$). در بازه‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی با وجود کاهش در سطح بیان این ژن در هر دو رقم این نرخ در رقم مقاوم در مقایسه با رقم حساس اختلاف داشت که این اختلاف به ترتیب از نظر آماری در سطح احتمال ($P < 0.001$) و ($P < 0.01$) معنی دار بود. تفاوت معنی‌داری در نرخ



شکل ۲- نرخ بیان ژن های A: PR-5, B: POX, C: PR-10, D: PR-12, E: PR-13 و F: NH-1 در رقم بینام در مقایسه با خزر در تعامل با *R. solani* در زمان های مختلف پس از تلقیح.

Figure 2 - The expression rate of A: PR-5, B: POX, C: PR-10, D: PR-12, E: PR-13 and F: NH-1 genes in Binam cv comparing with Khazar cv in challenge with *R. solani* at different time points after inoculation.

خط نشان خطا، میانگین انحراف معیار بیان ژن را در دو آزمایش جداگانه نشان می دهد، * و *** به ترتیب معنی دار بودن را در سطح احتمال (P < 0.01) و (P < 0.001) در آزمون مقایسه ای T student نشان می دهد.

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

به دلیل نقش فعال *POX* در محکم‌تر شدن دیواره سلولی گیاه با کاتالیز فرایند تولید لیگنین (Lignification)، که خود منجر به افزایش تحمل در برابر فعالیت آنزیمی نفوذ بیمارگر شده جایگاه این ژن را در مقاومت توجیه می‌کند (Passardi et al., 2004). در مطالعات ما سطح بیان این ژن در ۱۲ ساعت اول افزایشی اندک داشت که به دلیل نفوذ هیف‌های اولیه در این زمان است. نسخه‌های این ژن در ساعت‌های ۲۴ و ۴۸ پس از تلقیح روند افزایشی خود را ادامه داد که با نتایج بررسی‌های قبلی در مورد بیان *POX* در گیاه برنج پس از تلقیح با *Magnaporthe oryzae* و *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* و *grisea* مطابقت دارد (Jaishree et al., 1997). در این زمان اکثر هیف‌ها به بافت پارانیشم رخنه کرده و علائم بیماری در حال بروز است. نسخه‌های این ژن در رقم حساس (خزر) در مقایسه با رقم مقاوم بسیار کمتر بوده که نشان‌دهنده نقش فعال این ژن در بروز مقاومت رقم بینام می‌باشد. نقش این ژن در مقاومت گیاه برنج علیه بیماری سوختگی باکتریایی ناشی از *X. oryzae* pv. *oryzae* و دخالت آن در تولید لیگنین در گیاه بعنوان یکی از مکانیسم‌های دفاع گیاه پس از حمله بیمارگر بخوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Hilaire et al., 2001).

با اینکه ژن *PR-10* اثرات ریبونوکلازی و RNase دارد و نقش فعال آن در بروز مقاومت گیاهان علیه پاتوژنهای ویروسی اثبات شده است (Jwa et al., 2001)، اما بیان این ژن در برابر

پروتئین‌های شبه تاوماتین^۱ سبب تغییر نفوذپذیری غشاء پلاسمایی قارچ‌ها شده و در نهایت سبب مرگ سلول قارچی می‌گردد. موتوکریشانان و همکاران (Muthukrishnan et al., 2001) نقش این ژن را در افزایش مقاومت نسبت به *R. solani* در گیاه برنج گزارش کردند (Muthukrishnan et al., 2001). در این بررسی بیان رونوشت‌های ژن *PR-5* از ۱۲ ساعت پس از آلودگی شروع، در ۲۴ ساعت پس از آلودگی افزایشی شدید داشته و در زمان ۴۸ ساعت پس از تلقیح به اوج خود رسید. به نظر می‌رسد شروع القای این ژن در ساعت ۱۲ به دلیل نفوذ بخشی از هیف‌ها به داخل پارانیشم می‌باشد. به نظر می‌رسد در ساعت ۴۸ پس از آلودگی که میزان بیان ژن *PR-5* به اوج خود رسیده قارچ از دیواره سلولی گیاه رد شده و در بافت پارانیشمی بوده که این حداکثر تحریک گیاه توسط نفوذ پاتوژن سبب افزایش بیان ژن مذکور می‌شود (Zhao et al., 2008). روند افزایش بیان این ژن در طی ساعات ذکر شده با نتایج بابایی زاد و همکاران (Babaeizad et al., 2009) مطابقت دارد. در مطالعه ما نسخه‌های *PR-5* در ژنوتیپ مقاوم پس از آلوده‌سازی گیاهان با *R. solani* افزایش یافت که با یافته‌های قبلی (Muthukrishnan et al., 2001) مطابقت داشته و نشان‌دهنده نقش این ژن در بروز مقاومت در برنج در مقابل *R. solani* می‌باشد.

¹ . Thaumatin Like Proteins

رقم حساس می تواند دلیلی بر افزایش حساسیت این رقم در مقابل *R. solani* باشد. از نتایج فوق چنین بر می آید که افزایش بیان ژن های دخیل در مقاومت در زمان مناسب (نفوذ بیمارگر) سبب مقاومت موثر گیاه می گردد. ادروا و همکاران (۲۰۰۵) یک ژن شبه *Thionin* که در برگها و غلاف بطور مداوم بیان نمی شود و در برابر اکثر مولکولهای سیگنالی دفاعی مثل SA و JA القا نمی شود را کشف کردند. مطالعات بعدی نشان داد تیونین برنج (*OsThi1*) با JA در غلاف برنج القا و باعث مقاومت به بیماری باکتریایی ناشی از *Burkholderia plantarii* و *B. glumae* می گردد که با نتایج ما هم خوانی دارد (Iwai et al., 2002). ثابت شده بیان ژنهای *defensin* در گیاهان از طریق مسیرهای وابسته به JA و اتیلن صورت می پذیرد و غیروابسته به SA می باشد (Thomma et al., 1998). از این رو مسیر های وابسته به JA نقش فعالی در مکانیسم های مقاومت گیاه برنج علیه *R. solani* ایفا می کنند.

بنظر می رسد پاسخ های دفاعی وابسته به اتیلن و JA علیه نکروتروف ها و پاسخ های دفاعی وابسته به SA علیه عوامل بیوتروف در گیاهان در معرض حمله القا می شود. افزایش شدید بیان ژن *NHI 24* ساعت پس از آلودگی به قارچ *R. solani* این گفته را تایید می کند. برخی پاسخ های دفاعی وابسته به SA بطور مستقل از *NPRI* عمل می کنند. در نتیجه باید شاخه ای دیگر از مسیر سیگنال SA نیز وجود داشته باشد. ژن (*Arabidopsis thaliana AtWhy1*) توسط

پاتوژنهای قارچی نیز افزایش می یابد. نتایج این بررسی نشان داد که سطح بیان این ژن در همان ساعات اولیه نفوذ افزایش داشت که با نتایج کیم و همکاران مطابقت دارد (Kim et al., 2001). در ساعت ۱۰۰ پس از آلودگی نیز سطح بیان این ژن مجدداً در رقم مقاوم افزایش یافت که به دلیل تحریک ثانویه گیاه توسط هیف های ثانویه قارچ عامل بیماری می باشد. علاوه بر آن سطح بیان این ژن در رقم بینام به مراتب از رقم حساس خزر بیشتر بوده که نشان دهنده نقش این ژن در بروز مقاومت برنج علیه *R. solani* است. نتایج مشابهی در مورد نقش فعال *PBZ1* هومولوگ *PR10* در گیاه برنج در مقاومت علیه *R. solani* گزارش شده است (Midoh and Iwata, 1996). تخریب بخشی از سلولهای قارچی تحت تاثیر آنزیم های کیتیناز و بتا ۱،۳- گلوکاناز در داخل بافت گیاهی و به دنبال آن آزاد شدن مولکول های سیگنال دفاعی نظیر مونومر های کیتین و گلوکان دلیل احتمالی افزایش بیان این ژن است.

بیان ژن های *Defensin* و *Thionin* در رقم مقاوم بینام در ۱۲ ساعت اولیه پس از مایه زنی به اوج خود رسید. در حالیکه افزایش چندانی در رقم حساس خزر به چشم نمی خورد. این مشاهدات دلالت بر نقش احتمالی این دو ژن در بروز مقاومت ارقام برنج در تعامل با سوختگی غلاف دارد. بیان ژن *Defensin* در رقم حساس خزر بر خلاف رقم مقاوم در ۲۴ ساعت پس از آلودگی افزایش داشت که این نرخ در مقایسه با رقم مقاوم خیلی کمتر بود. تاخیر در بیان این ژن در

پاتوژن مذکور می باشد. در مورد تعامل با نکروتروفها در برنج برعکس بیوتروفها *NHI* باعث تجمع بیشتر *SA* و در نتیجه *SAR* نمی شود (Greenberg *et al.*, 1994). احتمالاً افزایش بیان این ژن در ساعت ۲۴ پس از تلقیح به دلیل نقش دیگر آن پیرامون بسته بندی و انتقال پروتئین های سنتز شده گیاهی است که قبلاً این نقش برای آن به اثبات رسید (Wang *et al.*, 2005).

آلودگی *Phytophthora parasitica* و تیمار با *SA* بیان شده اما این افزایش بیان مستقل از *NPRI* است (Spoel *et al.*, 2003). نتایج این بررسی نشان می دهد که سطح بیان این ژن در رقم مقاوم در زمان اولیه نفوذ (۱۲ ساعت پس از آلودگی) کاهش ولی در ساعت های بعدی افزایش معنی داری در مقایسه با رقم حساس یافته است که نشان دهنده نقش *NHI* در مکانیسم های مقاومت رقم مقاوم در تعامل با

منابع

- Abad L, Urzo D, Liu MP, Narasimhan D, Reuveni ML, Zhu M, Niu JK, Singh X, Hasegawa NK, Bressan RA (1996). Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science* 118: 11-23.
- Babaeizad V, Imani JG, Kogel KH, 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 Applied Genetics* 118: 455-463.
- Balali GR, Rahimian M, Kosari M (2008). Study of genetic variation of *Rhizoctonia solani* AG 1-1A isolated from rice using pectic zymogram technique. *Iranian Journal of Biology* 21: 17-23.
- Barratt DHP and Clark JA (1991). Proteins arising during the late stages of embryogenesis in *Pisum sativum* L. *Planta*. 184: 14-23.
- Bohlmann, H. 1994. The role of thionins in plant protection. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13:1-16.
- Carmona MJ, Molina A, Fernandez JA, Lopez-Fando JJ, Garcia-Olmedo F (1993). Expression of the alpha-Thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant Journal* 3: 457-462.
- Chern MS, Fitzgerald HA, Canlas PE, Navarre DA, Ronald PC (2005). Overexpression of a rice *NPRI* homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 511-520.
- Christensen AB, Hocho B, Naesby M, Gregersen PL Brandt J (2002). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 135-44.
- Datta R, Velazhahan N, Oliva I, Ona T, Mew GS, Kush T, Muthukrishnan, SK, Datta S (1999). Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease, *Theoretical Applied Genetics* 98: 1138-1145.
- Edreva, A. 2005. Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. *Gen. Applied plant physiology* 31: 105-124.
- Epple P, Apel K, Bohlmann H (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*. 9: 509-20.
- Farkas GL and Stahmann MA (1966). On the nature of changes in peroxidase isozymes in bean leaves infected by Southern Bean Mosaic Virus. *Phytopathology* 56: 669-677.

- Florack DEA, and Stiekema WJ (1994). Thionins: Properties, possible biological roles and mechanisms of actions. *Plant molecular biology* 26: 25-37.
- Florack DEA, Visser BDE, Vries PH, Van Vuurde JWL, and Stiekema WJ (1993). Analysis of the toxicity of purothionins and hordothionins for plant-pathogenic bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 99: 259-268.
- Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi Goltapeh E, Safaei N, Razavi KH (2015) Study of Wheat ESTs in its interaction with *Mycosphaerella graminicola*. *Iranian Journal of Agricultural Biotechnology* 7: 87-106.
- Glazebrook J (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43:205-227.
- Goudarzi A, Safaie N, Jafari M, Mahmoudi SB, Tohidfar M (2015) Transformation of sugar beet with a bean chitinase gene and enhanced resistance to *Alternaria alternata*. *Iranian Journal of Agricultural Biotechnology* 7: 175-200.
- Greenberg JT, Guo A, Klessig DF, Ausubel FM (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated with multiple defense functions. *Cell*. 77:551-63.
- Grover A, Gowthaman R (2003). Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Current Science* 84: 330-40.
- Hilaire E, Young SA, Willard LH, McGee JD, Sweat T, Chittoor, JM, Guikema JA, Leach JE (2001). Vascular defense responses in rice: Peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1411-1419.
- Iwai T, Kaku H, Honkura R, Nakamura S, Ochiai H, Sasaki T, Ohashi Y (2002). Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial disease in transgenic rice overproducing an oat cell -wall – bound thionin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 515-521.
- Jaishree M, Chittoor J, Leach E, Frank 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.
- Jwa NS, Agrawal GK, Rakwal R, Park CH, Agrawal VP (2001). Molecular cloning and characterization of a novel jasmonate inducible pathogenesis-related class 10 protein gene, JIOsPR10, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286: 973-983.
- Kim S, Ahn P, Lee YH (2001). Analysis of genes expressed during rice-Magnaporthe grisea interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1340-1346.
- Lay FT and Anderson MA (2005). Defensins—components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci* 6: 85-101.
- Lin W, Anuratha CS, Datta K, Potrykus I, Muthukrishnan S, and Datta SK (1995). Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Nature Biotechnology* 13: 686-691.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402-408.
- Midoh N and Iwata W (1996). Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiology* 37: 9-18.
- Muthukrishnan S, George H, Harold N, Bikram S (2001). Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64: 93-114.
- Novacky A and Hampton RE (1968). Peroxidase isozymes in virus-infected plants. *Phytopathology* 58: 301-305.
- Passardi F, Penel C, Dunand C (2004). Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9: 534-40.
- Shah J, Kachroo P, Klessig DF (1999). The Arabidopsis ssi1 mutation restores pathogenesis-related gene expression in npr1 plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* 11: 191-206.

- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt J.A (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15: 760–70.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 15107–11.
- Triant DA and Whitehead (2009). Simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from small tissue samples. *Journal of Heredity* 100: 246–250.
- Van Loon LC (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103: 753–7.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135–62.
- Velazhahan R, Chen-Cole K, Anuratha CS, Muthukrishnan S (1998). Induction of thaumatin-like proteins (TLPs) in *Rhizoctonia solani*-infected rice and characterization of two new cDNA clones. *Physiologia Plantarum* 102: 21–28.
- Zhao CG, Wang AR, Shi YJ, Wang LQ, Liu WD, Wang ZH, Lu GD (2008). Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*. *Theoretical Applied of Genetics* 116: 501–516.

Resistance of Two Rice Cultivars to the Sheath Blight Agent *Rhizoctonia solani* AG1-1A

Sayari M.¹, Babaeizad V.*², Tajick-Ghanbari M.A.², Rahimian H.³

¹Postgraduate, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Department of Plant Protection.

²Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Department of Plant Protection.

³Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Department of Plant Protection.

Abstract

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 resistant genes are useful genetic resources that can be employed to develop resistant varieties as the best alternative to other control measures. The present investigation was carried out to analyze the interaction of two major rice cultivars grown in Northern provinces, with *Rhizoctonia solani*, the causative agent of rice sheath blight disease. Binam and Khazar known as the resistant and susceptible cultivars, respectively, were inoculated and their reaction to *R. solani* determined. The lesions in the sheath of the susceptible cultivar were twice in length compared to those on the resistant cultivar. Analysis of data by the Student's T test showed existence of significant difference (P value < 0.05) between the two cultivars. To determine the expression profile of the genes involved in resistance to *R. solani*, samples were taken from leaves of two weeks old seedlings in different time courses post inoculation. RNA was extracted from the samples and analyzed by quantitative real time PCR. Results of the present study indicated that expression rates of *PR-5*, *Proxidase*, *PR-10*, *Defensin*, *Thionin*, and *NH-1* in resistant genotype (Binam) increased greatly after inoculation with *R. solani* when compared to Khazar cultivar. The outcomes of this study also suggest that the genes under study are involved in resistance mechanisms of rice against sheath blight disease.

Keywords: *Pathogenesis-Related genes*, Gene expression, Rice, *NH1*, cDNA, Real-time Q-PCR

* Corresponding Author: Babaeizad V.

Tel: 01133687567 Email: babaeizad@yahoo.com