



افزایش بیان ژن دفاعی *PR1* در گیاه به (*Cydonia oblonga*) با کاربرد ماده محرک بیون

نسیم سرهنگی^۱، منصوره کشاورزی^{۲*}، علی محمد شکیب^۳، محمد علی ابراهیمی^۴

^۱ دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور تهران، تهران، ایران.
^۲ دانشیار پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

^۳ دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

^۴ دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۰۵

چکیده

یکی از روش های سالم مدیریت بیماری آتشک در گیاه به (*Cydonia oblonga*)، فعال سازی سیستم های دفاعی درونزاد گیاه با استفاده از مواد محرک دفاعی از جمله بیون (Benzothiadiazole, Bion) است. هدف از این تحقیق، بررسی مکانیسم دفاع القا شده توسط بیون در گیاه به با تاکید بر تغییر بیان ژن های دفاعی گروه *PR1* بود. بدین منظور، ابتدا از برگ گیاهان تیمار که دو نوبت با محلول بیون (۴۰۰ میلی گرم در لیتر) محلول پاشی شدند و آب (شاهد) RNA استخراج شد و برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. سپس برای کنترل داخلی، یک قطعه ۷۵۰ جفت بازی از ژن خانه دار *actin* همسانه سازی و تعیین توالی شد. نتیجه توالی یابی نشان داد که ۹۹٪ تشابه بین ژن اکتین گیاه به با گیاه سیب (*Malus domestica*) وجود دارد. بر اساس آن توالی، آغازگرهای اختصاصی برای گیاه به طراحی و سپس تغییرات ایجاد شده در بیان ژن *PR1* پس از تیمار درختان به با بیون توسط *real-time PCR* بررسی و با شاهد مقایسه شد. نتایج این واکنش نشان داد که تیمار بیون موجب ۱۰ بار افزایش بیان ژن *PR1* می شود. بر این اساس، اثر ماده بیون در کنترل نسبی بیماری آتشک می تواند با فعالیت پروتئین های دفاعی گروه *PR1* مرتبط باشد.

واژگان کلیدی: به، پروتئین های دفاعی، *actin*، *real-time PCR*

مقدمه

اثبات شده (Maxson-Stein *et al.*, 2002) است. همچنین نتایج تحقیقات انجام شده در ایران نیز نشان‌دهنده تاثیر ماده بیون در کنترل بیماری آتشک در سیب در شرایط برون تنی (Shahini *et al.*, 2010) و در گیاه به در شرایط اسکرین هاوس (Balajoo *et al.*, 2012) بوده است.

مکانیسم‌های القا شده با واسطه مواد محرک در بسیاری از موارد با افزایش بیان ژن‌های دفاعی همراه بوده و منجر به افزایش سطوح مقاومت‌گیاه می‌شوند (Adrienne & Barbara, 2006; Durrant and Dung, 2004). بررسی‌های قبلی نشان داده است که پروتئین‌های دفاعی (Pathogenesis-related proteins) در دفاع القایی با واسطه ماده بیون نیز نقش دارند (Francis *et al.*, 2009; Herman *et al.*, 2008). به‌عنوان مثال، در برنج، نسخه برداری ژن‌های کدکننده کینازها، پروتئین فسفاتازها و چندپروتئین دیگر در واکنش‌های دفاعی القا شده با بیون، افزایش می‌یابد (Cao *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005). همچنین در گیاه به، مکانیسم ملکولی دفاع القا شده توسط بیون با افزایش نسخه‌برداری ژن‌های مسئول سنتز پروتئین‌های دفاعی گروه PR2 (بتاگلوکانازها) همراه بوده است (Sarhangi *et al.*, 2015).

بیماری باکتریایی آتشک با عامل (Burrill) *Erwinia amylovora* (Wislow *et al.*, 1920) از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه دار است و به‌خصوص در سیب، به و گلابی از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار است. روش‌های مبارزه متعددی برای مهار این بیماری وجود دارد که از جمله می‌توان به فعال‌سازی سریع و موثر واکنش‌های دفاع درون‌زاد گیاه با استفاده از مواد محرک اشاره نمود (Maloni *et al.*, 2005). ترکیبات آلی و غیرآلی مختلفی می‌توانند واکنش دفاعی گیاه را فعال کنند. از جمله این مواد محرک، Acibenzolar-S-methyl است که ترکیبی از Benzothiadiazole بوده و با نام تجاری بیون Bion® تولید می‌شود. این ماده در ایالات متحده در سطح تجاری برای کنترل بیماری‌های لکه و اسپک باکتریایی گوجه‌فرنگی، سفیدک پودری اسفناج و کپک آبی توتون استفاده می‌شود (Moffat, 2001). همچنین در سطح آزمایشی، اثر آن در کاهش شدت برخی بیماری‌های قارچی، ویروسی و باکتریایی در گیاهان زراعی مانند شلغم (Godard *et al.*, 1999)، خیار (Ishii *et al.*, 1999) و در گیاهان باغی از جمله در گلابی علیه لکه سیاه (Faize *et al.*, 2004) و آتشک (Sparlaet *et al.*, 2004) در سیب علیه آتشک (Baysal *et al.*, 2002; Brisset *et al.*, 2000; Hassan *et al.*, 2007;

تا کنون فعالیت آنزیمی از PR1 های گیاهی گزارش نشده است. اولین نشانه غیر مستقیم اثر ضد میکروبی پروتئین های خانواده PR1 در لاین های تراریخته توتون حاوی تراژن PR1a بود که با افزایش مقاومت به *Prenosporatabacina* و *Pparasitica* توام بود (Alexander *et al.*, 1993). همچنین پس از خاموش کردن ژن های PR1، حساسیت به *Phytophthoraparasitica* افزایش یافت (Riviere *et al.*, 2008). در شرایط برون تنی و در برگ، پروتئین های PR1 خالص سازی شده از گوجه فرنگی مانع جوانه زدن زئوسپور و کاهش شدت پوسیدگی ناشی از *Phytophthora infestans* شدند (Niderman *et al.*, 1995).

با توجه به مشاهدات قبلی مبنی بر کاهش شدت بیماری آتشک در گیاه به اثر تیمار با ماده محرک بیون (Balajoo *et al.*, 2012) و روشن شدن نقش پروتئین های دفاعی خانواده PR2 در این دفاع القایی (Sarhangi *et al.*, 2015)، این تحقیق با هدف بررسی گسترده تر مکانیسم عمل بیون در گیاه به انجام گرفت و با توجه به گستردگی پروتئین های خانواده PR1، برای اولین بار تغییرات بیان ژن های این خانواده پس از دفاع القایی با واسطه بیون در این گیاه بررسی شد.

تاکنون بیش از ۱۶ خانواده از پروتئین های دفاعی در گیاهان شناخته شده اند که یکی از گسترده ترین آن ها خانواده PR1 است. پروتئین های این خانواده در پاسخ به آلودگی های قارچی و باکتریایی در سطوح بسیار بالایی بیان می شوند. به عنوان مثال، بیان ژن های کد کننده PR1 متعاقب شرایط تنش در توتون بیش از ۱۰۰۰ بار افزایش می یابد و به همراه سایر پروتئین های دفاعی (مانند گلوکانازها، کینازها، کیتینازها) و آنزیم های متابولیسم ثانویه (مانند آنزیم های دخیل در بیوستز فیتوالکسین ها) موجب افزایش سطح مقاومت می شوند (Alexander *et al.*, 1993). برخی از اعضای این خانواده پروتئینی به عنوان بخشی در طی واکنش فوق حساسیت ترشح می شوند و با انتشار به بافت های سالم، در مسیر مقاومت اکتسابی سیستمیک نقش دارند (Abdel-Monaim *et al.*, 2012; Van Loon and Strain, 1999).

با وجود گستردگی پروتئین های PR1 و ارتباط آن ها با دفاع گیاه، مکانیسم عمل آن ها هنوز تا حدود زیادی ناشناخته مانده است. با توجه به اینکه این پروتئین ها همولوژی بالایی با برخی پروتئین های مشابه در مخمرها، حشرات و مهره داران دارند، بررسی مکانیسم عمل پروتئین های مشابه می تواند به شناخت مکانیسم عمل آنها در گیاهان کمک کند (Van Loon and Strain, 1999). برخی هو مولوگ های پروتئین های PR1 در انسان فعالیت پروتئازی و RNase دارند (Yamakawa *et al.*, 1998) اما

مواد و روش‌ها

در اواسط بهار، نهال‌های سه ساله به رقم اصفهان کاشته شده در ۲ تکرار (هر تکرار حاوی یک درخت) در باغ بیماری شناسی موسسه تحقیقات باغبانی کرج در دو نوبت با فاصله چهار روز با محلول بیون (به غلظت ۴۰۰ میلی گرم در لیتر) (Syngenta, USA) -محلول- پاشی شدند (Balajoo et al., 2012). پنج روز پس از دومین محلول پاشی، از برگ‌های جوان نمونه برداری و در یخدان به آزمایشگاه و فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. RNA کل برگ با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini (Qiagen, هلند) استخراج و برای ساخت cDNA از کیت cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) استفاده شد. به منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های خانواده PR1 از توالی این ژن (شماره دسترسی JQ917106) استفاده شد. به منظور استفاده از ژن کنترل داخلی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز زمان واقعی (real-time PCR)، ابتدا بر اساس هم‌ردیفی ژن‌های *actin* از گیاهان: سیب (شماره دسترسی GQ339778)، سویا (شماره بازیابی XM003547311)، لوبیا (شماره دسترسی KF033666) و توت فرنگی (شماره دسترسی XM004294460)، یک جفت آغازگر توسط نرم افزار Primer3 طراحی و توسط آن، بخشی از این ژن از گیاه به همسانه سازی و توالی یابی شد و سپس آغازگرهای اختصاصی برای ژن *actin* گیاه به طراحی شد. واکنش

زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک مرحله وا سرت است اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل: اتصال در دمای ۴۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و سپس بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ برده شد و توسط کیت تخلیص Fermentas خالص شد. سپس قطعه مورد نظر در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T الحاق و با روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* سویه XL1Blue منتقل شد. جهت تشکیل کلونی، ۲۰ میکرولیتر مخلوط انتقال بر روی محیط کشت LB agar حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت شد. پلاسمید نو ترکیب با کشت یک کلونی استخراج و حضور قطعه ژن درون پلاسمید با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تایید و پس از توالی یابی، با نرم افزارهای موجود با سایر توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات DNA مقایسه شد.

غلظت مناسب آغازگرهای ژن‌های *PR1* و *actin*، بهینه سازی برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت انجام *real-time* و رسم منحنی استاندارد با رقت سریالی cDNA با آغازگرها جهت تعیین غلظت مناسب cDNA انجام گرفت. میزان بیان با استفاده از مقادیر حدود آستانه حاصل از تکثیر ژن *PR1* بر روی نمونه‌های شاهد و تیمار شده با دو تکرار زیستی به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با نرم افزار مربوط به

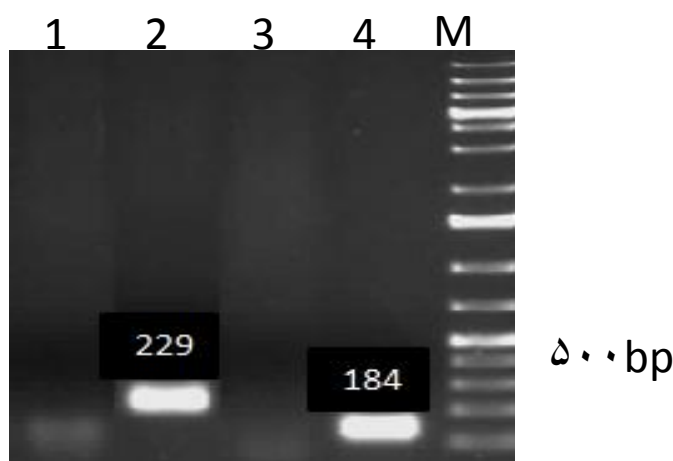
توالی قطعه تکثیر شده، یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی 5'-F: TCACACGTTCTACAATGAAC-3' و R:5'-TACTTCCTCTCAGGTGGAGC-3' طراحی و ساخته شد. از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از این جفت آغازگر، باند ۲۲۹ جفت بازی برای ژن اکتین که مورد انتظار بود بدست آمد (شکل‌های ۱ و ۲).

بر اساس توالی ژن *PRI* گیاه به (شماره دسترسی JQ917106.1) آغازگرهای اختصاصی با توالی 5'-F: CCAAGACACACCCCAAGACT-3' و R:5'-AGTGCTCATGGCAAGGTTTT-3' طراحی شد. از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از این آغازگر، یک باند ۱۸۴ جفت بازی برای این ژن که مورد انتظار بود بدست آمد (شکل ۱).

شرکت Bio-Rad محاسبه و به صورت نسبت بیان ژن بین گیاه تیمار شده و شاهد آورده شد.

نتایج و بحث

در بررسی‌های کمی بیان ژن، به یک ژن کنترل داخلی نیاز است. یکی از ژن‌هایی که در این زمینه در گیاهان استفاده می‌شود، ژناکتین است. با استفاده از cDNA ساخته شده به عنوان الگو و آغازگرهای طراحی شده برای ژن اکتین، یک قطعه ۷۵۰ جفت بازی این ژن از گیاه به تکثیر شد که پس از خالص‌سازی و همسانه‌سازی توالی آن تعیین شد. مقایسه توالی این قطعه با سایر توالی‌های موجود در بانک DNA نشان داد که بالاترین تشابه (۹۹٪) در سطح اسید نوکلئیک و پروتئین با ژن اکتین سیب (شماره دسترسی GQ339778.1) دارد. این توالی با شماره دسترسی KF981879 ثبت شد. بر اساس

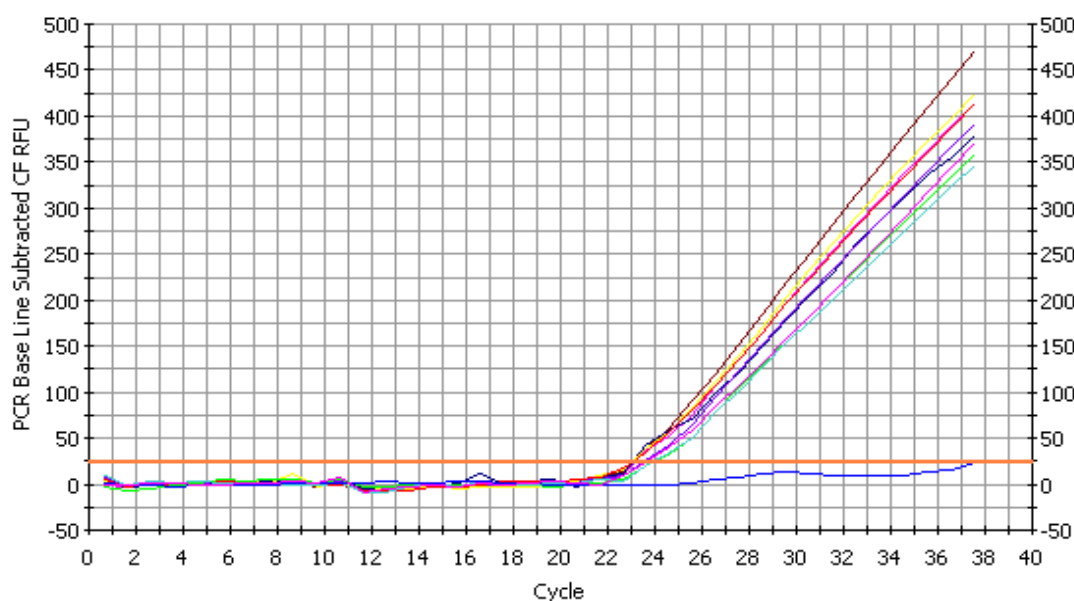


شکل ۱- نقوش الکتروفورزی محصولات حاصل از تکثیر ژن‌های *PRI* و *actin* چاهک‌های ۱ و ۳ کنترل منفی؛ چاهک‌های ۲ و ۴ به ترتیب *PRI* و اکتین؛ M نشانگر وزن مولکولی 1kb.

Figure 1- Electrophoretic patterns of PCR products for *actin* and *PRI* genes. 1 and 3 lanes: negative control; 2 and 4 lanes: *PRI* and *actin* genes, respectively; M: 1kb DNA weight ladder.

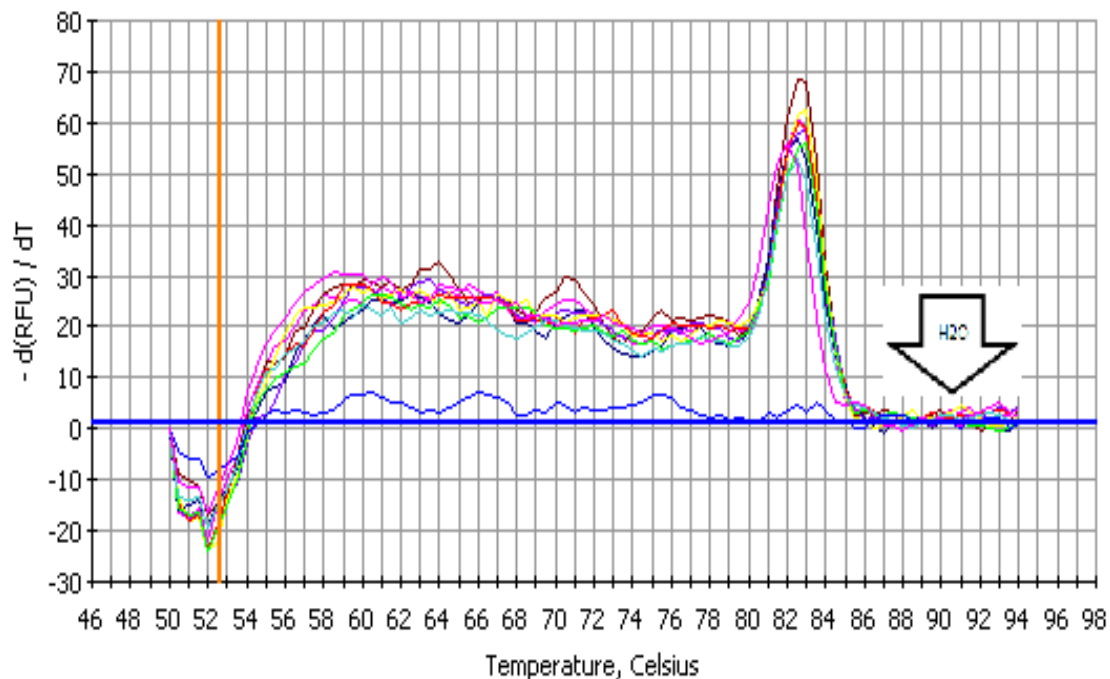
میزان بیان ژن‌های *PR1* و اکتین در نمونه‌های تیمار شده و شاهد با استفاده از *real-time PCR* بررسی و نمودارهای حدود آستانه و ذوب رسم شدند (شکل‌های ۲، ۳، ۴ و ۵). بررسی میزان بیان با استفاده از مقادیر حدود آستانه حاصل از تکثیر ژن *PR1* در نمونه‌های شاهد و تیمار شده نشان داد که تیمار ماده بیون روی درختان به باعث افزایش ۱۰ برابری بیان ژن *PR1* می‌شود (شکل ۶). در برخی درختان دیگر نیز واکنش‌های دفاعی با افزایش بیان ژن *PR1* توأم بوده است. به عنوان مثال در سیب (*Malus*

domesticus)، ماده بیون قادر به القای بیان ژن‌های خانواده *PR1* در برابر بیماری آتشک بود و سطح آن را تا ۱۰ بار افزایش داد (Maxson-Stein et al., 2002). افزایش بیان ژن *PR1* در رز (*Rosa damascena*) در برابر عامل بیماری لکه سیاه (Suo and Leung, 2002)، در کلم (*Brassica oleracea*) در برابر عامل بیماری سفیدک پودری (Ziadi et al., 2001) و در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) در برابر قارچ (*Uromyces fabae*) (Rauscher et al., 1999) نیز گزارش شده است.



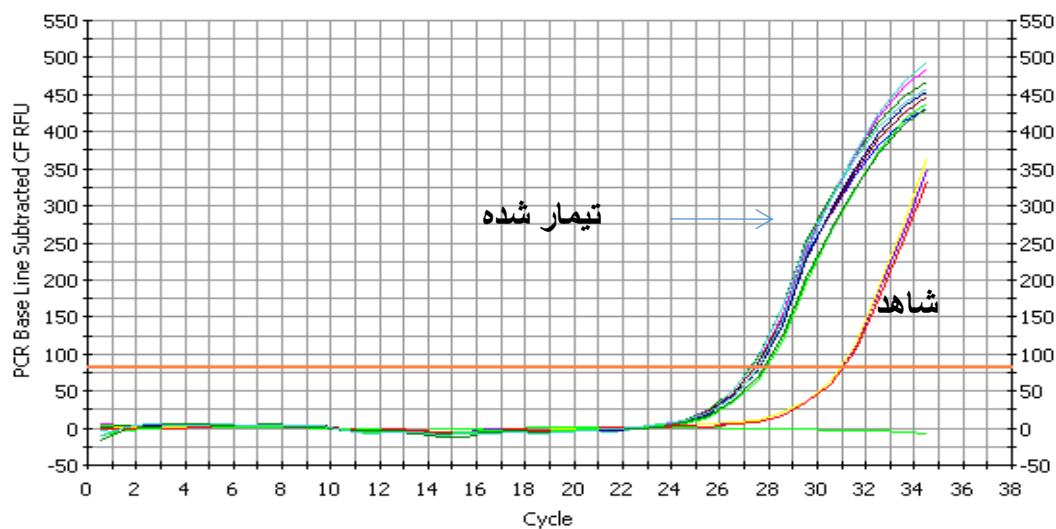
شکل ۲- نمودار تکثیر و حدود آستانه تکثیر ژن *actin* در گیاهان به تیمار شده با بیون و شاهد.

Figure 2- Graph for amplification and threshold value of the *actin* gene Bion-treated and control *Cydonia oblonga* plants.



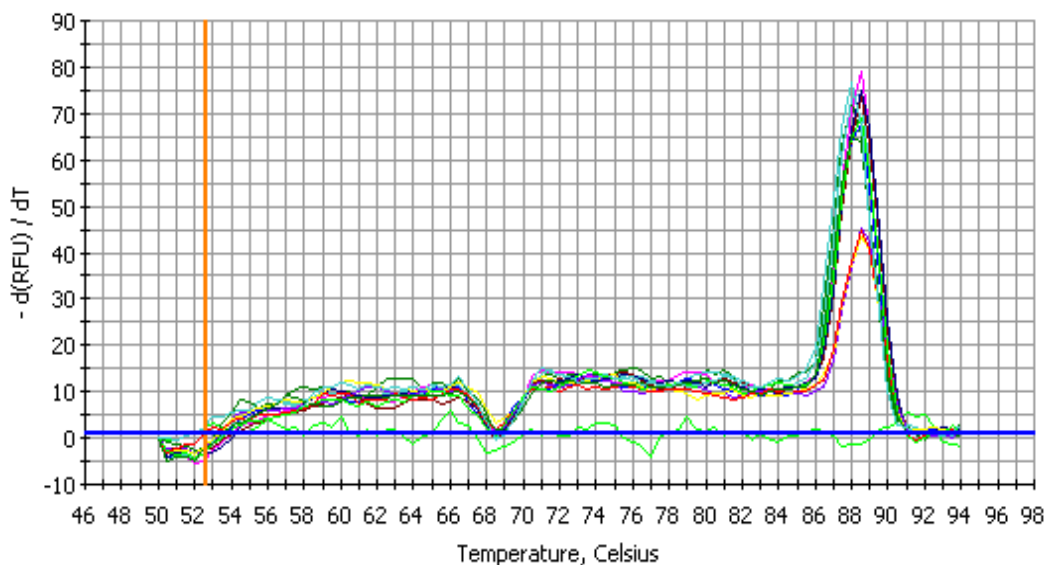
شکل ۳- نمودار ذوب تکثیر ژن *actin* در گیاهان به تیمار شده با بیون و شاهد.

Figure 3- Melting pattern for *actin* gene amplification in bion-treated and control *Cydonia oblonga* plants.



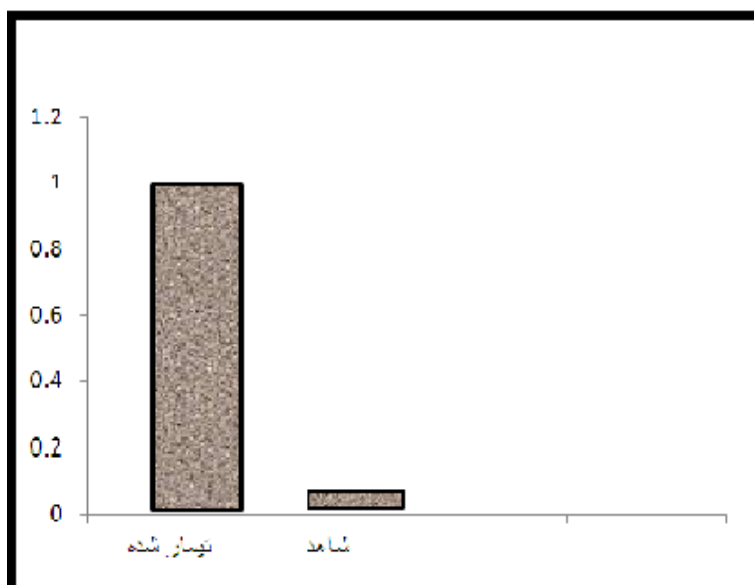
شکل ۴- نمودار تکثیر و حدود آستانه ژن *PRI* در گیاهان به تیمار شده با بیون و شاهد.

Figure 4- Amplification and limit pattern for *PRI* gene in bion-treated and control *Cydonia oblonga* plants.



شکل ۵- نمودار ذوب تکثیر ژن *PR1* در گیاهان به تیمار شده با بیون و شاهد.

Figure 5- Melting pattern for *PR1* gene amplification in bion-treated and control *Cydonia oblonga* plants.



شکل ۶- مقایسه بیان نسبی ژن *PR1* بین گیاهان به تیمار شده با بیون و شاهد.

Figure 6- Comparison of relative expression of *PR1* gene between bion-treated and control *Cydonia oblonga* plants.

پروتئین PR1g بازی افزایش یافت و میزان فعالیت بتا-۱-۳ گلوکوناز (که توسط ژن *PR2* بیان می شود) در فضای بین سلولی بالا رفت اما

در بررسی گیاهان تراریخته توتون که در آن پروتئین های PR1 اسیدی خاموش شده بودند، پس از تیمار با اسید سالسیلیک، بیان

NPR1 در هسته با فاکتور نسخه برداری TGA2 (که کنترل منفی بیان ژن *PR1* را برعهده دارد) واکنش نموده و با خارج کردن آن از روی DNA هدف، آنرا غیرفعال می‌کند که در نتیجه، بیان ژن‌های دفاعی از جمله *PR1* فعال می‌شود (Boyle et al., 2009).

مکانسیم عمل پروتئین‌های دفاعی خانواده *PR1* در گیاهان هرچه باشد، توالی یابی آن‌ها نشان می‌دهد که در گیاهان به شدت حفاظت شده و فراوان هستند که موید این است که از منشا تکوینی واحدی نشأت گرفته و فعالیت آن‌ها برای بقای موجودات زنده ضروری است (Edreva, 2005; Van Loon, 2001). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که پروتئین‌های دفاعی خانواده *PR1*، بخشی از مکانسیم دفاعی القا شده در گیاه به هستند که نسخه برداری ژن‌های کدکننده آن‌ها متعاقب تحریک با مواد محرک دفاعی چندین بار افزایش می‌یابد. براین اساس، نقش و نحوه اثر ماده محرک بی‌خطر بیون در القای سیستم‌های درونزاد مقاومت گیاهی بیشتر مشخص می‌شود.

میزان کالوز کاهش یافت. این گیاهان پس از تیمار با پروتئین *PR1* نوترکیب، حالت برگشت نشان دادند (Riviere et al., 2008). این محققان نتیجه گرفتند که پروتئین‌های *PR1* اسیدی نقش تنظیمی در کاهش پروتئین‌های بازی و کاهش فعالیت گلوکانازها در فضای خارج سلولی دارند که احتمالاً با اتصال پروتئین‌های *PR1* اسیدی با گلوکانازها صورت می‌گیرد. مطالعات در گیاه آرابیداپسیس نشان داد که فعال شدن *PR1* از طریق (Nonexpressor of pathogenesis-related proteins) عناصر نسخه برداری گروه TGA2 صورت می‌گیرد (Rochonet et al., 2006). سالیسیلیک اسید مسیره‌های سیگنالی دفاعی را از طریق ملکول‌های سیگنال *NPR1* فعال می‌کند. این مولکول‌ها در سیتوزول به صورت غیر فعال وجود دارد و اسید سالیسیلیک آن‌ها را احیا و فعال می‌کند. مولکول‌های فعال شده از سیتوزول به هسته منتقل شده و بیان ژن‌های دفاعی را تحریک می‌کنند (Brosche and Kanagasjavi, 2012; Lindermayer et al., 2010; Tada et al., 2008). با افزایش اسیدسالیسیلیک، پروتئین

منابع

- Abdel-Monaim MF, Ismail ME, Morsy KM (2012). Induction of systemic resistance in soybean plants against Fusarium wilts disease by seed treatment with Benzothiadiazole and humic acid. *African Journal of Biotechnology* 110: 2454-2465.
- Adrienne CS, Barbara JH (2006). Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. *Eukaryot Cell* 5: 1941-1949.
- Alexander DR, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings National Academy of Sciences U.S.A* 90:7327-7331.

- Baysal O, Laux P, Zeller W (2002). Systemic acquired resistance (SAR) against fireblight. *Acta Horticulturae* 590: 269-272.
- Balajoo OM, Kesahavarzi M, Zahabi A, Danesh YR, Haghjuyan R (2012). Protective effect of acibenzolar-s-methyl on fireblight severity in quince and characterization of the *Erwinia amylovora* strains involved. *Journal of Plant Pathology* 94: 211-214.
- Boyle P, Su E, Rochen A, Shearer H, Murmu S, Chu J, Fobert P, Despre C (2009). The BTB/POZ Domain of the Arabidopsis disease resistance protein NPR1 Interacts with the repression domain of TGA2 to Negate Its Function. *Plant Cell* 21: 3700-3713.
- Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin JP (2000). Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fireblight. *European Journal of Plant Pathology* 106: 529-536.
- Brosche M, Kangasjarvi J (2012). Low antioxidant concentrations impact on multiple signaling pathways in Arabidopsis thaliana partly through NPR1. *Experimental Botany* 63: 1849-1861.
- Cao Y, Yang Y, Zhang H, Li D, Zheng Z (2008). Overexpression of a rice defense-related F-box protein gene OsDRF1 in tobacco improves disease resistance through potentiation of defense gene expression. *Physiol Plant* 134:440-452.
- Durrant WE, Dong X (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of PhytoPathology* 42: 158-209.
- Edreva A (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology* 31: 105-124.
- Faize M, Faize L, Koike N, Ishizaka M, Ishii H (2004). Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiating of multiple defense responses. *Phytopathology* 94: 604-612.
- Francis MI, Redondo A, Burns JK, Graham JH (2009). Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *European Journal of Plant Pathology* 124: 283-292.
- Godard JP, Ziadi S, Monot C, Le Corre D, Silue D (1999). Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. *Crop Protection* 18: 397-405.
- Hassan MAE, Buchenauer H (2007). Induction of resistance to fire blight in apple by acibenzolar-S-methyl and DL-3-aminobutyric acid. *Plant Diseases and Protection* 114: 151-158.
- Herman MAB, Davidson JK, Smart CD (2008). Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes. *Phytopathology* 98:1226-1232.
- Ishii H, Tomita Y, Hirio T, Narusaka Y, Nakazawa Y, Ivamoto S (1999). Induced resistance of Acibenzolar-S-methyl to cucumber and Japanese pear diseases. *European Journal of Plant Pathology* 105:77-85.
- Li D, Liu H, Zhang H, Wang A, Song F (2008). OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defense responses against pathogen infection and oxidative stress. *Experimental Botany* 59:2133-2146.
- Lindermayr CS, Cell B, Muller B, Leister D, Duner J (2010). Redox regulation of NPR1-TGA1 system of Arabidopsis thaliana by nitric oxide. *Plant Cell* 22: 2894-2907.
- Liu H, Wang X, Zhang H, Yang Y, Ge X, Song F (2008). A rice serine carboxypeptidase-like gene OsBISCPL1 is involved in regulation of defense responses against biotic and oxidative stress. *Gene* 420:57-65.
- Luo H, Song F, Goodman RM, Zheng Z (2005). Up-regulation of OsBIHD1, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses. *Plant Biology* 7:459-568.

- Maloni M, Venisse JS, Chevreau E (2005). Expression of a bacterial effector, harpinN, causes increased resistance to fire blight in *Pyrus communis*. *Tree Genetic Genomes* 1: 41-49.
- Maxon-Stein K, He ES, Hammerschmidt R, Jones A (2002). Effect of treating apple trees with Acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis related protein genes. *Plant Disease* 86:785-790.
- Moffat AS (2001). Finding new ways to fight plant diseases. *Science* 292: 270-273.
- Niderman T, Genet I, Bruyère T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mössinger E (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108: 17-27.
- Rauscher M, Adam AL, Wirtz S, Guggenheim R, Mendgen K, Deising HB (1999). PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant Journal* 19: 625-633.
- Riviere M, Marais A, Ponchet M, Willats W, Glliana E (2008). Silencing of acidic pathogenesis-related PR1 genes increases extracellular (1-3)-glucanase activity at the onset of tobacco defense reactions. *Experimental Botany* 59: 1225-1239.
- Rochon A, Boyle P, Wings T, Fobert PR, Despres C (2006). The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* 18: 3670-3685.
- Sarhangi N, Shakib AM, Keshavarzi M, Ebrahimi MA, Ahmad-Raji M (2015). Effect of the BTH chemical elicitor on expression of the PR2 gene and fire blight disease severity in quince. *Seed and Plant Journal* 31: 249-262 (In Farsi).
- Shahini S, Keshavarzi M, Hasanzadeh N, Hashemi M, Abdollahi H, Tavoosi M (2010). In vitro evaluation of Acilbenzolar-S-methyl on inhibition of fire blight in apple c.v. Golden delicious. *Iranian Journal of Plant Pathology* 46: 77-79. (In Farsi).
- Sparla F, Rotino L, Valgimigli CM, Pupillo P, Trost P (2004). Systemic resistance induced by Benzothiadiazole in pear inoculated with the agent of fireblight. *Scientia Horticulturae* 101: 269-279.
- Suo Y, Leung DWM (2002). BTH-induced accumulation of extracellular proteins and blackspot disease in reipse. *Biologia Plantarum* 42: 273-279.
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowaka-Mukhtar K, Moo ZS, Song JQ, Wang C, Zuo JR, Dong XN (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952-956.
- Van Loon LC (2001). The families of pathogenesis-related proteins. The 6th International Workshop on PR-proteins. Spa, Belgium: 9-10.
- Van Loon LC, Strain EA (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their functions and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Yamakawa T, Miyata S, Ogawa N, Koshikawa N, Yasumitsu H, Kanamori T, Miyazaki K (1998). cDNA cloning of a novel trypsin inhibitor with similarity to pathogenesis-related proteins and its frequent expression in human brain cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1395: 202-208.
- Zhang W, Chen JJ, Zhang H, Song F (2008). Overexpression of a rice diacylglycerol kinase gene OsBIDK1 enhances disease resistance in transgenic tobacco. *Molecular Cells* 26:258-264.
- Ziadi S, Barbedette S, Godard JF, Monot C, Corre DL, Silue D (2001). Production of pathogenesis related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis)-downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with Acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathology* 50:579-586.

Increasing expression of the *PR1* gene in quince (*Cydonia oblonga*) by application of Bion elicitor

Sarhangi N.¹, Keshavarzi M.^{2*}, Shakib A.M.³, Ebrahimi M.A.⁴

¹ Graduated M.Sc. Student, Payame Nour Univ., Karaj, Iran.

² Associate Professor, Horticultural Research Institute, Cold and Temperate Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

³ Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj

⁴ Associate Professor, Payame Nour University, Karaj, Iran.

Abstract

One of the safe methods for fire blight disease management in quince plant (*Cydonia oblonga*) is through activating plant indigenous defense systems using defense elicitors such as Bion (Benzothiadiazole). Investigating the effect of PR1 defense genes group in induced defense mechanism by Bion in quince was the purpose of this study. For this, RNA was extracted from leaf tissues of bion-sprayed (400 mg/L) and water sprayed (control) plants was used for cDNA synthesis. First, a 750 bp fragment of the actin gene from quince, as a house keeping gene, was cloned and sequenced. The result of sequencing showed it has 99% homology with appleactin gene. Specific primers for quince actin gene were designed and used to study changes in PR1 gene expression in bion-treated comparing control plants using real-time PCR method. Based on the results, Bion treatment caused 10 times increase in the PR1 gene expression. Based of result, the effect of Bion in relative control of fire blight in quince can partly be related to PR1 defense proteins activities.

Keywords: *Quince, Actin, Defense proteins, Real-Time PCR.*