بیان ژن های رمز کننده پپتید های ضد میکروبی تیونین و دفنسین در تعامل برنج با قارچ عامل بلاست، *Magnaporthe oryzae*[*]

EXPRESSION OF GENES RESPONSIBLE FOR PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL POLYPEPTIDES, THIONIN AND PDF1.2 IN INTERACTION OF RICE WITH RICE BLAST AGENT, *MAGNAPORTHE ORYZAE*

زهرا ساداتی [۱**]، محمدعلی تاجیک قنبری[۱]، ولی اله بابایی زاد[۱]، حشمت اله رحیمیان[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۱۸)

چکیده

تیونین ها و دفنسین ها پلی پپتید هایی با وزن مولکولی کم (5kDa)، بازی و غنی از سیستئین هستند که فعالیت ضد قارچی دارند. در این تحقیق بیان دو ژن *Thionin* و *PDF1.2* در دو رقم برنج طارم (حساس) و خزر (مقاوم) پس از آلودگی با قارچ *Magnaporthe oryzae* مورد ارزیابی قرار گرفت. از واکنشQuantitative Real-time PCR برای بررسی بیان این ژن ها در زمان های صفر تا ۹۶ ساعت بعد از آلودگی استفاده شد. بیان ژن *PDF1.2* در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به حداکثر رسید (۲۰ برابر نسبت به ساعت صفر). بیشترین میزان بیان ژن *Thionin* در ۴۸ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد (حدود ۸ برابر نسبت به ساعت صفر). الگوی بیان هر دو ژن *Thionin* و *PDF1.2* در رقم حساس و مقاوم مشابه بود، ولی سطح بیان این ژن ها در رقم خزر بیشتر از رقم طارم بوده است. آزمون مقایسه ای T-test تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ بین بیان این ژن ها در رقم حساس و مقاوم نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن های *Thionin* و *PDF1.2* احتمالا با مقاومت رقم خزر به قارچ *M. oryzae* مرتبط می باشند.

کلیدواژه: برنج، مقاومت، پپتید های ضد میکروبی، بیمارگر

---

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zahrasadati2@gmail.com

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، استادیار و استاد بیماری شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقدمه

بلاست، از مخربترین بیماری های قارچی در طی دوره رشدی گیاه برنج است که در مواردی تا ۹۰ درصد باعث کاهش محصول می شود (Ramkumar *et al.* 2010). قارچ *M. oryzae* روی برنج به صورت همی بیوتروف فعالیت می کند. کنیدیوم ها جوانه زده و تولید آپرسوریوم می کنند و از آپرسوریوم میخ رخنه خارج می شود که با فشار از لایه کوتیکول عبور می کند (Howard & Valent 1996). این قارچ پس از وارد شدن به سلول گیاه حساس از محتویات سلولی تغذیه می کند و پس از کشتن سلول وارد سلول مجاور می شود (Ebbole 2007).

گیاهان در مقابل حمله بیمارگر، با فعال شدن مکانیسم های دفاعی از خودشان دفاع می کنند (Song & Goodman 2001). تولید سریع فرم های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، سوپر اکسید و یون هیدروکسیل از فرآیند های اولیه پاسخ دفاعی گیاه به حمله بیمارگر می باشد (Hao *et al.* 2009). دیگر واکنش های دفاعی گیاه شامل تولید ترکیبات ضد میکروبی، تقویت دیواره سلولی و ترشح پروتئین های مرتبط با بیماری زایی (Pathogenesis related protein, PRP) (Wei *et al.* 2004) و تخریب هسته می باشد (Ryerson & Heath 1996). به دنبال حمله یک بیمارگر بیوتروف، مقاومت سیستمیک اکتسابی (Systemic acquired resistance, SAR) در بافت ها گسترش می یابد تا از توسعه بیمارگر جلوگیری کند (Ryals *et al.* 1996). SAR نوعی مقاومت القایی با دامنه اثر وسیع است که در اثر آلودگی موضعی بیمارگرها و یا کاربرد مواد شیمیایی تحریک کننده سیستم دفاعی گیاه القا می شود و منجر به فعال شدن بیان ژن های دفاعی گیاه که مسئول تولید پروتئین های دفاعی هستند، می شود (Zimmerli *et al.* 2000).

پروتئین های PR شامل مجموعه پروتئین های القا شده توسط بیمارگر ها می باشند، که عموما به طور ترکیبی مقدار آنها در اغلب آلودگی ها افزایش می یا بد و در زمان حمله بیمارگرها به گیاهان، یکی از ترکیبات اساسی در مکانیسم دفاعی گیاه هستند (Loon *et al.* 2006) این پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، توالی آمینو اسیدی ، روابط سرولوژیکی و محل و نوع فعالیت بیولوژیکی به ۱۷ خانواده تقسیم شده اند (Edreva 2005; Loon *et al.* 2006).

دفنسین ها و تیونین ها گروه مهمی از پلی پپتید های ضد میکروبی هستند که به ترتیب به خانواده PR12 و PR13 تعلق دارند (Loon *et al.* 2006). دفنسین ها و تیونین ها پروتئین های کوچک (حدود 5 kDa)، بازی و غنی از سیستئین هستند (Kawata *et al.* 2003). اولین دفنسین ها از گندم و جو جدا شدند و در ابتدا آنها را به عنوان زیر گروهی از خانواده تیونین ها می دانستند. سپس این گروه از پروتئین ها دفنسین نامیده شدند (Broekaert *et al.* 1995). بعضی از این پروتئین ها در غلظت های کم (میکرو مولار) در شرایط *in vitro* فعالیت ضد قارچی در مقابل طیف وسیعی از قارچ های رشته ای نشان می دهند و از رشد طولی ریسه جلوگیری می کنند و باعث تغییر نفوذپذیری غشای سلول های قارچ می شوند (Portieles *et al.* 2006).

تیونین ها در طیف وسیعی از گونه های گیاهی بیان می شوند و در دیواره سلولی، واکوئل ها و اجسام پروتئینی گیاهان یافت می شوند (Shirasawa-seo *et al.* 2002, Castro & Wagner 2005). میزان بیان این پروتئین ها بعد از حمله بیمارگر افزایش می یابد (Bohlmann *et al.* 1998). نقش این ژن در جو و آرابیدوپسیس مورد بررسی

قرار گرفته است و مشخص شده در دفاع نقش دارد. تیونین جدا شده از برگ های جو در شرایط *in vitro* بر روی قارچ ها و باکتری ها اثر سمیت دارد (Bohlmann *et al.* 1998, Molina *et al.* 1993). از دفنسین ها و تیونین ها می توان برای ایجاد گیاهان تراریخت مقاوم استفاده کرد (Wijaya *et al.* 2000). بیان دفنسین های دو گیاه *Brassica campestris* و *B. oleracea* در برنج باعث افزایش مقاومت به *M. oryzae* و *Xanthomonas oryzae* و طیف وسیعی از بیمارگرها شد (Kawata *et al.* 2003). انتقال ژن تیونین جو دوسر به برنج باعث افزایش مقاومت به دو بیمارگر باکتریایی خاک برد شده است (Iwai *et al.* 2002). بیان ژن تیونین جو در گیاهان توتون تراریخت باعث افزایش مقاومت به بیمارگر های باکتریایی شده است (Carmona *et al.* 1993). این بررسی با هدف ارزیابی میزان بیان ژن های *Thionin* و *PDF1.2* در تعامل برنج با قارچ عامل بلاست (*M. oryzae*) انجام گردید.

روش بررسی

تهیه گیاهچه های همسن

بذرهای رقم طارم به عنوان ژنوتیپ حساس به بلاست (Shabani *et al.* 2007) و رقم خزر به عنوان ژنوتیپ مقاوم (Moradi *et al.* 2009) از موسسه تحقیقات برنج آمل تهیه شدند. برای تلقیح گیاهان نیاز است تا گیاهچه های مورد استفاده همسن باشند. به همین منظور ابتدا بذرهای تهیه شده روی کاغذ صافی مرطوبی در تشتک پتری استریل قرار داده شدند. در این شرایط رطوبت نسبی حدود ۹۵ درصد فراهم گردید و به مدت ۴ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا بذرها جوانه بزنند. تعداد ۱۰-۱۵ بذر جوانه زده در گلدان های پلاستیکی به قطر ۱۵ سانتیمتر با خاک استریل شده با اتوکلاو قرار داده شدند. گلدان ها در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۸ درجه سلسیوس در روز و ۲۵ درجه سلسیوس در شب و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند سپس برای تلقیح از گیاهچه های همسن در مرحله ۵ برگی استفاده شد.

کشت قارچ و تهیه اسپور برای مایه زنی

جدایه قارچ *M. oryzae* تهیه شده از پژوهشکده برنج و مرکبات دانشگاه علوم کشاورزی ساری روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar, PDA) کشت داده شد و تشتک های پتری حاوی قارچ در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. این قارچ در محیط PDA اسپور کمی تولید می کند. به منظور افزایش اسپورزایی قارچ، از محیط آب آگار (Water Agar, WA) استفاده شد. دیسک هایی از کشت سه تا چهار روزه قارچ در محیط PDA روی محیط WA قرار داده شد. تشتک های پتری برای تحریک اسپورزایی تحت شرایط دمایی ۲۸ درجه سلسیوس و تناوب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. ۱۰-۱۲ روز پس از کشت در محیط WA تعداد زیادی اسپور بوجود آمد.

تهیه سوسپانسون اسپور و آلوده سازی گیاهچه ها

برای تلقیح قارچ به گیاهچه های برنج از سوسپانسیون اسپور با غلظت ۲×۱۰^{۵} استفاده شده است. به منظور تهیه این سوسپانسیون از ۳۰ میلی لیتر آب مقطر استریل همراه با ۰/۰۵ درصد توین۲۰ استفاده شد. دو میلی لیتر آب به هر تشتک پتری اضافه و به خوبی ریسه قارچ در آب مقطر همزده شد تا اسپورها به درون آب آزاد گردند. سوسپانسیون تهیه شده از پارچه ململی عبور داده شد تا

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای انجام واکنش Real - time PCR.

Table 1: **The primers used in Real time PCR assay.**

Primer name	Sequence	Refrence
PDF1.2	F: 5'- ATCACCCTTATCTTCGCTGC-3' R: 5'-TGCTGGGAAGACATAGTTGC-3'	(Qu et al. 2010)
Thionin	F: 5'- GCTAGGCTTAGTCCTGCAAC-3' R: 5'- GGTGACAGTCTCAGCTTCCT-3'	(Liu et al. 2008)
OsUBC	F: 5'- CCGTTTGTAGAGCCATAATT-3' R: 5'- AGGTTGCCTGAGTCACAGTT-3'	(Jain et al. 2006)

مانع حضور ریسه قارچ گردد. از سوسپانسیون تهیه شده برای اسپورپاشی روی گیاهچه های سه هفته ای استفاده شد. نمونه ها پس از آلوده سازی در اتاقک رشد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. طی یک هفته تا ده روز پس از تلقیح، علائم بیماری روی برگ های رقم حساس برنج مشاهده شد. ضمنا تلقیح و بررسی علایم بیماری در دو تکرار انجام شد.

انتخاب نمونه در زمان های مختلف

به منظور بررسی مکانیسم مقاومت در زمان های مختلف بعد از آلودگی، از برگ های آلوده نمونه گیری صورت گرفت تا از آنها برای استخراج RNA استفاده شود. زمان هایی که برای انتخاب نمونه در نظر گرفته شد صفر، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از آلودگی بود . نمونه ها بلافاصله بعد از جدا شدن از گیاه در نیتروژن مایع قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج آر ان ای کل

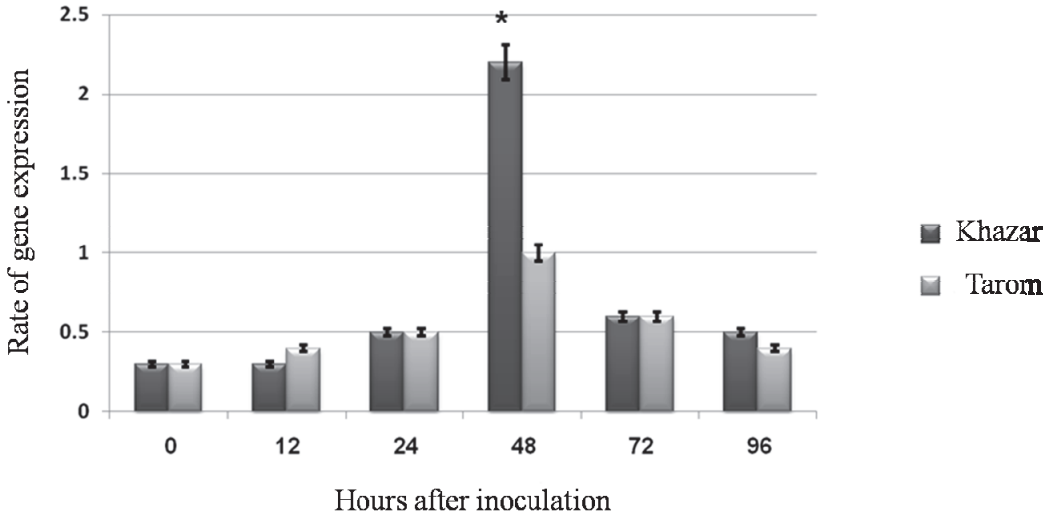
استخراج RNA از برگ های گیاهچه های برنج بر اساس دستورالعمل کیت RNX Plus (شرکت سیناژن) انجام شد. در پایان ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC به هر لوله اضافه گردید. RNA در دمای ۴۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. جهت بررسی کیفیت آر ان ای استخراج شده، از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شد.

ساخت cDNA

دی ان ای مکمل (cDNA) با استفاده از کیت Revert AidFirst Strand cDNA synthesis™ Kit(Fermentas, MBI, Lithuania) از آر ان ای کل استخراج شده با دستورالعمل سازنده ساخته شد. نمونه ها تا زمان استفاده در ۲۰- نگهداری شدند. کیفیت cDNA پس از انجام واکنش PCR با آغازگر osUBC در ژل آگاروز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون Real-time PCR

واکنش Quantitative Real-time PCR با استفاده از معرف SYBR Green (Qiagen Co, USA) و با آغازگرهای دو ژن *Thionin* و *PDF1.2* (جدول ۱) انجام شد. واکنش ها در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Green، یک میکرولیتر از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۵ پیکومول، شش میکرولیتر آب و دو میکرولیتر از نمونه cDNA با ترموسایکلر CFX96 Real-time system (Bio Rad, co.) صورت گرفت.



شکل ۱: بیان ژن *Thionin* در ارقام خزر و طارم برنج در پاسخ به قارچ *M. oryzae* اختلاف بین میانگین ها بر اساس آزمون T-test انجام شد و اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد با ⁕ مشخص شده است.

Fig. 1. *Thionin* gene expression in Khazar and Tarom cultivars of rice in response to the *M. oryzae*. The T-test analysis shows significant differences between the means at 5% level (⁕).

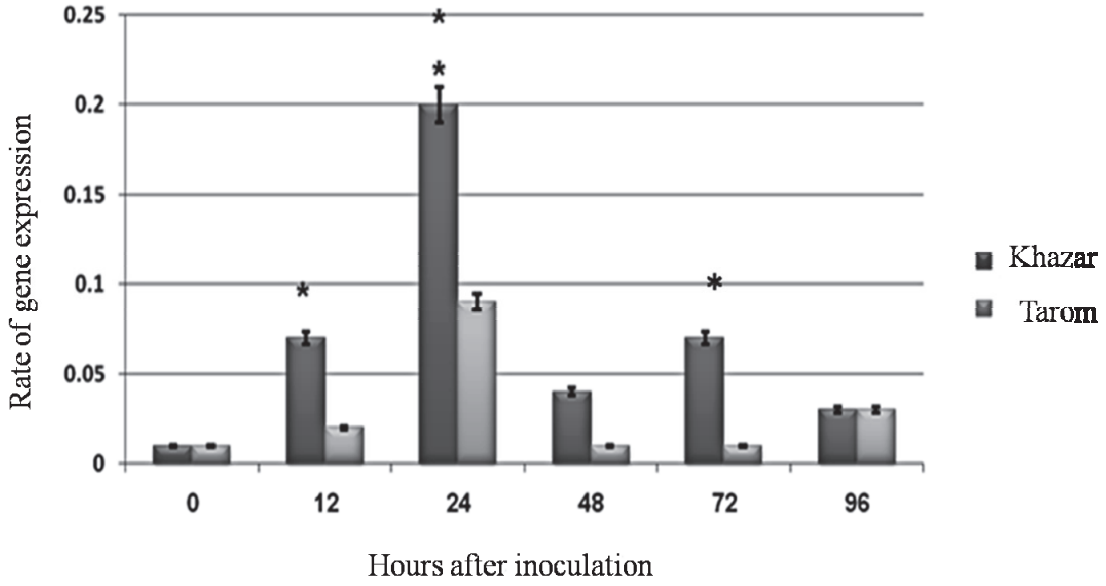
واکنش های زنجیره ای پلی مراز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۵ دقیقه ای در دمای ۹۴ °C، سپس ۲۵ تا ۳۵ چرخه (۳۰ ثانیه در ۹۴ °C، ۳۰ ثانیه در ۶۰ °C و یک دقیقه در ۷۲ °C) و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ °C انجام شد. هر نمونه در دو تکرارآزمایش شد . تجزیه داده ها بر اساس داده های چرخه آستانه (Threshold cycle; Ct) حاصل از دستگاه و به روش Delta-Delta CT (Hao *et al.* 2009) انجام شد. جهت نرمال سازی داده ها نیز از ژن خانه دار ubiquitin استفاده شد. مقایسه میانگین بیان ژن ها به روش T-test در سطح احتمال پنج درصد بین دو رقم در هر زمان انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج ارزیابی بیماری نشان داد طی۷ -۵ روز بعد از تلقیح سوسپانسیون قارچ روی گیاهچه های برنج، علائم بیماری ظاهر شد به نحوی که لکه های بیماری در خزر کمتر و کوچکتر از رقم طارم بودند.

بیان ژن *Thionin* پس از آلودگی با *M. oryzae* در ارقام خزر و طارم

نتایج نشان داد که بیان ژن *Thionin* از ۲۴ ساعت پس از تلقیح قارچ در رقم خزر افزایش یافت و در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی به حداکثر بیان (حدود ۸ برابر نسبت به ساعت صفر) رسید، سپس میزان بیان آن کاهش یافت (شکل ۱). میزان بیان این ژن در رقم طارم نیز از ۲۴ ساعت پس از آلودگی افزایش یافت و در ساعت ۴۸ به بیشترین سطح رسید (حدود ۴ برابر نسبت به ساعت صفر). آزمون مقایسه T-test اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد بین رقم طارم و خزر در ساعت ۴۸ نشان داد. بیشتر بودن سطح بیان ژن *Thionin* در رقم خزر



شکل ۲: بیان ژن *PDF1.2* در ارقام خزر و طارم برنج در پاسخ به قارچ *M. oryzae* اختلاف بین میانگین ها با آزمون T-test انجام شد. اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ با * و در سطح ۱٪ با ** مشخص شده است.

Fig. 2. *PDF1.2* gene expression in Khazar and Tarom cultivars of rice in response to the *M. oryzae*. The T-test analysis shows significant differences between the means at 5% level. * and ** indicate significance at 5% and 1% level, respectively.

ممکن است با مقاومت این رقم به بلاست مرتبط باشد.

بیان ژن *PDF1.2* پس از آلودگی با *M. oryzae* در ارقام خزر و طارم

بیان ژن *PDF1.2* در رقم خزر پس از آلودگی با قارچ به تدریج افزایش یافته و در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی به حداکثر میزان رسید (حدود ۲۰ برابر نسبت به ساعت صفر). به تدریج میزان بیان ژن *PDF1.2* کاهش و-مجددا در ساعت ۷۲ بعد از آلودگی افزایش یافت. بیان این ژن در رقم حساس نیز پس از آلودگی با قارچ افزایش یافت و در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بالاترین سطح رسید (حدود ۷ برابر نسبت به ساعت صفر) (شکل ۲) .در ساعت های ۱۲، ۲۴ و ۷۲ بین رقم خزر و طارم اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد وجود دارد. سطح بالای بیان ژن *PDF1.2* در رقم خزر نشان می دهد احتمالا این ژن می تواند در مقاومت خزر به بلاست دخیل باشد.

قارچ *M. oryzae* یک بیمارگر همی بیوتروف است که در ابتدا به صورت بیمارگر بیوتروف عمل می کند و بدون آسیب به سلول در گیاه مستقرمی شود. این قارچ پس از استقرار فاز نکروتروفی را آغاز می کند. کنیدیوم های *M. oryzae* پس از چسبیدن به سطح برگ جوانه زده و طی ۴- ۸ ساعت ملانیزه شدن اپرسوریوم آغاز می شود. در حدود ۳۱ ساعت پس از تلقیح میخ رخنه و ریسه آلودگی تشکیل می شود و تا ۴۸ ساعت ریسه قارچ در اطراف سلولهای اپیدرمی گسترش می یابد (Talbot 2004). تیونین ها و دفنسین ها گروه مهمی از پلی پپتیدهای ضد میکروبی هستند که در اثر تحریک بیمارگر در گیاه تولید

می شوند (Bohlmann *et al.* 1998; Kawata *et al.* 2003). فعالیت ضد قارچی این پلی پپتیدها در محیط کشت علیه بسیاری از قارچ ها ثابت شده است و در جریان مقاومت گیاه این ژن ها بیان می شوند. دفنسین ها با تغییر در نفوذ پذیری غشای بیمارگر منجر به توقف رشد آن

می شود و تیونین به غشای سلولی بیمارگر را مورد هدف قرار می دهد و با تغییر در عملکرد غشا، موجب نشت قند ها، یون های پتاسیم و فسفرو همچنین نوکلئوتیدها و پروتئین ها می شود. (Molina *et al.* 1993; Bohlmann *et al.* 1998; Portieles *et al.* 2006). بولمن و همکاران (Bohlman *et al*. 1998) نشان دادند که بیان ژن تیونین در برگ های جو پس از آلودگی با قارچ افزایش یافت. لی (Lee 2008) با بررسی بیان ژن *PDF1.2* و تیونین در ارقام حساس و مقاوم آرابیدوپسیس به قارچ *M. oryzae* نشان داد که سطح بیان این ژن ها در تعاملات ناسازگار بیشتر بوده است. در این بررسی افزایش سطح بیان ژن *Thionin* و *PDF1.2* پس از آلودگی با قارچ نیز نتایج بررسی های فوق را تایید می کند. با توجه به فعالیت ضد قارچی تیونین، و بیشترین سطح بیان ژن تیونین در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی به نظر می رسد که این ژن همزمان با ورود قارچ به مرحله نکروتروفی فعال شود تا از گسترش قارچ جلوگیری کند. همچنین بالا بودن بیان ژن *PDF1.2* در ساعت ۲۴ شان می دهد که گیاه با تولید این پلی پپتید ها تلاش می کند تا از رشد ریسه قارچ و توسعه آن جلوگیری کند و افزایش مجدد این ژن در ساعت ۷۲ آلودگی ریسه های ثانویه را نشان می دهد. این ژن ها در رقم حساس طارم نیز بیان می شوند ولی سطح بیان آن ها کمتر است که با نتایج لی و همکاران(۲۰۰۸) مطابقت دارد. سطح بالای هر دو ژن *PDF1.2* و *Thionin* در رقم خزر نسبت به رقم طارم نشان می دهد که ممکن است این دو ژن در مقاومت رقم خزر به *M. oryzae* دخیل باشند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (۱۴۸-۱۴۹) متن انگلیسی مراجعه شود.