مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۱، شماره ۲، سال ۱۳۹۴

تاثیر ماده محرک BTH بر بیان ژن *PR2* و شدت بیماری آتشک در درخت به

Effect of the BTH Chemical Elicitor on Expression of the *PR2* Gene and Fire blight Disease Severity in Quince

نسیم سرهنگی[۱]، علی محمد شکیب[۲]، منصوره کشاورزی[۳]، محمدعلی ابراهیمی[۴] و مانا احمد راجی[۵]

۱ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران
۲ و ۵- به ترتیب دانشیار و کارشناس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
۳- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۸

چکیده

سرهنگی، ن.، شکیب، ع. م.، کشاورزی، م.، ابراهیمی، م. ع. و احمدراجی، م. ۱۳۹۴. تاثیر ماده محرک BTH بر بیان ژن *PR2* و شدت بیماری آتشک در درخت به. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۱:** ۲۶۴ - ۲۴۹.

استفاده از مواد محرک جهت القا ژن‌های دفاعی گیاه یکی از روش‌های مبارزه با بیماری‌ها است. این تحقیق با هدف بررسی اثر ماده محرک BTH بر بیان ژن *PR2* و شدت بیماری آتشک در گیاه به و در شرایط باغی انجام شد. درختچه‌های دو ساله به ارقام اصفهان و ترش در اردیبهشت ماه با محلول BTH با غلظت‌های ۳۰۰ و۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر دوبار به فاصله چهار روز محلول‌پاشی شدند، سپس با سوسپانسیون سلولی باکتری عامل بیماری آتشک آلوده شده و چهار هفته بعد شدت بیماری اندازه‌گیری شد. از برگ درختان تیمار شده با BTH ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و شاهد (اسپری شده با آب مقطر) نمونه‌برداری انجام شد. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، بخشی از ژن *PR2* با استفاده از آغازگرهای عمومی تکثیر و توالی آن تعیین شد. مقایسه توالی آن با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های DNA نشان داد که تشابه بالایی با ژن‌های شناخته شده گلوکاناز در گیاهان دیگر و از جمله سیب دارد. با طراحی آغازگرهای اختصاصی بر پایه توالی این ژن میزان تغییرات بیان آن از طریق واکنش real- time PCR ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بیان ژن *PR2* پس از تیمار گیاه با BTH چندین برابر افزایش یافت. بررسی شدت آتشک نیز مبین ۲۱/۶۶٪ و ۱۳/۷۶٪ کاهش شدت آتشک به ترتیب در تیمارهای ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر BTH بود. این نتایج نشان می‌دهد کاهش شدت بیماری آتشک پس از ماده محرک BTH می‌تواند با القا بیان ژن‌های رمز کننده PR پروتئین‌ها و از جمله *PR2* مرتبط باشد و از این ماده می‌توان در برنامه مبارزه تلفیقی با بیماری آتشک استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: به، آتشک، PR پروتئین‌ها، بیان ژن، real- time PCR.

نویسنده مسئول: a_shakib@abrii.ac.ir تلفـــن: ۰۲۶۳۲۷۰۳۵۳۶

مقدمه

بیماری آتشک (Fire blight) با عامل *Erwinia amylovora* (Burril) Wislow از مهم‌ترین بیماری های درختان میوه دانه‌دار در سراسر جهان از جمله ایران است. میزبان‌های عمده بیماری آتشک جنس‌های به (Cydonia)، گلابی (Pyrus)، سیب (Malus)، ازگیل (Mespilus)، زالزالک (Crataegus)، پیراکانتا (Pyracanta) و شیر خشت (Cotoneaster) و به، گلابی و سیب از حساس‌ترین میزبان‌ها هستند (van der Zwet and Keil, 1979). این بیماری در تعدادی از کشورها گزارش شده است (van der Zwet and Bonn, 1991) و در ایران، برای اولین بار در بهار ۱۳۶۸ از کرج گزارش شد (Zakeri and Sharifnabi, 1991). در حال حاضر آتشک در حال پیشروی است و خسارات هنگفتی به باغ‌های مناطق مختلف مانند آذربایجان شرقی، قزوین، زنجان، خراسان، گیلان، فارس و تهران تحمیل کرده است (Zakeri and Sharifnabi, 1991؛ Sahadpour and Ghasemi, 2004؛ Zohour, and Rahmani, 2004؛ Hassanzadeh, 1995).

روش‌های مبارزه متعددی برای مهار آتشک اعمال شده است ولی هیچ‌کدام به عنوان روش مبارزه قطعی مؤثر واقع نشده است (van der Zwet and Keil, 1979). انتخاب ارقام متحمل می‌تواند گزینه موثری باشد. در بررسی واکنش تعدادی از ژنوتیپ‌های به کشور به بیماری آتشک تنوع در تحمل آن‌ها مشاهده شد و رقم اصفهان در گروه حساس طبقه‌بندی شد (Mehrabipour *et al.*, 2010). یکی از روش‌های مبارزه فعال‌سازی سریع و موثر واکنش‌های دفاعی گیاه با کاربرد مواد محرک است که سبب القای ژن‌های رمز کننده PR پروتئین‌ها می‌شوند (Schaller *et al.*, 2000). ترکیبات آلی و غیر آلی مختلفی می‌توانند واکنش مقاومت سرتاسری در برابر بیماری ایجاد کنند از جمله ترکیب thiadiazole-7-carbothioic acid-*S*-methyl ester (acibenzolar-*S*-methyl, ASM or BTH) تحت عنوان Bion® یا Actigard™ توسط شرکت Syngenta تولید می‌شود و نقش آن به عنوان یک فعال‌کننده دفاع در تعدادی از گونه‌های گیاهی مانند آرابیدوپسیس (Lawton *et al.*, 1996)، توتون (Friedrich *et al.*, 1996)، گندم (Gorlach *et al.*, 1996)، لوبیا (Siegrist *et al.*, 1997)، ذرت (Morris *et al.*, 1998) و خیار (Narusuka *et al.*, 1999) نشان داده شده است. این ترکیب همچنین در درختان میوه مانند گلابی ژاپنی در برابر زنگ و لکه سیاه (Ishii *et al.*, 1999)، سیب در برابر آتشک (Brisset *et al.*, 2000؛ Maxon-Stein *et al.*, 2002؛ Bayasal and Zeller, 2004) تجربه شده

است. این تحقیق با هدف بررسی تاثیر ماده شیمیایی BTH بر شدت بیماری آتشک و بیان ژن *PR2* در گیاه به در شرایط مزرعه انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی اثر ماده محرک BTH بر بیان ژن *PR2* و شدت بیماری آتشک در به، نهال‌های دو ساله ارقام اصفهان و ترش کاشته شده در باغ تحقیقاتی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر در کرج مورد استفاده قرار گرفتند. نهال‌ها در زمان رشد سریع رویشی در اردیبهشت ماه با ماده محرک BTH با غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در لیتر دوبار به فاصله چهار روز محلول‌پاشی شدند. چهار روز پس از محلول‌پاشی دوم، آلوده‌سازی به صورت تزریق باکتری عامل به نوک شاخه‌های جوان با طول تقریبی ۳۰-۲۰ سانتی‌متر به وسیله سرنگ انسولین انجام شد. سویه‌های باکتری قبلاً از نمونه‌های برگ و میوه سیب و به آلوده از استان‌های البرز (سویه Ek از کرج)، خراسان (سویه En از نیشابور)، کردستان (سویه E4 از سنندج) و آذربایجان غربی (سویه EO1 از ارومیه) جداسازی و شناسایی شده بودند (Maleki Balajoo *et al.*, 2012). از کشت سه روزه سویه‌ها در محیط آگار مغذی نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. غلظت سوسپانسیون هر سویه توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۰ نانومتر روی ۰/۲ (معادل 10^8 سلول بر میلی‌لیتر) تنظیم شد (Baysal and Zeller, 2004) و حجم مساوی از آن‌ها با هم مخلوط و به عنوان مایه تلقیح به کار برده شد. چهار هفته پس از تزریق، شدت آلودگی به بیماری بر اساس نسبت طول بافت مرده به طول شاخه مایه‌زنی شده (×۱۰۰)، با احتساب کلیه شاخه‌های مایه‌زنی شده، اندازه‌گیری شد (Le Lezec and Paulin, 1984). در تیمار شاهد، آب مقطر استریل به جای محلول BTH به کار برده شد.

برای جداسازی قطعه ژنی *PR2*، نمونه برگ درختان پنج روز پس از تیمارهای ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر BTH (قبل از مایه‌زنی باکتری) از گیاهان تیمار شده و شاهد برداشت شد. RNA کل با استفاده از کیت استخراج RNeasy plant Mini kit از شرکت BioRad با افزودن دو ماده شیمیایی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) ۴ درصد و دیتیوتریتول (DTT) استخراج و برای ساخت cDNA از کیت شرکت BioRad استفاده شد. قطعه ژنی مشابه *PR2*، با یک جفت آغازگر عمومی (F 5-'TAYATAGCIGTIGGIAAYGA-3' و R 5'-AACATIGCRAAIAGRTAIGT-3') بر اساس توالی‌های حفاظت شده گیاهان مختلف (Maxon-Stein *et al.*, 2002) توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر تکثیر شد. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس در هر چرخه

دمـای ۹۴ درجـه بـه مـدت ۳۰ ثانیـه، اتـصال آغازگرهـا بـه رشـته الگـو در دمـای ۴۹ درجـه سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۱ دقیقـه، دمـای بـسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مـدت ۱ دقیقـه و مرحلـه بسط نهایی در دمـای ۷۲ درجـه سـانتی‌گـراد بـه مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول واکنش زنجیـره‌ای پلیمـراز روی ژل آگـارز ۱ درصـد بـرده شـد و توسط کیـت تخلـیص فرمنتـاز (Fermentas) از روی ژل خـــالص شـــد و در ناقـــل پلاســـمیدی pTZ57R/T الحاق و بـا روش شـوک حرارتـی به باکتری *E. coli* سویه XL1Blue منتقـل شـد. برای تشکیل کلنی ۲۰ میکرولیتر مخلـوط انتقـال روی محـــیط کـــشت LB Agar حـــاوی ۱۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت شـد. پلاسمید نوترکیب با کشت یک کلنی اسـتخراج شد و حضور قطعه ژن درون پلاسمید با واکـنش زنجیره‌ای پلیمراز تاییـد و پـس از تـوالی‌یـابی بـا نرم‌افزار های موجود با سایر تـوالی‌هـای موجـود در پایگاه اطلاعات DNA مقایسه شد.

بـــرای بررســـی تغییـــرات بیـــان ژن *PR2*، آغازگرهـای اختـصاصی ایـن ژن (بـر اسـاس تـــوالی آن) و ژن *Act* بـــه (بـــا شـــماره دسترسـی KF981879) بـه عنـوان ژن خانـه‌دار (House keeping) بـا اسـتفاده از نـرم‌افـزار Primer 3 طراحـی و سـفارش شـد (جـدول ۱). تعیین غلظـت مناسـب آغازگرهـا و بهینـه‌سـازی برنامه واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز جهـت انجـام real-time-PCR و همچنـــین رســـم منحنـــی اسـتاندارد بـا سـری رقتـی cDNA بـا آغازگرهـا جهت تعیین غلظت مناسـب cDNA انجـام شـد. میـزان بیـان بـا اسـتفاده از مقـادیر حـدود آسـتانه حاصل از تکثیر ژن *PR2* روی نمونه‌هـای شـاهد و تیمار شده با دو تکرار زیستی به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با نرم افزار مربوط به شرکت Bio-Rad محاسـبه و به صورت نسبت بیان ژن بین گیاه تیمار شده و شاهد ارائه شد. مقادیر به دست آمده، با اسـتفاده از نرم‌افزار Excell مورد تجزیه و تحلیل آمـاری قرار گرفتند و نمودارهای مربوطه رسم شدند.

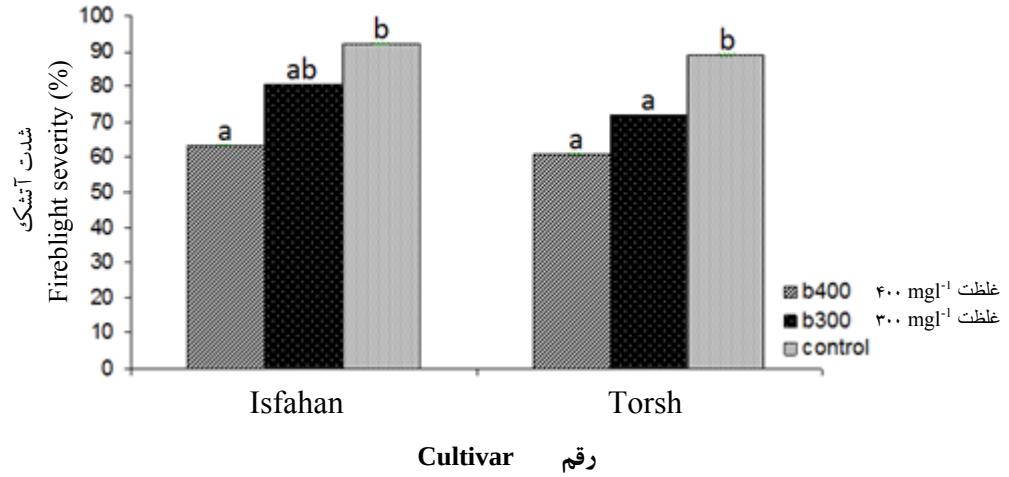
نتایج و بحث

بررسی شدت بیماری آتشک چهار هفته پس از آلـوده‌سـازی درختچـه‌هـای بـه نـشان داد کـه سطوح حساسیت دو رقم به اصـفهان و تـرش بـه این بیماری اختلاف معنی‌داری نداشتند (میانگین شـدت آتـشک بـه ترتیـب ۷۹/۷۴۸ درصـد و ۷۳/۱۸۲ درصـد بـود). امـا شـدت آتـشک در تیمارهـــای ۳۰۰ میلـــی‌گـــرم در لیتـــر BTH و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر BTH کم‌تر ($P\leq0.05$) از شاهد (آب مقطر) بود که دلالت بـر تـاثیر BTH در کاهش شدت بیماری داشت. میانگین مقـادیر شـــدت بیمـــاری در دو رقـــم در تیمارهـــای ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر BTH، ۳۰۰ میلـی‌گـرم در لیتـر BTH و آب مقطـر بـه ترتیـب ۷۰/۲۱۵، ۷۷/۲۹۵ و ۸۹/۶۳۱ درصد رویت شـد کـه مبـین ۲۱/۶۶٪ و ۱۳/۷۶٪ کـاهش شـدت آتـشک بـه ترتیـب در تیمارهـای ۴۰۰ میلـی‌گـرم در لیتـر و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر BTH بود. این تفـاوت بـه تفکیک رقم نیز معنـی‌دار بـود (شـکل ۱). نتـایج

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن *PR2* در درخت به پس از تیمار با ماده BTH

Table 1. Specifications of primers used for studying expression of the *PR2* gene in quince after treatment with BTH

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگرها Primer sequences
PR2 F	5′-TGGGAGAATTTTTGGGTGTC-3′
PR2 R	5′-CAACTGACGGAGCTGTGAAA-3′
Act F	5′-TGAGACATTCAACGCTCCTG-3′
Act R	5′-GAAGGAATAGCCACGCTCAG-3′



شکل ۱- مقایسه میانگین شدت آتشک در دو رقم به اصفهان و ترش پس از تیمار با غلظت‌های مختلف ماده محرک BTH

Fig. 1. Mean comparison of fire blight severity in two quince cultivars Isfahan and Torsh after treatment with different concentrations of BTH elicitor

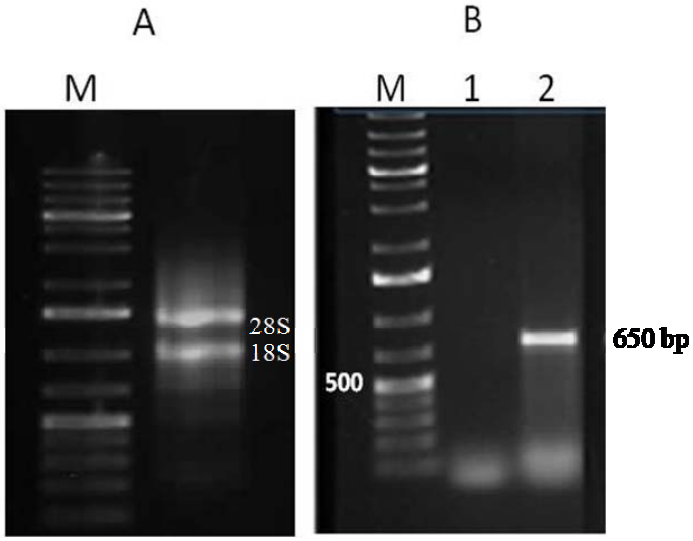
تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از ماده BTH روی درختان به ارقام اصفهان و ترش در شرایط باغی شدت بیماری آتشک را کاهش داد و دو رقم واکنش یکسانی به این ماده نشان دادند. کاربرد این ماده روی رقم اصفهان در شرایط گلخانه‌ای نیز شدت بیماری را کاهش داد (Maleki Balajoo *et al.*, 2012). در سیب و تا حدودی در گلابی گزارش‌های متعددی در مورد تاثیر BTH بر آتشک منتشر شده است (Thomson *et al*, 1998a؛ Tsiantos *et al.*, 2003؛ Buban *et al.*, 2002؛ Brisset *et al.*, 2000).

استفاده از این ماده به خصوص در کنترل آتشک سیب رقم گلدن دلیشز که رقم اصلی سیب کشور است، موثر گزارش شده است (Shahini *et al.*, 2010). این نتیجه با توجه به

عدم ثبت محلول‌پاشی استرپتومایسین برای کنترل آتشک در کشور حائز اهمیت است. در بسیاری از کشورها از استرپتومایسین برای کنترل آتشک استفاده می‌شود. بیست درصد باغات سیب و چهل درصد باغات گلابی در ایالات متحده با استرپتومایسین محافظت می‌شوند. اما در کشورهای اروپایی به جز آلمان، یونان و هلند، محلول پاشی استرپتومایسین مجاز نیست و جایگزینی آن با یک ماده بی‌خطر و موثر بسیار اهمیت دارد. یکی از روش‌های توصیه شده برای کنترل آتشک در اروپا کاربرد BTH (به جای استرپتومایسین) است (Deckers and Schoofs, 2003).

تاثیر ماده BTH بر بیان ژن *PR2*

پس از استخراج RNA از نمونه‌های گیاه به و مناسب بودن کیفیت آن با کامل بودن دو باند 28S RNA و 18S RNA از روی آن cDNA ساخته شد. با استفاده از cDNA و آغازگرهای عمومی یک قطعه حدود ۶۵۰ جفت باز از ژن *PR2* تکثیر (شکل ۲) و پس از همسانه‌سازی توالی یابی شد. نتایج توالی‌یابی قطعه کلون شده در جستجو با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های DNA نشان داد که قطعه تکثیر شده تشابه بالایی در سطح اسید نوکلئیک با ژن‌های خانواده *PR2* سایر گیاهان از جمله سیب دارد (شکل ۳). این توالی با شماره بازیابی KF981878 در بانک اطلاعات DNA ثبت شد. پروتئین حاصل از این کلون ژنی در به (beta-1,3-glucanase) بالاترین یکسانی (۸۹ درصد) را با توالی نظیر در *Malus hupehensis* (اکسشن gb|ADR71671.1) و *Malus domestica* (اکسشن emb|CAM82809.1) نشان داد. با توجه به نتایج توالی یابی و تعیین آغازگرهای اختصاصی مناسب برای انجام realtime-PCR برای ژن *PR2* واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد و تک باندهایی به طول ۱۶۵ جفت باز برای ژن *PR2* و ۲۲۹ جفت باز برای ژن اکتین حاصل شد (شکل ۴) که بر تکثیر کارآمد ژن‌های هدف و بهینه بودن شرایط واکنش دلالت داشت. پس از تعیین غلظت مناسب آغازگرها و بهینه‌سازی برنامه PCR میزان بیان ژن *PR2* با استفاده از آغازگرهای این ژن و ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی مورد سنجش قرار گرفت. تفاوت در آستانه تکثیر نمونه‌های تیمار شده با شاهد تفاوت در میزان بیان ژن بیان ژن *PR2* را نشان داد (شکل ۵). از آن جائی که رنگ Syber Green ممکن است تکثیرهای غیر اختصاصی و نیز پرایمر دایمر را نیز شناسایی کرده و گزارش کند (Morrison *et al.*, 1998) وجود نمودار ذوب منفرد دلالت بر محصولات خالص و اختصاصی دارد (شکل ۶). آنالیز داده‌ها افزایش حدود ۱۰ برابری بیان ژن *PR2* در گیاهان تیمار شده با BTH را نسبت به شاهد نشان داد که می‌تواند مبین تاثیر این ماده در افزایش بیان ژن *PR2* در درختان به باشد.



شکل ۲- الکتروفورز نمونه RNA استخراج شده (A) و تکثیر ژن *PR2* (B) از درخت به رقم اصفهان
M: نشانگر؛ ۱: کنترل منفی (آب)؛ ۲: محصول PCR تکثیر ژن *PR2* پس از همسانه سازی روی ناقل پلاسمید

Fig. 2. Electroforesis of extracted RNA sample (A) and amplification of the *PR2* gene (B) from quince cv. Isfahan. M: marker; 1: negative control (water); 2: PCR product of the *PR2* gene after cloning on a plasmid vector

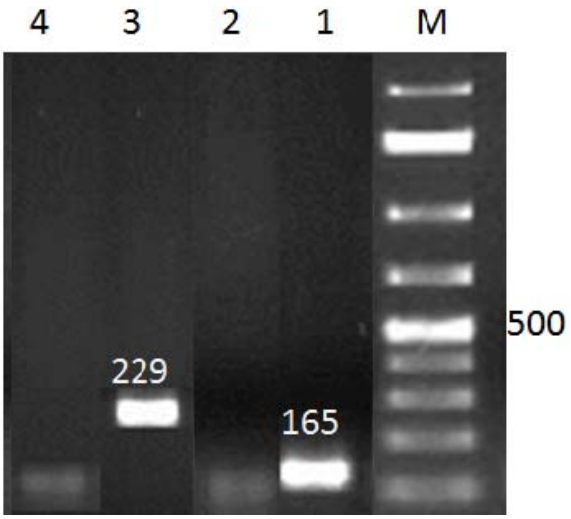
گیاهان به طور دائم در معرض انواع بیمارگرها قرار دارند که رشد و محصول آن‌ها را کاهش می‌دهند و از طریق چندین مسیر دفاعی خواه بصورت دائمی و یا القائی در برابر این عوامل بیماریزا مقاومت می‌کنند (Mang *et al.*, 2009). مسیر سیگنالی اسید سالیسیلیک، سیگنال اولیه در برابر بیمارگرهای بیوتروفیک است، در حالی که اسید جاسمونیک، اتیلن و اسید اولئیک سیگنال‌های اولیه هستند که در برابر آلودگی‌های نکروتروفیک فعال می‌شوند (Ferrari *et al.*, 2003؛ Diaz *et al.*, 2002؛ Zhu, 2014). واکنش فوق حساسیت اغلب با فعال شدن مکانیزم‌های دفاعی وابسته به اسید سالیسیلیک مرتبط است و به مقاومت اکتسابی سرتاسری منجر می‌شود که از ویژگی آن افزایش در تولید اسید سالیسیلیک داخلی، افزایش نسخه‌برداری ژن‌های *PR* مانند *PR1*، *PR2*، *PR5* و گلوتاتیون-اس-ترانسفراز و حفاظت در برابر بیمارگرهای بیوتروفیک است (Dewdney *et al.*, 2000). اسید سالیسیلیک نقش کلیدی در بسیاری فعالیت‌های گیاهی دارد (Vicente *et al.*, 2011) و در سطح وسیعی از گونه‌های گیاهی بیان می‌شود اما میزان سطح پایه آن در گونه‌های مختلف گیاهی تا چند ده برابر تفاوت نشان می‌دهد (Navarre and Mayo, 2004). چگونه گیاه ساخت اسید سالیسیلیک را تنظیم می‌کند؟

```
Mal       AAGATTCAAATACATTGCCGTAGGAAACGAAATCAAGCCCTCGGACTCGTCTGCGCAATT
Cyd       ----------TATATCGCGGTGGGGAACGAAGTCAAGCCCTCTGACTCGTCTGCGCAATT
              ** ** ** ** ** ****** ********** ****************

Mal       TCTGGTCCCGGCCATGCGGAACATTCAAAATGCGATTTCCAGTGCCGGTCTTGGAAACCA
Cyd       TCTGGTCTCGGCCATGCGGAACATTCAAAATGCGATTTCCAGTGCCGGTCTTGGAAACCA
          ******* **************************************************

Mal       AATCAAAGTTTCCACCGCCATAGACACCGGTGTGCTTGGAAATTCCTTTCCTCCATCAAA
Cyd       AATCAAAGTTTCCACCGCCATAGACACCAGTGTGCTTGGAAATTCCTATTTTCCATCAAT
          ************************** ***************** * ********

Mal       AGGAGAATTTAGGGGTGACTATAGCCCAATTTTGAATCCTGTTGTCCGGTTCCTGGTGGA
Cyd       GGGAGAATTTTTGGGTGTCTATAGCCCAATTTTGAATCCTGTTGTCCGGTTCCTGGTGGA
           *********  ***** ****************************************

Mal       CAACAAATCTCCGCTACTTGTTAATTTGTATCCTTATTTTAGTTATATTGGCAACACTCG
Cyd       CAACAAATCTCCCCTACTCGTTAATTTGTATACTTATTTTAGTTATATTAGCAACACTCG
          *********** ***** *********** ***************** **********

Mal       TGACATTCGTCTAGACTATGCTCTTTTCACAGCTCAGTCAGTTGTAGTACAAGATGGCGA
Cyd       TGACATGCGTCTAGATTATGCTCTTTTCACAGCTCCGTCAGTTGTAGTACAAGATGACCA
          ****** ******** ******************** ******************* * *

Mal       ACGTGGTTATCGTAATCTTTTCGATGCCATTTTGGGTGCTGTTTACGCTGCGCTTGACAA
Cyd       ACTTGGTTATCGTAATCTTTTCGATGCCATTTTGGATGCTTTTTACGCTGCGCTTGACAA
          ** ******************************** **** ******************

Mal       GGTCGGTGGAGGATCTTTGGAAATTGTTGTATCGGAGAGTGGTTGGCCGACAGCTGGTGG
Cyd       GGTCGGTGGAGGATCTTTGGAAATTGTTATATCGGAGACTGGTTGGCCGACAGCTGGTGG
          ************************** ********* *********************

Mal       GACGGCAACAACAGTTGATAATGCGAGGACTTATAACTCGAATTTGGTTCAACATGTGAA
Cyd       GACGGCAGCAACAGTGGATAATGCGAGGACTTATAACTCGAATTTGATTCAACATGTGAA
          ******* ******* ****************************** *************

Mal       GGGAGGGACTCCAAGGAAGCCTGGAAGGCCCATTGAAACTTACATCTTTGCCATGTTTGA
Cyd       GGGTGGAACTCCAAGGAAGCCTGGAAGGCCCATTGAAACCTACCTCTTCGCCATGTT---
          *** ** ********************************** *** **** ********
```

شکل ۳- هم ردیفی توالی نوکلوتیدی کلون ژنی *PR2* جداسازی شده از درخت به (Cyd) با توالی نظیر در سیب (Mal)

Fig. 3. Nucleotide sequence alignment of the *PR2* gene clone (588 bp) isolated from quince (Cyd) with its analogous gene in apple (Mal)

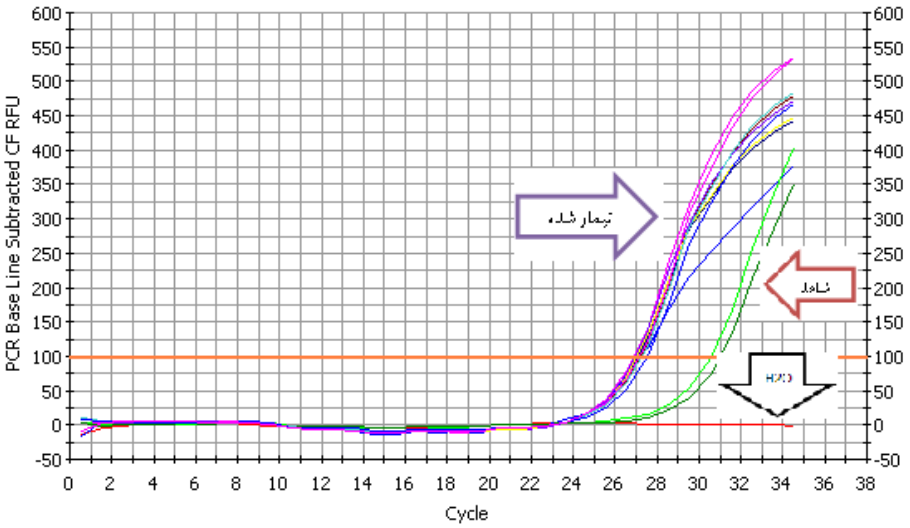
استفاده از روش‌های ژنتیک معکوس نشان داده است که بعضی از پروتئین‌ها مانند SARSD1 و CBP60g به عنوان عامل نسخه‌برداری نقش کلیدی در ساخت اسید سالیسیلیک هنگام مواجهه گیاه با عوامل بیمارگر دارند. به طوری که در گیاهان موتانت فاقد بیان این دو ژن ساخت اسید سالیسیلیک به طور کامل متوقف می‌شود (Zhang *et al.*, 2010). بیان ژن‌های *PR* در پائین دست اسید سالیسیلیک با القای مقاومت اکتسابی سرتاسری (SAR) مرتبط است (Kuc, 2001؛ Van Loon, 1997؛ Edreva, 2004, 2005). به طوری که *PR* ها در گیاهان تراریخته مقاوم، فعالیت ضد میکروبی بالایی را نشان دادند (Anand *et al.*, 2004؛ Tonon *et al.*, 2002). خانواده PR2 از خانواده پروتئین‌های مرتبط با دفاع گیاهی یا همان β(1,3)-glucanse ها در ایزوفرم‌های مختلفی در گیاهان گسترده هستند



شکل ۴- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن های *PR2* و اکتین با آغازگرهای اختصاصی

M: نشانگر وزن مولکولی؛ ۲ و۴ : کنترل منفی؛ ۱: *PR2*. ۳: *Act*.

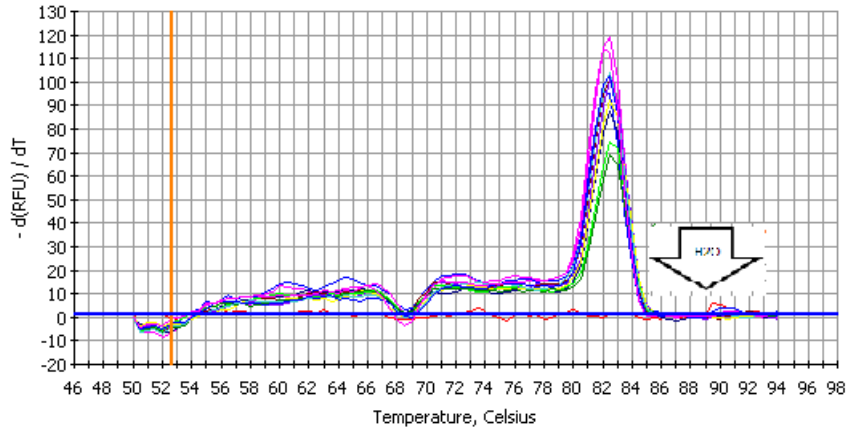
Fig. 4. Electrophoresis of PCR products of *PR2* and *actin* genes using specific primers
M: molecular weight marker; 2 and 4: negative control; 1: *PR2*, 3: *Actin*



شکل ۵- تکثیر و حدود آستانه مربوط به تکثیر ژن *PR2* در گیاه تیمار شده و شاهد

Fig. 5. Amplification and limit for the *PR2* gene amplification in treated and control plants

(Hoj *et al.*, 1995 ؛Simmonsn, 1994). پیوندهای گلوکانی در دیواه سلول گیاهی بیشترین نقش این آنزیم در دفاع علیه قارچ‌ها موجب مهار قارچ‌های مهاجم می‌شوند. به بررسی شده و نشان می‌دهد که با هیدرولیز علاوه، مواد آزاد شده از هیدرولیز گلوکان‌ها



شکل ۶- منحنی ذوب مربوط به تکثیر ژن *PR2* در گیاه تیمار شده و شاهد

Fig. 6. Melting curves for the *PR2* gene amplification in treated and control plants

خود به عنوان محرک پاسخ‌های دفاعی گیاه عمل می‌کنند (Bowels, 1990). در بیماری‌های ویروسی نیز نشان داده شده که این آنزیم‌ها در پاسخ فوق حساسیت گیاهان در برابر ویروس‌ها به شدت افزایش می‌یابند (Antoniw *et al.*, 1980). در بیماری‌های باکتریایی، اشکال واکوئولی و خارج سلولی این آنزیم در دفاع توتون علیه باکتری *Pseudomonas syringae* دخالت دارند (van Den Bulcke *et al.*, 1998). ماده محرکی در عصاره تهیه شده از انگور یافت شده است که موجب برانگیزش گلوکانازها در توتون می‌شود (Goupil *et al.*, 2012). در توتون نشان داده شد که برخی مواد مترشحه از *Pseudomonas syringae* عامل بیماری wildfire موجب مهار دفاع گیاه از جمله کاهش بیان ژن PR2 می‌شوند (Lee *et al.*, 2013). آنزیم گلوکاناز سبب تشدید فعالیت آنزیم کیتیناز نیز می‌شود (Zhang *et al.*, 2005) بررسی نقش PR2 در لاین‌های تراریخته با و بدون بیان ژن *PR2* در گیاه آرابیداپسیس تحت تاثیر قارچ *Leptosphaeria maculans* و باکتری *Pseudomonas syringae* نشان داد که بیان این ژن از ایجاد کالوز (پلیمری از بتا-۱-۳ گلوکان) در گیاه ممانعت می‌کند. ایجاد کالوز احتمالاً در مسیر انتقال سیگنال اسید سالیسیلیک تداخل کرده و مانع از ایجاد مقاومت می‌شود بنابراین PR2 ممکن است به عنوان یک تنظیم‌کننده در پاسخ به کالوز یا پاسخ دفاعی در گیاه عمل کند (Oide *et al.*, 2013).

ماده BTH که مشابه (آنالوگ) اسید سالیسیلیک است می‌تواند دفاع سرتاسری در برابر بیمارگر را بدون تجمع اسید سالیسیلیک و با فعال‌سازی مسیر پائین دست اسید سالیسیلیک تحریک کند (Yashimoto *et al.*, 2009؛ Wang *et al.*, 2006, 2007). کاربرد ماده محرک BTH در سیب نشان داد که افزایش

سطح مقاومت درختان نسبت به بیماری باکتریایی آتشک به طور ثابتی با فعال شدن آنزیم‌های پراکسیداز و گلوکاناز ارتباط دارد و تجمع آن‌ها حداقل تا ۱۷ روز پایدار بود (Brisset *et al*., 2000). در سیب میزان بیان ژن *PR2* پس از تیمار با BTH در شرایط گلخانه ۱۰۰ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت (Maxon-Stein *et al*., 2002). استفاده از بعضی مواد القا کننده که باعث افزایش بیان برخی از ژن‌های *PR* در گیاهان می‌شوند، مقاومت نسبت به عوامل بیماری‌زا را افزایش می‌دهند (Herman *et al*., 2008؛ Francis *et al*., 2009). به طور کلی می‌توان بیان کرد که استفاده از ماده محرک بیون، که می‌تواند سبب تحریک فرایند دفاع گیاهی و از جمله افزایش بیان PR پروتئین‌ها و کارکرد حفاظتی آن‌ها در برابر شرایط تنش در گیاه می شود، می‌تواند در برنامه مدیریت تلفیقی بیماری آتشک در گیاه به گنجانیده شود.

References

Anand, A., Lei, Z. T., Summer, L. W., Mysore, K. S., Arakane, Y., Backus, W. W., and Muthukrishnan, S. 2004. Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. Molecular Plant-Microbe Interaction 17: 1306-1317.

Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S., and van Loon, L. C. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. Journal of General Virology 47: 79-87.

Baysal, O., and Zeller, W. 2004. Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstook M26 similar to acibenzolar-S-methyl against fireblight (*Erwinia amylovora*). Physiological and Molecular Plant Pathology 65: 305-315.

Bowles, J. D. 1990. Defense-related proteins in higher plants. Annual Review of Biochemistry 59: 873-907.

Brisset, M. N., Cesbron, S., Thomson, S. V., and Paulin, J. P. 2000. Acibenzolar-Smethyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. European Journal of Plant Pathology 106: 529-536.

Buban, T., Sallai, P., Hertelendy, L., and Obzsut-Truskovszky, E. 2002. Trials with applying chemical agents other than bactericides to control fireblight in pear orchards. Acta Horticulturae 590: 263-267

Deckers, T., and Schoofs, H. 2003. Control strategies of bacterial diseases in European pear growing. Acta Horticulturae 587: 639-645.

Dewdney, J., Reuber, T, Wildermuth, M., Devoto, A., Cui, j., Stutius, L., Drummond, E., and Ausubel, F. 2000. Three unique mutants of Arabidopsis identify *eds* loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. The Plant Journal 24: 205-218.

Diaz, J., 'en Have, A., and van Kan, J., 2002. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to Botrytis cinerea. Plant Physiology 129: 1341-1351.

Edreva, A. 2004. A novel strategy for plant protection: induced resistance. Molecular and Cellular Biology 3: 61-69.

Edreva, A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. Genetics and Applied Plant Physiology 31: 105-124.

Ferrari, S., Plotnikora, J. M., De Lorenzo, G., and Ausubel, F. M. 2003. Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves EDS4, and PAD2 but not SID2, EDS5 and PAD4. Plant Journal 35: 193-205.

Francis, M. I., Redondo, A., Burns, J. K., and Graham, J. H. 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.

Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Manser, P., Specker, N., Gut, M., Meier, B., and Ryals, J. 1996. A benzothiadiazole derivetives induces systemic acquired resistance in tobacco. Plant Journal 10: 61-70.

Gorlach, J., Volrath, S., Knauf, G., Hengy, G., and Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. The Plant Cell 8: 629-643.

Goupil, P., Benouaret, R., Charrier, O., Halle, A., Richard, C., Eyheraguibel, B., Thiery, D., and Ledoigt, G. 2012. Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. Ecotoxicology 21: 1541-1549.

Hassanzadeh, N. 1995. Fireblight of Pear, Apple and Quince Trees. Agricultural Research, Education and Extension Organization Publication, Technical Issue No. 1: 18pp. (in Persian).

Herman, M. A. B., Davidson, J. K., and Smart, C. D. 2008. Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse- grown tomatoes. Phytopathology 98: 1226-1232.

Høj, P. B., and Fincher, G. B. 1995. Molecular evolution of plant ß-glucan endohydrolases 1995. Plant Journal 7: 367-379.

Ishii, H., Tomita, Y., Horio, T., Narusaka, Y., Nakazawa, Y., and Ivamoto, S. 1999. Induced resistance of acibenzolar-S-methyl to cucumber and Japanese pear diseases. European Journal of Plant Pathology 105: 77-85.

Kuc, J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European Journal of Plant Pathology 107: 7-12.

Lawton, K., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Kessmann, H., and Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic aquietrd resistance signal transduction pathway. Plant Journal 10: 71-82.

Lee, S., Yang, D. S., Rao, S., Summer, L. W., and Mysore, K. S. 2013. Suppression of plant defense responses by extracellular metabolites from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in *Nicotiana benthamiana*. BMC Plant Biology doi:10.1186/1471-2229-13-65.

Le Lezec, M., and Paulin, J. P. 1984. Shoot susceptibility to fire blight of some apple cultivars. Acta Horticulturae 151: 277-287.

Maleki Balajoo, O., Kesahavarzi, M., Zahabi, A., Danesh, Y. R., and Haghjuyan, R. 2012. Protective effect of acibenzolr-s-methyl on fireblight severity in quince and characterization of the *Erwinia amylovora* strains involved. Journal of Plant Pathology 94: 211-214.

Mang, H. G., Laluk, K. A., Parsons, E., Kosma, D., Cooper, B., Park, H., AbuGamar, S., Boccongelli, C., Myiazaki, S., Concigelio, S., Chilosi, G., Bohnert, H., Bressan., R., Mengiste, G., and Janks, M. 2009. The Arabidopsis RESURRECTION1 gene regulates a novel antagonistic interaction in plan defense to biotrophs and necrotrophs. Plant Physiology 151: 290-305.

Maxon-Stein, K., He, S., Hammerschmidt, R., and Jones, A. 2002. Effect of treating apple trees with acibenzolar-S- methyl on fireblight and expression of pathogenesis related protein genes. Plant Disease 86: 785-790.

Mehrabipour, S., Abdollahi, H., and Ghasemi, A. 2010. Response of some quince (*Cydonia oblanga* Mill.) genotypes from Guilan and Khorasan provinces to fireblight disease. Seed and Plant Improvement Journal 28-1: 67-84 (in Persian).

Morris, S. W., Vernooij, B, Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C. C., Frederiksen, R. A., Bhandhufalck, A., and Uknes, S. 1998. Induced resistance responses in maize. Molecular Plant-Microbe Interaction 11: 643-658.

Morrison, T. B., Weis, J. J., and Wittwer, C. T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous Syber Green I monitoring during amplification. Bio Techniques 24: 954-962.

Narusuka, Y., Narusuka, M., Horio, T., and Ishii, H. 1999. Comparison of local and systemic induction of acquired disease resistance in cucumber plants treated with benzothiadiazoles or salicylic acid. Plant Cell Physiology 40: 388-395.

Navarre, D. A., and Mayo, D. 2004. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. Physiological and Molecular Plant Pathology 64: 179-188.

Oide, S., Bejai, S., Staal, J., Guan, N., Kaliff, M., and Dixelius, C. 2013. A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. New Phytologist 200: 1187-1199.

Sahadpour, A., and Ghasemi, A. 2004. Outbreak of fire blight of pome fruits in Fars province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran. Page 423 (in Persian).

Schaller, A. P., Roy, N., and Amrhein, H. 2000. Salicylic acid- independent induction of pathogenesis- related gene expression by fusicoccin. Planta 210: 599-606.

Shahini, S., Keshavarzi, M., Hasanzadeh, N., Hashemi, M., Abdollahi, H., and Tavoosi, M. 2010. *In vitro* evaluation of acilbenzolar-S-methyl on inhibition of fireblight in apple cv Golden delicious. Iranian Journal of Plant Pathology 46: 77-79 (in Persian).

Siegrist, J., Glenewinkel, D., Kolle, C., and Schmidtke, M. 1997. Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal photogenes. Z. Pflan. Pflanzen 104: 599-610.

Simmonsn, C. R. 1994. The physiology and molecular biology of plant 1,3-ß-D-glucanases and 1,3;1,4-ß-D-glucanases. Critical Review of Plant Sciences 13: 325-387.

Thomson, S. V., Brisset, M. N., Chartier, R., and Paulin, J. P. 1998a. Induced resistance in apple and pear seedlings to fireblight by ASM and correlation with some defense-related enzymes. Acta Horticulturae 498: 583-588.

Thomson, S. V., Gouk, S. C., and Pauline, J. P. 1998b. Efficacy of Bion® (Actigard®) to control fire blight in pear and apple orchards in USA, New Zealand and France. Acta Horticulturae 489: 589-596.

Tsiantos, J., Psallidas, P., and Chatzaki, A. 2003. Efficacy of alternatives to antibiotic chemicals for the control of fireblight of pears. Annal of Applied Biology 143: 319-323.

Tonon, C. G., Guevara, C., and Olive, G. 2002. Isolation of a potato acidic 39 KDa β-1,3 glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance. Journal of Phytopathology 150: 189-195.

van Den Bulcke, M., Bauw, G., Castresana, C., Van Montagu, M., and Vamdekerckhove, J. 1998. Characterization of vacuolar and extracellular β (1,3)-glucanase of tobacco: evidence for a directly compartmentalized plant defense system. Proceedings of National Academy of Sciences, USA 86: 2673-2677.

van Loon, L. C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal of Plant Pathology 103: 753-765.

van der Zwet, T., and Bonn, W.G. 1991. Recent spread and current worldwide distribution of fireblight. Acta Horticulturae 489: 167-168.

van der Zwet, T., and Keil, H. L. 1979. Fireblight: A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. United States Department of Agriculture, Agricultural Handbook No. 510, Washington D. C., USA. 650pp.

Vicente, M. R., and Plasenica, J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. Journal of Experimental Botany 62: 3321-3338.

Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X. 2006. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. PLoS Pathogens 2006, 2: e123. doi:10.1371/journal.ppat.0020123.

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Hendrickson Culler, A., and Dong, X. 2007. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. Current Biology 17: 1784-1790.

Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y., and Shirasu, K. 2009. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. The Plant Cell 21: 2914-2927.

Zakeri, Z., and Sharifnabi, B. 1991. Fireblight of pear in Karaj. Proceedings of the 10th Iranian Plant Protection Congress, Kerman, Iran. Page 157 (in Persian).

Zhang, S. Y., Wang, J. B., Wang, H. F., Shao, J. W., Li, G. L., and Li, X. D. 2005. The relationship between activities of chitinase and β-1,3glucanase and resistance to rhizomania in sugar beet. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology 31: 281-286.

Zhang, Y., Xu, S., Ding, S., Wang, D., Cheng, Y., He, J., Gao, M., Xu , F., Li, Y., Zhu , Z., Li , X., and Zhang, Y. 2010. Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. Proceedings of National Academy of Sciences, USA 107: 18220-18225.

Zhu, Z. 2014. Molecular basis for jasmonate and ethylene signal interactions in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany 65: 5743-5748.

Zohour, E., and Rahmani Moghadam, N. 2004. Occurrence of fireblight in Khorasan province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran. Page 423 (in Persian).