دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

مطالعه تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی چند رقم برنج ایرانی در تعامل با بیمارگر باکتریایی *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* عامل بیماری سوختگی برگ

احمد درخشان[۱]، محمد سالاری[۲]، ولی‌اله بابائی‌زاد[۳]، ناصر پنجه‌که[۴] و عبدالحسین طاهری[۵]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه زابل
۲- دانشیار، دانشگاه زابل
۳- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (نویسنده مسوول: babaeizad@yahoo.com)
۴- دانشیار، دانشگاه زابل
۵- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۱۳
صفحه: ۷۷ تا ۸۹

چکیده

سوختگی باکتریایی برنج (*Xoo*) *Xanthamonos oryzae* pv. *oryzae* یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های باکتریایی برنج در برخی از مناطق کشت برنج در دنیا به‌ویژه مناطق گرمسیری آسیایی می‌باشد. عملکرد پایین مدیریت شیمیایی سبب شد تا بیشتر مطالعات روی شناخت ارقام مقاوم و درک مکانیسم‌های مقاومت، از طریق مطالعه برهم‌کنش بیوشیمیایی و شناخت ژن‌های مقاومت تمرکز یابد. این پژوهش با هدف ارزیابی مقاومت ۲۴ رقم تجاری برنج ایرانی در مقابل باکتری عامل سوختگی و مطالعه برخی مکانسیم مقاومت در سطوح بیوشیمیایی و الگوی تظاهر ژن *PAL* به‌روش qRT-PCR انجام گرفت. نتایج ارزیابی گلخانه‌ای نشان داد ارقام مختلف از نظر توسعه طول لکه نکروزه برگ به‌عنوان مهم‌ترین صفت ارزیابی بیماری اختلاف دارند. رقم تجاری خزر و نعمت در بالاترین سطح مقاومت و رقم طارم محلی و دیلمانی بیشترین حساسیت را بر اساس شاخص ارزیابی (مقاومت کمّی) نسبت به این بیماری نشان دادند. ارزیابی بیوشیمیایی آنزیم‌های کاتالاز، گایکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و فنل کل در رقم مقاوم خزر و حساس طارم محلی نشان از روند فعالیت بالای این آنزیم‌ها در رقم مقاوم در مقایسه با رقم حساس در ساعات اولیه پس از مایه‌زنی داشته که اختلاف بین رقم مقاوم و حساس در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. نرخ بیان ژن *PAL* نیز در رقم مقاوم خزر در ساعات اولیه پس از مایه‌زنی نسبت به رقم حساس به‌طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر بوده است. در مجموع به‌نظر می‌رسد القای ژن *PAL* و به‌دنبال آن افزایش تجمع آنزیم‌های اکسیدانی و آنتی اکسیدانی در بروز مقاومت رقم خزر نسبت به رقم حساس طارم محلی بخشی از ساز وکار دفاعی برنج در مقابل باکتری *Xoo* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ارقام تجاری برنج، تعاملات بیوشیمیایی، غربال‌گری، PAL، qRT-PCR

مقدمه

برنج (*Oryza sativa*) از مهم‌ترین محصولات غذایی بشر در نواحی مختلف دنیا به‌ویژه کشورهای در حال توسعه مانند آفریقا و آسیا از جمله ایران می‌باشد (۲۰). عامل سوختگی باکتریایی برگ برنج (*Xanthamonos oryzae* pv. *oryzae; Xoo*) از مخرب‌ترین و شایع‌ترین بیمارگرهای باکتریایی برنج در دنیا است (۱۷،۴۱). میزان خسارت این بیماری از ۲۰ تا ۳۰ درصد حد متوسط به ۵۰ تا ۸۰ درصد در شرایط حاد بسته به شرایط آب و هوایی و مناطق جغرافیایی گزارش شده است (۱۵،۱۷). این باکتری یک بیمارگر آوندی است که از طریق زخم‌ها و روزنه‌های آبی منتهی به آوندهای چوبی وارد گیاه شده و در آنجا تکثیر می‌یابد (۱۵). سپس با تولید افکتورهایی از جمله پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی[۱] سبب مسدود شدن آوندهای چوبی و مرگ میزبان می‌گردد. آلودگی در مراحل گیاهچه و پنجه‌زنی همراه با پژمردگی[۲] و در مراحل بعدی به‌صورت لکه‌های طویل که به‌تدریج به‌صورت سبز خاکستری و متمایل به زرد (سوختگی) گاهاً با حاشیه موجدار به‌سمت غلاف توسعه می‌یابد (۱۵،۱۷،۲۰).

در ایران بیماری سوختگی باکتریایی برنج در سال ۱۳۸۸ از مزارع برنج استان گیلان گزارش شد (۱۹). سپس این باکتری از بذور دو رقم آمل ۱ و آمل ۳ برنج گزارش و بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تحت عنوان *Xanthamonos oryzae* pv. *oryzae* از گیلان گزارش شد (۲،۲۴،۲۵). اهمیت اقتصادی بیماری، ناکارآمد بودن روش‌های زراعی و شیمیایی، عدم دسترسی به سیستم پیش‌آگاهی[۳] مناسب، وابستگی بیماری به نوع رقم و عملیات زراعی و شرایط محیطی منطقه جغرافیایی سبب شده تا کنترل آن از طریق ارقام مقاوم ژنتیکی به‌عنوان مهم‌ترین روش مدیریت معرفی گردد (۱۵،۴۱). فهم تعامل بیوشیمیایی و مولکولی نقش مهمی در طراحی استراتژی‌های اختصاصی در ایجاد مقاومت گیاهان علیه بیمارگرها (۴۱) و زمینه قابل اعتمادی جهت کمک به امنیت غذایی از طریق سلامت محصول فراهم می‌کند (۱۵،۱۷).

در برهمکنش سازگار و ناسازگار بیمارگر و گیاه میزبان صدها ژن تنظیم و بیان می‌شوند که در غالب موارد اختلاف بین مقاومت و حساسیت مرتبط با زمان و میزان این تغییرات نسبت به تفاوت در بیان مجموعه‌ای از ژن‌ها می‌باشد (۴۰). در تعامل ناسازگار با فعال شدن یک‌سری سیگنال‌های ناشی از تشخیص و درک الیسیتورها و یا افکتورهای بیمارگر توسط میزبان، نسخه‌برداری و بیان ژن‌های مرتبط با دفاع فعال می‌گردد (۷،۲۳،۲۹). از مؤثرترین پاسخ دفاعی اولیه گیاه در تعامل با بیمارگر شامل تغییراتی در متابولیسم سلول مانند

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]
[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

غیرقطبی‌شدن سریع و ناپایدار غشا، تغییر تبادلات یونی و بروز واکنش‌های انفجار[1] سلولی همراه با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از جمله پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)، سوپراکسیداکسیژن (O_2^-) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) می‌باشد که سبب فعال‌شدن مسیرهای انتقال پیام مانند مسیرهای وابسته به اسیدسالیسیلیک، جاسمونیک‌اسید و اتیلن، نسخه‌برداری و بیان ژن‌های دفاعی مانند بیوسنتز فیتوالکسین‌ها، تقویت دیواره سلولی از طریق افزایش ترکیبات فنیل‌پروپانوئید و سنتز آنزیم‌های دفاعی و انواع ژن‌های مرتبط با بیماریزایی با خواص ضدمیکروبی می‌گردد (۲۳،۲۹،۳۸). مطالعات نشان داد ROS به‌طور وسیع بین سلول‌های آوند چوبی و سلول‌های اطراف تجمع و انتشار می‌یابد که برای باکتری‌ها سمّی و سبب تخریب مولکول‌های بیوشیمیایی (پروتئین، مولکول DNA، لیپید و غشای سلولی) می‌گردد (۴۵). فعالیت آنزیم‌هایی چون پراکسیدازها، کاتالازها، سوپراکسید دیسموتازها و دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات فنلی از جمله تغییرات بیوشیمیایی هستند که برای حفظ سلول در مقابل انواع تنش‌ها و بیماری‌ها دست‌خوش تغییر می‌شود (۱۴). بررسی تعامل‌های ناسازگار بین دو نژاد از ایزوله عامل سوختگی باکتریایی برنج و گیاهان حامل ژن مقاوم (Xa_{10}) نشان داد که تجمع پراکسیدازها، کاتالازها و سوپراکسید دیسموتاز در میزبان افزایش می‌یابد. پراکسیدازهای کاتیونی از سلول‌های پارانشیم چوبی به داخل لومن تراوش می‌کند، تجمع آن سبب ضخامت دیواره سلولی ثانویه می‌شود. در نتیجه سبب کاهش منافذ غشایی سلول‌های پارانشیم و آوند چوبی شده و از توسعه و انتشار بیماری به داخل آوند ممانعت می‌کند (۲۲،۳۱). افزایش فعالیت پراکسیداز سبب مقاومت میزبان در تعامل با بیماری سوختگی باکتریایی برنج از طریق تولید لیگنین و آنزیم PAL می‌گردد که نقش مهمی در بیوسنتز فیتوالکسین دارد (۱۰). پراکسیدازها یکی از سریع‌ترین پاسخ‌های دفاعی آنزیمی علیه بیمارگرهای گیاهی از طریق پلی‌مر شدن هیدروکسی‌سینامیل‌الکل عامل بیوسنتز لیگنین، چوب پنبه‌ای‌شدن، پلی‌مرشدن گلیکوپروتئین‌های غنی از هیدروکسی‌پرولین، پروتئین‌های غنی از پرولین، تشکیل دیواره سلولی، ترمیم زخم و مقاومت علیه بیمارگر در گیاهان عمل می‌کند (۱۰،۴۴). کاتالاز یک آنزیم تمیزکننده سلول گیاهی از اثرات سمی H_2O_2 در طول توسعه از طریق تبدیل آن به آب و اکسیژن عمل می‌کند (۵،۳۴). پلی‌فنیل‌اکسیداز از سدهای اولیه دفاعی می‌باشد باعث تسریع اکسیداسیون فنل‌ها به رادیکال‌های آزاد که با مولکول‌های بیولوژیکی واکنش داده و در نهایت باعث ایجاد شرایط نامساعد برای توسعه بیمارگرها می‌شود (۳۶). سامانه‌های دفاعی آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گوایکول پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) و غیرآنزیمی مانند ترکیبات فنلی در پاسخ‌های دفاعی گیاه دخیل هستند و از آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیست شیمیایی در پژوهش‌های برهم‌کنش گیاه با بیمارگرها استفاده می‌شود (۳۱).

پروتئین PAL آنزیمی حیاتی در مسیر فنیل پروپانوئید است که نقش مهمی را در مقاومت گیاهان از طریق دخالت در مسیرهای بیوسنتز فلاونوییدها، ایزوفلاونوییدها و طیف وسیعی از ترکیبات فنیل پروپانوییدها (مثل لیگنین) که فعالیت فیتوالکسین دارند ایفا می‌کند (۱۰،۲۷). افزایش بیان ژن *PAL* در بررسی‌های متعدد، به‌عنوان ژن دخیل در مقاومت با اثر مستقیم در افزایش اسید سالیسیلیک (SA) فعال‌کردن ژن NPR_1 (پروتئین تنظیمی دخیل در مسیر پیام‌رسانی SA) و به دنبال آن بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی[2] (*PRs*) و نیز القای سریع مرگ سلولی به اثبات رسیده است (۱۰). فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (*PAL*)، اسید ترانس‌سینامیک را ابتدا به اسید ۲-هیدروکسی سینامیک و یا اسیدبنزوئیک و در نهایت به اسیدسالیسیلیک تبدیل می‌کند. اسیدسالیسیلیک با القای ژن‌های NPR_1 و *PRs* باعث فعال‌شدن مسیر SAR می‌شود (۴۳). در واقع فنیل‌آلانی‌آمونیالیاز فرآیند دی‌آمینی‌شدن و تبدیل ال‌فنیل‌آلانین به ترانس- سینامیک اسید را تسریع می‌کند. این تبدیل، اولین مرحله مسیر فنیل‌پروپانوئید است که پیش‌سازهای مواد فنولی، لیگنین و فیتوآلکسین‌ها را فراهم می‌کند (۱۴). برخی مطالعات نیز نشان از تأثیر مثبت *PAL* روی تنظیم JA و Et بر القای مقاومت سیستمیک در طول پروسه دفاعی گیاه دارد (۱۴). بررسی تغییرات زیست شیمیایی و الگوی بیان ژن‌های درگیر مقاومت می‌تواند داده‌های سودمندی را در زمینهٔ حساسیت و مقاومت گیاه به بیمارگر فراهم آورد. در این پژوهش به‌منظور دریافت بهتر ساز و کارهای ارقام حساس و مقاوم، دگرگونی‌های زیست شیمیایی و الگوی تظاهر بیان ژن *PAL* به‌روش Real-Time PCR در فواصل زمانی گوناگون پس از آلودگی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری

در این پژوهش جدایه استاندارد باکتری (۴۴۲) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* با قدرت بیماری‌زایی بالا از کلکسیون کشت‌های بین‌المللی ICMP نیوزیلند توسط آقای دکتر خدایگان تهیه و اهدا شد. برای انجام آزمایش‌ها از کلنی تازه رشد یافته باکتری در محیط کشت NAS (Nutriemt Agar Sucrose) و YDC (Yeast dextrose carbonate agar) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس استفاده شد. نگهداری و آزمون بیماری‌زایی بر اساس روش (۲۰،۲۸،۳۳) انجام گرفت.

تهیه بذر، گیاهچه‌های هم‌سن و آزمون غربال‌گری

بذور ارقام مختلف برنج (خزر، نعمت، ندا، شیرودی، دانش، پردیس، ساحل، صدری، قائم، سفید رود، سنگ طارم، طارم محلی، دیلمانی، هاشمی، جلودار، پژوهش، کادووس، فجر، دم سیاه، پویا، شفق، کوهسار، بی نام و کشوری) ارزیابی شده در این پژوهش از مرکز تحقیقات برنج کشور (آمل) و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه شد. آزمایشات بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های هم‌سن، جهت انتخاب رقم حساس و مقاوم به عامل سوختگی باکتریایی برنج و غربال‌گری انجام شد. حساس‌ترین و مقاوم‌ترین رقم به‌همراه یک رقم بینابین برای آزمایش‌های بعدی از جمله ارزیابی بیوشیمیایی و بیان ژن مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰).

1- Oxidative burst

2- Pathogenesis-related genes

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

آماده‌سازی مایه تلقیح، انجام آزمایش‌های بیماری‌زایی و ارزیابی بیماری

برای این منظور از کشت تازه باکتری در محیط (YDC) سوسپانسیونی با غلظت $۱۰^{۷}$ (معادل ۰/۱ :OD) سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شد (۲۰). تلقیح گیاهچه‌ها به‌روش قیچی سترون و روش مه‌پاشی سوسپانسیون باکتری انجام شد. در روش اول پس از غوطه‌ور سازی قیچی سترون در سوپانسیون تازه باکتری با غلظت مورد نظر برش‌هایی به طول ۱/۵-۱ سانتی‌متر در قسمت بالایی برگ ایجاد شد. در روش دوم سوسپانسیون باکتری به سطح برگ مه‌پاشی شد (۲۰،۳۳). بررسی توسعه بیماری از طریق اندازه‌گیری طول لکه‌های نکروزه[1] در سطح برگ انجام و نمره‌دهی آن طی دو هفته بعد از تلقیح انجام گرفت. تعداد چهار برگ در هر رقم برای مایه‌زنی انتخاب شد. برای محاسبه ناحیه نکروزه میانگین طول ناحیه نکروزه در چهار برگ از هر گلدان مایه‌زنی‌شده مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان با لکه‌هایی به طول صفر تا ۳ سانتی‌متر خیلی مقاوم، ۳/۱ تا ۶ سانتی‌متر مقاوم، لکه‌هایی تا ۹ سانتی‌متر با مقاومت متوسط[2] و بیشتر از آن در گروه حساس قرار گرفتند (۱،۳۳). آنالیز داده‌ها و رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 و برنامه SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت. آزمایشات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه بلوک کامل انجام شده است.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و شاخص‌های دفاعی گیاه برنج در برابر باکتری عامل سوختگی

به‌منظور مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی، گیاهان غربال‌شده از آزمون‌های بالا، مجدداً مایه‌زنی شده و در زمان‌های صفر، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از مایه‌زنی نمونه‌هایی انتخاب و بلافاصله در فالکون‌های ۵۰ میلی‌متر قرار داده و به داخل نیتروژن مایع انتقال و سپس در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس جهت بررسی‌های دگرگونی‌های بیوشیمیایی مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفت (۳۸).

استخراج محلول آنزیمی

برای استخراج محلول‌های آنزیمی نیم‌گرم از نمونه برگی با استفاده از هاون‌چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع هموژن و سپس به آن پنج میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH=۷/۵) محتوی EDTA نیم میلی‌مولار اضافه شد. هموژن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش، به‌مدت پانزده دقیقه با دور ۲۰۰۰۰ در دقیقه و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. به‌منظور پیشگیری از اثرات مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها، محلول آنزیمی به‌دست آمده به سه قسمت تقسیم و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۶).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، گایکول پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و فنل کل

بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مطابق روش دزی و همکاران (۶) با بررسی کاهش مقدار پراکسید هیدروژن (سرعت تجزیه H_2O_2) در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد (۶). ارزیابی فعالیت گایکول‌پراکسیداز بر اساس روش (۳۷) انجام شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از روش بیاچمپ و فردوویچ (۱۹۷۱) با اندازه‌گیری توانایی آنزیم در جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلو-تترازولیوم (NBT) تعیین شد. از آنجایی‌که یک واحد آنزیم مذکور عبارت است از میزانی از آنزیم که ۵۰ درصد بازداشت ایجاد می‌کند، فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز براساس واحد آنزیمی به ازای هر میلی‌گرم پروتئین برای تمام نمونه‌ها محاسبه گردید (۱۱). آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل سه عاملی با دو عامل رقم (در دو سطح)، بیمارگر (دو سطح) و زمان (در ۶ سطح) در چارچوب طرح کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه گردید. مقایسه میانگین‌ها در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

برای استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات فنلی از روش سیورز و دیلی استفاده شد (۳۰). در این روش عصاره بافت گیاه سانتریفیوژ شده و بخش رویی که حاوی ترکیبات فنلی است برای آزمایشات بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای اندازه‌گیری فنل کل در عصاره برگ مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره به‌دست آمده با هفت میلی‌لیتر آب مقطر استریل در یک لوله آزمایش ریخته و کاملاً مخلوط شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین را به لوله اضافه کرده، مجدداً محتویات لوله با هم مخلوط شد و پس از سه دقیقه یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به لوله اضافه و حجم مخلوط با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از یک ساعت مقدار جذب رنگ در طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. لوله‌های شاهد شامل آب مقطر و معرف بود.

ارزیابی بیان ژن

در این تحقیق ژن *PAL* در کنار ژن خانه‌دار اکتین (*Actin*$_1$) ارزیابی شد. آغازگرها استفاده شده در ریل تایم (۲۷) در جدول (۱) آمده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR

Table 1. The sequence of primers used in the Real-Time PCR reaction

Gene	Sequence (5'-3')	Tm °c	Amplication Length
Actin1	F- ATCCTTGTATGCTAGCGGTCGA R- ATCCAACCGGAGGATAGCATG	۶۱	۱۱۸
PAL	F – GGTGTTCTGCGAGGTGATGA R –AGGGTGGTGCTTCAGCTTGT	۶۱	۱۸۰

1- lesion length

2- Moderately resistant or MR

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

استخراج RNA ، تام، ساخت cDNA و آنالیز مولکولی

به‌منظور بررسی مکانیسم مولکولی و ارزیابی ژن *PAL*، پس از غربال‌گری اولیه، ارقام انتخاب‌شده با بیمارگر *Xoo* مایه‌زنی شد. سپس در بازه‌های مختلف زمانی (صفر، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲ و ۹۶ ساعت) پس از مایه‌زنی، نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌های انتخاب شده بلافاصله بعد از جدا شدن از گیاه، در فالکون‌های مناسب در نیتروژن مایع قرار و تا زمان استخراج RNA در فریزر در دمای۸۰- درجه نگهداری شدند. پس از پودر شدن نمونه‌ها در ازت مایع، استخراج RNA با استفاده از Rnax plus انجام شد. در این روش از ۵۰۰ میلی‌گرم پودر نمونه‌ها استفاده شد (۲۷). DNA مکمل (cDNA) با استفاده از پرایمر oligo(dT) و آنزیم ترنسکریپتاز معکوس از RNAی تام استخراج شده بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در منفی 20^{oC} نگهداری شدند. ارزیابی مولکولی ژن‌ها به روش Q-PCR (Quantitative Real time PCR) به‌روش سایبرگرین[1] و با پرایمرهای مدنظر شده انجام شد. واکنش‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرو لیتر SYBR Green، ۰/۴ میکرو لیتر پرایمر رفت، ۰/۴ میکرو لیتر پرایمر برگشت، ۱/۲ میکرو لیتر آب و ۸ میکرو لیتر از نمونه cDNA بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ سانتی‌گراد، سپس ۲۵ تا ۳۵ چرخه (شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ سانتی‌گراد) و در نهایت مرحله بسط نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ سانتی‌گراد بود. تجزیه داده‌های دستگاه Real time با نرم‌افزار Bio-Rad cfx manager انجام شد. نرخ بیان ژن در این روش با استفاده از فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد (۲۱). تجزیه داده‌ها با نرم‌افزارهای اکسل ۲۰۱۳ و SAS نسخه ۹/۱ انجام شد.

$\Delta\Delta CT=$ (ΔCT آزمایش نمونه – ΔCT کنترل نمونه)

$\Delta C_T=$ (C_T ژن هدف – C_T ژن خانه دار)

نتایج و بحث

ارزیابی برهم‌کنش ارقام مختلف برنج تجاری ایرانی و غربال‌گری آن‌ها

در این تحقیق عملکرد ۲۴ رقم تجاری ایران در برابر باکتری عامل سوختگی برنج مورد ارزیابی قرار گرفت. علایم ماکروسکوپی حاصل از آزمون بیماری‌زایی و ارزیابی مقاومت ارقام مختلف برنج ایرانی روی گیاهچه‌های چهار هفته‌ای با نتایج حاصل از علایم گزارش شده توسط بارکر مطابقت داشت (۴،۱۳). علایم بیماری ابتدا به‌صورت علایم آب‌سوخته و به تدریج طی دو هفته، نقاط زردی و نکروز ایجاد شد. سپس علایم زردی کم‌کم بخش اعظم برگ را در بر گرفت و به‌سمت قاعده گرایش یافت و نهایت در ارقام حساس کل سطح برگ را فرا گرفت. در برخی موارد برگ‌ها در قسمت انتهایی دچار پیچیدگی شدند. در حالی‌که در برگ‌های شاهد تیمار شده با آب مقطر هیچ‌گونه آثار آب‌سوختگی و زردی مشاهده نشد (شکل ۱).

شکل ۱– آزمون بیماری‌زایی به‌روش قیچی ستروِن (۱)، علایم اولیه (۲،۳) پیشرفت بیماری (۴) و مقایسه بیماری برخی از ارقام (۵ و ۶) در تعامل با سوختگی باکتریایی برنج (عکس نگارنده)

Figure 1. Pathogenicity test (leaf clipping fig1), primary symptoms (fig 2-3), disease progression (fig 4), and performance of some cultivars in interaction with rice bacterial blight

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از واکنش ارزیابی مقاومت روی ارقام مختلف در تعامل با سوختگی باکتریایی برنج به‌روش بلوک کامل تصادفی نشان داد که اولاً بین بلوک‌ها (مراحل مختلف آزمایش) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که حاکی از این است که در هر سه مرحله انجام تست گلخانه شرایط آزمایشی و دقت نمونه‌برداری تقریباً یکسان بود. بین ارقام مختلف برنج در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار ($p\leq 0.01$) وجود داشت (جدول ۲). به‌طوری‌که، ارقام تجاری خزر و نعمت بیشترین نرخ مقاومت و ارقام طارم محلی، دم سیاه، سنگ طارم، هاشمی و دیلمانی بیشترین حساسیت را نسبت به باکتری بر اساس اندازه‌گیری طول لکه نکروزه در سطح برگ (lesion length) و ارزیابی مقاومت کمی داشتند (جدول ۳ و شکل ۲). نتایج این تحقیق با بخشی از نتایج سایر محققان مطابقت داشت (۲،۲۴،۲۵).

1- SYBR Green

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]

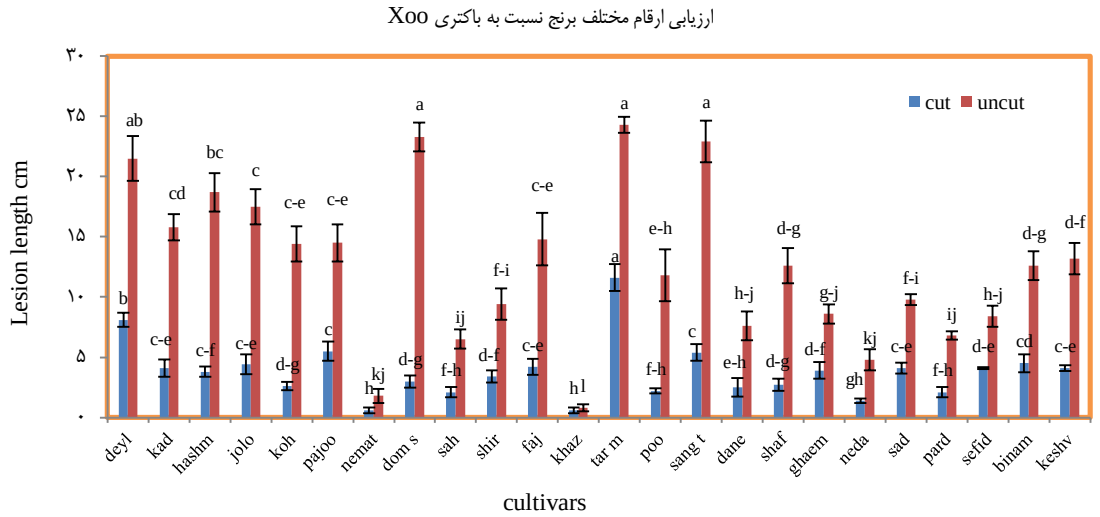
[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس مقایسه مقاومت ارقام براساس طول لکه نکروزه ناشی از سوختگی باکتریایی

Table 2. Results of analysis of variance comparing the resistance of cultivars based on the lesion length of bacterial blight

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		طول لکه در روش Cut	طول لکه در روش Un cut
بلوک	۲	۱/۴۱^{ns}	۱۱/۵۷^{ns}
رقم	۲۳	۱۶/۲۷**	۱۲۷/۳۶**
خطا	۴۶	۰/۹۶	۴/۶۹
ضریب تغییرات (٪)	-	۲۰/۵	۱۷/۲

ns: عدم معنی دار، **: معنی‌دار بودن در سطح یک درصد، مفهوم cut در واقع روش تلقیح (Clipping methods or Leaf Clipping) و Un cut (Fogging methods) روش مه‌پاشی.



شکل ۲- ارزیابی ارقام مختلف برنج نسبت به باکتری *Xoo* براساس طول لکه نکروزه (lesion length). مفهوم cut (Clipping methods or Leaf Clipping) و Un cut (Fogging methods) روش مه‌پاشی

Figure 2. Evaluation of different rice cultivars in challenging with *Xoo* based on lesion length. (cut or Clipping methods or Leaf Clipping and Un cut (Fogging methods)

همچنین بر اساس سیستم نمره‌دهی میزان بیماری (۳۳) این ارقام به گروه‌های خیلی مقاوم، متحمل، حساس و خیلی حساس تقسیم شدند (جدول۴). مطالعه ارزیابی مقاومت برخی از ارقام برنج (هاشمی، لنجان، فیروزان و گیلانه) به بیماری بلایت باکتریایی نشان داد که رقم هاشمی بر اساس دینامیک جمعیت باکتری در برگ‌ها، بیماری‌زایی (ناحیه نکروز برگ) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، حساس‌ترین و رقم لنجان بیشترین مقاومت را در مقایسه با سه رقم دیگر به بلایت باکتریایی داشتند (۲۵).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

جدول ۳- مقایسه میانگین طول لکه‌ها ی نکروزه و گروه‌بندی براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ۲۴ رقم تجاری برنج بر اساس دو روش تلقیح

Table 3. Comparison of necrosis lesion length mean and grouping based on multi-Duncan test of 24 commercial rice cultivars based on two inoculation methods

کد آزمایش	نام اختصاری رقم	نام رقم تجاری برنج	میانگین و گروه بندی ارقام بر اساس صفت Cut	میانگین و گروه‌بندی بر اساس صفت unCut
1	Deyl	دیلمانی	۸/۱۶۷b	۲۱/۵^{ab}
2	Kad	کادووس	۴/۱۶۷^{cde}	۱۵/۸۳۳^{cd}
3	Hash	هاشمی	۳/۸۳۳^{cdef}	۱۸/۱۶۷^{bc}
4	Jolo	جلودار	۴/۴۱۷^{cde}	۱۷/۵۸۳^{c}
5	Koh	کوهسار	۲/۶۶۷^{defg}	۱۴/۴۱۷^{cde}
6	Pajoo	پژوهش	۵/۵۸۳^{c}	۱۴/۵۸۳^{cde}
7	Nem	نعمت	۰/۶۶۷^{h}	۱/۸۶۷^{kl}
8	Doms	دم سیاه	۳^{defg}	۱۲/۳۳۳^{a}
9	Sah	ساحل	۲/۱۶۷^{fgh}	۶/۵۸۳^{ji}
10	Shir	شیرودی	۳/۴۱۷^{def}	۹/۴۱۷^{fghi}
11	Faj	فجر	۴/۲۵^{cde}	۱۴/۸۳۳^{cde}
12	Khaz	خزر	۰/۶۶۷^{h}	۰/۸۶۷^{l}
13	Tarm	طارم محلی	۱۱/۵۸۳a	۲۴/۳۳۳^{a}
14	Pooy	پویا	۲/۲f^{gh}	۱۱/۱۶۷^{efgh}
15	S.tar	سنگ طارم	۵/۴۱۷^{c}	۲۲/۹^{a}
16	Dan	دانش	۲/۵^{efgh}	۷/۶۶۷^{hij}
17	Shaf	شفق	۲/۷۸۳^{defg}	۱۲/۶۶۷^{defg}
18	Gha	قائم	۳/۹۱۷^{cdef}	۸/۶۶۷^{ghij}
19	Neda	ندا	۱/۴۶۷^{gh}	۴/۸۶۷^{kj}
20	Sad	صدری	۴/۱۶۷^{cde}	۹/۸۳۳^{fghi}
21	Pard	پردیس	۲/۱۶۷^{fgh}	۶/۸۳۳^{ji}
22	Sefid	سفیدرود	۴/۱۱۷^{cde}	۸/۴۱۷^{hij}
23	Binam	بی‌نام	۴/۵^{cd}	۱۲/۶۶۷^{defg}
24	Kesh	کشوری	۴/۱۶۷^{cde}	۱۳/۲۵^{def}

جدول ۴- کلاسه‌بندی حساسیت ارقام بر اساس مقیاس میزان بیماری (۱)

Table 4. Classification of rice cultivars susceptibility based on disease scale

خیلی مقاوم	خزر	نعمت	ندا									
مقاوم (متحمل)	شیرودی	دانش	پردیس	ساحل	صدری	قائم	سفیدرود					
حساس	سنگ‌طارم	هاشمی	جلودار	پژوهش	کادووس	فجر	دم سیاه	پویا	شفق	کوهسار	بی‌نام	کشوری
خیلی حساس	طارم محلی	دیلمانی										

نتایج ارزیابی تغییرات آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی در ارقام غربال‌شده برنج

براساس نتایج حاصل از آزمون گلخانه (ارزیابی مقاومت کمی) سه رقم خیلی حساس طارم محلی و متحمل شیرودی و مقاوم خزر برای ارزیابی بیوشیمیایی و مولکولی انتخاب شدند. نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس دگرگونی‌های زیست شیمیایی نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های گوایکول پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و همچنین فنل کل در هر سه رقم تحت تأثیر عامل بیماری، زمان و اثر متقابل آن‌ها قرار دارد (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه واریانس فعالیت‌های آنزیمی دفاعی گیاه برنج در پاسخ به باکتری *Xoo*

Table 5. Analysis of variance for activity of defense enzymes of rice seedlings in response to *Xoo*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		کاتالاز	گوایکول پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	پروتئین کل	فنل کل
مایه زنی	۱	۰/۵۰**	۲۰۳/۴۷**	۲۴/۲۵**	۱۶^{ns}	۸۷/۷۳**
رقم	۲	۱/۱۳**	۹۱/۶۰**	۳۳/۰۰**	۳۶۶/۲۱**	۷/۸۴**
زمان	۵	۰/۰۳**	۲۳/۷۷**	۶/۵۴**	۱۵۲/۸۲**	۱۰/۱۳**
مایه زنی× رقم	۲	۰/۰۳**	۱/۴۹**	۷/۰۷**	۲۳/۶۸*	۲۰/۰۱**
مایه زنی× زمان	۵	۰/۰۳**	۲۱/۶۲**	۶/۵۴**	۸۸/۲۲**	۷/۳۵**
رقم × زمان	۱۰	۰/۰۲**	۸/۷۳**	۱/۳۳**	۸۸/۲۲**	۲/۸۹**
مایه زنی× رقم× زمان	۱۰	۰/۰۲**	۶/۴۹**	۱/۳۳**	۲۴/۳۷**	۳/۶۰**
خطا		۰/۰۱۲	۱/۸۳	۰/۲۵	۷/۶۶	۰/۲۸
ضریب تغییرات (٪)		۱۶/۸۹	۱۲/۰۹	۱۰/۶۹	۱۹/۴۰	۷/۹۶

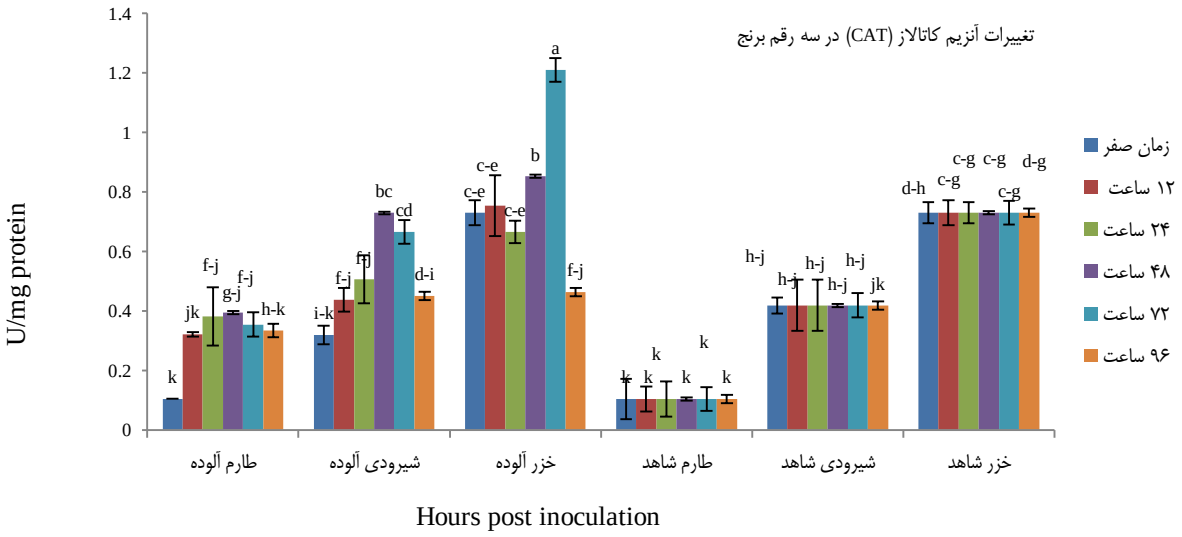
ns: عدم معنی‌دار، **: معنی‌دار بودن در سطح یک درصد و *: معنی‌دار بودن در در سطح ۵ درصد

میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی مورد بررسی در رقم مقاوم و حساس و بینابین (خزر، شیرودی و طارم محلی) پس از مایه‌زنی با بیمارگر در مقایسه با گیاهان شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌طوری‌که بیشترین تغییرات مربوط به رقم خزر و کمترین آن مربوط به رقم طارم محلی بوده است (شکل‌های ۳-۶). فعالیت آنزیم گوایکول پراکسیداز،

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]

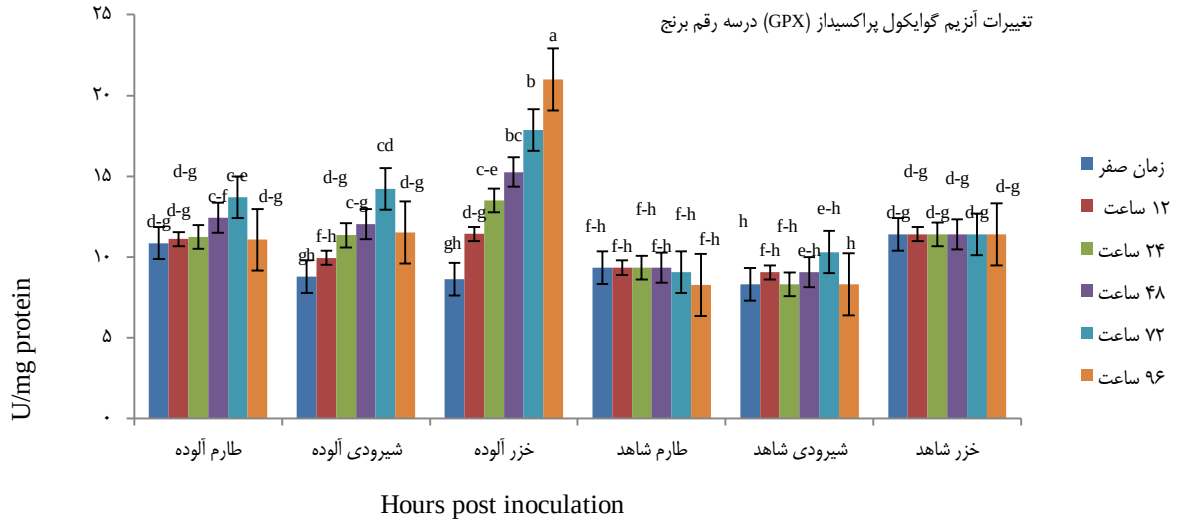
[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز نسبت به شاهد در هر سه رقم به‌طور معنی‌داری پائین‌تر از گیاهان آلوده بوده ولی فعالیت این آنزیم‌ها پس از آلودگی با باکتری افزایش یافت که این تغییرات افزایش فعالیت آنزیمی در رقم مقاوم خزر بیشتر و سریع‌تر نسبت به رقم حساس طارم محلی بود.



شکل ۳- ارزیابی میزان تغییرات آنزیم کاتالاز، در سه رقم طارم محلی، شیرودی و خزر

Figure 3. Evaluation of the rate of catalase enzyme changes in the three rice cultivars; Tarom, Shiroodi and Khazar



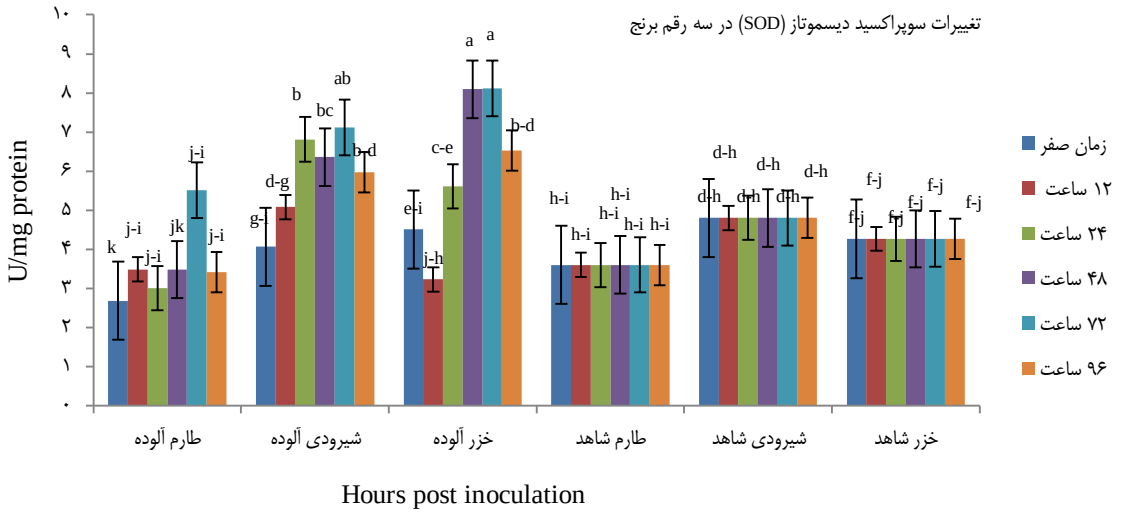
شکل ۴- ارزیابی میزان تغییرات آنزیم گوایکل پراکسیداز، در سه رقم طارم محلی، شیرودی و خزر

Figure 4. Evaluation of the rate of guaiacol peroxidase enzyme changes in the three rice cultivars; Tarom, Shiroodi and Khazar

بیشترین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز، مربوط به رقم مقاوم خزر به ترتیب در ساعات ۴۸ تا ۷۲ ساعت و ۷۲ و ۹۶ ساعت بود که بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها در گروه a قرار گرفته و به‌طور قابل توجهی (در سطح پنج درصد) نسبت به رقم حساس تفاوت معنی‌دار بود. تغییرات فنل کل نیز به ترتیب در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح در رقم مقاوم خزر با قرار گرفتن در گروه a نسبت به طارم محلی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. در مجموع افزایش فعالیت این آنزیم‌ها و فنل کل در دامنه ۲۴ تا تقریبا ۷۲ ساعت پس از آلودگی در رقم مقاوم خزر نسبت به طارم محلی بیشتر بود. نتایج ما با نتایج سایر یافته مطابقت می‌کندکه مجزا در مورد هر آنزیم بحث شده است (۲،۲۲،۴۴،۴).

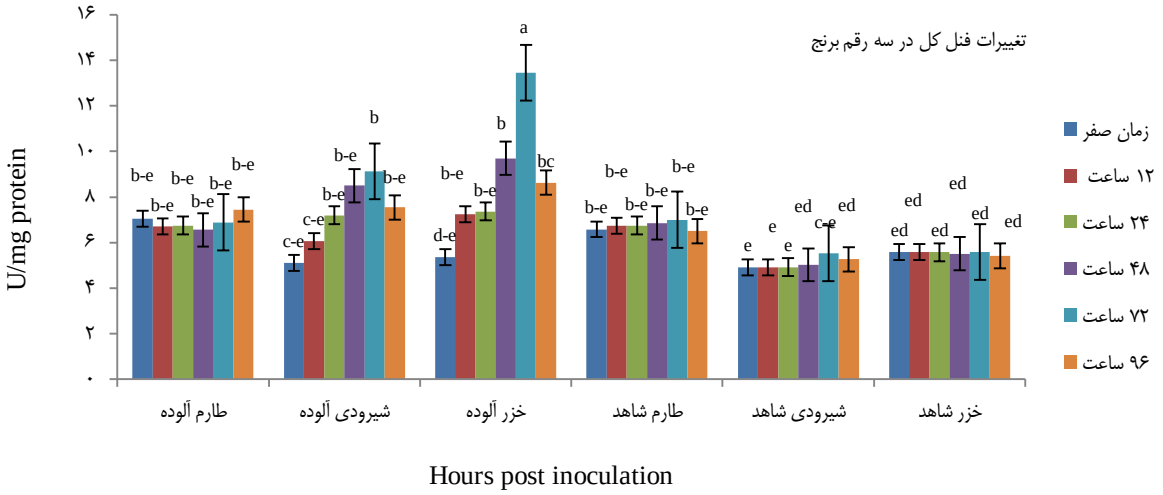
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]



شکل ۵- ارزیابی میزان تغییرات آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، در سه رقم طارم محلی، شیرودی و خزر.
Figure 5. Evaluation of the rate of SOD enzyme changes in the three rice cultivars; Tarom, Shiroodi and Khazar

آنزیم کاتالاز مهم‌ترین آنزیمی است که سلول گیاه را در برابر زیان اکسیداتیو ناشی از ROSها پشتیبانی می‌کند (۱۲). کاتالازها در سنجش با دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سرعت واکنش بالایی داشته به‌طوری‌که در هر ثانیه می‌توانند میلیون‌ها مولکول H_2O_2 را تجزیه نمایند (۳۱). افزایش تدریجی فعالیت کاتالاز تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی در رقم مقاوم نشان می‌دهد که این آنزیم در زدودن H_2O_2 اضافی نقش دارد. ادامه فعالیت این آنزیم هر چند به مقدار کمتر (کاهش میزان فعالیت پس از ۷۲ ساعت) را می‌توان بخشی از فعالیت دفاعی دانست تا گیاه بتواند غلظت‌های اضافی H_2O_2 را تحمل کند. فعالیت پایین‌تر این آنزیم در رقم حساس را می‌توان از عدم کارایی این آنزیم مقاومتی در کاهش سطح ROS در طول مراحل آلودگی با بیمارگر دانست که در نتیجه موجب انتشار و بروز علایم در گیاه می شود (۸).



شکل ۶- ارزیابی میزان تغییرات آنزیم فنل کل در سه رقم طارم محلی و شیرودی و خزر
Figure 6. Evaluation of the rate of total phenol enzyme changes in the three rice cultivars; Tarom, Shiroodi and Khazar.

نتایج بررسی‌های محققان نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام مقاوم به میزان قابل توجهی بیشتر است که روشن‌گر نقش این آنزیم در مقاومت گیاه در برابر بیمارگرها است. در این پژوهش نیز در گیاهان مایه زنی شده با باکتری فعالیت کاتالاز در مقایسه با گیاهان شاهد و رقم حساس افزایش بیشتری داشته که چنین نتیجه‌گیری می‌شود که آنزیم کاتالاز در واکنش‌های دفاعی و افزایش مقاومت گیاه در برابر باکتری *Xoo* نقش دارد. فعالیت اصلی پراکسیداز سنتز لیگنین است که سبب استواری دیواره سلولی و کاهش آسیب پذیری سلول در برابر آنزیم‌های تجزیه کننده دیوارهٔ سلولی تولیدی بیمارگرها می‌شود (۸). همچنین گایکول پراکسیداز می‌تواند به طور مستقیم اثرات ویرانگر پراکسید هیدروژن را که در تنش گیاه با بیمارگر به وجود آمده‌اند را خنثی کند. در این پژوهش از افزایش فعالیت آنزیم گایکول پراکسیداز در رقم مقاوم نسبت

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]
[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

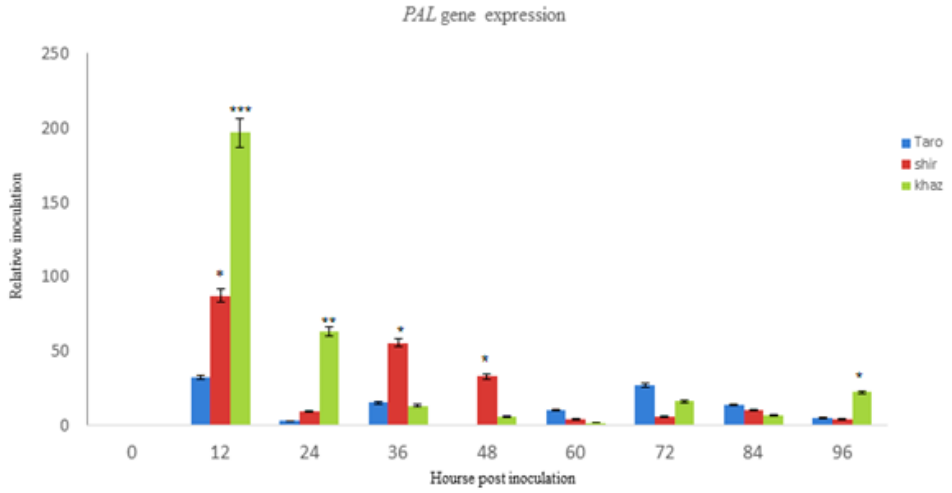
به گیاهان شاهد و حساس می‌توان چنین برداشت کرد که این آنزیم از راه استحکام دیواره سلولی و هم چنین سم زدایی H_2O_2 سبب افزایش مقاومت گیاه می‌شود. یافته‌های این پژوهش با نتایج پژوهشگرانی که مقاومت گیاه در برابر سوختگی باکتریایی برنج را مرتبط با افزایش میزان فعالیت پراکسیداز گزارش دادند مطابقت می‌کند (۲۲،۳۱).

فعال شدن SOD نخستین گام دفاع در برابر رادیکال های آزاد است (۳۱). در طول پاسخ گیاه به بیمارگرهای نکروتروف، پراکسیدازها در تنظیم سطوح رادیکال‌های فعال اکسیژن دخیل هستند و سبب کاهش جابجایی الکترون های H_2O_2 به انواع مولکول‌های گیرنده می‌شوند. این فرایندهای زیست شیمیایی منتهی به مقاومت می‌شوند (۳). آنزیم SOD از کارآمدترین آنزیم‌های درون سلولی است که نقش مثبتی در مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد. در واقع SOD نخستین سد دفاعی در برابر تنش‌های اکسیداتیو است و در دیسموتاز کردن O_2^- به H_2O_2 و O2 دخالت دارد (۱۶). در این پژوهش فعالیت بالای آنزیم SOD در رقم مقاوم در ساعاتی پس از آلودگی (۴۸ تا ۷۲ ساعت) می‌تواند نشان از عملکرد گیاه از طریق ایجاد شرایط نامساعد برای محدودکردن مکانسیم بیماری‌زایی باکتری باشد. پلی‌فنیل‌اکسیداز از سدهای اولیه دفاعی می‌باشد که باعث تسریع اکسیداسیون فنل‌ها به رادیکال‌های آزاد شده و با مولکول‌های بیولوژیکی واکنش داده و ایجاد شرایط نامساعد برای توسعه پاتوژن می‌کند (۱۸). افزایش فعالیت فنل کل در رقم مقاوم ۷۲ ساعت پس از آلودگی می‌تواند نشان از فعالیت هم‌زمان چندین مکانیسم دفاعی در میزبان در مسیرهای مختلف مقاومت باشد.

در مجموع تجمع آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات فنلی نه تنها سبب مرگ باکتری (تاثیر روی غشا سلولی و یا مولکول‌های فعال بیوشیمیایی مثل لیپید، پروتئین و مولکول DNA) می‌شود بلکه سبب محدودیت تکثیر، حرکت و یا انتشار باکتری و تولید افکتورهای بیماری‌زا در مراحل بعدی در تعامل ناسازگار می‌گردد. افزایش فنل کل در رقم مقاوم خزر می‌تواند یکی از مکانیسم‌های مقاومت این رقم در برابر باکتری باشد (۴۴،۴۶،۲،۲۲).

روند تغییرات بیان ژن *PAL*

بررسی روند تغییرات ژن *PAL* نشان داد که میزان تجمع نسخه‌های رونویسی شده این ژن در ساعت ۱۲ پس از تلقیح در هر سه رقم به‌طور قابل توجهی افزایش یافت ولی نرخ آن در دو رقم مقاوم خزر و متحمل شیرودی در مقایسه با رقم خیلی حساس طارم اختلاف معنی‌داری داشت. به‌دنبال آن نرخ بیان این ژن به‌تدریج کاهش یافت. با این حال در ۲۴ ساعت پس از تلقیح همچنان در سطح پنج درصد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشته است (شکل ۷).



شکل ۷- روند تغییرات بیان ژن *PAL* در ارقام خزر، طارم محلی و شیرودی. مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح یک دهم درصد (***)، و در سطح یک درصد (**) و در سطح پنج درصد (*) بر اساس آزمون t

Figure 7. The trend of *PAL* gene expression changes in Tarom Shiroodi and Khazar rice cultivars.

در میان ژن‌های مقاومت جهت تولید ارقام مقاوم، ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) در تنظیم فرآیندهای رشد و نمو و پاسخ‌های دفاعی گیاهان از اهمیت ویژه ای برخوردارند (۴۰). در این پژوهش تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن *PAL*، نشانگر افزایش بیان این ژن در گیاهان پس از مایه‌زنی با بیمارگر بود، به‌طوری‌که بیان آن در گیاهان تا ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی که زمان اوج حمله بیمارگر است القا شد و به بیشترین میزان رونوشت خود رسید و به تدریج در ساعات پسین کاهش یافتند. بنابراین چنین برداشت می‌شود که کارآمد بودن این ژن یک پیش‌نیاز برای حفاظت اولیه گیاه در برابر بیمارگر است. در نهایت اوج بیان این ژن در ساعات اولیه (ساعت ۱۲) و به‌دنبال آن نقش مهم آن در روی ژن‌های پایین دست (انواع PRها) و تولیدات محصولات آن‌ها در بروز واکنش فوق حساسیت و یا پدیده SAR در رقم مقاوم سبب

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]
[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

مقاومت میزبان می‌گردد. نتایج این با تحقیق با سایر محققان هم‌خوانی دارد (۱۴). البته افزایش مجدد این ژن در ساعات ۹۶ شاید کمکی در جهت پایداری بیشتر مکانیسم‌های دفاعی از جمله ممانعت از انتشار باکتری و بروز افکتورهای بیماری‌زایی باشد.

این ژن یک ترکیب کلیدی سیگنال‌دهی برای فعال نمودن ژن‌های وابسته دفاعی، کاتالیزکننده‌ها، پروتئین‌های رسپتور و فاکتور رونویسی است (۳۶). تأثیر مهم این ژن در فعال شدن ژن‌های دیگر مثل *NPR1* و فعال شدن مسیر سیگنال SA و بروز پدیده مقاومت سیستمیک SAR همراه می‌باشد. اوج فعالیت آنزیم‌های پراکسیدازها و فنل کل از ۴۸ ساعت و پس از آن تا ۹۶ ساعت پس از آلودگی در این پژوه این نکته را تقویت می‌کند. این نتایج با سایر تحقیقات انجام گرفته هم‌خوانی دارد (۱۰،۱۴،۴۳). در تحقیقات مختلف نقش این ژن را در القای مقاومت به تنش‌ها به‌خصوص عوامل بیمارگر مورد تأیید قرار دادند. در برنامه اصلاحی عملکرد ژن‌های خانواده *PAL* در میزان مقاومت کمی (QTL) برنج در مقابل عوامل مختلف بیمارگر به‌ویژه بلاست، سوختگی غلاف و سوختگی باکتریایی ناشی از *Xoo* نشان داده شد که این ژن‌ها از کلیدی‌ترین عوامل دخیل در مقاومت کمّی می‌باشند و یک پتانسیل مقاومتی مناسب برای بهبود و توسعه طیف وسیعی از عوامل بیمارگر برنج می‌باشند (۳۹). مطالعه روی واریته‌های مختلف برنج نسبت به سوختگی باکتریایی برنج نشان داد که میزان وقوع بیماری[1] و نمودار پیشرفت بیماری (AUDPC) با میزان بیان فعالیت *PAL* مرتبط بوده و میزان بیان آن نقش مهمی در بروز مقاومت نسبت به باکتری ایفاء می‌کند (۳۵). افزایش نرخ بیان ژن*PAL* در رقم مقاوم ساحل نسبت به طارم محلی، حاکی از نقش این ژن در مقاومت گیاه برنج نسبت به باکتری عامل بیماری نواری قهوه‌ای (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*) می‌باشد (۱۴). مطالعات نشان داد اسیدسالیسلیک یک تنظیم‌کننده ضروری در سیستم دفاعی گیاه سویا می‌باشد که از دو مسیر *PAL* یا سنتز ایزوکوریزمات (ICS –isochorismate) مشتق می‌گردد. به‌نظر می‌رسد این مولکول‌ها فعال‌کننده اولیه مسیر دفاعی اسید سالسیلیک می‌باشد. خاموشی ایزوفرم *PAL* و ایزوفرم ICS نشان داده پاسخ دفاعی وابسته به سالسلیک‌اسید در مقابل بیمارگرهای باکتری مانند *Pseudomonas syringae* و قارچ *Phytophthora sojae* در سویا غیرفعال و در نهایت مقاومت میزبان شکسته می‌شود. این مطالعه همچنین نشان داد القا بیوسنتز SA به‌شدت وابسته به غلظت *PAL* می‌باشد (۳۲). در بررسی میزان بیان ژن *PAL* توأم با ژن‌های وابسته به بیمارزایی PR_1 و PR_2 و کاتالاز (*CAT*) در رقم مقاوم و حساس گوجه فرنگی نسبت به باکتری عامل پوسیدگی ساقه *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* از مخرب‌ترین بیمارگرهای گوجه فرنگی نشان داد میزان بیان ژن‌های PR_2 و *PAL* و *CAT* در رقم مقاوم نسبت به حساس به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. ولی در میزان بیان ژن PR_1 بین رقم حساس و مقاوم اختلاف معنی‌داری نبوده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد ژن‌های *PAL* به‌همراه PR_2 و *CAT* در پاسخ‌های دفاعی میزبان نسبت به باکتری *Pcc* نقش داشته و می‌توان در برنامه مدیریت اصلاحی به‌کار گرفت (۹). در بررسی عملکرد ژن‌های *PAL* (PAL_1–PAL_4) در مواجه با استرس‌های مختلف (از جمله باکتری *Pseudomonas syringae*) در گیاه آرابیدوپسیس نشان داد که جهش یافتن این ژن سبب کاهش سطح SA و به‌دنبال آن حساسیت نسبت به بیمارگر باکتری می‌گردد (۱۶).

این پژوهش نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانت آنزیمی چون گایکول پراکسیداز، سوپر اکسیددیسموتاز، کاتالاز و غیر آنتی‌اکسیدانت (ترکیبات فنلی) در کنار ژن *PAL* نقش مهمی در بروز مقاومت به بیمارگر در تعامل میان ارقام مقاوم برنج و باکتری *Xoo* دارد. نتایج به‌خوبی نشان دادند که القا و افزایش به‌موقع آنزیم‌ها و ژن *PAL* نقش مهمی در مقاومت رقم تجاری خزر در برابر بیماری ناشی باکتری عامل سوختگی برگ برنج داشته است. در پایان، این نکته حائز اهمیت است که وجود خلأ اطلاعاتی درباره این باکتری در ایران و حساسیت اغلب ارقام تجاری نسبت به باکتری و قابلیت بالای بیماری‌زای آن نیاز به مطالعه بیشتر میدانی و مولکولی ضروری می‌باشد. درعین حال با پیداشدن زمینه مقاومت در برخی ارقام امکان دست‌یابی به ارقام مهم تجاری به کمک علم بیوتکنولوژی و اصلاح ارقام حساس و عرضه ارقام تجاری مقاوم نسبت به باکتری *Xoo* در آینده را فراهم خواهم کرد.

منابع

1. Adhikari, T.B. and T.W. Mew. 1994. Resistance of rice to Xanthomonas oryzae pv. oryzae in Nepal. Plant Disease, 78(1): 64-67.
2. Akbari, M., R. Rezaei and H. Charegani. 2019. Evaluation of resistance of some rice cultivars to bacterial blight disease caused by to Xanthomonas oryzae pv. oryzae. Journal of Plant Protection (Agricultural Science), 24 (3): 59-70 (In Persian).
3. Ardales, E.Y., H. Leung, C.M. Vera Cruz, T.W. Mew, J.E. Leach and R. J. Nelson. 1996. Hierarchical analysis of spatial variation of the bacterial blight pathogen across diverse agroecosystems in philippines. Phytopathology, 86(3): 241-252.
4. Barker, D. 2002. Method for Inoculating rice with Xanthomonas. Plant Pathology Laboratory, Iowa State University, 203 pp.
5. Choodamani, M.S., P. Hariprasad, M.K. Sateesh and S. Umesha. 2009. Involvement of catalase in bacterial blight disease development of rice caused by Xanthomonas oryzae pv. oryzae. International Journal of pest Management, 55(2): 121-127.

1- Disease intensity, DI

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

6. Dazy, M., V. Jung, J.F. Férard and J.F. Masfaraud. 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. Chemosphere, 74(1): 57-63.
7. Deb, S., M.K. Gupta, H.K. Patel and V. Sontir. 2019. Xanthomonas oryzae pv. oryzae XopQ protein suppresses rice immune responses through interaction with two 14-3-3 proteins but its phospho-null mutant induces rice immune responses and interacts with another 14-3-3 protein. Molecular Plant Pathology, 20(7): 976-989
8. Debona, D., F.A. Rodrigues, J.A. Rios and K.J.T. Nascimento. 2012. Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by Pyricularia oryzae. Phytopathology, 102(12): 1121-1129.
9. Farahani, A.S., S.M. Taghavi, A. Afsharifar and A. Niazi. 2016. Changes in expression of pathogenesis-related gene1, pathogenesis-related gene2, phenylalanine ammonia-lyase and catalase in tomato in response to Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum. Journal of Plant Pathology, 98(3): 525-530.
10. Fitzgerald, H.A., M.S. Chern, R. Navarre and P.C. Ronald. 2004. Overexpression of (At) NPR1 in rice leads to a BTH-and environment-induced lesion-mimic/cell deathphenotype. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17(2): 140-151.
11. Giannopolitis, C.N. and S.K. Ries. 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology, 59(2): 309-314.
12. Gill, S.S. and N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930.
13. Goto, M. 1964. Kreseck and pale yellow leaf, systemic symptom of bacterial blight of rice caused by Xanthomonas oryzae (Uyeda & Ishiyama) Dowson. The Plant Disease Reporter, 48: 858-61.
14. Heydarinejad, A.M., V. Babaeizad and H.A. Rahimian. 2015. A study of the role of PR_2 and PAL genes in rice plant resistance to Acidovorax avenae subsp. avenae. Journal of Agricultural Biotechnology, 7(4): 67-82. (In persion)
15. Horgana, K.J. and J.O. Henderson. 2015. Resistance genes of Oryza sativa for Protection Against Xanthomonas oryzae pv. oryzae, the causative agent of bacterial leaf blight. Journal of Student Research, 4(1): 12-17.
16. Huang, J., M. Gu, Z. Lai, B. Fan, K. Shi, Y.H. Zhou and Z. Chen. 2010. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. Plant Physiology, 153(4):1526-1538.
17. Jiang, N., J. Yan, Y. Liang, Y. Shi, Z. He, Y. Wu, Q. Zeng, X. Liu and J. Peng. 2020. Resistance Genes and their Interactions with Bacterial Blight/Leaf Streak Pathogens (Xanthomonas oryzae) in Rice (*Oryza sativa* L.) an Updated Review. Rice, 13(1): 1-12.
18. Jockusch, H.1966. The role of host genes, temperature and polyphenol oxidase in the necrotization of TMV infected tobacco tissue. Jouurnal of Phytopatholology, 55: 185-192.
19. Khoshdaman, M., M. Niknejad Kazempour, A.S. Ebadi and F. Pedram. 2009. Identification of the causative agent of rice bacterial blight in farms of Gilan province, Journal of Plant Protection (Agricultural Sciences and Industries), 23(1): 50-57 (In Persian).
20. Khoshkdaman, M., A.A. Ebadi and D. Kahrizi. 2012. Evaluation of pathogencity and race classification of Xanthomonas oryzae pv. oryzae in guilan province-Iran. Agricultural Sciences, 3(4): 561-557.
21. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402-408.
22. Nino-Liu, D.O., P.C. Ronald and A.J. Bogdanove. 2006. Pathogen profile Xanthomonas oryzae pathovars: model pathogens of a model crop. Molecular Plant Pathology, 7(5): 303-324.
23. Oliveira, M.D.M., C.M R. Varanda and M.R.F. Félix. 2016. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. Phytochemistry Letters, 15: 152-158.
24. Rostami, M., A. Qasemi, H. Rahimian and V. Khosravi. 2010. Identification of Rice Seed Disease Diseases in Mazandaran Province. Summary of papers of the 19th Congress of Plant Protection. University of Tehran, page 420 pp (In Persian).
25. Sahebi, M., S. Tarighi, P. Taheri and M. Goldani. 2015. Diversity of Xanthomonas oryzae pv. oryzae Bacterial blight of rice. Journal of Plant Protection (Agricultural Sciences and Industries), 29(1): 23-31. (In Persian).
26. Sairam, R.K., K. Veerabhadra Rao and G.C. Srivastava. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Journal of Plant Science, 163: 1037-1046
27. Sayari, M., V. Babaeizad, M.A.T. Ghanbari and H.Rahimian. 2014. Expression of the pathogenesis related proteins, NH-1, PAL, and lipoxygenase in the Iranian Tarom and Khazar rice cultivars, in reaction to Rhizoctonia solani–the causal agent of rice sheath blight. Journal of Plant Protection Research, 54(1): 36-43.
28. Schaad, N.W., J.B. Joneas and C. Chun. 2001. Laboratory Guid for identification of plant pathogenic bacteria. (Third edition) St Paul, Minnestota, APS press, 373 pp.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

29. Schwessinger, B. and P.C. Ronald. 2012. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. Annual Review of Plant Biology, 63: 451-482
30. Seevers, P.M. and J.M. Daly. 1970. Studies on wheat stem rust resistance control at sr6 locus. 1-the role of phenolic compounds. Phytopathology, 6: 1322-1328.
31. Sharma, P., A.B. Jha, R.S. Dubey and M. Pessarakli. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany, 1: 1-26.
32. Shine, M.B., J.W. Yang, M. El-Habbak, P. Nagyabhyru, D.Q. Fu, D.Navarre and A. Kachroo. 2016. Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochorismate synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean. New Phytologist, 212(3): 627-636.
33. Sodhi, M., Y. Vikal, M.L.C. George, G.S. Bala, G.S. Mangat, M. Garg, J.S. Sidhu, and H.S. Dhaliwal. 2003. DNA fingerprinting and virulence analysis of Xanthomonas oryzae pv. oryzae isolates from Punjab, northern India. Euphytica, 130(1): 107-115.
34. Sofo, A., A. Scopa, M. Nuzzaci, A. Vitti. 2015. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. International Journal of Molecular Sciences, 16(6): 13561-13578.
35. Solekha, R., F.A. Susanto, T. Joko, T.R. Nuringtyas and Y.A. Purwestri. 2019. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) contributes to the resistance of black rice against Xanthomonas oryzae pv. oryzae. Journal of Plant Pathology, 102(2): 367-367.
36. Stotz, H.U., J.G. Thomson, Y. Wang. 2009. Plant defensins Defense, development and application. Plant Signaling and Behavior, 4(11): 1010-1012.
37. Tang, W. and J.R. Newton. 2005. Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (Pinus scorba L.) zygotic embryos. Plant Physiolgy and Biochemistry, 43: 760-769.
38. Thakur, M. and B.S. Sohal. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. ISRN Biochemistry.
39. Tonnessen, B.W., P. Manosalva, J.M. Lang, M. Baraoidan, A. Bordeos, R. Mauleon and J.E. Leach. 2015. Rice phenylalanine ammonia-lyase gene OsPAL4 is associated with broad spectrum disease resistance. Plant Molecular Biology, 87(3): 273-286.
40. Van Loon, L., M. Rep and C. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology, 44: 135-162.
41. Venturi, V. and C. Fuqua. 2013. Chemical signaling between plants and plant-pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology, 51: 17-37.
42. White, F.F. and B. Yang. 2009. Host and pathogen factors controlling the rice-Xanthomonas oryzae interaction. Plant Physiology, 150(4): 1677-1686.
43. Wildermuth, M.C., J. Dewdney, G. Wu and F.M. Ausubel. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature, 414(6863): 562-565.
44. Wu, W., X. Wan, F. Shah, S. Fahad and J. Huang. 2014. The role of antioxidant enzymes in adaptive responses to sheath blight infestation under different fertilization rates and hill densities. The Scientific World Journal. https://doi.org/10.1155/2014/502134
45. Yu, C., N. Wang, M. Wu, F. Tian, H. Chen, F. Yang and C. He. 2016. OxyR-regulated catalase CatB promotes the virulence in rice via detoxifying hydrogen peroxide in Xanthomonas oryzae pv. oryzae. BMC Microbiology, 16(1): 269.
46. Yuan, Y., S. Zhong, Q. Li, Z. Zhu, Y. Lou, L. Wang, J. Wang, M. Wang, Q. Li, D. Yang and Z. He. 2007. Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. Plant Biotechnology Journal, 5(2): 313-324.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]

Study of Biochemical and Molecular Changes of Iranian Rice Cultivars in Interaction with Bacterial Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Causes Leaf Blight Disease

Ahmad Drakhshan[1], Mohammad Salari[2], Valiollah Babaeizad[3], Naser Panjehkeh[2] and AbdolhosainTaheri[4]

1- Phd student, University of Zabol
2- Associate Professor University of Zabol
3- Associate Professor Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: babaeizad@yahoo.com)
4- Associate Professor University of Zabol
5- Associate Professor Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Received: 16 June, 2020 Accepted: 4 October, 2020

Abstract

Rice bacterial blight caused by Xanthamonos oryzae pv. oryzae is one of the most destructive bacterial diseases of rice in some areas of rice cultivation in the world, especially in the tropics of Asia. The low efficiency of disease management methods, especially chemical methods, has led to more research on recognizing resistant cultivars and understanding resistance mechanisms through the study of biochemical interactions and recognition of resistant genes. This study aimed to evaluate the resistance of 24 commercial Iranian rice cultivars against bacterial blight and to study some mechanisms of resistance at biochemical levels and the pattern of PAL gene expression by the qRT-PCR method. The results of the greenhouse assessment showed that different cultivars varied in the development of leaf spot length as the most important trait for disease evaluation. The Khazar and Nemat commercial cultivars at the highest level of resistance and the Tarom (mahalli) and Dilamani cultivars showed the highest sensitivity based on the evaluation index (quantitative resistance) of this disease. Biochemical evaluation of Catalase, guaiacol peroxidase, superoxide dismutase enzymes and total phenol in the resistant and sensitive cultivar shows the high activity of these enzymes in the resistant cultivar compared to the sensitive cultivar in the early hours after inoculation. The difference between resistant and sensitive cultivars was significant at the level of one percent. The PAL gene expression rate was also significantly higher in the resistant Caspian cultivar in the early hours (12h) after inoculation than the sensitive cultivar. Overall, it seems that the induction of the PAL gene and the subsequent increase in the accumulation of oxidative and antioxidant enzymes in the resistance of Khazar cultivar to the sensitive cultivar of Tarom, it is part of the defense mechanism of rice against Xoo bacteria.

Keywords: Commercial rice cultivars, Biochemical interactions, Screening, PAL, qRT-PCR

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-14]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.77]