زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 4، شماره 2، پاییز و زمستان 1392

شناسایی ژن کد کننده پروتئین pita در قارچ *Rhizoctonia solani* AG1-IA

سهیلا طالش ساسانی[1]، بهرام محمد سلطانی[2*]، مهرداد بهمنش[3]، ناصر صفایی[4]

1- دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
2- استادیار ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
3- دانشیار ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
4- دانشیار بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

* تهران، صندوق پستی 175- 14115
soltanib@modares.ac.ir
(دریافت مقاله: 93/5/13 پذیرش مقاله: 93/7/3)

چکیده- سوختگی غلاف برنج که به‌وسیله قارچ *Rhizoctonia solani* ایجاد می‌شود یکی ازمخرب‌ترین بیماری‌های برنج در سراسر جهان است. روش متداول مبارزه با این بیماری استفاده ازقارچ‌کش‌ها است که مشکلات جدیدی در پی دارد. بنابراین آشنایی با مکانیسم‌های سلولی و مولکولی میان‌کنش مابین پاتوژن و میزبان در مدیریت بیماری و به‌کارگیری روش‌های مؤثر کنترل بیماری ضروری است. دراین تحقیق با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک و PCR ژن کدکننده پروتئین پیتا (Pita) در سه سویه جغرافیایی مختلف، R1, A2 و T2 از ایران، شناسایی شد. توالی‌های ابتدای '5 از ژن پیتا در سویه‌های مورد مطالعه در نواحی اینترونی 100٪ و در نواحی اگزونی 99٪ تشابه داشتند که احتمال دخالت این ژن در بیماری‌زایی را مطرح می‌کند. از سوی دیگر احتمال ترشحی بودن آن با استفاده از مطالعه بیوانفورماتیک و نرم‌افزار SignalP پیش‌بینی شد که با توجه به شباهت زیاد (98٪) آن با ژن پیتا در *Magnaporthe oryzae* احتمال افکتور بودن این ژن در ریزوکتونیا را افزایش می‌دهد. برای اطمینان از این امر، تعیین توالی کامل ژن و مطالعه بیان آن در میان‌کنش گیاه-پاتوژن پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژگان: *Rhizoctonia solani*، پپتید راهنما، بلاست برنج، افکتور.

1- مقدمه

برنج یکی از مهمترین مواد غذایی مردم جهان و به ویژه آسیاست. بیماری‌ها از عوامل مهم محدود کننده میزان محصول برنج بوده و بیش از 70 بیماری در برنج شناسایی شده‌اند که مهمترین آن‌ها بیماری‌های بلاست[1] سوختگی قارچی غلاف[2] و سوختگی باکتریایی غلاف می‌باشند [2،1]. بیماری سوختگی غلاف ناشی از تهاجم قارچ *Rhizoctonia solani* (AG1-IA) [3] یکی از بیماری‌های مهم برنج در ایران و بیشتر کشورهای برنج خیز جهان محسوب می‌شود و در شرایط مساعد روی

1. Rice Blast

2. Rice Sheath Blight

ارقام پر محصول و حساس برنج در استان‌های گیلان و مازندران می‌تواند آلودگی‌های شدیدی ایجاد کرده و منجر به بروز خسارت شود. سوختگی غلاف برنج پس از بیماری بلاست مهمترین بیماری از نظر اقتصادی در بیشتر کشورهای برنج خیز آسیا محسوب می‌شود به طوری که موجب کاهش میزان محصول در این کشورها از 25 تا 50 درصد شده است [4،3]. اولین گزارش از این بیماری در ایران مربوط به سال 1363 از استان مازندران است [6،5]، اما با کشت گسترده ارقام حساس و استفاده از کودهای شیمیایی و نیز تغییرات ژنتیکی سریع قارچ، بیماری به سرعت گسترش یافت [6]. هم اکنون این بیماری در گیلان و مازندران روی ارقام مختلف از جمله ارقام بی‌نام و دم‌زرد (ارقام بومی) نیز دیده می‌شود. ریزوکتونیا سولانی، قارچ بازیدیومیست خاک‌زی است که انواع گیاهان مهم اقتصادی از جمله برنج، گندم، سویا، ذرت و سایر انواع گیاهان تک لپه‌ای و دولپه‌ای را مورد حمله قرار می‌دهد [7-9]. این قارچ شامل 14 گروه آناستوموزی (AG1-AG13, AG-BI) و تعدادی زیر گروه است که بر اساس شباهت ژنتیکی هیف‌ها و واکنش آن‌ها در گروه‌ها و زیر گروه‌های خاص قرار می‌گیرند. عامل اصلی سوختگی غلاف برنج در کشور ما متعلق به گروه AG1-IA است. شایان ذکر است که گزارش‌هایی مربوط به گروه AG1-IB نیز از مزارع شمال کشورمان وجود دارد [10-5].

به دلیل طیف میزبانی گسترده، تنوع ژنتیکی سریع، نبود ارقام مقاوم برنج و نیز بقای طولانی مدت پاتوژن (روی بقایای گیاهی آلوده و خاک) کنترل بیماری دشوار است. روش مؤثر و متداول مبارزه با سوختگی غلاف برنج استفاده از قارچ‌کش‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها است، اما این روش‌ها گران بوده و نیز به سبب آلوده ساختن محیط‌زیست و ظهور ارقام جدید و مقاوم پاتوژن مطلوب نیستند [11،10]. بنابراین برای دست‌یابی به روش‌های ایمن و مؤثر در کنترل و مدیریت بیماری، شناسایی ساختار ژنتیکی عامل بیماری و مکانیسم‌های مولکولی مؤثر در بیماری‌زایی و میان‌کنش گیاه- پاتوژن ضروری به نظر می‌رسد.

تعیین توالی ژنوم قارچ *R.solani* هنوز به طور کامل انجام نشده و از مکانیسم مولکولی بیماری‌زایی آن اطلاعات زیادی در دست نیست؛ اما اخیراً یک پیش‌نویس ژنومی[1] از این ارگانیسم منتشر شده است که در کشف مکانیسم بیماری‌زایی مفید خواهد بود [13،12،8]. هدف از این تحقیق، شناسایی یک ژن رمز دهنده پروتئینی است که احتمالاً در بیماری‌زایی قارچ نقش داشته و شناخت آن در چگونگی مدیریت بیماری مؤثر خواهد بود. اولین بار پروتئین Avr-Pita در جدایه برنج O137 آلوده شده به‌وسیله قارچ *Magnaporthe oryzae* شناسایی شد. این پروتئین به پروتئین‌های متالوپروتئاز قارچ‌ها شباهت داشت و تحقیقات نشان داد که این پروتئین محصول بیان یک خانواده ژنی متعلق به *M.oryzae* است که در بیماری‌زایی نقش مؤثری دارد [15،14]. در این تحقیق نشان داده شده که ژن *Avr_Pita* در ریزوکتونیا سولانی نیز وجود داشته و احتمالاً در بیماری‌زایی این قارچ نیز دخیل است.

2- مواد و روشها

2-1- تهیه جدایه‌های قارچ

اسکلروت‌های سه جدایه R1، A2 و T2 قارچ *R. solani* (AG1-IA) و یک ایزوله از *M. oryzae* از مؤسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) تهیه شد. ابتدا تکثیر قارچ در محیط کشت PDA و در شرایط محیطی مطلوب (دمای 28 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 98%) انجام شد. در مرحله بعد مقداری از هیف‌های به دست آمده در محیط مایع عصاره مخمر (5 g/l) داخل فلاسک‌های 500 ml کشت و فلاسک‌ها در دمای 28 درجه سانتی‌گراد و روی شیکر با دور 150 rpm قرار گرفتند.

1. Genome Draft

2-2- استخراج DNA

پس از پنج روز میسلیوم‌ها با استفاده از کاغذ واتمن از محیط کشت جدا و با آب مقطر استریل شستشو شده و استخراج DNA به روش صفایی و همکاران [16] با استفاده از بافر استخراج تریس (Tris 100mm, EDTA 5mm, NaCl) انجام شد. بدین ترتیب که پس از افزودن مقدار کافی بافر به میسلیوم له شده در ازت مایع و قرار دادن آن در بن ماری، سانتریفوژ در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و دور 10000 rpm انجام شد. سپس با اضافه کردن ایزوپروپانل سرد به محلول رویی و نگه‌داری در سرمای 20- درجه سانتی‌گراد به مدت 2 ساعت، دوباره سانتریفوژ انجام شد و به رسوب DNA آب دیونیزه و آنزیم RNase افزوده شد.

3-2- طراحی پرایمرها و PCR

یک کانتیگ[1] مربوط به ژنوم ریزوکتونیا سولانی (Contig65, Accession number JF701180) که به وسیله ریوکس وهمکاران [17] گزارش شده، با ژن *Avr_pita1* در پاتوژن عامل بلاست برنج (*M. oryzae*) 100% مشابهت نشان داد؛ بر این اساس پرایمر رو به جلو مطابق با ژنوم مگناپورت:

F1(5-ACATTATTTTTGCAATTATG-3) و پرایمر رو به عقب R1 (5-TTTTAAAATTATATGCACC-3) مطابق با کانتیگ گزارش شده، طراحی شد. سپس واکنش PCR با برنامه گرمایی 94 درجه 5 دقیقه و 35 چرخه شامل 94 درجه 30 ثانیه، 42 درجه 30 ثانیه و 72 درجه 1 دقیقه و نیز 72 درجه 10 دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (BioRad) انجام شد. محصول واکنش روی ژل آگارز 1٪ الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و مشاهده به وسیله دستگاه ژل- داک، از ژل استخراج و در ناقل کلونینگ pTG19 کلون شد. پرگنه‌های نوترکیب با استفاده از محیط کشت انتخابی شناسایی و پس از تأیید با کلنی -PCR، تکثیر این پرگنه‌ها در محیط کشت LB دارای آمپی‌سیلین و در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی‌گراد و شیکر با دور 250 rpm به مدت یک شبانه روز انجام گرفت. سپس استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج GeneAll انجام و قطعه کلون شده تعیین توالی شد .

4-2- مطالعه بیوانفورماتیک

مطالعه هم‌ردیفی[2] برای توالی به دست آمده (*Rhiz_Pita*) با استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی ClustalW[3] علیه ژن پیتا در *M. oryzae* انجام شد. همچنین با استفاده از نرم‌افزار SignalP[4]، توالی پپتید راهنما و ناحیه برش آن تعیین شد. احتمال ترشحی بودن محصول پروتئینی *Rhiz_Pita* نیز به‌وسیله نرم‌افزارهای TargetP[5] و PrediSi[6] پیش‌بینی شد.

5-2- مطالعه ژن *Rhiz_Pita* در دو جدایه جغرافیایی دیگر

ژنوم دو جدایه دیگر از قارچ ریزوکتونیا سولانی موسوم به R1 و T2 (جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف) نیز از نظر حضور ژن پیتا مطالعه شد. برای این منظور پرایمرهای اختصاصی بر اساس توالی به دست آمده از ژنوم A2، با عنوان F2[7] و R2[8] طراحی شدند. واکنش PCR با برنامه دمایی 94 درجه 5 دقیقه، 35 چرخه شامل 94 درجه 30 ثانیه، 62 درجه 30 ثانیه و 72 درجه 30 ثانیه و طویل شدن نهایی نیز در 72 درجه 10 دقیقه انجام شد. محصول واکنش (یک باند 500 bp) پس از الکتروفورز، رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و استخراج از ژل، به ناقل کلونینگ pTG19 منتقل و پس از تکثیر تعیین توالی شد.

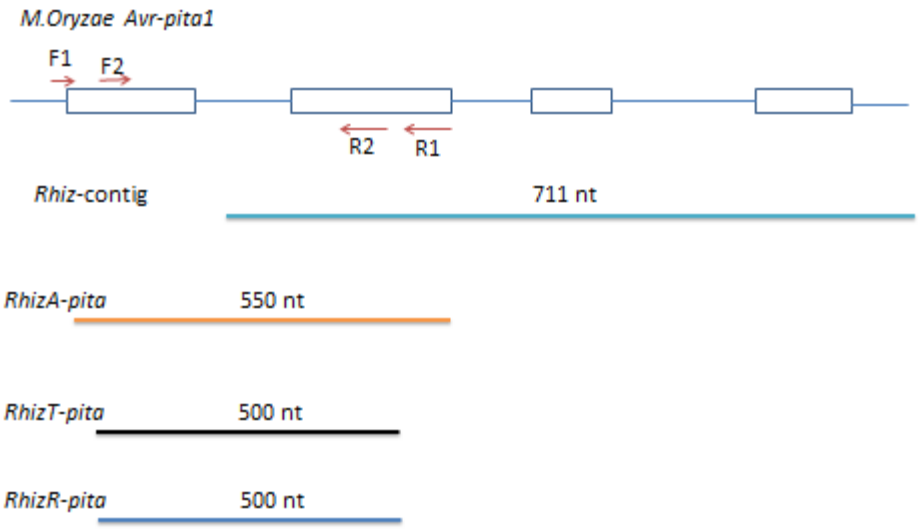
1. Contig

2. Alignment
3. (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)
4. (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)
5. (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP)
6. (www.bioinformatics.org/sms2)
7. (5'-AACATTGGCACCTTTTCACACCC-3')
8. (5'-CCGGCAGTAATTTCCCTGCTG-3')

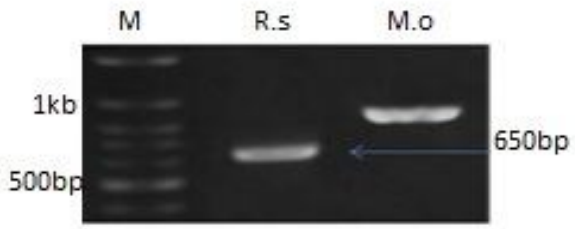
3- نتایج

3-1- شناسایی ژن پیتا در قارچ *Rhizoctonia solani*

پس از معرفی یک کانتیگ در ژنوم ریزوکتونیا سولانی به‌وسیله ریوکس و همکاران [12] که با ژن کد کننده پروتئین Avr-pita در قارچ مگنا پورت همولوژی زیادی داشت تصمیم گرفته شد که وجود این ژن در ایزوله‌های جغرافیایی مختلف شمال ایران مطالعه شود. چون کانتیگ گزارش شده شامل ناحیه ´3 از ژن پیتا بود، در وهله اول تعیین انتهای ´5 ژن ضروری به نظر می‌رسید، بنابراین پس از استخراج DNA از میسلیوم‌های جدایه جغرافیایی A2 واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای F1 و R1 انجام شد و محصول واکنش به صورت یک باند حدود 650 bp روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل 1). محصول PCR تعیین توالی شد که 550 باز آن به طور قابل اطمینان با ژن پیتای مگنا پورت مشابه بود و مطالعه هم ردیفی با استفاده از BLASTN و ClustalW انجام گرفت که با ژن *Avr_pita1* در مگناپورت 98٪ همولوژی و با کانتیگ مذکور 97٪ شباهت نشان داد (جدول 1). این توالی در سایت EMBL-EBI (Accession No.: LK999997) به ثبت رسید.



(الف)



(ب)

شکل 1 شناسایی ژن پیتا در DNAی ژنومی *R. solani* . الف) جایگاه پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی و تعیین طول کامل ژن ب) باند مربوط به ژن پیتا در ریزوکتونیا سولانی (Rs) و مگناپورت (Mo)

3-2- مطالعه بیوانفورماتیک پتانسیل ترشحی بودن پروتئین Rhiz-pita

با توجه به شباهت 98% توالی به دست آمده از ریزوکتونیا سولانی با ژن پیتا 1 در مگنا پورت گمان می‌رفت که توالی حاصل از ریزوکتونیا سولانی هم (مانند ژن پیتای مگنا پورت) توانایی تولید یک پروتئین ترشحی را داشته باشد. بنابراین به مطالعه ترشحی بودن محصول پروتئینی آن با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک ORF Finder ,SignalP, PrediSi و TargetP پرداخته شد. ابتدا قالب باز خواندن (ORF) ژن *Rhiz_Pita* در ایزوله A2 تعیین وسپس ناحیه پپتید راهنما مشخص شد که کاملاً مشابه ژن ارتولگ خود در مگنا پورت بوده و دارای توالی اسید آمینه یکسان پپتید راهنما در ابتدای ´5 بود و ناحیه برش آن نیز مابین هفدهمین وهجدهمین اسید آمینه است. این یافته، ترشحی بودن پروتئین حاصل از بیان ژن *Rhiz_Pita* را پیشنهاد می‌کند.

3-3- مطالعه ژن پیتا درجدایه‌های جغرافیایی دیگر

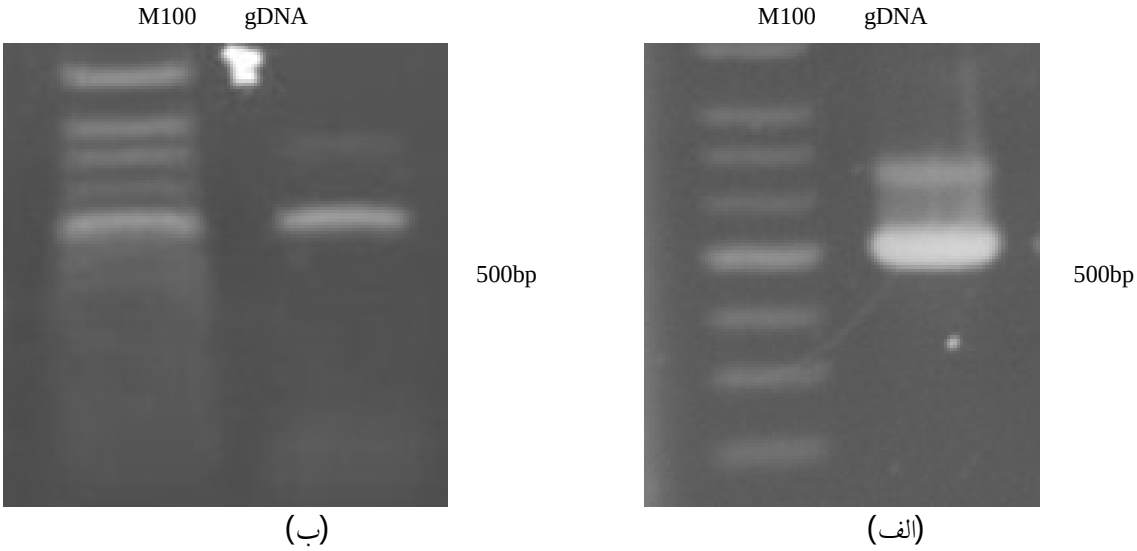
دو جدایه دیگر که از مزارع برنج شهرستان‌های رشت (R1) و تنکابن (T2) جمع‌آوری شده بودند [6] نیز برای شناسایی ژن پیتا مورد مطالعه قرار گرفتند. از میسلیوم‌های این جدایه‌ها نیز DNA استخراج شد و با پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی ژن *RhizA_Pita* (F2, R2) واکنش PCR انجام شد. شایان ذکر است برای هر دو جدایه، باند 500bp با استفاده از Nested PCR تأیید شد (شکل 2). پس از توالی‌یابی محصول واکنش و مطالعه هم‌ردیفی، وجود ژن پیتا در این دو جدایه نیز تأیید گردید که با شماره‌های LK999998 وLK999999 (به‌ترتیب برای جدایه‌های R1 و T2) در EMBL-EBI به ثبت رسیدند. توالی‌های شناسایی شده در این جدایه‌ها با ژن پیتا در مگناپورت 98٪، با کانتیگ گزارش شده از ریزوکتونیا 97٪ و نیز با *RhizA_Pita* 99٪ همولوژی نشان دادند (جدول 1).

4- بحث

برنج غذای عمده بسیاری از مردم جهان به ویژه قاره آسیا و از جمله مردم ایران است و در شمال کشورمان نیز کشت برنج، کشت و کار اصلی محسوب می‌شود. هر ساله قسمتی از محصول برنج به دلیل بیماری‌های مختلف از دست می‌رود و در این ارتباط بیماری‌های قارچی از عوامل بسیار مهم خسارت به مزارع برنج کشور به شمار می‌آیند.

جدول 1 همولوژی ژن پیتا در جدایه‌های مختلف R. solani AG1-IA بایکدیگروبا *M. oryzae*

	Mag-pita1	Mag-pita2	Mag-pita3	A Pita1	R Pita	T-pita	Riz-contig
Mag-pita1	-	٪92	٪71	٪98	٪98	٪98	٪100
Mag-pita2	-	-	٪71	٪92	٪92	٪92	٪91
Mag-pita3	-	-	-	٪71	٪71	٪69	٪71
A pita1	-	-	-	-	٪99	٪99	٪97
R Pita1	-	-	-	-	-	٪99	٪97
Riz-contig	-	-	-	-	-	٪97	-



شکل 2 شناسایی ژن پیتا در ژنوم جدایه‌های مختلف جغرافیایی الف) جدایه R ب) جدایه T

در این میان، سوختگی قارچی غلاف پس از بیماری بلاست از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [4] زیرا پاتوژن عامل بیماری (*Rhizoctonia solani* AG1-IA) قابلیت بقای طولانی مدت در مزرعه را دارد و نیز میزبان‌های متعددی مانند علف‌های هرز مزارع برنج به گسترش آن کمک می‌کنند [11]. ازسوی دیگر این پاتوژن قادر به تغییرات ژنتیکی سریع در اگزون‌های کد کننده افکتورها بوده وتاکنون هیچ رقم مقاوم در برنج برای آن شناسایی نشده است. توالی ژنومی ریزوکتونیا سولانی به طورکامل تعیین توالی نشده است و این موضوع می‌تواند به ناتوانی در کنترل بیماری بیافزاید.

روش رایج مبارزه با سوختگی قارچی غلاف برنج استفاده از قارچ‌کش‌هاست که به دلایل متعدد مانند آلوده ساختن محیط زیست، پیدایش نژادهای جدید عامل بیماری‌زا، نداشتن صرفه اقتصادی و ... روش مناسبی نیست. بنابراین شناسایی ژن‌های مؤثر در بیماری‌زایی و مکانیسم‌های مولکولی میان‌کنش گیاه–پاتوژن در اتخاذ روش‌های ایمن و مؤثر برای مدیریت و کنترل بیماری ضروری به نظر می‌رسد. پاتوژن‌های گیاهی به ویژه قارچ‌ها تعداد زیادی پروتئین تولید و ترشح می‌کنند که برای ایجاد بیماری در گیاه میزبان ضروری‌اند. بسیاری از پروتئین‌های مترشحه پاتوژن‌های گیاهی موسوم به افکتورها سیستم دفاعی گیاه را مهار کرده و فرایندهای سلولی را در جهت شرایط مورد نیاز خود به کار می‌گیرند. به این ترتیب با تغییر ساختار یا عملکرد سلول میزبان موجب بیماری‌زایی می‌شوند [12،13-18]. دراین فرایند، گیاه میزبان برای مقابله با افکتورها از پروتئین‌های دفاعی جدید استفاده می‌کند [19]. از سوی دیگر پاتوژن نیز با ایجاد تغییر در ساختار ژنی خود، افکتورهای جدیدی تولید می‌کند [19،20]. پروتئین‌های ترشحی و مؤثر در بیماری‌زایی ریزوکتونیا سولانی مورد توجه و مطالعات زیادی بوده است. جامع‌ترین آن‌ها در یک پیش‌نویس ژنومی انتشار یافته به‌وسیله ژنگ و همکاران [8] آمده است که در آن تعداد پروتئین‌های دخیل در میان‌کنش گیاه-پاتوژن، 257 عدد تخمین زده شده است.

خانواده ژنی *Avr_Pita* شامل سه ژن مختلف، اولین بار در قارچ *M. oryzae* شناسایی شد که دو عضو آن (پیتا1 و پیتا2) با تولید پروتئین‌های متالو پروتئاز خارج سلولی در بیماری بلاست برنج مؤثرند. پروتئین پیتای فعال در مگناپورت یک پروتئین 176 اسید آمینه‌ای است که در

میان‌کنش موسوم به gene- for- gene دخالت داشته و در پاسخ به تغییراتی که گیاه میزبان در ژن مقاومت ایجاد می‌کند، قارچ نیز به‌طور سریع در ژن مؤثر در بیماری‌زایی دچار تغییراتی می‌شود تا خاصیت بیماری‌زایی خود را حفظ کند. از سوی دیگر حضور پروتئین پیتا3 در انواع بیماری‌زا وغیر بیماری‌زای قارچ مگناپورت بیانگر دخالت این خانواده ژنی در سایر فرایندهای سلولی است. پروتئین‌های پیتا همانند سایر متالوپروتئازهای قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی به طرق مختلف مانند فراهم نمودن تغذیه پاتوژن، حمله به گیاه میزبان یا تحت کنترل گرفتن سیستم دفاعی میزبان در بیماری‌زایی نقش ایفا می‌کنند [14-17]. با توجه به اهمیت این ژن در بیماری‌زایی مگناپورت و با در نظر گرفتن همولوژی بسیار زیاد آن با کانتیگ گزارش شده به وسیله ریوکس و همکاران در یک جدایه از ریزوکتونیا سولانی، تصمیم گرفته شد که این ژن در برخی از جدایه‌های ریزوکتونیا سولانی عامل سوختگی غلاف در شمال ایران جستجو شود. نتایج این تحقیق نشان داد علی‌رغم آن که Chuma و همکاران و نیز Khang و همکاران وجود این ژن را منحصر به مگناپورت دانستند، ژن پیتا علاوه بر *M. oryzae* در قارچ مورد مطالعه نگارندگان نیز وجود دارد [14-20]. معمولاً پروتئین‌های افکتور دارای یک پپتید راهنما در ناحیه بالادست ژن خود هستند [21] که موجب هدایت پروتئین به خارج سلول می‌شود. بررسی *in silico* وجود پپتید راهنما را در ابتدای *RhizA_Pita* نشان داده است که همانند ژن پیتا در مگناپورت در ابتدای ژن قرار داشته و دارای یک ناحیه برش مابین هفدهمین و هجدهمین اسید آمینه در پروتئین کد شونده این ژن (پیش‌بینی شده با استفاده از نرم‌افزار بیوانفورماتیک) است. موضوع اخیر ترشحی بودن این محصول پروتئینی را پیشنهاد می‌کند. ژن‌های کد کننده افکتورها، برای فایق آمدن به مقاومت گیاه میزبان به‌طور مرتب تغییر می‌کنند که این تغییرات در نواحی اگزونی سریع‌تر و بیشتر از نواحی اینترونی است [22]. در تحقیق حاضر، مطالعه هم‌ردیفی ژن پیتا در سه جدایه جغرافیایی مختلف نشان دهنده همولوژی 100٪ در نواحی اینترونی وتفاوت‌های نوکلئوتیدی در اگزون‌هاست که می‌تواند دلیل دیگری بر افکتور بودن پروتئین حاصل از آن باشد. همچنین این یافته با نتایج طاهری و همکاران [23] مبنی بر آنکه ناحیه جغرافیایی عامل تعیین کننده ساختار ژنتیکی در ریزوکتونیا سولانی است، مطابقت دارد. البته برای اطمینان از حضور یک یا چند ژن پیتا در ریزوکتونیا سولانی عامل سوختگی غلاف، در جدایه‌های مختلف شناسایی توالی کامل ژن پیتا ضروری است. همچنین مطالعه آزمایشگاهی دخالت این ژن در میان‌کنش گیاه-پاتوژن و نیز استفاده از روش‌های عملی (مانند استفاده از پروتئین‌های گزارشگر) برای بررسی ترشحی بودن پروتئین مربوط پیشنهاد می‌شود. به طور کلی تحقیق حاضر نشان داد که ژن پیتا (ارتولگ ژن کد کننده Avr-Pita در قارچ عامل بلاست برنج) در قارچ ریزوکتونیا سولانی عامل سوختگی غلاف برنج وجود دارد. این ژن یک پروتئین ترشحی را کد می‌کند که احتمالاً در بیماری‌زایی قارچ مؤثر است. همچنین کوچک بودن پروتئین مذکور و تغییرات نوکلئوتیدی در نواحی اگزونی احتمال افکتور بودن آن را افزایش می‌دهد زیرا ترشحی بودن، کوچک بودن و تکامل سریع اگزونی از ویژگی‌های مهم افکتورهای پاتوژن‌های گیاهی است.

5- سپاسگزاری

در پایان از همکاری صمیمانه آقای دکتر فریدون پاداشت (مؤسسه تحقیقات برنج کشور-رشت) برای اهدای نمونه‌های قارچ تشکر و قدردانی می‌شود.

6- منابع

[1] Song F. and Goodman R. M., (2001), Molecular biology of disease resistance in rice,

Physiol Mol Plant P, 59, pp. 1-11.

[2] Brooks S. A., (2007). Sensitivity to a phytotoxin from *Rhizoctonia solani* correlates with sheath blight susceptibility in rice, Phytopathol, Vol. 97, No. 10, pp. 1207-1212.

[3] Krijger J-J., Horbach R., Behr M., Schweizer P., Deising H. B. and Wirsel S.G.R., 2008, The yeast signal sequence trap identifies secreted proteins on the hemibiotrophic corn pathogen *Colletitrichum graminicola*, MPMI (Molecular Plant- Microbe Interactions) Vol. 21, No. 10, pp. 1325-1336.

[4] نیک‌نژاد کاظم‌پور، مصطفی (1385). تأثیر جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* روی *Rhizoctonia solani Kuhn* عامل بیماری سوختگی غلاف برنج، مجله علمی- پژوهشی علوم کشاورزی، دانشگاه آزاداسلامی واحدعلوم وتحقیقات، سال دوازدهم، شماره (4) 1385، ص.ص. 729-745.

[5] Mohammadi M., Banihashemi M., Hedjarude G.-A. and Rahimian H., (2003). Genetic diversity among Iranian isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn anastomosis group 1 subgroups based on isozyme analysis and total soluble protein pattern, J. Phytopathol 151, pp. 162-170.

[6] Padasht-Dehkaai F., Ceresini P.C., zala M., Okhovvat S.M., Nikkhah M.J. and McDonald B.A., (2013). Population genetic evidence that basidiospores play an important role in the disease cycle of rice-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in Iran, Plant Pathol., 62, pp. 49-58.

[7] Taheri P. and Tarighi S., (2010). Cytomolecular aspects of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*, Eur J Plant pathol, Published Online.

[8] Zheng A. et al., (2013). The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen, Nature communications, Dol: 10.1038 Ncomms 2427.

[9] Hollier Clayton A. and Groth D.E., (2009). Sheath Blight of Rice, Louisiana Plant Pathol., Online Published.

[10] Surpili M. J., (2002). A yeast-based model system for cloning secreted and membrane proteins, An Acad Bras Cienc, 74(4), pp. 599-608.

[11] Kumar K. V. K. et al., (2009). Sheath blight disease of rice (*Oryza sativa* L.)- An overview, Biosci., Biotech. Res. Asia, Vol. 6(2), pp. 465- 480.

[12] Tatiana A. Valueva, Natalia N. Kudryavsteva, Alexis V. Sofin, Tatiana A. Revin, Ekaterina L. Gvozdeva and Elena V. Ievleva, (2011). Comparative analyses of exoproteinases produced by three phytopathogenic microorganisms, Journal of Pathogens, Research Article, Article ID 947218.

[13] Lee S.-J., Kelley B.S., Damasceno C.M.B., Bonnie St. John, Byung- Sookim, Byung-Dong Kim and Jocelyn K.C. Rose, (2006). A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in plants, MPMI(Molecular Plant-Microbe Interactions), Vol. 19, No. 12, pp. 1368-1377.

[14] Khang Chang Hyun, (2008). Genome Organization and Evolution of the *AVR-Pita* Avirulence Gene Family in the *Magnaporthe grisea* Species Complex, MPMI Vol. 21, No. 5, 2008, pp. 658–670.

[15] Orbach M. J. et al., (2000). A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. Plant Cell 12, pp. 2019–2032.

[16] Safaie N. et al., (2005). Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of Fusarium graminearum, the causal agent of wheat head blight. Iran J Plant Pathol 41, pp. 171–189.

[17] Rioux R. et al., (2011). Comparative analysis of putative pathogenesis-related gene expression in two *Rhizoctonia solani* pathosystems, Curr Genet, 57, pp. 391–408.

[18] Stergiopoulos I. and Wit P. J. D., (2009). Fungal effector proteins, Annu. Rev. Phytopathol., 47, pp. 233-63.

[19] Chisholm S. T. et al., (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response, Cell 124, pp. 803–814. February 24.

[20] Chuma et al., (2011). Multiple Translocation of the *AVR.Pita* Effector Gene among Chromosomes of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* and Related Species, PLOS Pathogens, Vol. 7, Issue 7.

[21] Goo J. H. et al., (1999). Selection of *Arabidopsis* genes encoding secreted and plasma membrane proteins, Plant. Mol. Biol.41, pp. 415–423.

[22] McCann H. C. and Guttman S., (2008). Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant–microbe interactions, New Phytol., 177, pp. 33–47.

[23] Taheri P. et al., (2007). Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. Associated with rice sheath diseases in India, Phytopathology, Vol. 97, No. 3.