Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Evaluation of the morphological and molecular response of several tobacco cultivars to the tobacco fire blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Amin Zoroofian

MSc graduate, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University OF Tehran Varamin Pishva Branch, Varamin, Iran. E-mail: amin.zoroofian@gmail.com

Milad Habibi Daronkolaei

Researcher, Department of Plant Protection, Agronomy Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: milad.habibi08@gamil.com

Valiollah Babaeizad

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Protection, Agronomy Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: babaeizad@yahoo.com

Abstract

Objective

One of the most significant challenges facing human society today is food safety and security. The chemical management of plant pests and diseases has led to an increase in environmental pollutants. Therefore, it is essential to find alternative methods for combating these diseases. In this context, genes that confer resistance to pathogens represent valuable genetic resources for managing plant diseases. This study aimed to analyze the expression of several genes that regulate resistance and sensitivity in cultivars with varying degrees of susceptibility to the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*Pst*), the causative agent of wild tobacco blight.

Materials and methods

Initially, six tobacco cultivars were prepared and cultivated. After seven weeks, the seedlings were inoculated with *Pst* bacteria. Based on the diameter of the necrotic tissue and the assessment of bacterial growth and proliferation, resistant and susceptible cultivars were identified and selected for subsequent stages of cultivation. To determine the expression patterns of genes involved in resistance, leaves from the seven-week-old seedlings were sampled at various time points post-inoculation (0, 12, 24, 48, and 72 hours), and total RNA was extracted from these samples. Subsequently, complementary DNA (cDNA) was synthesized from the RNA. The

expression profiles of the *WRKY*, *PAL*, *PR1*, *PR2*, and *PR5* genes were analyzed using the qPCR technique.

Results

Based on the results of the necrotic tissue diameter and bacterial growth and proliferation tests, the Basma cultivar was identified as resistant, while the White Burley cultivar was classified as susceptible. The examination of gene expression activity for resistance-related genes, including *WRKY*, *PAL*, *PR1*, *PR2*, and *PR5*, revealed a significant increase in expression in the resistant Basma cultivar compared to the susceptible White Burley cultivar following inoculation.

Conclusions

The findings of this study indicate that certain genes play a crucial role in plant defense responses. These genes are involved in the mechanisms of resistance and sensitivity of tobacco plants in their interactions with *Pst* bacteria. They genes may serve as promising targets for the development of transgenic plants that exhibit resistance to diseases. However, further detailed and complementary studies are necessary.

Keywords: Chemical management, Resistance Cultivar, Resistance genes, Sensitive cultivar, Transgenic plants

Paper Type: Research Paper

Citation: Zoroofian, A., Habibi Daronkolaei, M., & Babaeizad, V. (2026). Evaluation of the morphological and molecular response of several tobacco cultivars to the tobacco fire blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Agricultural Biotechnology Journal,* 18(1), 27-54.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(1), 27-54. DOI: 10.22103/jab.2025.25081.1685

Received: September 28, 2025. Received in revised form: November 01, 2025.

Accepted: November 02, 2025. Published online: January 15, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

Introduction

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), an important economic crop, is exposed to a wide range of biotic and abiotic stresses that significantly impact its yield and quality. Among the biotic stresses, tobacco fire blight is a common disease in tobacco cultivation. The pathogen responsible for tobacco fire blight is *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*Pst*). Currently, chemicals remain the primary strategy in fire blight management. Although somewhat effective, the widespread use of chemicals has led to various issues, including low efficiency, disruption of soil microbial

ecosystems, potential risks to human health, and the persistence of excessive chemical amounts. Plants possess a highly specialized defense system, which includes mechanisms that are activated before and after various stresses to protect plants. Proteins that play a crucial role in plant defense emerge after stress formation. Among these proteins, pathogenesis-related (PR) proteins are particularly important as they can induce the plant's innate immune system. PR proteins have the ability to inhibit pathogen growth or prevent spore germination. In addition, these proteins can act as antimicrobial agents, hydrolases, and proteinase inhibitors, among other functions. Strategy for disease management involves transferring resistance genes to various tobacco cultivars, while technological advancements can introduce advanced traits to produce plants with greater resistance to various stresses. Therefore, this study examines the resistance of different plant cultivars to fire blight and analyzes the expression of *PR* genes in susceptible and resistant cultivars. The information obtained can aid future research in genetic modification of resistant plants and the development of disease control management methods. This study marks the first time work is being conducted on these cultivars.

Materials and methods

In the research, six varieties including Basma, White Burley, Burley, Virginia, Samsoun and Xanthi were initially obtained from the Iran Tobacco Research Institute-Tirtash. The seeds were surface disinfected and then sown in pots containing autoclaved soil, which were later transferred to the growth chamber. A suspension with a concentration of 1×10^7 CFU/ml per milliliter was prepared from a two-day culture of *Pst* bacteria in NA culture medium. For inoculation, approximately 20 microliters of the suspension were injected into the interleaf space of the youngest two leaves of each seven-week-old plant using a special syringe. The pots were then returned to the growth chamber and after 4 days, the diameter of the necrotic spot in the inoculated seedlings was measured. To evaluate the growth and proliferation of bacterial populations in different tobacco cultivars, five leaf discs with a diameter of 5 mm were taken from healthy leaves of each cultivar and immersed in a bacterial suspension with a concentration of 1×10^7 CFU/ml for 20 minutes. The leaf discs were then transferred to a growth chamber, surface sterilized and powdered after 4 days. Subsequently 1 ml of 10 mM $MgCl_2$ solution was prepared for each sample to a dilution of 10^{-10} and all dilutions were transferred to King B culture medium. The number of colonies was counted after 48 hours to identify resistant and susceptible cultivars for further steps. To determine the expression pattern of genes involved in resistance, leaves of seven-week-old seedlings were sampled at different times after inoculation (0, 12, 24, 48 and 72) and total RNA was extracted. Complementary strand DNA (cDNA) was then synthesized from the RNA

samples. The profiles of the *WRKY*, *PAL*, *PR1*, *PR2*, and *PR5* genes were investigated using the qPCR technique.

Results

The study revealed that in the resistant cultivar, the expression levels of the genes being studied increased after inoculation. These genes play a crucial role in eradicating bacteria, limiting their presence to the site of injection and preventing further penetration and spread. On the other hand, the susceptible cultivar exhibited lower expression levels of these genes, creating conditions for bacterial multiplication and spread among leaf cells. Therefore, utilizing resistant cultivars can effectively contribute to disease control in a manner that is both efficient and environmentally friendly. Additionally, the bacterial population was also the lowest in the Basma cultivar and the highest in the White Burley cultivar. The expression level of the *WRKY12* gene in both cultivars reached its maximum value 12 hours after inoculation, but the expression level of this gene in the Basma cultivar was approximately 10 times higher than that of the White Burley cultivar at the same time. The expression pattern of the *PAL* gene in the resistant cultivar Basma reached its maximum value 24 hours after inoculation, with the expression level of this gene being about 13 times higher than that of the control sample. In contrast, the White Burley cultivar did not show any specific activity at different times after inoculation. The expression of the *PR1* gene in both cultivars increased significantly during the first hours after inoculation. In Basma, this increase was observed to be as high as 1496-fold compared to time zero, while in White Burley, this amount was 412-fold. *PR2* gene expression also reached its highest level in both genotypes 12 hours after infection, with this increase being 7 and 3 times the initial value in resistant and susceptible cultivars, respectively. Furthermore, the *PR5* gene expression pattern in Basma reached its peak after 12 hours, with its level being 91 times that of the control plant and 2.75 times higher than that of the White Burley cultivar measured at the same time. The results of tracking the fluctuations of *Pst* bacterial population in Basma and White Burley cultivars with the *hrp* gene showed that the bacterial population level was higher in the susceptible cultivar than in the resistant cultivar 24 hours ofter infection.

Conclusions

This study demonstrated that in the resistant cultivar, the expression level of the studied genes increased after inoculation. These genes are essential in eliminating the bacteria, restricting their presence to the injection site, and halting further penetration and spread. In contrast, the susceptible cultivar exhibited lower expression levels of these genes, creating favorable conditions for bacterial multiplication and spread among leaf cells. The findings of this study

highlight that utilizing resistant cultivars can effectively aid in disease control in a sustainable and eco-friendly manner.

Author Contributions

The work was conceived and supervised: Babaeizad V, Material preparation, data collection, and analysis were performed: Zoroofian A and Habibi Daronkolaei M, Writing-original draft preparation: Zoroofian A and Babaeizad V, Writing-review and editing: Babaeizad V and Habibi Daronkolaei M. All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

The datasets generated during the current investigate are not publicly, but are available from the corresponding author upon reasonable request, subject to approval by the relevant institutional review board.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to all participants who contributed to this study. We also acknowledge the research department of plant pathology at Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

Ethical Considerations

The study was approved by the Ethics Committee of the Islamic Azad University OF Tehran Varamin Pishva Branch. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

This study was conducted using funds provided by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸
دانشگاه شهید باهنر کرمان
انجمن بیوتکنولوژی ایران

ارزیابی واکنش مورفولوژیکی و مولکولی چند رقم توتون در مقابل باکتری عامل آتشک توتون *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

امین ظروفیان

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیمارشی شناسی گیاهی، دانشگده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، تهران، ایران. رایانامه: amin.zoroofian@gmail.com

میلاد حبیبی درونکلایی

پژوهشگر، گروه گیاهپزشکی، دانشگده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: milad.habibi08@gamil.com

ولی‌اله بابایی زاد

*نویسنده مسئول: استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشگده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه:babaeizad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۶ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۹/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۰

چکیده

هدف: یکی از بزرگترین چالش‌های جامعه بشری مسئله امنیت و سلامت غذای است. مدیریت شیمیایی آفات و بیماری‌های گیاهی منتج به افزایش میزان آلوده کننده‌های زیست محیطی شده است. لذا یافتن روشی جایگزین جهت مقابله با بیماری‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا ژن‌های مسئول مقاومت در گیاهان نسبت به عوامل بیماری‌زا ، منابع ژنتیکی با ارزشی هستند که می‌توان از آن‌ها در جهت مدیریت بیماری‌های گیاهی استفاده کرد. در این تحقیق با هدف آنالیز بیان چند ژن کنترل کننده مقاومت و حساسیت در ارقام با درجات مختلف حساسیت در برابر باکتری *Pseudomonas syringae* pv.*tabaci* (*Pst*) عامل سوختگی وحشی توتون استفاده شد.

مواد و روش‌ها: در ابتدا شش رقم توتون تهیه و کشت شدند و پس از هفت هفته، گیاهچه‌ها به باکتری *Pst* آلوده شدند سپس بر اساس میزان قطر بافت نکروزه و آزمون میزان رشد و تکثیر باکتری انجام گرفت در نتیجه، ارقام مقاوم و حساس شناسایی شده و برای مراحل بعدی انتخاب و کشت شدند. جهت تعیین الگوی بیان ژنهای دخیل در مقاومت از برگ های گیاهچه های هفت هفته

ای در ساعات مختلف پس از تلقیح (صفر، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲) نمونه برداری شده و RNA کل از آن ها استخراج شد. سپس از روی نمونه های RNA رشته مکمل DNA (cDNA) سنتز شد پروفایل ژن‌های *WRKY*، *PAL*، *PR1*، *PR2* و *PR5* مورد بررسی با تکنیک qPCR انجام گردید.

نتایج: بر اساس نتایج قطر بافت نکروزه و آزمون میزان رشد و تکثیر باکتری، رقم Basma به عنوان رقم مقاوم و رقم White Burley به عنوان رقم حساس شناخته شدند. بررسی فعالیت بیان ژن‌های مسئول بروز مقاومت *WRKY*، *PAL*، *PR1*، *PR2* و *PR5* در رقم مقاوم Basma نسبت به رقم حساس White Burley پس از مایه زنی به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که این ژن‌ها نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی گیاه ایفا می‌کنند و در مکانیسم‌های مقاومت و حساسیت گیاه توتون در تعامل با باکتری *Pst* نقش دارند و می‌توانند به‌عنوان اهدافی مناسب برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند. با این حال نیازمند انجام مطالعات تکمیلی و دقیق‌تر است.

کلیدواژه‌ها: رقم حساس، رقم مقاوم، ژن‌های مقاومت، گیاهان تراریخته، مدیریت شیمیایی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ظروفیان امین، حبیبی درونکلایی میلاد، بابایی‌زاد ولی‌اله (۱۴۰۵) ارزیابی واکنش مورفولوژیکی و مولکولی چند رقم توتون در مقابل باکتری عامل آتشک توتون *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۱)، ۲۷-۵۴.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) به عنوان یک محصول اقتصادی مهم، در معرض طیف گسترده‌ای از تنش‌های زیستی و غیرزیستی است که به طور قابل توجهی بر عملکرد و کیفیت آن تأثیر می‌گذارد (Dixon et al., 2018; Hussain et al., 2023). علاوه بر این، از این گیاه برای بررسی تعاملات میان گیاه و میکروب نیز استفاده می‌گردد (Xing et al., 2022). در میان تنش‌های زیستی، بیماری‌های باکتریایی برگی که شامل آتشک و لکه برگی زاویه‌دار است منجر به خسارات اقتصادی قابل توجهی به صنعت توتون می‌گردند (Taguchi et al., 2010; Guo et al., 2020). بیماری آتشک توتون از بیماری‌های رایج در مناطق اصلی کشت توتون در سراسر جهان محسوب می‌شود. این بیماری عمدتاً شاخ و برگ گیاه را آلوده کرده و باعث کاهش چشمگیر محتوای کلروفیل و ماده خشک می‌شود در نتیجه باعث کاهش قابل توجه عملکرد محصول می‌شود (Cheng et al., 2016). پاتوژن مسئول بیماری آتشک توتون، *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* است که یک باکتری گرم منفی میله‌ای شکل

کوتاه است (Hockett et al., 2013; Marpu et al., 2017; Huang et al., 2022). عوامل متعددی از جمله کشت گسترده ارقام فاقد مقاومت در برابر این بیماری، استفاده از یک واریته خاص و سایر دلایل، تأثیر قابل توجهی در شدت این بیماری داشته‌اند. در حال حاضر، کنترل شیمیایی همچنان به عنوان استراتژی اصلی در مدیریت بیماری آتشک مورد استفاده قرار می‌گیرد. هرچند این روش‌تا حدی مؤثر است اما کاربرد گسترده مواد شیمیایی مشکلات مختلفی از جمله راندمان پایین، اختلال در اکوسیستم‌های میکروبی خاک، خطرات بالقوه برای سلامت انسان و باقی‌ماندن مقادیر بیش از حد مواد شیمیایی را به همراه داشته است (Lammoglia et al., 2017; Gutiérrez-Barranquero et al., 2019; He et al., 2021; Bundalovic-Torma et al., 2022; Cech et al., 2023). گیاهان عالی موجوداتی ثابت و بدون قابلیت حرکت هستند، این ویژگی به‌عنوان نقطه‌ضعف آن‌ها در برابر تنش‌ها محسوب می‌شود. با این وجود، در طول تکامل، یک سیستم دفاعی بسیار تخصصی ایجاد شده است (Li et al., 2020). این سیستم دفاعی تخصصی شامل مکانیسم‌هایی است که قبل و بعد از انواع تنش‌ها فعال شده و توانایی محافظت از گیاهان را دارند (Freeman & Beattie 2008; Souza et al., 2017; Mhlongo et al., 2018; Nishad et al., 2020). در میان مکانیسم‌هایی که پس از تشکیل پدید می‌آیند، پروتئین‌هایی حضور دارند که نقش حیاتی در دفاع گیاه ایفا می‌کنند. از جمله این پروتئین‌ها، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR[1]) اهمیت ویژه‌ای دارند چرا که توانایی القای سیستم ایمنی ذاتی گیاه را دارا هستند (Finkina et al., 2017; Ali et al., 2018; Nguyen et al., 2021; Yuan et al., 2021). پروتئین‌های PR قابلیت مهار رشد پاتوژن یا جلوگیری از جوانه‌زنی اسپور را دارند. علاوه بر این، این پروتئین‌ها می‌توانند به عنوان عوامل ضدمیکروبی، هیدرولازها و مهارکننده‌های پروتئیناز عمل کرده و همچنین فعالیت‌های دیگری انجام دهند (Jain & Khurana 2018; Zribi et al., 2021). در این پژوهش بیان ژن‌های *WRKY*، *PAL*، *PR1*، *PR2* و *PR5* بررسی می‌گردد پروتئین‌های WRKY نقش کلیدی و اساسی در سیگنال‌دهی و پاسخ‌های دفاعی ایفا داشته و در مسیر پایین‌دست MAPK نقش داشته و دفاع گیاه را افزایش می‌دهد (Mao et al., 2011; Sheikh et al., 2016). نشان داده شده است باند شدن فاکتورهای رونویسی *WRKY* به DNA برای فعال سازی ژن‌های *PR* مهم است (Van loon et al., 2006). و از طرفی دیگر *PAL* نیز یک ژن دفاعی تنظیمی مهم است که در میزان بیان ژن‌های دیگر نقش دارد (Yang et al., 2022). پروتئین‌های PR1 در میان گیاهان از نظر ساختاری بسیار حفظ شده‌اند این امر بیانگر آن است که این پروتئین‌ها نقش مهم و عمومی در واکنش گیاه به تنش‌های زیستی ایفا می‌کنند (Lincoln et al., 2018). به نظر می‌رسد این پروتئین بر روی غشا موثر باشد (Vidhyasekaran 2002)، پروتئین‌های PR2 (β-glucanases) فعالیت بتا-۱و۳-گلوکانازی نشان می‌دهند. *PR2* نقش دوگانه‌ای دارد بدین صورت که هم به صورت مستقیم اجزای ساختاری دیواره سلولی باکتری را تخریب می‌کند و به صورت غیرمستقیم نیز با آزاد کردن محرک‌ها پاسخ‌های دفاعی در گیاهان را بالا می‌برد (Stintzi et al., 1993) و پروتئین‌های متعلق به خانواده PR5 این پروتئین نفوذپذیری غشا و دیواره سلولی عوامل بیماری‌زا را تغییر می‌دهد (Kitajima & Sato 1999; Vidhyasekaran 2002). یکی از راهکارهای مدیریت

[1] Pathogenesis-Related

این بیماری، انتقال ژن‌های مقاومت به این بیماری در ارقام گوناگون توتون است (Batchvarova et al., 1998) و نوآوری‌های فناوری قادرند گیاهانی را تولید کنند که در برابر انواع تنش‌ها مقاومت بالاتری داشته باشند (Engqvist & Rabe 2019; Hernández-De Lira wt al., 2022). لذا، این پژوهش به بررسی مقاومت ارقام مختلف گیاهان در برابر بیماری آتشک و تحلیل بیان ژن‌های *PR* در ارقام حساس و مقاوم پرداخته می‌شود. اطلاعات به‌دست‌آمده می‌تواند به تحقیقات آینده در زمینه اصلاح ژنتیکی گیاهان مقاوم و توسعه روش‌های مدیریتی برای کنترل بیماری‌ها کمک کند. در این تحقیق، برای اولین بار بر روی این ارقام کار می‌شود.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهچه‌های همسان: بذور مربوط به شش رقم Basma، White Burley، Burley، virginia، Samsoun و Xanthi از انستیتو تحقیقات توتون ایران–تیرتاش بهشهر دریافت شد. برای از بین بردن آلودگی‌های سطحی بذور، ضد عفونی سطحی انجام شد. برای این کار ابتدا بذور به مدت یک دقیقه در اتانول ۵۰ درصد قرار گرفت سپس در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و پس از آن سه بار با آب مقطر شستشو شد. پس از ضدعفونی سطحی، تعداد ۲۵ بذر از هر رقم را در گلدان‌های حاوی خاک اتوکلاو شده کاشته سپس گلدان‌ها به اتاقک رشد تحت شرایط دمایی ۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰ درصد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

تهیه و کشت سویه استاندارد باکتری *Pst*: سویه استاندارد باکتری *Pst* از کلکسیون باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی دانشگاه گوتینگن آلمان (GCPB) با شماره کاتالوگ GCPB113 و شماره ثبت 460134043 اهدایی از طرف دکتر خدایگان، گروه گیاهپزشکی دانشگاه ولیعصر رفسنجان، تهیه و در محیط آگار غذایی حاوی قند[۲] به مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد داده شد. تک کلون‌های رشد یافته به منظور انجام آزمون‌های بعدی انتخاب و در محیط محیط آگار غذایی کشت داده شد (Basavand & Khodaygan 2020).

تست بیماری‌زایی: کشت دو روزه باکتری *Pst* در محیط کشت NA را دو مرتبه شسته و محتویات پتری را در محلول ۱۰ میلی مولار $MgCl_2$ غوطه‌ور کرده سپس سوسپانسونی با غلظت ۱×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر[۳] در هر میلی لیتر تهیه گردید. برای مایه زنی حدود ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله به وسیله سرنگ مخصوص تزریق به فضای میان برگی برگهای توتون تزریق شد. از محلول ۱۰ میلی مولار $MgCl_2$ نیز برای تزریق در شاهد منفی استفاده شد.

[۲] Nutrient Agar Sucrose
[۳] Colony-Forming Unit (CFU)

مایه زنی باکتری عامل بیماری به گیاه: از کشت دو روزه باکتری *Pst* در محیط کشت NA سوسپانسونی با غلظت ۱×۱۰^۷ CFU/ml در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. برای مایه زنی، حدود ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله به وسیله سرنگ مخصوص به فضای میان برگی جوانترین دو برگ هر گیاه شش هفته‌ای تزریق شد و سپس گلدان‌ها مجدداً به اتاقک رشد برگردانده شد.

ارزیابی مورفولوژیکی برهمکنش باکتری با گیاه: پس از بروز علائم بیماری به مدت ۴ روز گسترش قطر لکه نکروزه در گیاهچه‌های تلقیح شده اندازه‌گیری و تجزیه واریانس در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار، مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD، تحلیل‌های آماری به کمک نرم افزار SAS 9.1 و ترسیم نمودارها به کمک نرم افزار Excel انجام گرفت.

آزمون میزان رشد باکتری در ارقام مختلف گیاه توتون: جهت ارزیابی میزان رشد و تکثیر جمعیت باکتری در ارقام مختلف توتون از برگ‌های سالم هر رقم به تعداد پنج دیسک برگی به قطر ۵ میلی‌متر برداشت و برای ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری با غلظت ۱×۱۰^۷ CFU/ml غوطه‌ور نموده و پس از آن، قطعات برگ مربوط به هر رقم به پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب گذاشته شده و پتری‌دیش‌ها به اتاقک رشد منتقل شدند.. پس از ۴ روز از آلوده سازی، دیسک‌های برگی جهت استریلیزاسیون سطحی به مدت ۱ دقیقه در محلول ۱۵ درصد هیدروژن پراکسید[۴] غوطه‌ور شده و پس از دو بار شستشو با آب مقطر استریل قطعات برگی در هاون چینی استریل قرار داده و پودر شدند. در مرحله بعد، پس از اضافه نمودن ۱ میلی‌لیتر محلول $MgCl_2$ 10Mm به هر هاون، از هر نمونه سریال رقت[۵] تا رقت 10^{-10} تهیه شد و از تمام رقت‌ها هر کدام حجم معینی معادل ۴۰۰ میکرولیتر به پلیت محیط کشت جامد King B انتقال یافت(Cheng et al., 2016) و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، با استفاده از دستگاه کلنی شمار تعداد کلنی‌ها شمارش شده و بر رقت مربوطه تقسیم شدند تا تعداد باکتری در حجم اولیه بدست آید. بدین ترتیب میزان توسعه و تکثیر باکتری در ارقام مختلف مورد بررسی قرار گرفت (Taguchi et al., 2010). در این آزمایش ترسیم نمودارها و جداول به کمک نرم افزار Excel انجام گرفت.

آنالیز بیان ژن های دخیل در مقاومت در همکنش باکتری *Pst* با دو رقم حساس و مقاوم توتون

تیمار آزمایشی: مطالعه حاضر بر اساس آزمایش فاکتوریل که فاکتور اول رقم (Basma و White Burley) و فاکتور دوم بیمارگر *Pst* در قالب طرح کاملاً تصادفی، در ۳ تکرار انجام گرفت. نتایج مقایسه میانگین ژن‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح ۰/۰۱ درصد توسط نرم افزار آماری SAS 9.1 و تست یکنواختی واریانس توسط آزمون لون صورت گرفت و نمودار نرخ ایجاد رونوشت‌های mRNA با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم گردید.

مایه‌زنی و جمع‌آوری نمونه: برای این منظور با استفاده از سرنگ مخصوص تزریق باکتری با غلظت ۱×۱۰^۷ CFU/ml به فضای میان‌برگی به گیاهچه‌های ۷ هفته‌ای تزریق گردید و گلدان‌ها به اتاقک رشد انتقال داده شد. نمونه‌برداری از برگ گیاهان آلوده

[۴] H_2O_2
[۵] serial dilution

در زمان‌های صفر(شاهد)، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از آلودگی انجام و پس از پودر شدن با ازت مایع تا زمان استخراج RNA در فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و qPCR: RNA کل با استفاده از کیت RNX plus (شرکت سیناژن) استخراج گردید سپس به منظور زدودن DNA ژنومی از نمونه‌های RNA از کیت RQ1 *RNase*-free DNase ساخت شرکت Thermo طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. سنتز cDNA با استفاده از کیت Revert Aid first strand cDNA شرکت Thermo انجام و جهت بررسی تشکیل یا عدم تشکیل cDNA سنتز شده از تکنیک PCR با آغازگر اختصاصی *Actin* استفاده گردید. تجزیه و تحلیل بیان ژن با تکنیک Quantitative real- time PCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystems® StepOnePlus™ Real-Time PCR صورت گرفت. کیت استفاده شده در این واکنش Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) شرکت Thermo بود. برنامه دمایی و زمانی در هر چرخه درجدول ۱ آمده است. آنالیز نتایج با فرمول $^{-(\Delta\Delta CT)}$ ۲ انجام شد (Livak & Schmittgen 2001). در این بررسی ژن *Actin* به عنوان ژن خانه دار و ژن‌های *WRKY12*، *PAL*، *PR1*، *PR2*، *PR5* و *hrp* به عنوان ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲).

جدول ۱. تناوب دمایی واکنش Real-time PCR

Table 1. Real-time PCR reaction temperature cycle

تکرار Cycle	زمان Time	دما(°C) Temperature (C°)	نام مرحله Step Name
1	10 دقیقه Minute	95	واسرشت‌سازی Denaturation
40	15 ثانیه Second	95	واسرشت‌سازی Denaturation
	1 دقیقه Minute	60	اتصال/ گسترش Annealing/Extension
1	15 ثانیه Second	95	واسرشت‌سازی Denaturation
	1 دقیقه Minute	60	اتصال Annealing
	15 ثانیه Second	95	گسترش Extension

نتایج و بحث

ارزیابی برهمکنش ارقام مختلف توتون و غربالگری آن‌ها بر اساس میزان پیشرفت بیماری: نتایج مقایسه میانگین حاصل از اندازه‌گیری قطر بافت نکروزه در برگ تلقیح شده نشان داد که از نظر میزان توسعه بافت نکروزه در ارقام مختلف اختلاف وجود دارد (جدول ۲). بدین صورت که در رقم Basma به عنوان رقمی با سطح مقاومت بالاتر از سایر ارقام، پس از وقوع پدیده واکنش فوق حساسیت و تشکیل بافت نکروزه در محل تلقیح، حضور باکتری به محل تزریق محدود شده و قابلیت نفوذ و

توسعه بیشتر را از دست داد. در صورتی که در رقم White Burley به عنوان رقمی با سطح حساسیت بالاتر از سایر ارقام توانمندی محدود ساختن توسعه و تکثیر جمعیت باکتری را نداشته بنابراین جمعیت باکتری سطح بیشتری از فضای میان سلولی برگ را آلوده کرد. لذا در ارقام با درجه حساسیت بالاتر قطر لکه بافت نکروزه بیشتر می‌باشد (شکل ۱ و ۲).

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده برای انجام واکنش‌های Real - time PCR

Table 2. The primers used in real time PCR assays

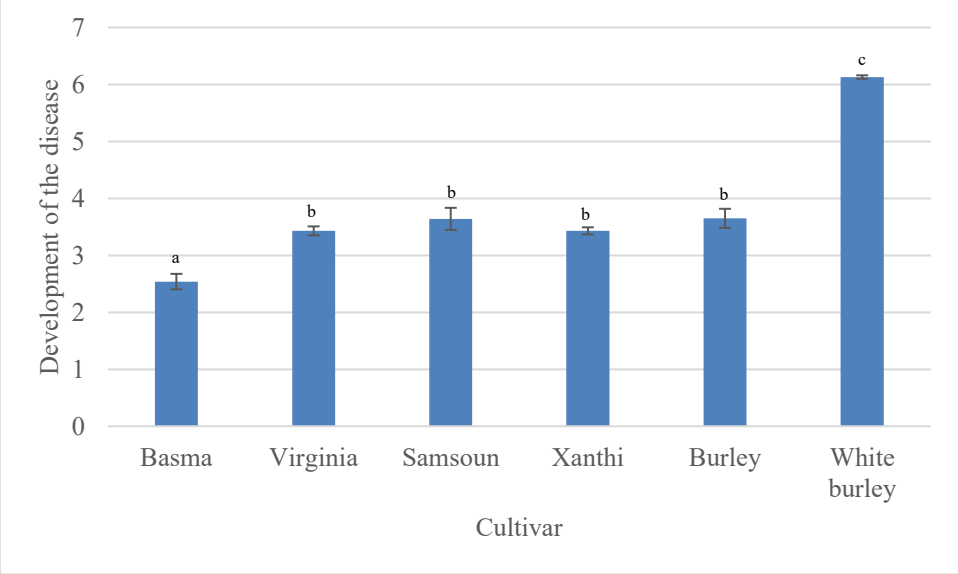
نام ژن Gene name	توالی آغازگر Primer sequence		طول قطعه تکثیر شده Amplicon size (bp)
ژن *Actin* *Actin* gene	5'- CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA -3'	آغازگر رفت Forward Primer	160
	5'- AGGACCTCAGGACAACGGAAACG -3'	آغازگر برگشت Reverse Primer	
ژن *WRKY12* *WRKY12* gene	5'- AGCTAGTTCATTTGATGCCACAC -3'	آغازگر رفت Forward Primer	120
	5'- CATCCAAGATCTCAAGCTCGGT -3'	آغازگر برگشت Reverse Primer	
ژن *PAL* *PAL* gene	5'- TCTCCAAATCTCCTCACAACC -3'	آغازگر رفت Forward Primer	115
	5'- AGCTGCCATTTCCCAATTC -3'	آغازگر برگشت Reverse Primer	
ژن *PR1* *PR1* gene	5'- GGATGCCCATAACACAGCTC -3'	آغازگر رفت Forward Primer	110
	5'- GCTAGGTTTTCGCCGTATTG -3'	آغازگر برگشت Reverse Primer	
ژن *PR2* *PR2* gene	5'- TCTTGCAGCTGCCCTTGTACT -3'	آغازگر رفت Forward Primer	150
	5'- GAAGGCCAGCCACTTTCAGAT -3'	آغازگر برگشت Reverse Primer	
ژن *PR5* *PR5* gene	5'- CCGTATCAGGAATGCTGCAAG -3'	آغازگر رفت Forward Primer	125
	5'- GGCCAAAGCCTAACAAGTGC -3'	آغازگر برگشت Reverse Primer	
ژن *hrp* *hrp* gene	5'- GCAAGCCGCTGTCAGTTCCAA -3'	آغازگر رفت Forward Primer	120
	5'- GATCACACCACTGGCCGACGA -3'	آغازگر برگشت Reverse Primer	

جدول ۲. تجزیه واریانس بافت نکروزه

Table 2. Analysis of variance of necrotic tissue

میانگین مربع Mean square	درجه آزادی DF	منبع تغییر Source of variation
27.933**	5	رقم Cultivar
0.001	12	خطای آزمایش Error
14.963		ضریب تغییرات CV

**: Significant at 1% level of probability **: معنی داری در سطح یک درصد

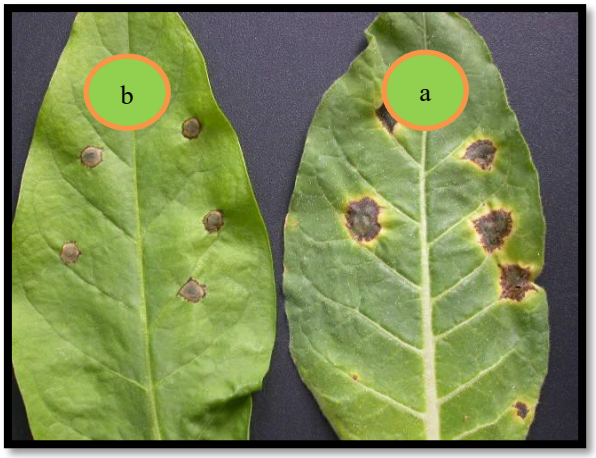


شکل ۱. میزان پیشرفت بیماری در ارقام مختلف هشت روز پس از آلودگی با *Pst*

Figure 1. Disease progression rates among different cultivars eight days post- inoculation with *Pst*

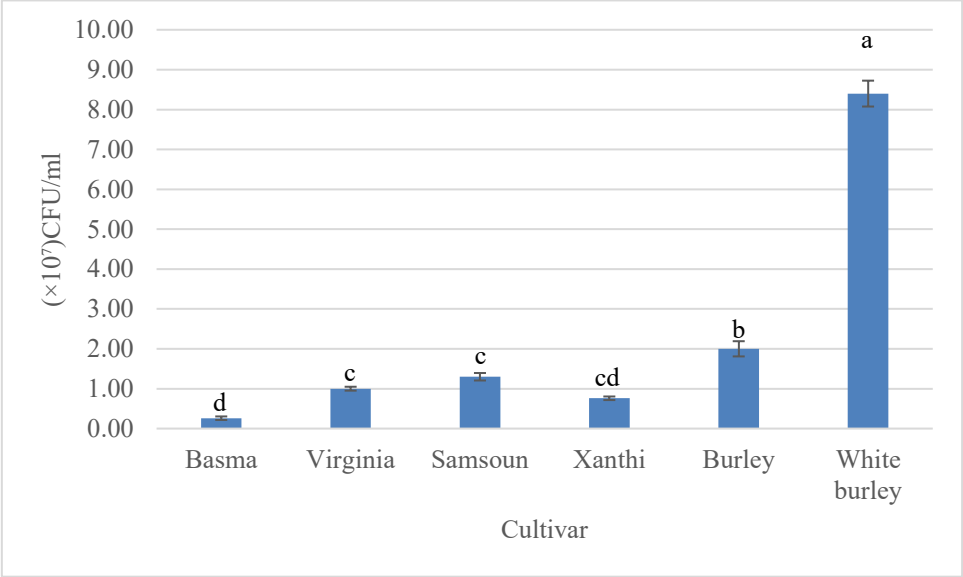
میزان جمعیت باکتری در ارقام مختلف: نتایج به دست آمده از بررسی میزان توسعه و گسترش جمعیت باکتری در بین ارقام مورد بررسی توتون نشان داد میزان تکثیر باکتری عامل بیماری در رقم Basma به عنوان رقمی با سطح مقاومت بالاتر نسبت به سایر ارقام کمتر بوده که این نتیجه، نشان دهنده بالا بودن راندمان سازوکار دفاعی گیاه در سرکوب نمودن جمعیت باکتری عامل بیماری و جلوگیری از گسترش آن می‌شود و در مقابل نیز، رقم White Burley به عنوان رقمی با سطح حساسیت بالاتر نسبت به سایر ارقام، به علت پایین بودن کارایی سیستم دفاعی گیاه در برابر فعالیت بیماری زایی باکتری، میزان توسعه و گسترش باکتری در نسوج گیاه نسبت به سایر ارقام مورد بررسی در بالاترین سطح خود می‌باشد که نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر بافت نکروزه را تایید می‌نماید (شکل ۳). در پژوهشی که با استفاده از باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* بر روی گیاه برنج انجام شده

بود، مشخص گردید که ارقام مقاوم مانع از گسترش این باکتری می‌گردد، موضوعی که در این آزمایش نیز تأیید شد (Derakhshan et al., 2020).



شکل ۲. a: رقم White Burley و b: برگ توتون رقم Basma، هشت روز پس از مایه زنی با *Pst*

Figure 2. The right leaf tobacco White Burley cultivar and left leaf tobacco basma cultivar, eight days after post-inoculation with *Pst*



شکل ۳. میزان توسعه جمعیت باکتری *Pst* در ارقام توتون

Figure 3. The amount of *Pst* bacteria population development in tobacco cultivars

الگوی بیان ژن‌ها در رقم مقاوم و حساس: در این تحقیق بنابر نتایج حاصله از غربالگری ارقام مورد بررسی، از ارقام Basma و White Burley به ترتیب به عنوان رقم مقاوم و حساس، برای تعامل بین توتون و عامل باکتریایی سوختگی توتون (*Pst*) استفاده شد.

الگوی بیان ژن *WRKY12*: بیان ژن *WRKY12* در هر دو رقم در ساعت ۱۲ پس از تلقیح به بالاترین سطح خود رسید، اما میزان بیان این ژن در رقم Basma تقریباً ۱۰ برابر بیشتر از رقم White Burley در همین زمان بود. به طوری که در رقم Basmaحدود ۷۴ برابر و در رقم White Burley حدود ۷ برابر نسبت به زمان صفرشان (شاهد) افزایش نشان داد. پس از این نقطه اوج، سطح بیان به تدریج کاهش یافت و تا ساعت ۷۲ پس از آلودگی روند نزولی ادامه داشت (شکل ۴). پروتئین‌های WRKY به عنوان تنظیم کننده اصلی در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیولوژیکی عمل می‌کنند و به محرک‌ها پاسخ داده و نقش اساسی در ایمنی گیاه دارند (Phukan et al., 2016; Jiang et al., 2017; Chen et al., 2019). همچنین نقش کلیدی و اساسی در سیگنال‌دهی و پاسخ‌های دفاعی ایفا می‌کنند. تحقیقات نشان داده است که ژن‌های *OsWRKY22*، *OsWRKY30*، *OsWRKY45* و *OsWRKY89* در برنج باعث افزایش مقاومت در برابر *Magnaporthe oryzae* می‌شود (Wang et al., 2007; Abbruscato et al., 2012; Peng et al., 2012; Shimono et al., 2012). در گیاه آرابیدوپسیس نیز، ژن‌های *ATWRKY33* و *ATWRKY46* در مسیر پایین‌دست MAPK نقش داشته و دفاع گیاه را افزایش می‌دهد (Mao et al., 2011; Sheikh et al., 2016). نشان داده شده است برخی از فاکتورهای رونویسی WRKY نقش مهمی در القا مقاومت در برابر پاتوژن‌های نکروتروف مانند *Botrytis cinerea*، *Alternaria brassicicola* و *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum* (*Pcc*) دارند. به طور مثال، در *Arabidopsis*، بیان *WRKY70* در پاسخ به *Pcc* افزایش پیدا می‌کند در حالی که سرکوب آن حساسیت بیشتری نسبت به دو پاتوژن *Pcc* و *Pseudomonas syringae* می‌شود (Li et al., 2004; Zheng et al., 2006; Lai et al., 2011). باند شدن فاکتورهای رونویسی *WRKY* به DNA برای فعال سازی ژن‌های *PR* مهم است (Van loon et al., 2006). در پروموتر بسیاری از ژن‌های گیاهی دخیل در دفاع و پاسخ به عوامل بیماری‌زا، توالی موتیفی حفاظت شده‌ای به نام W-box وجود دارد. پروتئین‌های WRKY به طور اختصاصی به W-box متصل شده و موجب فرایند رونویسی از ژن پایین دست می‌شود (Du et al., 2000). بیان ژن *WRKY12* در برنج در اثر باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* موجب افزایش بیان *NPR1*، *PR1*، *PAL* و *POX* می‌شود (Song et al., 2001). اثبات شده که بیان ژن‌های *tWRKY3* و *tWRKY4* در گیاه توتون بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی را افزایش دهد و در نهایت منتج به افزایش سطح مقاومت می‌گردد (Oh et al., 2008). فاکتور فعال سازی رونویسی *NtWRKY12* در توتون با متصل شدن به توالی حفاظت شده‌ای در پروموتر ژن *PR1* موجب بیش بیانی ژن *PR1* می‌شود (Verk et al., 2010). پژوهشگران ژن خاصی به نام *WRKY12* را در کلم پیچ شناسایی کرده‌اند که نقش کلیدی در افزایش مقاومت گیاه در برابر آلودگی ناشی از *Pcc* دارد. مطالعات نشان داد که بیان ژن *WRKY12* در پاسخ به آلودگی *Pcc* به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. و همچنین این ژن از طریق فعال‌سازی مسیرهای دفاعی و تقویت بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت، نقش مؤثری در کاهش شدت بیماری دارد (Kim et al., 2014). در این مطالعه سطح بیان ژن *WRKY*، در تمامی بازه‌های زمانی اندازه‌گیری‌شده در رقم Basma به‌طور قابل توجهی بیشتر از رقم White Burley بود که نشان‌دهنده آن است در ارقام مقاوم، بیان ژن *WRKY* پتانسیل بالاتری در بیان برخوردار

هستند. اهمیت این موضوع زمانی بیشتر مشخص می‌شود که بدانیم بیان سریع و بالای این ژن پس از مواجهه با *Pst*، امکان مقابله تحمل گیاه ر افزایش می‌دهد.

الگوی بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز (*PAL*): در بررسی دو رقم مورد مطالعه، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در سطح بیان ژن *PAL* مشاهده شد. در رقم مقاوم Basma، بیان این ژن پس از تعامل با باکتری *Pst* در ساعت ۱۲ پس از مایه‌زنی به حدود ۴ برابر میزان بیان در نمونه شاهد (زمان صفر) رسید. این افزایش به مرور ادامه یافته و در زمان ۲۴ ساعت پس از تلقیح به اوج خود رسید، به‌طوری‌که میزان بیان در این زمان حدود ۱۳ برابر نمونه شاهد بود. پس از این نقطه زمانی (ساعت ۲۴)، روند بیان ژن کاهشی شد و این کاهش تا ساعت ۷۲ ادامه پیدا کرد اما در هم‌کنش رقم White Burley با باکتری *Pst*، بررسی نشان داد که ژن *PAL* در ساعات مختلف پس از مایه‌زنی فعالیت خاصی نداشته و در برهم‌کنش با باکتری نقشی ایفا نکرده است (شکل ۴). متابولیسم فنیل‌پروپانوئید یکی از مسیرهای مهم در متابولیسم ثانویه است که نقش کلیدی در مقاومت گیاهان به بیماری‌ها دارد (Dixon et al., 2002). این مسیر به بیوسنتز طیف وسیعی از محصولات طبیعی گیاهی مانند هیدروکسی سینامیک اسید، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، لیگنین، تانن‌ها و استیلبن‌ها می‌شود که عملکردهای متنوعی دارند (Reichert et al., 2009). PAL یک آنزیم کلیدی در متابولیسم فنیل‌پروپانوئید شناخته می‌شود (Liu et al., 2019a). فعالیت PAL پیش‌سازهایی برای بیوسنتز لیگنین و سایر فنل‌ها مانند اسید سالیسیلیک (SA) را تولید می‌کند که در هنگام آلودگی در گیاه تجمع پیدا می‌کنند (Mauch-Mani & Slusarenko 1996; Duan et al., 2014; He et al., 2019) و یک ژن دفاعی تنظیمی مهم است (Yang et al., 2022). در این مطالعه نشان داده شد که در تمامی ساعت‌های پس از آلودگی، سطح بیان *PAL* در رقم مقاوم Basma بسیار بالاتر از رقم حساس White Burley بود. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که *PAL* نقشی اساسی در القای پاسخ مقاومتی به بیماری‌های گیاهی دارد (Tanaka et al., 2003; Kim & Hwang 2014). همچنین مشخص شده که رونوشت‌های ژن *PAL* در ترکیبات ناسازگار میزبان-پاتوژن افزایش می‌یابند (Edwards et al. 1985). به‌عنوان مثال، در گیاه توتون، سرکوب بیان ژن *PAL*موجب کاهش مقاومت در برابر قارچ *Cercospora nicotianae* شد (Maher et al., 1994). در برنج، افزایش بیان ژن *PAL1* در گونه‌های تیپ وحشی باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری بلاست برنج می‌گردد (Zhou et al., 2018). در مطالعه‌ای با استفاده از تکنیک Quantitative Real-time PCR، بیان ژن‌های *PAL* و *PR2* در دو رقم برنج طارم محلی (حساس) و ساحل (مقاوم) بررسی شد. نتایج نشان داد که بیان این ژن‌ها در رقم مقاوم ساحل پس از مایه‌زنی با باکتری *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* به‌طور معناداری نسبت به رقم حساس طارم افزایش یافت (Heydari Nezhad et al., 2016).

الگوی بیان ژن *PR1*: بررسی الگوی بیان ژن *PR1* در دو رقم Basma و White Burley در تعامل با باکتری *Pst* نشان‌دهنده نقش کلیدی این ژن در مقاومت به این باکتری بود. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که بیان ژن *PR1* در هر دو رقم

مورد مطالعه در ساعت اولیه پس از تلقیح افزایش قابل‌توجهی داشت. در رقم مقاوم، بیان ژن *PR1* تا ۱۴۹۶ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت، در حالی که این افزایش در رقم حساس ۴۱۲ برابر بود. با این حال، پس از زمان اوج، نرخ بیان ژن *PR1* در هر دو رقم کاهش یافت (شکل ۴). پروتئین‌های PR1 از نخستین پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی بودند که شناسایی شده‌اند (Showmy & Yusuf 2020). پروتئین‌های PR1 در میان گیاهان از نظر ساختاری بسیار حفظ شده‌اند این امر بیانگر آن است که این پروتئین‌ها نقش مهم و عمومی در واکنش گیاه به تنش‌های زیستی ایفا می‌کنند (Lincoln et al., 2018). مطالعات قبلی نشان دادند که سطح رونویسی *PR1* در گیاهان تحت تنش زیستی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Ali et al., 2018; Shi et al., 2019; Tunsagool et al., 2019; Yang et al., 2019). پژوهش‌های گذشته نشان داد که در گیاهان مختلف و گیاهان تراریخته‌ای که ژن *PR1* بیان بالایی دارند معمولاً مقاومت بیشتری در برابر طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها، قارچ‌ها و حتی ویروس‌های بیماری‌زا دارند. در مقابل، گیاهانی که ژن *PR1* در آن‌ها غیرفعال شده باشد، نسبت به گونه‌های وحشی حساسیت بیشتری به آلودگی نشان می‌دهند (Cutt et al., 1989; Rivière et al., 2008; Kusajima et al., 2010; Dolatabadi et al., 2014; Gao et al., 2015; Jiang et al., 2015; Maschietto et al., 2016; Liu et al., 2019b). به نظر می‌رسد این پروتئین بر روی غشا موثر باشد (Vidhyasekaran 2002). البته گزارش شده است که بیان بیش از حد ژن *PR1* سطوح گونه‌های اکسیژن فعال را تعدیل می‌کند که منجر به افزایش مقاومت در برابر بیماری می‌شود (Lincoln et al., 2018). علاوه بر این، پروتئین PR1 ممکن است با تقویت دیواره‌های سلول میزبان در جلوگیری از گسترش پاتوژن نقش داشته باشد (Santén et al., 2005). همچنین نشان داده شده است که *PR1* در گوجه‌فرنگی به عنوان یک الگوی مولکولی مرتبط در سیگنال‌دهی دفاعی عمل می‌کند (Chen et al., 2014; Chien et al., 2015; Meijer et al., 2019). در مطالعه‌ای مشخص شد که پس از آلودگی برنج با *Rhizoctonia solani*، میزان بیان ژن *PR1* در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس بیشتر بود (Yang et al., 2022). در این مطالعه نیز، بیان ژن *PR1* در هر دو رقم گیاه، ۱۲ ساعت پس از آلودگی افزایش پیدا کرد. با این حال، در رقم مقاوم، میزان بیان این ژن در تمامی زمان‌های بررسی شده بیشتر از رقم حساس بود. این موضوع نشان می‌دهد که رقم مقاوم توانایی بهتری در کنترل باکتری *Pst* دارد.

الگوی بیان ژن *PR2*: پس از آنالیز داده‌های حاصل از این پژوهش، مشاهده شد که بیان ژن *PR2* در هر دو رقم مقاوم و حساس پس از تعامل با باکتری *Pst* افزایش یافت. الگوی بیان این ژن در هر دو رقم سیر مشابهی را نشان داد. به طوری‌که نرخ بیان ژن *PR2* در هر دو ژنوتیپ در ۱۲ ساعت پس از آلودگی به حداکثر رسید که به ترتیب در رقم مقاوم و حساس ۷ و ۳ برابر زمان صفر محاسبه شد. پس از این زمان بیان ژن مذکور روند نزولی را طی نمود و این کاهش تا زمان ۷۲ ادامه یافت (شکل ۴).

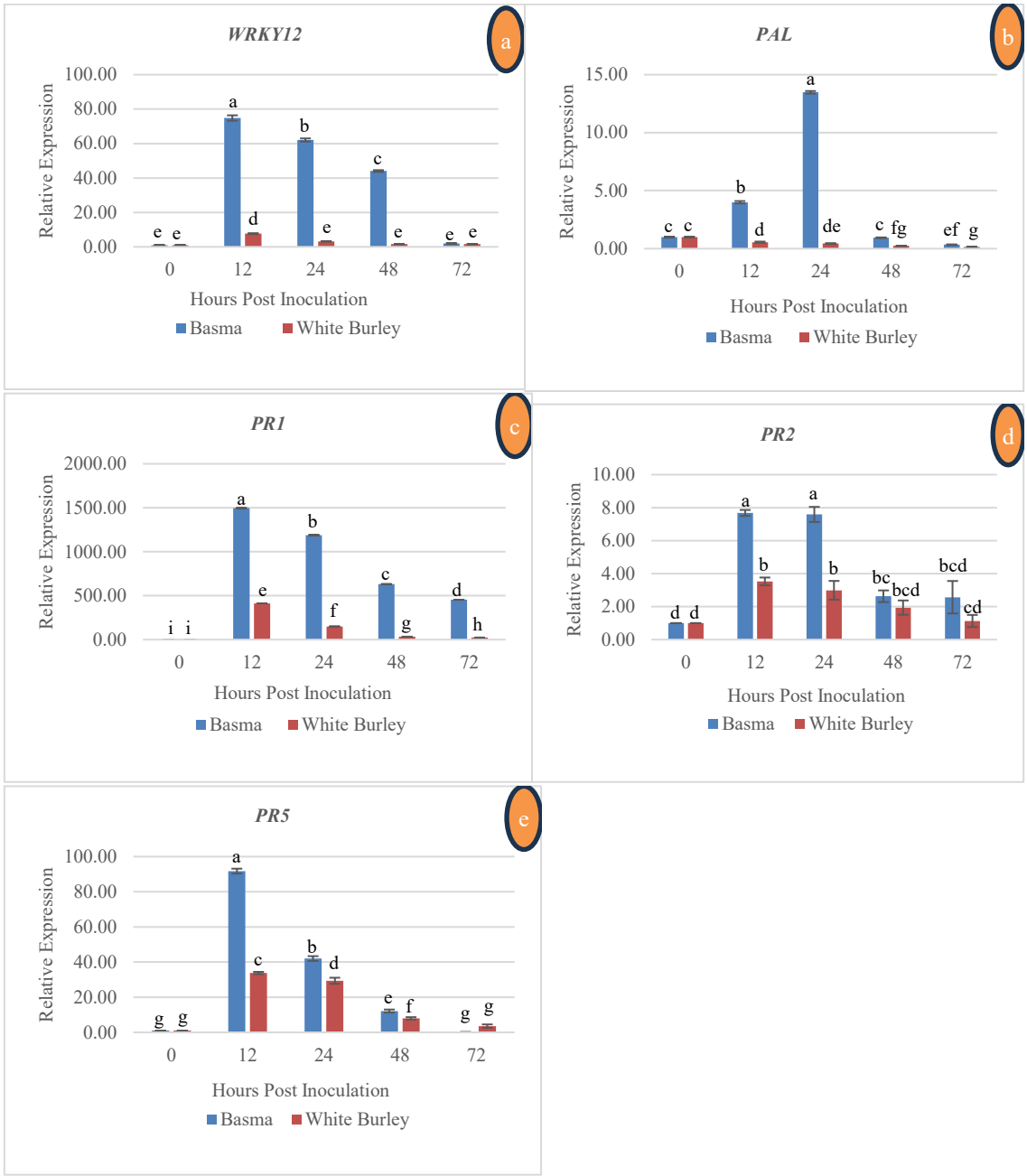
پروتئین‌های PR2 (β-glucanases) فعالیت بتا-۱و۳-گلوکانازی نشان می‌دهند. بتا-۱و۳-گلوکاناز (گلوکان اندو-۱و۳ بتا-گلوکوزیداز) باعث شکستن واحد های ۱و۳-بتا –دی-گلوکوزیدیک در بتا-۱و۳-گلوکان ها می‌شود. وزن مولکولی آن‌ها در حدود ۳۳ تا ۳۶ کیلو دالتون است (Van Loon et al., 2006). *PR2* نقش دوگانه‌ای در دغاع گیاه آزاد دارد. بدین صورت که هم به صورت

مستقیم اجزای ساختاری دیواره سلولی باکتری را تخریب می‌کند و به صورت غیرمستقیم نیز با آزاد کردن محرک‌ها پاسخ‌های دفاعی در گیاهان را بالا می‌برد (Stintzi et al., 1993). *PR2* دارای دو فرم بازی و اسیدی است که فرم بازی در واکوئل قرار می‌گیرد و فرم اسیدی به فضای خارج سلولی (آپوپلاستی) ترشح می شوند. در این مطالعه، مشاهده شد که بیان ژن *PR2* در هر دو رقم مقاوم و حساس در ساعت‌های ۱۲ و ۲۴ پس از تلقیح افزایش یافت. این نتایج نشان‌دهنده اهمیت بالای این ژن در ساعات اولیه پس از ورود عامل بیماری‌زا است که با القای به‌موقع در مراحل ابتدایی استقرار و نفوذ عامل بیماری‌زا موجب تخریب دیواره سلولی باکتری می‌شود. علاوه بر این، سطح بیان ژن *PR2* در رقم مقاوم Basma نسبت به رقم حساس White Burley به‌طور قابل توجهی بیشتر بود. تفاوت موجود در سطح بیان این ژن میان ارقام مقاوم و حساس را می‌توان به تشکیل سریع‌تر و تجمع بالاتر در رقم مقاوم نسبت داده شود. نتایج مطالعه‌ای نشان داده بود که بیان ژن *PR2* در گیاه جو، پس از آلودگی با قارچ *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* در رقم مقاوم (Banteng) بیشتر از رقم حساس (WI2291) بود (Arabi et al., 2019).

الگوی بیان ژن *PR5*: الگوی بیان ژن *PR5* در رقم Basma، ۱۲ ساعت پس از آلودگی به اوج خود رسید که تقریباً ۹۱ برابر بیشتر از بیان این ژن در گیاه شاهد (زمان صفر) بود. همچنین، نرخ بیان این ژن در این رقم ۲/۷۵ برابر بیشتر نسبت به رقم White Burleyدر زمان اوج بیان (۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی) مشاهده شد. در هر دو رقم، پس از ساعت ۱۲، میزان بیان به تدریج کاهش یافت (شکل ۴). پروتئین‌های متعلق به خانواده PR5 به دلیل تشابهات توالی آن‌ها با پروتئین گیاهی تائوماتین[۶] به پروتئین‌های شبه تائوماتین Thamatin-like (TL) هم معروف هستند (Moralejo et al., 1999). Osmotins فرم بازی TL، گروهی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در تنش‌های شوری بیان می‌شوند، نیز متعلق به این گروه از پروتئین‌ها (PR5) هستند (Vidhyasekaran 2002). گروه پروتئین‌های PR5 تاکنون از توتون، آرابیدوبسیس، سویا، برنج، گندم، توتون، گوجه و بسیاری گیاهان دیگر جدا شده‌اند (Vigers et al., 2006). در گیاهان، تجمع این پروتئین‌ها در واکنش به شرایط استرس‌زا مانند غلظت‌های بالای نمک، آسیب‌دیدگی یا حملات عوامل بیماری‌زا مشاهده شده است. این پروتئین نفوذپذیری غشا و دیواره سلولی عوامل بیماری‌زا را تغییر می‌دهد (Kitajima & Sato 1999; Vidhyasekaran 2002). نتایج حاصله از آنالیز بیان ژن *PR5* هم گویای این مطلب می‌باشد که در ارقام مختلف توتون اعم از حساس و مقاوم بیشترین میزان جهش سطح بیان ژن نسبت به زمان صفر (شاهد) در ساعت ۱۲ پس از مایه زنی می‌باشد که با نتایج بررسی‌های دیگر محققین نیز نشانگر افزایش‌بیـــان این پس از آلودگی در گیاهان بود، مطابقت دارد (Liu et al., 2013). در مطالعه ما میزان نسخه‌های *PR5* در ژنوتیپ مقاوم و حساس پس از آلوده‌سازی گیاهان با *Pst* افزایش یافت، اما در این بین نکته‌ی قابل توجه اختلاف سطح بیان و کارایی این ژن در دو رقم مورد بررسی می باشد که در رقم مقاوم برخلاف رقم حساس بیان ژن *PR5* ، بالاتر بود که این امر بیانگر اهمیت این ژن در مقاومت به پاتوژن *Pst* است. نتایج

[۶] Thamatin

یک بررسی نشان داد که ژن *PR5* در ژنوتیپ‌های آفتابگردان با مقاومت بالاتر در برابر قارچ *sclerotinia sclerotiorum*، بیان بیشتری دارد (Musa-Khalifani et al., 2021).



شکل ٤. نرخ ایجاد رونوشت‌های mRNA ژن‌های *WRKY12* (a)، *PAL* (b)، *PR1*(c)، *PR2* (d) و *PR5* (e) در رقم‌های Basma و White Burley در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با *Pst*

Figure 4. The mRNA transcript levels of *WRKY12* (a), *PAL* (b), *PR1* (c), *PR2* (d), and *PR5* (e) genes in Basma and White Burley cultivars were analyzed in over hours post-inoculation with *Pst*

تغییرات سطح جمعیت باکتری *Pst* در رقم Basma و White Burley با استفاده از ژن *hrp*: نتایج حاصل از ردیابی نوسانات جمعیت باکتری *Pst* در رقم Basma نشان داد در نمونه شاهد (زمان صفر) به علت عدم حضور باکتری *Pst* هیچ تکثیری رخ نداده است. بالاترین سطح جمعیتی باکتری در ساعت ۱۲ پس از آلودگی می‌باشد که این میزان در ساعات بعدی مورد بررسی به شدت کاهش یافته و در ساعت ۲۴ پس از تلقیح جمعیت باکتری به میزان حدود ۷۵ درصد می‌یابد و این کاهش تا ساعت ۷۲ به عنوان آخرین نقطه زمانی مورد بررسی در این تحقیق ادمه یافت. در رقم White Burley نیز مشابه با رقم Basma در نمونه شاهد (ساعت صفر) به علت عدم حضور باکتری *Pst* ، تکثیری رخ نداد. بالاترین میزان سطح جمعیت باکتری *Pst*، مربوط به ساعت ۱۲ پس از آلودگی می باشد. نکته جالب و قابل ملاحظه، شیب ملایم کاهش میزان جمعیت باکتری *Pst* در رقم White Burley پس از ساعت ۱۲، نسبت به کاهش شدید جمعیت باکتری در ساعات مشابه در رقمBasma می‌باشد. ژن‌های *hrp* مسئول کدگذاری سیستم‌های ترشح نوع III (T3SS) هستند. این خوشه ژنی نقشی اساسی در تعاملات میان گیاه و عوامل بیماری‌زا دارد و در عین حال در فرآیند رشد و ظهور علائم در گیاهان نیز تأثیرگذار است (Vicente and Holub 2013; Lee et al., 2011). به طور کلی تصور می شود که T3SS برای بیماری زایی و در برانگیختن مرگ سلولی و سایر دفاع‌ها نقش دارد (Lindgren 1997). در این پژوهش در هر دو رقم مورد بررسی میزان جمعیت باکتری در ۱۲ ساعت پس از آلودگی بالا بود اما در رقم Basma با سطح مقاومتی بالا میزان جمعیت باکتری پس از طی ساعات اولیه و فعال شدن ژن‌های دفاعی گیاه و تولید پروتئین‌ها به شدت کاهش پیدا کرد که حاکی از کاهش باکتری عامل بیماری در برابر سازوکار های دفاعی توتون می باشد ولی در رقم White Burley با سطح مقاومتی پایین، استراتژی‌های تدافعی گیاه عملکرد کمتری در سرکوب جمعیت باکتری داشته‌اند. به همین دلیل، در تمام زمان‌های پس از ۱۲ ساعت بررسی، جمعیت باکتری عامل بیماری در این رقم نسبت به رقم Basma بیشتر بوده است.

نتیجه‌گیری: امروزه یکی از روش های کنترل بیماری که اثر مضری برای محیط زیست ندارد استفاده از رارقام مقاوم است. در این مطالعه پس از بررسی میزان سطح مقاومت شش رقم توتون در مقابل آلودگی سوختگی توتون (*Pst*) رقم Basma به عنوان رقمی با درجه مقاومت بالاتر و رقم White Burley به عنوان رقمی با درجه حساسیت بالاتر انتخاب شد و آنالیز الگوی بیان ژن‌های نشان داد میزان تجمع رونوشت‌های این ژن ها در رقم Basma بسیار افزایش یافته در حالی که در رقم حساس یا بیان نمی شوند و یا میزان بیان آن ها کمتر و کندتر از ارقام مقاوم است.

سپاسگزاری: نگارندگان مقاله از گروه گیاهپزشکی و حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جهت تامین مواد مورد نیاز این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

References

Abbruscato, P., Nepusz, T., Mizzi, L., Del Corvo, M., Morandini, P., Fumasoni, I., Michel, C., Paccanaro, A., Guiderdoni, E., Schaffrath, U., & MOREL, J.B. (2012). *OsWRKY22*, a monocot *WRKY* gene, plays a role in the resistance response to blast. *Molecular plant pathology*, *13*(8), 828-841. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00795.x

Ali, S., Ganai, B.A., Kamili, A.N., Bhat, A.A., Mir, Z.A., Bhat, J.A., Tyagi, A., Islam, S.T., Mushtaq, M., Yadav, P., & Rawat, S. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological research*, *212*, 29-37. https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008

Ali, S., Mir, Z.A., Bhat, J.A., Tyagi, A., Chandrashekar, N., Yadav, P., Rawat, S., Sultana, M., & Grover, A. (2018). Isolation and characterization of systemic acquired resistance marker gene *PR1* and its promoter from *Brassica juncea*. *3 Biotech*, *8*(1), 10. https://doi.org/10.1007/s13205-017-1027-8

Arabi, E., Jawhar, M., Al-daoude, A., Al-Shehadah, E., Shoaib, A., & Imad, M. (2019). Differential expression of defense-related genes in susceptible versus resistant barley genotypes challenged with *Pyrenophora teres*. *Mycopath*, *15*(2).

Basavand, E., & Khodaygan, P. (2020). Common water-plantain, a new host of *Pseudomonas viridiflava* in rice fields in Iran. *Journal of Plant Pathology*, *102*(3), 913-913. https://doi.org/10.1007/s42161-020-00491-9

Batchvarova, R., Nikolaeva, V., Slavov, S., Bossolova, S., Valkov, V., Atanassova, S., Guelemerov, S., Atanassov, A., & Anzai, H. (1998). Transgenic tobacco cultivars resistant to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Theoretical and Applied Genetics*, *97*(5), 986-989. https://doi.org/10.1007/s001220050981

Bundalovic-Torma, C., Lonjon, F., Desveaux, D., & Guttman, D. S. (2022). Diversity, evolution, and function of *Pseudomonas syringae* effectoromes. *Annual Review of Phytopathology*, *60*(1), 211-236. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021621-121935

Cech, R., Zaller, J. G., Lyssimachou, A., Clausing, P., Hertoge, K., & Linhart, C. (2023). Pesticide drift mitigation measures appear to reduce contamination of non-agricultural areas, but hazards to humans and the environment remain. *Science of the Total Environment*, *854*, 158814. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158814

Chen, X., Li, C., Wang, H., & Guo, Z. (2019). *WRKY* transcription factors: evolution, binding, and action. *Phytopathology research*, *1*(1), 1-15. https://doi.org/10.1186/s42483-019-0022-x

Chen, Y. L., Lee, C. Y., Cheng, K. T., Chang, W. H., Huang, R. N., Nam, H. G., & Chen, Y. R. (2014). Quantitative peptidomics study reveals that a wound-induced peptide from *PR-1* regulates immune signaling in tomato. *The Plant Cell*, *26*(10), 4135-4148. https://doi.org/10.1105/tpc.114.131185

Cheng, D. D., Zhang, Z. S., Sun, X. B., Zhao, M., Sun, G. Y., & Chow, W. S. (2016). Photoinhibition and photoinhibition-like damage to the photosynthetic apparatus in tobacco leaves induced by *pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* under light and dark conditions. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 29. https://doi.org/10.1186/s12870-016-0723-6

Cheng, D.D., Liu, M.J., Sun, X.B., Zhao, M., Chow, W.S., Sun, G.Y., Zhang, Z.S., & Hu, Y.B. (2016). Light suppresses bacterial population through the accumulation of hydrogen peroxide in tobacco leaves infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 512. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00512

Chien, P. S., Nam, H. G., & Chen, Y. R. (2015). A salt-regulated peptide derived from the CAP superfamily protein negatively regulates salt-stress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, *66*(17), 5301-5313. https://doi.org/10.1093/jxb/erv263

Cutt, J. R., Harpster, M. H., Dixon, D. C., Carr, J. P., Dunsmuir, P., & Klessig, D. F. (1989). Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related *PR1b* gene. *Virology*, *173*(1), 89-97. https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90224-9

Dixon, E., Kennedy, B., Pearce, R., & Pfeufer, E. (2018). Occurrence of frogeye leaf spot, caused by *Cercospora nicotianae*, on greenhouse tobacco transplants in Kentucky. *Plant Disease*, *102*(5), 1036. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1548-PDN

Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S., & Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular plant pathology*, *3*(5), 371-390. https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x

Dolatabadi, B., Ranjbar, G., Tohidfar, M., & Dehestani, A. (2014). Genetic transformation of Tomato with three pathogenesis-related protein genes for increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Plant Molecular Breeding*, *2*(1), 1-11. https://doi.org/10.22058/jpmb.2014.8424

Drakhshan, A., SALARI, M., BABAEIZAD, V., PANJEHKEH, N., & Taheri, A. (2021). Study of biochemical and molecular changes of iranian rice cultivars in interaction with bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes leaf blight disease.

Du, L., & Chen, Z. (2000). Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen-and salicylic acid-induced *WRKY* DNA-binding proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *24*(6), 837-847. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2000.00923.x

Duan, L., Liu, H., Li, X., Xiao, J., & Wang, S. (2014). Multiple phytohormones and phytoalexins are involved in disease resistance to *Magnaporthe oryzae* invaded from roots in rice. *Physiologia plantarum*, *152*(3), 486-500. https://doi.org/10.1111/ppl.12192

Edwards, K., Cramer, C. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Schuch, W., & Lamb, C. J. (1985). Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*(20), 6731-6735. https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6731

Finkina, E., N. Melnikova, D., V. Bogdanov, I., & V. Ovchinnikova, T. (2017). Plant pathogenesis-related proteins *PR-10* and *PR-14* as components of innate immunity system and ubiquitous allergens. *Current Medicinal Chemistry*, *24*(17), 1772-1787. https://doi.org/10.2174/0929867323666161026154111

Freeman, B., & Beattie, G. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores.

Gao, L., Wang, S., Li, X. Y., Wei, X. J., Zhang, Y. J., Wang, H. Y., & Liu, D. Q. (2015). Expression and functional analysis of a pathogenesis-related protein 1 gene, *TcLr19PR1*, involved in wheat resistance against leaf rust fungus. *Plant Molecular Biology Reporter*, *33*(4), 797-805. https://doi.org/10.1007/s11105-014-0790-5

Guo, Z., Xie, H., Wang, H., Huang, Y., Chen, Q., Xiang, L., Yu, Z. and Yang, X. (2020). Leaf spot caused by *Didymella segeticola* on tobacco in China. *Plant Disease*, *104*(5), 1559. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2398-PDN

Gutiérrez-Barranquero, J. A., Cazorla, F. M., & De Vicente, A. (2019). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the "hodgepodge" of the *Pseudomonas syringae* complex. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 570. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00570

He, J., Liu, Y., Yuan, D., Duan, M., Liu, Y., Shen, Z., Yang, C., Qiu, Z., Liu, D., Wen, P., & Huang, J. (2020). An *R2R3 MYB* transcription factor confers brown planthopper resistance by regulating the phenylalanine ammonia-lyase pathway in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(1), 271-277. https://doi.org/10.1073/pnas.1902771116

He, L., Ding, L., Zhang, P., Li, B., Mu, W., & Liu, F. (2021). Impact of the equilibrium relationship between deposition and wettability behavior on the high-efficiency utilization of pesticides. *Pest Management Science*, *77*(5), 2485-2493. https://doi.org/10.1002/ps.6279

Heydari Nezhad, A. M., Baba Zad, V. A., & Rahimian, H. A. (2016). Studying *PR2* and *PAL* genes involvement in rice resistance against *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae*. *Agricultural Biotechnology Journal*, *7*(4), 67-82. https://doi.org/10.22103/jab.2016.1391

Hockett, K. L., Burch, A. Y., & Lindow, S. E. (2013). Thermo-regulation of genes mediating motility and plant interactions in *Pseudomonas syringae*. *PLoS One*, *8*(3), e59850. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059850

Huang, J., Yao, C., Sun, Y., Ji, Q., & Deng, X. (2022). Virulence-related regulatory network of *Pseudomonas syringae*. *Computational and structural biotechnology journal*, *20*, 6259-6270. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.011

Hussain, M.M., Saeed, A., Shakeel, M., Rauf, A., Jan, F., Gul, S., Mohibullah, M., Munir, M., Khan, I., & Yasin, M. (2023). Dynamics of lead tolerance in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genotypes. *SABRAO J. Breed. Genet*, *55*(4), 1321-1331. http://doi.org/10.54910/sabrao2023.55.4.25

Jain, D., & Khurana, J. P. (2018). Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In *Molecular aspects of plant-pathogen interaction* (pp. 265-281). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12

Jiang LiangYu, J.L., Wu JunJiang, W.J., Fan SuJie, F.S., Li WenBin, L.W., Dong LiDong, D.L., Cheng Qun, C.Q., Xu PengFei, X.P., & Zhang ShuZhen, Z.S. (2015). Isolation and characterization of a novel pathogenesis-related protein gene (*GmPRP*) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129932

Jiang, J., Ma, S., Ye, N., Jiang, M., Cao, J., & Zhang, J. (2017). *WRKY* transcription factors in plant responses to stresses. *Journal of integrative plant biology*, *59*(2), 86-101. https://doi.org/10.1111/jipb.12513

Kim, D. S., & Hwang, B. K. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of experimental botany*, *65*(9), 2295-2306. https://doi.org/10.1093/jxb/eru109

Kitajima, S., & Sato, F. (1999). Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *The journal of biochemistry*, *125*(1), 1-8.

Kusajima, M., Yasuda, M., Kawashima, A., Nojiri, H., Yamane, H., Nakajima, M., Akutsu, K., & Nakashita, H. (2010). Suppressive effect of abscisic acid on systemic acquired resistance in tobacco plants. *Journal of General Plant Pathology*, *76*(2), 161-167. https://doi.org/10.1007/s10327-010-0218-5

Lai, Z., Li, Y., Wang, F., Cheng, Y., Fan, B., Yu, J. Q., & Chen, Z. (2011). *Arabidopsis* sigma factor binding proteins are activators of the *WRKY33* transcription factor in plant defense. *The Plant Cell*, *23*(10), 3824-3841. https://doi.org/10.1105/tpc.111.090571

Lammoglia, S. K., Kennedy, M. C., Barriuso, E., Alletto, L., Justes, E., Munier-Jolain, N., & Mamy, L. (2017). Assessing human health risks from pesticide use in conventional and innovative cropping systems with the BROWSE model. *Environment International*, *105*, 66-78. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.04.012

Lee, J. S., Cha, J. Y., & Baik, H. S. (2011). Plant cell contact-dependent virulence regulation of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528. *생명과학회지*, *21*(2), 227-234.

Li, J., Brader, G., & Palva, E. T. (2004). The *WRKY70* transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell*, *16*(2), 319-331. https://doi.org/10.1105/tpc.016980

Li, P., Lu, Y. J., Chen, H., & Day, B. (2020). The lifecycle of the plant immune system. *Critical reviews in plant sciences*, *39*(1), 72-100. https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1757829

Lincoln, J. E., Sanchez, J. P., Zumstein, K., & Gilchrist, D. G. (2018). Plant and animal *PR1* family members inhibit programmed cell death and suppress bacterial pathogens in plant tissues. *Molecular Plant Pathology*, *19*(9), 2111-2123. https://doi.org/10.1111/mpp.12685

Lindgren, P. B. (1997). The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annual review of phytopathology*, *35*(1), 129-152. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.129

Liu, Y., Liu, L., Yang, S., Zeng, Q., He, Z., & Liu, Y. (2019a). Cloning, characterization and expression of the phenylalanine Ammonia-Lyase gene (*PaPAL*) from spruce *Picea asperata*. *Forests*, *10*(8), 613. https://doi.org/10.3390/f10080613

Liu, Y., Liu, Q., Tang, Y., & Ding, W. (2019b). *NtPR1a* regulates resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Nicotiana tabacum* via activating the defense-related genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *508*(3), 940-945. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.017

Liu, Y., Wang, L., Cai, G., Jiang, S., Sun, L., & Li, D. (2013). Response of tobacco to the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 is mainly dependent on salicylic acid signaling pathway. *FEMS microbiology letters*, *344*(1), 77-85. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12157

Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R. A., & Lamb, C. J. (1994). Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(16), 7802-7806. https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7802

Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., & Zhang, S. (2011). Phosphorylation of a *WRKY* transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *23*(4), 1639-1653. https://doi.org/10.1105/tpc.111.084996

Marpu, S., Kolailat, S.S., Korir, D., Kamras, B.L., Chaturvedi, R., Joseph, A., Smith, C.M., Palma, M.C., Shah, J., & Omary, M.A. (2017). Photochemical formation of chitosan-stabilized near-infrared-absorbing silver Nanoworms: A "Green" synthetic strategy and activity on Gram-negative pathogenic bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, *507*, 437-452. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.08.009

Maschietto, V., Lanubile, A., De Leonardis, S., Marocco, A., & Paciolla, C. (2016). Constitutive expression of pathogenesis-related proteins and antioxydant enzyme activities triggers maize resistance towards *Fusarium verticillioides*. *Journal of Plant Physiology*, *200*, 53-61. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.06.006

Mauch-Mani, B., & Slusarenko, A. J. (1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell*, *8*(2), 203-212. https://doi.org/10.1105/tpc.8.2.203

Meijer, H. J., Schoina, C., Wang, S., Bouwmeester, K., Hua, C., & Govers, F. (2019). *Phytophthora infestans* small phospholipase D-like proteins elicit plant cell death and promote virulence. *Molecular Plant Pathology*, *20*(2), 180-193. https://doi.org/10.1111/mpp.12746

Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Madala, N. E., Labuschagne, N., & Dubery, I. A. (2018). The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Frontiers in plant science*, *9*, 112. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00112

Moralejo, F. J., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., & Martin, J. F. (1999). Thaumatin production in *Aspergillus* awamori by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(3), 1168-1174. https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1168-1174.1999

Musa-Khalifani, K., Darvishzadeh, R., & Abrinbana, M. (2021). Resistance against *Sclerotinia* basal stem rot pathogens in sunflower. *Tropical Plant Pathology*, *46*(6), 651-663. https://doi.org/10.1007/s40858-021-00463-z

Nguyen, Q. M., Iswanto, A. B. B., Son, G. H., & Kim, S. H. (2021). Recent advances in effector-triggered immunity in plants: new pieces in the puzzle create a different paradigm.

International Journal of Molecular Sciences, *22*(9), 4709. https://doi.org/10.3390/ijms22094709

Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of plant defense system in response to microbial interactions. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1298. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01298

Oh, S. K., Baek, K. H., Park, J. M., Yi, S. Y., Yu, S. H., & Choi, D. (2008). Capsicum annuum WRKY protein *CaWRKY1* is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytologist*, *177*(4). https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02310.x

Peng, X., Hu, Y., Tang, X., Zhou, P., Deng, X., Wang, H., & Guo, Z. (2012). Constitutive expression of rice *WRKY30* gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, *PR* gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. *Planta*, *236*(5), 1485-1498. https://doi.org/10.1007/s00425-012-1698-7

Phukan, U. J., Jeena, G. S., & Shukla, R. K. (2016). *WRKY* transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. *Frontiers in plant science*, *7*, 760. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00760

Reichert, A. I., He, X. Z., & Dixon, R. A. (2009). Phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco *PAL* genes and active heterotetrameric enzymes. *Biochemical Journal*, *424*(2), 233-242. https://doi.org/10.1042/BJ20090620

Riviere, M. P., Marais, A., Ponchet, M., Willats, W., & Galiana, E. (2008). Silencing of acidic pathogenesis-related *PR-1* genes increases extracellular β-(1→ 3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. *Journal of experimental botany*, *59*(6), 1225-1239. https://doi.org/10.1093/jxb/ern044

Santén, K., Marttila, S., Liljeroth, E., & Bryngelsson, T. (2005). Immunocytochemical localization of the pathogenesis-related PR-1 protein in barley leaves after infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Physiological and molecular plant pathology*, *66*(1-2), 45-54. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.04.006

Sheikh, A. H., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Hoehenwarter, W., Sinha, A. K., Scheel, D., & Lee, J. (2016). Regulation of *WRKY46* transcription factor function by mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 61. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00061

Shi, Y.L., Sheng, Y.Y., Cai, Z.Y., Yang, R., Li, Q.S., Li, X.M., Li, D., Guo, X.Y., Lu, J.L., Ye, J.H., & Wang, K.R. (2019). Involvement of salicylic acid in anthracnose infection in tea plants revealed by transcriptome profiling. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10), 2439. https://doi.org/10.3390/ijms20102439

Shimono, M., Koga, H., Akagi, A.Y.A., Hayashi, N., Goto, S., Sawada, M., Kurihara, T., Matsushita, A., Sugano, S., JIANG, C.J., & Kaku, H. (2012). Rice *WRKY45* plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Molecular plant pathology*, *13*(1), 83-94. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00732.x

Showmy, K. S., & Yusuf, A. (2020). Characterization of disease resistance in nine traditional rice (*Oryza sativa* L.) cultivars and expression of chennellu *PR1* gene in response to

Xanthomonas oryzae pv. *Oryzae*. *Indian Phytopathology*, *73*(2), 281-291. https://doi.org/10.1007/s42360-020-00220-3

Song, F., & Goodman, R. M. (2001). Molecular biology of disease resistance in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *59*(1), 1-11. https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0353

Souza, T. P., Dias, R. O., & Silva-Filho, M. C. (2017). Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress. *Genetics and Molecular Biology*, *40*(1 suppl 1), 360-372. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0057

Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., & Fritig, B. (1993). Plant 'pathogenesis-related'proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, *75*(8), 687-706. https://doi.org/10.1016/0300-9084(93)90100-7

Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2010). The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *Journal of Bacteriology*, *192*(1), 117-126. https://doi.org/10.1128/jb.00689-

Taguchi, F., Yamamoto, M., Ohnishi-Kameyama, M., Iwaki, M., Yoshida, M., Ishii, T., Konishi, T., & Ichinose, Y. (2010). Defects in flagellin glycosylation affect the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *Microbiology*, *156*(1), 72-80. https://doi.org/10.1099/mic.0.030700-0

Tanaka, N., Che, F. S., Watanabe, N., Fujiwara, S., Takayama, S., & Isogai, A. (2003). Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H2O2 generation accompanying hypersensitive cell death and expression of *PAL*, *Cht-1*, and *PBZ1*, but not of *Lox* in rice. *Molecular plant-microbe interactions*, *16*(5), 422-428. https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.5.422

Tunsagool, P., Jutidamrongphan, W., Phaonakrop, N., Jaresitthikunchai, J., Roytrakul, S., & Leelasuphakul, W. (2019). Insights into stress responses in mandarins triggered by *Bacillus subtilis* cyclic lipopeptides and exogenous plant hormones upon *Penicillium digitatum* infection. *Plant cell reports*, *38*(5), 559-575. https://doi.org/10.1007/s00299-019-02386-1

van Verk, M. C., Neeleman, L., Bol, J. F., & Linthorst, H. J. (2010). Tobacco Transcription Factors *NtWRKY12* and *TGA2*. 2 Interact in vitro and in vivo and Activate *PR-1a* Gene Expression.

Vicente, J. G., & Holub, E. B. (2013). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to *brassica* crops. *Molecular plant pathology*, *14*(1), 2-18. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x

Vidhyasekaran, P. (2002). Bacterial disease resistance in plants. *Haworth Press, Inc., 10 Alice Street Binghamton NY 13904-1580 USA. 466*, 466.

Vigers, A. J., Roberts, W. K., & Selitrennikoff, C. P. (1991). A new family of plant antifungal proteins. *Mol Plant Microbe Interact*, *4*(4), 315-323.

Wang, H., Hao, J., Chen, X., Hao, Z., Wang, X., Lou, Y., Peng, Y., & Guo, Z. (2007). Overexpression of rice *WRKY89* enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in

rice plants. *Plant molecular biology*, *65*(6), 799-815. https://doi.org/10.1007/s11103-007-9244-x

Xing, L., Zhi, Q., Hu, X., Liu, L., Xu, H., Zhou, T., Yin, H., Yi, Z., & Li, J. (2022). Influence of association network properties and ecological assembly of the foliar fugal community on crop quality. *Frontiers in microbiology*, *13*, 783923. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.783923

Yang, J., Wang, G. Q., Zhou, Q., Lu, W., Ma, J. Q., & Huang, J. H. (2019). Transcriptomic and proteomic response of *Manihot esculenta* to *Tetranychus urticae* infestation at different densities. *Experimental and Applied Acarology*, *78*(2), 273-293. https://doi.org/10.1007/s10493-019-00387-z

Yang, X., Gu, X., Ding, J., Yao, L., Gao, X., Zhang, M., Meng, Q., Wei, S., & Fu, J. (2022). Gene expression analysis of resistant and susceptible rice cultivars to sheath blight after inoculation with *Rhizoctonia solani*. *BMC genomics*, *23*(1), 278. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08524-6

Yuan, M., Ngou, B. P. M., Ding, P., & Xin, X. F. (2021). PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current opinion in plant biology*, *62*, 102030. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030

Zheng, Z., Qamar, S. A., Chen, Z., & Mengiste, T. (2006). Arabidopsis *WRKY33* transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, *48*(4), 592-605. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02901.x

Zhou, X., Liao, H., Chern, M., Yin, J., Chen, Y., Wang, J., Zhu, X., Chen, Z., Yuan, C., Zhao, W., & Wang, J. (2018). Loss of function of a rice TPR-domain RNA-binding protein confers broad-spectrum disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(12), 3174-3179. https://doi.org/10.1073/pnas.1705927115

Zribi, I., Ghorbel, M., & Brini, F. (2021). Pathogenesis related proteins (PRs): From cellular mechanisms to plant defense. *Current Protein and Peptide Science*, *22*(5), 396-412. https://doi.org/10.2174/1389203721999201231212736