

The impact of chitosan on the activation of genes related to resistance against rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*

Milad Habibi Daronkolaei 

Resercher, Department of Plant Protection, Agronomy Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. milad.habibi08@gamil.com

Valiollah Babaeizad 

*Corresponding Author. Associate Professor, Department of Plant Protection, Agronomy Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail address: v.babaeizad@sanru.ac.ir

Mohammad Ali Tajick Ghanbary 

Associate Professor, Department of Plant Protection, Agronomy Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail address: m.tajick@sanru.ac.ir

Heshmatolah Rahimian 

Professor, Department of Plant Protection, Agronomy Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail address: h.rahimian@sanru.ac.ir

Ali Dehestani 

Associate Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail address: a.dehestani@sanru.ac.ir

Abstract

Objective

Rice is a staple food for half the world's population. The sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* poses a significant threat to rice production. While fungicides are commonly used to control plant diseases, they pose significant risks to human health and the environment. Therefore, finding biocompatible compounds that are effective in disease control is essential. Chitosan, a biocompatible compound, has been demonstrated in various studies to reduce damage. The objective of this research is to explore the induction of resistance in two domestic varieties of rice using chitosan against the fungus responsible for pod burn.

Materials and methods

In the research, rice seedlings (cultivar Tarom and Khazar) were cultured and treated with chitosan. After 48 hours, the seedlings were infected with *R. solani*. Samples were collected at 0, 24, 48, 72, and 96 hours after the pathogen treatment. Total RNA was extracted from the samples, and cDNA was synthesized. Gene transcript analysis was conducted using the qPCR technique with specific primers *PAL*, *LOX*, *PR1*, *PR3*, and *PR5* genes.

Results

The variance analysis results indicated that changes in the expression levels of *PAL*, *LOX*, *PR1*, *PR3*, and *PR5* genes were significant across all sources. Significant differences were observed in the expression levels of all genes. This suggests that genes in the resistant cultivar have a higher expression potential compared to the sensitive cultivar, leading to faster and more extensive-expression during contamination.

Conclusions

In this study, chitosan increased the expression of *PAL*, *LOX*, *PR1*, *PR3* and *PR5* genes in treated plants compared to control plants. The results of this study demonstrate that applying one gram per liter of chitosan to the aerial parts of plants induces proteins related to pathogenicity and creates physical and chemical barriers against pathogens. Consequently, it can be utilized in agricultural management to decrease *R. solani* contamination in rice and is a viable alternative to fungicides.

Keywords: Chitosane, Induced Resistance, Rice sheath blight, qPCR.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Habibi Daronkolaie M, Babaeizad V, Tajick Ghanbary MA, Rahimian H, Dehestani A (2024) The impact of chitosan on the activation of genes related to resistance against rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Agricultural Biotechnology Journal* 16(4), 77-98.

Agricultural Biotechnology Journal 16(4), 77-98.

DOI: 10.22103/jab.2024.23050.1555

Received: September 09, 2024.

Received in revised form: October 23, 2024.

Accepted: October 24, 2024.

Published online: December 30, 2024.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors


تاثیر کیتوزان بر القای ژن‌های دخیل در مقاومت به بیماری سوختگی غلاف برنج ناشی از

Rhizoctonia solani

میلاذ حبیبی درونکلایی 


محقق، گروه گیاهپزشکی، دانشگده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه:

milad.habibi08@gamil.com

ولی‌اله بابایی زاد 


* نویسنده مسئول: دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

رایانامه: v.babaeizad@sanru.ac.ir

محمدعلی تاجیک قنبری 


دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه:

m.tajick@sanru.ac.ir

حشمت‌اله رحیمیان 

استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشگده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه:

h.rahimian@sanru.ac.ir

علی دهستانی 

دانشیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری تبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه:

a.dehestani@sanru.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۸/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۳

چکیده

هدف: برنج (*Oryza sativa* L.) منبع غذایی نیمی از جمعیت جهان است. بیماری سوختگی غلاف ناشی از *Rhizoctonia*

solani تولید برنج را به شدت محدود کرده و منجر به زیان اقتصادی و تهدید امنیت غذایی شده است. استفاده از قارچ‌کش‌ها

یک روش معمول برای کنترل بیماری‌های گیاهی است ولی تهدید جدی برای سلامتی انسان و محیط زیست است. بنابراین یافتن

ترکیبات زیست سازگاری که در کنترل بیماری موثر باشند یک نیاز اساسی است. کیتوزان یک ترکیب زیست سازگار بوده و در بررسی‌های مختلف نیز نشان داده است که باعث کاهش خسارت می‌شود. لذا، هدف از این پژوهش بررسی القاء مقاومت در دو رقم داخلی برنج با کیتوزان در برابر قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ابتدا گیاهچه‌های برنج (ارقام طارم و خزر) کشت، سپس با کیتوزان تیمار نموده و ۴۸ ساعت بعد، گیاهچه‌ها با قارچ *R. solani* مایه‌زنی شدند. نمونه‌برداری در بازه‌های زمانی ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از مایه زنی انجام گرفت. RNA کل از نمونه‌ها استخراج و بعد از زدودن DNA ژنومی، cDNA ساخته شد. بیان ژن با تکنیک qPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌ها *PR5*، *PR3*، *PR1*، *LOX*، *PAL* و *PR5* انجام گردید.

نتایج: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در تمامی منابع تغییرات، میزان بیان ژن‌های *PR5*، *PR3*، *PR1*، *LOX*، *PAL* و *PR5* معنی‌دار بود. بین رقم مقاوم (طارم) و رقم حساس (خزر) به جز ژن *PR1* و *PR5* در مابقی ژن‌ها، مقایسه میانگین‌ها معنی‌دار بوده است که نشان داد ژن‌ها در ارقام مقاوم در مقایسه با ارقام حساس پتانسیل بیان بیشتری دارند که در هنگام آلودگی، سریع‌تر و به میزان بیشتری بیان می‌شوند.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش کیتوزان باعث افزایش میزان بیان ژن‌های *PR5*، *PR3*، *PR1*، *LOX*، *PAL* و *PR5* در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد شده است. این نتایج نشان داد کیتوزان یک گرم در لیتر که روی قسمت‌های هوایی بوته‌ها اسپری شده بود باعث القاء پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و تشکیل سدهای فیزیکی و شیمیایی در برابر عوامل بیماری‌زا می‌گردد در نتیجه می‌تواند در مدیریت زراعی برای کاهش میزان آلودگی *R. solani* در برنج استفاده و جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌ها باشد.

کلیدواژه‌ها: سوختگی غلاف برنج، کیتوزان، مقاومت القایی، qPCR.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: حبیبی درونکلایی میلاد، بابایی‌زاد ولی‌اله، تاجیک قنبری محمدعلی، رحیمیان حشمت‌اله، دهستانی کلاگر (۱۴۰۳) تاثیر کیتوزان بر القای ژن‌های دخیل در مقاومت به بیماری سوختگی غلاف برنج ناشی از *Rhizoctonia solani*. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۶(۴)، ۷۷-۹۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant
Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهمترین محصولات غذایی برای انسان است و منبع غذایی پایدار برای بیش از نیمی از جمعیت جهان را فراهم می‌کند. در سال‌های اخیر به دلیل تغییرات آب و هوایی، بیماری ناشی از *Rhizoctonia solani* Kühn تولید برنج را محدود کرده است و بسته به شدت بیماری، عملکرد ۲۰ تا ۵۰ درصد کاهش پیدا می‌کند در نتیجه باعث زیان‌های اقتصادی شدید شده و امنیت غذایی را تهدید می‌کند (Lee et al. 2006; Wang et al. 2015; Mishra et al. 2020). قارچ‌کش‌ها، خطرات و آلودگی‌های زیست محیطی ایجاد می‌کنند، بنابراین رویکردهای یافتن ترکیبات جایگزین آن‌ها یک نیاز اساسی برای مدیریت بیماری است. استفاده از ترکیبات شیمیایی زیست سازگار یک روش جدید در مدیریت یکپارچه محصولات بوده و مقاومت به بیماری را از طریق مقاومت القایی^۱ تقویت می‌کند (Du 2015) که بر اساس تفاوت در مسیر سیگنال‌دهی به دو نوع، مقاومت اکتسابی سیستمیک (Systemic acquired resistance (SAR) و مقاومت سیستمیک القایی (Induced systemic resistance (ISR) تقسیم می‌شود. ویژگی مهم SAR این است که این مقاومت به صورت دراز مدت و گاهی برای کل زندگی گیاه باقی می‌ماند ولی در ISR فقط در زمان تنش فعال می‌شود (Goellner & Conrath 2008). یکی از پاسخ‌های اولیه در مقاومت، القای ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis Related genes; PRs) است (Lim et al. 2013). نتایج بررسی‌های مختلف نشان داده است که القاء‌کننده‌های غیرزیستی مانند کیتوزان، در کنترل قارچ *Fusarium* و *Fusarium sp.* Akram & Anjum (2014; El-Mohamedy et al. 2011). کیتوزان که با نام کیتین استیله شده نیز شناخته می‌شود، دومین پلیمر طبیعی فراوان در طبیعت است. این ماده یک پلیمر زیستی مبتنی بر صدف دریایی است که از پلی ساکارید کاتیونی با وزن مولکولی بالا تشکیل شده (Yin et al. 2010; Katiyar et al. 2015) و به عنوان یک ترکیب غیر سمی، زیست تخریب پذیر و زیست سازگار است (Hassan & Chang 2017). کیتوزان به دلیل فعالیت ضد قارچی و ضد میکروبی به طور گسترده در کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته است (Fitza et al. 2013; Lopez-Moya et al. 2021). این ترکیب قادر به تحریک تولید آنزیم‌های مربوط به پاسخ‌های دفاعی (کیتینازها، گلوکانازها و فنیل آلانین آمونیا لیناز (PAL) در گیاهان می‌شود (Soni et al. 2023). علاوه بر این، مشخص شده است که این ترکیبات بسته به غلظت و درجه استیلاسیون، قادر به فعال کردن آنزیم PAL و سایر اجزاء مقاومت در گیاهان می‌شود (Stanley-Raja et al. 2021) و منجر به تشکیل سدهای فیزیکی و شیمیایی در برابر عوامل بیماری‌زا مهاجم می‌گردد (Bautista et al. 2003).

کیتوزان، بیماری‌های پوسیدگی خاکستری و کپک آبی (*Botrytis cinerea* Pers. and *Penicillium expansum*) در گوجه فرنگی و آنتراکنوز (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc.) در پاپایا و انبه را به طور موثری

¹ Induced Resistance

کنترل می‌کند (Liu et al. 2007; Al-Eryani-Raqeeb et al. 2009). در پژوهشی درصد آلودگی و شدت بیماری ناشی از *Rhizopus stolonifer* Vuill. در هلو تیمار شده با کیتوزان کاهش یافت (Han et al. 2004). فعالیت قارچ کشی کیتوزان برای ۱۲ جنس بیمارگر گیاهی ثابت شده و بیشترین مهار آن در *Fusarium oxysporum*، *Phomopsis asparagi* Grove و *R. solani* بود (Zhang et al. 2003). مطالعات نشان داده کیتوزان جوانه‌زنی اسپور و رشد میسلیم در دو بیمارگر قارچی در میوه گلابی را مهار کرده و باعث القاء کیتیناز و β -1,3- glucanase شده است (Kim et al. 2005; Meng et al. 2010). نتایج یک تحقیق نشان داد که اسپری برگی کیتوزان، در گندم منجر به کاهش رشد قارچ *F. graminearum* Schwabe در خوشه‌ها و مقاومت القایی خیار در برابر *B. cinerea* می‌شود (Soni et al. 2023). تیمار بذور آفتاب‌گردان با محلول کیتوزان توانست بیماری سفیدک دروغی (*Plasmopara halstedii* Berl. & De Toni) را در شرایط گلخانه و مزرعه کنترل نمایند (Nandeeshkumar et al. 2008). گزارش‌ها نشان داد، ارزیابی تیمار شده با نانوذرات کیتوزان منجر به بیش بیانی ژن‌های *PR5*، *PR1*، *PAL*، پراکسیداز و فنیل اکسیداز پس از تلقیح با قارچ *Sclerospora graminicola* J. Schröt. می‌شود (Manjunatha et al. 2008). تیمار گندم حساس به بیماری سفیدک پودری (*Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* Speer) با کیتوزان باعث افزایش بیان ژن ناقل سیگنال سالیسیلیک اسید، *NPRI* و سرکوب فعالیت ژن‌های سرکوب کننده مرگ سلولی شد (Khatami et al. 2018). کارایی کیتوزان در دفاع کاج مجنون مکزیکی در برابر *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، در خزانه و گلخانه طول لکه‌ها در گیاهان تیمار شده در مقایسه با گیاهان تیمار نشده کاهش و میزان رونوشت فنیل آلانین آمونیا لایز (*PAL*) چهار برابر افزایش یافت (Fitza et al. 2013). به علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Safaei et al. 2022). ماده ژنتیکی ۲ یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه همه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Barazandeh et al. 2016). بنابراین یکی از اقدامات اساسی در بهینه‌سازی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Shahsavari et al. 2023). بنابراین در دسترس بودن ابزارهای ژنومی می‌تواند اصلاح موجودات را در زمان کوتاه‌تر تا حد زیادی افزایش دهد. این ابزارها از جمله آنالیز بیان ژن برای تسهیل شناسایی ژن‌های مقاوم در حال توسعه هستند و بررسی الگوی بیان ژن‌ها و مشخص کردن ژن‌های مقاوم به بیماری در این راستا انجام می‌گیرد. بررسی بیان ژن می‌تواند بررسی یک ژن خاص با استفاده از روش‌هایی مثل Real-Time PCR و یا بررسی تعداد زیادی از ژن‌ها باشد (Mohammadabadi et al. 2023). لذا، هدف از این پژوهش بررسی القاء

² DNA

مقاومت در گیاه برنج تیمار شده با کیتوزان و روند و نرخ بیان ژن‌های مقاومت (*PR5* و *PR3*، *PR1*، *LOX*، *NHI*) پس از آلودگی با قارچ *R. solani* است. تاثیر کیتوزان در دو رقم داخلی برنج در برابر قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این پژوهش تاثیر این القاءکننده در بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت در پاسخ به *R. solani* در دو رقم طارم محلی و خزر برای اولین بار بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تیمار آزمایشی: مطالعه حاضر بر اساس آمیزش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، در ۳ تکرار (که در هر تکرار ۵۰ بوته رقم طارم محلی و ۵۰ بوته رقم خزر) و دو فاکتور القاگر (کیتوزان و *R. solani*) و دو رقم برنج (طارم و خزر) است. نتایج مقایسه میانگین ژن‌ها توسط نرم افزار آماری SAS 9.1 و نمودار نرخ ایجاد رونوشت‌های mRNA با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم گردید.

آماده سازی گیاهان: بذور برنج رقم‌های طارم محلی و خزر از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان تهیه شد. به منظور تولید گیاهچه‌های همسان، بذور پس از ضد عفونی یک دقیقه‌ای در الکل ۷۰ درصد با آب مقطر شستشو سپس ۳۰ دقیقه در هیپوکلرید سدیم تجاری یک درصد تیمار و سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند بعد از آن بذور روی کاغذ فیلتر مرطوب در شرایط تاریکی در دمای آزمایشگاه گذاشته و جوانه‌دار کرده سپس بذور جوانه‌دار شده طارم محلی و خزر به گلدان‌های پلاستیکی که با خاک شالیزار استریل شده پر بود، منتقل و گلدان‌ها به اتاقک رشد (با تناوب نوری ۱۶ ساعت نور با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد) انتقال یافتند.

تیمار، تلقیح پاتوژن، نمونه برداری و استخراج RNA: بعد از ۴ هفته، ۱۰ میلی لیتر کیتوزان (شرکت Sigma) یک گرم در لیتر بر روی قسمت‌های هوایی بوته‌ها اسپری شد (He et al. 1999). ۴۸ ساعت بعد از تیمار کیتوزان، پلاگ میسلیومی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از کشت ۴۸ ساعته قارچ *R. solani* RLB1 (با گروه و زیر گروه آناتوموزی AGI-IA و شماره دسترسی HM211085 از موسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شد) به وسیله چوب پنبه سوراخ‌کن در داخل غلاف دوم برگ گذاشته و با پلاستیک پوشانده شد (Park et al. 2008). از بافت برگ گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد به ترتیب در بازه‌های زمانی ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از تلقیح *R. solani* نمونه‌برداری شد. نمونه‌های برگ پس از انتقال به لوله‌های فالكون به سرعت در نیتروژن مایع فرو برده و سپس به فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

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 کیفیت نمونه‌های cDNA سنتز شده از PCR با آغازگر اختصاصی *I8S* استفاده گردید. تجزیه و تحلیل بیان ژن با تکنیک Quantitative real-time PCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystems® Maxima SYBR 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 در جدول ۱ آمده است. آنالیز نتایج با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد (Livak & Schmittgen 2001). در این بررسی ژن *I8S* به عنوان ژن خانه دار و ژن‌های *PR1*، *PR3*، *PR5*، *LOX* و *PAL* 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

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

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۳ نشان داد که اثرات تیمارها در تمامی منابع تغییرات در میزان بیان ژن‌های *PAL*، *LOX*، *PR1*، *PR3* و *PR5* معنی‌دار بود. معنی‌دار بودن اثرات متقابل به این معنی است که ارقام مورد آزمایش قرار گرفته نسبت به تیمارها واکنش‌های متفاوتی نشان دادند به طوری که در رقم طارم میزان بیان ژن‌های نسبت به رقم خزر بیشتر بوده است.

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

Table 2. The primers used in real time PCR assays

نام ژن	توالی آغازگر	طول قطعه تکثیر شده
Gene name	Primer sequence	Amplicon size (bp)
ژن <i>18S rRNA</i> <i>18S rRNA</i> gene	آغازگر رفت 5'-ATGATAACTCGACGGATCGC-3' Sense Primer	169
	آغازگر برگشت 5'-CCTGGATGTGGTAGCCGTTT-3' Antisense Primer	
ژن <i>PR1</i> <i>PR1</i> gene	آغازگر رفت 5'-AGGCGTTCGCGGAGAACTA-3' Sense Primer	92
	آغازگر برگشت 5'-GAAGAGGTTCTCGCCAAGGTT-3' Antisense Primer	
ژن <i>PR3</i> <i>PR3</i> gene	آغازگر رفت 5'-TACTGTGTCCAGAGCTCGCAGTGG-3' Sense Primer	165
	آغازگر برگشت 5'-TCTGGTTGTAGCAGTCCAAGTTGG-3' Antisense Primer	
ژن <i>PR5</i> <i>PR5</i> gene	آغازگر رفت 5'-ACCTCTCCGCTGTCCTC-3' Sense Primer	241
	آغازگر برگشت 5'-GAAGACGACTTGGTAGTTGC-3' Antisense Primer	
ژن <i>PAL</i> <i>PAL</i> gene	آغازگر رفت 5'-AGATGAGGCGCGTGATGAC-3' Sense Primer	185
	آغازگر برگشت 5'-CATGGAAGTCGAGCATGAACA-3' Antisense Primer	
ژن <i>LOX</i> <i>LOX</i> gene	آغازگر رفت 5'-GGTGTCTGCGAGGTGATGA-3' Sense Primer	180
	آغازگر برگشت 5'-AGGGTGGTGCTTCAGCTTGT-3'	

جدول ۳. تجزیه واریانس بیان ژن‌های اندازه‌گیری شده در آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی

Table 3. Analysis of variance of gene expression was measured in a factorial experiment using a completely randomized design

میانگین مربعات Mean square					درجه آزادی DF	منابع تغییرات Source of variation
<i>PR5</i>	<i>PR3</i>	<i>PR1</i>	<i>LOX</i>	<i>PAL</i>		
1.636**	12.177**	9.322**	0.833**	12.186**	1	تیمار Treatment
0.990**	5.557**	6.045**	4.603**	4.762**	4	زمان Time
0.165**	8.763**	0.847**	3.937**	11.952**	1	رقم Cultivar
0.360**	4.713**	3.536**	0.483**	5.391**	4	تیمار×زمان Treatment ×Time
0.001**	5.797**	0.007**	0.101**	3.800**	1	تیمار×رقم Treatment ×Cultivar
0.889**	3.750**	2.230**	1.569**	8.252**	4	زمان×رقم Time×Cultivar
0.643**	2.177**	0.431**	0.041**	7.069**	4	تیمار×زمان×رقم Treatment ×Time×Cultivar
0.004	0.003	0.001	0.001	0.001	40	خطای آزمایش Error
8.111	5.376	4.212	4.746	3.518		ضریب تغییرات CV

Significant at 1% level of probability **: **

بررسی الگوی بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز (*PAL*): در بوته‌های برنج رقم طارم تیمار شده با کیتوزان و طارم

شاهد، ۲۴ ساعت پس از آلودگی بیان ژن *PAL* نسبت به زمان صفر به ترتیب ۱/۸۹ و ۱/۵۷ برابر بوده و بیشترین میزان بیان این ژن در طارم تیمار شده با کیتوزان در ۷۲ ساعت بعد از آلودگی بوده است ولی در بوته‌های برنج رقم خزر تیمار شده با کیتوزان و خزر

شاهد بیان ژن افزایشی نسبت به زمان صفر نداشته است اما در تمامی بازه‌های زمانی میزان بیان این ژن در خزر تیمار شده با کیتوزان نسبت به خزر شاهد بیشتر بوده است (شکل ۱).

جدول ۴. مقایسه میانگین بین تیمارها در ژن‌های *PR5*، *PR3*، *PR1*، *LOX*، *PAL*

Table 4. Average comparison between treatments *PAL*, *LOX*, *PR1*, *PR3* and *PR5* genes

<i>PR5</i>	<i>PR3</i>	<i>PR1</i>	<i>LOX</i>	<i>PAL</i>	تیمار
0.97 ^a	1.53 ^a	1.19 ^a	0.93 ^a	1.60 ^a	کیتوزان Chitosane
0.64 ^b	0.63 ^b	0.40 ^b	0.7 ^b	0.7 ^b	ریزوکتونیا <i>R. solani</i>

میانگین‌ها با حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال یک در صد با استفاده از آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند

The meanings of the same letters in each column not have a significant difference

جدول ۵. مقایسه میانگین بین رقم‌ها در میزان ژن‌های *PR5*، *PR3*، *PR1*، *LOX*، *PAL*

Table 5. Comparison of the average between numbers in *PAL*, *LOX*, *PR1*, *PR3* and *PR5* genes

<i>PR5</i>	<i>PR3</i>	<i>PR1</i>	<i>LOX</i>	<i>PAL</i>	رقم Cultivar
0.86 ^a	1.47 ^a	0.91 ^a	1.07 ^a	1.59 ^a	طارم Tarom
0.75 ^a	0.70 ^b	0.67 ^b	0.56 ^b	0.70 ^b	خزر Khazar

میانگین‌ها با حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال یک در صد با استفاده از آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند

The meanings of the same letters in each column not have a significant difference

ژن کد کننده *PAL* یک ژن مهم دفاعی در گیاهان است (Pellegrini et al. 1994). فنیل آلانین آمونیا لیاز (*PAL*) آنزیمی است که در مسیر فنیل پروپانوئید، تبدیل ال فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند سپس ترانس سینامیک اسید وارد مسیرهای بیوسنتزی مختلف شده که منجر به سنتز لیگنین در برابر تهاجم بیمارگر می‌شود. سطح فعالیت *PAL* کلید کنترل سنتز فنیل پروپانوئیدها است. *PAL* در سنتز ترکیبات ضد میکروبی ثانویه گیاهی نیز شرکت دارد که این ترکیبات نقش مهمی در پاسخ‌های مقاومت به بیماری‌های گیاهی ایفا می‌کنند (Waewthongrak et al. 2015). گزارش شده است که انباشته شدن غلظت‌های بالای ترکیبات فنولی با افزایش فعالیت *PAL* مرتبط است (Geetha et al. 2005). ژانگ و همکاران (۲۰۱۷) پی بردند ترکیبات *PAL* در رقم مقاوم بسیار بیشتر از رقم حساس تجمع پیدا می‌کنند (Zhang et al. 2017). در بررسی‌ای نشان داده

شد بیان ژن PAL در بازه زمانی اولیه در رقم طارم نسبت به خزر بیشتر بوده است (Sayari et al. 2014). در این بررسی نیز مشاهده شد که بیان این ژن در رقم طارم نسبت به رقم خزر بیشتر است. بیان نسبی این ژن بین دو تیمار *R. solani* و کیتوزان معنی‌دار بوده است همچنین ترکیبات PAL در گیاهان تیمار شده با کیتوزان پس از مایه کوبی پاتوژن به مقدار بیشتری از گیاهان تیمار شده با *R. solani* تجمع پیدا کرد.

اثر کیتوزان در میزان بیان ژن لیپواکسیژناز (LOX): ژن LOX در بوته‌های برنج شاهد و تیمار شده با

کیتوزان افزایشی نسبت به زمان صفر نداشتند اما میزان بیان در بوته‌های خزر تیمار شده با کیتوزان نسبت به خزر شاهد بیشتر بود ولی در بوته‌های برنج رقم طارم شاهد و تیمار شده با کیتوزان در زمان ۲۴ به اوج خود نسبت به زمان صفر (به ترتیب ۲/۰۷ و ۳/۲۰) رسید و پس از آن، میزان بیان کاهش یافت (شکل ۱). LOXها نقش‌های متنوعی در طول مراحل مختلف رشدی و تنش‌های محیطی دارند (Forouzanfar et al. 2016). یکی از نقش‌های مهم آن انتقال سیگنال و القاء پاسخ‌های دفاعی است (Kolomiets et al. 2000; Eckardt 2008; Gao et al. 2011). در گیاهان، LOXها آنزیم‌های چند عملکردی هستند که واکنش دی‌اکسیژناسیون بسترهای لیپیدی را کاتالیز می‌کنند. فعالیت عملکردی LOXها بر اساس مکان بافت گیاهی و مکان اکسیژن رسانی طبقه‌بندی می‌شوند (Feussner & Wasternack 2002; Vello-sillo et al. 2007). هیدروپراکسیدها بسیار واکنش پذیر هستند و به سرعت به پیش سازهایی برای سنتز جاسمونیک اسید، متیل جاسمونات (MeJ)، دی انوئیک اسیدهای مزدوج و چندین ترکیب آلدئید فرار تجزیه می‌شود. Sayari et al. (2014) دریافتند میزان فعالیت LOX در رقم‌های مقاوم (طارم) نسبت به رقم حساس (خزر) در پاسخ به *R. solani* بیشتر است (Sayari et al. 2014). در این بررسی نیز میزان بیان ژن LOX در رقم طارم نسبت به رقم خزر بیشتر بوده است. بنابراین چنین استنباط می‌شود که ژن LOX در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس پتانسیل بیشتری در بیان دارند به طوری که در هنگام آلودگی به بیماری، ترکیبات LOX سریع‌تر و به میزان بیشتری در ارقام مقاوم بیان می‌شود. نشان داده شده است جاسمونات‌ها به عنوان سیگنال تحت تنش عوامل بیماری‌زا و حشرات عمل کرده و بیان ژن‌های مربوط به دفاع را تنظیم می‌کند (Taheri & Tarighi 2010). JA محرک اصلی ISR در گیاهان و القا کننده ژن‌های مختلف مرتبط با دفاع برای محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا است (Jain et al. 2017) که می‌توان نتیجه گرفت کیتوزان باعث افزایش بیان LOX و در ادامه باعث فعال شدن ژن‌های مرتبط به دفاع گردیده در نتیجه از گسترش بیماری جلوگیری کرده است.

بیان ژن PRI در برنج‌های تیمار شده و شاهد در تعامل با قارچ *R. solani*: در گیاه خزر (شاهد و تیمار شده)

میزان بیان ژن PRI در پاسخ به آلودگی *R. solani* نسبت به زمان صفر افزایش بیانی مشاهده نشد اما میزان بیان در خزر تیمار شده با کیتوزان در برابر خزر شاهد بیشتر بود ولی در بوته‌های برنج رقم طارم شاهد و تیمار شده با کیتوزان، ۷۲ ساعت بعد از آلودگی بیان این ژن به بیشینه خود رسید که سطح آن به ترتیب ۱/۱۷ و ۴/۴۲ برابر زمان شاهد (زمان صفر) بود و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی نرخ بیان کم شد (شکل ۱). PRIها به عنوان مارکرهای پروتئین‌های القا شده در سیستم ایمنی گیاه در نظر گرفته می‌شوند (Ali

(et al. 2018). پروتئین‌های PR1 در گیاهان مختلف شباهت زیادی با یکدیگر دارند و از نظر ساختاری بسیار حفاظت شده هستند. نشان داده شده است که این پروتئین‌ها در تنش‌های زیستی نقش مهمی ایفا می‌کنند (Lincoln et al. 2018). مطالعات قبلی نشان داد که سطح رونویسی و ترجمه PR1 در گیاهان تحت تنش زیستی افزایش می‌یابد (Tunsagool et al. 2019; Yang et al. 2019). تحقیقات نشان داده است که افزایش بیان ژن PR1 در گیاهان تراریخته باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر بیماری‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی می‌شود و خاموش کردن آن در گیاه، باعث افزایش حساسیت به بیمارگر می‌گردد (Jiang et al. 2019). هیچ شواهد قطعی مبنی بر اینکه پروتئین‌های PR1 مستقیماً رشد بیمارگر را مهار می‌کنند، وجود ندارد (Pečenková et al. 2017) اما لینکلن و همکاران گزارش نموده‌اند که افزایش میزان بیان ژن PR1، سطح گونه‌های اکسیژن فعال را تعدیل می‌کند در نتیجه باعث افزایش مقاومت در برابر بیماری می‌شود (Lincoln et al. 2018). علاوه بر این، پروتئین PR1 با تقویت دیواره سلولی میزان از گسترش بیمارگر جلوگیری می‌کند (Santén et al. 2005). تحقیقات قبلی نشان داده است، ژن PR1 در رقم طارم به میزان بیشتری نسبت به رقم خزر القا می‌شود (Sayari et al. 2014). در این پژوهش نیز بیان این ژن در رقم طارم در مقایسه با رقم خزر هنگامی که تحت تنش *R. solani* قرار گرفت بیشتر بوده است. همچنین در رقم طارم تیمار شده با کیتوزان در مقایسه با شاهد تیمار نشده هنگامی که تحت تنش *R. solani* قرار می‌گیرند بیان ژن PR1 افزایش داشته که می‌توان گفت کیتوزان باعث افزایش مولکول‌های سیگنالینگ شده و به دنبال آن افزایش بیان PR1 صورت گرفته است که نتیجه آن ایجاد مقاومت در گیاه میزبان بوده است.

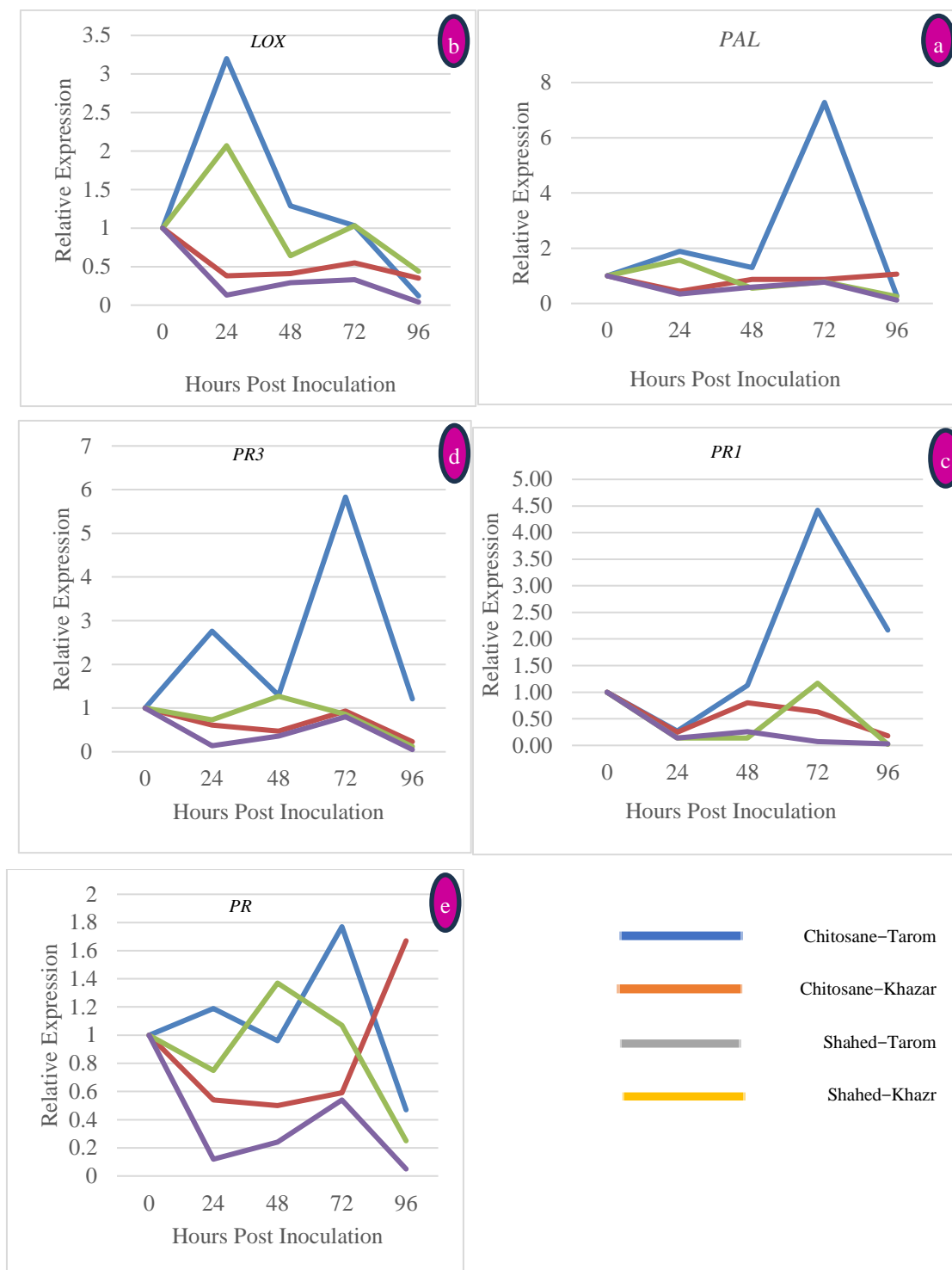
میزان تاثیر تیمارها در بیان ژن PR3 بیان ژن PR3 در بوته‌های برنج رقم طارم تیمار شده با کیتوزان تحت تنش با *R. solani* در تمامی ساعات بعد از آلودگی افزایش داشته و بیشترین میزان آن در ۷۲ ساعت بعد از آلودگی، ۵/۸۳ برابر نسبت به زمان صفر و در طارم شاهد بیشترین میزان بیان در ساعت ۴۸ به میزان ۱/۲۷ بود ولی در رقم خزر (شاهد و تیمار شده) به دنبال آلودگی با *R. solani*، بیان این ژن افزایش نداشته است اما در بوته‌های خزر تیمار شده با کیتوزان نسبت به خزر شاهد در تمامی بازه‌های زمانی بیان بیشتر بود (شکل ۱). خانواده PR3، پروتئین‌های دارای خواص کیتینازی هستند (Sels et al. 2008). کیتیناز یک پروتئین هموپلیمر خطی از واحدهای N-استیل-دی گلوکز آمین است که با پیوندهای بتا ۱ و ۴ به هم متصل هستند (Jwa et al. 2006). کیتینازها به دو دسته اگزوکیتینازها و اندوکیتینازها تقسیم می‌شود (Payne et al. 1990). اندوکیتینازها در بسیاری از گیاهان فعالیتی مانند لیزوزیم از خود نشان می‌دهند. نشان داده شده است که کیتینازها فعالیت ضد قارچی قابل توجهی در برابر قارچ‌های بیماری‌زا مانند *Fusarium oxysporum* و *Cercospora nicotianae* Ellis & Everh. دارند (Zhu et al. 1994; Jongedijk 1995). پروتئین‌های PR3 می‌توانند پلیمرهای کیتین را در دیواره سلولی جدا کنند به طوری که دیواره سلولی ضعیف شده و حساسیت اسمزی در قارچ را افزایش دهد (Golshani et al. 2015). بیان ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز منجر به مقاومت بیشتر گوجه فرنگی در برابر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* W.C. Snyder & H.N. Hansen می‌شود در صورتی که در گیاهان تراریخته که یکی از این ژن‌ها بیان می‌شود، مقاومت کمتر است (Jongedijk 1995). گائو و

همکاران (۲۰۱۳) دریافتند که *PR3* تحت تنش شوری بیان می‌شود (Qing-Hua et al. 2013). میزان بیان *PR3* در رقم مقاوم (طارم) نسبت به رقم حساس (خزر) بیشتر بوده است. در این بررسی سطح بیان *PR3* به طور قابل توجهی در طارم تیمار شده نسبت به شاهد بالاتر بود که بیانگر این است که تیمار کیتوزان از طریق فعال کردن مقاومت القایی^۳ باعث می‌شود گیاه پس از دریافت اولین سیگنال حمله بیمارگر، شروع به افزایش میزان بیان ژن *PR3* کرده و در نتیجه دیواره سلولی قارچ تخریب شده و مانع پیشروی بیماری می‌گردد. نتایج تحقیقات گذشته نیز حاکی از نقش موثر این تیمارها در القاء مقاومت علیه بیمارگرهای مختلف دارد (Wei et al. 2003).

تاثیر کیتوزان در میزان بیان ژن شبه تاوماتین (*PR5*): میزان بیان *PR5* در رقم خزر شاهد در تمامی ساعات بعد

از آلودگی نسبت به زمان صفر کم بود اما در خزر تیمار شده با کیتوزان در ساعت ۹۶، ۱/۶۷ برابر نسبت به زمان صفر شد. در بوته‌های برنج رقم طارم تیمار شده میزان بیان این ژن در پاسخ به آلودگی ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی افزایش یافت سپس مقداری کاهش و در ساعت ۷۲ دوباره ۱/۷۷ برابر نسبت به زمان صفر شد و در بوته‌های برنج رقم طارم شاهد ۴۸ ساعت بعد از آلودگی به بیشینه بیان نسبی خود به میزان ۱/۳۷ رسید (شکل ۱). ژن *PR5* توسط سیگنال‌هایی مانند، اسید سالیسیلیک (SA)، اسید آسبیزیک (ABA)، اکسین، ET، شوری، شرایط خشکی، نور UV، زخم، خشکی، سرما، بیماری قارچی، اوومیسیت‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها بیان می‌شود، این بیان منجر به تجمع پروتئین‌های اسموتین در سلول‌های گیاهی می‌شود (Fagoaga et al. 2001; Anil Kumar et al. 2015). نشان داده شده است یک تعامل فیزیکی بین غشای پلاسمایی قارچ‌های حساس و پروتئین‌های *PR5* وجود دارد (Ramos et al. 2015). پروتئین‌های *PR5* به عنوان پروتئین‌های شبه تاوماتین نیز شناخته می‌شوند زیرا به دنباله تاوماتین شباهت دارند (Hoffmann-Sommergruber 2000). پروتئین‌های خانواده *PR5* فعالیت ضدقارچی و ضدیخ نیز دارند (Rombouts et al. 2010; Liu et al. 2007). پروتئین‌های *PR5* در برگ‌های جوان تنباکو به سرعت تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی بیان و تجمع می‌یابد (Chen 2012). پروتئین‌های *PR5* نفوذپذیری غشای لیپوزوم را تغییر می‌دهند (Anzlovar et al. 1998) و با ایجاد نشت غشایی در دو لایه لیپیدی، نفوذپذیری غشا را افزایش می‌دهد (Osmond et al. 2001; Anzlovar & Dermastia 2015: Sharma et al. 2003). نشان داده شده است که *PR5s* پروتئین‌های معمولی میزبان هستند که در پاسخ‌های دفاعی نقش دارند (Gómez-Casado et al., 2014). در این بررسی میزان بیان *PR5* در رقم مقاوم (طارم) نسبت به رقم حساس (خزر) معنی‌دار نبوده است. عدم معنی داری بیان *PR5* بین دو رقم ممکن است به دلیل مکانیسم‌های جبرانی باشد. در واقع اگر سایر پروتئین‌های *PR* یا مکانیسم‌های دفاعی فعال شوند، نقش *PR5* ممکن است تحت الشعاع قرار گیرد (Utsugi et al. 2014) پس می‌توان نتیجه گرفت که افزایش فعالیت سایر ژن‌ها، باعث کاهش فعالیت ژن *PR5* شده و منجر به عدم معنی‌داری بین دو رقم شده است.

³ Induced Resistance



شکل ۱. نرخ ایجاد رونوشت‌های mRNA ژن‌های PAL (a)، LOX (b)، PR1 (c)، PR3 (d) و PR5 (e) در رقم‌های طارم (مقاوم) و خزر، شاهد و تیمار شده با کیتوزان در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با *R. solani*

Figure 1. The mRNA transcript levels of PAL (a), LOX (b), PR1 (c), PR3 (d), and PR5 (e) genes in Tarom (Resistance) and Khazar cultivars were analyzed in both control and chitosan-treated plants over hours post-inoculation with *R. solani*

نتیجه گیری: استفاده از قارچ‌کش‌ها یک روش معمول برای کنترل بیماری‌های گیاهی است ولی کنترل شیمیایی هزینه تولید را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد و تهدید جدی برای سلامتی انسان و محیط زیست است. علاوه بر این با ظهور نژادهای مقاوم به قارچ‌کش‌ها، استفاده از قارچ‌کش‌ها تاثیر مطلوب و با دوامی ندارد. از این رو یک روش جدید در مدیریت یکپارچه محصولات استفاده از ترکیبات شیمیایی زیست سازگار است که مقاومت به بیماری را از طریق مقاومت سیستمیک القایی (ISR) تقویت می‌کند. ISR پدیده‌ای است که به دنبال آن واکنش‌های دفاعی سریع‌تر و قوی‌تری اتفاق می‌افتد. در این پژوهش بررسی مولکولی نشان داد این ماده از طریق القای ژن *PAL* و چند ژن مرتبط با بیماری‌زایی باعث فعال شدن مکانیسم مقاومت القایی^۴ در گیاه برنج رقم طارم در برابر بیماری سوختگی غلاف شده و تاثیر خوبی در کنترل این بیماری در شرایط گلخانه داشته است از این رو ممکن است این القاکننده‌ها جایگزینی برای ترکیبات شیمیایی در کنترل سوختگی غلاف در مزرعه باشد که لازم است مورد مطالعه دقیق قرار گیرد.

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

References

- Akram W, Anjum T (2011) Use of bioagents and synthetic chemicals for induction of systemic resistance in tomato against diseases. *Int Res J Agric Sci Soil Sci* 1(08), 286-292.
- Al-Eryani-Raqeeb A, Mahmud TMM, Syed Omar SR, et al. (2009) Effects of calcium and chitosan treatments on controlling anthracnose and postharvest quality of papaya (*Carica papaya* L.). *Int J Agric Res* 4(2), 53-68.
- Ali S, Mir ZA, Bhat JA, et al. (2018) Isolation and characterization of systemic acquired resistance marker gene *PR1* and its promoter from *Brassica juncea*. *3 Biotech* 8, 1-14.
- Anil Kumar S, Hima Kumari P, Shravan Kumar G, et al. (2015) Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. *Front Plant Sci* 6, 163.
- Anžlovar S, Dermastia M (2003) The comparative analysis of osmotins and osmotin-like PR-5 proteins. *Plant Biol* 5(02), 116-124.
- Anžlovar S, Serra MD, Dermastia M, Menestrina, G (1998) Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. *Mol Plant-Microbe Interact* 11(7), 610-617.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech J Anim Sci* 61, e487.

⁴ Induced Resistance

- Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E, Wilson CL (2003) Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Prot* 22(9), 1087-1092.
- Chen D (2012) *Aspergillus niger* control on strawberries by recombinant tobacco osmotin for extending shelf-life (Doctoral dissertation).
- Du Jardin P (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci Hort* 196, 3-14.
- Eckardt NA (2008) Oxylin signaling in plant stress responses. *Plant Cell* 20 495–497.
- El-Mohamedy RS, Abdel-Kader MM, Abd-El-Kareem F, El-Mougy NS (2013) Essential oils, inorganic acids and potassium salts as control measures against the growth of tomato root rot pathogens in vitro. *J Agric Technol* 9(6), 1507-1520.
- Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, et al. (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Mol Breed* 7, 175-185.
- Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Rev Plant Biol* 53(1), 275-297.
- Fitza KN, Payn KG, Steenkamp ET, et al. (2013) Chitosan application improves resistance to *Fusarium circinatum* in *Pinus patula*. *S Afr J Bot* 85, 70-78.
- Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, et al. (2016) Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388(10053), 1659-1724.
- Gao G, Zhang S, Wang C, et al. (2011) Arabidopsis CPR5 independently regulates seed germination and postgermination arrest of development through *LOX* pathway and ABA signaling. *PLoS One* 6(4), e19406.
- Geetha NP, Amruthesh KN, Sharathchandra RG, Shetty HS (2005) Resistance to downy mildew in pearl millet is associated with increased phenylalanine ammonia lyase activity. *Funct Plant Biol* 32(3), 267-275.
- Goellner K, Conrath U (2008) Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Sustainable Disease Management in a European Context*, 233-242.
- Golshani F, Fakheri BA, Behshad E, Vashvaei RM (2015) PRs proteins and their mechanism in plants. *Biol Forum* 7(1), 477.
- Gómez-Casado C, Murua-García A, Garrido-Arandia M, et al. (2014) Alt a 1 from *Alternaria* interacts with PR5 thaumatin-like proteins. *FEBS Lett* 588(9), 1501-1508.

- Han C, Zhao Y, Leonard SW, Traber MG (2004) Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria ananassa*) and raspberries (*Rubus idaeus*). *Postharvest Biol Technol* 33(1), 67-78.
- Hassan O, Chang T (2017) Chitosan for eco-friendly control of plant disease. *Asian J Plant Pathol* 11(2), 53-70.
- He P, Davis SS, Illum L (1999) Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int J Pharm* 187(1), 53-65.
- Hoffmann-Sommergruber K (2000) Plant allergens and pathogenesis-related proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 122(3), 155-166.
- Jain S, Vaishnav A, Kumari S, et al. (2017) Chitinolytic *Bacillus*-mediated induction of jasmonic acid and defense-related proteins in soybean (*Glycine max* L. Merrill) plant against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. *J Plant Growth Regul* 36, 200-214.
- Jiang L, Wu J, Fan S, et al. (2015) Isolation and characterization of a novel pathogenesis-related protein gene (*GmPRP*) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae*. *PLoS One* 10(6), e0129932.
- Jongedijk E, Tigelaar H, Van Roekel JS, et al. (1995) Synergistic activity of chitinases and β -1, 3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica* 85, 173-180.
- Jwa NS, Agrawal GK, Tamogami S, et al. (2006) Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiol Biochem* 44(5-6), 261-273.
- Katiyar D, Hemantaranjan A, Singh B (2015) Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian J Plant Physiol* 20, 1-9.
- Khatami M, Ahangar L, Taliei Tabari F, et al. (2018) Assay of *NPRI*, *MLO* and *BI-1* genes expression in susceptible wheat to powdery mildew after treatment with chitosan. *Cell Mol Biol Res (Iran J Biol)* 31(4), 471-483.
- Kim SK, Rajapakse N (2005) Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr Polym* 62(4), 357-368.
- Kolomiets MV, Chen H, Gladon RJ, et al. (2000) A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiol* 124(3), 1121-1130.
- Lee J, Bricker TM, Lefevre M, et al. (2006) Proteomic and genetic approaches to identifying defence-related proteins in rice challenged with the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Mol Plant Pathol* 7(5), 405-416.

- Lim S, Borza T, Peters RD, et al. (2013) Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*. *J Proteomics* 93, 207-223.
- Lincoln JE, Sanchez JP, Zumstein K, Gilchrist DG (2018) Plant and animal *PRI* family members inhibit programmed cell death and suppress bacterial pathogens in plant tissues. *Mol Plant Pathol* 19(9), 2111-2123.
- Liu J, Tian S, Meng X, Xu Y (2007) Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biol Technol* 44(3), 300-306.
- Liu JJ, Zamani A, Ekramoddoullah AK (2010) Expression profiling of a complex thaumatin-like protein family in western white pine. *Planta* 231, 637-651.
- Liu Y, Liu Q, Tang Y, Ding W (2019) NtPR1a regulates resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Nicotiana tabacum* via activating the defense-related genes. *Biochem Biophys Res Commun* 508(3), 940-945.
- Livak KJ, Schmittgen TD, (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *Methods* 25(4), 402-408.
- Lopez-Moya F, Martin-Urdiroz M, Osés-Ruiz M, et al. (2021) Chitosan inhibits septin-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in a protein kinase C and Nox1 NADPH oxidase-dependent manner. *New Phytol* 230(4), 1578-1593.
- Manjunatha G, Roopa KS, Prashanth GN, Shekar Shetty H (2008) Chitosan enhances disease resistance in pearl millet against downy mildew caused by *Sclerospora graminicola* and defence-related enzyme activation. *Pest Manage Sci* 64(12), 1250-1257.
- Maschietto V, Lanubile A, De Leonardis S, et al. (2016) Constitutive expression of pathogenesis-related proteins and antioxidant enzyme activities triggers maize resistance towards *Fusarium verticillioides*. *J Plant Physiol* 200, 53-61.
- Meng X, Yang L, Kennedy JF, Tian S (2010) Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydr Polym* 81(1), 70-75.
- Mishra D, Rajput RS, Zaidi NW, Singh HB (2020) Sheath blight and drought stress management in rice (*Oryza sativa*) through *Trichoderma* spp. *Indian Phytopathol* 73(1), 71-77.
- Mohammadabadi M, Golkar A, Askari Hesni M (2023) The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agric Biotechnol J* 15 (4), 239-256 (In Persian).
- Nandeeshkumar P, Sudisha J, Ramachandra KK, et al. (2008) Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiol Mol Plant Pathol* 72(4-6), 188-194.

- Osmond RI, Hrmova M, Fontaine F, et al. (2001) Binding in-teractions between barley thaumatin-like proteins and (1, 3)- β -D-glucans. *Biochem* 268, 4190–4199.
- Park DS, Sayler RJ, Hong YG, et al. (2008) A method for inoculation and evaluation of rice sheath blight disease. *Plant Dis* 92(1), 25-29.
- Payne G, Ahl P, Moyer M, et al. (1990) Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco. *Proc Natl Acad Sci* 87(1), 98-102.
- Pečenková T, Pleskot R, Žárský V (2017) Subcellular localization of *Arabidopsis* pathogenesis-related 1 (PR1) protein. *Int J Mol Sci* 18(4), 825.
- Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B, Legrand M (1994) Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco (molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor). *Plant Physiol* 106(3), 877-886.
- Qing-Hua G, Xiang-Ran Z, Lin J, et al. (2013). The expression profiling of rice pathogenesis-related proteins in seedling stage under environmental stresses. *Prog Biochem Biophys* 40(11), 1140-1147.
- Ramos MV, de Oliveira RS, Pereira HM, et al. (2015) Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: Insights into the mechanism of action. *Phytochem* 119, 5-18.
- Rombouts S, Volckaert G, Rabijns A (2007) Molecular and mutational analysis of a wheat thaumatin-like xylanase inhibitor (TLXI).
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13 (1), e14.
- 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*. *Physiol Mol Plant Pathol* 66(1-2), 45-54.
- 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*. *Physiol Mol Plant Pathol* 66(1-2), 45-54.
- Sayari M, Babaeizad V, Ghanbari MAT, Rahimian H (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. *J Plant Prot Res* 54(1).
- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, et al. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem.* 46(11), 941-950.

- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2023) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. *Anim Biotechnol* 34 (4), 882-892.
- Sharma P, Gaur SN, Goel N, Arora N (2015) Engineered hypoallergenic variants of osmotin demonstrate hypoallergenicity with in vitro and in vivo methods. *Mol Immunol* 64(1), 46-54.
- Soni AT, Rookes JE, Arya SS (2023) Chitosan Nanoparticles as Seed Priming Agents to Alleviate Salinity Stress in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings. *Polysaccharides* 4(2), 129-141.
- Stanley-Raja V, Senthil-Nathan S, Chanthini KMP, et al. (2021) Biological activity of chitosan inducing resistance efficiency of rice (*Oryza sativa* L.) after treatment with fungal based chitosan. *Sci Rep* 11(1), 20488.
- Taheri P, Tarighi S (2010) Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. *J Plant Physiol* 167(3), 201-208.
- Tunsagool P, Jutidamrongphan W, Phaonakrop N, et al. (2019) Insights into stress responses in mandarins triggered by *Bacillus subtilis* cyclic lipopeptides and exogenous plant hormones upon *Penicillium digitatum* infection. *Plant Cell Rep* 38, 559-575.
- Utsugi C, Miyazono S, Osada K, et al. (2014). Hard-diet feeding recovers neurogenesis in the subventricular zone and olfactory functions of mice impaired by soft-diet feeding. *PLoS One* 9(5), 97309.
- Vello-sillo T, Martínez M, Lopez MA, et al. (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* 19(3), 831-846.
- Waewthongrak W, Pisuchpen S, Leelasuphakul W (2015) Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biol Technol* 99, 44-49.
- Wang LL, Liu LM, Hou YX, et al. (2015) Pathotypic and genetic diversity in the population of *Rhizoctonia solani* AG 1-IA causing rice sheath blight in China. *Plant Pathol* 64(3), 718-28.
- Wei N, Zhixue L, Qun L, et al. (2003) Oligo saccharide oligo-GlcNAc induces hypersensitive cell death and enhances disease resistance in rice. *Plant Physiol Commun* 39(5), 441-443.
- Yang J, Wang GQ, Zhou Q, et al. (2019) Transcriptomic and proteomic response of *Manihot esculenta* to *Tetranychus urticae* infestation at different densities. *Exp Appl Acarol* 78, 273-293.

- Yin H, Zhao X, Du Y (2010) Oligochitosan: a plant diseases vaccine—a review. Carbohydr Polym 82(1), 1-8.
- Zhang J, Chen L, Fu C, et al. (2017) Comparative transcriptome analyses of gene expression changes triggered by *Rhizoctonia solani* AG1 IA infection in resistant and susceptible rice varieties. Front Plant Sci 8, 1422.
- Zhang MI, Tan T, Yuan H, Rui C (2003) Insecticidal and fungicidal activities of chitosan and oligo-chitosan. J Bioact Compat.Polym 18(5), 391-400.
- Zhu Q, Maher EA, Masoud S, et al. (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. Bio/Technology 12(8), 807-812.