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

Evaluation of expression pattern of several pathogenesis related genes and *PAL* in sour orange plant following treatment with SA and JA in response to citrus blast bacterium *Pseudomonas viridiflava*

Hossein Moradi

Former Ph.D.Student, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.and Higher Education Complex of Saravan, Saravan, Iran. E-mail address: hossmor@gmail.com

Valiollah Babaeizad

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

Heshmatollah Rahimian

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

Ali Pakdin Parizi

Assistant Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail address: ali.pakdin@gmail.com

Mohammad Ali Tajick Ghanbary

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

Abstract

Objective

Plant diseases are one of the major limitations in agricultural production. Citrus blast disease is one of the most common diseases in citrus producing regions of the world, with the exception of tropical regions. Plants respond to bacterial pathogens by activating genes encoding defense proteins. One of the defense mechanisms of plants against pathogens is the accumulation of Pathogenesis related proteins associated. The aim of this study was to evaluate the expression of several defense genes against *Pseudomonas viridiflava* after treatment of seedlings with Salicylic acid and Jasmonic acid.

Materials and methods

The expression levels of *PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, POX, LOX pathogenesis related* and *PAL* genes in the early stages of citrus blast disease in *Citrus aurantium* were assessed using RT-PCR. In this study, *UBI* gene was used as a housekeeping gene. The total RNA of the samples was extracted and after cDNA synthesis, the expression level changes of the declared genes were calculated and measured using the formula $2^{-(\Delta\Delta CT)}$.

Results

Increased expression of *PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, POX, LOX* Pathogenesis related and *PAL* genes in the early stages of citrus blast disease in sour orange mostly occurred at 24 and 48 hours after challenging with the citrus blast causal agent *P. viridiflava*.

Conclusions

The results of this study was showed that salicylic acid treatment had a greater effect on the expression of *PR1, PR2, PAL, POX* and *PR5* genes than jasmonic acid and jasmonic acid treatment was showed a greater effect on the induction of *PR4, PR3* and *LOX* genes than salicylic acid. Furthermore, the expression of *PR1, PR2, LOX, PR4, PAL* and *PR5* genes peaked in 24 hours after infection in sour orange plant by both treatments and it seems that these mentioned inducer of resistance genes involved in citrus blast disease resistance in host plant

Keywords: : Citrus blast, Salicylic acid, Jasmonic acid, RT-PCR

Paper Type: Research Paper.

Citation: Moradi H, Babaeizad V, Rahimian H, Pakdin Parizi A, Tajick Ghanbary M (2023) Evaluation of expression pattern of several pathogenesis related genes and PAL in sour orange plant following treatment with SA and JA in response to citrus blast bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 189-216.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 189-216. DOI: 10.22103/jab.2023.18958.1381

Received: January 19, 2023. Received in revised form: February 28, 2023.

Accepted: February 29, 2023. Published online: February 30, 2023.

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

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بررسی الگوی بیان چند ژن مرتبط با بیماری‌زایی و *PAL* در گیاه نارنج در پاسخ به باکتری عامل بلاست مرکبات *Pseudomonas viridiflava* پس از تیمار با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید

حسین مرادی

دانشجوی سابق دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران و مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران. رایانامه: hossmor@gmail.com

ولی اله بابایی زاد

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

حشمت اله رحیمیان

استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: h.rahimian@sanru.ac.ir

علی پاکدین پاریزی

استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: ali.pakdin@gmail.com

محمدعلی تاجیک قنبری

دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: m.tajick@sanru.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۱۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

چکیده

هدف: بیماری‌های گیاهی یکی از عوامل محدودکننده در تولید محصولات کشاورزی به شمار می‌روند. بیماری بلاست مرکبات ازجمله بیماری‌های شایع در مناطق مرکبات خیز به‌استثنای مناطق گرمسیری است. گیاهان از طریق فعال کردن ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دفاعی نسبت به بیمارگرهای باکتریایی واکنش نشان می‌دهند. یکی از سازوکارهای دفاعی گیاهان در مقابل عوامل

بیماری‌زا، تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی اســـت. هدف از این مطالعه بررســـی بیان چند ژن دفاعی در مقابل باکتری *Pseudomonas viridiflava* پس از تیمار گیاهچه ها با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید بود.

مواد و روش‌ها: ســـطح بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی *PR1*، *PR2*، *PR3*، *PR4*، *PR5*، *POX*، *LOX* و ژن *PAL* در مراحل اولیه بیماری بلاســت مرکبات در نارنج با اســتفاده از روش RT-PCR بررســی شــدند. در این پژوهش ژن ابی کوتین به‌عنوان ژن خانه‌دار مورد اســتفاده قرار گرفت. RNA کل نمونه‌ها اســتخراج شــد و پس از ســنتز cDNA، تغییرات ســطح بیان ژن‌های مذکور با استفاده از فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه و اندازه‌گیری شد.

نتایج: افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی *PR1*، *PR2*، *PR3*، *PR4*، *PR5*، *POX*، *LOX* و ژن *PAL* در مراحل اولیه بیماری بلاست مرکبات در نارنج اکثراً در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت اتفاق افتاد.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان داد تیمار با سالیسیلیک اسید در بیان ژن‌های *PR1*، *PR2*، *PAL*، *POX* و *PR5* تأثیر بیشتری نسبت به جاسمونیک اسید داشت و تیمار جاسمونیک اسید در القای ژن‌های *PR4*، *PR3* و LOX تأثیر بیشتری نسبت به سالیسیلیک اسید نشان داد. همچنین میزان بیان ژن‌های *PR1*، *PR2*، *LOX*، *PR4*، *PAL* و *PR5* در ۲۴ ساعت پس از اعمال آلودگی در گیاه نارنج به‌و سیله هر دو تیمار به اوج خود ر سید که بنظر می ر سد این افزایش بیان ژن‌ها در مواجهه میزبان با باکتری عامل بلاست در ممانعت از گسترش بیشتر بیمارگر مشارکت داشته و بدین شکل افزایش مقاومت در گیاه میزبان را در پی داشت.

واژه‌های کلیدی: بلاست مرکبات، جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید، RT-PCR

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: مرادی حسین، بابایی زاد ولی اله، رحیمیان حشمت اله، پاکدین پاریزی علی، تاجیک قنبری محمدعلی (۱۴۰۲) بررسی الگوی بیان چند ژن مرتبط با بیماری‌زایی و *PAL* در گیاه نارنج در پاسخ به باکتری عامل بلاست مرکبات *Pseudomonas viridiflava* پس از تیمار با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۱۸۹-۲۱۶.

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

© the authors

مقدمه

بیماری بلاست یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در اکثر مناطق مرکبات خیز دنیا به‌استثنای مناطق گرمسیری است. عامل بیماری دو گونه از جنس*Pseudomonas* بنام‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) و *P. viridiflava* (*Pv*)

هستند که در مناطق مختلف استان‌های شمالی پراکنش دارند. باکتری *Pv*علاوه بر مرکبات در ایران از گیاهان مختلفی از قبیل ریحان، اسفناج، همیشه‌بهار و توتون نیز به‌عنوان بیمارگر گزارش شده است (Sadeghi et al. 2011). بیمارگر از راه زخم‌های ایجادشده روی قسمت‌های جوان، به گیاه حمله می‌کند. علائم بلاست، روی پهنک و دم برگ به‌صورت لکه‌های آب سوخته و سیاه‌رنگ است که اگر آوند آبکش دم برگ آلوده شود، برگها پژمرده شده و می‌ریزند. علائم بیماری در طول فصل رشد به‌خصوص در شرایط خنک و بارانی، روی سرشاخه‌های جوان شدیدتر شده و ممکن است دچار سرخشکیدگی شوند (Beigi et al. 2012). گیاهان برای مقابله با عوامل بیماری‌زا از طیف وسیعی از سازوکارها استفاده می‌کنند. نتیجه برهمکنش گیاه با عوامل بیماری‌زا، القای بیان ژن‌های درگیر در مقاومت و به دنبال آن کاهش آسیب توسط بیمارگر است (Dixon et al. 1994). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis related proteins; *PRs*) گروهی از پروتئین‌ها محسوب می‌شوند که در اثر حمله بیمارگرها و یا مواد مرتبط با بیمارگرها همچون الیسیتورها و هورمون‌های گیاهی مثل سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن در گیاه القاء می شوند (Van Loon et al. 2006). بیان این پروتئین‌ها در گیاه و به صورت اختصاصی، موضعی و سیستمیک، درنتیجه برهمکنش‌های سازگار جزئی و ناسازگار صورت می‌گیرد. درک عوامل بیماری‌زا توسط گیاهان باعث تغییرات متابولیکی همچون تولید(Reactive oxygen species (ROS و به دنبال آن القای مقاومت اکتسابی سراسری Systemic Acquired Resistance (SAR)و مقاومت القایی سراسری Induced Systemic Resistance (ISR) می‌شوند. فعالیت و حضور پروتئین‌های مرتبط با SAR ارتباط مستقیمی با سطح مقاومت و حساسیت در گیاه دارد. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی مثل کیتیناز، گلوکاناز و پراکسیداز که نقش ضد باکتریایی و ضد قارچی دارند در ارتباط با SAR می‌باشند (Ryals et al. 1996). در میان همه پروتئینهای مرتبط با بیماریزایی، PR1 از مهم‌ترین آن‌ها در مقاومت به بیمارگرهای مختلف ازجمله سفیدک سطحی، شیت بلایت، بلایت باکتریایی و بلاست برنج می‌باشد (Van Loon et al. 2006; Sayyari et al. 2015). اگرچه عملکرد بیوشیمیایی خاصی برای آن در نظر گرفته نشده اما نقش ضد میکروبی آن توسط محققین گزارش شده است (Rauscher et al. 1999; Sels et al. 2008; Sayyari et al. 2015). نتایج بررسی‌ها نشان داد که *PR1* در گیاهان به دنبال تیمار با القاکننده‌های مختلف زیستی و غیر زیستی به‌صورت معنی‌داری القاء شده و منجر به افزایش مقاومت به بیمارگر های مختلف ازجمله قارچها و باکتری‌ها می شود (Ali et al. 2018; Malnoy et al. 2006). القای بیان این ژن در گیاهان به‌عنوان مارکر فعال شدن سازوکار مقاومتی اکتسابی سراسری (SAR) شناخته می شود (Schultheiss et al. 2003). پروتئین‌های PR2، فعالیت آنزیمی بتا ۱ و ۳ گلوکانازی نشان می‌دهند (Leubner-Metzger and Meins 1999). مطالعات نشان می‌دهد ژن‌های *PR* تقویت‌کننده مقاومت علیه تنش‌های زنده و غیرزنده هستند و از آن‌ها به‌عنوان مهم‌ترین و امیدوارکننده‌ترین کاندید تحمل تنش‌های چندگانه نام می‌برند (Ali et al. 2018). بتا ۱ و ۳ گلوکان ماده زمینه آنزیم گلوکاناز است که در بافت‌های گیاهی وجود دارد و در تشکیل کالوز، زوائد مویی ساقه و برگ، تارهای کشنده ریشه و سلول‌های پارانشیم زخم نقش دارد و به صورت مستقیم باعث مرگ بیمارگر می‌شود (Bowles 1990) و به‌صورت غیرمستقیم نیز قطعات حاصل از تخریب دیواره سلولی به‌عنوان الیسیتور

موجب القای مقاومت خواهند شد (Sharp et al. 1984). پروتئین‌های گلوکاناز فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی داشته و در ارتباط با مقاومت اکتسابی سیستمیک هستند (Ali et al. 2018). پروتئین‌های PR3 و PR4 فعالیت کیتیناز دارند. چندین کیتیناز در تمام گونه‌های گیاهی مورد مطالعه گزارش شده‌اند. کیتینازها، پیوندهای بتاگلوکوزیدی را در انتهای احیا شده گلوکوزامینیدها (که می‌تواند بخش‌هایی از پلیمرهای مختلف مانند کیتین، کیتوزان یا پپتیدوگلیکان باشند) هیدرولیز می‌کنند (Vidhyasekaran 2002). این پروتئین‌ها در مهندسی ژنتیک در جهت مقاومت به بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شوند (Hernandez 2005). اگرچه کیتینازها بیشتر فعالیت ضد قارچی دارند و در برهمکنش‌های بین قارچ‌های بیماری‌زا و گیاهان نقش عمده‌ای دارند ولی مطالعات نقش لیزوزیمی را نیز برای کیتینازها اثبات کرده که از این طریق باعث تجزیه دیواره سلولی باکتری‌ها می‌شود (Fritig et al. 1998) پروتئین‌های متعلق به خانواده PR5 به دلیل تشابه توالی آن‌ها با پروتئین گیاهی تائوماتین (Thaumatin) به پروتئین‌های شبه تائوماتین Thaumatin-like(TL) معروف هستند (Moralejo et al. 1999). گروه پروتئین‌های PR5 تاکنون از توتون، آرابیدوپسیس، برنج، گندم و بسیاری گیاهان دیگر جدا شده‌اند (Vigers et al. 1991). تجمع این پروتئین‌ها در گیاهان در واکنش به موقعیت‌های تنش‌زا مانند غلظت‌های نمک بالا، زخم‌ها یا حمله بیمارگرها دیده شده است. این پروتئین‌ها نفوذپذیری غشای سلولی بیمارگر را تغییر می‌دهند (Kitajima and Sato 1999). فرم‌های بازی پروتئین‌های PR5 شبیه اسموتین می‌باشند. اسموتین یک پروتئین القایی است که در اثر تنش شوری در توتون ردیابی شده است. بنابراین فرم‌های بازی را اسموتین می‌خوانند. پروتئین‌های PR5 خنثی در گیاهان سالم وجود ندارد ولی به‌وسیله اتیلن القا می‌شوند (Vidhyasekaran 2002). پروتئین پراکسیداز (POX) با کاتالیز فرآیند تولید لیگنین سبب تقویت دیواره سلولی گیاه و در نتیجه مقاومت علیه بسیاری از بیمارگرها می‌شوند (Hernandez et al. 2005). پراکسیداز در مقاومت گیاهان تأثیر مستقیمی داشته و نقش مهمی را در پاسخ دفاعی میزبان از طریق تولید رادیکال آزاد پراکسید هیدروژن ایفا می‌کند و از طرفی باعث لیگنینی‌شدن دیواره سلولی شده، پیوندهای متقابلی را با پروتئین‌های دیواره سلولی ایجاد نموده و باعث مقاومت گیاه علیه بیمارگر می‌شود (Chittoor et al. 1999; Torres et al. 2006). ژن *PR9* فرم مخصوص پراکسیداز است که می‌تواند با تسریع در لیگنینی نمودن دیواره سلول‌ها باعث تقویت آن شده و گسترش بیمارگر را در سلول‌ها و بافت‌های گیاه محدود کند (Passardi et al. 2004). LOXها (Lipoxygenase)، آنزیم‌هایی هستند که در سنتز اسیدهای چرب اکسیژنه دخالت دارند و شامل جاسمونیک اسید و آلدهید است که نقش بسیار مهمی در دفاع گیاه علیه عفونت‌های میکروبی و حشرات دارند (Jones and Dangel 2006). فنیل‌آلانین آمونیالیاز (*PAL*) یکی از اولین ژن‌های تدافعی گیاهان تشخیص داده شده که به‌وسیله تنش‌های محیطی و عوامل بیماری‌زا تحریک می شود (Kang and Wang 2010). محصول این ژن ازجمله ترکیبات مؤثر دفاعی در گیاهان است (Bagal et al. 2012; Ritter and Schulz 2004). در بررسی‌های متعدد نشان داده شده افزایش بیان ژن *PAL*، با اثر بر افزایش SA، فعال کردن ژن *NPR1* و به دنبال آن بیان ژن‌های *PR* و نیز القای سریع مرگ سلولی در مقاومت به بیمارگرها

دخالت دارد (Fitzgerald et al. 2004). با فعالیت آنزیم PAL، دو مسیر بیوسنتزی فعال می‌شود که یکی از این مسیرها مربوط به سالیسیلیک اسید است (Chen et al. 2009). در یک پژوهش نشان داده شد تیمار گیاه سیب با Acibenzolar-*S*-methyl (ASM) به‌عنوان یکی از آنالوگ‌های SA منجر به افزایش مقاومت به بیماری باکتریایی آتشک شد که این افزایش مقاومت با القای ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی ازجمله *PR1*، *PR2* و*PR8* مؤثر در مسیر مقاومت SAR همراه بود. در بررسی دیگر نشان داده شد بیش بیانی ژن *NPR1* با تراریخت کردن سیب منجر به القای ژن‌های *PR1*، *PR2*، *PR5*، *PR8* و *PR10* شده و به دنبال آن مقاومت به بیماری‌های زنگ، لکه سیاه و بیماری آتشک به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Malnoy et al. 2007). به‌علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم های مولکولی در زمره مهم ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می نمایند (Arabpour et al. 2021). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می کند کنترل می شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد (Mohammadabadi et al. 2021). بیان ژن های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت¬ها برای هر بافت اختصاصی است (Shahsavari et al. 2021). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت هایی که آن محصول را می¬سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن¬ها و پروتئین های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). لذا، هدف از این تحقیق، بررسی و مقایسه میزان بیان ژن‌های *PR1*، *PR2*، *PR3*، *PR4*، *PR5*، *POX*، *LOX* و *PAL* در گیاه نارنج به دنبال تیمار با SA و JA (بعنوان مولکول سیگنال در مقاومت سراسری SAR و ISR) در پاسخ به باکتری عامل بیماری بلاست مرکبات *P. viridiflava* با استفاده از روش Real- time PCR کمّی است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی گیاهچه‌ها: در این پژوهش از رقم محلی نارنج (*Citrus aurantium* L.) موجود در گلخانه دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری استفاده شد و به‌منظور تولید گیاهچه‌های همسان و کاملاً عاری از هرگونه

پاتوژن، بذور رقم ذکر شده در سال ۱۳۹۸ تهیه و برای تسریع در ریشه‌زنی، پوسته خارجی بذرها جدا و پس از ضدعفونی ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درجه و ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم تجاری ۱٪ و شستشو با آب، در محیط (MS) با کمی تغییر کشت داده شدند (Murashige and Skoog 1962). ظروف حاوی بذر ۴ روز در تاریکی نگهداری و سپس در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ ماه نگهداری شد.

تیمار گیاهچه‌ها با سالیسیلیک اسید: گیاهچه‌های یکماهه به‌وسیله محلول سالیسیلیک اسید با غلظت ۳ mM افشانه و تیمار شدند. جهت حل نمودن سالیسیلیک ابتدا با اتانول (ده درصد حجمی) حل شد و سپس با آب مقطر به حجم رسانیده شد. گیاهچه‌های تیمار شده به مدت ۲ روز زیر پوشش پلاستیکی در ژرمیناتور نگهداری شد (Muchembled et al. 2006).

تیمار گیاهچه‌ها با جاسمونیک اسید: گیاهچه‌ها به‌وسیله محلول جاسمونیک اسید با غلظت ۰/۵ mM تیمار شدند. جاسمونیک اسید در اتانول (چهار درصد حجمی) حل شد و سپس با آب مقطر به حجم رسانیده شد. گیاهچه‌های تیمار شده به مدت ۲ روز زیر پوشش پلاستیکی در ژرمیناتور در شرایط مناسب دما و رطوبت نگهداری شد (Traw and Bergelson 2003).

آلوده سازی گیاهچه‌ها: گیاهچه‌ها در ۲ ردیف تیمار شده و گیاهان بدون تیمار جدا و برای هر زمان نمونه‌برداری ۱۵ گلدان در نظر گرفته شد. آلوده‌سازی گیاهچه‌ها ۴۸ ساعت پس از تیمار با هورمون‌ها با باکتری عامل بلاست مرکبات *P. viridiflava* انجام گرفت. بدین منظور سوسپانسیون (10^6 cfu/ml) از باکتری مذکور در فاز رشد لگاریتمی با سرنگ انسولین به بافت برگی تزریق شد. نمونه‌برداری از برگهای گیاهان به ترتیب در بازه زمانی۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گرفت. پس از نمونه‌برداری در هر زمان نمونه‌ها سریعاً در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA، ساختcDNA و اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن: استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-plus شرکت سیناژن (Cat, No: RN7713C) صورت گرفت و سپس کیفیت آن در ژل آگارز ۱/۵ در صد ارزیابی شد. جهت زدودن DNA احتمالی از آنزیم DNase 1 شرکت Thermo Fisher (cat. No: EN0525) استفاده گردید. در نهایت برای ساخت cDNA از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis شرکت Thermo Fisher (cat. No: RT5201) استفاده شد. تجزیه و تحلیل بیان ژن با دستگاه Real-time PCRApplied Biosystems®StepOneplusTM و کیت SYBR (Green/ROX qPCR Master Mix(2x شرکت Thermo Fisher (Cat. No: K0221) انجام شد. در این بررسی ژن *UBI* به‌عنوان ژن خانه‌دار و ژن‌های *PR1*، *PR2*، *PR3*، *PR4*، *PR5*، *LOX*، *POX* و *PAL* به‌عنوان ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). میزان بیان ژن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen 2001). تجزیه آماری داده ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون LSD در سطح احتمال موردنظر استفاده شد.

جدول ۱. نام ژن‌ها و توالی آغازگرهای آن

Table 1. Names of genes and their sequences of primers

ژن Gene	توالی آغازگر Primer sequence	طول قطعه (جفت باز) Amplicon size (bp)	مرجع آغازگر Primer reference
PR1	F: 5' - CCCTAAGCTTACAAACACACATCTCCGAAA -3' R: 5' – GCATGAATTCTTGAAATGAGCAGCAGCAAA -3'	171	Sudyoung et al. 2020
PR2	F: 5' - GACGTCGTCGTATCTCATGG -3' R: 5' – GAGTTGGGCGTCAAAAAGG -3'	127	AJ000081
PR3	F: 5'- ACAGAATTGTGGAAGCGG -3' R: 5'- AGCAAGTCTTCAAACATCTCC -3'	121	AF090336
PR4	F: 5'- AATGATGAACGATGCCCTGCCA -3' R: 5'- CCACTTGATGCTGTCTCCAA -3'	151	Waewthongrak et al. 2014
PR5	F: 5'- TAGGACCAATTCTGTCTCTCAC-3' R: 5'- ATATCTCATTTGGCTTCCCT-3'	160	Waewthongrak et al. 2014
POX	F: 5' - GATCTTCGTGCTCGTGTTCA -3' R: 5' - TGCGAATGTTTTGCTGTCTC -3'	188	Waewthongrak et al. 2014
PAL	F: 5'- CACAAATTGAAGCACCATCC-3' R: 5'- TTCTCAGGGCATAACGATCC-3'	122	AY681119
LOX	F: 5' - GTCGTTCTGGAACTTGTCGGCACT -3' R: 5' – CTGTGATTGCACCAGGCGTCCC -3'	179	Waewthongrak et al. 2014
UBI	F: 5' - GATCCCACCAGACCAGCAA -3' R: 5' – ACCAAATGAAGGGTTGATTCCTT -3'	105	Iorio et al. 2013
Tef	F: 5' - ACC GTC TTG GGG TTG TAT CC -3' F: 5' - TCG TCG CTG TCA ACA AGA TG-3'	152	Deshmukh and Kogel 2007

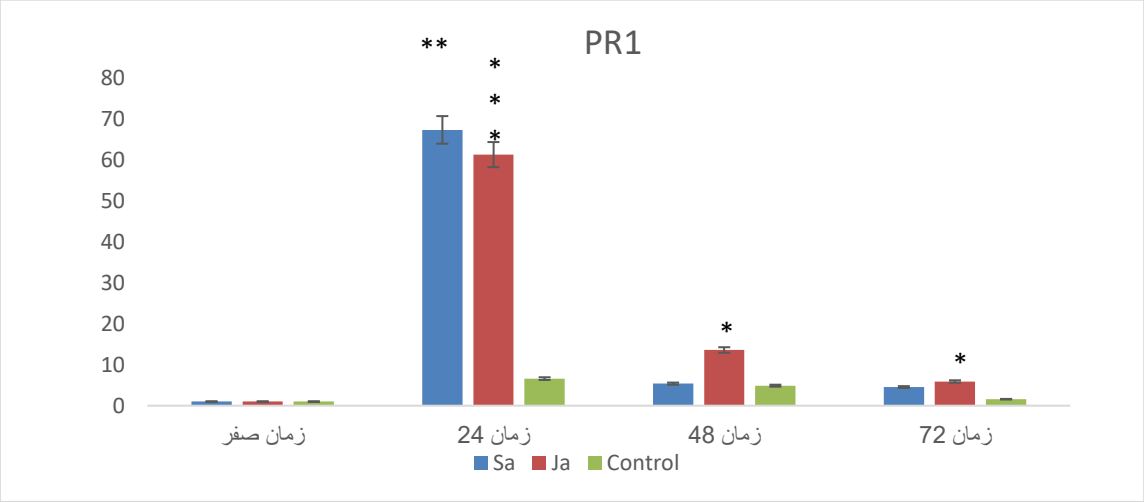
نتایج و بحث

سطح بیان ژن *PR1*: در گیاه نارنج سطح بیان این ژن در گیاه تیمار شده با JA در بازه زمانی ۲۴ ساعت پس از آلودگی با باکتری *P. viridiflava* به بیشینه بیان خود رسید که ۶۴/۴۴ برابر زمان صفر (شاهد) بود که اختلاف معنی دار در سطح یک دهم در صد دا شت. در ساعت ۴۸ سطح بیان در گیاه تیمار شده با JA کاهش یافت و به ۸/۵۷ برابر ر سید و در نهایت در زمان ۷۲ به

۵/۳۷ برابر رسید که اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد داشت. در تیمار با SA در بازه‌ی زمانی ۲۴ اوج بیان این ژن اتفاق افتاد. به‌طوری که ۷۱/۰۱ برابر زمان صفر بود و مطابق شکل اختلاف معنی دار در سطح یک درصد داشت. در زمان‌های بعدی کاهشی شده و به ترتیب به میزان ۱۱/۱۵ و ۴/۷۸ برابری نشان داد. قابل ذکر است که در گیاه شاهد آلوده شده با *P. viridiflava* اوج بیان در ساعت ۲۴، ۷/۴۹ برابر زمان صفر بود و در زمان‌های بعدی به ۴/۴۳ و ۱/۰۳ برابری رسید (شکل ۱). پروتئین‌های PR بسته به ساختار اولیه، روابط سرولوژیکی و فعالیت‌های بیولوژیکی به هفده خانواده گروه‌بندی می شوند. خانواده‌های مختلف پروتئین‌های PRفعالیت‌های آنزیمی و ضد میکروبی متفاوتی را نشان می‌دهند، به‌عنوان مثال کیتینازها (PR3, PR4, PR8, PR11)، گلوکاناز (PR2)، اسموتین یا پروتئین شبه تائوماتین (PR5)، آران ایز (PR10)، دیفنسین ها (PR12)، تیونین (PR13)، پروتئین انتقال دهنده چربی (PR14) و اگزالات اکسیداز (PR15, PR16). اکثر خانواده‌های این پروتئین‌ها طبیعت خارج سلولی دارند، اما برخی از آن‌ها در سیتوپلاسم نیز به‌وفور و در واکوئل یافت می‌شوند. نقش انواع مختلف آن‌ها در طول تنش‌های غیر زیستی و زیستی و پاسخ‌های دفاعی آن‌ها در گیاهان به‌خوبی اثبات شده است (Jain and Kumar 2015). PR1 ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌های غنی از سیستئین می‌باشند که در بافت‌های مختلف گیاهی مثل دیواره سلولی، دستجات آوندی و واکوئل ها وجود دارند (Hoegen et al. 2002). این‌ها، به‌عنوان شاخصی برای مقاومت القایی سیستمیک (SAR) مورد استفاده قرار می‌گیرند (Schultheiss et al. 2003). این پروتئین‌ها با اثر مستقیمی که بر روی بیمارگرها دارند از رشد و گسترش آن‌ها در گیاه میزبان جلوگیری می‌کنند. نتایج این بررسی نشان داد میزان بیان این ژن در ۲۴ ساعت پس از اعمال آلودگی در گیاه نارنج به‌وسیله هر دو تیمار افزایش یافته و به اوج رسیده است. مطالعات مختلف انجام شده نشان داد که سطح رونویسی و ترجمه *PR1* در گیاهان تحت تنش زیستی به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است (Ali et al. 2018; Shi et al. 2019; Tunsagool et al. 2019; Yang et al. 2019). افزایش بیان ژن‌های *PR1* در گیاهان مختلف سبب مقاومت بیشتر گیاه نسبت به بسیاری از باکتری‌ها، قارچ‌ها و حتی ویروس‌های عامل بیماری می شود و برعکس خاموشی ژن آن در گیاهان باعث حساسیت بیشتر نسبت به بیمارگر می شود (Maschietto et al. 2016; Liu et al. 2019). نتایج بررسی‌های مختلف نشان داد که *PR1* در گیاهان به دنبال تیمار با القاکننده‌های مختلف زیستی و غیر زیستی به‌صورت معنی‌داری القاء شده و منجر به افزایش مقاومت به بیمارگر های مختلف ازجمله قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌شود (Ali et al. 2018; Malnoy et al. 2006). در مطالعه‌ای Ahangar et al. (2016) بر روی الگوی بیان ژن *PR1* بر مقاومت گندم در پاسخ به آلودگی به سفیدک سطحی نشان دادند این ژن بیشترین تأثیر و نقش را در برهمکنش بیمارگر- گیاه ایفا کرده است (Ahangar et al. 2016).

سطح بیان ژن *PR2*: در گیاه تیمار شده با JA اوج بیان این ژن در بازه زمانی ۲۴ ساعت پس از آلودگی اتفاق افتاد که ۴/۹۷ برابر زمان صفر (شاهد) بود و از لحاظ آماری در سطح یک درصد در مقایسه با گیاهان شاهد متناظر معنی دار بود. میزان بیان این ژن سپس کاهش یافت و مشابه زمان صفر یعنی ۱/۰۷ گردید و در ادامه به ۲/۱ رسید. SA هم توانایی القای این ژن را داشت

و اوج بیان آن در ساعت ۲۴ پس از آلودگی بود که ۸/۲۸ برابر زمان شاهد خود بود سپس روند بیان ژن کاهشی شد و به ترتیب به ۱/۰۱ و ۱/۴۶ رسید و اختلاف در بازه های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب در سطح یک دهم در صد و یک در صد در مقایسه با شاهد معنی دار بود.



شکل ۱. سطح بیان ژن *PR1* در گیاهان نارنج تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نسبت به شاهد در زمان‌های مختلف. میل بارها نشان دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می باشد. *، **و * به ترتیب معنی داری در سطح 0.1 درصد، ۱ درصد و ۵ درصد را نشان می دهد**

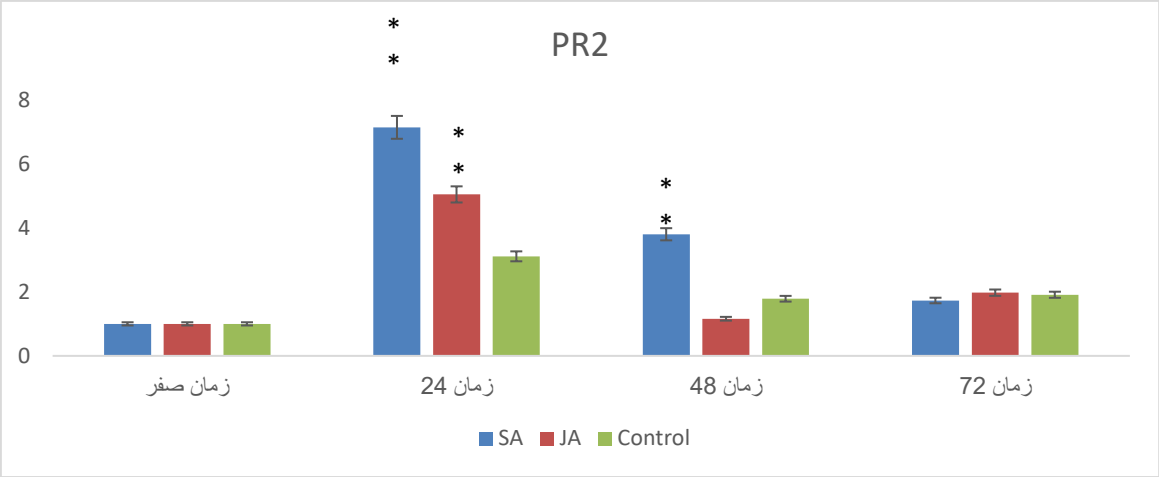
Figure 1. *PR1*gene expression level in sour orange plants treated with salicylic acid and jasmonic acid compared to the control at different times. Error bars represent standard error of the mean. *, **, * show significance at the level of 0.1%, 1% and 5% respectively**

در گیاه شاهد تیمار شده با *P. viridiflava* بیشینه بیان این ژن ۲۴ ساعت پس از آلودگی ۲/۷۲ برابر زمان صفر بود و تغییرات بیان آن در زمان‌های بعدی کاهش یافت و به۲/۰۷ در ساعات ۴۸ و ۷۲ رسید (شکل ۲). پروتئین‌های PR-2 (β-glucanases) فعالیت بتا-۱و۳-گلوکانازی نشان می‌دهند. بتا -۱ و ۳- گلوکاناز (گلوکان اندو- ۱ و ۳ بتا- گلوکوزیداز) باعث شکستن واحدهای ۱و۳-بتا – دی-گلوکوزیدی در بتا-۱و۳-گلوکان‌ها می‌شود. این ترکیب در بافت‌های گیاهی وجود دارد و در تشکیل کالوز و در زوائد مویی ساقه و برگ، تارهای کشنده ریشه، دانه گرده، تخمک‌ها و سلول‌های پاراشیمی زخم نقش دارد (Vidhyasekaran 2002). وزن مولکولی آن‌ها در حدود ۳۳ تا ۳۶ کیلو دالتون است (Van Loon et al. 2006). اولین نقشی که β-glucanases در تعامل باکتری-گیاه ایفا می‌کند مربوط به متلاشی و تجزیه نمودن دیواره سلولی بیمارگر می‌باشد که این خود به مرگ بیمارگر می‌انجامد. پخش شدن قطعات دیواره سلولی حاصل از متلاشی شدن باکتری به‌عنوان الیسیتور عمل نموده و در ادامه سیستم دفاعی گیاه را فعال می‌نماید (Vidhyasekaran 2002). در تحقیقات، خاصیت سینرژیستی پروتئین‌های این

گروه به همراه گروه PR3 اثبات شده است (Stintzi 1993). در تحقیقات تکمیلی نشان داده شد که در بعضی موارد این پروتئین در آزاد کردن مولکول‌های الیسیتور گیاهی ازجمله ترکیبات فنولی، فیتوالکسین ها و سایر PR ها نقش دارد و افزایش مقاومت به علت عمل مستقیم این پروتئین نمی‌باشد (Vidhyasekaran 2002). در مطالعه پیش رو، نرخ بیان ژن *PR2* در گیاه نارنج در تیمار سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید القا شد. سطح بیان این ژن در بررسی حاضر در ۲۴ ساعت به اوج خود رسید که در تیمار سالیسیلیک اسید سطح بیان بیشتر از جاسمونیک اسید بود. این موضوع نشان داد نارنج با تیمار سالیسیلیک اسید مقاومت بیشتری نسبت به جاسمونیک اسید دارد. به نظر می‌رسد این نتایج، اهمیت بیان ژن *PR2* در ساعات ابتدایی پس از تلقیح و کارایی آن را در مقاومت نشان می‌دهد. بیان بالای این ژن در برابر بیمارگرهای باکتریایی و قارچی در بررسی‌های گذشته نیز به اثبات رسیده است (Sharp et al. 1984). در مطالعه ای نقش ژن‌های *PR2* و *PAL* در مقاومت گیاه برنج به باکتری *Acidovorax avenae.* subsp. *avenae* پرداخته شد. نتایج این بررسی نشان داد این دو ژن تأثیر به سزایی بر مقاومت گیاه برنج در مقابل باکتری عامل بیماری نواری قهوه‌ای ایفا می‌کنند (Heydarinezhad et al. 2016). در بررسی Ahangar et al.(2016) اثر سالیسیلیک اسید بر روی افزایش بیان این ژن در مواجهه با سفیدک سطحی گندم اثبات شده است (Ahangar et al. 2016). کاربرد آسی بنزولار متیل در مرکبات باعث القا و افزایش بیان این ژن شد (Dekkers et al. 2004). افزایش بیان ژن گلوکاناز در گیاهان مختلف منجر به افزایش معنی‌دار مقاومت به عوامل بیماری‌زا شد (Sareena et al. 2006; Brogue et al. 1991). در بررسی Sharifi-Sirchi et al. (2011) نشان داده شد که میزان بیان ژن بتا ۱ و ۳ گلوکاناز در تعامل مرکبات با باکتری شانکر مرکبات افزایش می‌یابد (Sharifi-Sirchi et al. 2011). نتایج یک بررسی نشان داد که دو آنزیم کیتیناز و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز در مقاومت به قارچ *Alternaria alternate* در گوجه‌فرنگی مشارکت دارند (Cota et al. 2007).

سطح بیان ژن *PR3* : در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید بالاترین بیان ژن مذکور در ساعت ۲۴ و به میزان ۹/۷۸ برابر گیاه شاهد در زمان صفر بود که در سح یک درصد اختلاف معنی دار بود. تغییرات بیان در ساعت‌های بعدی کاهشی بود و به ۱/۱۲ و ۱/۴۸ رسید ولی اختلاف معنی دار نبود. چگونگی بیان ژن در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید متفاوت بود بطوریکه ابتدا در ساعت ۲۴ افزایش یافت و به ۱۵/۰۳ رسید سپس در ساعت ۴۸ به اوج خود یعنی ۱۹/۵۶ برابر شاهد منتاظر خود رسید و با کاهش مجدد در ساعت ۷۲ به ۲/۰۲ رسید.

در بازه زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت به ترتیب در سطح یک دهم، یک دهم و پنج درصد معنی دار بود. سطح بیان در گیاهان نارنج آلوده به باکتری عامل بلاست نیز متغیر بود و بالاترین سطح بیان در ساعت ۲۴ به اندازه ۳ برابر زمان صفر بود و سپس در ساعات بعدی به ۱/۳۸ و ۱/۵۵ رسید (شکل ۳). این پروتئین یک 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). سطح بیان این ژن در بررسی حاضر در تیمار جاسمونیک اسید در ۴۸ ساعت به اوج خود رسید و سطح بیان این ژن در ۲۴ ساعت برای تیمار سالیسیلیک اسید به اوج خود رسید.



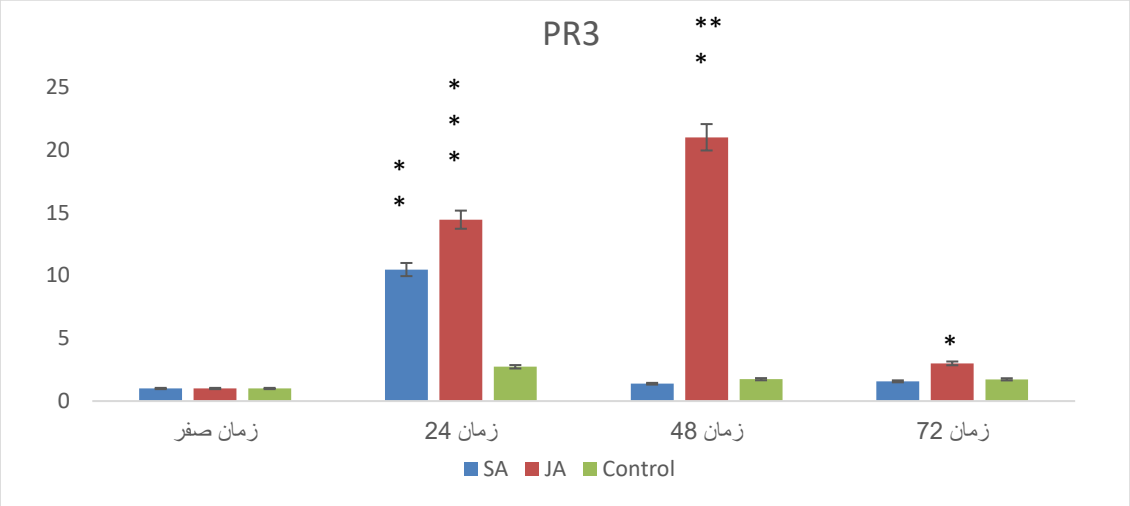
شکل ۲. سطح بیان ژن *PR2* در گیاهان نارنج تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نسبت به شاهد در زمانهای مختلف. میل بارها نشان دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می باشد. * و ** به ترتیب معنی داری در سطح 0.1 درصد و ۱ درصد را نشان می دهد**

Figure 2. *PR2* gene expression level in sour orange plants treated with salicylic acid and jasmonic acid compared to the control at different times. Error bars represent standard error of the mean. *, ** show significance at the level of 0.1% and 1% respectively**

در مطالعه‌ای خاکساری و همکاران به بررسی الگوی بیان ژن *PR3* در مقاومت مرکبات در برابر باکتری عامل بلاست بر روی اوکیتسو، نارنج و دو رگ لایم کوآت پرداختند. نتایج حاکی از افزایش مقاومت مرکبات پس از اعمال ژن می‌با شد (Khaksari et al. 2017). نسخ ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در مراحل اولیه آلودگی نهال‌های پرتقال (رقم واشنگتن ناول) به باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات نیز افزایش یافت (Mansouri et al. 2010). بیان ژن‌های کیتیناز در گندم تیمار شده با سالیسیلیک اسید در تعامل با قارچ میکوسفرلا نیز افزایشی بود (Gholamnezhad et al. 2016).

سطح بیان ژن *PR4*: اوج بیان ژن در مورد سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در ساعت ۲۴ اندازه‌گیری گردید بطوریکه ۱۷ و ۲۲/۶۲ برابر زمان صفر که همان شاهد می‌با شد ثبت گردید که به ترتیب در سطح یک و یک دهم در صد اختلاف معنی دار بود. میزان بیان سالیسیلیک اسید در ساعت ۴۸ کاهش یافت و به ۳/۳۶ رسید و در ساعت ۷۲ نیز کاهشی شد و به ۱۱/۷۱ رسید. بررسی‌های به‌عمل‌آمده در مورد اثر جاسمونیک اسید حاکی از آن است که در ساعت ۴۸ کاهش یافت و به ۳/۸۶ رسید اما در اندازه‌گیری ساعت ۷۲ دوباره افزایش نشان داد و به ۱۰/۱۹ رسید. در بازه ۷۲ ساعت برای هر دو تیمار در سطح یک دهم در صد اختلاف معنادار بود. گیاه شاهد تیمار شده با باکتری نیز در ساعت ۲۴ به ۳/۷۳ رسید و بیشترین بیان را در ۴۸ ساعت پس از آلودگی و معادل ۸ نشان داد و در ساعت ۷۲ به میزان ۶/۴۹ رسید (شکل ۴). نتایج این بررسی نشان داد میزان بیان ژن *PR4* در ۲۴ ساعت پس از اعمال آلودگی در گیاه نارنج به‌وسیله هر دو تیمار افزایش یافته است. میزان بیان ژن‌های کیتیناز در مراحل اولیه

آلودگی نهال‌های پرتقـال (رقـم واشـنگتن ناول) به باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات نیز افزایش یافت (Mansouri et al. 2010).



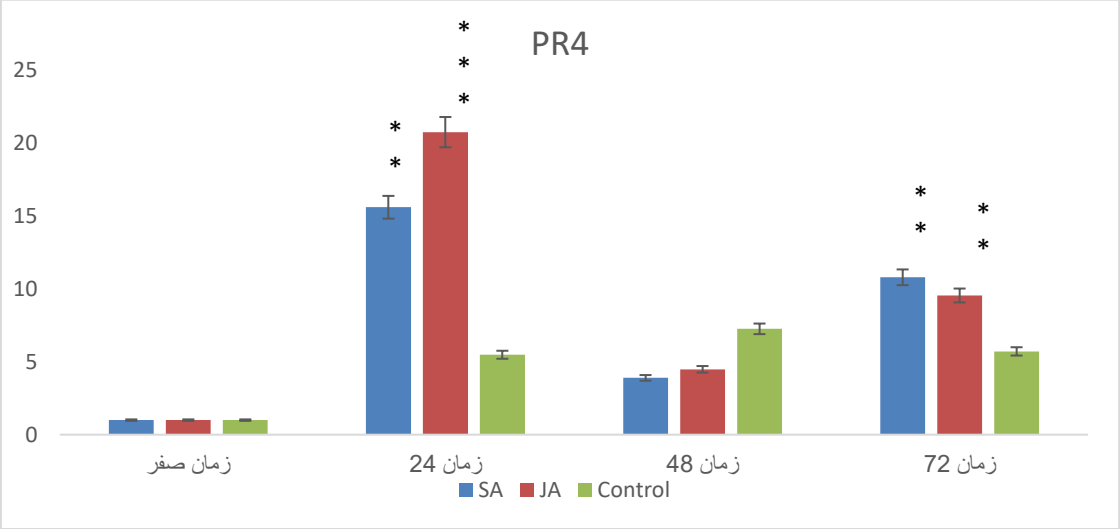
شکل ۳. سطح بیان ژن *PR3* در گیاهان نارنج تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نسبت به شاهد در زمانهای مختلف. میل بارها نشان دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می باشد. *، **و * به ترتیب معنی داری در سطح 0.1 درصد، ۱ درصد و ۵ درصد را نشان می دهد**

Figure 3. *PR3* gene expression level in sour orange plants treated with salicylic acid and jasmonic acid compared to the control at different times. Error bars represent standard error of the mean. *, **, * show significance at the level of 0.1%, 1% and 5% respectively**

افزایش بیان ژن کیتیناز و برخی ژن های *PR* در گیاه فلفل با عث افزایش مقاومت به آلودگی در برابر باکتری *Xanthamonas campestris* pv. *vesicatoria* شده است (Kang and wang 2010). بیان همزمان دو یا چند ژن *PR* با اثر سینرژیستی باعث افزایش مقاومت و درنتیجه کنترل بهتر بیماری می‌شود (Zhu et al. 1994). مطالعات قبلی محققین نشان داد که بیان بالای پروتئین کیتیناز می‌تواند به‌طور مستقیم و غیرمستقیم سبب مقاومت به بیمارگرهای قارچی و باکتریایی شود. در روش مستقیم کیتینازهای واکوئلی، کیتین موجود در هیف های در حال رشد و یا پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری‌ها را تجزیه می‌کنند، در حالی که درروش غیرمستقیم کیتینازهای آپوپلاست سبب آزاد کردن الیگومرهای کیتین می‌شود که می‌تواند به‌عنوان محرک‌های سازوکار دفاعی در گیاه عمل نماید (Coling et al. 1993).

سطح بیان ژن *PR5* : در گیاه نارنج، در گیاهچه‌های تیمار شده با JA بیشینه بیان این ژن با اختلاف معنی دار در سطح یک درصد پس از آلودگی در بازه ۲۴ اتفاق افتاد که ۱۵/۵ برابر زمان صفر بود. میزان بیان ژن در ساعت ۴۸ کاهشی شد و به ۲/۸ رسید سپس در زمان ۷۲ دوباره افزایش یافت و به ۶/۲۱ رسید. در نارنج‌های تیمار شده با SA اوج بیان این ژن در ساعت ۲۴ پس

از آلودگی بود که با اختلاف معنی دار در سطح یک درصد بیش از ۲۸/۷۴ برابر زمان صفر بود سپس در زمان ۴۸ کاهش یافت و به ۱/۶۵ ر سید اما دوباره روند افزایشی بود و به ۷/۹۷ در ساعت ۷۲ نزدیک شد. در بازه ۷۲ ساعت برای هر دو تیمار در سطح یک درصد اختلاف معنادار بود.



شکل ٤. سطح بیان ژن*PR4* در گیاهان نارنج تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نسبت به شاهد در زمانهای مختلف. میل بارها نشان دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می باشد. * و ** به ترتیب معنی داری در سطح 0.1 درصد و ۱درصد را نشان می‌دهد**

Figure 4. *PR4*gene expression level in sour orange plants treated with salicylic acid and jasmonic acid compared to the control at different times. Error bars represent standard error of the mean. *, ** show significance at the level of 0.1% and 1% respectively**

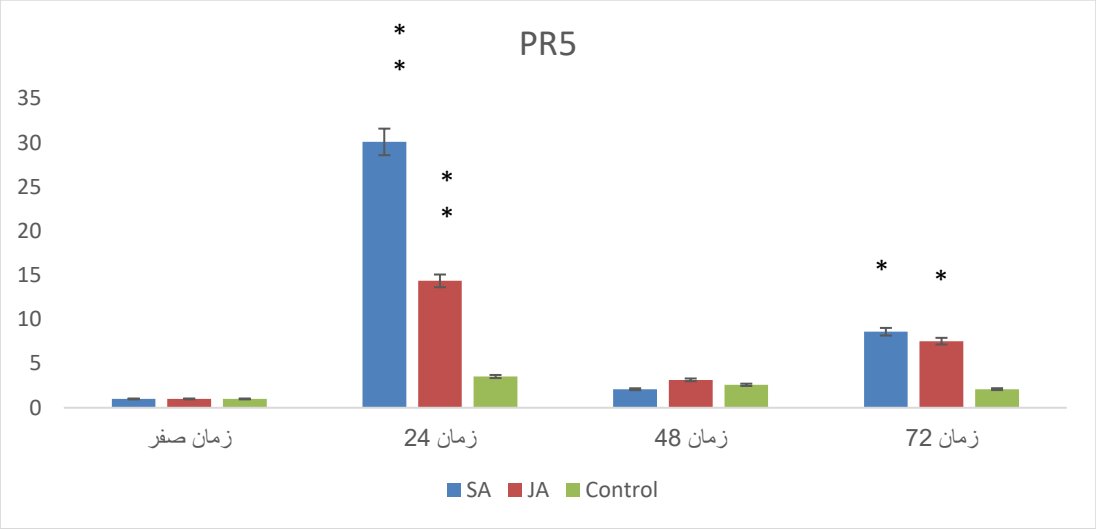
در گیاه شاهد هم ۴۸ ساعت پس از آلودگی این افزایش بیان به ۳/۲۳ رسید در حالی که افزایش آن در زمان ۲۴ نیز افزایشی بود و ۳/۲۲ ثبت گردید و در ادامه در ساعت ۷۲ به ۲/۵۴ اندازه‌گیری شد (شکل ۵). پروتئین PR5 سبب تغییر نفوذپذیری اجزای ساختاری دیواره سلولی باکتری شده و در نهایت سبب مرگ سلول باکتری می‌گردد (Vidhyasekaran 2002). نتایج این بررسی نشان داد میزان بیان ژن *PR5* در ۲۴ ساعت پس از اعمال آلودگی در گیاه نارنج به‌وسیله تیمار سالیسیلیک اسید افزایش بیشتری نسبت به جاسمونیک اسید داشته است. در پژوهشی که توسط والر و همکاران نیز بر روی جو صورت گرفت افزایش بیان این ژن ۲۴ ساعت پس از آلودگی با سفیدک پودری اندازه‌گیری گردید (Waller et al. 2005). مطابق بررسی Hajipour et al. (2015) روی برنج همزیست با قارچ نیز افزایش بیان این ژن در مقابل *Fusarium proliferatum* اثبات شده است (Hajipour et al. 2015). در بررسی که توسط وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد رقم T07-4 مقاوم به ویروس برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) و رقم حساس T07-1 با قارچ همزیست ریشه *Serendipita indica* در گلخانه تلقیح شدند تا

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

اثرات تلقیح قارچ بر رشد، عملکرد زودرس و کیفیت میوه گوجه‌فرنگی و مقاومت در برابر TYCLV بررسی شود. نتایج نشان داد که قارچ رشد ریشه را تحریک کرده و رشد گیاه گوجه‌فرنگی را بین ۲-۶ هفته برای رقم T07-1 و ۲-۴ هفته برای رقم T07-4 پس از تلقیح افزایش داد. همچنین بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی را در رقم حساس T07-1 نسبت به رقم مقاوم T07-4 در ۲ هفته پس از تلقیح افزایش داده است (Wang et al. 2015). طبق گزارش Ashrafi et al. (2020) بیان این ژن در گندم همزیست با قارچ در مقابل بیماری سپتوریوز القا شد. نتایج این بررسی نشان داد میزان رونوشت ژن‌های *NPR1* و *PR5* در تیمار گیاهان با قارچ میکوریز *S. indica* و باکتری *Pseudomonas protegens* افزایش یافت (Ashrafi et al. 2020). بیان این ژن در رقم مقاوم بینام نسبت به رقم حساس خزر پس از مایه‌زنی با قارچ عامل سوختگی غلاف به شدت افزایش یافت درنتیجه به نظر می‌رسد این ژن در سازوکارهای مقاومت گیاه برنج در تعامل با قارچ عامل سوختگی غلاف نقش داشته باشد (Sayyari et al. 2015).

سطح بیان ژن *POX*: بیان ژن در گیاه تیمار شده با JA در ساعت ۲۴ به ۱/۱۲ بود که اختلاف معنادار نبود و با افزایش دو برابری در ساعت ۴۸ به ۲/۸۱ رسید که دارای اختلاف معنادار درسطح یک دهم درصد بود و در ساعت ۷۲ نیز کاهشی شد و به ۱/۳۷ برابر زمان صفر رسید. هورمون SA نیز باعث القای بیان این ژن شد و اوج بیان آن در ساعت ۲۴ بعد از آلودگی اتفاق افتاد که ۴/۷ برابر شاهد مربوطه بود. بیان این ژن در ساعات بعدی کاهشی بود و به ۲/۵۸ و ۲/۱۳ نزول داشت. بر اساس تحلیل آماری در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب در سطح یک دهم، یک و یک درصد معنادار بود. در گیاهان آلوده شده با *P. viridiflava* نیز این ژن القاء می‌شود و بیشینه بیان آن در ساعت ۴۸ پس از آلودگی ۱/۳ اتفاق افتاد و در ساعت ۲۴ برابر ۱/۱ و در ساعت ۴۸ به ۱/۱۲ رسید (شکل ۶). پراکسیداز (POX) در مقاومت گیاهان تأثیر مستقیمی داشته و نقش مهمی را در پاسخ دفاعی میزبان از طریق تولید رادیکال آزاد پراکسید هیدروژن ایفا می‌کند و از طرفی باعث لیگنینی شدن دیواره سلولی شده، پیوندهای متقابلی را با پروتئین‌های دیواره سلولی ایجاد نموده و باعث مقاومت گیاه علیه بیمارگر می‌شود (Torres et al. 2006). در مطالعه پیش رو، نرخ بیان ژن *POX* در گیاه نارنج در تیمار سالیسیلیک اسید در ساعت ۲۴ افزایشی شد. میزان بیان این ژن در گیاه گوجه‌فرنگی همزیست شده با قارچ نیز افزایش‌یافته است، این افزایش بیان در مقابل تنش شوری توسط عبدالعزیز گزارش‌شده است (Abdelaziz et al. 2019). در بررسی‌های متعدد نشان داده شد که این پروتئین از طریق دخالت در لیگنینی و سوبرینی نمودن دیواره سلولی، ایجاد پیوندهای عرضی بین پروتئین‌های دیواره، ضخیم نمودن دیواره آوند چوبی، تولید گونه‌های اکسیژن فعال، مهار هیدروژن پراکسید، سنتز فیتوآلکسین در مقاومت به بیمارگرها نقش دارد (Hilaire et al. 2001; Passardi et al. 2004). در مطالعه ای Rostami et al. (2020) به بررسی بیان ژن‌های مختلف ازجمله *POX* در برنج تحت تیمارهای قارچ پرداخته‌اند. نتایج نشان می‌دهد بیان ژن‌های کیتیناز و پراکسیداز در تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم، بهترین تیمار در تحریک واکنش دفاعی گیاه شناسایی شده است (Rostami et al. 2020). بیان این ژن در گندم تیمار شده با

سالیسیلیک اسید نیز افزایشی بود. در بررسی Gholamnezhad et al. (2016) مشخص شد گندم تیمار شده در مواجهه با قارچ *Mycosphaerella graminicola* همراه با افزایش بیان ژن‌های مختلف دفاعی ازجمله پراکسیداز بود (Gholamnezhad et al. 2016).



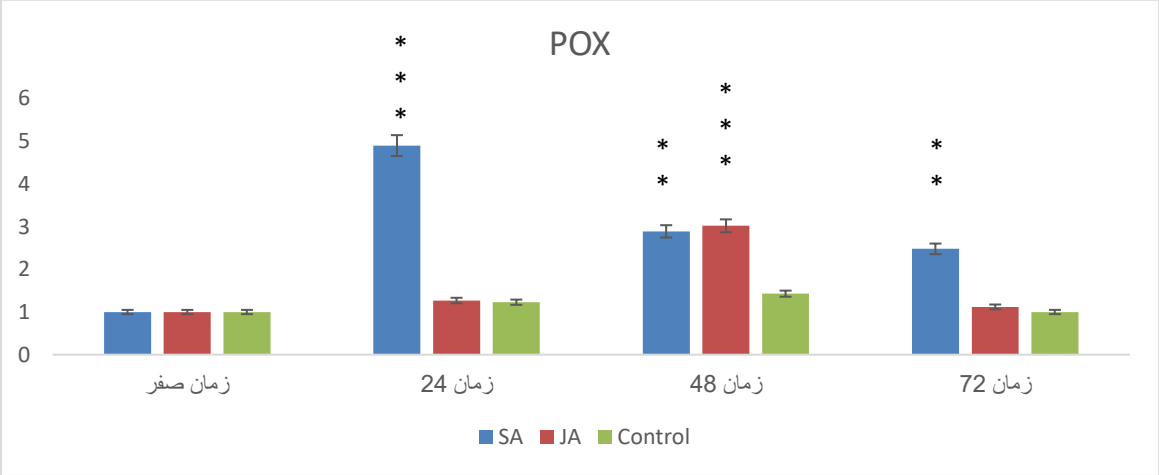
شکل ۵. سطح بیان ژن *PR5* در گیاهان نارنج تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نسبت به شاهد در زمانهای مختلف. میل بارها نشان دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می باشد. **و * به ترتیب معنی داری در سطح ۱ درصدو ۵ درصد را نشان می دهد

Figure 5. *PR5* gene expression level in sour orange plants treated with salicylic acid and jasmonic acid compared to the control at different times. Error bars represent standard error of the mean. ** , * show significance at the level of 1% and 5% respectively

سطح بیان ژن *LOX* : بر طبق نتایج به‌دست‌آمده میزان تغییر در بیان ژن نارنج تیمار شده با سالیسیلیک اسید ۲۴/۲۵ برابر نسبت به شاهد در زمان ۲۴ اتفاق افتاد که بر اساس داده های آماری در سطح یک دهم درصد معنادار بود و در زمان‌های بعدی به ۲/۸۲ و ۲/۰۷ رسید. اثر جاسمونیک اسید نیز در ساعت ۲۴ به اوج خود یعنی ۳۵/۵ نزدیک شد و اختلاف معنی دار در سطح یک دهم درصد نشان داد و سپس روند کاهشی شد و به ۱/۱۸ و ۲/۸۲ رسید که معنادار نبود. میزان بیان در گیاه نارنج تیمار شده با عامل بیماری بلاست مرکبات در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ به ترتیب برابر ۸/۸۷، ۸ و ۶/۹۶ اندازه‌گیری گردید (شکل ۷). لیپوکسیژناز نقش بسیار مهمی در دفاع گیاه علیه عفونت‌های میکروبی و حشرات دارد (Jones and Dangel 2006). لیپوکسیژنازها آنزیم‌های حاوی آهن غیر هم هستند که به‌طور وسیع در گیاهان و حیوانات یافت می‌شوند. پروتئین‌های LOX اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع را به هیدروپراکسیدهای اسید چرب غیراشباع کاتالیز می‌کنند. LOX می‌تواند باعث سنتز اکسی لیپین ها ازجمله ترکیبات غیر حلقوی و حلقوی شود. تا به امروز، بسیاری از ژن‌های *LOX* از گیاهانی مثل *Arabidopsis*

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

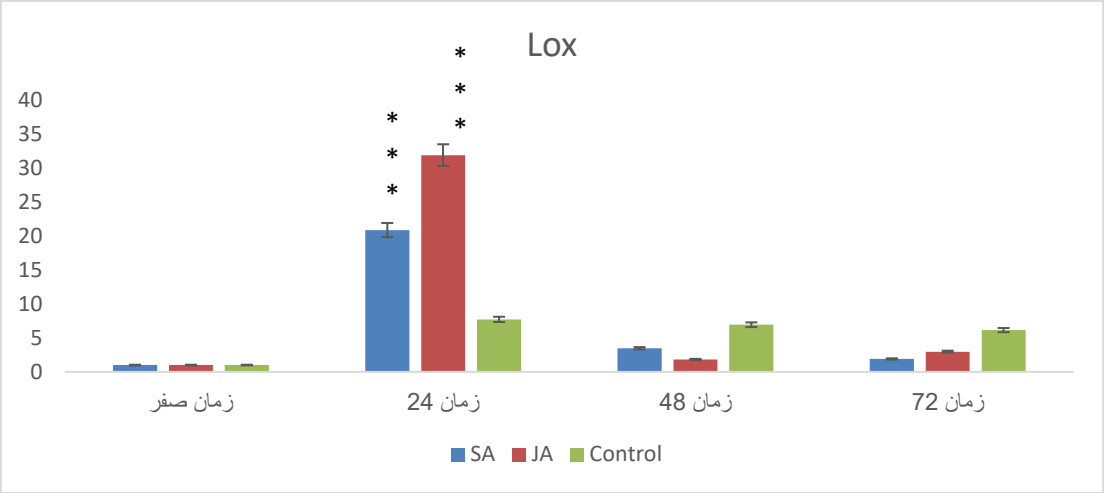
thaliana، *Glycine max*، *Medicago truncatula*، *Pyrus bretschneideri* و *Vitis vinifera* شنا سایی شده‌اند (Song et al. 2016). همچنین Porta and Rocha (2002) گزارش کردند که ژن‌های *LOX* گیاهی در پاسخ به بسیاری از مسیرها مانند فرآیندهای رشد و نمو و مقاومت در برابر تنش‌های غیر زیستی نقش دارند.



شکل ٦. سطح بیان ژن *POX* درگیاهان نارنج تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نسبت به شاهد در زمان‌های مختلف. میل بارها نشان دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می باشد. * و ** به ترتیب معنی داری در سطح 0.1 درصد و ۱ درصد را نشان می دهد**

Figure 6. *POX* gene expression level in sour orange plants treated with salicylic acid and jasmonic acid compared to the control at different times. Error bars represent standard error of the mean.* , ** show significance at the level of 0.1% and 1% respectively**

در پژوهشی Zhang et al. (2014) نشان دادند که سطح بیان ژن *LOX* به‌طور متفاوتی در طول رشد و رسیدن خربزه (*Cucumis melo*) تنظیم می‌شود. طبق گزارش وجت در سال ۲۰۱۳ ژن‌های *MdLOX1a* و *MdLOX5e* در تولیدات مواد فرار میوه سیب نقش داشته‌اند (Vogt et al. 2013). یانگ و همکاران دریافتند که ژن *LOX* خیار در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی ازجمله سرما (۴ درجه سلسیوس)، کلرید سدیم و کلرید پتاسیم نقش دارند (Yang et al. 2012). این ژن می‌تواند مرحله اولیه سنتز متیل جاسمونات (JA) را کاتالیز کند. میزان بیان آن در دانه‌های ذرت در مقاومت به قارچ *Aspergillus* spp ارتباط مثبت داشت (Gao et al. 2009). بیان ژن‌های *VvLOXC* و *VvLOXO* در اثر زخم‌های مکانیکی و آلودگی ناشی از *Botrytis cinerea* در *Vitis vinifera* افزایش یافت (Podolyan et al. 2010). نتایج این بررسی نشان داد میزان بیان این ژن در ۲۴ ساعت پس از اعمال آلودگی در گیاه نارنج به‌وسیله هر دو تیمار افزایش یافت.

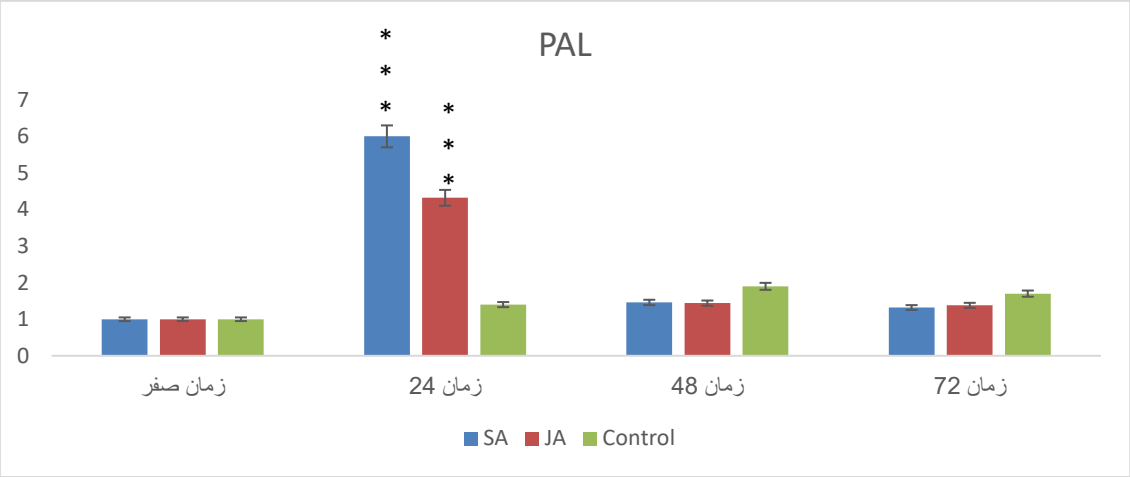


شکل ۷. سطح بیان ژن *LOX* درگیاهان نارنج تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نسبت به شاهد در زمان‌های مختلف. میل بارها نشان دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می باشد. * معنی داری در سطح0.1 درصد را نشان می دهد**

Figure 7. LOX gene expression level in sour orange plants treated with salicylic acid and jasmonic acid compared to the control at different times. Error bars represent standard error of the mean. *, shows significance at the level of 0.1%**

سطح بیان ژن *PAL*: اوج مقدار بیان ژن *PAL* در ساعت ۲۴ در گیاه نارنج تیمار شده با JA، ۴/۶۵ برابر زمان صفر شد و اختلاف معنادار در سطح یک دهم درصد نشان داد درحالی‌که در ساعت ۴۸ با کاهش به ۱/۵۱ رسید و در ۷۲ نیز به ۱/۵۴ رسید. در تیمار با SA نیز این ژن القاء شد و اوج بیان آن ۲۴ ساعت پس از آلودگی اتفاق افتاد که نرخ آن ۶/۶۳ برابر زمان صفر (شاهد) بود و اختلاف معنادار در سطح یک دهم درصد مشاهده شد. در ساعت‌های بعدی کاهشی بود و به ۱/۳۴ و ۱/۲۳ رسید. در گیاه شاهد تیمار شده با *P. viridiflava* اوج بیان این ژن در ساعت ۴۸ رخ داد و به ۲/۰۹ رسید و در ساعات ۲۴ و ۷۲ نیز برابر ۱/۵۴ و ۱/۸۵ ثبت شد (شکل ۸). فنیل آلانین آمونیالیاز فرایند دی آمینی شدن و تبدیل ال–فنیل آلانین به ترانس – سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. این تبدیل، اولین مرحله مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد که پیش سازهای مواد فنولی، لیگنین و فیتوآلکسین ها را فراهم می‌کند (Vidhyasekaran 2002). مشخص شده است که افزایش مقدار mRNA ژن *PAL* مبنای افزایش فعالیت آن می‌باشد. عدم فعالیت ژن فنیل آلانین آمونیالیاز که برای سنتز سالیسیلیک اسید مورد نیاز است منجر به کاهش SAR می شود. PALدر مسیر بیوسنتز سالیسیلیک اسید و دیگر ترکیبات وابسته دفاعی دخیل است و یک ترکیب کلیدی سیگنال دهی برای فعال نمودن ژن‌های وابسته دفاعی، کاتالیز کننده‌ها، پروتئین‌های رسپتور مانند و فاکتور رونویسی است. بنابراین PAL نقش مهمی در مقاومت گیاه به بیماری دارد (Stotz et al. 2009). سطح بیان این ژن در بررسی حاضر در تیمار سالیسیلیک اسید افزایش

بیشتری نسبت به تیمار جاسمونیک اسید نشان داد. مشابها در مطالعه Ahangar et al. (2016) نیز میزان بیان ژن در گندم همزیست شده با قارچ در برابر بیمارگر سفیدک پودری *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* افزایش یافت (Ahangar et al. 2016). مطالعات نشان داده افزایش میزان فعالیت PAL سبب افزایش غلظت ترکیبات فنلی می‌شود که به‌عنوان سوبسترایی برای آنزیم‌های اکسیداتیو مانند پراکسیداز و پلی¬فنل¬اکسیداز هستند. بررسی نتایج سایر محققین نقش این آنزیم را در افزایش مقاومت گیاه در برابر بیمارگرهای مختلف تائید می‌کند (Tonnessen et al. 2015) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.



شکل ۸. سطح بیان ژن *PAL* در گیاهان نارنج تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نسبت به شاهد در زمانهای مختلف. میل بارها نشان دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می باشد. * معنی داری در سطح 0.1 درصد را نشان می دهد**

Figure 8. *PAL* gene expression level in sour orange plants treated with salicylic acid and jasmonic acid compared to the control at different times. Error bars represent standard error of the mean.* shows significance at the level of 0.1%**

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی افزایش بیان ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز، توماتین، دیفنسین و تیونین به‌صورت جداگانه یا ترکیبی، سطح پاسخ دفاعی گیاهان را در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا افزایش می‌دهد (Ali et al. 2018). در پژوهش حاضر بر اساس نتایج به‌دست‌آمده تیمار سالیسیلیک اسید در بیان ژن‌های *PR1*، *PR2*، *PAL* و *POX* و *PR5* تأثیر بیشتری نسبت به جاسمونیک اسید داشت؛ اما تیمار جاسمونیک اسید در القای ژن‌های *PR4*، *PR3* و LOX تأثیر بیشتری نسبت به سالیسیلیک اسید نشان داد. همچنین میزان بیان ژن *PR1*، *PR2*، *LOX*، *PR4*، *PAL* و *PR5* در ۲۴ ساعت پس از اعمال آلودگی در گیاه نارنج به‌وسیله هر دو تیمار به اوج خود رسید که با توجه به اثبات نقش این ژن ها در مقاومت به بیمارگر های گیاهی در پژوهش های متعدد، بنظر می رسد افزایش بیان ژن‌های فوق در مواجهه میزبان با باکتری عامل بلاست در کاهش گسترش بیشتر بیماری در گیاه نارنج مشارکت دارند.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به خاطر حمایت معنوی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

اشرفی جواد، رهنما کامران، بابایی زاد ولی اله، رمضانپور سیده ساناز، کیل کریستوف (۱۳۹۹) بررسی تاثیر باکتری *Pseudomonas protegens* CHA0 و قارچ اندوفیت *Serendipita indica* در القای مقاومت و بیان ژن های دفاعی در گندم بر علیه عامل بیماری زای سپتوریوز برگ. بیماریهای گیاهی ۵۶(۳)، ۳۰۱-۲۷۵.

آهنگر لیلا، بابایی زاد ولی اله، رنجبر غلامعلی، نجفی زرینی حمید، بیابانی عباس (۱۳۹۴) الگوی بیان ژن های دفاعی ارقام حساس و مقاوم گندم در پاسخ به آلودگی به سفیدک سطحی. ژنتیک نوین ۱۰(۱)، ۴۶-۳۳.

بیکی فرید، رحیمیان حشمت اله، محمدی گل تپه ابراهیم، شمس بخش مسعود، برزگر علی، بوسکت آنتونی، گارسیا والدس النا، لالوکات جرج (۱۳۹۱) بررسی فنوتیپی و بیماری‌زایی عوامل بیماری بلاست مرکبات در استان‌های شمال ایران. دانش گیاهپزشکی ایران. ۴۳(۲)، ۲۲۲-۲۱۱.

حاجی‌پور باقری عباس، سوهانی محمد مهدی، حسنی سید حسن، بابایی زاد ولی‌اله، علوی سید محمد (۱۳۹۴) اثر همزیستی قارچ *Piriformospora indica* بر واکنش گیاه برنج (*Oryza sativa*) به بیماری پوسیدگی طوقه. تحقیقات غلات ۵(۳)، ۲۳۰-۲۱۹.

حیدری نژاد امیر مسعود، بابایی زاد ولی اله، رحیمیان حشمت اله (۱۳۹۵) مطالعه نقش ژن‌های *PR2* و *PAL* در مقاومت گیاه برنج به باکتری *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی۷(۴)، ۸۲-۶۷.

خاکساری مهسا، بابایی زاد ولی اله، رحیمیان حشمت اله، بیگی فرید (۱۳۹۶) بررسی الگوی بیان چند ژن مقاومت در سه ژنوتیپ مرکبات در برابر باکتری عامل بلاست *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. ژنتیک نوین ۱۲(۳)، ۱۰-۱.

رستمی مهدی، طریقی سعید، طاهری پریسا، رحیمیان حشمت اله (۱۳۹۸) بیان ژن های کیتیناز، بتا-۱ و ۳ گلوکوناز و پراکسیداز در برنج تحت تیمارهای قارچ عامل بیماری. آفات و بیماریهای گیاهی ۸۷(۱)، ۱۴۶-۱۲۹.

سیاری محمد، بابایی زاد ولی اله،, تاجیک قنبری محمد علی، رحیمیان حشمت اله (۱۳۹۴) بررسی مقاومت دو رقم برنج در تعامل با قارچ عامل سوختگی غلاف، *Rhizoctonia solani* . مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۷(۴)، ۱۱۲-۹۷.

صادقی فاطمه، رحیمیان حشمت اله، بابایی زاد ولی اله (۱۳۹۰) تنوع ژنتیکی جدایه های *Pseudomonas viridiflava* عامل بیماری بلاست مرکبات با آغازگرgyr B . هفتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران ۳۷.

عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن p32 در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.

غلام نژاد جلال، سنجریان فروغ، محمدی گل تپه ابراهیم، صفایی ناصر، رضوی خدیجه (۱۳۹۵) بررسی تغییرات بیان ژن های دفاعی گیاه گندم در پاسخ به آلودگی به *Mycosphaerella graminicola*. زیست شناسی گیاهی ۸(۳۰)، ۵۴-۴۳.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۷۷-۱۹۲.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانیmRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۴-۱۶۹.

محمدآبادی محمدرضا، سفلایی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

منصوری مهدی، حسینی پور اکبر، شریفی سیرچی غلامرضا، معصومی حسین (۱۳۸۸) بررسی تغییرات رونوشت های دو ژن کیتیناز و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز در نهال های پرتقال(*Citrus sinensis*) در پاسخ به آلودگی باکتری عامل شانکر مرکبات. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱(۲)، ۵۲-۳۹.

References

Abdelaziz M, Abdelsattar M, Abdeldaym E, et al. (2019) *Piriformospora indica* alters Na+/K+ homeostasis, antioxidant enzymes and LeNHX1 expression of greenhouse tomato grown under salt stress. Sci Hortic 256, 1-8.

Ahangar L, Babaiezad V, Ranjbar G, et al. (2016) Expression profile of defense-related genes in susceptible and resistant wheat cultivars in response to powdery mildew infection. New Genetics 1, 33-46 (In Persian).

Ali S, Ganai BA, Kamili AN, et al. (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. Microbiological Research 212, 29-37.

Arabpour Z, Mohammadabadi M, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. Agric Biotechnol J 13 (4), 183-200 (In Persian).

Ashrafi J, Rahnama K, Babaeizad V, et al. (2020) The effect of *Pseudomonas protegens* CHA0 and an endophyte fungus *Serendipita indica* on resistance induction with defense genes expression of wheat against Septoria leaf blotch disease. Iran J Plant Path 56(3), 275-301 (In Persian).

Bagal UR, Leebens-Mack JH, Walter Lorenz W, Dean JFD (2012) The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. Bio Med Central Genomi 13, S3- S1.

Beigi F, Rahimian H, Mohamadi goltape A, et al. (2012) Phenotypic and Pathogenecity Phenotypic and Pathogenecity Characteristics of the Agents Causing Citrus Blast Disease in the Northern Provinces of Iran. Iran J Plant Prot 43, 211-222 (In Persian).

Bowles DJ (1990) Defense-related proteins in higher plants. Annu Rev Biochem 59,873-907.

Brogue K, Chet I, Holliday M, et al. (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen Rhizoctonia solani. Science 254,1194-1197.

Chen Z, Zheng Z, Huang J, et al. (2009) Biosynthesis of salicylic acid in plants. Plant Signal Behav 4,493-496.

Chittoor JM, Leach JE, White FF (1999) Induction of peroxidase during defense against pathogens, in: S.K. Datta, S. Muthukrishnan (Eds.), Pathogenesis: Related Proteins in Plants, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 171-193.

Coling DBK, Kra M, Kragh K, et al. (1993) Plant chitinase. Plant J 80,389-413.

Cota IE, Troncoso-Rojas R, Sotelo-Mundo R, et al. (2007) Chitinase and b-1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. Sci Hortic 112, 42-50.

Dekkers MGH, Graham JH, Burns JK, et al. (2004) Evaluation of chemical inducers and PR protein reporters for induced systemic resistance to citrus bacterial diseases. Phytopathol 94, S25.

Deshmukh SD, Kogel KH (2007) *Piriformospora indica* protects barley from root rot caused by *Fusarium graminearum*. J Plant Dis Protect 114(6), 263-268.

Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defenses. Annu Rev Phytopathol 32,479-510.

Fitzgerald HA, Chern MS, Navarre R, Ronald PC (2004) Overexpression of (At) NPR1 in rice leads to a BTH-and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. Mol Plant Microbe Interact 17, 140-151.

Fritig B, Heitz T, Legrand M (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. Curr Opin Immunol 10,16-22.

Gao X, Brodhagen M, Isakeit T, et al. (2009) Inactivation of the *lipoxygenase ZmLOX3* increases susceptibility of maize to *Aspergillus* spp. Mol Plant Microbe Interact 22(2), 222-231.

Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi Goltapeh E, et al. (2016) Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by *Mycosphaerella graminicola* Iran J Plant Biol 8(30), 43-54 (In Persian).

Hajipour A, Sohani M, Hasani-Kumleh H, et al. (2015) The symbiotic effect of *Piriformospora indica* on induced resistance against bakanae disease in rice (*Oryza sativa* L) J Cereal Res 5(3), 219-230 (In Persian).

Heidarinezhad A, Babaiezad V, Rahimian H (2016) Study of the role of *PR2* and *PAL* genes in resistance of rice plant to *Acidovorax avenae* subsp *avenae* bacterium. J Agric Biotech 7(4), 67-82 (In Persian).

Hernandez I, Portieles R, Chacon O, Borras-Hidalgo O (2005) Proteins and peptides for the control of phytopathogenic fungi. Biotecnol Apl 22, 256- 260.

Hilaire E, Young SA, Willard LH, et al. (2001) Vascular defense responses in rice: Peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. Mol Plant Microbe Interact 14, 1411-1419.

Hoegen E, Stromberg A, Pihlgren U, et al. (2002) Primary structure and tissuespecific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. Mol Plant pathol 3, 329-345.

Iorio RA, Del Duca S, Calamelli E, et al. (2013) Citrus allergy from pollen to clinical symptoms. PLoS One 8(1), e53680.

Jain S, Kumar A (2015) The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses. Adv Plants Agric Res 3(1), 77.

Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444, 323–329.

Jwa NS, Agrawal GK, Tamogami S, et al. (2006) Role of defense/stressrelated marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. Plant Physiol Biochem 44, 261-273.

Kang TS, Wang L (2010) Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: phenylalanine amm onia lyase for phenylketonuria. Mol Genet Metab 99,4-9

Khaksari M, Babaiezad V, Rahimian H, Beigi F (2017) Expression profile of some resistance genes in three citrus genotypes in challenging with *Pseudomonas syringae* pv *syringae* the causal agent of blast disease. New genet 12(3), 1-10 (In Persian).

Kitajima S, Sato F (1999) Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function. J Biochem 125, 1-8.

Leubner-Metzger G, Meins F (1999) Functions and regulation of plant ß-1, 3-glucanases (PR-2). Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press, Boca Raton, FL, 49-76.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods 25(4), 402-408.

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.

Malnoy M, Jin Q, Borejsza-Wysocka EE, et al. (2007) Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in Malus × domestica. Mol Plant Microbe Interact 20 (12), 1568–1580.

Mansouri M, Hosseini Pour A, Sharifi Sirchi GR, Masoumi H (2010) Changes in chitinase and β-1, 3-glucanase transcript levels in sweet orange (*Citrus sinensis*) in response to treatment with *Xanthomonas citri* subsp *citri*. Agric Biotechnol J 1(2), 39-52 (In Persian).

Maschietto V, Lanubile A, De Leonardis S, et al. (2016) Constitutive expression of pathogenesis-related proteins and antioxydant enzyme activities triggers maize resistance towards *Fusarium verticillioides*. J Plant physiol 200, 53-61.

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (Foeniculum vulgare) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. Small Rumin Res 193, e106276.

Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 12 (4), 167-181 (In Persian).

Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (Foeniculum vulgare) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. Heliyon 7 (12), e08542.

Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. Agric Biotechnol J 12, 191-208 (In Persian).

Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 12 (1), 177-192 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10, 111-122 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295 (In Persian).

Moralejo FJ, Cardoza RE, Gutierrez S, Martin JF (1999) Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage Appl Environ Microbiol 65, 1168–1174.

Muchembled J, Sahraoui ALH, Grandmougin-Ferjani A, Sancholle M (2006) Changes in lipid composition of *Blumeria graminis* f sp *tritici* conidia produced on wheat leaves treated with heptanoyl salicylic acid. Phytochem 67(11), 1104-1109.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol plant 15(3), 473-497.

Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. Phytochem 65(13), 1879-1893.

Passardi F, Penel C, Dunand C (2004) Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. Trends Plant Sci 9, 534–40.

Podolyan A, White J, Jordan B, Winefield C (2010) Identification of the *lipoxygenase* gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-*lipoxygenases* expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. Funct Plant Biol 37(8), 767-784.

Porta H, Rocha-Sosa M (2002) Plant lipoxygenases Physiological and molecular features. Plant physiol 130(1), 15-21.

Rauscher M, Adam AL, Wirtz S, et al. (1999) PR-1protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. Plant J 19, 625-633.

Ritter H, Schulz GE (2004) Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. Plant Cell 16,3426-3436.

Rostami M, Tarighi S, Taheri P, Rahimian H (2019) Genes expression of chitinase, β-1, 3-glucanase and peroxidase enzymes in rice treated with the causal agent of sheath blight diseases, antagonistic and inducer bacteria, and potassium silicate. Appl Entomol Phytopathol 87(1), 129-146 (In Persian).

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, et al. (1996) Systemic acquired resistance. Plant Cell 8,1809-1819.

Sadeghi F, Rahimian H, Babaeizad V (2011) Genetic diversity of *Pseudomonas viridiflava* isolates causing citrus blast disease with gyr B primer, 7th National Conference on Biotechnology of the Islamic Republic of Iran, Tehran, Niroo Research Institute p37 (In Persian).

Sareena S Poovannan K, Kumar KK, et al. (2006) Biochemical responses in transgenic rice plants expressing a defence gene deployed against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. Curr Sci 91,1529- 1532.

Sayyari M, Babaeizad V, Tajick Qanbari MA, Rahimian H (2015) Resistance of two Rice cultivars to the sheath blight agent *Rhizoctonia solani* AG1-1A. Agric Biotechnol J 7(4), 97-112 (In Persian).

Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2021) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (Foeniculum vulgare) seed powder consumption in muscle of sheep. Anim Biotechnol 33, 1-11.

Schultheiss H, Dechert C, Kogel KH, Huckelhoven R (2003) Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. Plant J 36, 589-601.

Sels J, Mathys M, De Coninck BMA, Cammue BPA (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiol Biochem 46, 941-950.

Sharifi-Sirchi Q, Hosseinipour A, Mansouri M (2011) Priming against Asiatic citrus canker and monitoring of PR genes expression during resistance induction. Afr J Biotechnol 10, 19-20.

Sharp JK, Valent B, Albersheim P (1984) Purification and partial characterization of a βglucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. J Biol Chem 259, 11312-11320.

Shi YL, Sheng YY, Cai ZY, et al. (2019) Involvement of salicylic acid in anthracnose infection in tea plants revealed by transcriptome profiling. Int J Mol Sci 20(10), 2439.

Song H, Wang P, Li C, et al. (2016) Identification of lipoxygenase (LOX) genes from legumes and their responses in wild type and cultivated peanut upon *Aspergillus flavus* infection. Sci rep 6(1), 1-9.

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, et al. (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie 75, 687-706.

Stotz HU, Thomson JG, Wang Y (2009) Plant defensins Defense, development and application. Plant Signal Behav 4, 1010-1012.

Sudyoung N, Tokuyama S, Krajangsang S, et al. (2020) Plant defense-related gene expression analysis of canker-infected lime seedling In IOP Conference Series: Earth Environ Sci 432 (1), 012007.

Tonnessen BW, Manosalva P, Lang JM, et al. (2015) Rice phenylalanine ammonia-lyase gene OsPAL4 is associated with broad spectrum disease resistance. Plant Mol Biol 87(3), 273-286.

Torres MA, Jones JD, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. Plant physiol 141(2), 373-378.

Traw MB, Bergelson J (2003) Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in Arabidopsis. Plant physiol 133(3), 1367-1375.

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(5), 559-575.

Van Loon L, Rep M, Pieterse C (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol 44, 135-162.

Vidhyasekaran P (2002) Bacterial disease resistance in plants: molecular biology and biotechnological applications: Routledge pp 322.

Vigers AJ, Roberts WK, Selitrennikoff CP (1991) A new family of plant antifungal proteins. Mol Plant Microbe Interact 4, 315-323.

Vogt J, Schiller D, Ulrich D, et al. (2013) Identification of *lipoxygenase (LOX)* genes putatively involved in fruit flavour formation in apple (*Malus domestica*). Tree Genet Genomes 9(6), 1493-1511.

Waewthongrak W, Leelasuphakul W, McCollum G (2014) Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS–S14 elicit defense-related gene expression in citrus fruit. PloS one 9(10), e109386.

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proc Natl Acad Sci 102(38), 13386-13391.

Wang H, Zheng J, Ren X, et al. (2015) Effects of *Piriformospora indica* on the growth, fruit quality and interaction with Tomato yellow leaf curl virus in tomato cultivars susceptible and resistant to TYCLV. Plant Growth Regul 76(3), 303-313.

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(2), 273-293.

Yang XY, Jiang WJ, Yu HJ (2012) The expression profiling of the *lipoxygenase (LOX)* family genes during fruit development, abiotic stress and hormonal treatments in cucumber (*Cucumis sativus* L). Int J Mol Sci 13(2), 2481-2500.

Zhang C, Jin Y, Liu J, et al. (2014) The phylogeny and expression profiles of the *lipoxygenase (LOX)* family genes in the melon (*Cucumis melo* L) genome. Sci Hortic 170, 94-102.

Zhu Q, Maher EA, Masoud S, et al. (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. Nat Biotechnol 12, 807-812.