

بررسی الگوی بیان چند ژن مقاومت در سه ژنوتیپ مرکبات در برابر باکتری عامل بلاست *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss)

Expression profile of some resistance genes in three citrus genotypes in challenging with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* the causal agent of blast disease

مهسا خاکساری^۱، ولی الله بابایی زاد^{۱*}، حشمت الله رحیمیان^۱، فرید بیگی^۲

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

Khaksari M¹, Babaeizad V^{*1}, Rahimian H¹, Beigi F²

1- MSc Student, Associate Professor, Professor, Sari Agricultural
Sciences and Natural Resources University.

2- Assistant Professor, Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research
Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: babaeizad@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

بیماری‌های گیاهی یکی از محدودیت‌های بزرگ در تولید محصولات کشاورزی به شمار می‌روند. بیماری بلاست مرکبات از جمله بیماری‌های شایع در مناطق مرکبات خیز دنیا به‌استثنای مناطق گرمسیری است که عمدتاً به‌وسیله *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* Van Hall 1902 (Pss) ایجاد می‌شود. گیاهان از طریق فعال کردن ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دفاعی نسبت به بیمارگرهای باکتریایی واکنش نشان می‌دهد. توسعه مقاومت به بیماری در بسیاری از برهم‌کنش‌های گیاه - بیمارگر باکتریایی، با تجمع پروتئین‌های القایی در گیاه مرتبط است. تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی نظیر بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، کیتیناز، فیل آلانین آمونیاپاز و نیز فاکتور رونویسی WRKY 40 در اثر حمله بیمارگرهای گیاهی، یکی از مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در مقابل عوامل بیماری‌زا است. به‌منظور بررسی و مقایسه میزان mRNA سه ژن بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، کیتیناز، PAL و فاکتور RKY 40 در مراحل اولیه بیماری بلاست مرکبات (Pss) از روش Real Time RT-PCR استفاده شد. پس از آلوده نمودن برگ‌های مرکبات مختلف با باکتری (Pss) از طریق مایه‌زنی، در زمان‌های مختلف RNA کل استخراج و پس از سنتز cDNA، تغییرات سطح بیان ژن‌های مذکور اندازه‌گیری شد. نتایج این بررسی نشان داد بیان سه ژن مذکور به‌ترتیب در رقم اوکیتسو، نارنج و دو رگ لایم کاهش می‌یابد و نتایج با مشاهدات باغی مطابقت دارد.

واژه‌های کلیدی

بتا ۱ و ۳ گلوکاناز
بلاست مرکبات
بیان ژن
کیتیناز

مقدمه

بیماری بلاست مرکبات یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در اکثر مناطق مرکبات خیز دنیا به‌استثنای مناطق گرمسیری است که عمدتاً به‌وسیله *Pseudomonas syringae* pv. (Pss) *Syringae* Van Hall (1902) ایجاد می‌شود. بیمارگر از راه زخم‌های ایجادشده روی قسمت‌های جوان، به گیاه حمله می‌کند. علائم بلاست، روی پهنک و دم‌برگ به‌صورت لکه‌های آب‌سوخته 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 و ممکن است سرشاخه‌ها دچار سرخشیدگی شوند (Beigi et al. 1391). گیاهان برای مقابله با عوامل بیماری‌زا از طیف وسیعی از مکانیسم‌ها استفاده می‌کنند. نتیجه برهمکنش گیاه با عوامل بیماری‌زا، القای بیان ژن‌های درگیر در مقاومت و به دنبال آن کاهش زخم و آسیب توسط بیمارگر است (Dixon et al. 1994). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis related proteins; PRs) دسته‌ای از پروتئین‌ها محسوب می‌شوند که در اثر حمله بیمارگرها و یا مواد مرتبط با بیمارگرها هم‌چون الیستورها و هورمون‌های گیاهی مثل سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن در گیاه تولید می‌شوند (Van loon and Pieterse 2006). بیان چنین پروتئین‌هایی در گیاه و به‌صورت اختصاصی، موضعی و سیستمیک، در نتیجه‌ی برهمکنش‌های سازگار جزئی و ناسازگار صورت می‌گیرد. در گیاه *Arabidopsis thaliana* مجموع ژن‌های PR که در پاسخ به آلودگی با قارچ *Prenospora parasitica* بیان می‌شود با مجموع ژن‌های PR که در پاسخ به آلودگی با قارچ *Alternaria brassiciola* بیان می‌شود متفاوت است (Thomma et al. 1998). عوامل بیماری‌زا باعث تغییرات متابولیکی همچون تولید Reactive oxygen (ROS) species، القای مقاومت اکتسابی سراسری Systemic acquired resistance (SAR) و مقاومت القایی سراسری Induced systemic resistance می‌شوند. فعالیت و حضور پروتئین‌های مرتبط با SAR ارتباط مستقیمی با سطح مقاومت و حساسیت در گیاه دارد. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی هم‌چون کیتیناز و گلوکاناز که نقش ضد باکتریایی و ضد قارچی دارند در ارتباط با

SAR می‌باشند (Ryals et al. 1996). پروتئین‌های PR2، فعالیت آنزیمی بتا ۱ و ۳ گلوکانازی نشان می‌دهند (Vidhyasekaran 2002).

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. این آنزیم به‌صورت مستقیم باعث مرگ بیمارگر می‌شود (Bowels 1990)، به‌صورت غیرمستقیم نیز قطعات حاصل از تخریب دیواره سلولی به‌عنوان الیستور موجب القای مقاومت خواهند شد (Vidhyaskaran 2002). پروتئین‌های گلوکاناز فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی دارند و در ارتباط با مقاومت اکتسابی سیستمیک است (Sticher et al. 1997). گیاهانی که بیان ژن‌های گلوکاناز در آن‌ها افزایش داده شد، مقاومت بالایی به عوامل بیماری‌زا پیدا کرده‌اند (Sareena et al. 2006; Brouge et al. 1991).

در بررسی‌های گذشته 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; mansouri et al. 2009). Cota et al. (2007) نشان دادند که میزان فعالیت دو آنزیم کیتیناز و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز به‌محض ایجاد آلودگی در هر دو مرحله سبز و قرمز در مقاومت میوه ارقام گوجه‌فرنگی به آلترناریا افزایش یافت (Cota et al. 2007).

پروتئین‌های PR3 فعالیت کیتینازی دارند. چندین کیتیناز در تمام گونه‌های گیاهی مورد مطالعه گزارش شده‌است. کیتینازها، پیوندهای بتاگلوکوزیدی را در انتهای احیاشده گلوکوزامینیدها (که می‌تواند بخش‌هایی از پلیمرهای مختلف مانند کیتین، کیتوزان یا پپتیدوگلیکان باشند) هیدرولیز می‌کنند (Vidhyasekaran 2002). پروتئین‌های PR3 در مهندسی ژنتیک مقاومت 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 لیروزیمی را نیز برای کیتینازها اثبات کرده که از این طریق باعث تجزیه دیواره سلولی باکتری‌ها می‌شود (Firitig et al. 1998; Hitz 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 هیف‌های در حال رشد و یا پیتیدوگلیکان را تجزیه می‌کنند، درحالی‌که در روش غیرمستقیم کیتینازهای آپوپلاست سبب آزاد کردن الیگومرهای کیتین می‌شود که می‌تواند به عنوان محرک‌های مکانیسم دفاعی در گیاه عمل نماید (Colling et al. 1993). افزایش بیان ژن کیتیناز و برخی ژن‌های PR در گیاه فلفل باعث افزایش مقاومت به آلودگی در برابر باکتری *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* شده‌است (Kang and wang 2010). بیان هم‌زمان دو یا چند ژن PR با اثر سینرژیستی باعث افزایش مقاومت و در نتیجه کنترل بهتر بیماری می‌شود (Zhu et al. 1994).

افزایش میزان بیان ژن کیتیناز دلیل افزایش سطح مقاومت در درختان سیب نسبت به بیماری باکتریایی آتشک درختان دانه‌دار است (Brisset et al. 2000). (Sharifi et al. 2011) نیز به نقش این ژن در تعامل با شاکر مرکبات اشاره نموده‌اند. تولید گیاهان مقاوم به عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی و ویروسی از طریق انتقال ژن‌های کد کننده مواد ضد میکروبی، روش امیدوار کننده‌ای برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی است (Zasloff 2002).

فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) یکی از اولین ژن‌های تدافعی گیاهان تشخیص داده شده که به وسیله تنش‌های محیطی و عوامل بیماری‌زا تحریک می‌شود (Kang and Wang 2010). محصول این ژن از جمله 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). در نتیجه فعالیت آنزیم PAL، دو مسیر بیوستیزی فعال می‌شود که یکی از این مسیرها مربوط به سالیسیلیک اسید است. این آنزیم در مراحل اولیه مسیر فنیل پروپانویید ساخته می‌شود و باعث فعال شدن مسیر SAR و القای مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاه خواهد شد (Chen et al. 2009). در توتون آلوده به ویروس موزاییک توتون افزایش فعالیت ژن PAL و POX گزارش شده‌است (Way et al. 2002).

افزایش بیان ژن PAL در پاسخ به *Ph. parasitica* و زخم مکانیکی در پونسیروس گزارش شده‌است (Boava 2011). شواهد حاکی از این است که مونولیگنول‌های تولید شده به وسیله این ژن توسط پراکسیدازها اکسید شده تا لیگنین را در دیواره سلولی سنتز نمایند (Mohammadi and Kazemi 2002). گیاهان تراریخت توتون که فعالیت PAL در آن‌ها کم است، لیگنین کمتری در دیواره داشته و در مقایسه با گیاهان دست‌کاری نشده توتون، نسبت به تهاجم بیمارگر حساس‌تر می‌باشند، بنابراین PAL نقش مهمی در مقاومت گیاه به بیماری دارد (Stotz et al. 2009). مطالعات مولکولی و ژنتیکی حذف یا تخریب این ژن با هدف مطالعه عملکرد در پدیده رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی صورت گرفته است (Haung et al. 2010). خانواده ژنی WRKY نماینده یکی از مهم‌ترین گروه‌های عوامل تنظیم‌کننده رونویسی است (Zhang and wang 2005). باند شدن فاکتورهای رونویسی به DNA برای فعال‌سازی ژن‌های PR مهم است (Van loon and Pieterse 2006). در پروموتور بسیاری از ژن‌های گیاهی دخیل در دفاع و پاسخ به عوامل بیماری‌زا، توالی موتیفی حفاظت‌شده‌ای بنام W-box با توالی TTGACC یا TTGACT وجود دارد. پروتئین‌های WRKY به‌طور اختصاصی به W-box متصل شده و موجب تشدید فرایند رونویسی از ژن پایین‌دست می‌شود. بیان ژن WRKY12 در گیاهان متفاوت در پاسخ به آلودگی باکتریایی مشاهده شده است (Dellaji et al. 2000). بیان ژن WRKY12 در برنج در اثر باکتری *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* موجب افزایش بیان *NPR1*، *Pr1b*، فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) و پراکسیداز (POX) می‌شود (Zheng et al. 2007). ژن WRKY افزایش مقاومت پونسیروس نسبت به عوامل بیماری‌زا و سرما مؤثر است (Shahin-cevik 2013). تعدادی از فاکتورهای WRKY تنظیم‌کننده منفی و تعدادی نیز تنظیم‌کننده مثبت ژن‌های PR هستند.

هدف از این تحقیق، بررسی و مقایسه میزان بیان چهار ژن کیتیناز، گلوکاناز، فنیل آلانین آمونیلایز و WRKY 40 در واکنش به باکتری عامل بیماری بلاست مرکبات با استفاده از روش Real time PCR (QPCR) کمی در مراحل اولیه آلودگی ارقام مختلف مرکبات است.

مواد و روش‌ها

باکتری موردنظر از کلکسیون باکتری موجود در بخش کنترل بیولوژیک موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور واقع در موسسه تحقیقات برنج کشور (معاونت آمل) تهیه و در محیط NAS کشت شد. در این بررسی از سه رقم متفاوت مرکبات (نارنگی رقم اوکیتسو (*Citrus reticulata* var okitso)، گونه نارنج (*Citrus aurantium*) و دورگ لایم کوآت از گونه لایم (*Citrus aurantifolia*) یک‌ساله پیوند زده‌شده بر روی پایه نارنج استفاده شد. تمامی نهال‌ها چهار هفته قبل از انجام آزمایش‌ها سربرداری شدند. نهال‌های مرکبات تحت شرایط گلخانه‌ای در درجه حرارت ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد نگهداری شدند. از کشت ۱-۲ روزه باکتری Pss در محیط کشت NAS سوسپانسیونی با غلظت $10^6 \times 7$ سلول (Colony-Forming Unit; CFU) در هر میلی‌لیتر جهت آزمون بیماری‌زایی تهیه شد. غلظت‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول‌موج ۶۰۰ نانومتر انجام شد. برای مایه‌زنی، حدود ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله به روش مایه‌کوبی به‌وسیله سرنگ مخصوص انسولین به فضای میان‌برگی برگ‌های مرکبات تزریق شد. نهال‌ها ۲۴ ساعت قبل و بعد از مایه‌زنی گیاهان، با استفاده از کیسه‌های پلاستیکی شفاف پوشیده شدند. نمونه‌برداری در بازه‌های متفاوت انجام و در فریزر -70°C نگهداری شد. استخراج RNA کل از برگ‌های نمونه‌برداری شده در بازه‌های زمانی مختلف با استفاده از کیت RNxplus (شرکت سیناژن) انجام شد. به‌منظور زدودن DNA ژنومی از نمونه‌های RNA، از کیت RQ1 RNase-free DNase ساخت شرکت Fermentas طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

به‌منظور بررسی کیفیت RNA استخراجی از دو روش استفاده شد. نمونه‌های استخراج‌شده، با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE بررسی شدند. ژل در اتیدیوم بروماید ($0.5 \mu\text{g/mL}$) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از شستشو با آب مقطر با UV دستگاه ژل خوان کداک از آن عکس‌برداری شد. در روش دوم درجه خلوص و غلظت نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد.

نتایج

ساخت cDNA توسط کیت Revert Aid First Standard cDNA (Fermentase) و بر اساس دستورالعمل، از محتوی RNA کل استخراج‌شده انجام شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در 20°C - نگهداری و تکثیر قطعات cDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و جفت آغازگر TEF انجام شد.

بیان ژن‌ها به‌وسیله qRT-PCR، با استفاده از کیت CYBR Green M*3000P (BioRad) thermal cycler انجام شد. حدود دو میکرولیتر از cDNA رقیق‌شده (50ng) از هر نمونه به‌عنوان الگو در واکنش‌ها استفاده شد و به ترکیب: $1 \mu\text{L}$ از هر آغازگر، $7/5 \mu\text{L}$ سایبرگرین، $8/5 \mu\text{L}$ آب (حجم نهایی $20 \mu\text{L}$) افزوده شد. برنامه دمایی جهت تکثیر شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و ۴۰ سیکل تکثیری با برنامه واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، تکثیر به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس بود، ارزیابی محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE صورت گرفت. لیست آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش نیز در جدول ۱ ارایه شده‌است. در تمام آزمایش‌ها از ژن Tef به‌عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. تمام واکنش‌های PCR در ۳ تکرار انجام گرفت.

تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار Bio-Rad cfx manager انجام و نرخ بیان هر ژن در این روش با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen 2001)

در این مطالعه دو رگ لایم کوآت نسبت به نارنج و رقم اوکیتسو مقاومت پایین‌تری را نسبت به *P. syringae* نشان داد. اندازه لکه‌های آب‌سوخته در لایم کوآت دو برابر اوکیتسو بود. میزان حساسیت به بیماری در رقم نارنج بیشتر از لایم کوآت و کمتر از اوکیتسو مشاهده شد (شکل ۱).

بیان نسبی چهار ژن (*PR-3 (Chitinase)*، *PR-(β-1,3 glucanase)*، *2 PAL (Phenylalanine amonialyase)* و فاکتور رونویسی *WRKY40* در دورگ لایم کوآت، نارنج و رقم اوکیتسو از زمان

تزریق تا بیان مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آزمایش از روش qRT-PCR استفاده شد. بیشینه بیان اغلب ژن‌ها در فاصله ۲۴-۴۸ ساعت مشاهده شد و سطح ژن‌های *PR* در ساعت صفر بسیار ناچیز بود.

میزان بیان ژن گلوکاناز در اوکیٹسو و نارنج در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی به میزان بیشینه خود رسید که سطح آن به ترتیب ۱۰/۵۱ و ۵/۳۹ برابر زمان شاهد (زمان صفر) بود. میزان بیان در لایم کوات که نسبت به این بیماری بسیار حساس است نیز در ساعت ۲۴ به بیشینه بیان خود رسید که این مقدار بیشینه بیان ۴/۳۵ برابر زمان صفر بود. اختلاف معناداری در سطح پنج درصد در بازه زمانی ۱۶۸ ساعت بین هیچ رقمی وجود نداشت ولی در تمامی بازه‌های زمانی دیگر اختلاف معنادار وجود داشت (شکل ۳).

در گیاه لایم کوات سطح بیان ژن پرکسیداز در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی افزایش یافته و در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی به میزان اوج خود رسید. میزان آن در بازه زمانی اوج ۵/۲۳ برابر شاهد (زمان صفر) بود. درحالی‌که بیان این ژن در ارقام نارنج و اوکیٹسو ۱۲ ساعت زودتر به مقدار بیشینه خود رسید ولی سطح بیان ژن *PR3* در ساعت اوج خود در اوکیٹسو بیش‌تر از نارنج بود. به‌طوری‌که این نرخ در رقم اوکیٹسو در این بازه زمانی ۱۰/۳۳ برابر زمان شاهد خود، درحالی‌که در نارنج ۸/۰۱ برابر شاهد مربوطه بود. میزان بیان ژن *PR3* در سایر بازه‌ها روند کاهشی به خود گرفت ولی همچنان سطح آن در اوکیٹسو نسبت به دو رقم حساس به بیماری بیش‌تر بود (شکل ۴).

در رقم اوکیٹسو بیش‌ترین میزان بیان ژن *PAL* در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی به باکتری *Pss* مشاهده شد. میزان اوج بیان نسبت به شاهد (زمان صفر) افزایش ۲۵/۰۰ برابری داشت. بیان ژن فنیل

آلانین آمونیلایز در نارنج و لایم کوات نیز در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی به بیشینه خود رسید که میزان این بیشینه بیان در رقم نارنج ۱۴/۲۴ و در رقم لایم کوات ۹/۲۰ برابر زمان صفر بود. گونه نارنج و دو رگ لایم کوات در بازه‌های زمانی ۷۲ و ۱۶۸ ساعت اختلاف معناداری در سطح پنج درصد نداشتند اما در سایر بازه‌های زمانی اختلاف معنادار بین سه رقم مشاهده شد (شکل ۵).

سطح بیان فاکتور رونویسی *WRKY40* در اوکیٹسو و نارنج در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی بیش‌ترین مقدار خود رسید درحالی‌که در دورگ لایم کوات با ۱۲ ساعت تأخیر در زمان ۴۸ به اوج رسید. میزان بیان این فاکتور رونویسی در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت بعد از آلودگی در رقم اوکیٹسو به ترتیب ۳۳/۷۶، ۲۴/۵۹، ۱۴/۰۳، ۱۱/۵۱ برابر زمان صفر نسبت به شاهد بود. میزان بیان بیشینه در رقم نارنج و لایم کوات ۱۲/۲۲ و ۸/۰۱ برابر ساعت صفر (شاهد) خود بود. در تمامی بازه‌های زمانی اختلاف معنادار در سطح پنج درصد بین ارقام مشاهده شد (شکل ۲).

بحث

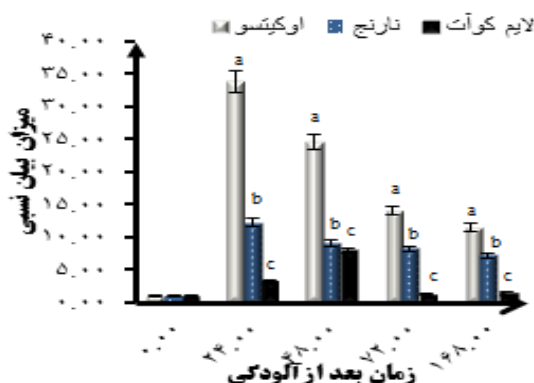
پیش‌نیاز تولید ارقام مقاوم، شناسایی مکانیسم‌های گیاهی درگیر در واکنش به عوامل بیماری‌زا است که منجر به ظهور مقاومت در ارقام مقاوم و حساسیت در ارقام حساس گیاهی می‌شود (Baker et al. 1997). پروتئین‌های *PR* از جمله پروتئین‌های درگیر در مقاومت بوده که در اثر حمله بیمارگر و یا مواد مرتبط با بیمارگر همچون الیستورها و تیمار گیاهان با هورمون‌های گیاهی مانند سالیسیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن در گیاه تولید می‌شوند (Van loon and Pieterse 2006).

جدول ۱- توالی جفت آغازگرها در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز

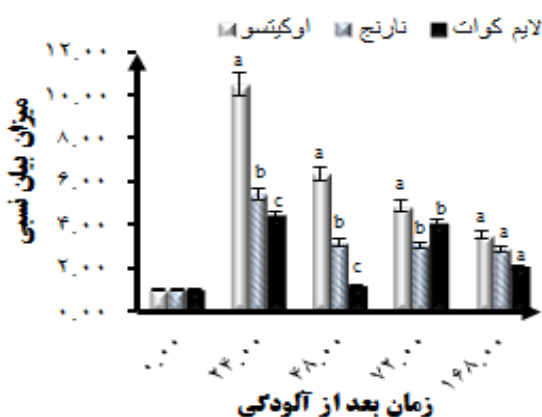
نام ژن	توالی آغازگر (5'→3')	accession number
<i>elongation factor 1-alpha</i>	F: GGTCAGACTCGTGAGCATGC R: CATCGTACCTAGCCTTTGAGTACTTG	AY498567
<i>PR2</i>	F: GACGTCGTCGTATCTCATGG R: GAGTTGGGCGTCAAAAAGG	AJ000081
<i>PR3</i>	F: ACAGAAATTGTGGAAGCGG R: AGCAAGTCTTCAAACATCTCC	AF090336
<i>PAL</i>	F: CACAAATTGAAGCACCATCC R: TTCTCAGGGCATAACGATCC	AY681119
<i>WRKY40</i>	F: TGGTCAATGGATTCAACGTG R: TTCCTCCACCAAAATTCCAG	AY681120



شکل ۱- میزان گسترش بیماری در رقم اکتیسو، گونه نارنج و دورگ لایم کوآت



شکل ۲- بیان نسبی ژن *WRKY 40* در لایم کوآت، نارنج و اکتیسو بعد از مایه‌زنی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* برگ‌ها با غلظت 7×10^6 cfu ml⁻¹ باکتری مایه‌زنی شده‌اند. بیان نسبی ژن با استفاده از روش منحنی استاندارد محاسبه شد. آزمایش در سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. مقایسه میانگین بین ارقام با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام پذیرفت.



شکل ۳- بیان نسبی ژن بتا ۱ و ۳ گلوکاناز در لایم کوآت، نارنج و اکتیسو بعد از مایه‌زنی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* برگ‌ها با غلظت 7×10^6 cfu ml⁻¹ باکتری مایه‌زنی شده‌اند. بیان نسبی ژن با استفاده از روش منحنی استاندارد محاسبه شد. آزمایش در سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. مقایسه میانگین بین ارقام با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام پذیرفت.

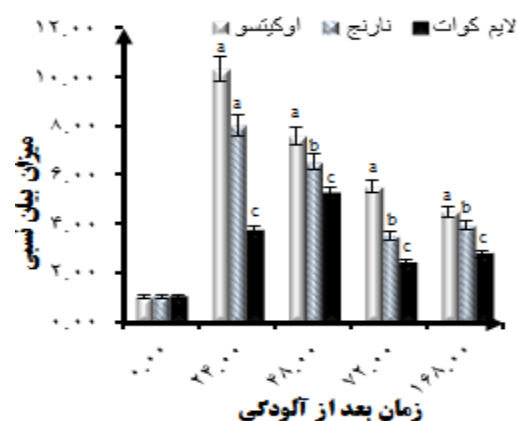
ازجمله این پروتئین‌ها گلوکاناز است که نقش ضد باکتریایی و ضد قارچی داشته و در ارتباط با مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌باشد (Sticher et al. 1997; Ryals et al. 1996). میزان بیان ژن *PR2* در هر سه گونه و رقم مرکبات در ساعت ۲۴ به اوج خود رسید که نشان‌دهنده این است که در ارقام حساس و مقاوم زمان اوج بیان یکسان بوده اما سطح اوج بیان این ژن در اوکتیسو افزایش ۱۰/۵۱ برابری نسبت به صفر داشته است درحالی که در گونه نارنج با حساسیت متوسط ۵/۳۹ برابر و در دورگ حساس لایم کوآت ۴/۳۵ برابر زمان صفر است. میزان بیان در اوکتیسو و نارنج بعد از زمان اوج به تدریج تا ۷۲ ساعت بعد از آلودگی کاهش یافت اما پس از گذشت ۱۶۸ ساعت از تزریق مقداری افزایش بیان مشاهده شد، افزایش مجدد آن به علت افزایش تحریک گیاه در زمان بروز علائم بلاست است؛ اما در رقم لایم کوآت در ۷۲ ساعت بعد از آلودگی افزایش بیان دیده شد که می‌تواند به علت کنترل ضعیف باکتری و افزایش تحریک گیاه به دلیل افزایش تعداد سلول باکتری در این دورگ (لایم کوآت) و بالا رفتن فعالیت باکتری در این ساعت باشد. بالاتر بودن سطح بیان ژن *PR2* به ترتیب در اوکتیسو و نارنج نشان‌دهنده مقاومت بالاتر این ارقام می‌باشد (شکل ۳).

نتایج یک بررسی نیز نشان داد که میزان بیان ژن بتا گلوکاناز در رقم لایم در برابر باکتری عامل شانکر مرکبات نسبت به رقم واشنگتن ناول کمتر است که نشان‌دهنده نقش این ژن در مقاومت به بیماری می‌باشد (Sharifi-sirchi et al. 2011). هم‌چنین نشان داده شده بیش بیانی ژن کیتیناز در برنج باعث افزایش مقاومت گیاهان تراریخت به عامل بیماری شیت بلایت می‌شود (Sareena et al. 2006; Brogue et al. 1991).

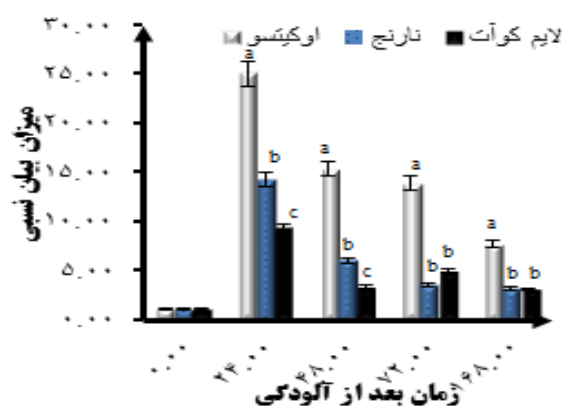
پروتئین *PR3* در میان پروتئین‌های *PR* جایگاه ویژه‌ای دارد. این پروتئین یک هموپلیمر خطی از واحدهای N-استیل-دی گلوکز آمین است که با پیوندهای بتا ۱ و ۴ به هم متصل هستند (Jwa et al. 2006). سطح بیان ژن *PR3* در بررسی حاضر در اوکتیسو و نارنج در ۲۴ ساعت به اوج خود رسید که در اوکتیسو سطح بیان بیشتر از نارنج بوده و تأییدکننده این موضوع است که رقم اوکتیسو مقاومت بیشتری نسبت به رقم نارنج دارد.

مطابقت دارد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سطح تظاهر ژن کیتیناز در رقم مقاوم در تمامی بازه‌های زمانی پس از آلودگی بیشتر از دورگ حساس است (شکل ۴). نتایج به‌دست‌آمده بیانگر این است که لایم کوآت، نارنج و اوکیتسو به دلیل فعال بودن مقاومت القایی SAR و ISR در آن‌ها، از توانایی بالایی در مقابله با بیمارگر برخوردار بوده لذا پس از دریافت اولین سیگنال مبنی بر حضور بیمارگر شروع به بیان ژن‌های مسیر مقاومتی از جمله کیتیناز می‌نمایند. با توجه به نحوه عملکرد کیتیناز به‌نظر می‌رسد که این آنزیم نیز مانند آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز پس از دریافت سیگنال حمله بیمارگر و انتقال آن به داخل سلول، پاسخ‌های دفاعی ثانویه و تولید فیتوالکسین‌ها را در گیاه القا نموده و در نهایت با ایجاد مرگ سلولی سبب آزادسازی آنزیم‌های کیتینازی واکوئلی می‌شود تا با تجزیه دیواره سلولی بیمارگر سبب انهدام آن شود (Sareena et al. 2006). نتایج تحقیقات گذشته نیز حاکی از نقش مؤثر این ژن در القای مقاومت علیه بیمارگرهای مختلف است (Kang and buchenauer 2000). میزان تاثیر بیان ژن کیتیناز نسبت به ژن بتا گلوکاناز در واشنگتن ناول مقابل بیماری شانکر مرکبات بیش‌تر است (Mansouri et al. 2009). در این بررسی نیز مشاهده شد که بیان ژن کیتیناز در تمامی بازه‌های زمانی تفاوت معناداری در دو رقم با مقاومت بیش‌تر در مقایسه با رقم حساس لایم کوآت دارد (شکل ۴).

فنیل آلانین آمونیالیز (PAL) فرایند دی آمینی شدن و تبدیل ال‌فنیل آلانین به ترانس-سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. این تبدیل، اولین مرحله مسیر فنیل پروپانویید است که پیش‌سازهای مواد فنولی، لیگنین و فیتوالکسین‌ها را فراهم می‌کند (Haung et al. 2010). این ژن در هنگام آلودگی به بیمارگرهای باکتریایی مانند شانکر مرکبات با تحریک الیستورهای مقاومتی مرکبات به کاهش بیماری کمک می‌نماید (Doroii et al. 2010; Ballster et al. 2009). در بررسی روند تغییرات این ژن در سه رقم مورد مطالعه در برابر باکتری *Pss*، در رقم لایم کوآت بیشینه بیان در ساعت ۲۴ مشاهده شد و سطح بیان ژن با افزایش زمان کاهش یافت اما در زمان ۷۲ مقداری افزایش بیان دیده شد که احتمالاً به دلیل عدم کارایی ژن‌های مقاومت و افزایش تحریک در بازه‌های زمانی بعدی و آلودگی ثانویه در این رقم است. در دو رقم نارنج



شکل ۴- بیان نسبی ژن کیتیناز در لایم کوآت، نارنج و اوکیتسو بعد از مایه‌زنی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* برگ‌ها با غلظت 1×10^6 cfu ml⁻¹ 106×7 باکتری مایه‌زنی شده‌اند. بیان نسبی ژن با استفاده از روش منحنی استاندارد محاسبه شد. آزمایش در سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. مقایسه میانگین بین ارقام با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام پذیرفت.



شکل ۵- بیان نسبی ژن PAL در لایم کوآت، نارنج و اوکیتسو بعد از مایه‌زنی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* برگ‌ها با غلظت 1×10^6 cfu ml⁻¹ ۷×۱۰۶ باکتری مایه‌زنی شده‌اند. بیان نسبی ژن با استفاده از روش منحنی استاندارد محاسبه شد. آزمایش در سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. مقایسه میانگین بین ارقام با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام پذیرفت.

بیان ژن *PR3* در رقم لایم کوآت با ۱۲ ساعت تأخیر نسبت به نارنج و اوکیتسو در ساعت ۴۸ به اوج می‌رسد که میزان بیشینه بیان این رقم کمتر از نارنج و اوکیتسو بود. در دورگ لایم کوآت میزان بیان در ۱۶۸ ساعت بعد از تزریق نیز افزایش ملایمی پیدا می‌کند که در اثر بروز علائم بلاست بر روی برگ لایم کوآت است (شکل ۴). این نتایج با نتایج (Sharifi-sirchi et al. 2011).

می‌یابد اما در لایم کوات میزان بیان در زمان بروز علائم بالاست افزایش کمی داشته که به دلیل تکثیر باکتری عامل بیماری و افزایش تحریک گیاه در بازه‌های بعدی در این گیاه می‌باشد (شکل ۳). اخیراً نشان داده شده که میزان بیان ژن *WRKY* در گونه نارنج سه برگ و پونسیروس در برابر عوامل بیماریگر *Phytophthora citrophthora* و ویروس تریستزای مرکبات افزایش معنی‌داری دارد (Shahin-cevik and Moore 2014). هم‌چنین در بررسی‌های انجام شده نیز نقش مثبت فاکتورهای رونویسی *WRKY* در مقاومت به بیماری‌های بالاست و بلایت باکتریایی برنج به اثبات رسیده است (Qiu et al. 2007, Vanverker et al. 2008; Hu et al. 2008). در نهایت می‌توان نتیجه گرفت سطح بیان ژن‌های مورد مطالعه به ترتیب در رقم اوکیتسو و نارنج بیش‌تر از دو رگ لایم کوات بوده و در بعضی از ژن‌ها بیان زودتری در گیاه اوکیتسو و نارنج نسبت به لایم کوات مشاهده شد. این نتایج می‌تواند حساس‌تر بودن دو رگ لایم کوات را در مقایسه با اوکیتسو و نارنج توجیه کند.

در پایان باید اشاره کرد که کلیه عوامل کنترل‌کننده بیماری‌های گیاهان، جنبه حفاظتی داشته و هیچ شیوه‌ای که بتوان با آن گیاهان آلوده و بیمار را به‌طور کامل درمان بخشید، وجود ندارد. به‌همین دلیل سال‌ها پس از معرفی روش‌های مختلف کنترل، محققین هنوز به دنبال روش‌های ایمن‌تر، مؤثرتر، آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر مدیریت بیماری‌های گیاهان هستند. در این راستا، بیماری‌شناسان گیاهی در سرتاسر دنیا ضمن ارائه سیستم‌های مدیریت مبارزه تلفیقی بیماری‌های گیاهان، هم‌نظر هستند که هدف نهایی این روش‌ها، مهار کامل بیماری نبوده و تنها کاهش اقتصادی خسارت ناشی از بیماری با حداقل خسارت به محیط‌زیست مدنظر است.

منابع

Ahangar L, Babaeizad V, Ranjbar GA, Najafi H, and Biabani A (2015) Expression profile of defense-related genes in susceptible and resistant wheat cultivars in response to powdery mildew infection Expression profile of defense-related genes in susceptible and resistant wheat cultivars in response to powdery mildew infection. New Genetics 10:33-46. (In Farsi).

Bagal UR, Leebens-Mack JH, Walter Lorenz W, Dean JFD (2012) The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene

و اوکیتسو نیز در ساعت ۲۴ بیش‌ترین میزان بیان این ژن دیده می‌شود. میزان بیان با سپری شدن زمان آلودگی کاهش می‌یابد. در هر سه رقم در زمان نشان دادن علائم بالاست روی مرکبات، به عبارت دیگر ۷ روز بعد از تزریق باکتری میزان بیان به مقدار کمی افزایش می‌یابد (شکل ۴). افزایش سطح بیان ژن در زمان بروز علائم می‌تواند به علت تحریک ثانویه گیاه توسط بیمارگر باشد. به‌طور کلی سطح بیان ژن *PAL* در گیاه اوکیتسو بیشتر از نارنج و لایم کوات است. بررسی روند تغییرات بیانگر این بود که گیاهان مقاوم با بیان بالای این ژن در تمامی بازه‌های زمانی تفاوت زیادی را نسبت به رقم حساس دارا بودند (شکل ۵) لذا چنین استنباط می‌شود که ارقام با مقاومت بالا به‌طور طبیعی از پتانسیل بالاتری برای بیان ژن *PAL* برخوردار می‌باشند به‌طوری که پس از مواجه با بیماری بیان بالا و سریع این ژن مقابله و تحمل بیماری را میسر می‌سازد. افزایش بیان معنی‌دار و زودهنگام این ژن در ارقام مقاوم برنج و گندم در مقایسه با ارقام حساس در برابر باکتری بالاست برنج و سفیدک گندم مشاهده شده است (Ahangar et al. 2015; Heydari et al. 2016). نتایج این تحقیق با نتایج (Boava et al. 2011) در گیاهان متفاوت هماهنگی دارد. پروتئین‌های *WRKY* نقش تنظیمی و فعال‌کنندگی ژن‌های دخیل در مقاومت در برابر تحریک بیمارگر را بر عهده دارند (Shahin-cevik 2012). در بررسی نرخ بیان ژن *WRKY40* در سه رقم و گونه مرکبات دیده شد که در نارنج و اوکیتسو اوج بیان در ساعت ۲۴ بعد از تزریق بوده است اما در دورگ حساس لایم کوات بیشینه بیان در بازه زمانی ۴۸ است. میزان بیان در رقم اوکیتسو ۲/۷۶ برابر نارنج و ۴/۲۱ برابر لایم کوات است. در نارنج و اوکیتسو با افزایش زمان، نرخ بیان شیب نزولی داشته و کاهش

family shows a gymnosperm-specific lineage. Bio Med Central Genomi 13:S3- S1.

Ballester AR, Izquierdo A, Lafuente MT, González-Candelas L (2010) Biochemical and molecular characterization of induced resistance against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. Postharvest Biology Technology 56:31-38.

Baker CJ and Orlandi EW (1995) Active oxygen in plant/pathogen interactions. Annual Review of Phytopathology 33:299-321.

- Baker CJ, Mock NM, Glazener JA and Orlandi, E.W (1993) Recognition responses in pathogen/non-host and race/cultivar interactions involving soybean (*Glycine max*) and *Pseudomonas syringae* pathovars. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43:81-94.
- Beigi F, Rahimian H, Mohamadi Goltape A, Shams bakhsh M, Barzegar A, Bosket A, Garcia valdes A, Lalokat J (1391) Phenotypic and Pathogenicity Phenotypic and Pathogenicity Characteristics of the Agents Causing Citrus Blast Disease in the Northern Provinces of Iran. *Iranian journal of Plant Protection* 43:211-222.
- Boava LP, Cristofani-Yaly M, Stuart RM. and Machado MA (2011) Expression of defense-related genes in response to mechanical wounding and *Phytophthora parasitica* infection in *Poncirus trifoliata* and *Citrus sunki*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76:119-125.
- Bowles DJ (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review Biochemistry* 59:873-907.
- Brisset M.N, Cesbron S, Thomson SV, Paulin JP (2000) Acibenzolar-Smethyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 106:529-536.
- Brogue K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Broglie R. (1991) transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254:1194-1197.
- Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B (2009) Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior* 4:493-496.
- Coling DBK, Kra M, Kragh K, Mikkelsen M J D and Vad K (1993) Plant chitinase. *The Plant Journal*. 80:389-413.
- Cota IE, Troncoso-Rojas R, Sotelo-Mundo R, Sacher-Estrada A and Tiznado- Hernandez ME (2007) Chitinase and β -1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Scientia Horticulturae* 112:42-50.
- Dellagi A, Heilbronn J, Avrova AO, Montesano M, Palva ET, Stewart HE, Toth IK, Cooke DEL, Lyon GD and Birch PRJ (2000) a potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1092-1101.
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defenses. *Annual Review of Phytopathology* 32:479-510.
- Droby S, Wisniewski M, Macarasin D, Wilson C (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology Technology* 52:137-145.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:140-151.
- Fritig B, Heitz T, Legrand M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* 10:16-22.
- Hernández I, Portieles R, Chacón O and Borrás-Hidalgo O (2005) Proteins and peptides for the control of phytopathogenic fungi. *Biotechnologia Aplicada* 22:256-260.
- Hu J, Barlet X, Deslandes L, Hirsch J, Feng DX, Somssich I, Marco Y (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One*: 3:1-10.
- Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou Y H, Yu J Q and Chen Z (2010) Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology* 153:1526-1538.
- Heydary nejad AM, Babaeizad V, and Rahim H (2016) Studying *PR2* and *PAL* genes involvement in rice resistance against *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. *Journal of Agricultural Biotechnology* 7: 67-82. (In Farsi).
- Jwa N S, Agrawal GK, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H and Rakwal R (2006) Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry* 44:261-273.
- Kang Z and Buchenauer H (2000) Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiology Molecular Plant Pathology* 57:255-268.
- Kang TS, and Wang L (2010) Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: phenylalanine ammonia lyase for phenylketonuria. *Molecular and Genetic Metabolism* 99:4-9.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 to the (Delta Delta Ct) method. *Methods* 25:402-408.
- Mansouri M, Hosseini pour A, Sharifi-sirchi Gh R, Massumi H (2009) Changes in chitinase and β -1,3-glucanase transcript levels in sweet orange (*Citrus sinensis*) in response to treatment with *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. *Journal Agriculture Biotechnology* 2:39-52. (In Farsi).
- Mohammadi M, Kazemi H (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science* 162:491-498.
- Qiu D, Xiao J, Ding X, Xiong M, Cai M, Cao Y, Li X, Xu C, Wang S (2007) OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:492-499.
- Qiu D, Xiao J, Xie W, Liu H, Li X, Xiong L, Wang S (2008a) Rice gene network inferred from expression profiling of plants overexpressing OsWRKY13, a positive regulator of disease resistance. *Molecular Plant* 1:538-551.
- Ritter H, Schulz GE (2004) Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell* 16:3426-3436.

- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819.
- Sareena S, Poovannan K, Kumar KK, Raja JAJ, Samiyappan R, Sudhakar D, Balasubramanian P (2006) Biochemical responses in transgenic rice plants expressing a defence gene deployed against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani* *Current Science* 91:1529-1532.
- Shahin-Cevik M. and Moore GA (2012) Isolation and expression analysis of a drought and cold stress inducible WRKY gene in the cold-hardy citrus relative *Poncirus trifoliata*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 1-12.
- Shahin-Cevik M (2012) A WRKY transcription factor gene isolated from *Poncirus trifoliata* show differential responses to cold and drought stresses. *Plant Omics Journal* 5:438-445.
- Sharifi-Sirchi B, Hosseinipour A, Mansouri M (2011) Priming against Asiatic citrus canker and monitoring of PR genes expression during resistance induction. *African Journal of Biotechnology* 10:19-20.
- Sood S, Comstock J C and Raid R N (2013) evaluation of sugarcane clones in the cp-cultivar program for resistance to *puccinia kuhenii*, the pathogen of orange rust. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technology* 28:1335-1340.
- Sticher L, Mauch-Mani B, and Me´traux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35:235-270.
- Stotz HU, Thomson J and Wang Y (2009) Plant defensins: defense, development and application. *Plant signaling and behavior* 4:1010-1012.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R (1998) Separate jasmonate dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95:15107-11.
- Triant D, Whitehead A (2008) Simultaneous extraction of high quality RNA and DNA from small tissue samples. *Journal of Heredity* 100:246-250.
- Van Loon L, Rep M. and Pieterse C (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44:135-162.
- Van Verk MC, Neeleman L, Bol JF and Linthorst HJ (2011) Tobacco transcription factor NtWRKY12 interacts with TGA2. 2 in vitro and in vivo. *Frontiers in plant science* 2:1-10.
- Vidhyasekaran P (2002) Bacterial disease resistance in plants: molecular biology and biotechnological applications: Routledge. 322p.
- Way HM, Kazan K, Mitter N, Goulter KC, Birch RG, Manners JM (2002) Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth. *Physiological and Molecular plant pathology* 60:275-282.
- Yamaguchi T, Nakayama K, Hayashi T, Tanaka Y, Koike S (2002) Molecular cloning and characterization of a novel β -1,3-glucanase gene from rice. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 66:1403-1406.
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.
- Zhang Y and Wang L (2005) The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolutionary Biology* 5:1-3.
- Zheng Z, Mosher SL, Fan B, Klessig DF, Chen Z (2007) Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biology* 7:2-14.
- Zheng Z, Qamar SA, Chen Z and Mengiste T (2006) *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal* 48:592-605.
- Zheng X Y, Spivey N W, Zeng W, Liu P P, Fu Z Q, Klessig D F (2010) Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host and Microbe* 11:587-96.
- Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA, Lamb CJ (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Nature Biotechnology* 12: 807-812.
- Zhu Q, Dabi T, Beeche A, Yamamoto R, Lawton MA, and Lamb C (1995) Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Journal of Plant Molecular Biology* 29:535-550.