ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶
صفحه ۴۲۰ - ۴۱۱

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- به‌ترتیب 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 M[1], Babaeizad V[*1], Rahimian H[1], Beigi F[2]

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 به‌شمار می‌روند. بیماری بلاست مرکبات ازجمله 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 می‌دهند. 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، فنیل آلانین آمونیالیاز 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 روشReal 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 اوکینسو، نارنج و دو رگ لایم کوآت کاهش می‌یابد و نتایج با مشاهدات باغی مطابقت دارد.

واژه‌های کلیدی

بتا ۱ و ۳ گلوکاناز
بلاست مرکبات
بیان ژن
کیتیناز

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.9.3]

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 سرخشکیدگی 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 proteines; PRs) دسته‌ای 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 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 species (ROS)، 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 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 الیسیتور 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 پیداکرده‌اند (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 موردمطالعه 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 لیزوزیمی 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.9.3]

مقاومت به بیمارگرهای قارچی و باکتریایی شود. در روش مستقیم کیتینازهای واکوئلی، کیتین موجود در هیف‌های در حال رشد و یا پپتیدوگلیکان را تجزیه می‌کنند، درحالی‌که در روش غیرمستقیم کیتینازهای آپوپلاست سبب آزاد کردن الیگومرهای کیتین می‌شود که می‌تواند به‌عنوان 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 *Xanthamonas campestris* pv. *vesicatoria* شده‌است (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).

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 شانکر 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 آمونیالیاز (*PAL*) یکی از اولین ژن‌های تدافعی گیاهان تشخیص داده شده که به‌وسیله تنش‌های محیطی و عوامل بیماری‌زا تحریک می‌شود (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). درنتیجه فعالیت آنزیم *PAL*، دو مسیر بیوسنتزی فعال می‌شود که یکی از این مسیرها مربوط به سالیسیلیک‌اسید است. این آنزیم در مراحل اولیه مسیر فنیل پروپانوئید 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 تولیدشده به‌وسیله 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 پروموتر 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 مشاهده‌شده است (Dellaji et al. 2000). بیان ژن *WRKY12* در برنج در اثر باکتری *Xanthamonas orysae* pv *orysae* موجب افزایش بیان *NPR1*، Pr_{1b}، فنیل آلانین آمونیالیاز (*PAL*) و پراکسیداز (*POX*) می‌شود (Zheng et al. 2007). ژن *WRKY* در 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 آمونیالیاز 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.9.3]

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 reticulate* 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 ٦٥ درصد نگهداری شدند. از کشت ۲-۱ روزه باکتری *Pss* در محیط کشت NAS سوسپانسیونی با غلظت ۷×۱۰^{٦} سلول (Colony-Forming Unit; *CFU*) در هر میلی‌لیتر جهت آزمون بیماری‌زایی تهیه شد. غلظت‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول‌موج ٦۰۰ 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 ٢٤ ساعت قبل و بعد از مایه‌زنی گیاهان، با استفاده از کیسه‌های پلاستیکی شفاف پوشیده شدند. نمونه‌برداری در بازه‌های متفاوت انجام و در فریزر $۷۰^{o}C$- 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 µg/mL) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از شستشو با آب‌مقطر با UV دستگاه ژل خوان کداک از آن عکس‌برداری شد. در روش دوم درجه خلوص و غلظت نمونه‌ها در طول موج ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد.

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 $-۲۰^{\circ}C$ نگهداری و تکثیر قطعات cDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و جفت آغازگر TEF انجام شد.

بیان ژن‌ها به‌وسیله qRT-PCR، با استفاده از کیت CYBR Green و آغازگرهای مربوطه در دستگاه M*3000P (BioRad) thermal cycler انجام شد. حدود دو میکرولیتر از cDNA رقیق‌شده (50ngr) از هر نمونه به‌عنوان الگو در واکنش‌ها استفاده شد و به ترکیب: ۱µL از هر آغازگر، ۷/۵µL سایبرگرین، ۸/۵µL آب (حجم نهایی ۲۰µl) افزوده شد. برنامه دمایی جهت تکثیر شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ٤ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و ٤۰ سیکل تکثیری با برنامه واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ٦۰ درجه سلسیوس، تکثیر به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ٦۰ 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 $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen 2001)

نتایج

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

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.9.3]

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

میزان بیان ژن گلوکاناز در اوکیتسو و نارنج در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی به میزان بیشینه خود رسید که سطح آن به‌ترتیب 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 افزایش‌یافته 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 اوکیتسو ۱۲ ساعت زودتر به مقدار بیشینه خود رسید ولی سطح بیان ژن *PR3* در ساعت اوج خود در اوکیتسو بیش‌تر از نارنج بود. به‌طوری‌که این نرخ در رقم اوکیتسو 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 اوکیتسو نسبت به دو رقم حساس به بیماری بیش‌تر بود (شکل ٤).

در رقم اوکیتسو 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 آمونیالیاز در نارنج و لایم کوات نیز در ۲۴ بعد از آلودگی به بیشینه خود رسید که میزان این بیشینه بیان در رقم نارنج ۱٤/۲٤ و در رقم لایم کوات ۹/۲۰ برابر زمان صفر بود. گونه نارنج و دو رگ لایم کوآت در بازه‌های زمانی ۷۲ و ۱٦۸ ساعت اختلاف معناداری در سطح پنج درصد نداشتند اما در سایر بازه‌های زمانی اختلاف معنادار بین سه رقم مشاهده شد (شکل۵).

سطح بیان فاکتور رونویسی *WRKY40* در اوکیتسو و نارنج در ۲٤ ساعت بعد از آلودگی بیش‌ترین مقدار خود رسید درحالی‌که در دورگ لایم کوات با ۱۲ ساعت تأخیر در زمان ٤۸ به اوج رسید. میزان بیان این فاکتور رونویسی در بازه‌های زمانی ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۱٦۸ ساعت بعد از آلودگی در رقم اوکیتسو به‌ترتیب ۳۳/۷٦، ۲٤/۵۹، ۱٤/۰۳، 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 (شکل۲).

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 ازجمله پروتئین‌های درگیر در مقاومت بوده که در اثر حمله بیمارگر و یا مواد مرتبط با بیمارگر همچون الیسیتورها و تیمار گیاهان با هورمون‌های گیاهی مانند سالسیلیک 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 ('3→'5)	accession number
elongation factor 1-alpha	F: GGTCAGACTCGTGAGCATGC R:CATCGTACCTAGCCTTTGAGTACTTG	AY498567
PR2	F: GACGTCGTCGTATCTCATGG R: GAGTTGGGCGTCAAAAAGG	AJ000081
PR3	F: ACAGAATTGTGGAAGCGG R: AGCAAGTCTTCAAACATCTCC	AF090336
PAL	F: CACAAATTGAAGCACCATCC R: TTCTCAGGGCATAACGATCC	AY681119
WRKY40	F: TGGTCAATGGATTCAACGTG R: TTCCTCCACCAAAATTCCAG	AY681120

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.9.3]

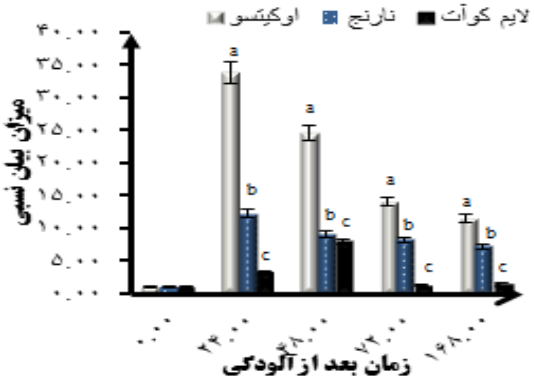
ازجمله این پروتئین‌ها گلوکاناز است که نقش ضد باکتریایی و ضد قارچی داشته و در ارتباط با مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌باشد (Sticher et al. 1997; Ryals et al. 1996). میزان بیان ژن *PR2* در هر سه گونه و رقم مرکبات در ساعت ٢٤ به اوج خود رسید که نشان‌دهنده این است که در ارقام حساس و مقاوم زمان اوج بیان یکسان بوده اما سطح اوج بیان این ژن در اوکیتسو افزایش ١٠/٥١ برابری نسبت به صفر داشته است درحالی که در گونه نارنج با حساسیت متوسط ٥/٣٩ برابر و در دورگ حساس لایم کوات ٤/٣٥ برابر زمان صفر است. میزان بیان در اوکیتسو و نارنج بعد از زمان اوج به‌تدریج تا ٧٢ ساعت بعد از آلودگی کاهش یافت اما پس از گذشت ١٦٨ساعت از تزریق مقداری افزایش بیان مشاهده شد، افزایش مجدد آن به‌علت افزایش تحریک گیاه در زمان بروز علائم بلاست است؛ اما در رقم لایم کوات در ٧٢ ساعت بعد از آلودگی افزایش بیان دیده شد که می‌تواند به علت کنترل ضعیف باکتری و افزایش تحریک گیاه به‌دلیل افزایش تعداد سلول باکتری در این دورگ (لایم کوآت) و بالا رفتن فعالیت باکتری در این ساعت باشد. بالاتر بودن سطح بیان ژن *PR2* به‌ترتیب در اوکیتسو و نارنج نشان‌دهنده مقاومت بالاتر این ارقام می‌باشد (شکل ٣).

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).

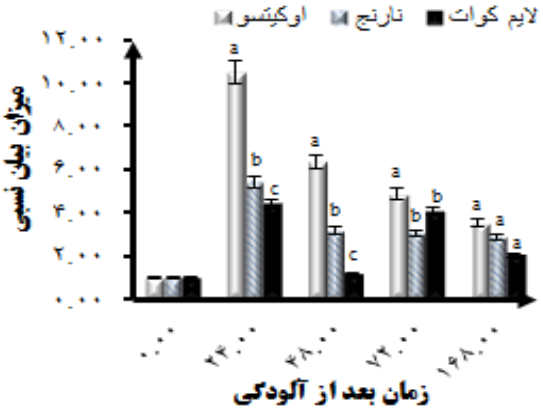
پروتئین PR3 در میان پروتئین‌های PR جایگاه ویژه‌ای دارد. این پروتئین یک هموپلیمر خطی از واحدهای N- استیل- دی گلوکز آمین است که با پیوندهای بتا ١ و ٤ به هم متصل هستند (Jwa et al. 2006). سطح بیان ژن *PR3* در بررسی حاضر در اوکیتسو و نارنج در ٢٤ ساعت به اوج خود رسید که در اوکیتسو سطح بیان بیشتر از نارنج بوده و تأییدکننده این موضوع است که رقم اوکیتسو مقاومت بیشتری نسبت به رقم نارنج دارد.



شکل ١- میزان گسترش بیماری در رقم اکیتسو، گونه نارنج و دورگ لایم کوآت

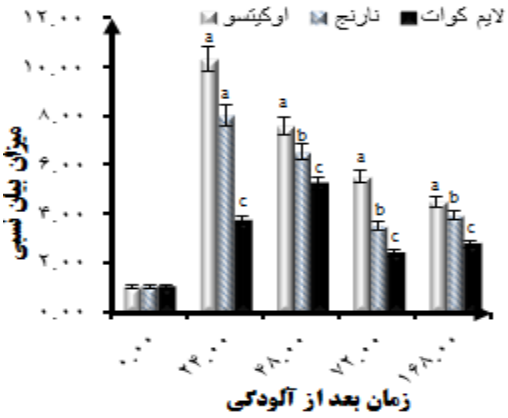


شکل ٢- بیان نسبی ژن *WRKY 40* در لایم کوات، نارنج و اکیتسو بعد از مایه‌زنی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. برگ‌ها با غلظت 7×10^{6} cfu ml^{-1} باکتری مایه‌زنی شده‌اند. بیان نسبی ژن با استفاده از روش منحنی استاندارد محاسبه شد. آزمایش در سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. مقایسه میانگین بین ارقام با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام پذیرفت.

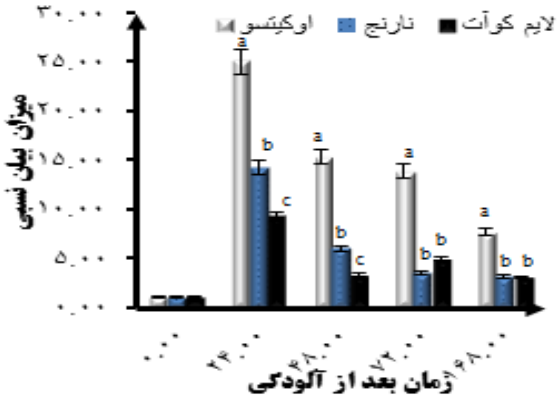


شکل ٣- بیان نسبی ژن بتا ١ و٣ گلوکاناز در لایم کوات، نارنج و اکیتسو بعد از مایه‌زنی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. برگ‌ها با غلظت 7×10^{6} cfu ml^{-1} باکتری مایه‌زنی شده‌اند. بیان نسبی ژن با استفاده از روش منحنی استاندارد محاسبه شد. آزمایش در سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. مقایسه میانگین بین ارقام با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام پذیرفت.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.9.3]



شکل٤- بیان نسبی ژن کیتیناز در لایم کوات، نارنج و اکیتسو بعد از مایه‌زنی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. برگ‌ها با غلظت cfu ml-1 7×106 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 ٥- بیان نسبی ژن PAL در لایم کوات، نارنج و اکیتسو بعد از مایه‌زنی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. برگ‌ها با غلظت $cfu\ ml^{-1}$ ۷×۱۰^{٦} باکتری مایه‌زنی شده‌اند. بیان نسبی ژن با استفاده از روش منحنی استاندارد محاسبه شد. آزمایش در سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. 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 کوات با ۱۲ ساعت تأخیر نسبت به نارنج و اوکیتسو در ساعت ٤٨ به اوج می‌رسد که میزان بیشینه بیان این رقم کمتر از نارنج و اوکیتسو بود. در دورگ لایم کوات میزان بیان در ١٦٨ ساعت بعد از تزریق نیز افزایش ملایمی پیدا می‌کند که در اثر بروز علائم بلاست بر روی برگ لایم کوآت است (شکل٤). این نتایج با نتایج Sharifi-sirchi et al. (2011) 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 (شکل٤). 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 ازجمله کیتیناز می‌نمایند. با توجه به نحوه عملکرد کیتیناز به‌نظر می‌رسد که این آنزیم نیز مانند آنزیم بتا ۱ و۳ گلوکاناز پس از دریافت سیگنال حمله بیمارگر و انتقال آن به داخل سلول، پاسخ‌های دفاعی ثانویه و تولید فیتوآلکسین‌ها را در گیاه القا نموده و درنهایت با ایجاد مرگ سلولی سبب آزادسازی آنزیم‌های کیتیناز 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 بیشتراست (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 کوات دارد (شکل ٤).

فنیل آلانین آمونیالیاز (*PAL*) فرایند دی آمینی شدن و تبدیل الفنیل آلانین به ترانس– سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. این تبدیل، اولین مرحله مسیر فنیل پروپانوئید است که پیش سازهای مواد فنولی، لیگنین و فیتوآلکسین‌ها را فراهم می‌کند (Haung et al. 2010). این ژن در هنگام آلودگی به بیمارگرهای باکتریایی مانند شانکر مرکبات با تحریک الیسیتورهای مقاومتی مرکبات به کاهش بیماری کمک می‌نماید (Ballster et al. 2010; Doroii et al. 2009). در بررسی روند تغییرات این ژن در سه رقم مورد مطالعه در برابر باکتری *Pss*، در رقم لایم کوات بیشینه بیان در ساعت ٢٤ مشاهده شد و سطح بیان ژن با افزایش زمان کاهش یافت اما در زمان ٧٢ 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.9.3]

و اوکیتسو نیز در ساعت ۲٤ 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 بلاست روی مرکبات، به‌عبارت دیگر ۷ روز بعد از تزریق باکتری میزان بیان به مقدار کمی افزایش می‌یابد (شکل٤). افزایش سطح بیان ژن در زمان بروز علائم می‌تواند به‌علت تحریک ثانویه گیاه توسط بیمارگر باشد. به‌طورکلی 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 بلاست برنج و سفیدک گندم مشاهده شده‌است (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 ۲٤ بعد از تزریق بوده است اما در دورگ حساس لایم کوات بیشینه بیان در بازه زمانی ٤۸ است. میزان بیان در رقم اوکیتسو ۲/۷٦ برابر نارنج و ٤/۲۱ برابر لایم کوات است. در نارنج و اوکیتسو با افزایش زمان، نرخ بیان شیب نزولی داشته و کاهش می‌یابد اما در لایم کوات میزان بیان در زمان بروز علائم بلاست افزایش کمی داشته که به‌دلیل تکثیر باکتری عامل بیماری و افزایش تحریک گیاه در بازه‌های بعدی در این گیاه می‌باشد (شکل۳). اخیرا نشان داده شده که میزان بیان ژن *WRKY* در گونه نارنج سه برگ و پونسیروس در برابر عوامل بیمارگر *Phytophtora 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 بلاست و بلایت باکتریایی برنج به اثبات رسیده است (Qiu et al. 2007, 2008; Hu et al. 2008; Vanverk et al. 2011). 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 اکیتسو 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 به‌دنبال روش‌های ایمن‌تر، مؤثرتر، آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر مدیریت بیماری‌های گیاهان هستند. در این راستا، بیماری شناسان 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 wheatcultivars 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.(InFarsi).

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.

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.9.3]

Baker CJ, Mock NM, Glazener JA and Orlandi, E.W (1993) Recognition responses in pathogen/non-host and race/cultivar interac-tions 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 Pathogenecity Phenotypic and Pathogenecity 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 Biochemestry 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, Sachez-Estrada A and Tiznado- Hernantez ME (2007) Chitinase and b-1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by Alternaria alternate 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-liketranscription factor is induced in interactions withErwinia carotovora subsp atroseptica andPhytophthorainfestans and is coregulated with class I endochitinase expression. Molcular Plant-Microbe Interactions 13:1092-1101.

Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defenses. Annual Review of Phytopatholgy 32:479-510.

Droby S, Wisniewski M, Macarisin D, Wilson C (2009) Twenty years of posthar-vest 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. Biotecnologia 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) Utrastructural 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 amm onia 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 Xant homonas 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 defenserelated 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.9.3]

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 expressionanalysis 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 geneisolated 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) evalution of sugercane clones in the cp-cultivar program for resistance to *puccina 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 jasmonatedependent 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 ofArabidopsisWRKY25 transcription factor in plant defens against Pseudomonas syringae. BMC Plant Biology 7:2-14.

Zheng Z, Qamar SA, Chen Z and Mengiste T (2006) ArabidopsisWRKY33 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 Molcular Biology 29:535-550.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.9.3]