بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۹ / شماره ۳/ سال ۱۴۰۲: ۲۱۶-۲۰۲ DOI: 10.22034/ijpp.2024.2021791.446

CC BY

مقاله پژوهشی

بررسی الگوی بیانی ژن‌های PR1، FLS2 و RAR1 در لیموترش در پاسخ به بیمارگر شانکر باکتریایی مرکبات (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)

حسین میرزایی نجفقلی[1*]، میترا خادمی[2]، فاطمه دریکوند[3] و ندا روحانی[4]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۳ ، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۷)

چکیده

شانکر باکتریایی مرکبات، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های مرکبات است که توسط باکتری *XCC* ایجاد می‌شود. پس از هجوم بیمارگر به گیاه، تغییر در میزان هورمون‌های کلیدی و القایی ژن‌های مقاومت جز مهم‌ترین واکنش‌های دفاعی گیاهی است. در مطالعه حاضر ابتدا به بررسی اثر ضدباکتریایی ترکیب‌های لینالول و سیترال علیه بیمارگر *Xcc* پرداخته شد. سپس ارزیابی بیان ژن‌های *FLS2*، *RAR1* و *PR1* نهال لیموترش تحت تیمارهای سیترال، لینالول، سیترال+باکتری (استرین *Xcc*-KV*XCC1*) و لینالول+باکتری(استرین *Xcc*-KV*XCC1*) در بازه زمانی صفر، یک و چهار روز بعد مایه‌زنی با باکتری *Xcc* با استفاده از تکنیک Real Time PCR بررسی شد. بررسی اثرضدباکتریایی ترکیب‌های لینالول و سیترال نشان داد که هر دو ترکیب دارای اثرات بازدارندگی معنی‌داری ($P\leq$ ۰/۰۱) در جلوگیری از رشد بیمارگر *Xcc* بودند. همچنین نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی تیمارهای مختلف نشان داد که ترکیب سیترال با غلظت ۳۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قدرت مهارکنندگی خوبی نسبت به سایر ترکیبات علیه بیمارگر مورد نظر داشت. بررسی بیان ژن‌های *RAR1*،*FLS2* و *PR1* در اثر تیمارهای سیترال، لینالول، سیترال+باکتری و لینالول+باکتری نشان داد که بیشترین بیان ژن‌های مورد نظر در بازه‌های زمانی یک روز بعد از مایه‌زنی بود در حالیکه بیان ژن‌ها در بازده زمانی چهار روز بعد از مایه‌زنی تفاوت داشت. نتایج این پژوهش نشان داد که اثر تیمار لینالول+باکتری باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی و القایی مقاومت به بیماری در نهال‌های لیموترش می‌شود که در نتیجه آن، می‌تواند خسارت بیماری‌زای شانکر باکتریایی مرکبات را تا حدود زیادی کاهش دهد.

کلید واژه: ژن‌های مقاومت، بیماری شانکر باکتریایی، سیترال، لیموترش، لینالول

**مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mirzaei.h@lu.ac.ir
۱ استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۲ استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۳ فارغ التحصیل گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۴ فارغ التحصیل گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

Iran. J. Plant Path., Vol. 59, No .3, 2023: 202-216

CC BY

DOI: 10.22034/ijpp.2024.2021791.446

Research Article

Investigating the expression pattern of PR1, FLS2, and RAR1 genes in lime in response to the citrus bacterial canker pathogen *(Xanthomonas citri* subsp. *citri)*

H. Mirzaei Najafgholi[*1], M. Khademi [2], F. Derikvand [3] and N. Rouhani [4]

(Received: 13.03.2024; Accepted: 28.08.2024)

Abstract

Citrus canker is one of the most destructive citrus diseases caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) Following the pathogen's attack on the plant, plant hormones and the induction of resistance genes play crucial roles in plant defense. This study explored the antibacterial effects of linalool and citral components against *Xcc* bacteria. Subsequently, we examined the expression patterns of the *FLS*2, *RAR1*, and *PR1* genes in *C. aurantifolia* seedlings under different treatments, including citral, linalool, citral+*Xcc* bacteria (strain KV*XCC*1), and linalool+*Xcc* bacteria (strain KV*XCC1*), at 0-, 1-, and 4-days post-inoculation with *Xcc* bacteria using real-time PCR. The antimicrobial activity of linalool and citral essential oils revealed significant inhibitory effects on *Xcc* bacterial growth ($P < 0.01$). The minimum inhibitory concentration results showed that citral essential oil, with a concentration of 0.37 µg/ml, exhibited relatively high inhibitory power on this pathogen. Gene expression results indicated that the expression of *FLS*2, *RAR1*, and *PR1* genes increased in response to citral, linalool, bacterial citral, and bacterial linalool treatments within one day after inoculation. However, the expression levels of these genes differed four days after inoculation. The findings of this study demonstrated that the linalool+bacteria treatment effectively enhanced the expression of defense genes and induced disease resistance in *C. aurantifolia* seedlings, thereby significantly reducing the pathogenic damage caused by citrus canker**.**

Keywords: Resistance genes, Citrus canker disease, Citral, *Citrus aurantifolia*, Linalool

**Corresponding author's E-mail address: mirzaei.h@lu.ac.ir
1 Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabbad, Iran
2 Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3 Ph.D. candidate, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Lorestan university, Khorram Abad, Iran
4 Ph.D. candidate, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Lorestan university, Khorram Abad, Iran

مقدمه

بیماری شانکر باکتریایی مرکبات یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان مرکبات است که توسط *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) ایجاد می‌شود (Schaad *et al*., 2006). این باکتری دامنه میزبانی وسیعی در گونه‌های گیاهی روتاسه (Rutaceae) دارد که در بین آن‌ها برخی از ارقام مهم تجاری نظیر پرتقال (*Citrus sinensis*) و لیمو ترش (*Citrus aurantifolia*) خسارت شدیدی می‌بینند (Gttwald *et al*., 2000). علائم اولیه بیماری روی برگ‌ها به صورت زخم‌های کوچک تاول مانند و برجسته در حدود ۹ روز بعد از آلودگی ظاهر می‌شود. زخم‌ها با افزایش سن، ابتدا برنزه روشن و سپس قهوه‌ای می‌شوند که غالباً با یک هاله زرد رنگ احاطه شده و با پیشرفت بیماری ریزش برگ‌ها، بدشکلی و ریزش پیش از موقع میوه‌ها وخشکیدگی سر شاخه‌ها رخ می‌دهد (Chen *et al*., 2012; Leduc *et al*., 2015). در ایران بیماری شانکر مرکبات اولین بار توسط علیزاده و رحیمیان در منطقه کهنوج استان کرمان بر روی لیموی مکزیکی گزارش شد (Rahimian, 1990 Alizadeh and).

سویه‌های مولد شانکر مرکبات دارای پاتوتیپ‌های مختلفی (A، A* و A^w) است که روی گونه‌های مرکبات بیماری‌زا هستند. این پاتوتیپ‌ها بر اساس دامنه میزبانی، انتشار جغرافیایی و برخی از صفات ژنتیکی از یکدیگر تفکیک می‌شوند (Sun *et al*., 2004). سویه‌های پاتوتیپ A انتشار جهانی داشته و به خاطر قدرت تهاجم زیاد و دامنه میزبانی وسیع بیشترین توجه را به خود اختصاص داده‌اند. به منظور کنترل بیماری از روش‌های مختلفی مانند ریشه‌کنی درختان و نهال‌های آلوده، اقدامات قرنطینه‌ای، ایجاد بادشکن در اطراف و بین ردیف‌های باغ، کاشت گونه‌ها و کولتیوارهای مقاوم، استفاده از باکتری‌کش‌های مسی استفاده شده است (Ali *et al*., 2014; Mustafa *et al*., 2015). اگرچه سموم شیمیایی معمولا برای کنترل بیمارگرها استفاده می‌شود، اما به دلیل تاثیر منفی سموم شیمیایی بر سلامت انسان، محیط زیست و مقاومت تدریجی بیمارگرها، یافتن مواد جایگزین ضروری است (Bajpai *et al*., 2007). در نتیجه پیدا کردن یک راهکار پایدار و مناسب به روش‌های طبیعی و ارگانیک که بتواند ضمن جلوگیری از رشد بیمارگر بر روی سطوح گیاه، باعث القاء مکانیسم‌های دفاعی گیاه شود ضروری به نظر می‌رسد. اسانس‌ها و ترکیبات آلی فرار گیاهی با قابلیت مهار رشد بیمارگرهای مختلف می‌توانند جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی باشند. امروزه خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی و آفت‌کشی بسیاری از این اسانس‌های روغنی تایید شده است (Burt, 2004). ترکیبات فنولی موجود در اسانس‌های روغنی مهمترین ترکیبات با خاصیت ضدمیکروبی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به تیمول، منتول، اوژنول، کارواکرول، لینالول و سیترال اشاره نمود (Mansouri *et al*., 2010; Silva *et al*., 2011; Shimada *et al*., 2017). لینالول و سیترال یک الکل ترپنی با خاصیت ضدباکتریایی وسیع الطیف می‌باشد. با توجه به نقش لینالول و سیترال درون‌زاد در کنترل تنش‌ها، احتمال می‌رود که کاربرد خارجی آن نیز بتواند به عنوان یکی از روش‌های کاهش دهنده اثرات تنش و القاء کننده مکانیسم‌های دفاعی گیاهان مفید باشد.

از مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در مقابل عوامل بیماری‌زا تولید و تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زا است. پروتئین‌های مرتبط با بیمارگر (Pathogenesis related protein: PRs) گروهی متنوعی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در اثر حمله بیمارگرها بیان می‌شوند. بیان چنین پروتئین‌هایی در میزبان، به صورت اختصاصی، موضعی و سیستمیک باعث تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان می‌شوند (Van *et al*., 2006; Vlot *et al*., 2009).

پروتئین‌های PR1 بیشترین فراوانی را در میان

سایر پروتئین‌های خانواده PR به خود اختصاص داده‌اند و سبب القا تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive oxygen species) و ریزش دیواره سلولی در ناحیه آلوده در حمله بیمارگرهای باکتریایی و قارچی می‌شوند (Tao *et al*., 2003). از بیان ژن یا پروتئین *PR1* به عنوان یک مارکر مولکولی برای نشان دادند واکنش القایی سیستمیک استفاده می‌شود. همه ژن‌های *PR*1 توسط سالیسیلیک اسید القا می‌شوند (Van *et al*., 2006). افزایش بیان این ژن در گیاهان تنباکو سبب ایجاد مقاومت علیه بیمارگرهای *Phytophthora nicotianae*، *Ralstonia solanacearum* و *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* شده است (Sarowar *et al*., 2005). علاوه بر ژن‌های *PR*، ژن‌های مختلفی در برابر هجوم بیمارگرها در گیاه میزبان تولید می‌شوند از جمله مهمترین این ژن‌ها، می‌تواند به ژن‌های Flagellin sensing2 (*FLS*2) و *RAR1* اشاره نمود.

گیاهان دارای سیستم‌های دفاعی دیگری موسوم به سیستم‌های ایمنی ذاتی (Innate immunity) که به صورت PTI (PAMP-Triggered Immunity-PTI) و ETI (Effector-Triggered Immunity) است که از گسترش بیمارگرها جلوگیری می‌کنند (Zheng *et al*., 2020). در یکی از این سازو کارها که به PTI معروف است، شناسایی بیمارگرها توسط گیرنده‌های خاصی صورت می‌گیرد که در غشای پلاسمایی سلول‌های گیاهی قرار دارند (Chen *et al*., 2020). این گیرنده‌ها مولکول‌های ویژه‌ای از میکروب‌ها را شناسایی کرده و پیام‌های داخلی سلولی را تولید و واکنش‌های دفاعی را شروع می‌کنند. ژن (*FLS*2) Flagelli sensing2 کدکننده گیرنده کینازی غشایی برای تشخیص پروتئین فلاژلین تاژک باکتری‌ها می‌باشد که به عنوان یک سیگنال برای تشخیص حضور باکتری، تولید کالوز و فعال کردن پاسخ‌های دفاعی عمل می‌کند (Pitino *et al*., 2015). گیرنده‌های غشایی مرتبط با پروتئین‌های مقاومت گیاهی شباهت ساختاری و عملکردی دارد. همچنین، ژن *FLS*2 یک دمین تکراری غنی از لوسین و یک دمین کینازی ترئونین-سرین سیتوپلاسمی را کد می‌کند. این ویژگی در تولید ژن‌های مقاومت درگیر در تشخیص الیسیتور سویه‌های خاص، به عنوان یک ساز و کار اصلی مقاومت در گیاه نقش دارد (Gómez-Gómez and Boller, 2000). ایمنی ناشی از افکتور (ETI) به‌صورت عمومی منجر به پاسخ فوق‌حساسیت و مرگ سلولی بافت اطراف محل آلودگی می‌شود و بنابراین بیمارگر را به محل آلودگی محدود می‌کند (Chen *et al*., 2020). اکثر پروتئین‌های رمزشده توسط ژن‌های مقاومت *RAR*1 دارای دمین غنی از هیستیدین و سیستئین هستند که در فعال کردن ژن‌های دخیل در مقاومت و مسیر سیگنالی سلول نقش دارد. این پروتئین در مقاومت پایه‌ای و غیرمیزبانی به عنوان الگو مولکولی مرتبط با بیمارگرها و از اجزای مهم سیگنال‌دهی پاسخ‌های ایمنی ذاتی گیاهان با واسطه ژن‌های مقاومت (R) هستند. افزایش بیان این ژن باعث کاهش شدت بیماری‌زایی بیمارگر شانکر در کامکوات ناگامی (*Nagami kumquat*) شد (Shi *et al*., 2015; Azevedo *et al*., 2002).

هدف اصلی این مطالعه بررسی الگوی بیان ژن‌های *FLS*2، *RAR1* و *PR*1 در اثر کاربرد خارجی لینالول و سیترال به عنوان یک الیستور طبیعی علیه بیمارگر شانکر باکتریایی در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با استفاده از روش Real time PCR (qPCR) در نهال‌های لیموترش است.

مواد و روش‌ها

بررسی اثر ضدباکتری ترکیبات لینالول وسیترال

جدایه‌ی *Xcc*-KVXCC1 که در مطالعات قبلی تیم تحقیقاتی حاضر با استفاده از آزمون‌های شیمیایی و مولکولی تایید شد برای انجام بررسی اثر خاصیت

ضدمیکروبی ترکیبات لینالول (CAS. NO=9778706) و سیترال (خریداری شده از شرکت سیگما الدریچ (CAS. NO= FG5392405 علیه این بیمارگر استفاده شد (Mirzaei *et al*., 2017).

ابتدا سوسپانسیونی با غلظت 10^8 CFU/ml از کشت ۲۴ ساعته باکتری تهیه شد. سپس از سوسپانسیون تهیه شده، میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی تشتک پتری حاوی NA (Nutrient Agar) به صورت چمنی کشت شد و مقدار ۱۰ میکروگرم از ترکیبات روی دیسک‌های کاغذی استاندارد شش میلی‌متری قرار داده شد. بعد از جذب ترکیبات توسط دیسک‌های کاغذی، دیسک‌ها روی محیط‌کشت قرار داده شدند و تشتک‌های پتری داخل انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (Burt et al., 2004). از دیسک آغشته به آب مقطر سترون و دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک استاندارد آمپی‌سیلین با غلظت ۳۰ میکروگرم در دیسک به ترتیب به عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده شد. دو روز بعد از رشد پرگنه‌های باکتریایی درون تشتک پتری، اثر ضدباکتریایی ترکیبات با اندازه‌گیری هاله بازدارنده مورد بررسی قرار گرفت. آنالیر واریانس یک سویه (ANOVA) با استفاده از برنامه R و نرم افزار اکسل و همچنین مقایسه میانگین به روش دانکن انجام شد.

همچنین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی ترکیبات لینالول و سیترال با روش میکرودیلوشن و ماکرودایلوشن انجام شد. در این روش از غلظت ۳۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۱۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمارها درون پلیت‌های الیزا استفاده شد و سپس باتوجه به MIC بدست آمده از مرحله‌ای قبلی، در رنج ۶.۶۴ تا ۳۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱۱.۵۶ تا ۵۹۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب برای اسانس لینالول و سیترال استفاده شد.

درون هر چاهک از پلیت الیزا ۷۰ میکرولیتر محیط کشت (NB: Nutrient broth) ریخته شد. میزان ۷۰ میکرولیتر از هر تیمار با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به چاهک اول هر ردیف اضافه شد، با روش سری رقت، میزان ۷۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و درون چاهک دوم ریخته شد این عمل تا چاهک آخر هر ردیف ادامه داده شد. سپس به همه چاهک‌ها مقدار ۷۰ میکرولیتر محیط‌کشت NB اضافه شد. در آخر به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 CFU/ml اضافه شد. در این آزمایش جهت حل شدن کامل ترکیبات لینالول و سیترال با محیط کشت از توئین ۲۰ به مقدار ۰/۱ درصد استفاده شد. پلیت‌های الیزا به مدت ۲۴ ساعت درون شیکر-انکوباتور با سرعت ۶۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. همچنین برای بررسی دقیق‌تر از روش ماکرو دیلوشن با استفاده از فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری استفاده شد. تیمارها به ترتیب شامل لینالول، سیترال، میکروتیوب‌های حاوی باکتری و آب-توئین به عنوان شاهد استفاده شد. مقدار حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی هر تیمار بعد از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (Burt et al., 2004).

تیمار نهال‌های لیموترش با ترکیبات سیترال و لینالول

یک روز قبل از مایه‌زنی با جدایه باکتری *Xcc*-KVXCC1، از ترکیبات سیترال و لینالول با غلظت ۰/۱ درصد به صورت اسپری روی نهال‌های دو ساله لیموترش (*Citrus aurantifolia*) در شرایط گلخانه استفاده شد. روز بعد از کاربرد ترکیبات، سوسپانسیون با غلظت 10^6 CFU/ml از کشت ۲۴ ساعت جدایه *Xcc*- KVXCC1 تهیه شد و مقدار ۲۵ میکرولیتر در دو طرف هر برگ لیمو ترش مایه‌زنی شد و در برگ شاهد از آب مقطر استریل به عنوان مایه‌زنی استفاده شد. بنابراین تیمارهای آزمایش شامل نهال‌های مایه‌زنی شده با عامل باکتری به تنهایی، نهال‌های مایه‌زنی شده با باکتری و از قبل اسپری شده با سیترال و نهال‌های مایه‌زنی شده با باکتری و اسپری شده با لینالول، نهال‌های اسپری شده با سیترال، نهال‌های اسپری شده با لینالول بدونِ مایه‌زنی با باکتری استفاده شد. نهال‌های

اسپری شده با آب بدونِ مایه‌زنی با باکتری به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، بازه‌های زمان‌های صفر، یک و چهار روز بعد از مایه‌زنی برای بررسی بیان ژن‌های *FLS2*، *RAR1* و *PR1* مورد مطالعه قرار گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA کل با استفاده از کیت استخراج RNA (Column RNA Isolation Kit 1) و مطابق با شیوه‌نامه شرکت دنازیست آسیا انجام شد. کیفیت‌سنجی RNA استخراجی با الکتروفورز RNA روی ژل آگارز ۱ درصد و کمیت‌سنجی غلظت RNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر صورت گرفت. حذف آلودگی ژنومی با تیمار آنزیم D*NaseI* (یکتا تجهیز آزما) صورت گرفت و عدم حضور DNA با استفاده از واکنش PCR بر روی RNA استخراجی تایید شد. جهت سنتز cDNA از کیت cDNA synthetase (EurX, molecular biology products, Poland) و مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد.

اندازه‌گیری بیان ژن با روش Real-time PCR

به منظور بررسی بیان ژن‌های *FLS2*، *RAR1* و *PR1* در نهال‌های لیموترش مایه‌زنی شده با جدایه *Xcc*-KVXCC1 القا با ترکیبات سیترال و لینالول از Real-time PCR استفاده شد (Shi *et al*., 2015; Pitino *et al*., 2015). همچنین از ژن UPL7 به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای انجام واکنش Real-time PCR نسبی در جدول ۱ ذکر شده است. مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Master Mix با غلظت X ۲، یک میکرولیتر آغازگر رفت، یک میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۲ میکرولیتر cDNA و ۶ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. آزمایش در سه تکرار برای هر نمونه انجام شد. واکنش‌ها در دستگاه CFX Connect™ Real-Time PCR (Bio-Rad Detection System - Bio-Rad) انجام شد.

جدول۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن‌های دخیل در مقاومت

Table 1. List of primer sequences used for expression analysis of resistance genes

Primer	5'- 3'(Sequence)	Reference
*FLS*2-F	AGCCCTCCAGGTTCTTGATT	Pitino *et al*., 2015
*FLS*2-R	GAGACCAAGCGCTAACAAGG	
PR-F	ACAAACACACATCTCCGAAATGA	Pitino *et al*., 2015
PR-R	TTGAAATGAGCAGCAGCAAAA	
RAR1-F	GTCAGAACGACGACGCTTTG	Shi et al., 2016
RAR1-R	GCGTTGCAGCCAATTCG	
UPL7-F	CAAAGAAGTGCAGCGAGAGA	Pitino *et al*., 2015
UPL7-R	TCAGGAACA GCAAAAGCAAG	

واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و با چرخه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه، و سپس ۴۰ سیکل با ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. به منظور کمی‌سازی بیان ژن‌های مورد نظر در نمونه‌های مختلف از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel صورت گرفت.

نتایج

خاصیت ضدباکتری و حداقل غلظت بازدارندگی ترکیبات لینالول و سیترال لینالول و سیترال علیه جدایه *Xcc*-

KVXCC1 بـه روش نشـت در دیسـک بررسـی شـد. نتـایج حاصل از تجزیه واریانس ارزیابی فعالیت ضدباکتری ترکیبـات لینالول و سیترال نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمـارهـا مورد مطالعه در سطح یک درصد بود (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین آزمون دانکن نشان داد که سـیترال دارای خاصیت ضدباکتریایی بالاتری نسـبت بـه لینـالول و شاهد (آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین) داشت. همانطوری کـه در جدول ۳ مشاهده می‌شـود ترکیبـات سـیترال و لینـالول بـه ترتیب با ایجاد هاله بازدارنده به قطر ۱۶/۶۵ و۹/۳ میلی‌متر، بیشترین اثر ضدباکتریایی را نشان دادند.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثرضدباکتری ترکیبات لینالول و سیترال علیه بیمارگر *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Table 2. ANOVA analysis of the antibacterial effect of linalool and citral components against the *Xanthomonas citri* subsp. *citri* bacterium

Source of variation	Df	Mean squares
Treatment	2	60.38**
Error	6	0.01

** Significant at the 1% level ** معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۳. مقایسه میانگین میزان قطر هاله عدم رشد ترکیبات لینالول و سیترال علیه بیمارگر *Xanthomonas citri* subsp.*citri*

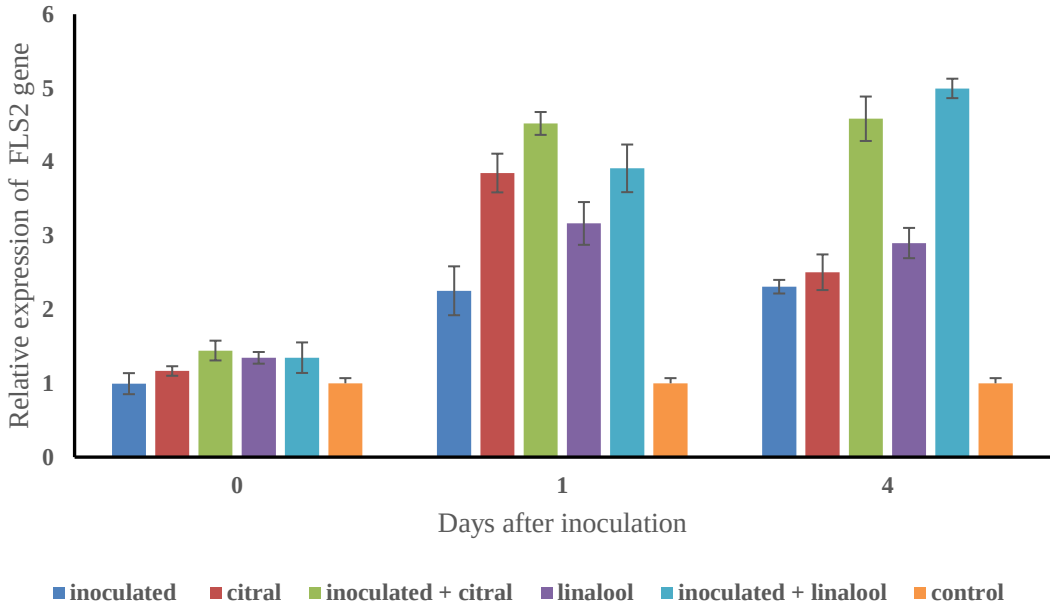
Table 3. Comparison of the mean diameter of the inhibitor of linalool and citral components against the *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* bacterium

Treatment	Mean diameter (± SD) of the inhibition zone (mm)
Linalool	9.33 [b] ±0.00
Citral	16.65 [a] ± 0.88
Water+Twin	0.00
Ampicilin (30 µg)	8.5[c] ±0.33

تعیین حـداقل غلظـت بازدارنـدگی (MIC) و کشـندگی (MBC) ترکیبات سیترال و لینالول به روش میکرودیلوشن و ماکرودیلوشن انجام شد.حداقل غلظت بازدارندگی ترکیبـات سـیترال و لینـالول بـه ترتیـب ۳۷۰ و ۸۵۰ میکروگـرم بـر میلی‌لیتر بـود. همچنـین کمتـرین و بیشـترین اثـر کشـندگی مربوط بـه ترکیـب سـیترال بـا غلظـت ۷۴۰ میکروگـرم بـر میلی‌لیتر و لینالول با غلظت ۱۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن

به منظـور انـدازه‌گیـری تغییـرات بیـان ژن‌هـای *FLS2*، *RAR1* و *PR1* در نهال‌های لیمـوترش مایـه‌زنـی شـده بـا جدایه *Xcc*-KVXCC1 القا با ترکیبات سیترال و لینـالول از Real-time PCR اسـتفاده شـد. ژن *FLS2* در تیمـارهـای شـامل مایـه‌زنـی بـا بـاکتری *Xcc*، سـیترال+باکتری و لینالول+باکتری افزایش بیان نشـان داد (شـکل۱). بیشـترین مقدار بیان آن در بازه‌ی زمانی یک روز بعد از مایه‌زنـی، در تیمارهـای سـیترال+باکتری، سـیترال و لینالول+بـاکتری بـا مقـدار۰/۱۳±۰/۲،۴/۵۲±۰/۰۶ و۳/۸ و۳/۹ برابـر بـه ترتیـب نسبت به شاهد (گیاه بدون تیمـار بـا بـاکتری یـا ترکیبـات اسانس) مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان بیان ایـن ژن در زمـان چهـار روز بعـد از مایـه زنـی، در تیمـارهـای سیترال+باکتری و لینالول+باکتری *Xcc* به ترتیب با افـزایش بیـان ۰/۲۴±۴/۵۸ و ۰/۱۳±۴/۹۹ برابـر نسـبت بـه شـاهد مشاهده شد. میزان بیان ژن *FLS2* در تیمارهای مایه‌زنی بـا بـاکتری *Xcc*، سـیترال+باکتری و لینالول+بـاکتری در طـی زمان‌های صفر، یک و چهار روز بعد از مایه‌زنی به صورت صعودی افزایش بیان نشان داد (شکل۱).

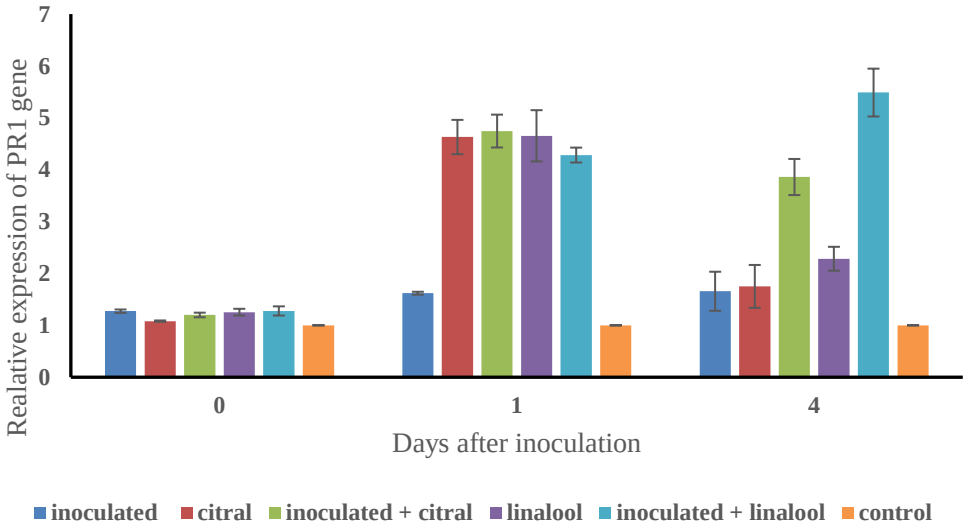


شکل۱. بررسی بیان ژن *FLS2* لیموترش علیه با باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* در بازه زمانی صفر، یک و چهار روز بعد از مایه زنی.

Figure 1. Investigating the *FLS2* gene expression against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in zero, one and four days after inoculation in *Citrus aurantifolia*

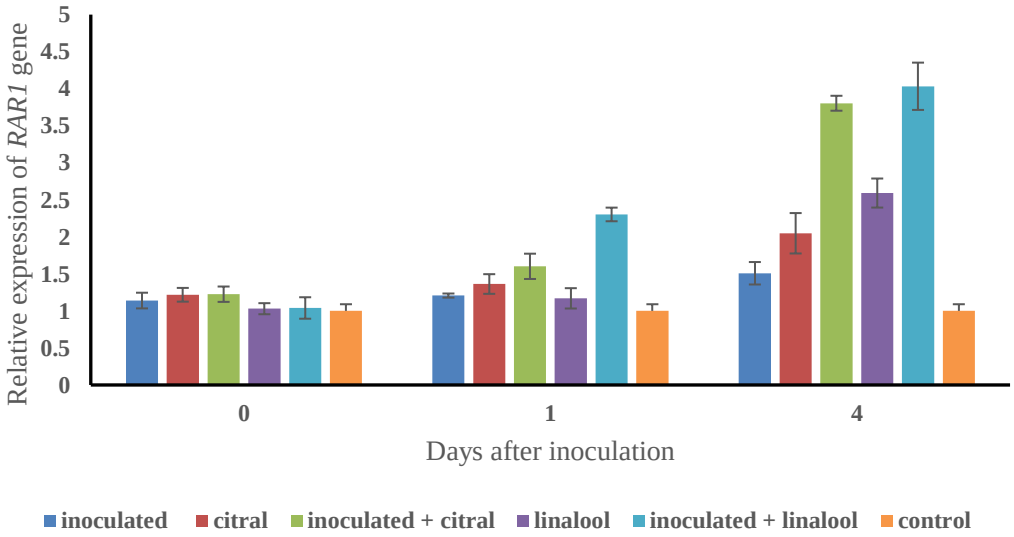
ژن *PR1* در تیمارهای شامل مایه‌زنی با باکتری *Xcc* و لینالول+باکتری افزایش بیان نشان داد (شکل ۲). بیشترین مقدار بیان ژن *PR1* در زمان یک روز بعد از مایه‌زنی، در تیمارهای سیترال، سیترال+باکتری و لینالول به ترتیب با افزایش بیان ۴/۶۲±۰/۳۳، ۴/۷۴±۰/۳۱ و ۴/۶۵±۰/۴۹ برابری نسبت به شاهد مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان بیان این ژن در زمان چهار روز بعد از مایه‌زنی در تیمار لینالول+باکتری *Xcc* با افزایش بیان ۵/۴۸±۰/۴۶ برابری نسبت به شاهد مشاهده شد. میزان بیان ژن *PR1* در تیمارهای مایه‌زنی با باکتری *Xcc* و لینالول+باکتری در طی زمان‌های صفر، یک و چهار روز بعد از مایه‌زنی به صورت صعودی افزایش بیان نشان داد (شکل ۲).

ژن *RAR1* در تیمارهای لینالول+باکتری *Xcc*، سیترال+باکتری *Xcc* و سیترال افزایش بیان نشان داد (شکل ۳). بیشترین مقدار بیان آن در زمان یک روز بعد از مایه‌زنی در تیمار لینالول+باکتری با افزایش بیان ۲/۳±۰/۰۹ برابری نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان بیان این ژن در زمان چهار روز بعد از مایه‌زنی در تیمارهای سیترال+باکتری و لینالول+باکتری *Xcc* به ترتیب با افزایش بیان ۳/۸۷±۰/۲۷ و ۴/۰۳±۰/۳۱ برابری نسبت به شاهد بدون تلقیح مشاهده شد (شکل۳).



شکل۲. بررسی بیان ژن ***PR1*** لیموترش علیه با باکتری ***Xanthomonas citri*** **subsp.** ***citri*** در بازه زمانی صفر، یک و چهار روز بعد از مایه زنی.

Figure 2. Investigating the *PR1* gene expression against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in zero, one, and four days after inoculation in *Citrus aurantifolia*



شکل ۳. بیان نهایی ژن مقاومت ***RAR1*** لیموترش علیه باکتری ***Xanthomonas citri*** **subsp.** ***citri*** در بازه زمانی صفر، یک و چهار روز بعد از مایه زنی.

Figure 3. Investigating the *RAR1* gene expression against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in zero, one, and four days after inoculation in *Citrus aurantifolia*

بحث

Xcc عامل بیماری شانکر باکتریایی است که باعث آسیب اقتصادی به بسیاری از گونه‌های مرکبات می‌شود. تاکنون هیچ راهکار موثری برای کنترل این بیمارگر گیاهی ارائه نشده است (Ali et al., 2023). با توجه به مشکلات ناشی از استفاده ترکیبات شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل بیمارگرها، وجود داروهای جدید و ایمن برای کنترل بیماری‌های گیاهی به عنوان راهکارهای جدید کنترل ضروری به نظر می‌رسد (Bajpai *et al.*, 2007). این موارد سبب افزایش علاقه عمومی به سمت استفاده از روش‌های جایگزین از جمله استفاده از ترکیبات ثانویه گیاهی مانند عصاره‌ها و اسانس‌های طبیعی شده است که ضمن کنترل بیمارگر، باعث فعال شدن سیستم دفاعی گیاه و تجمع اسید سالیسیلیک و بیان ژن‌های مقاومت شود (Kumar *et al.*, 2023).

در مطالعه حاضر با توجه به اهداف کشاورزی مولکولی، شناسایی ترکیب مناسب از اسانس‌ها و همچنین کاهش خسارت بیمارگر بر روی نهال‌های لیموترش به بررسی بیان ژن‌های مقاومت پرداخته شد. ابتدا به بررسی خاصیت ضدباکتری ترکیبات لینالول و سیترال علیه بیمارگر *Xcc* پرداخته شد که نتایج نشان دهنده قدرت بازدارندگی ترکیبات لینالول و سیترال علیه بیمارگر بود. آزمایش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی ترکیبات نشان داد باکتری *Xcc* به میزان بسیار بالایی در مقابل ترکیب سیترال با غلظت ۳۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حساس است. در پژوهش‌های مختلف اثر ضدباکتریایی ترکیبات لینالول، سیترال، آلفا-ترپینئول، سیترونلال، ژرانیول و لینالیل استات علیه بیمارگرهای مختلف گزارش شده است (Ferreira *et al.*, 2006). به هر حال گزارشات کمی در مورد اثر ضدباکتریایی ترکیبات اسانس‌ها علیه باکتری‌های بیمارگر گیاهی بخصوص باکتری *Xcc* وجود دارد. فراسینتی و همکاران (۲۰۱۱) اثرات ضدباکتریایی اسانس گونه‌های مرکبات را علیه ده استرین باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت بررسی کرد (Frassinetti *et al.*, 2011) . در بررسی آن‌ها MIC اسانس‌ها بین ۱۵ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین کمترین مقدار MIC متعلق به اسانس گونه *C. lemon* علیه باکتری *Xcc* بود (Frassinetti *et al.*, 2011). مطالعات انجام شده روی اسانس‌های گیاهی نشان داده‌اند اسانس‌ها فاز تاخیری رشد باکتری را طولانی‌تر و سرعت رشد در فاز لگاریتمی را کاهش می‌دهند. اسانس‌ها از یک سازو کار واحد تبعیت می‌کند که به تجمع آن‌ها در دو لایه لیپیدی غشای سلول و تخریب ساختار آن مربوط است (Aam *et al.*, 2010). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که دلیل تفاوت در میزان بازدارندگی ترکیبات لینالول و سیترال علیه بیمارگر *Xcc* می‌تواند ناشی از ساختار شیمیایی ترکیبات و موقعیت‌های مختلف گروه‌های عاملی هیدروکسیل و آلدهیدی در هر دو ترکیب باشد. به طوریکه موقعیت‌های گروه‌های عاملی هیدروکسیل متصل به کربن نوع سه و ساختار حلقوی باعث افزایش فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به ترکیبات با گروه هیدروکسیل بر روی کربن نوع یک و ساختار خطی دارد.

با توجه به نتایج ذکر شده از ترکیبات لینالول و سیترال که دارای خاصیت ضدمیکروبی بودند به عنوان پیش تیمار در مطالعه حاضر استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تیمارهای لینالول+ باکتری و سیترال+باکتری باعث افزایش بیان در ژن‌های *FLS2*، *PR1* و *RAR1* که به عنوان تنظیم‌کننده اصلی و کلیدی مسیر دفاعی علیه بیمارگر *Xcc* در نهال لیموترش شدند (شکل۱، ۲ و ۳). در مطالعه‌ای جیانگ و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی اثر لینالول علیه ویروس موزاییک تنباکو (TMV) پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که لینالول با القای واکنش‌های فوق حساسیت (HR)، فوق بیان آنزیم‌های مرتبط با دفاع همچون POD، CAT، SOD و PAL می‌شود. القای

مقاومت به بیماری گیاهی توسط لینالول دارای مدت زمان طولانی‌تر و طیف گسترده‌تر خاصیت ضدمیکروبی است. بنابراین لینالول این پتانسیل را دارد که به عنوان یک عامل ضدمیکروبی جدید مشتق شده از گیاه و فعال کننده سیستم ایمنی گیاهی توسعه یابد (Jiang *et al*., 2023). در همین راستا، حاسبی و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی ترکیب اسید آمینه‌های اورنیتین، متیونین و آرژنین علیه بیمارگر شانکر باکتریایی مرکبات (*Xcc*) بر روی نهال لیمو ترش (*C. aurantifolia*) پرداختند. همچنین به منظور تایید القای ژن‌های مقاومت، الگوی بیان ژن‌های *PR2* و ۱و ۳ بتاگوکاناز مورد بررسی قرار گرفت (Hasabi *et al*., 2014). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب تیماری متیونین بر روی لیمو ترش (*C. aurantifolia*) باعث القای بیان ژن‌های *PR2* و بتا ۱و۳ گلوکاناز علیه بیمارگر *Xcc* شد (Hasabi *et al*., 2014). همچنین بهشتی و همکاران (۲۰۱۱) برای کنترل و کاهش عامل بیماری *Xcc* به بررسی تاثیر تیمارهای اسید-β آمینوبوتیریک (BABA)، اسید اسکوربیک (ویتامینC)، تیامین (ویتامین B1)، عصاره چای سبز (*Camellia sinensis*) و اکسی کلرید مس بر روی نهال لیمو ترش (*C. aurantifolia*) پرداختند (Beheshti *et al*., 2011). همچنین توسعه علائم بیماری برای برگ‌های تیمارشده بیست روز پس از تلقیح با باکتری *Xcc* بررسی شد (Beheshti *et al*., 2011). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کاهش علایم بیماری در گیاهان تیمار شده با عصاره چای سبز و بتا-آمینو بوتریک اسید (β-aminobutyric Acid) نسبت به شاهد و سایر تیمار قابل توجه بود. عصاره چای سبز و بتا-آمینو بوتریک اسید سبب افزایش بیان ژن‌های کیتیناز و بتا ۱و۳ گلوکاناز شد که نشان دهنده ارتباط این ژن‌ها با سیستم دفاعی گیاه علیه بیمارگر می‌باشد (Beheshti *et al*., 2011).

ژن *FLS2* توسط گیرنده‌های کینازی کد می‌شود که سبب تشخیص سیگنال‌های مولکولی حاصل از flg22 باکتری می‌شود (Gómez-Gómez *et al*., 2001; Kunze *et al*., 2001). این ژن در میزبان‌های مختلف سبب تشخیص پروتئین فلاژلین گونه‌های باکتریایی متفاوتی می‌شود (Chinchilla *et al*., 2006). هاوو و همکاران (۲۰۱۶) با انتقال ژن *FLS2* از توتون (*Nicotiana benthamiana*) به پرتقال رقم هاملین (hamlin) سبب کاهش حساسیت این رقم نسبت به بیماری شانکر باکتریای مرکبات *Xcc* شد (Hao *et al*., 2016). ژن *FLS2* در پرتقال هاملین باعث تحریک تولید گروه اکسیژن فعال (ROS) و القای بیان ژن‌های مقاومت از طریق آبشاری از پروتئین کینازهای فعال شونده میتوژن (MAPK: Mitogen-activated protein kinases) در برگ‌های نهال تراریخت شد. بنابراین این امر نشان دهنده تعامل گیرنده *FLS2* با پروتئین flg22 بیمارگر و فعال کردن پاسخ‌های دفاعی PTI (PAMP -Triggered Immunity -PTI) در گیاهان تراریخت است که منجر به تحریک نسخه‌برداری تعدادی از ژن‌های مقاومت می‌شود (Hao *et al*., 2016).

همچنین در پژوهش پی‌تینو و همکاران (۲۰۱۵) افزایش میزان بیان ژن‌های مقاومت *FLS2*، *PR1*، LRR8، RLP12 وGSL07 در تیمار با پپتید فلاژلین در ژنوتیپ‌های نارنج با تولید سطح بالای گروه اکسیژن فعال (ROS) مشاهده کردند (Pitino *et al*., 201). در این مطالعه، میزان بیان ژن‌های مقاومت *FLS2*، *PR1*، LRR8، RLP12 وGSL07 در دو گروه از ژنوتیپ‌های نارنج با تولید سطح بالا و پایین گروه اکسیژن فعال (ROS) در دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های تولید کننده سطح بالای گروه اکسیژن فعال (ROS) به مقدار زیادی در بازه‌های زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت نسبت به شاهد (عدم استفاده از پپتید فلاژلین) افزایش یافت. در حالی‌که میزان بیان این ژن‌ها در

ژنوتیپ‌های تولید کننده سطح پایین گروه اکسیژن فعال (ROS) ، برابر یا کمتر از شاهد بود. در این بررسی سطح بالای گروه اکسیژن فعال (ROS) با افزایش در فعالیت ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی همبستگی مثبتی نشان داد (Pitino *et al*., 201). در مطالعه حاضر، با توجه به برهمکنش پروتئین ژن *FLS2* با گیرنده کینازی و فعال شدن مسیرهای میتوژن (MAPK) به بررسی ژن مورد نظر پرداخته شد (Pitino *et al*., 201). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد الگوی بیان ژن *FLS2* در تیمارهای سیترال و لینالول در روز اول افزایش بیان داشتند اما در روز چهارم بیان آن‌ها نسبت به روزهای گذشته کاهش پیدا کرد این در حالی بود که تیمارهای سیترال+باکتری و لینالول+باکتری در طی بازده‌های زمانی مورد بررسی روند صعودی داشتند. نتایج ما با یافته‌های پی تینو و همکاران (۲۰۱۵) و هاوو و همکاران (۲۰۱۶) و در رابطه ارتباط مستقیم بین افزایش بیان ژن *FLS2* با میزان مقاومت میزبان علیه بیمارگر مطابقت داشت (Hao *et al*., 2016).

ژن *RAR1* به عنوان یک ژن کلیدی و نقطه‌ی ارتباطی بین مسیرهای سیگنال‌های حاصل از فعال شدن ژن‌های مقاومت می‌باشد که افزایش بیان این ژن در مقاومت علیه بیمارگرهای مختلف نشان دهنده حضور آن در مسیرهای دفاعی در گیاه می‌باشد (Mayorga *et al*., 2018). در مطالعه حاضر میزبان بیان ژن *RAR1* پس از تیمار با لینالول+باکتری و سیترال+باکتری نشان داد که در ابتدا سطح پایین‌تری از میزان بیان این ژن در روزهای صفر و ۱ روزه مشاهده شد اما به تدریج، بیان این ژن در روزه چهارم با تفاوت قابل توجهی افزایش یافت، که نشان دهنده تلاش گیاه در جهت جلوگیری از رشد باکتری می‌باشد (شکل ۳).

در تحقیقی توسط تانی‌گوچی و همکاران (۲۰۱۴) مشخص شد که تیمار گیاهان برنج با لینالول منجر به القای تولید جاسمونیک اسید می‌شود و در نتیجه سبب افزایش مقاومت برنج نسبت به باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* شده است (Taniguchi *et al*., 2014). اسید جاسمونیک (JA) از جمله تنظیم کننده‌های رشد گیاهی محسوب می‌شود که نقش مهمی در سازکار دفاعی گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی و القای ژن‌های دفاعی دارد (Taniguchi *et al*., 2014). همچنین تیمار برنج با لینالول سبب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی پراکسیداز، کیتیناز، بتا-۱و۳ گلوکاناز، تاوماتین (Thaumatin) شده است. شای و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهش خود نشان دادند که استفاده از ترکیب سیترال سبب کاهش بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی شامل ژن‌های تنظیم کننده فعالیت تاژک، پروتئین A و X غشای خارجی، چسبندگی و تهاجم، موتور تاژک، سنتز سلولز، تشکیل بیوفیلم، سیستم سیدروفور و جذب آهن و سنتز پلی‌ساکارید خارج سلولی در باکتری *Cronobacter sakazakii* شده است (Shi *et al*., 2017.).

در این پژوهش الگوی بیان ژن‌ها در تیمارهای همچون سیترال و لینالول متفاوت بود به طوری که تیمار سیترال و لینالول سبب افزایش بیان ژن‌های *FLS2* و *PR1* در بازه زمانی یک روز بعد از مایه‌زنی شدند (شکل۱، ۲ و ۳). در مقابل میزان بیان ژن *RAR1* در اثر تیمارهای سیترال و لینالول در طی زمان‌های صفر، یک و چهار روز بعد از مایه‌زنی به صورت صعودی افزایش نشان داد که می‌تواند مبین تاثیر این ماده در افزایش بیان ژن *RAR1* در نهال لیمو ترش (*C. aurantifolia*) باشد (شکل۱، ۲ و ۳).

سیترال و لینالول مونوترپن (ترپنوئیدها) هستند (Nishijima et al., 2014., Taniguchi *et al*., 2014). از طرفی ترپنوئیدها سبب القا پاسخ دفاعی در گیاهان در برهمکنش با دامنه وسیعی از بیمارگرها می‌شوند (Ballester *et al*., 2011). براساس گزارش وان‌اسچی و همکاران (۲۰۰۷) اسید سالیسیلیک، جاسمونیک اسید و اتیلین سبب تجمع ترپنوئیدها می‌شود که نتیجه تجمع این

ترکیبات، ایجاد القای مقاومت علیه بیمارگرهاست (Van Schie *et al*., 2007). علاوه‌بر این، یک ارتباط بین هورمون‌های گیاهی و ترپنوئیدها در طی فعال‌سازی واکنش‌های دفاعی وجود دارد. بر اساس گزارش‌های راکوال و کوماتسو (۲۰۰۰) و جووا و همکاران (۲۰۰۱)، جاسمونیک اسید سبب افزایش تولید فیتوالکسین ساکورانتین (Sakuranetin) ، مومی‌لاکتون ای (Momilactone A) و ژن‌های درگیر در مقاومت علیه بیمارگر می‌شود. از این‌رو می‌توان پیشنهاد کرد که لینالول و سیترال با توجه به ماهیت ترپنوئیدی‌شان سبب القای ژن‌های *FLS2*، *RAR1* و *PR1* در این بررسی شده‌اند (Rakwal and Komatsu , 2000., Jwa *et al*., 2001). نتایج این پژوهش با نتایج شیمادا و همکاران (۲۰۱۷)، تانی‌گوچی و همکاران (۲۰۱۴) و شای و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد. با توجه به نتایج حاصل، سیترال و لینالول به واسطه داشتن خاصیت ضدباکتریایی و ایجاد القای مقاومت در مرکبات در برهمکنش با بیمارگر عامل شانکر باکتریایی مرکبات می‌توانند به عنوان یک ترکیب مهم در کنترل شانکر باکتریایی مرکبات استفاده شوند (Shimada *et al*., 2017., Taniguchi *et al*, 2014).

References **منابع**

Aam B.B. Heggset E.B. Norberg A.L. Sørli, M. Vårum K.M. and Eijsink, V.G. 2010. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine drugs*, 8: 1482-1517. doi: 10.3390/md8051482.

Ali S. Hameed A. Muhae-Ud-Din G. Ikhlaq M. Ashfaq M. Atiq M. Ali F. Zia Z.U. Naqvi S.A.H. and Wang Y. 2023. Citrus canker: a persistent threat to the worldwide citrus industry—an analysis. Agronomy, 13: 1112. https://doi.org/10.3390/agronomy13041112.

Ali A. Haider M.S. Hanif S. and Akhtar N. 2014. Assessment of the antibacterial activity of *Cuscuta pedicellata* Ledeb. African Journal of Biotechnology, 13 (3): 430-433. https://doi.org/10.5897/AJB2013.12440.

Alizadeh A. and Rahimian H. 1990. Citrus canker in kerman province. Iran. J.plant Pathol. 26(1-4): 42.

Azevedo C. Sadanandom A. Kitagawa K. Freialdenhoven A. Shirasu K. and Schulze-Lefert P. 2002. The *RAR1* interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. Science, 295: 2073-2076. DOI: 10.1126/science.1067554.

Bajpai V.K. Rahman A. Choi U.K. Youn S.J. and Kang S.C. 2007. Inhibitory parameters of the essential oil and various extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu to reduce food spoilage and food-borne pathogens. Food Chemistry, 105 (3): 1061-1066. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.05.008.

Beheshti B. Sharifi-Sirchi G. Mansouri M. Hosseinipour A. and Schlaich N. 2011. Resistance to citrus canker in Key/Mexican Lime Induced by β-Aminobutyric Acid and green tea. American Journal of Agricultural and Biological Science, 6 (2): 242-248. https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.242.248.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. International Journal of Food Microbiology, 94 (3): 223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

Chen Z. Shen Z. Zhao D. Xu L. Zhang L. Zou Q. 2021. Genome-Wide Analysis of LysM-Containing Gene Family in Wheat: Structural and Phylogenetic Analysis during Development and Defense. Genes, 31 (12): 1-18. doi: 10.3390/genes12010031

Chen P.S. Wang L.Y. Chen Y.J. Tzeng K.C. Chang S.C. Chung K.R. and LeeM.H. 2012. Understanding cellular defence in kumquat and calamondin to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 79: 1-12. DOI: 10.1016/j.pmpp.2012.03.001.

Chinchilla D. Bauer Z. Regenass M. Boller T. and Felix G. 2006. The Arabidopsis receptor kinase

*FLS*2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. The Plant Cell, 18: 465-476. doi: 10.1105/tpc.105.036574.

Frassinetti S. Caltavuturo L. Cini M. Della Croce C. Maserti B. 2011. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from *Citrus* spp. Journal of Essential Oil Research, 23: 27-31. DOI: 10.1080/10412905.2011.9700427.

Ferreira R.B. Monteiro S. Freitas R. Santos C.N. Chen Z. Batista L.M. Duarte J. Borges, A. and Teixeira A.R. 2006. Fungal pathogens: the battle for plant infection. Critical Reviews in Plant Sciences, 25: 505-524. DOI: 10.1080/07352680601054610.

Gomez-Gomez L. Baur Z. and Boller T. 2001. Both the extra-cellular leucine-rich lipid domain and the kinase activity of *FLS*2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. The Plant Cell, 13: 1155–163.

Gómez-Gómez L. and Boller T. 2000. *FLS*2: An LRR receptor–like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. Molecular cell, 5: 1003-1011. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80265-8.

Hasabi V. Askari H. Alavi S.M. and Zamanizadeh H. 2013. Effect of amino acid application on induced resistance against citrus canker disease in lime plants. Journal of Plant Protection Research, 54: 144-149. DOI: https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0023.

Jiang Y. Pan X. Li Y. Yang Y. Jia Y. Lei B. Feng J. Ma, Z. Liu X. and Yan H. 2023). Linalool induces resistance against tobacco mosaic virus in tobacco plants. Plant Disease, 107: 2144-2152. DOI: 10.1094/PDIS-09-22-2246-RE.

Jwa N.S. Agrawal G.K. Rakwal R. Park C.H. and Agrawal V.P. 2001. Molecular cloning and characterization of a novel Jasmonate inducible pathogenesis-related class 10 protein gene, *JIOsPR10*, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves. Biochemical and Biophysical Research Communications, 286: 973–983. doi: 10.1006/bbrc.2001.5507.

Kumar S. Korra T. Thakur R. Arutselvan R. Kashyap A.S. Nehela Y. Chaplygin V. Minkina T. and Keswani C. 2023. Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. *Plant Stress*: 100154. https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100154.

Kunze G. Zipfel C. Robatzek S. Niehaus K. Boller T. and Felix G. 2004. The N-terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. Plant Cell, 15: 3496–507. doi: 10.1105/tpc.104.026765.

Leduc A. Traoré Y.N. Boyer K. Magne M. Grygiel P. Juhasz C.C. Boyer C. Guerin F. Wonni I. and Ouedraogo L. 2015. Bridgehead invasion of a monomorphic plant pathogenic bacterium: *Xanthomonas citri* pv. *citri*, an emerging citrus pathogen in Mali and Burkina Faso. Environmental Microbiology, 17 (11): 4429-4442. doi: 10.1111/1462-2920.12876.

Mansouri M. Hosseini Pour A. Sharifi Sirchi G.R. and 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. *Agricultural Biotechnology Journal*, 1: 39-52.

Mayorga-López Á.G. Baas-Espinola F.M. Limones-Briones V. Martin-Cocom M.A. Vallejo-Reyna M.Á. de Jesús Canul-Euán T. Barredo-Pool F.A. García-Laynes S. Herrera-Valencia V.A. and Peraza-Echeverria S. 2018. Genomic organization, phylogeny, and functional analysis of the banana MaRAR1 gene that encodes a cochaperone of HSP90. *Plant gene*, 16: 19-31. https://doi.org/10.1016/j.plgene.2018.08.003.

Mirzaei H. Tarighi S. Taheri P. Golmohammadi M. Comparison of bacterial virulence factors and investigation of the biochemical, molecular and cellular interactions of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* with citrus. Thesis. Ferdowsi University of Mashhad Faculty of Agriculture. 1-150 pp. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00681.x.

Mustafa M. Imran M. Rasool A. Azeem M. Riaz A. and Afzal M. 2014. Evaluation of commercial citrus cultivars for resistance to citrus leaf miner and its management. International Journal of Agronomy and Agricultural Research, 6 (6): 1-9.

Nishijima C.M. Ganev E.G. Mazzardo-Martins L. Martins D.F. Rocha L.R. Santos A.R. and

Hiruma-Lima C.A. 2014. Citral: a monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. European Journal of Pharmacology, 736: 16-25. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.04.029.

Pitino M. Armstrong C. M. and Duan Y. 2015. Rapid screening for citrus canker resistance employing pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity responses. Horticulture Research, 2: 1-9. doi: 10.1038/hortres.

Rakwal R. and Komatsu S. 2000. Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa* L.) self-defense mechanism using proteome analysis. Electrophoresis, 21: 2492–2500. doi: 10.1002/1522-2683(20000701)21.

Sarowar S. Kim Y.J. Kim E.N. Kim K.D. Hwang B.K. Islam,R. and Shin J.S. 2005. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. Plant cell reports, 24: 216-224. doi: 10.1007/s00299-005-0928-x.

Shi Q. Febres V.J. Jones J.B., and Moore, G.A. 2015. Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. *citri-derived* pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker. Molecular plant *pathology* 16: 507-520. doi: 10.1111/mpp.12206.

Shi Q. Febres V.J. Jones J.B. and Moore G.A. 2016. A survey of *FLS*2 genes from multiple citrus species identifies candidates for enhancing disease resistance to *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. Horticulture research, 3: 16022. https://doi.org/10.1038/hortres.2016.22.

Shimada T. Endo, T. Rodríguez A. Fujii H. Goto S. Matsuura T. Hojo Y. Ikeda Y. Mori I. C. and Fujikawa T. 2017. Ectopic accumulation of linalool confers resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in transgenic sweet orange plants. Tree Physiology. 1-11. Doi: 10.1093/treephys/tpw134.

Silva F. Ferreira S. Queiroz J.A. and Domingues F.C. 2011. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. Journal of medical microbiology, 60 (10): 1479-1486. doi: 10.1099/jmm.0.034157-0.

Sun X. Stall R.E. Jones J.B. Cubero J. Gottwald T.R. Graham J.H. Dixon W.N. Schubert T.S. Chaloux P.H. and Stromberg V.K. 2004. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. Plant Disease 88: 1179-1188. DOI: 10.1094/PDIS.2004.88.11.1179.

Tao Y. Xie Z. Chen W. Glazebrook J. Chang H.S. Han B. Zhu T. Zou G. and Katagiri F. 2003. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. The Plant Cell, 15: 317-330. doi: 10.1105/tpc.007591.

Taniguchi S. Hosokawa-shinonaga Y. Tamaoki D. Yamada S. Akimitsu K. and Gomi K. 2014. Jasmonate induction of the monoterpene linalool confers resistance to rice bacterial blight and its biosynthesis is regulated by JAZ protein in rice. Plant, cell and environment, 37:451-461. doi: 10.1111/pce.12169.

Van Loon L.C. Rep M. and Pieterse C.M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual. Review in. Phytopathology. 44, 135-162. doi: 10.1146/annurev.

Vlot A.C D.A. Dempsey and D F. Klessig. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annual Review of Phytopathology, 47: 177-206. doi: 10.1146/annurev.phyto.

Schaad N.W. Postnikova E. Lacy G.A Sechler and Garkova L. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. Systematic and Applied Microbiology, 29: 90-695. doi: 10.1016/j.syapm.2006.08.001.

Van Schie C C. Haring M A. and Schuurink R C. 2007. Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. Plant Molecular Biology, 64: 251–263. doi: 10.1007/s11103-007-9149-8.