DOI: 10.22034/ijpp.2025.2021818.464

بیماری‌های گیاهی / جلد ۶۰ / شماره ۱/ سال ۱۴۰۳: ۴۷-۳۳

مقاله پژوهشی

بررسی الگوی بیان ژن‌های NH_1 ، تیونین و لیپواکسیژناز در پاسخ به بیمارگر بیماری سوختگی باکتریایی برنج (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)

احمد درخشان[۱]، ولی‌اله بابایی‌زاد[۲*]، محمد سالاری[۳]، ناصر رادمان[۳] و عبدالحسین طاهری[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹ ، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۶)

چکیده

سوختگی باکتریایی برنج ناشی از *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های برنج در اغلب مناطق دنیا محسوب می‌گردد. فهم تعامل بیوشیمیایی و مولکولی نقش مهمی در طراحی استراتژی اصلاح و مقاومت گیاهان به عنوان موثرترین و اقتصادی‌ترین روش مدیریتی محسوب می‌گردد. در برهمکنش بین بیمارگر و گیاه میزبان صدها ژن تنظیم و بیان می‌شوند که در اغلب موارد اختلاف بین مقاومت و حساسیت به زمان و میزان بیان آن‌ها، نسبت به تفاوت در بیان مجموعه‌ای از ژن‌ها بستگی دارد. در این پژوهش الگوی بیان ژن‌های NH_1، *Thionin* و *Lipoxygenase* در بازه های زمانی مختلف بعد از مایه‌زنی در ارقام مقاوم (خزر) و حساس (طارم محلی) نسبت به سوختگی باکتریایی به روش qRT-PCR مورد ارزیابی گرفت. مطالعه الگوی بیان ژن های مورد بررسی نشان داد، روند افزایش بیان آنها در اولین بازه زمانی پس از تلقیح (ساعت ۱۲) در رقم مقاوم خزر نسبت به رقم حساس دارای اختلاف معنی دار بود. علی‌رغم کاهش میزان بیان این ژن‌ها بعد از ساعات اولیه، نسبت بیان ژن‌ها در دو رقم حساس و مقاوم تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی در سطح ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود. افزایش بیان ژن‌های NH_1، PR_{13} و *LOX* و احتمالا القا مسیرهای مختلف مقاومت سیستمیک وابسته به عنوان بخشی از ساز و کار دفاعی برنج، نقش مهمی در مقاومت رقم خزر نسبت به باکتری عامل سوختگی برنج دارد.

واژه‌های کلیدی: تعامل مولکولی،ژن‌های *PRs*، طارم، خزر، qRT-PCR

---

* بخشی از رساله دکتری نویسنده اول می باشد

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

[۱] استادیار سازمان جهاددانشگاهی خراسان رضوی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، گروه زیست فناوری قارچ های صنعتی

[۲] دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۳] دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل

[۴] دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Iran. J. Plant Path., Vol. 60, No .1, 2024: 33-47

DOI: 10.22034/ijpp.2025.2021818.464

Research Article
Analysis of the expression pattern of NH_1, thionine, and lipoxygenase in response to the rice bacterial blight disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Drakhshan[1], V. Babaeizad*[2], M. Salari[3], N. Radman[3] and A. Taheri[4]

(Received: 13.11.2024; Accepted: 13.01.2025)

Abstract

Bacterial blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is one of the most destructive rice diseases in most regions. Understanding the biochemical and molecular interaction plays an important role in designing a specific strategy for the improvement and resistance of plants as the most effective and economical management method. In the interaction between the pathogen and the host, hundreds of genes are regulated and expressed, and in most cases, the difference between resistance and sensitivity is related to time and the amount of these changes compared to the difference in the expression of a set of genes. This study evaluated the expression pattern of *NH1*, thionine, and lipoxygenase genes at different intervals after inoculation in resistant (Khazar) and susceptible (local Tarom) cultivars to bacterial blight using qRT-PCR. The study of the expression pattern of the investigated genes showed that the trend of increasing their expression in the first period after inoculation (12 hours) in the resistant variety Khazar was significantly different from the susceptible variety. Despite the decrease in the expression of these genes after the initial hours, the gene expression ratio in the two susceptible and resistant varieties was significantly different at the 5% level up to 72 hours after inoculation. Increasing the expression of the mentioned genes and inducing various related systemic resistance pathways as a part of the defense mechanism of rice has played an important role in the resistance of the commercial cultivar Khazar to rice bacterial blight.

Keywords: Molecular interaction, PRs gene, Tarom, Khazar, qRT-PCR

* A part of the first author's doctoral dissertation

**Corresponding author's E-mail address: babaeizad@yahoo.com

[1] Industrial Fungi Biotechnology Research Department, Research Institute for Industrial Biotechnology, Acadenic Center for Education, Cultural and Research (ACECR) Khorasan Razavi Branch.

[2] Associate Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University. Sari, Iran

[3] Associate Professor, Department of Plant Protection, University of Zabol. Zabol, Iran

[4] Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan, Iran

مقدمه

سوختگی باکتریایی برنج ناشی از *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* با میانگین خسارت ۳۰ درصد در شرایط عادی تا ۸۰ درصد در شرایط حاد، در کنار بیماری بلاست (*Magnaporthe oryzae*) از مهمترین عوامل بیمارگر برنج به شمار می‌روند (Venturi & Fuqua 2013, Liu *et al*. 2014). این باکتری از طریق زخم‌ها و روزنه‌های آبی منتهی به آوندهای چوبی وارد گیاه شده و در محل آوندها شروع به تکثیر می‌کند. باکتری با تولید افکتورهایی از جمله پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS-Xanthan) باعث انسداد آوندهای چوبی و مرگ گیاه برنج می‌شود. آلودگی در مراحل گیاهچه‌ای و پنجه‌زنی با پژمردگی (کرسک) همراه است و در مراحل بعدی به صورت لکه‌های طویل و پهن که به تدریج به رنگ سبز خاکستری و زرد تغییر می‌کنند، مشاهده می‌شود و در نهایت باعث سوختگی یا بلایت می‌گردد (Shen & Ronald 2002, Khoshdaman *et al*. 2012, Horgana & Henderson, 2015).

کارایی پایین کنترل شیمیایی، نشان می‌دهد مؤثرترین و مطمئن‌ترین روش مدیریت سوختگی باکتریایی استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. کارایی این روش نیاز به فهم دقیقی از تعامل بین میزبان و باکتری عامل بیماری دارد. تعامل مولکولی بین گیاه و عوامل بیمارگر بستگی به ژن‌هایی دارد که گیاهان میزبان و عوامل بیمارگر واجد آن‌ها هستند که منجر به پدیده سازگاری (حساسیت) و یا ناسازگاری (مقاومت) می‌شود. در تعامل ناسازگار با تشخیص عامل بیمارگر، صدها ژن از جمله ژن‌های مقاومت ذاتی (Innate resistance) و مرتبط با بیماریزایی (Pathogenesis-related genes)، مکانیسم‌های بیوشیمیایی مانند بیوسنتز فیتوالکسین‌ها، تقویت دیواره سلولی از طریق افزایش ترکیبات فنیل پروپانوئید، بیوسنتز آنزیم‌های دفاعی و ترکیبات فنلی فعال می‌گردد. به دنبال آن با بروز واکنش فوق حساسیت همراه با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species /ROS) از جمله پراکسید هیدروژن و سوپراکسید اکسیژن، مسیرهای انتقال پیام وابسته به اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک و اتیلن شامل مقاومت سیستمیک اکتسابی (Systemic Acquired Resistance) و مقاومت القایی (Induced Systemic Resistance) در گیاه فعال می‌گردد (Van Loon *et al*. 2006; Schwessinger & Ronald 2012; Thakur & Sohal 2013; Oliviera *et al*. 2016).

پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی(Pathogenesis-related proteins/PRs) به پروتئین‌هایی اطلاق می‌شود که توسط گیاه میزبان تولید می‌شوند و معمولاً در پاسخ به عوامل بیمارگر یا تحت شرایط تنش القا می‌شوند. این پروتئین‌ها نقش مهمی در دفاع گیاهان علیه بیمارگرها ایفا می‌کنند و می‌توانند به عنوان اولین خط دفاعی در برابر آنها عمل کنند(Van loon 2006, Ali *et al*. 2018). لذا از نگاه محققان به عنوان اولین کاندید و مشهورترین سلاح‌های دفاعی برای توسعه گیاهان مقاوم در برابر طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی معرفی می‌گردند (Golshani *et al*. 2015, Ali *et al*. 2018). بیان بالای ژن‌های *PRs* توام با تجمع پروتئین‌ها، در گیاه مقاوم نسبت به حساس، همچنین تجمع mRNA و بیش بیانی این ژن‌ها در گیاهان تراریخته همراه با بروز واکنش‌های فوق حساسیت و فعال شدن مسیرهای مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR)، نشان از رابطه شدت و میزان بیان این ژن‌ها و فعالیت پروتئین‌های مرتبط با آن‌ها، در مقاومت گیاهان نسبت به عوامل بیمارگر و تنش‌ها می‌باشد (Kumar *et al*. 2013, Jain *et al*. 2018, Jiang *et al*. 2020).

پروتئین تیونین یا PR_{13} یک گروه از پپتیدها با خاصیت ضد میکروبی هستند که معمولاً دارای ۴۷-۴۶ اسید آمینه عموما بازی و غنی از سیتئین با وزن مولکولی حدود ۵

کیلو دالتون می‌باشند. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های تیونین، تخریب ساختار غشای سلولی بیمارگر از طریق اکسیداسیون فسفولیپیدها می‌باشد. این فرآیند منجر به تغییر بالانس یون‌های کلسیم (Ca^{2+}) و پتاسیم (K^{+}) می‌شود و در نهایت باعث نشت پروتئین‌ها، نوکلئوتیدها و سایر ترکیبات داخل سلول می‌گردد (Bohlmann & Apel 1991, Ji *et al.* 2015). بدین ترتیب به نظر می‌رسد مهمترین اثر سمیت PR_{13} تخریب غشای سلولی شبیه مواد شوینده روی لایه‌های چربی می‌باشد (Sudisha *et al.* 2012). مطالعات نشان داده این پروتئین علاوه بر تخریب غشای بیمارگر، باعث ممانعت از سنتز پروتئین میکروبی می‌گردد (Quilis *et al.* 2008). ویژگی ضد میکروبی برخی PRs از جمله PR_{10} (شبه ریبونوکلئاز- Pseudo-ribonuclease)، PR_{12} (دیفنسین)، PR_{13} (تیونین) و PR_{14} (پروتئین‌های ناقل لیپید) بسیار مطالعه شده‌اند (Jiang *et al.* 2015, Ali *et al.* 2018).

لیپواکسیژناز (*LOX*) یک دی‌اکسیژناز است که منجر به هیدروپراکسیداسیون اسیدهای چرب با ساختار سیس (Cis)، اسیدهای لینولئیک (Linoleic)، لینولنیک (Linolenic) و آراشیدونیک (Arachidonic) می‌شود. این ژن عمل پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع و تبدیل آن‌ها به اسیدهای چرب هیدروپروکسید را تسریع می‌کند. البته ترکیباتی مثل جاسمونیک اسید و آلدهیدها نیز از دیگر محصولات ژن *LOX* می‌باشند. فعالیت ضد میکروبی این ژن نیز در گیاهان مختلف و علیه بیمارگرهای متفاوت به اثبات رسیده است (Song & Goodman 2001, Peng *et al.* 1994). تحقیقات نشان داد فعالیت *LOX* در گیاهان آلوده به بیمارگرهای باکتریائی افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد لیپواکسیژناز از اولین آنزیم‌های دخیل در تسریع و تولید JA از لینولئیک اسید بوده و در فعال کردن مسیر سیگنال مقاومت سیستمیک القایی (ISR) ایفای نقش می‌کند (Vick & Zinnerman 1983, Xu *et al.* 2018).

افزایش اولیه *LOX* منجر به تخریب غشای سلول بیمارگر و نشست الکترولیت‌ها خواهد شد (Vick & Zinnerman 1983). بررسی‌ها نشان داد میزان بیان ژن *LOX* درگیاهچه برنج مایه‌زنی شده با سویه ناسازگار *Acdiovorax avenae* sub sp. *avenae*، ۶ ساعت پس ازمایه‌زنی، افزایش یافته است (Tanaka *et al.* 2003).

ژن NH_1 (*NPR1* homologue) با نام‌های NIMI (Non-inducible immunity) و SAII (insensitive Salicylic acid - Holtrof *et al.* 2002) شناخته می‌شود. این ژن تنظیم کننده کلیدی در فهم و نسخه‌برداری از ژنهای *PRs* در پدیده SAR بوده و در مقاومت گیاهان علیه طیف وسیعی از بیمارگرها نقش مهمی دارد (Holtrof *et al.* 2002, Wang *et el.* 2018). مطالعات دیگر نشان داد این ژن در تنظیم ISR نیز نقش دارد. این ژن مسیر پایین دست سیگنال SA را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Bai *et al.* 2011). آلودگی ناشی از بیمارگر و تیمار با SA، ایندول اسید استیک (IAA/ Indole-3-Acetic Acid) و بنزوتیادیازول (BTH/Benzothiadiazole) سبب انتقال ژن NPR_1 از سیتوپلاسم به هسته، جائی که با فاکتور رونویسی TGA2 تعامل می‌کند شده و منجر به القای بیان چندین ژن از جمله ژن PR_1 می‌گردد (Mou *et al.* 2003). تجمع NPR_1 در سیتوپلاسم به صورت الیگومر بوده و در طول SAR در اثر تحریک ناشی از SA یا عوامل بیمارگر این پروتئین به شکل منومر درآمده و وارد هسته شده وسبب تحریک بیان ژن‌های *PR* می‌گردد. این فرآیند برای عملکرد مقاومت ضروری می‌باشد (Yuan *et al.* 2007). سطح اولیه SA در طول پاسخ دفاعی به طور موثری وابسته به قدرت HR یا مرگ سلولی ناشی از بیمارگر می‌باشد (Fu & Dong 2013). مطالعه روی انواع نسخه های NPR_1 مثل NPR_4، NPR_3 نشان داد میزان غلظت SA در تنظیم نهائی NPR_1 و HR نقش مهمی دارد. بررسی‌ها نشان داد سطح بالای غلظت SA در طول واکنش HR، سبب باند

شدن SA با NPR_3 و تقویت NPR_1 و در نهایت افزایش عملکرد NPR_1 و ژن‌های پایین دست می‌گردد. در مقابل غلظت پایین SA از طریق باند شدن NPR_1 با NPR_4 باعث تخریب عملکرد NPR_1 می‌شود (Fu & Dong 2013). در ارزیابی تاثیر عوامل القاگر مقاومت مانند SA (القا کننده شیمیایی) و قارچ *Piriformospora indica* (القا کننده بیولوژیکی) در بیان ژن NPR_1 در ساعات مختلف در برابر سفیدک سطحی گندم (*Blumeria graminnis* f. sp. *tritici*) نشان داد که القای بیان این ژن از ساعات اولیه (ساعت ۶) در رقم مقاوم تجن به وضوح مشهود می‌باشد (Ahangar *et al*, 2017).

ارتولوگ NPR_1 در برنج NH_1 نام دارد. آزمایشات نشان داد که بیش بیان (Overexpression) این ژن در برنج منجر به افزایش مقاومت به بیمارگر باکتریایی(*Xoo*) و بلاست (*M. oryzae*) شده است. بررسی بیش‌بیان ژن‌های $OsNPR_1$ ، $OsNPR_2$، $OsNPR_3$ در برنج به منظور افزایش مقاومت به باکتری سوختگی برنج نشان داد که تنها افزایش $OsNPR_1$ موجب افزایش مقاومت به باکتری *Xoo* می‌گردد (Yuan *et al*. 2007). بعلاوه مطالعه روی بیش بیان NH_1 منتهی به مقاومت بالا نسبت به *Xoo* و بروز HR نسبت به تنش‌هایی مثل نور، دما و BTH می‌گردد (Bai *et al*. 2011).

بررسی تغییرات مولکولی و الگوی بیان ژن‌های مقاومت از جمله پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی(Pathogenesis-related proteins) می‌تواند داده‌های سودمندی را در زمینهٔ حساسیت و مقاومت، فهم مکانیسم تعامل میزبان و بیمارگر و نهایت تعیین استرتژی مناسب مدیریت فراهم آورد. در این پژوهش به منظور فهم بهتر سازوکارهای ارقام حساس و مقاوم، الگوی بیان ژن‌های NH_1، PR_{13} و *LOX* در بازه های زمانی مختلف پس از آلودگی با استفاده از تکنیک Real-Time PCR مورد ارزیابی و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه جدایه باکتری

کلیه آزمایش‌ها با یک جدایه استاندارد و شناخته شده *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (442) با قدرت بیماریزایی بالا انجام گرفت. این باکتری از کلکسیون کشت بین المللی نیوزلند (ICMP) تهیه شد. جهت انجام آزمایش‌ها از پرگنه تازه باکتری رشد یافته در محیط کشت YDC (Yeast Dextrose $CaCo_3$) و NAS (Nutrient Agar Sucrose) در دمای ۲±۲۷ درجه سلسیوس استفاده شد. برای نگهداری طولانی مدت استرین خالص شده، در گلیسرول ۲۰٪ روی محیط (Luria Peptone LP Difco) در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Schaad *et al*. 2001, Sudhi *et al*. 2003, Khoshkdaman *et al*. 2012).

غربالگری ارقام نسبت به بیماری *Xoo*

برای این منظور گیاهچه‌های همسن از ۲۴ رقم مختلف برنج در شرایط گلخانه در مقابل باکتری *Xoo* مورد ارزیابی قرار گرفتند. طول لکه ایجاد شده (lesion length) به عنوان شاخص اصلی ارزیابی علایم بیماری در سطح برگ، مقاوم‌ترین و حساس‌ترین رقم و بینابین، انتخاب و آزمایشات بعدی از جمله ارزیابی بیان ژن روی ارقام انتخاب شده انجام شد (Adhikari & Mew, 1994, Gnanamanickam *et al*. 1999, Sodhi *et al*. 2003, Khoshkdaman *et al*. 2012, Derakhshan *et al*. 2020).

ارزیابی مولکولی و بیان ژن

استخراج mRNA

به منظور بررسی تعامل مولکولی و ارزیابی بیان ژن‌ها، پس از غربالگری اولیه ارقام تجاری برنج ایرانی (Derakhshan *et al*. 2020)، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین رقم به‌همراه یک رقم بینابین در بازه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲ و ۹۶ ساعت) بعد از مایه‌زنی، نمونه‌برداری (گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و

منابع طبیعی ساری) شد. نمونه ها بلافاصله در ازت مایع قرار گرفته، تا زمان استخراج RNA در فریزر در دمای ۸۰- درجه‌سلسیوس نگهداری شد (Thakur and Sohal, 2013). استخراج RNA از برگ‌های گیاهچه مایه‌زنی شده بر اساس کیت استخراج RNX-Plus انجام شد. در این روش از یک گرم بافت گیاهی استفاده شد (Sayari *et al*. 2014).

ساخت cDNA

سنتز cDNA از RNAهای استخراج شده بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده ازآغازگر Oligo(dT) و آنزیم Super Script Reverse Transcriptase انجام شد. نمونه‌ها جهت نگهداری به فریزر با دمای ۱۲°C- منتقل شد.

تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن

ارزیابی مولکولی ژنها به روش qPCR (Quantitative Real-time PCR) با استفاده از کیت SYBR Green و جفت آغازگرهای اختصاصی ژن‌های هدف (*NH1*، *LOX* و *PR13*) و ژن خانه زاد اکتین (*Actin*) به عنوان ژن کنترل داخلی، پس از نرمال سازی به وسیله دستگاه Step One Plus™ Real-Time PCR Systems انجام شد (جدول ۱). در واکنش qRT-PCR علاوه بر ژن اصلی و ژن کنترل داخلی، برای اطمینان از آلوده نبودن آغازگرها و یا cDNA مورد نظر از یک کنترل منفی که شامل همه مواد مورد نیاز برای واکنش به جز cDNA است نیز استفاده شد. واکنش‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر SYBR Green، ۰/۶ میکرولیتر پرایمر رفت (Forward Primer)، ۰/۶ میکرولیتر پرایمر برگشت(Reverse Primer)، ۳/۴ میکرولیتر آب و ۰/۴ میکرولیتر از نمونه cDNA بود. واکنش های زنجیره ای پلی مراز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۱۰ دقیقه ای در دمای°C ۹۴، سپس ۳۵ سیکل (شامل ۳۰ ثانیه در°C ۹۴، ۳۰ ثانیه در°C۶۰ و یک دقیقه در°C۷۲) و در نهایت مرحله گسترش نهایی بمدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۷۲ بود. قبل از تجزیه داده‌ها منحنی ذوب برای هر ژن به دست آمد و با بررسی این منحنی‌ها صحت پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید گردید. برای هر آزمایش سه تکرار زیستی و سه تکرار آزمایشگاهی در نظر گرفته شد. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Real-Time PCR، داده‌های خام به صورت C_t (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شدند. نرخ بیان هر ژن با استفاده از فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد (Livak & Schmittgen, 2001). رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft excel و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون Student's t-test به وسیله نرم افزار SPSS statistics انجام گردید (Livak & Schmittgen, 2001).

$\Delta C_T = (C_T$ ژن هدف $- C_T$ ژن خانه زاد$)$

$\Delta\Delta CT = ($ژن هدف ΔCT – ژن خانه زاد $\Delta CT)$

جدول۱. آغازگری های استفاده شده در بررسی واکنش بوته های برنج مایه زنی شده با باکتری *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*

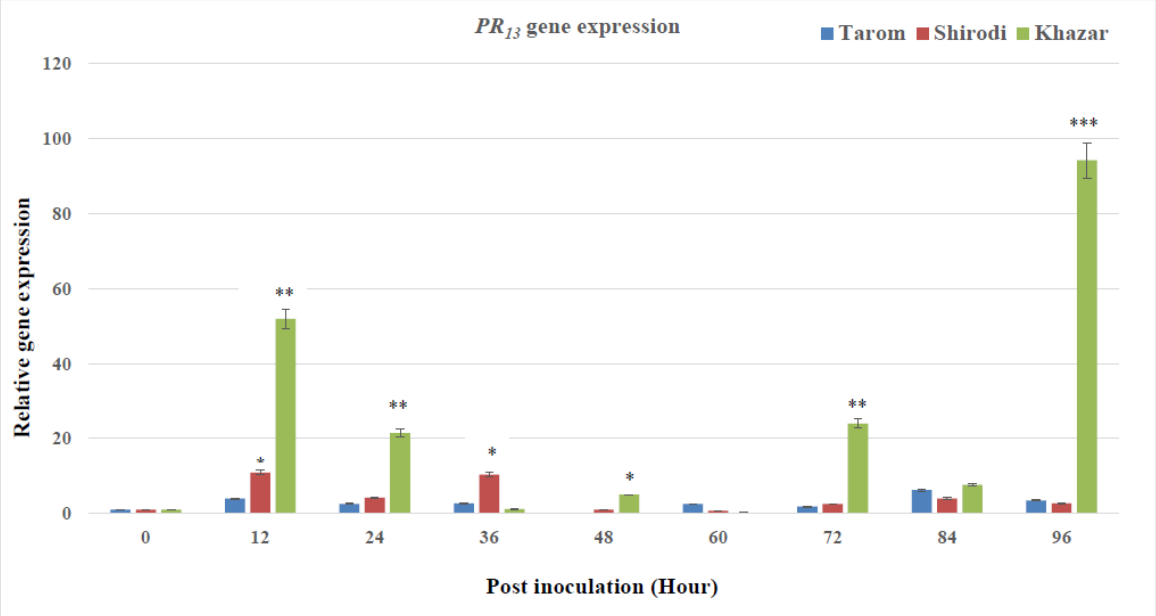
Table 1. Primers used to study the response of rice plants inoculated with the bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Gene	Sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Reference
Actin-F	ATCCTTGTATGCTAGCGGTCGA	60	Caldana *et al*. 2007
Actin-R	ATCCAACCGGAGGATAGCATG	60	Caldana *et al*. 2007
PR13-F	AGGGTGGTGCTTCAGCTTGT	60	Sayari *et al*. 2014
PR13-R	GGTGTTCTGCGAGGTGATGA	60	Sayari *et al*. 2014
NH1-F	GAACCCGGGATGGACACCACCATTG	59	Chern *et al*. 2001
NH1-R	AAGGATCCTCAAGGTACCTCCAAACCAAG	59	Chern *et al*. 2001
LOX-F	GGTGGAGCCATACATCATC	59	Sayari *et al*. 2014
LOX-R	GTTGATCCGCATCGTGTAG	59	Sayari *et al*. 2014

نتایج و بحث

الگوی بیان ژن PR_{13}

بررسی روند تغییرات ژن PR_{13} نشان داد که میزان بیان این ژن در رقم مقاوم خزر نسبت به رقم حساس طارم محلی پس از مایه‌زنی به میزان قابل توجهی افزایش یافت. میزان بیان این ژن در رقم خزر در ساعت ۱۲ پس از مایه‌زنی در سطح یک درصد با رقم حساس تفاوت معنی‌دار داشت. تفاوت مقدار بیان این ژن تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی نسبت به رقم حساس بسیار قابل تمایز بود. اوج گیری مجدد بیان این ژن در ساعت ۹۶ پس از مایه زنی احتمالا به دلیل تحریک ژن‌های مقاومت توسط جمعیت‌های جدید بیمارگر می‌باشد که در نهایت باعث افزایش بیان ژن واحتمالا بروز مقاومت از طریق تقویت و القا مسیرهای مقاومت سیستمیک می‌گردد (Sayari *et al*.2014, Iwai *et al*. 2007, Pieterse *et al*. 2012). میزان بیان این ژن در رقم مقاوم خزر در ۱۲، ۲۴ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی به ترتیب ۱۳، ۷ و ۲۳/۵ برابر نسبت به رقم حساس طارم محلی بود (شکل ۱).



شکل ۱- نرخ بیان ژن PR_{13} در ارقام طارم محلی (حساس) و خزر (مقاوم) و شیرودی (نیمه حساس) پس ازآلودگی با سوختگی باکتریایی برنج بر اساس آزمون T-test. اختلاف معنی دار درسطح 5 درصد با*، اختلاف معنی دار درسطح 1 درصد با ** و اختلاف معنی دار درسطح 0/1 درصد با * مشخص شده است.**

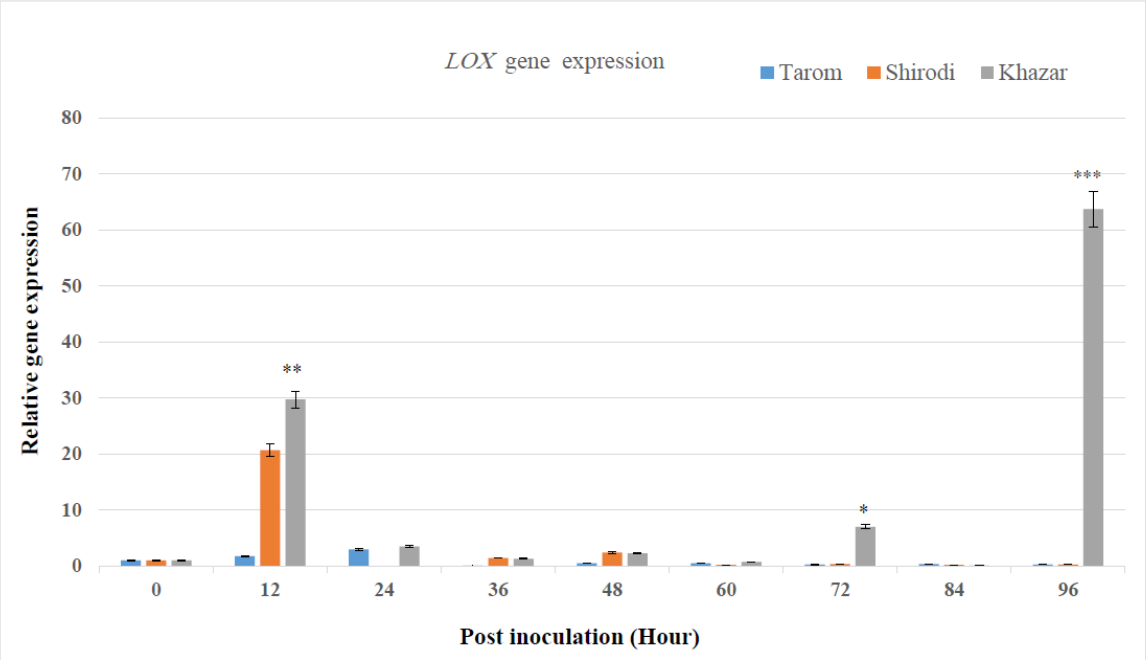
Figure 1. The expression rate of the PR_{13} gene in the local Tarom (sensitive), Khazar (resistant), and Shiroodi (semi-sensitive) cultivars after infection with the bacterial blight of rice was determined based on the T-test. Significant differences at the 5% level are indicated by *, significant differences at the 1% level by **, and significant differences at the 0.1% level by *.**

در مجموع با توجه به بیان بالای این ژن در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس در این تحقیق و اثبات ماهیت ضد میکروبی این ژن در تحقیقات متعدد به نظر می‌رسد PR_{13} در عکس العمل دفاعی رقم خزر نسبت به سوختگی باکتریایی نقش موثری ایفا کند. یافته‌های این پژوهش با یافته‌های سایر محققان نیز مطابقت دارد. یافته‌های قبلی این ژن را به عنوان یک ژن شاخص برای بروز مقاومت از طریق القای اسید جاسمونیک در واکنش‌های تنش و پاسخ‌های دفاعی معرفی نموده‌اند (Iwai *et al.* 2007). نقش ژن PR_{13} در مقاومت برنج به دو با کتری بذرزاد ثابت شده است (Iwai *et al.* 2007). مطالعات نشان داد بیان بالای این ژن ۲۴ ساعت پس از آلودگی گیاه برنج نسبت به قارچ عامل لکه قهوه‌ای برنج (*Bipolaris oryzae*) فرضیه ورود قارچ به فاز نکروتروفی و همچنین فعال شدن مسیرهای دفاعی وابسته به JA را تقویت کرده و در مجموع می‌توان استدلال کرد که مسیرهای وابسته به JA نقش فعالی در مقاومت گیاه برنج به بیماری لکه قهوه‌ای دارد (Iwai *et al.* 2007). ارزیابی مقاومت گیاه توتون (*Nicotiana attenuate*) نسبت به باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* نشان داد با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید (SA) بیان دو ژن PR_1 و PR_{13} (*Thionin*) نیز افزایش یافت. نقش ضد باکتریایی پروتئین *Thionin* در یک تحقیق ثابت شده است (Rayapuram, *et al.* 2008). بررسی فعالیت ژن‌های مسئول مقاومت NH_1، *PR* (5, 9, 10, 12, 13) در مقابل عامل شیت بلایت برنج (*Rhizoctonia solani*) نشان داد بیان این ژن‌ها در ارقام مقاوم نسبت به حساس، تفاوت معنی‌دار دارد (Sayari, *et al.* 2014). همچنین بررسی ها نشان داد بیش بیان PR_{13} باعث افزایش مقاومت علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها شده است (Chen *et al.* 2010b). ژن‌های *PR* از جمله تیونین به هورمون‌های گیاهی پاسخ‌های متفاوت دارند. فیتوهورمون‌ها نه تنها جنبه‌های رشد و توسعه را هماهنگ می‌کنند بلکه تعدیل کننده تنش ها و پاسخ‌های دفاعی گیاهان از جمله القای بیان ژن‌های *PRs* هستند (Pieterse *et al.* 2012). مطالعه تجمع سه ژن تیونین در ریشه گیاه برنج تیمار شده با ABA ((Abscisic acid))، (Methyl jasmonate)MeJA و BTH (Benzo-1, 2, 3-thiadiazole carbothioic acid S-methyl ester) نشان می‌دهد این ژنها در پاسخ دفاعی گیاه درپاسخ به حمله بیمارگر القا می شوند (Ji *et al.* 2015). گزارش های مختلفی از نشت یون‌ها از سلول‌های مختلف در تیمار PR_{13} وجود دارد. سمیت سیتوپلاسمی، بواسطه فعالیت فسفولیپازها ورود Ca^{2+} و بدنبال آن خروج یون فسفات و هیدرولیز ATP و کاهش میزان آن سبب مرگ سلولی شده است. لذا خروج یون‌ها و کاهش ATP و مرگ سلولی از پارامترهای اندازه‌گیری فعالیت تیونین استفاده می‌شود (Sudisha *et al.* 2012). نتایج بررسی‌ها نشان داد که خا صیت سمی تیونین‌ها بر روی بیمارگرها احتمالا به د لیل اثر این پروتئین‌ها بر غشای سلولی بیمارگر بوده و پس از تغییر نفوذپذیری آن منجر به بازداری از جذب قندها و نشست یون‌های پتاسیم، فسفر، پروتئین‌ها و نوکلئوتیدها از سلول می‌گردند (Bohlmann 1999, Iwai *et al.* 2007). بنابراین با توجه به مطالعات گذشته، افزایش بیان این ژن در ساعات اولیه پس از تلقیح در گیاه مقاوم (خزر) نسبت به حساس(طارم) را می‌توان چنین تفسیر کرد که فعال شدن ژن PR_{13} احتمالا باعث بروز تغییرات در غشای سلولی وبدنبال آن مرگ سول‌های باکتری و در نهایت منجر به کاهش خسارت بیماری در رقم مقاوم خزر می‌شود (Bohlmann 1999, Iwai *et al.* 200).

الگوی بیان لیپواکسیژناز (*LOX*)

بررسی روند تغییرات ژن *LOX* نشان داد که میزان بیان این ژن در رقم مقاوم خزر و رقم بینابین شیرودی نسبت به رقم حساس طارم محلی پس از مایه‌زنی به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. نتایج نشان داد بیان نسبی این

ژن در ساعت های ۱۲ و ۹۶ پس از مایه‌زنی در رقم مقاوم خزر به ترتیب ۱۴ و ۲۰۰ برابر رقم حساس بود. این اختلاف بیان در ساعت ۱۲ در سطح یک درصد و در ساعت ۹۶ در سطح ۰/۱ درصد در مقایسه با شاهد معنی‌دار می‌باشد(شکل ۲). اوج گیری مجدد بیان این ژن در ساعت ۹۶ پس از مایه زنی شاید توجیهی برای نقش این ژن در فعالیت مسیرهای مقاومت سیستمیک بودن از جمله ISR و محصولات دفاعی وابسته و ممانعت از توسعه بیماری باشد (Xu *et al.* 2018, Xiao, *et al.* 2009). در مجموع با توجه به بیان بالا و ماهیت این ژن به نظر می‌رسد که Lox در بروز عکس العمل دفاعی و فعال کردن مسیر مقاومت سیستمیک (مانند ISR)، رقم خزر حائز اهمیت باشد (Rance *et al.* 1998, Song & Goodman 2001, Xiao, *et al.* 2009).



شکل ۲- نرخ بیان ژن *LOX* در ارقام طارم محلی (حساس)، خزر (مقاوم) و شیرودی (نیمه حساس) پس ازآلودگی با سوختگی باکتریایی برنج بر اساس آزمون T-test. اختلاف معنی دار درسطح 5 درصد با*، اختلاف معنی دار درسطح 1 درصد با ** و اختلاف معنی دار درسطح ۰/۱ درصد با * مشخص شده است.**

Figure 2. The expression rate of the *LOX* gene in the local Tarom (sensitive), Khazar (resistant), and Shiroodi (semi-sensitive) cultivars after infection with the bacterial blight of rice was determined based on the T-test. Significant differences at the 5% level are indicated by *, significant differences at the 1% level by **, and significant differences at the 0.1% level by *.**

مطالعات نشان داد فعالیت لیپواکسیژناز بیوسنتز JA از اسید لینولنیک را تسریع می‌کند و به عنوان یک ژن دفاعی در برگ‌های برنج در برابر آلودگی ناشی از بیمارگرها تولید می‌شود. در واقع القای شدن فعالیت این ژن مرتبط با مقاومت برنج در برابر بیمارگرها می باشد (Rance *et al.* 1998, Xiao, *et al.* 2009, Liao *et al.* 2022). مولکول

هیدرو پروکسی لینولئیک اسید، یک پیش ماده برای ساخت اسید جاسمونیک (JA) می‌باشد که در نتیجه آلودگی به بیمارگرهای گوناگون مثل عامل بلاست افزایش یافته و در نهایت باعث تولید و تجمع فیتوالکسین در برنج می‌گردد (Vick and Zimmerman 1983, Chehab *et al*. 2008, Patel & Thakkar 2015). کاهش تجمع JA در گیاهانی که ژن *OsDR10* در آنها سرکوب شد باعث سرکوب ژن‌های *LOX* و *AOS* (آنزیم‌هایی که در بیوسنتز JA نقش دارند) پس از آلودگی باکتریایی می‌شود، این یافته‌ها نشان می دهد *OsDR10* یک فعال کننده مسیر وابسته به JA است و در بالادست JA عمل می کند (Xiao, *et al*. 2009). مطالعه فعالیت *LOX* در برگ گوجه فرنگی آلوده به *P. syringae* pv. *syringae* (مقاومت غیر میزبانی) در مقایسه با *P. syringae* pv. *tomato* (رابطه سازگار) نشان داد در تعامل ناسازگار میزان تولید و فعالیت *LOX* در بازه زمانی ۶ تا ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش و در ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از مایه زنی فعالیت آن به بیشترین سطح خود می‌رسد. این نتایج نشان می‌دهد القای اولیه *LOX* در مقاومت به بیماری نقش دارد. همچنین بیان *OsLox* از گیاهان برنج مایه‌زنی شده با استرین سازگار *Acdiovorax avenae* subsp. *avenae* ردیابی نشده است ولی در گیاهچه برنج با استرین ناسازگار افزایش بیان ژن *LOX* دربازه زمانی ۶ ساعت پس از تلقیح را نشان می‌دهد (Tanaka *et al*. 2003).

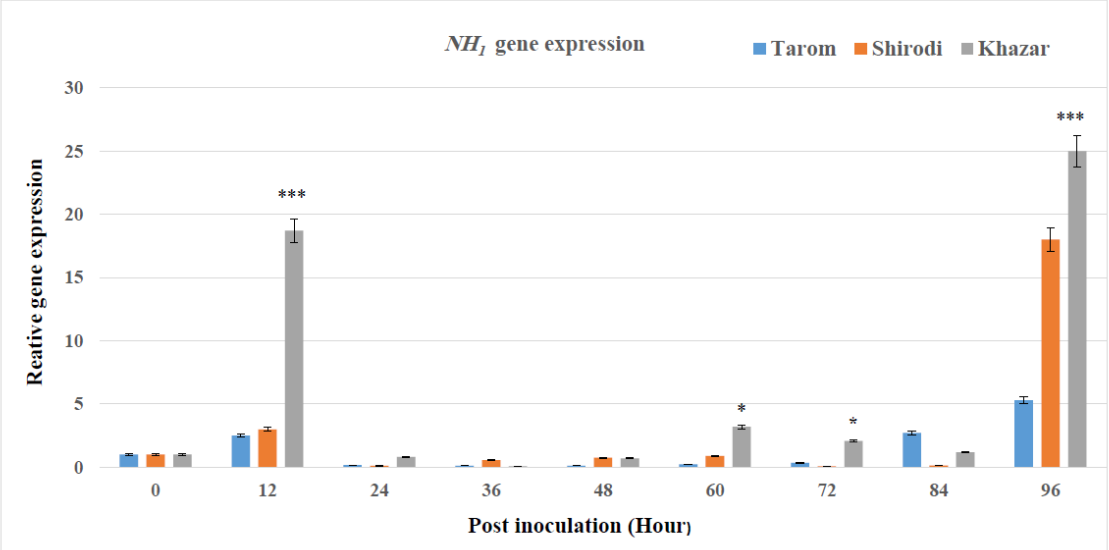
بیان ژن *LOX* در برنج ممکن است باعث تولید موادی نظیر رادیکال های آزاد و پراکسید هیدروژن گردد. این مواد می توانند سبب سمیت برای بیمارگر و در نتیجه از بین بردن آن شوند (Song and Goodman 2001). همچنین این ترکیبات می‌توانند به عنوان مولکول سیگنال جهت برانگیختن پاسخ های دفاعی گیاه و متعاقب آن باعث افزایش فعالیت PR پروتئین‌ها شوند. تیمار خارجی JA باعث تجمع پروتئین‌های PR_1، PR_3، PR_5 و PR_9 می‌شود (Tanaka *et al*. 2003). این نتایج نشان می‌دهد JA نقش واسط در القای ژن‌های مرتبط با دفاع در برابر عوامل بیمارگر در گیاه برنج را بازی می‌کند (Schweizer *et al*. 1997; Tanaka *et al*. 2003).

اوج گیری مجدد بیان این ژن در بازه زمانی ۹۶ ساعت پس از آلوده سازی احتمالا توجیهی برای نقش این ژن در فعال شدن مسیرهای مقاومت القایی سیستمیک از جمله ISR (Induced Systemic Resistance) و محصولات دفاعی وابسته و ممانعت از توسعه بیماری باشد (Xiao *et al*. 2009).

تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن *LOX* و افزایش بیان این ژن در ساعات اولیه پس از تلقیح باکتری نشان می‌دهد احتمالا افزایش بیان این ژن توام با افزایش فعالیت ژن *JA* در برنج پس از مایه‌زنی با باکتری عامل سوختگی بوده است. لذا با توجه به ماهیت این ژن در فعال کردن مسیر مقاومت القایی سیستمیک به نظر می رسد در واکنش دفاعی رقم خزر حائز اهمیت می‌باشد.

الگوی بیان ژن NH_1

میزان بیان ژن NH_1 در هر سه رقم مقاوم خزر، حساس طارم محلی و بینابین شیرودی ۱۲ ساعت پس از تلقیح نسبت به شاهد خود افزایش یافت. بیان آن در رقم مقاوم خزر در ساعت ۱۲ افزایش زیادی داشت و بعد از آن به‌شدت کاهش یافت. علی رغم کاهش نسبی بیان این ژن در رقم مقاوم در بازه‌های زمانی۶۰ و ۷۲ نسبت به رقم حساس، نرخ بیان آن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار داشت. فعالیت این ژن در بازه زمانی ۹۶ ساعت بعد از آلودگی مجددا روند افزایشی به خود گرفت. در زمان اوج بیان (ساعت ۹۶ پس از تلقیح)، میزان افزایش بیان این ژن در رقم مقاوم خزر ۵ برابر نسبت به رقم حساس طارم محلی بوده است (شکل ۳).



شکل ۳- نرخ بیان ژن *NH1* در ارقام طارم محلی (حساس) ، خزر (مقاوم) و شیرودی (نیمه حساس) پس ازآلودگی با سوختگی باکتریایی برنج بر اساس آزمون T-test. اختلاف معنی دار درسطح 5 درصد با*، اختلاف معنی دار درسطح 1 درصد با ** و اختلاف معنی دار درسطح ۰.۱ درصد با * مشخص شده است.**

Figure 3. The expression rate of the *NH1* gene in the local Tarom (sensitive), Khazar (resistant), and Shiroodi (semi-sensitive) cultivars after infection with the bacterial blight of rice was determined based on the T-test. Significant differences at the 5% level are indicated by *, significant differences at the 1% level by **, and significant differences at the 0.1% level by *.**

بررسی‌های مختلف نشان داد که افزایش بیان این ژن درگیاهان باعث القای مقاومت به بیمارگرها می‌شود. این ژن به عنوان تنظیم کننده اصلی و کلیدی مسیردفاعی در برابر بیمارگرها می‌باشد که سبب مقاومت گیاهان علیه طیف وسیعی از بیمارگرها شده و نقش مهمی در پدیده SAR و ISR دارد (Bai *et al.* 2011, Sayari *et al.* 2014). بیان این ژن یکی از اولین مراحل فعالیت مسیر SAR است که مسیر پائین دستی سیگنال SA را تحت تاثیر قرار می‌دهد. پروتئین NH_1 برای انتقال سیگنال SA ضرورت دارد (Bai *et al.* 2011; Wang *et al.* 2018). علاوه بر این مطالعات نشان داد تجمع NH_1 در سیتوپلاسم به صورت اولیگومر بوده و در طول SAR به دنبال حمله بیمارگرها و تجمع مولکول سیگنال SA به شکل مونومر در آمده ودر بیان ژن های *PR* مشارکت می‌کند(Yuan *et al.* 2007). بیش‌بیان ژن *NPR1* آرابیدوپیس (*At NPR1*) در برنج سبب افزایش مقاومت علیه چندین بیمارگر از جمله *Xoo* و *Erwinia chrysanthemi* شده است (Wang *et el.* 2018). نتایج بررسی نشان داد که ژن‌های *NPR1* و *PR1b* در مقاومت برنج به باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* نقش دارند (Yuan, *et al.* 2007,). همچنین ثابت شد که ژن *NPR1* به طور طبیعی در آرابیدوپیس بیان شده و می‌تواند به وسیله تیمار SA و سایر آنالوگ‌های آن و یا بیمارگر تحریک شود. با این وجود بیان طبیعی *NPR1* در غیاب عوامل محرک منجر به بیان ژن‌های *PRs* نمی‌شود

این نتایج مشخص می‌کند القای بیان پروتئین NPR_1 برای بروز پدیده SAR لازم است (Yuan *et al*. 2007).

در این پژوهش افزایش بیان ژن NH_1 بلافاصله در اولین بازه زمانی پس از آلودگی (۱۲ ساعت) نشان از ارتباط این ژن در مقاومت رقم خزر نسبت رقم حساس طارم محلی در برابر باکتری می‌باشد. با توجه به نقش تنظیم‌کنندگی این ژن در بیان ژن‌های *PRs* به نظر می‌رسد این ژن از ساعات اولیه پس از القا توسط عوامل مختلف تنش در گیاهان مقاوم بیان می‌شود (Chen *et al*. 2012, Ahangar *et al*. 2017). در ارزیابی تاثیر عوامل القا کننده مقاومت مانند SA و قارچ *Piriformospora indica* در بیان ژن NPR_1 در ساعات مختلف بعد از آلودگی به سفیدک سطحی گندم (*Blumeria graminnis* f. sp. *tritici*) نشان داد که القای بیان این ژن از ساعات اولیه (ساعت ۶) در رقم مقاوم تجن به وضوح مشهود می‌باشد (Ahangar *et al*. 2017). این ژن توام با فعالیت ژن‌های پایین دست شامل *PRs* و محصولات آن ها باعث بروز واکنش فوق حساسیت و القای پدیده SAR در رقم مقاوم و در نتیجه بروز مقاومت میزبان می‌شود. نتایج این تحقیق با یافته های پژوهش های گذشته همخوانی دارد (Derakhshan *et al*. 2023, Bai *et al*. 2011). افزایش مجدد این ژن در ساعت ۹۶ شاید کمکی در جهت پایداری بیشتر مکانیسم‌های دفاعی (مثل افزایش فعالیت *PRs*) و ممانعت از انتشار و تولید افکتورهای بیماریزایی باشد. بررسی های گذشته نیز نشان داد که بیان ژن NH_1 در برنج منجر به افزایش مقاومت به عامل بیماری بلایت باکتریایی (*Xoo*) و بیماری قارچی عامل بلاست (*Magnaporthe grisea*) شده است (Quilis *et al*. 2008).

چرن و همکاران (Chern *et al*. 2001) نشان دادند در برنج تراریخت شده با ژن NH_1 مقاومت به بیماری بلاست و بلایت باکتریایی با القای بیان ژن‌های pr_1b، pr_5، pr_{10} و pbz_1 افزایش یافت. مطالعات نشان داد فعالیت فاکتورهای ترانویسی (*WRKY*) توسط ژن NPR_1 سبب فعالیت ژن پایین دست PR_1b می‌گردد که نشان از نقش ژن‌های *PRs* از جمله PR_1b در واکنش دفاعی می باشد (Yuan *et al*. 2007, Wang *et al*. 2018, Gao *et al*. 2018).

اثبات نقش ژن‌های *PRs* درمقاومت علیه تنش‌های زنده و غیرزنده سبب شد تا بعنوان کاندیدای مهم در توسعه عملکرد مقاومت یا تحمل گیاه نسبت به تنش های مختلف انتخاب گردند. از این رو در تکنولوژی تراریخت سازی گیاهان، بطور وسیعی از آن‌ها به عنوان مهمترین فاکتورها برای توسعه مقاومت گیاهان تراریخت نام برده شده است (Ali *et al*. 2018). ارزیابی مکانیسم عمل این ژن‌ها نشان داد که *PRs* به عنوان ژن‌های مؤثر در القای مسیرهای پیام رسان وابسته به SA و JA در مدل دفاعی بسیاری از گیاهان زراعی بوده و به دنبال آن پاسخ‌های ایمنی کلیدی در میزبان در جهت ممانعت از آلودگی و استقرار بیمارگر شکل می گیرد (Ausubel, 2005, Ali *et al*. 2018; Jones & Dangl 2006). بطور کلی دفاع در گیاهان بر پایه پاسخ‌های دفاعی اولیه و پاسخ های القایی استوار است. این واکنش‌های اولیه، آغازگر شبکه‌های پیام رسانی بوده که سبب راه اندازی پاسخ‌های دفاعی سراسری می‌شوند. از جمله فعال کننده‌های پاسخ دفاعی گیاه میزبان افزایش بیان ژن‌های مقاومت، ترکیبات فنلی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی *PR* است که بطور معمول در گیاهان مقاوم ایجاد می‌شوند و سبب پاسخ HR نسبت به بیمارگرهای قارچی، ویروسی و باکتریایی می‌شوند (Golshani *et al*. 2015). در مجموع در برهمکنش سازگار و ناسازگار بین بیمارگر و گیاه میزبان صدها ژن تنظیم و بیان می‌شوند که در غالب موارد اختلاف بین مقاومت و حساسیت مرتبط با زمان، سرعت و سطح بیان و تفاوت در بیان مجموعه‌ای از ژن‌ها می‌باشد (Van Loon *et al*. 2006). نتایج این تحقیق همراه با

تحقیقات قبلی نشان داد افزایش بیان چند ژن *PRs* بطور همزمان، در اولین بازه زمانی پس از تلقیح برنج با بیمارگر *Xoo* در رقم مقاوم (خزر) نشان از یک پتانسیل ژنتیکی این رقم در مواجه با این باکتری می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک پشتوانه ژنتیکی در کاربرد رقم مقاوم به عنوان مناسب‌ترین روش مدیریت بیماری سوختگی باکتریایی ناشی از *Xoo* ، قابل استفاده باشد. همچنین با توجه به نتایج این تحقیق و پژوهش های گذشته به نظر می‌رسد در برهمکنش گیاه برنج و باکتری عامل سوختگی (*Xoo*)، القای ژن‌های *NH1*، *LOX*، PR_{13} و سایر ژن‌های دخیل در مقاومت در رقم مقاوم خزر، به فعال شدن مسیرهای مکانیسم مقاومت سیستمیک وابسته به مولکول‌های سیگنال SA و JA مرتبط باشد (Derakhshan *et al*. 2020, Derakhshan *et al*. 2023).

References **منابع**

Ahangar L., Ranjbar G.A., Babaeizad V., Najafi Zarrini H. and Biabani, A. 2017. Assay of NPR1 gene expression in wheat under powdery mildew stress. Journal of Crop Protection, 6(1): 157-166.

Ali S., Ganai B.A., Kamili A.N., Bhat A.A., Mir Z.A., Bhat J.A., Tyagi A., Islam S.T., Mushtaq M., Yadav P. and Rawat S. 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. Microbiological Research 212:.29-37. 10.1016/j.micres.2018.04.008.

Ausubel F.M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? Nature immunology 6(10): 973-979.

Bai W., Chern M., Ruan D., Canlas P. E., Sze - to W. H. and Ronald P. C. 2011. Enhanced disease resistance and hypersensitivity to BTH by introduction of an NH1/OsNPR1 paralog. Plant Biotechnology Journal 9: 205-15. 10.1111/j.1467-7652.2010.00544.x

Bohlmann H. and Apel K. 1991. Thionine. *Annual Review of Plant Biology*. 42: 227–240.

Caldana C., Scheible W.R., Mueller-Roeber B. and Ruzicic S. 2007. A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. Plant Methods 3: 1-7.

Chehab E, W., Kaspi R., Savchenko, T., Rowe H., Negre-Zakharov F., Kliebenstein, D. and Dehesh, K. 2008. Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses. *PloS one*, *3*(4): 1904. 10.1371/journal.pone.0001904.

Chen X., Chern M., Canlas PE., Ruan D., Jiang C. and Ronald PC. 2010b. An ATPase promotes autophosphorylation of the pattern recognition receptor XA21 and inhibits XA_{21}-mediated immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 8029–8034. 10.1073/pnas.0912311107.

Chen, J.W., Kuang J.F., Peng G. Wan S.B., Liu R.U.I., Yang Z.D. and Deng, H.H. 2012. Molecular cloning and expression analysis of a NPR1 gene from sugarcane. *Pakistan Journal of Botany*. *44*(1): 193-200.

Chern M.S., Fitzgerald H.A., Yadav R.C., Canlas P.E., Dong X. and Ronald P.C. 2001. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signaling pathway in Arabidopsis. The Plant Journal. 27(2): 101-113. 10.1046/j.1365-313x.2001.01070.x.

Derakhshan A., Babaeizad V., Panjekeh N. and Taheri A., 2020. Study of biochemical and molecular changes of iranian rice cultivars in interaction with bacterial pathogen Xanthomonas oryzae pv. oryzae causes leaf blight disease. Journal of Crop Breeding 12(36): 77-89. In Persian with English Summary. 10.52547/jcb.12.36.77.

Derakhshan A., Salari M., Babaeizad V., Radman N. and Taheri A.H., 2023. Involvement of *NPR1* and some pathogenesis-related genes in challenging with bacterial rice blight caused by *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*. Journal of Crop Breeding. In Persian with English Summary. 15(45): 115-124. 10.52547/jcb.15.45.115.

Fu Z.Q. and Dong, X. 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64: 839–863. 10.1146/annurev-arplant-042811-105606.

Gao J., Bi W., Li H., Wu J., Yu X., Liu D. and Wang, X. 2018**.** WRKY transcription factors associated with NPR1-mediated acquired resistance in barley are potential resources to improve wheat resistance to Puccinia

triticina. *Frontiers in plant science*, 9: 490-498. doi.org/10.3389/fpls.2018.01486

Golshani F., Fakheri B.A., Behshad E. and Vashvaei R.M. 2015. PRs proteins and their mechanism in plants. In Biological forum 7 (1): 477.

Holtrof H., Guitton M. and Reski R. 2002. Plant functional genomics. Naturwissenschaften 89: 235-249. 10.107/s00114-002-0321-3.

Horgana K. J. and Henderson J.O. 2015. Resistance genes of *Oryza sativa* for protection against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the causative agent of bacterial leaf blight. Journal of Student Research 4(1): 12-17. 10.47611/jsr.v4i1.202.

Iwai T., Seo S., Mitsuhara I. and Ohashi Y. 2007. Probenazole-induced accumulation of salicylic acid confers resistance to Magnaporthe grisea in adult rice plants. Plant and Cell Physiology 48(7): 915-924. 10.1093/pcp/pcm062.

Jain D., and Khurana J. P. 2018. Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction 265-281. 10.1007/978-981-10-7371-7_12.

Ji H., Gheysen G., Ullah C., Verbeek R., Shang C., De Vleesschauwer D., Höfte M. and Kyndt, T. 2015. The role of thionins in rice defence against root pathogens Molecular plant pathology 16(8): 870-881. 10.1111/mpp.12246.

Jiang L., Wu J., Fan S., Li W., Dong L., Cheng Q. 2015. Isolation and characterization of a novel pathogenesis-Related protein gene (GmPRP) with induced expression in soybean (Glycine max) during infection with phytophthora sojae. PLoS ONE 10(6): e0129932. 10.1371/journal.pone.0129932

Jiang N., Yan J., Liang Y., Shi Y., He Z., Wu Y., Zeng Q., Liu X. and Peng J. 2020. Resistance Genes and their Interactions with Bacterial Blight/Leaf Streak Pathogens (*Xanthomonas oryzae*) in Rice (*Oryza sativa* L.) - an Updated Review. Rice 13(1): 1-12. 10.1186/s12284-019-0358-y.

Jones J.D.G. and Dangl J.L. 2006. The plant immune system Nature 444: 323–329.

Khoshkdaman M., Ebadi A. A. and Kahrizi D. 2012. Evaluation of pathogencity and race classification of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* in Guilan province-Iran. Agricultural Sciences. 3(4): 561-557.

Kumar A., Guha A., Bimolata W., Reddy A.R., Laha G.S., Sundaram R.M., Pandey M.K. and Ghazi I.A. 2013. Leaf gas exchange physiology in rice genotypes infected with bacterial blight: An attempt to link photosynthesis with disease severity and rice yield. Australian Journal of Crop Science. 7(1): 32-39.

Liao, Z., Wang, L., Li, C., Cao, M., Wang, J., Yao, Z., Zhou, S., Zhou, G., Zhang, D. and Lou, Y., 2022. The lipoxygenase gene OsRCI-1 is involved in the biosynthesis of herbivore-induced JAs and regulates plant defense and growth in rice. *Plant, Cell & Environment*. *45*(9): 2827-2840. 10.1111/pce.14341

Liu W., Liu J., Triplett L., Leach J.E. and Wang G.L. 2014. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. Annual review of phytopathology 52: 213-241. 10.1146/annurev-phyto-102313-045926.

Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 25(4): 402-408. 10.1006/meth.2001.1262.

Oliveira M. D. M., C.M R. Varanda and M.R.F. Félix. 2016. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. Phytochemistry Letters, 15: 152-158. 10.1016/j.phytol.2015.12.011Get rights and content.

Patel D.D., Patel R.R. and Thakkar V.R. 2015. Purification, characterization and application of lipoxygenase isoenzymes from Lasiodiplodia theobromae. *Applied biochemistry and biotechnology*, *175*: 513-525. 10.1007/s12010-014-1278-3.

Peng Y. L., Y. Shirano H. Ohta T. Hibino K. Tanaka and D. Shibata. 1994. A novel lipoxygenase from rice, Primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. Journal of *Biological Chemistry*. 269: 3755-3761. 10.1016/S0021-9258(17)41924-7.

Pieterse C.M., Van der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A. and Van Wees S.C. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. Annual review of cell and developmental biology. 28: 489-521. 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055.

Quilis J., Peñas G., Messeguer J., Brugidou, C. and Segundo, B.S. 2008. The Arabidopsis *AtNPR1* inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to

abiotic stresses in transgenic rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21(9): 1215-1231. 10.1094/MPMI-21-9-1215.

Rayapuram C., Wu, J., Haas C. and Baldwin I.T. 2008. *PR-13/Thionin* but not *PR-1* mediates bacterial resistance in Nicotiana attenuata in nature, and neither influences herbivore resistance. Molecular plant-microbe interactions 21(7): 988-1000. 10.1094/MPMI-21-7-0988.

Sayari M., Babaeizad V., Ghanbari M.A.T. and Rahimian H. 2014. Expression of the pathogenesis related proteins, *NH-1, PAL,* and *lipoxygenase* in the Iranian Tarom and Khazar rice cultivars, in reaction to *Rhizoctonia solani*–the causal agent of rice sheath blight. Journal of Plant Protection Research 54(1): 36-43.

Schaad N.W., Joneas J.B .and Chun C. 2001. Laboratory Guid for identification of plant pathogenic bacteria. (Third edition) St Paul, Minnestota, APS press. 373 pp.

Schwessinger B. and Ronald P.C. 2012. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. Annual review of plant biology 63(1): 451-482.

Shen Y. and Ronald P. 2002. Molecular determinants of disease and resistance in interactions of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* and rice. Microbes and Infection 4(13): 1361-1367. 10.1016/S1286-4579(02)00004-7.

Sodhi M., Vikal Y., George M.L.C., Bala G.S., Mangat G.S., Garg M., Sidhu J.S. and Dhaliwal H.S. 2003. DNA fingerprinting and virulence analysis of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* isolates from Punjab, northern India. Euphytica 130(1): 107-115. 10.1023/A:1022329024651.

Song F. and Goodman R.M. 2001. Molecular biology of disease resistance in rice. Physiological and Molecular Plant Pathology 59(1): 1-11. 10.1006/pmpp.2001.0353.

Sudisha J., Sharathchandra R.G., Amruthesh K.N., Arun Kuma, and Shetty H. S. 2012. Pathogenesis related proteins in plant defense response. biological control. 379- 403. 10.1007/978-94-007-1933-0_17.

Tanaka N., Che F.S., Watanabe N., Fujiwara S., Takayama S. and Isogai A. 2003. Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H2O2 generation accompanying hypersensitive cell death and expression of PAL, Cht-1, and PBZ1, but not of Lox in rice. Molecular plant-microbe interactions. 16(5): 422-428. 10.1094/MPMI.2003.16.5.422.

Thakur M. and Sohal B.S. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. International Scholarly Research Notices 1:762412. 10.1155/2013/762412.

Van Loon L., Rep M. and Pieterse C. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44: 7-1. 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.

Venturi V. and Fuqua C. 2013. Chemical signaling between plants and plant-pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology. 51: 17-37. 10.1146/annurev-phyto-082712-102239.

Vick B.A. and Zimmerman D.C. 1983. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant *lipoxygenase*. Biochemical and biophysical research communications 111(2): 470-477. 10.1016/0006-291X (83)90330-3.

Wang X.D., Bi W.S., Jing G.A.O., Yu X.M., Wang H.Y. and Liu D.Q. 2018. Systemic acquired resistance, NPR_1, and pathogenesis-related genes in wheat and barley. Journal of integrative agriculture. 17(11): 2468-2477. 10.1016/S2095-3119(17)61852-5.

Xiao W., Liu H., Li Y., Li X., Xu C. Long M. and Wang S. 2009. A rice gene of de novo origin negatively regulates pathogen-induced defense response. *PloS one, 4*(2) :4603. 10.1371/journal.pone.0004603

Xu X., Chen Z., Shi Y.F., Wang H.M., He Y., Shi L., Chen T., Wu J.L. and Zhang X.B. 2018. Functional inactivation of OsGCNT induces enhanced disease resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. BMC plant biology 18(1): 264. 10.1186/s12870-018-1489-9.

Yuan Y., Zhong S., Li, Zhu Q, Z., Lou, Y., Wang L., Wang J., Wang M., Li Q., Yang D. and He Z. 2007. Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that *OsNPR1/NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. Plant Biotechnology Journal. 5(2): 313-324. 10.1111/j.1467-7652.2007.00243.x.