

Analysis of pathogenic proteins 1, 2, and 4 in resistant and susceptible soybean cultivars Challenged by *Macrophomina phaseolina*

1. Hadi Ranjkesh Shourkaei¹: Graduate M.Sc., Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Mohammad Ali Tajick Ghanbary^{2*}: Associate Professor, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Valiollah Babaeizad³: Professor, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
4. Valiollah Ghasemi Omran⁴: Assistant Professor Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

*Corresponding Author's Email Address: m.tajick@gmail.com

Article Type:

Original Research

Received: 26 January 2025

Revised: 22 March 2025

Accepted: 29 March 2025

How to Cite: Ranjkesh Shourkaei, H., Tajick Ghanbary, M. A., Babaeizad, V., & Ghasemi Omran, V. (2024). Analysis of pathogenic proteins 1, 2, and 4 in resistant and susceptible soybean cultivars Challenged by *Macrophomina phaseolina*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 60(2), 203-214.

DOI: 10.22034/ijpp.2025.2021836.476

Abstract:

Bell pepper (*Capsicum annuum* L.), in Solanaceae family plays a vital role in a healthy diet due to its fiber, vitamins, and minerals. Bell pepper production is significantly affected by viral, bacterial, fungal, and nematode infection. This study aimed to examine effects of cucumber mosaic virus (*Cucumovirus* CMV) and alfalfa mosaic virus (*Alfamovirus* AMV) infections on the morphological and physiological characteristics of the bell pepper cultivar California Wonder. The traits assessed included plant height, greenness index, leaf area index (LAI), fresh and dry weight of the plant, fresh fruit weight, total phenol content, vitamin C, chlorophyll a and b, carotenoids, and proximate composition, including moisture, protein, crude fiber, ash, crude fat, and carbohydrates. The results indicated that infection with CMV and AMV resulted in a significant reduction in plant height, greenness index, LAI, fresh and dry weight of the plant, chlorophyll a and b, carotenoids, vitamin C, and fresh fruit weight. No significant change was found in the total phenol content between infected and control plants. The percentages of moisture, protein, ash, crude fat, and carbohydrates were not affected by viral infections. However, the percentage of crude fiber significantly increased in infected plants. Overall, the findings of this study suggest that infection to CMV and AMV, reduces growth, yield, fresh fruit weight and vitamin C, leading to a decline in the nutritional value of bell pepper fruits.

Keywords: bell pepper, cucumber mosaic virus (CMV), alfalfa mosaic virus (AMV), Vitamin C



© 2024 the authors. Published by Maher Publishing Institute. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

Extended Abstract

Introduction

Soybean (*Glycine max* L.) is one of the major oilseed crops in the world and is widely cultivated. In addition to having a significant percentage of oil, soybeans also contain protein. The pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* is considered a very destructive agent for soybean and more than 500 other plant species and causes charcoal rot disease. The severity and prevalence of this disease have increased, especially in recent years, due to climate change. Charcoal rot symptoms usually appear after the flowering stage and become more severe during growth stages such as the formation of primary seeds, seed completion, and the beginning of maturity. In infected plants, the size of leaves and seeds usually decreases, and they dry out and die earlier. The fungus survives by producing microsclerotia in root and stem tissues and persists in the soil for up to four years after harvest, acting as a major source of disease transmission. This fungal pathogen is a necrotrophic pathogen, and since necrotrophic pathogens are more challenging to control, this pathogen has a significant economic impact on the agricultural sector. Charcoal rot management strategies, such as biological control and fungicide application, have shown limited success. Therefore, charcoal rot-tolerant soybean genotypes are the most sustainable strategy in terms of maintaining high yield and seed quality. In response to stress, plants activate a series of responses. Among these responses, the induction and accumulation of pathogenesis-related (PR) proteins play a special role. These proteins, as part of the plant's innate immunity, are of great importance in combating biotic and abiotic stresses. This study aims to identify mechanisms of resistance to charcoal rot by examining changes in the expression of pathogenicity-related genes in the most susceptible and resistant soybean cultivars at various times after infection. The results of this study can be used to pinpoint key genes involved in resistance to charcoal rot.

Materials and Methods

Plants displaying symptoms of charcoal rot in the crown were collected from soybean growing areas in Mazandaran province, specifically from Amol, Babol, Babolsar, Bahnmir, Jooybar, Ghaemshahr, and Behshahr. The fungus responsible was isolated by culturing in water agar medium, purified using the Hyphae tip technique, and identified through morphological methods. In the subsequent phase of the research, seeds of Sahar and JK cultivars were acquired from Tekato Oilseed Cultivation Development Company to assess soybean resistance. The seeds were disinfected to ensure uniform and pathogen-free seedlings, germinated, and then transplanted into plastic pots with sterile soil. These pots were placed in a growth chamber. Once the soybean plants reached six leaves, a suspension containing 1.2×10^4 spores per milliliter was prepared and added to the soil of 14-day-old soybean seedlings (JK and Sahar cultivars). Leaf samples were taken at intervals of zero (before inoculation) and at 24, 48, 72, 96, and 144 hours after inoculation. Total RNA was extracted from the leaves, its quality assessed, and genomic DNA removed from the RNA samples. Subsequently, cDNA was synthesized, and the expression analysis of *PR1*, *PR2*, and *PR4* genes was conducted using the Quantitative Real-Time PCR technique. The actin gene was selected as the housekeeping gene, and the results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula. This study was carried out as a factorial experiment in a completely randomized design, with Sahar and JK cultivars and three replications.

Resultss

Isolates obtained from infected plants formed white, fluffy colonies that changed to brown or gray over time, eventually turning black and producing a large number of microsclerotia in the culture medium. Based on the appearance and growth characteristics of these isolates, the fungus *M. phaseolina* was identified. The expression of *PR1*, *PR2*, and *PR4* genes in JK and Sahar cultivars gradually increased after fungal inoculation, reaching its highest level at 96 hours after infection. However, a decrease in

expression was observed in all three genes at 144 hours after infection. Comparison of gene expression levels in the two cultivars showed that at the peak, *PR1* gene expression in the JK cultivar was about 4.22 times higher than that in the Sahar cultivar. Additionally, the expression level of the *PR2* gene in the JK cultivar was 12.22, compared to 6.28 in the Sahar cultivar. *PR4* gene expression was also measured to be almost twice as high in JK compared to Sahar. Overall, in all time periods studied, the expression of genes associated with resistance was higher in JK than in Sahar. These results indicate genetic differences between the two cultivars that could affect their resistance to *M. phaseolina*.

Discussion

The use of fungicides is one of the common methods for controlling plant diseases. However, this method, while significantly increasing production costs, poses serious risks to human health and the environment. For this reason, the use of resistant varieties is one of the best methods for controlling the disease. One of the differences between varieties is the level of gene expression. It has been shown that the *PR1* protein is effective on the membrane, and increasing the expression of the *PR1* gene can modulate the level of reactive oxygen species and thus increase disease resistance in plants. The *PR2* family protein belongs to a group of proteins that, with their β -1,3-glucanase activity, hydrolyze the β -1,3-glycosidic bonds present in the glucans of the pathogen wall, thus causing the pathogen to be destroyed. The *PR4* protein acts as a chitinase and also has the ability to inhibit the growth of fungal mycelium. In this study, *PR1*, *PR2*, and *PR4* genes in the JK cultivar have higher expression against charcoal rot disease than the Sahar cultivar. The findings of this study showed that these genes play an important role in plant defense responses and can be used as suitable targets for the production of transgenic plants resistant to fungal diseases. However, for the practical use of these results in plant breeding, it is necessary to conduct complementary and more detailed studies. These studies can include investigating more detailed molecular mechanisms, assessing the stability of resistance under field

conditions, and analyzing possible effects on other plant traits. The results of this study can be an effective step towards developing new strategies for plant disease management.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest in conducting the present study.

Ethical Considerations

All ethical principles and standards were fully observed in the conduct of this research.

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to all those who contributed to the various stages of this study.

بررسی تغییرات پروتئین‌های وابسته به بیماریزائی ۱، ۲ و ۴ در دو رقم مقاوم و حساس سویا آلوده به *Macrophomina phaseolina*

۱. هادی رنجکش شورکایی^۱، دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲. محمدعلی تاجیک قنبری^۲، دانشیار، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۳. ولی‌اله بابایی‌زاد^۳، استاد، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۴. ولی‌اله قاسمی عمران^۴، استادیار پژوهشکده زیست فناوری طبرستان، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری تبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران

*پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.tajick@gmail.com

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۷ بهمن ۱۴۰۳

تاریخ بازنگری: ۲ فروردین ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: ۹ فروردین ۱۴۰۴

گیاه سویا (*Glycine max* L.) از مهم‌ترین منابع تغذیه‌ای برای انسان و دام محسوب می‌شود. یکی از تهدیدهای که هر ساله خسارات چشمگیری به این محصول وارد می‌کند، قارچ *Macrophomina phaseolina* است. گیاهان دارای سیستم‌های دفاعی پیچیده‌ای هستند که شامل سدهای فیزیکی و واکنش‌های بیوشیمیایی است. یکی از مهم‌ترین واکنش‌های بیوشیمیایی در گیاهان، القا و تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) است. که از گسترش بیشتر عفونت جلوگیری می‌کند. در این پژوهش، تعامل دو رقم تجاری سویا با قارچ *M. phaseolina* بررسی شد. گیاهچه‌های سویا در مرحله رشد شش برگه، با سوسپانسیون اسپور قارچ مایه‌زنی شده و نمونه‌برداری از برگ‌ها در بازه‌های زمانی مختلف پس از آلودگی (۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت) انجام گردید. سپس RNA کل از نمونه‌های برگ استخراج شد و در ادامه، cDNA از RNA کل ساخته شده و بیان ژن‌ها با استفاده از تکنیک Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR) بررسی گردید. نتایج تحقیق نشان داد که بیان ژن‌های *PR1*، *PR2* و *PR4* در رقم مقاوم JK نسبت به رقم حساس Sahar پس از مایه‌زنی به‌صورت تدریجی افزایش می‌یابد و معمولاً در ۹۶ ساعت پس از بیماری به حداکثر سطح خود می‌رسد. یافته‌های حاصل از این بررسی نشان داد، سطح بیان این ژن‌ها در ارقام مختلف سویا متفاوت است. این تفاوت در میزان بیان ژن‌ها می‌تواند یکی از عوامل کلیدی در تعیین میزان مقاومت یا حساسیت ارقام مختلف سویا در برابر این بیماری باشد. در نهایت، شناخت دقیق‌تر از مکانیسم‌های مولکولی مقاومت می‌تواند گامی مؤثر در جهت افزایش پایداری تولید محصولات کشاورزی باشد.

کلیدواژه‌گان: بیان ژن، پوسیدگی ذغالی، سویا

نحوه استناددهی: رنجکش شورکایی، هادی، تاجیک قنبری، محمدعلی، بابایی‌زاد، ولی‌اله، و قاسمی عمران، ولی‌اله. (۱۴۰۳). بررسی تغییرات پروتئین‌های وابسته به بیماریزائی ۱، ۲ و ۴ در دو رقم مقاوم و حساس سویا آلوده به *Macrophomina phaseolina*. بیماری‌های گیاهی، ۶۰(۲)، ۲۱۴-۲۰۳.

DOI:

10.22034/ijpp.2025.2021836.476



مجوز و حق نشر: © ۱۴۰۳ تمامی حقوق انتشار این مقاله متعلق به نویسنده است. انتشار این مقاله توسط انتشارات ماهر به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با گواهی (CC BY 4.0) صورت گرفته است.

سویا (*Glycine max* L.) یکی از محصولات اساسی در گروه دانه‌های روغنی در جهان محسوب می‌شود که به طور گسترده‌ای کشت می‌گردد. دانه‌های سویا علاوه بر داشتن درصد قابل توجهی روغن (تقریباً ۱۸ تا ۲۲ درصد)، حدود ۴۰ تا ۴۵ درصد پروتئین نیز دارا هستند. به همین علت، کشت این محصول به میزان زیادی انجام می‌شود (Meseldžija et al., 2020). اگرچه سویا در بسیاری از نقاط جهان کشت می‌شود، اما ۹۶/۲ درصد از تولید آن به ده کشور محدود می‌شود. در این میان، برزیل با ۱۲۱/۸ میلیون تن، ایالات متحده آمریکا با ۱۱۲/۵ میلیون تن و آرژانتین با ۴۸/۸ میلیون تن در صدر قرار دارند (Faostat, 2020). خشکی، به عنوان یکی از عوامل تنش غیرزیستی، نه تنها به صورت مستقل می‌تواند سبب کاهش عملکرد محصول سویا شود، بلکه زمینه مناسبی برای عفونت قارچی *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid نیز می‌شود. گزارش شده است که هرچه سویا بیشتر تحت تنش خشکی قرار گیرد، حساسیت آن به این بیماری افزایش می‌یابد (Kendig et al., 2000). قارچ بیماری‌زا *M. phaseolina* از عوامل بسیار مخرب برای سویا و بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی دیگر محسوب می‌شود و باعث بروز بیماری پوسیدگی ذغالی می‌گردد. شدت و شیوع این بیماری به ویژه در سال‌های اخیر به دلیل تغییرات اقلیمی افزایش یافته است (Cohen et al., 2022). در گیاهان آلوده معمولاً اندازه برگ و دانه کاهش و زودتر خشک شده و از بین بروند (Wrather et al., 2008). علائم پوسیدگی ذغالی معمولاً پس از مرحله گلدهی ظاهر شده و در مراحل رشد همچون تشکیل دانه‌های اولیه، تکمیل دانه و آغاز بلوغ، شدت بیشتری می‌یابند. این قارچ، که به عنوان یک پاتوژن خاکری و چند میزبان شناخته می‌شود، از طریق تولید میکرواسکلروت در بافت‌های ریشه و ساقه، بقا پیدا می‌کند. میکرواسکلروت‌ها ساختارهای سیاه‌رنگ شبیه به اسپور هستند که توانایی قارچ برای زنده ماندن در خاک را حتی تا چهار سال پس از برداشت

محصول حفظ کرده و به عنوان منبع اصلی شیوع این بیماری عمل می‌نماید

(Abbas et al., 2019).

این پاتوژن قارچی از نوع نکروتروف است و از آنجا که مقابله با عوامل بیماری‌زای نکروتروف چالش‌برانگیزتر است در نتیجه، این پاتوژن تأثیر اقتصادی قابل توجهی بر بخش کشاورزی دارد. استراتژی‌های مدیریت پوسیدگی ذغالی، مانند کنترل بیولوژیکی و کاربرد قارچ کش، موفقیت محدودی را نشان داده‌اند به همین دلیل، ژنوتیپ‌های سویا متحمل به پوسیدگی ذغالی پایدارترین استراتژی از نظر حفاظت از عملکرد بالا و کیفیت بذر است (Bellaloui et al., 2023). گیاهان اغلب با طیف گسترده‌ای از تنش‌های زیستی و غیرزیستی روبه‌رو می‌شوند. در واکنش به این تهدیدات، گیاهان مجموعه‌ای از ژن‌ها را فعال می‌کنند که نقشی کلیدی در دفاع آن‌ها ایفا می‌کند. از میان این واکنش‌ها، القا و تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) جایگاه ویژه‌ای دارد. این پروتئین‌ها به عنوان بخشی از ایمنی ذاتی گیاه، در مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی اهمیت زیادی دارند. عملکرد محافظتی پروتئین‌های PR با تجمع آن‌ها نه تنها در بافت‌های آسیب‌دیده و نواحی اطراف آن بلکه در بافت‌های دور از محل عفونت نیز مشاهده می‌شود که مانع گسترش بیشتر عفونت در گیاه می‌شود (Jain & Khurana, 2018). در سویا آلوده شده به *M. phaseolina*، بیان ژن دفاعی *PR1* در سویا تیمار شده با قارچ میکوریز و تیمار نشده افزایش پیدا کرد (Marquez et al., 2018). در تنباکوی تراریخته، پس از آلودگی با قارچ *M. phaseolina*، سطح بیان ژن‌های *PR2* و *PR5* افزایش پیدا کرد (Agarwal et al., 2018). در تحقیقی نشان داده شد در کینجد آلوده شده با *M. phaseolina* بیان ژن‌های β -1,3 glucanases و chitinases در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس، بیشتر و زودتر بودند (Radadiya et al., 2020). در پژوهشی در گیاهان سویا شاهد و تیمار شده با *Bacillus subtilis* پس از آلودگی با قارچ

پوسیدگی ذغالی ژن‌های *PR1* و *PR4* بیان داشتند اما در گیاهان تیمار شده با *B. subtilis* میزان بیان بیشتر بود (Chauhan et al., 2024).

این پژوهش با هدف شناسایی مکانیسم‌های مقاومت به این بیماری، تغییرات در بیان ژن‌های مرتبط بیماری‌زایی در حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ارقام سویا در زمان‌های مختلف پس از آلوده‌سازی بررسی می‌شود. نتایج این مطالعه می‌تواند، برای شناسایی ژن‌های کلیدی دخیل در مقاومت به پوسیدگی ذغالی باشد و با اصلاح ارقام مقاوم، به کاهش خسارت ناشی از این بیماری و تضمین تولید پایدار سویا کمک کند.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه: از مناطق سویا کاری در استان مازندران از شهرستان‌های آمل، بابل، بابلسر، بهنمیر، جویبار، قائمشهر و بهشهر نمونه برداری انجام گرفت. برای این منظور از گیاهانی که دارای علائم پوسیدگی ذغالی در طوقه بودند نمونه برداری به عمل آمد.

جداسازی و خالص سازی قارچ: از حاشیه قسمت‌های آلوده که در مجاورت بافت سالم بودند. قطعات یک تا دو سانتی‌متری تهیه شد. این قطعات به وسیله هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی شده و پس از دو بار شستشو با آب مقطر استریل با استفاده از کاغذ صافی خشک شدند. این قطعات در تشتک‌های پتری حاوی آب آگار قرار داده شدند. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. خالص سازی بیمارگر با استفاده از روش نوک ریشه انجام شد. کشت‌های جدید در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

شناسایی قارچ جداشده: برای شناسایی قارچ *M. phaseolina* از خصوصیات میکروسکوپی و ریخت شناسی استفاده گردید (Sinclair & Backman, 1989).

تیمار آزمایشی: مطالعه حاضر بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین بر اساس LSD در سطح ۰/۰۱ درصد توسط نرم افزار آماری SAS 9.1 انجام گرفت. نمودارهای بیان ژن با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم گردید. **تهیه بذر:** برای انجام این تحقیق رقم *Sahar* و *JK* از شرکت توسعه کشت دانه های روغنی تکاتو تهیه گردید.

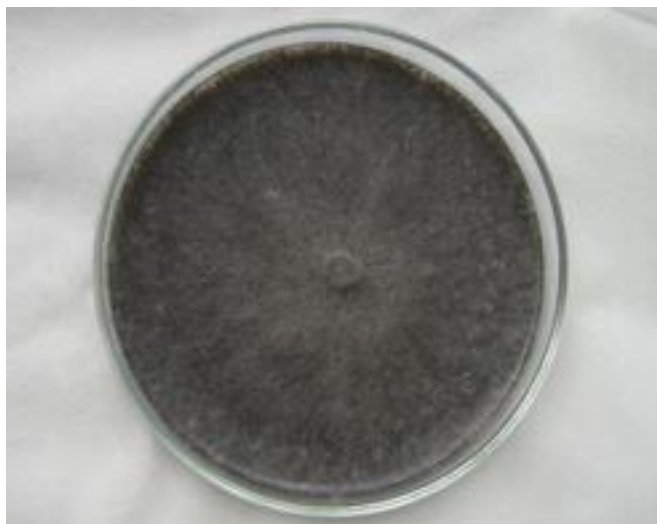
تولید گیاهچه و اعمال بیماری روی آن: در ابتدا بذور سویا با اتانول ۷۶ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی شدند و در نهایت با آب مقطر (استریل) شستشو شده و روی کاغذ صافی، درون تشتک‌های استریل قرار داده شدند. سپس برای جوانه دار شدن بذر، پس از مرطوب کردن کاغذ صافی با آب مقطر استریل، برای یکنواخت‌تر شدن جوانه‌زنی، پتری‌ها در ژرمیناتور با رطوبت نسبی بالای ۸۰ درصد و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و بعد از ۴۸ ساعت بذور جوانه زده، به گلدان‌های حاوی بستری که دوبار با اتوکلاو استریل شده بودند، منتقل شدند. گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با تناوب ۱۲ ساعت روشنایی با دمای ۲۸ درجه و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۲۳ درجه با رطوبت نسبی ۸۰ درصد به مدت دو هفته نگهداری شدند و زمانی که گیاه سویا واجد شش برگ شد مایه‌زنی روی آن انجام شد. جهت مایه‌زنی عامل بیماری بر روی گیاهچه‌های سویا، جدایه بهشهر قارچ *M. phaseolina* کشت داده و بعد از رشد کافی به پتری‌های مذکور آب مقطر استریل همراه با توئین ۲۰ (یک در هزار) اضافه کرده و سوسپانسیون با غلظت $1/2 \times 10^4$ اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد و به خاک گیاهچه‌های ۱۴ روزه سویا (رقم‌های *JK* و *Sahar*) اضافه گردید (Riggs et al., 1988). نمونه‌گیری در فواصل زمانی صفر پیش از مایه‌زنی و ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت پس از تلقیح انجام گرفت.

استخراج RNA: RNA از برگ‌های نمونه‌برداری شده در زمان‌های مختلف با استفاده از کیت *RNX Plus* از شرکت سیناژن استخراج گردید. برای

نتایج

شناسایی قارچ

جدایه‌های به‌دست‌آمده از گیاهان آلوده پرگنه‌هایی سفید و کرک‌دار تشکیل دادند که با گذشت زمان به رنگ قهوه‌ای تا خاکستری تغییر کرده و در نهایت پرگنه، به رنگ سیاه تبدیل شدند و میسلیم‌های قارچ دیواره‌دار بودند و پرگنه‌ها در دمای بالای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت زیادی رشد کرده و تعداد زیادی میکرواسکلروت در محیط کشت تولید می‌کردند. با توجه به ویژگی‌های ظاهری و رشدی پرگنه‌های این جدایه‌ها، قارچ *M. phaseolina* شناسایی شد (Sinclair & Backman, 1989).



شکل ۱- پرگنه قارچ *M. phaseolina* در پتری

Fig 1. *M. phaseolina* fungus colony in Petri

بررسی الگوی بیان ژن *PR1* در ارقام *Sahar* و *JK* در تعامل با قارچ

M. phaseolina

بیان ژن *PR1* در رقم *JK* و *Sahar* پس از تلقیح قارچ به تدریج افزایش یافت و در ۹۶ ساعت پس از آلودگی به بالاترین سطح خود رسید. با این حال، در ۱۴۴ ساعت پس از آلودگی کاهش مشاهده شد. میزان بیان این ژن

حذف DNA ژنومی از نمونه‌های RNA، از کیت RQ1 RNase-Free DNase ساخت شرکت Thermo طبق دستورالعمل تولیدکننده استفاده شد.

کیفیت نمونه‌های استخراج شده نیز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد ارزیابی گردید.

ساخت cDNA: سنتز cDNA با استفاده از کیت Revert Aid First

Strand از شرکت Thermo انجام شد. برای بررسی کیفیت نمونه‌های سنتز شده، از PCR با آغازگر اختصاصی *Actin* استفاده گردید.

بررسی بیان ژن‌ها: تجزیه و تحلیل بیان ژن با استفاده از تکنیک

Quantitative Real-Time PCR صورت پذیرفت. برای این کار از دستگاه

Applied Biosystems® StepOnePlus™ Real-Time PCR بهره گرفته

شد. کیت مورد استفاده در این واکنش Maxima SYBR Green/ROX

qPCR Master Mix (2X) از شرکت Thermo بود. نتایج با فرمول $(\Delta\Delta CT) -$

۲ تجزیه و تحلیل شدند. در این مطالعه، ژن *Actin* به عنوان ژن خانه‌دار و

ژن‌های *PR1*، *PR2* و *PR4* به عنوان ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفتند

(جدول ۱).

جدول ۱. 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)	Accession Number
Actin-F	CCAAACGAAGATGGCATGA	AK059783
Actin-R	CAAGTGGTCGCACAACTGGT	
PR1-F	ACCCACAATTGCACTGCATC	D16221
PR1-R	TGCTAACCAACGCAAGGTG	
PR2-F	TCAATGACCTCCTCTGCT	D14000
PR2-R	TCGGTGGTAGTGCAAGATGG	
PR4-F	TATTTGTCACCCGCAAGCAC	X16099
PR4-R	TTGGGACGCTAGCAAACTT	

در رقم مقاوم در زمان اوج، ۴/۲۲ برابر در رقم حساس اندازه‌گیری شد (شکل ۲).

PR1 از فرواترین پروتئین‌های PR محسوب می‌شوند (Lu et al., 2011) و غنی از سیستمی می‌باشند که در بافتهای مختلف گیاهی مثل دیواره سلولی، دستجات آوندی و واکوئل‌ها وجود دارند (Hoegen et al., 2002) و دارای وزن مولکولی کم (۱۷-۱۵ کیلودالتون) هستند. به نظر می‌رسد این پروتئین بر روی غشا موثر باشد، اما مکانیسم دقیق فعالیت ضد میکروبی این گروه به خوبی شناخته نشده است (van Loon et al., 2006) با این حال پروتئین‌های PR1 در گیاهان ساختار بسیار محافظت‌شده و ویژگی‌های مشترکی دارند که بیانگر نقش عمومی آنها در پاسخ به تنش‌های زیستی است و همچنین نشان داده شده است که افزایش بیان ژن PR1 می‌تواند موجب تعدیل سطح گونه‌های اکسیژن فعال شده و به این ترتیب مقاومت به بیماری در گیاهان را افزایش دهد (Lincoln et al., 2018).

فعالیت ضد میکروبی پروتئین PR1 برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ شناسایی شد، زمانی که ژئوسپوره‌های *Phytophthora infestans* با پروتئین‌های خالص‌شده PR1 از گیاهان تنباکو و گوجه‌فرنگی مورد آزمایش قرار گرفتند، نتایج نشان داد که PR1 جوانه‌زنی اسپورها را تا بیش از ۹۰ درصد کاهش می‌دهد (Niderman et al., 1995). همچنین، بیان بیش از حد PR1 در گیاهان تراریخته، توانایی آلوده کردن پاتوژن‌هایی مانند اومیس‌ها روی گوجه‌فرنگی و تنباکو و قارچ *Uromyces fabae* بر روی لوبیا را مهار می‌کند (Alexander et al., 1993; Li et al., 2011; Rauscher et al., 1999). پس از این مطالعات اولیه، تحقیقات بعدی نیز فعالیت مستقیم ضد میکروبی پروتئین‌های PR1 را در شرایط آزمایشگاهی در برابر پاتوژن‌های گیاهی متعددی شامل اومیس‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها تأیید کرد (Gamir et al., 2017; Ghorbel et al., 2021; Guo et al., 2022). همچنین نشان داده شده است که سطح رونویسی و ترجمه پروتئین‌های PR1 در پاسخ به

تنش زیستی و غیرزیستی به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (Ali et al., 2018; Hou et al., 2012; Liu et al., 2013; Shi et al., 2019; Tunsagool et al., 2019; Wang et al., 2011; Yang et al., 2019). در بررسی انجام شده نیز بیان ژن PR1 در زمان‌های مختلف پس از آلودگی، افزایش یافته و پس از گذشت ۹۶ ساعت از تلقیح قارچ عامل بیماری به بیشترین سطح نسبت به زمان شاهد رسیده است. بیشتر بودن بیان این ژن در رقم مقاوم JK نسبت رقم حساس Sahar، در تمام زمان‌های مورد بررسی، می‌تواند بیان گر نقش مهم این ژن در مقاومت و جلوگیری از گسترش بیمارگر باشد (جدول ۲).

تغییرات بیان ژن PR2 در ارقام Sahar و JK در تعامل با قارچ M.

phaseolina

سطح بیان ژن PR2 در هر دو رقم JK و Sahar پس از آلودگی به تدریج افزایش یافته و در ۹۶ ساعت پس از آلودگی به حداکثر میزان خود رسید که در رقم JK برابر با ۱۲/۲۲ و در رقم Sahar معادل ۶/۲۸ بود. سپس در ۱۴۴ ساعت پس از آلودگی کاهش یافت. همچنین، در تمامی بازه‌های زمانی بررسی‌شده، میزان بیان ژن در رقم JK بیشتر از رقم Sahar مشاهده شد (شکل ۲).

خانواده PR2 متعلق به گروهی از پروتئین‌هایی است که با فرآیندهای دفاعی در گیاهان مرتبط هستند. این پروتئین‌ها با فعالیت بتا-۳،۱ گلوکانازی خود، پیوندهای بتا-۳،۱ گلیکوزیدی موجود در گلوکان‌های دیواره پاتوژن‌ها را هیدرولیز می‌کنند و به این ترتیب باعث تخریب پاتوژن می‌شوند. این خانواده در گیاهان مختلف به صورت ایزوفرم‌های متنوعی حضور دارند (Leubner-Metzger & Meins, 1999). همچنین پخش شدن قطعات دیواره سلولی به عنوان الیستور عمل نموده و سیستم دفاعی گیاه را فعال می‌نماید (van Loon et al., 2006).

terminal chitin-binding domain (ChtBD) به دو کلاس I و II تقسیم می‌شوند. همچنین مطالعات پیشین نشان داده‌اند که *PR4* علاوه بر فعالیت DNase، توانایی مهار رشد میسلیم قارچ را نیز دارد (Menezes et al., 2014). بر اساس گزارش‌ها، پروتئین *PR4b* در گیاهانی مانند فلفل (*Capsicum annuum*)، گندم (*Triticum aestivum*) و برنج (*Oryza sativa* L.) دارای خاصیت ضد قارچی است (Hong et al., 2017). مطالعات نشان داده است افزایش بیان ژن‌های بتا-۳،۱ گلوکاناز و کیتیناز در انگور به طور قابل توجهی مقاومت این گیاه را در برابر بیماری سفیدک پودری افزایش می‌دهد (Nookaraju & Agrawal, 2012). همچنین در یک آزمایش، ژن *PR4* در انگور تحت جهش قرار گرفت و سپس به عامل بیماری‌زای *Plasmopara viticola* آلوده شد. نتایج حاصل نشان داد که انگورهای وحشی در مقایسه با انگورهای جهش‌یافته مقاومت بیشتری در برابر *P. viticola* از خود نشان می‌دهند (Li et al., 2020). در بررسی انجام شده نیز بیان ژن *PR4* در زمان‌های مختلف پس از آلودگی افزایش یافته و پس از گذشت ۹۶ ساعت از تلقیح قارچ عامل بیماری به بیشترین سطح نسبت به زمان شاهد رسیده است. بیشتر بودن بیان این ژن در رقم مقاوم JK نسبت به رقم حساس *Sahar*، در تمام زمان‌های مورد بررسی، می‌تواند بیان گر نقش مهم این ژن در مقاومت و جلوگیری از گسترش بیمارگر باشد که با نتایج کالونک و همکاران (Calonnec et al., 2021) مطابقت دارد.

جدول ۲- مقایسه میانگین بین رقم‌ها در میزان در ژن‌های *PR1*.

PR4 و *PR2*

Table 2. Comparison of the average between numbers in *PR1*, *PR2* and *PR4* genes

<i>PR4</i>	<i>PR2</i>	<i>PR1</i>	Cultivar
1.20442 ^a	0.99098 ^a	0.34640 ^a	JK
0.50658 ^b	0.40184 ^b	0.09543 ^b	Sahar

در این بررسی بیان ژن *PR2* در هر دو رقم *Sahar* و JK پس از تلقیح بیماری افزایش می‌یابد. افزایش بیان ژن در ساعت ۲۴ پس از آلودگی آغاز شده و با توجه به بیولوژی قارچ *M. phaseolina*، با روند به نسبت کندی ادامه پیدا کرده است. تا اینکه در ساعت ۹۶ پس از تلقیح به حداکثر سطح خود رسید که این افزایش در رقم JK نسبت به رقم *Sahar* قابل توجه است. نتایج تحقیق ما با مطالعات پیشین هماهنگ است، که نشان داده‌اند سطوح بالاتری از *PR2* در ارقام مقاوم نخود در مقایسه با ارقام حساس، پس از بیماری با *Fusarium oxysporum* مشاهده شده است (Raju et al., 2008). این موضوع همچنین در انگور پس از آلودگی به بیماری‌های سفیدک کرکی و کپک خاکستری نیز گزارش شده است (Lakkis et al., 2019). در پژوهشی، رقم مقاوم و حساس جو به *Pyrenophora teres* و *Pyrenophora graminea* آلوده شدند و بیان ژن‌های *PAL* و *PR2* با استفاده از روش qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که رقم مقاوم در مقایسه با رقم حساس، پس از آلودگی با هر دو پاتوژن، بیان بالاتری از این ژن‌ها را نشان می‌دهد (Arabi et al., 2020).

بیان ژن *PR4* پس از آلودگی در ارقام JK و *Sahar*

بیان ژن *PR4* در دو رقم گندم JK و *Sahar* پس از آلودگی، به‌طور تدریجی روند افزایشی داشت. تحلیل‌ها نشان دادند که از زمان آلودگی تا ساعت ۹۶، میزان بیان این ژن در هر دو رقم به‌صورت پیوسته افزایش یافته و در این بازه زمانی به حداکثر مقدار خود رسیده است. با این حال، سطح بیان ژن *PR4* در رقم JK به‌طور قابل توجهی بیشتر از رقم *Sahar* بود و تقریباً دو برابر آن اندازه‌گیری شد. پس از رسیدن به اوج در ساعت ۹۶، میزان بیان ژن در هر دو رقم در ساعت ۱۴۴ کاهش یافت (شکل ۲).

یکی از رایج‌ترین پروتئین‌های PR، پروتئین *PR4* محسوب می‌شود که به‌عنوان یک کیتیناز و همچنین پروتئین متصل‌شونده به کیتین عمل می‌کند (Melchers et al., 1994) که بر اساس وجود یا عدم وجود amino-

نتیجه‌گیری:

استفاده از قارچ‌کش‌ها یکی از روش‌های رایج برای کنترل بیماری‌های گیاهی محسوب می‌شود، اما این روش ضمن افزایش قابل توجه هزینه‌های تولید، خطرات جدی برای سلامت انسان و محیط زیست ایجاد می‌کند. به همین دلیل، استفاده از ارقام مقاوم یکی از بهترین روش‌ها برای کنترل بیماری است. در این پژوهش ژن‌های *PR1*، *PR2* و *PR4* در رقم *JK* نسبت به رقم *Sahar* بیان بیشتری در برابر بیماری پوسیدگی ذغالی دارند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که این ژن‌ها نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی گیاه ایفا می‌کنند و می‌توانند به عنوان اهدافی مناسب برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری‌های قارچی مورد استفاده قرار گیرند. با این حال، برای استفاده عملی از این نتایج در به‌نژادی گیاهان، انجام مطالعات تکمیلی و دقیق‌تر ضروری است. این مطالعات می‌توانند شامل بررسی مکانیسم‌های مولکولی دقیق‌تر، ارزیابی پایداری مقاومت در شرایط مزرعه‌ای و همچنین تحلیل اثرات احتمالی بر سایر ویژگی‌های گیاه باشند. نتایج این پژوهش می‌تواند گامی مؤثر در جهت توسعه راهکارهای نوین برای مدیریت بیماری‌های گیاهی باشد.

تعارض منافع

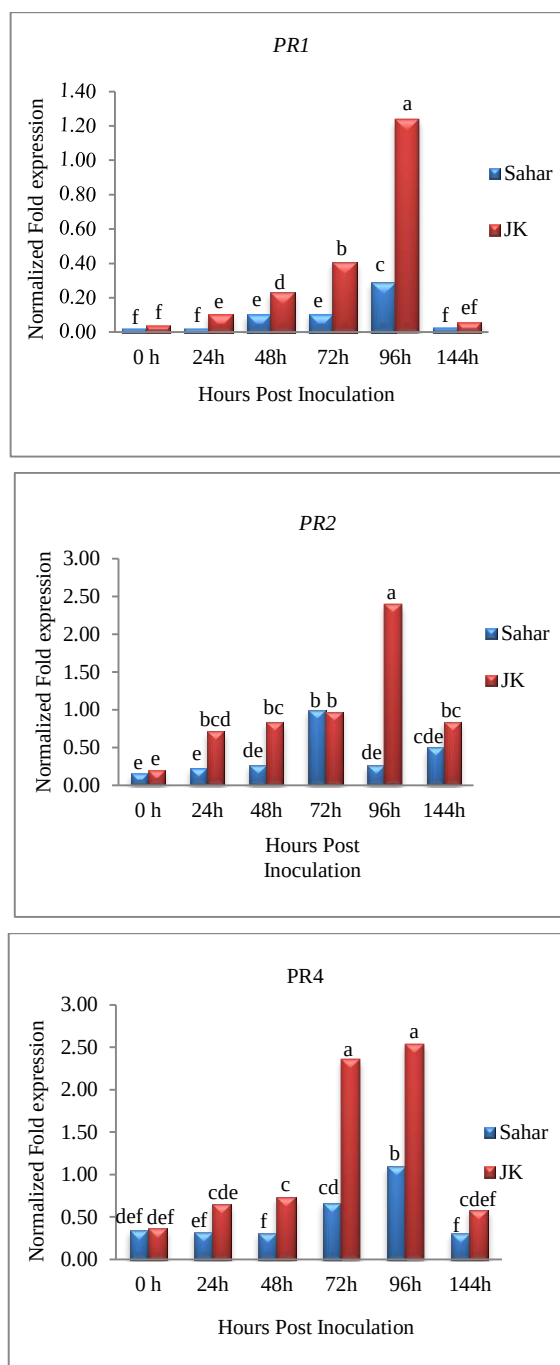
در انجام مطالعه حاضر، هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

موازن اخلاقی

در انجام این پژوهش تمامی موازن و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.

سپاسگزاری

از تمامی کسانی که در طی مراحل این پژوهش یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌گردد.



شکل ۲- بیان ژن‌های *PR1*، *PR2* و *PR4* در زمان‌های مختلف پس

از آلودگی با *M. phaseolina*

Fig 2. The Expression of *PR1*, *PR2* and *PR4* gene over hours post-inoculation with *M. phaseolina*

References

- Abbas, H. K., Bellaloui, N., Accinelli, C., Smith, J. R., & Shier, W. T. (2019). Toxin production in soybean (*Glycine max* L.) plants with charcoal rot disease and by *Macrophomina phaseolina*, the fungus that causes the disease. *Toxins*, 11(11), 645. [Link]
- Agarwal, P., Patel, K., & Agarwal, P. K. (2018). Ectopic expression of JcWRKY confers enhanced resistance in transgenic tobacco against *Macrophomina phaseolina*. *DNA and Cell Biology*, 37(4), 298-307. [Link]
- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., & Ward, E. S. C. H. E. R. I. C. H. I. (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(15), 7327-7331. [Link]
- Ali, S., Mir, Z. A., Bhat, J. A., Tyagi, A., Chandrashekar, N., Yadav, P., & Grover, A. (2018). Isolation and characterization of systemic acquired resistance marker gene PR1 and its promoter from *Brassica juncea*. *3 Biotech*, 8, 1-14. [Link]
- Arabi, M. I. E., Alek, H., Jawhar, M., & Al-Shehadah, E. (2020). Expression of PAL and PR2 pathogenesis related genes in barley plants challenged with closely related *Pyrenophora* species. *Cereal Research Communications*, 48, 211-216. [Link]
- Bellaloui, N., Mengistu, A., Smith, J. R., Abbas, H. K., Accinelli, C., & Shier, W. T. (2023). Soybean Seed Sugars: A role in the mechanism of resistance to charcoal rot and potential use as biomarkers in selection. *Plants*, 12(2), 392. [Link]
- Calonnec, A., Jolivet, J., Ramaroson, M. L., Dufour, M. C., & Corio-Costet, M. F. (2021). Defence responses of grapevine cultivars to powdery mildew: Ontogenic resistance versus genetic resistance. *Plant Pathology*, 70(7), 1583-1600. [Link]
- Chauhan, P., Verma, P., Bhattacharya, A., Narayan, S., Sharma, M. P., Choure, K., & Mishra, A. (2024). Intervention of *Bacillus subtilis* Enhance Defence Activity in Soybean as Compared to Chemical Fungicide During Charcoal Rot Disease. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-16. [Link]
- Cohen, R., Elkabetz, M., Paris, H. S., Gur, A., Dai, N., Rabinovitz, O., & Freeman, S. (2022). Occurrence of *Macrophomina phaseolina* in Israel: Challenges for disease management and crop germplasm enhancement. *Plant Disease*, 106(1), 15-25. [Link]
- Faostat. (2020). *Crops and livestock products* (
- Gamir, J., Darwiche, R., Van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneider, R., & Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *The Plant Journal*, 89(3), 502-509. [Link]
- Ghorbel, M., Zribi, I., Missaoui, K., Drira-Fakhfekh, M., Azzouzi, B., & Brini, F. (2021). Differential regulation of the durum wheat Pathogenesis-related protein (PR1) by Calmodulin TdCaM1. 3 protein. *Molecular Biology Reports*, 48, 347-362. [Link]
- Guo, J., Bai, Y., Wei, Y., Dong, Y., Zeng, H., Reiter, R. J., & Shi, H. (2022). Fine-tuning of pathogenesis-related protein 1 (PR1) activity by the melatonin biosynthetic enzyme ASMT2 in defense response to cassava bacterial blight. *Journal of Pineal Research*, 72(2), e12784. [Link]
- Hoegen, E., Strömberg, A., Pihlgren, U., & Kombrink, E. (2002). Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Molecular Plant Pathology*, 3(5), 329-345. [Link]
- Hong, J. K., Hwang, I. S., & Hwang, B. K. (2017). Functional roles of the pepper leucine-rich repeat protein and its interactions with pathogenesis-related and hypersensitive-induced proteins in plant cell death and immunity. *Planta*, 246, 351-364. [Link]
- Hou, L., Gao, C., Che, Y., Zhao, F., & Liu, X. (2012). Gene cloning and expression analysis of pathogenesis-related protein 1 in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology Communications*, 48(1), 57-62. [Link]
- Jain, D., & Khurana, J. P. (2018). Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In *Molecular aspects of plant-pathogen interaction* (pp. 265-281). https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12
- Kendig, S. R., Rupe, J. C., & Scott, H. D. (2000). Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. *Plant Disease*, 84(8), 895-900. [Link]
- Lakkis, S., Trotel-Aziz, P., Rabenoelina, F., Schwarzenberg, A., Nguema-Ona, E., Clément, C., & Aziz, A. (2019). Strengthening grapevine resistance by *Pseudomonas fluorescens* PTA-CT2 relies on distinct defense pathways in susceptible and partially resistant genotypes to downy mildew and gray mold diseases. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1112. [Link]
- Leubner-Metzger, G., & Meins, F. J. R. (1999). Functions and regulation of plant β -1, 3-glucanases (PR-2). In *Pathogenesis-related proteins in plants* (pp. 49-76). <https://doi.org/10.1201/9781420049299.ch3>
- Li, M. Y., Jiao, Y. T., Wang, Y. T., Zhang, N., Wang, B. B., Liu, R. Q., & Liu, G. T. (2020). CRISPR/Cas9-mediated VvPR4b editing decreases downy mildew resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Horticulture Research*, 7. [Link]
- Li, Z. T., Dhekney, S. A., & Gray, D. J. (2011). PR-1 gene family of grapevine: a uniquely duplicated PR-1 gene from a *Vitis* interspecific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*, 30, 1-11. [Link]
- Lincoln, J. E., Sanchez, J. P., Zumstein, K., & Gilchrist, D. G. (2018). Plant and animal PR1 family members inhibit programmed cell death and suppress bacterial pathogens in plant tissues. *Molecular Plant Pathology*, 19(9), 2111-2123. [Link]
- Liu, W. X., Zhang, F. C., Zhang, W. Z., Song, L. F., Wu, W. H., & Chen, Y. F. (2013). Arabidopsis Di19 functions as a transcription factor and modulates PR1, PR2, and PR5 expression in response to drought stress. *Molecular Plant*, 6(5), 1487-1502. [Link]
- Lu, S., Friesen, T. L., & Faris, J. D. (2011). Molecular characterization and genomic mapping of the pathogenesis-related protein 1 (PR-1) gene family in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 285, 485-503. [Link]
- Melchers, L. S., Groot, M. A. D., Van Der Knaap, J. A., Ponstein, A. S., Sela-Buurlage, M. B., Bol, J. F., & Linthorst, H. J. (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *The Plant Journal*, 5(4), 469-480. [Link]
- Menezes, S. P., de Andrade Silva, E. M., Lima, E. M., de Sousa, A. O., Andrade, B. S., Lemos, L. S. L., & Micheli, F. (2014). The pathogenesis-related protein PR-4b from *Theobroma cacao* presents RNase activity, Ca²⁺ and Mg²⁺ dependent-DNase activity and antifungal action on *Moniliophthora perniciosa*. *BMC Plant Biology*, 14, 1-21. [Link]

- Meseldžija, M., Rajković, M., Dudić, M., Vranešević, M., Bezdan, A., Jurišić, A., & Ljevnaić-Mašić, B. (2020). Economic feasibility of chemical weed control in soybean production in Serbia. *Agronomy*, 10(2), 291. [Link]
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., & Mosinger, E. (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal (isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*, 108(1), 17-27. [Link]
- Nookaraju, A., & Agrawal, D. C. (2012). Enhanced tolerance of transgenic grapevines expressing chitinase and β -1, 3-glucanase genes to downy mildew. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 111, 15-28. [Link]
- Radadiya, N., Antala, V., Desai, H., Chaudhary, H., Dholariya, D., Dholariya, T. L., & Golakiya, B. (2020). Expression of the pathogenesis related proteins during sesame-Macrophomina phaseolina interaction. *Int J Chem Stud*, 8, 2698-2703. [Link]
- Raju, S., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2008). Comparative study on the induction of defense related enzymes in two different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) genotypes by salicylic acid, spermine and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Australian Journal of Crop Science*, 2(3), 121-140. [Link]
- Rauscher, M., Ádám, A. L., Wirtz, S., Guggenheim, R., Mendgen, K., & Deising, H. B. (1999). PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *The Plant Journal*, 19(6), 625-633. [Link]
- Riggs, R. D., Schmitt, D. P., & Noel, G. R. (1988). Variability in race tests with *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 20(4), 565. [Link]
- Shi, Y. L., Sheng, Y. Y., Cai, Z. Y., Yang, R., Li, Q. S., Li, X. M., & Zheng, X. Q. (2019). Involvement of salicylic acid in anthracnose infection in tea plants revealed by transcriptome profiling. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2439. [Link]
- Sinclair, J. B., & Backman, P. A. (1989). *Compendium of soybean diseases*. The American Phytopathological Society.
- Tunsagool, P., Jutidamrongphan, W., Phaonakrop, N., Jaresitthikunchai, J., Roytrakul, S., & Leelasuphakul, W. (2019). Insights into stress responses in mandarins triggered by *Bacillus subtilis* cyclic lipopeptides and exogenous plant hormones upon *Penicillium digitatum* infection. *Plant Cell Reports*, 38, 559-575. [Link]
- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44(1), 135-162. [Link]
- Wang, N., Xiao, B., & Xiong, L. (2011). Identification of a cluster of PR4-like genes involved in stress responses in rice. *Journal of Plant Physiology*, 168(18), 2212-2224. [Link]
- Wrather, J. A., Shannon, J. G., Carter, T. E., Bond, J. P., Rupe, J. C., & Almeida, A. M. R. (2008). Reaction of drought-tolerant soybean genotypes to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Health Progress*, 9(1), 16. [Link]
- Yang, J., Wang, G. Q., Zhou, Q., Lu, W., Ma, J. Q., & Huang, J. H. (2019). Transcriptomic and proteomic response of *Manihot esculenta* to *Tetranychus urticae* infestation at different densities. *Experimental and Applied Acarology*, 78, 273-293. [Link]