Crop Biotech.
Spring (2016) 13: 1-12.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال پنجم، شماره سیزدهم، بهار ۱۳۹۵ (۱۲-۱)

بررسی بیان ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در گندم تیمار شده با اسیدسالیسیلیک و باکتری *Pseudomonas flourescens* در برهمکنش با قارچ عامل سوختگی برگ گندم

الهام زمانی[۱]، فروغ سنجریان[۲*]، ابراهیم محمدی گل‌تپه[۳] و ناصر صفایی[٤]

۱. دانشجوی دکتری گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. استادیار گروه زیست فراورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۳. استاد گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٤. دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۱/۱۱- تاریخ تصویب: ۹۵/۳/۳)

Evaluation of chitinase and β-1,3glucanase expression profile in *Pseudomonas flourescens* and salicylic acid treated wheat against *Septoria tritici* bloch (STB)

Elham Zamani[1], Forough Sanjarian[2]*, Ebrahim Mohammadi-goltappeh[3], and Naser Safaie[4]
1. Ph.D. student, Department of Plant Pathology, Tarbiat Modares University, Faculty of Agriculture, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
3. Professor, Department of Plant Pathology, Tarbiat Modares University, Faculty of Agriculture, Tehran, Iran
4. Associate Professor, Department of Plant Pathology, Tarbiat Modares University, Faculty of Agriculture, Tehran, Iran
(Received: Jun. 30, 2016-Accepted: May 23, 2016)

Abstract

Induced resistance is one the ways by which plants cope with the biotic stresses. Pathogenesis-related proteins (PRs), including chitinase and β-1,3-glucanase are synthesized by plant in response to pathogenic infection. In present work, we have carried out inoculation experiment in wheat to investigate the effect of salicylic acid (SA) and *Pseudomonas flourescens* on *Septoria tritici* Bloch (STB) symptoms. Subsequently, the expression profiles of chitinase and β-1,3-glucanase were analyzed with semi-quantitative RT-PCR at 0, 4, 14 and 24 days after inoculation in both treated and control plants. Results showed that the expression of both chitinase and β-1,3-glucanase genes increased in interaction with *Z. tritici* and the application of SA and *P. flourescens*. On the other hand, the application together had no significant effect on gene expression. Briefly, it can be concluded that increment of chitinase and β-1,3-glucanase expression level with the application of SA and *P. flourescens* would play role induction of plant defense against STB.

Keywords: Salicylic acid, *Pseudomonas flourescens*, β-1,3 Glucanase, Chitinase and *Septoria tritici* Bloch (STB)

چکیده

القاء مقاومت به بیمارگرها از جمله راه‌کارهای مقابله با تنش‌های زیستی در گیاهان می‌باشد. آنزیم‌های کیتیناز و بتا ۱و۳ گلوکوناز از جمله پروتئین‌های دفاعی قابل‌القاء هستند که در پاسخ به‌عوامل بیماریزا توسط گیاه، تولید می‌شوند. در این تحقیق، در ابتدا تاثیر تیمار اسیدسالیسیلیک و باکتری *Pseudomonas flourescens* در کاهش علایم بیماری سوختگی برگ گندم مورد بررسی قرار گرفت. سپس تغییرات بیان ژن‌های کیتیناز و بتا ۱و۳ گلوکوناز در نمونه‌های گیاهی تیمار شده و کنترل در روزهای ۰، ٤، ۱٤ و ۲٤ سیکل بیماری به‌روش RT-PCR نیمه کمی بررسی شدند. نتایج نشان‌دهندهٔ افزایش بیان هر دو ژن در روز چهارم پس از تلقیح بیمارگر بود و کاربرد اسیدسالیسیک و باکتری بیوکنترل به‌صورت جداگانه توانست بیان آن‌ها را افزایش دهد، ولی کاربرد همزمان هر دو تیمار، کاهش معنی‌داری از نظر آماری ایجاد نکرد. بر اساس نتایج، افزایش بیان آنزیم‌های کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکوناز با کاربرد اسیدسالیسیک و باکتری بیوکنترل *P. flourescens* می‌تواند در القاء مقاومت میزبانی در مقابله با بیماری سوختگی برگ گندم نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اسیدسالیسیلیک، *Pseudomonas flourescens*، بتا ۱و۳ گلوکوناز، کیتیناز، سوختگی برگ گندم

* نویسنده مسئول: فروغ سنجریان
E-mail: fsanjarian@nigeb.ac.ir

مقدمه

قارچ *Zymoseptoria tritici* (با نام قبلی *Mycosphaerella graminicola*) از جمله قارچ‌های آسکومیست بیمارگر گیاهی، همی‌بیوتروف می‌باشد. این بیمارگر دارای پراکنش جهانی بوده و عامل سوختگی برگ گندم (STB)[1] می‌باشد (Goodwin *et al*., 2011). در طبقه‌بندی انجام گرفته در معرفی ده بیمارگر قارچی مهم در دنیا، قارچ *Z. tritici* جایگاه هفتم جهان را به‌خود اختصاص داده‌است (Dean *et al*., 2012). خسارت این بیماری به لحاظ اقتصادی قابل توجه بوده و باعث کاهش بازده محصول گندم به‌میزان ۲۰ تا ۵۰٪ می‌شود (Ponomarenko *et al*., 2011). کشت ارقام مقاوم ساده‌ترین و اقتصادی‌ترین روش مدیریت بیماری سوختگی برگ گندم است ولی اغلب ارقام تجاری به این بیماری حساس بوده و دسترسی به ارقام مقاوم و پر محصول محدود است (Eyal, 1987). از سویی دیگر مشکل عمده در کنترل شیمیایی بسیاری از جمعیت‌های *Z. tritici* بروز مقاومت به قارچکش‌ها است، که این وضعیت بخصوص در مورد سموم استروبیلورین دیده شده‌است (Bockus *et al*., 2010). عوامل کنترل بیولوژیک، کنترل بیمارگرهای گیاهی را از وابستگی به ترکیبات شیمیایی مستقل کرده و دوست‌دار محیط زیست هستند. برخی گونه‌ها از باکتری جنس *Pseudomonas* در بین عوامل کنترل‌بیولوژیکی موثر علیه بیمارگرها قرار دارند. مشاهده شده است، این باکتری‌ها رشد گیاه را با تولید مواد بهبود دهندهٔ رشد گیاهی تقویت می‌کنند و از این‌رو PGPR[2] نامیده می‌شوند. PGPRها می‌توانند به‌طور سیستمیک مکانیسم‌های دفاعی نهفته گیاهی را که مقاومت سیستمیک القایی ISR [3] نامیده می‌شود، فعال کنند (Hammerschmidt, 1995). علاوه بر این مطالعات نشان داده‌اند تیمار خارجی گیاهان با اسیدسالیسیلیک و برخی مواد دیگر شامل اسید پلی‌آکریلیک، استیل‌سالیسیلیک‌اسید و ۲ و۶ دی‌کلرو ایزونیکوتینیک اسید می‌تواند باعث القاء مقاومت سیستمیک و تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی شده و منجر به کاهش خسارات ناشی از چندین عامل بیمارگر در محصولات مختلف گردد (Gozzo, 2003). در تعداد زیادی از گیاهان، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی را به‌عنوان پروتئین‌هایی که بعد از آلودگی گیاهان با بیمارگرهای مختلف تجمع می‌یابند، می‌شناسند (Bol *et al*., 1990). این پروتئین‌ها القاءپذیر می‌باشند و در طول حمله بیمارگرها و یا شرایط تنش‌زای مشابه بیان می‌شوند و فعالیت ضدقارچی دارند (Van Loon and Van Strien, 1999). PR پروتئین‌ها بر اساس تشابه اسیدآمینه‌ای، روابط سرولوژیک و یا فعالیت آنزیمی بیولوژیکی، به ۱۷ خانواده طبقه‌بندی می‌شوند (Gorjanović, 2009). در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان، دو خانواده *PR-2* و *PR-3* نقش مهمی در مقاومت گیاهان به بیماری‌های قارچی دارند. خانواده *PR-2* عمدتا شامل بتا-۱و۳ گلوکاناز می‌باشند و توانایی هیدرولیز پلیمرهای گلوکوزیدی را که واحدهای آن با پیوند بتا-۱و۳ گلوکان یکدیگر متصل شده‌اند، دارند (Simmons, 1994). خانواده *PR-3* نیز دربردارنده‌ی کیتینازها هستند که پیوندهای گلیکوزیدی کیتین را به واحدهای مونومری، می‌شکنند. کیتین و گلوکان جزء تشکیل‌دهنده دیواره سلولی بسیاری از بیمارگرهای قارچی می‌باشند (Saikia *et al*., 2005). در بسیاری از گیاهان در پاسخ به آلودگی، فعالیت این دو آنزیم

1. *Septoria tritici* Blotch
2. Plant Growth Promoting Rhizobacteria
3. Induced systemic resistance

القاء شده و باعث ایجاد مقاومت می‌شود. کیتینازها و گلوکونازها در تخریب دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها باهم همکاری دارند (Saikia *et al*., 2005).

گندم نان از جمله مهم‌ترین محصولات زراعی ایران است و یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای محدودکننده‌ی رشد آن در ایران عامل بیمارگر سوختگی برگ گندم است، بنابراین بررسی و مطالعه بیان ژن‌های کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکاناز به‌عنوان ژن‌های دفاعی گندم در برهمکنش با قارچ عامل سوختگی برگ گندم در طی سیکل بیماری این بیمارگر و همچنین تغییرات بیان آن در برهمکنش با مقاومت القاء شده در میزبان، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه‌ی فهم مکانیسم واکنش‌های دفاعی و ارائهٔ روش‌های مدیریتی مکمل در جهت کشاورزی پایدار در اختیار قرار دهد. در این مطالعه، تغییرات بیان ژن‌های کیتیناز و بتا -۱و۳ گلوکوناز در نقاط زمانی پس از آلودگی با قارچ عامل سوختگی برگ گندم در ژنوتیپ حساس کویر به‌روش RT-PCR بررسی شد و تاثیرات استفاده از اسیدسالیسیلیک و باکتری *Pseudomonas flourescens* بر علایم بیماری و مقدار بیان این ژن‌ها ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

جدایه قارچی، سویه باکتری

در این تحقیق از جدایه قارچی S1، که از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد، استفاده گردید. این جدایه دارای بیماری‌زایی نسبتاً بالایی بوده و مربوط به منطقه دزفول می‌باشد. در ابتدا جدایه نگهداری شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد در محیط کشت YMDA (شامل چهار گرم عصاره مخمر، چهار گرم عصاره مالت، چهار گرم گرم دکستروز و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد با ۱۲ ساعت تناوب نوری به‌مدت دو روز نگهداری شد (Guo and Verreet, 2008). سپس سه قرص از محیط کشت حاوی بار قارچی به محیط کشت‌های مایع YMDB انتقال داده شده و به‌مدت پنج روز در شیکر انکوباتور با دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۳۵ برای کنیدی‌زایی نگهداری شدند (Mehrabi *et al*., 2006). سویه باکتری *Pseudomonas flourescens* با نام ۱۹ از محیط فراریشه گندم جدا شده بود و قبلاً در پژوهشی تاثیر مناسب بیولوژیکی آن در کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه ایجاد شده با عوامل بیمارگر *Fusarium culmorum* و *F. pseudograminearum* مورد بررسی قرار گرفته بود (Hajimashaalah *et al*., 2014) این سویه از کلکسیون باکتری‌شناسی مرکز تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه گردید. غلظت مورد استفاده اسیدسالیسیلیک شامل غلظت چهار میلی‌مولار بود که نتایج قابل قبولی در آزمون‌های قبلی بیماری‌زایی نشان داده بود (Gholamnejad *et al*., 2014).

تیمار بذور با باکتری *P. flourescens*

برای تهیه زادمایه باکتری *P. fluorescens*، سویه ۱۹در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع LB (حاوی ده گرم تریپتون پپتون، پنج گرم عصاره مخمر، ۰/۲۵ گرم فسفات منیزیم آبدار، هشت گرم کلریدسدیم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر) کشت داده شد و در دمای اتاق بر روی شیکر به‌مدت ۳۶ ساعت (۲۰۰ دور در دقیقه) قرار گرفت. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر غلظت 10^9cfu/ml از آن تهیه گردید، در فلاسک‌های۵۰ میلی‌لیتری حجم‌های ۱۰ میلی‌لیتری از این سوسپانسیون تهیه و به‌مدت پنج دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد و فاز رویی دور ریخته شد. جهت پوشش کامل و تیمار باکتری با بذور، محلول ۱٪ کربوکسی‌متیل‌سلولز (cmc) [1] تهیه و اتوکلاو

1. Carboxymethyl cellulose

گردید و پس از سرد شدن به فلاسک‌های حاوی رسوب تا رسیدن به‌حجم ده میلی‌لیتر اضافه شدند. پس از آن فلاسک‌ها خوب تکان داده شدند تا سوسپانسیون یکنواختی از باکتری به‌دست آید. تعداد مناسبی از بذور به این سوسپانسیون اضافه شده و پس از سه الی چهار ساعت بذور از سوسپانسیون خارج شده و در زیر هود روی کاغذ صافی‌های استریل نگهداری شدند تا به‌خوبی خشک شوند. پس از تیمار باکتریایی بذرها مورد کشت قرار گرفتند (Sharifi Tehrani *et al*., 2011).

آزمایش گلخانه‌ای

آزمایش گلخانه‌ای با استفاده از رقم کویر به‌عنوان رقم حساس (Gholamnejad *et al*., 2014)، در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. آزمون گلخانه‌ای، طبق روش تایید شده جهت انجام آزمون‌های بیماری‌زایی در پاتوسیستم گندم-سپتوریوز (Kema *et al*., 1996) انجام شد. برای تهیه غلظت مورد نظر اسیدسالیسیلیک محلول پایه یک مولار اسیدسالیسیلیک در حلال متانول تهیه شده و غلظت ۴ میلی‌مولار با اضافه کردن حجم مناسبی از محلول پایه به آب تهیه شد. غلظت سوسپانسیون کنیدی برای استفاده در آزمایش‌های گلخانه‌ای با کمک لام گلبول شمار در ده میلیون کنیدی در هر میلی‌لیتر تنظیم شد. اسیدسالیسیلیک با غلظت چهار میلی‌مولار به‌صورت پاشش هوایی بر روی برگ، ۲۴ ساعت قبل از اسپورپاشی استفاده شد. ارزیابی شدت بیماری ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با اندازه‌گیری درصد پوشش پیکنیدیومی انجام شد (Chartrain *et al*., 2004, Brown *et al*., 2001). نمونه‌برداری از گیاه در نقاط زمانی ۰، ۴، ۱۴ و ۲۴ روز پس از آلودگی انجام گرفت و نمونه‌ها پس از انجماد سریع با ازت مایع در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج Total RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم برگ با استفاده از کیت RNX plus (شرکت سیناژن، ایران) انجام گرفت. ساخت رشته cDNA از روی RNA کل با استفاده از کیت RevertAid Reverse Transcriptase (شرکت Thermo Scientific، آلمان) انجام شد.

تکثیر قطعات

تکثیر قطعات ژنی با استفاده از آغازگرهای طراحی شده (جدول ۱) در دستگاه ترموسایکلر (مدل BioRad و ساخت کشور آمریکا) صورت گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ مایکرولیتر حاوی PCR Buffer (10X)، 10Mm dNTP، $MgCl_2$ 50mM، یک واحد Taq پلیمراز (ساخت شرکت سیناژن) و با غلظت 10mM از هرکدام از آغازگرها تهیه شد. برنامهٔ زمانی و چرخه‌ی دمایی شامل پنج دقیقه نگهداری در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه نگهداری در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه نگهداری در دمای اتصال مربوط به هر جفت آغازگر (دمای اتصال برای هردو ژن ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود)، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس دو دقیقه نگهداری در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر قطعات

Gene name	Primer sequence	Product size
Chitinase	5' GTTTAAGACGGCGTTGTGGT 3'-F 5' ACCGTTGATGATGTTGGTGAT 3' -R	352
β-1,3 Glucanase	5' AACGACCAGCTCTCCAACAT 3'-F 5' AACAGGGATGTGTAGGTCAG 3' -R	152
eEF1A-1	5'GGTGATGCTGGCATAGTGAAG3'-F 5'GATGACACCAACAGCCACAG3' –R	126

بررسی وزن قطعات و تجزیه و تحلیل روشنایی باندها
پس از تأیید تکثیر قطعات ژنی توسط الکتروفورز، عکس‌های گرفته شده از ژل وارد نرم‌افزار Totallab شدند. امتیازدهی به باندها با استفاده از نرم‌افزار Totallab صورت گرفت که میزان روشنایی باندها را براساس تعداد نقاط روشن موجود در محدوده باند مورد نظر مشخص می‌نماید. پس از آن که تمامی باندها بر اساس باند *eEF1A-1* استاندارد شدند، داده‌های حاصل از نرم‌افزار Totallab وارد نرم‌افزار اکسل شد و با استفاده از نرم افزار SAS ver.9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

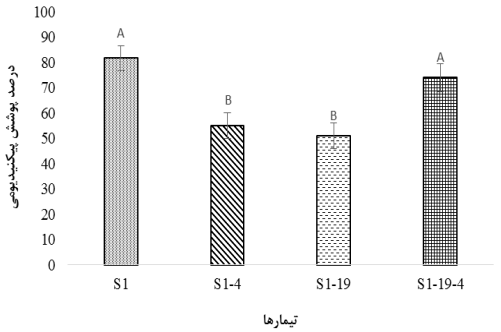
نتایج و بحث

باتوجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) بین اثر تیمارهای مختلف بر روی علایم بیماری اختلاف معنی‌دار (به احتمال ۹۹ ٪) وجود داشت. در این آزمون، رقم کویر تیمار شده با قارچ در تعامل جداگانه با سویه باکتری ۱۹ و سطح چهار میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک به‌ترتیب با ۵۱ و ۵۵٪ پوشش پیکنیدویومی، کمترین شدت بیماری و رقم کویر تیمار شده با قارچ با ۸۱/۶۷٪ پوشش پیکنیدیومی بیشترین شدت بیماری را داشتند. با توجه به نتایج مقایسه میانگین بین اثر کاربرد باکتری بیوکنترل و اسیدسالیسیلیک اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری مشاهده نشد (شکل۱). تیمار حاوی کاربرد همزمان غلظت چهار میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک و سویه باکتری با ۷۴٪ پوشش پیکنیدیومی، اختلاف معنی‌داری از نظر آماری با کاربرد بیمارگر نداشت (شکل۱). در این تحقیق مشاهده شد که استفاده‌ی همزمان باکتری با اسیدسالیسیلیک در دو رقم کویر و مرودشت تاثیری در کاهش میزان شدت بیماری را به دنبال ندارد و همچنین در سطح بیان ژن نیز قادر به القاء بیان ژن‌های مورد بررسی نبود. به‌نظر می‌رسد که این نتیجه به‌دلیل ارتباط آنتاگونیستی بین مسیر سیگنال‌دهی اسیدسالیسیلیک با مسیرهای سیگنال‌دهی اسیدجاسمونیک و اتیلن باشد. ارتباط آنتاگونیستی بین مسیرهای سیگنال‌دهی اسیدسالیسیلیک و اسید جاسمونیک در مطالعات متعددی گزارش شده است (Spoel *et al*., 2003, Pieterse and van Loon, 1999, Van der Does *et al*., 2013).

جدول ۲. تجزیه واریانس درصد پوشش پیکنیدیومی رقم کویر در تعامل با قارچ عامل سوختگی برگ گندم

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
تیمار	۳	۱۹۶۲/۲۵	۶۵۴/۰۸**
خطا	۸	۲۳۴/۶۶	۲۹/۳۳
کل	۱۱	۲۱۹۶/۹۱	
ضریب تغییرات (C.V)		۲۱/۰۵	

**: معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد.



شکل ۱. مقایسه تیمارها براساس میانگین پوشش پیکنیدی با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ ٪. شرایط تنش با بیمارگر (S1)، بیمارگر به‌همراه غلظت چهار میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک (S1-4)، بیمارگر به‌همراه باکتری *P. fluorescens* (S1-Pf) و بیمارگر به‌همراه غلظت چهار میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و باکتری *P. fluorescens* (S1-Pf-4). میانگین‌ها با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند.

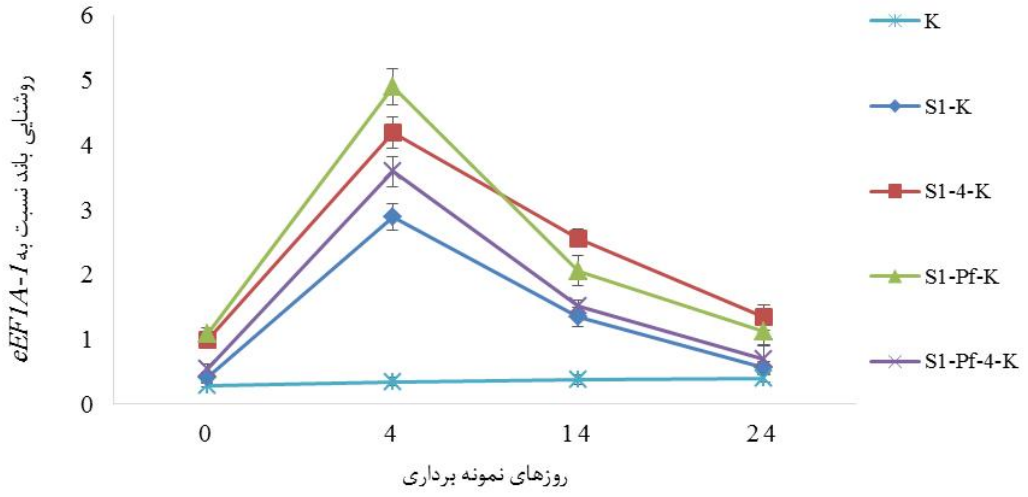
تجمع PR پروتئین‌ها به‌محض حمله بیمارگرهای میکروبی در گیاهان اثبات شده‌است. بتا-۱و۳ گلوکانازها و کیتینازها از جمله PR پروتئین‌ها با خاصیت هیدرولایتیک بوده و قادر به تجزیه‌ی دیواره سلولی در چندین جنس از قارچ‌ها از جمله جنس‌های *Trichoderma*، *Alternaria* و *Mycosphaerella*

می‌باشند (Sharma *et al.,* 2011). القاء بتا-۱و۳ گلوکانازها و کیتینازها در بسیاری از تعامل‌های گیاه-بیمارگر گزارش شده است و تصور بر این است که دارای نقش‌های متعددی در واکنش‌های دفاعی گیاهی هستند (Jongedijk *et al*., 1995, Kemp *et al*., 1999, Kini *et al*., 2000) آن‌ها در ابتدا می‌توانند دیواره سلولی بیمارگر را هضم کرده و استقرار آن را مسدود کنند (Mauch *et al.,* 1988)، دیگر اینکه با رهاسازی اجزای دیواره سلولی بیمارگر به‌عنوان الیسیتور در فعالسازی واکنش‌های دفاعی گیاهی نقش دارند (Yoshikawa *et al*., 1993). اغلب مطالعات انجام گرفته در بررسی فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکاناز به مقایسه میزان بیان این آنزیم‌ها در ارقام مقاوم و حساس در مقابله با بیماری پرداخته‌اند (Ahangar *et al*., 2015)، ولی در این مطالعه سعی شد فعالیت این آنزیم‌ها در رقم حساس و تاثیری که تیمارهای القاگر مقاومت می‌توانند بر میزان فعالیت آن‌ها داشته باشند، موردبررسی قرارگیرد. با توجه به نقش بتا-۱و۳ گلوکانازها و کیتینازها به‌عنوان واکنش‌های دفاعی اولیه در مقابله با حمله بیمارگرها، در اغلب مطالعات انجام گرفته (Gholamnejad *et al*., 2014; Habibi *et al*., 2013)، بیان این دسته ژن‌ها اغلب در ساعات و روزهای اولیه پس از آلودگی موردبررسی قرار گرفته است. در این تحقیق با توجه به اینکه بیمارگر سوختگی برگ گندم همی بیوتروف بود و فاز فاقد علائم و بیوتروف آن ممکن است تا چهارده روز طول بکشد، روند تغییرات بیان این ژن‌ها تا بازه زمانی ۲۴ روز موردبررسی قرار گرفت تا تغییرات بیان آن، پس از ورود به فاز نکروتروف بیمارگر نیز بررسی شود.

نتایج اندازه‌گیری بیان نیمه‌کمی ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز نشان‌دهنده غلظت متفاوت بیان این ژن در سطح mRNA در تیمارهای متفاوت مورد بررسی بود. با توجه به‌شکل بین وجود و عدم وجود بیمارگر و وجود و عدم وجود اسیدسالیسیلیک و باکتری در تیمارها از نظر بررسی نیمه‌کمی نتایج واکنش RT-PCR اختلاف معنی‌دار وجود داشت، به بیان دیگر، وجود بیمارگر در تعامل با میزبان و کاربرد اسیدسالیسیلیک و باکتری به‌صورت جداگانه باعث القاء افزایش بیان این ژن شده بود. در روز چهارم بعد از آلودگی بیان این ژن به بیشترین مقدار خود رسید و سپس به‌تدریج از مقدار آن کاسته شد. در روز چهارم در تیمار با قارچ بیان ژن بتا-۱و۳ گلوکوناز تا دو برابر افزایش پیدا کرد و کاربرد جداگانه اسید سالیسیلیک و باکتری توانست میزان بیان آن تا ۴/۵ و ۵ برابر به‌ترتیب افزایش دهد. در حالیکه حضور همزمان هر دو تیمار بی‌تاثیر بود و اختلاف معنی‌داری با تیمار قارچ تنها نداشت. پس از روز چهارم روند کاهشی سریعی را تا روز ۱۴در بیان این ژن مشاهده شد ولی حتی در روز ۲۴ نیز، میزان بیان بیشتر از نقطه زمانی اول بود (شکل۲).

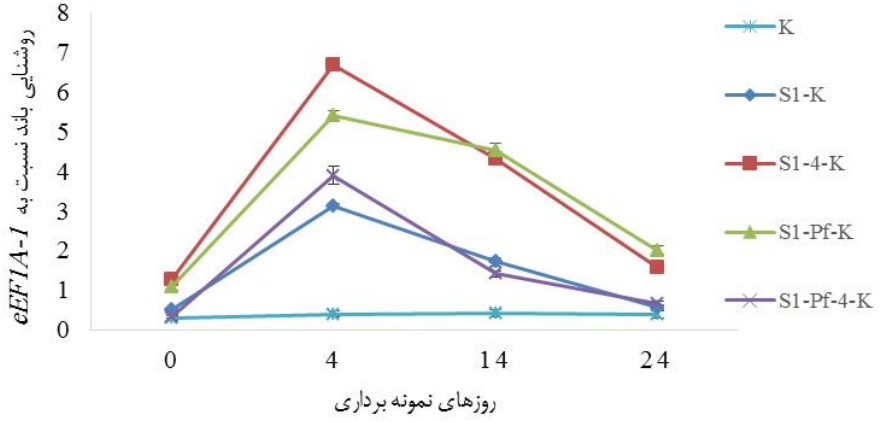
با توجه به بالا رفتن زیاد بیان این ژن در گیاه بعد از تنش و نقش مهم این ژن در دفاع گیاه علیه بیمارگرها، این نکته تأکید می‌شود که با حملهٔ عامل بیمارگر، گیاه میزان این آنزیم را در خود افزایش می‌دهد و این ژن یک ژن نسبتاً القا پذیر است که با کاربرد اسیدسالیسیلیک و باکتری *P. fluorescens* بر روی گیاه می‌توان میزان بیان آن‌ها را افزایش داد. فعالیت ضدقارچی این آنزیم در برابر قارچ‌های *Alternaria longipes* و *Rhizoctonia solani* و همچنین جلوگیری از رشد لوله و جوانه‌زنی کنیدی‌های قارچ‌های *Verticillium dahliae* و *F. oxysporum* گزارش شده‌است (Sun et al., 2011). در پژوهشی آنزیم گلوکاناز اسیدی از خیار استخراج شد و گزارش شد که فعالیت این آنزیم در خیار با القاء مقاومت در برابر بیمارگر *Colletotrichum lagenarium* در ارتباط است (Ji and Kuc, 1994). همچنین گیاهان زیادی از طریق انتقال ژن بتا ۱و ۳-گلوکاناز به‌صورت تنها و

یا همراه با ژن کیتیناز تراریخت شده‌اند که اکثر آن‌ها در مقابل آلودگی به بعضی از قارچ‌ها مقاومت نشان دادند (Punja, 2001). در مطالعه‌ای در گوجه فرنگی نشان داده‌شد که ایزوفرم‌های واکوئلی بتا-۱و۳ گلوکانازها می‌توانند باعث ممانعت از رشد بیمارگرهای *Alternaria solani*، *Trichoderma viride* و *Phytophthora infestans* شوند (Leubner-Metzger and Meins Jr, 1999). در گیاهان گندم تیمار شده با *F. culmorum* تجمع بالای بتا-۱و۳ گلوکاناز و کیتیناز در بافت‌های گیاهی و حتی در هیف‌های قارچی در محل تماس گیاه و هیف‌های قارچی دیده شده‌است. میزان این تجمع در گیاهان مقاوم گندم نسبت به حساس بیشتر بود که نشان می‌دهد تجمع بتا-۱و۳ گلوکاناز یکی از مکانیسم‌های احتمالی مقابله با بیمارگر در میزبان مقاوم است (Kang and Buchenauer, 2002). بتاگلوکانازها معمولاً بعد از حمله بیمارگر به گیاه و یا تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی مختلف در گیاه القاء می‌شود و معمولاً به‌صورت هم‌افزایی با آنزیم کیتیناز عمل می‌کند (Simmons, 1994). بیان ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز همواره دارای بیان سریع و میزان رونوشت بالایی در رقم مقاوم نسبت به گندم نسبت به رقم حساس است (Ahangar *et al*., 2015). در این تحقیق بیشترین میزان بیان ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز روز چهارم مشاهده شد، که این نتیجه نقش مهم این آنزیم را در واکنش‌های دفاعی و لزوم بیان آن در مراحل اولیه جهت القاء واکنش‌های دفاعی اولیه در میزبان تایید می‌کند. در مطالعه‌ای بیان بالای این ژن در ۲۴ ساعت اول پس از آلودگی با قارچ عامل سفیدک سطحی در رقم حساس فلات گزارش شد (Ahangar *et al*., 2015). در پژوهشی کاربرد تیمار ریشه‌ای باکتری *P. fluorescens*، در گیاه نخود توانست باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و گلوکاناز شود (Kumar *et al*., 2007). همچنین بررسی تیمار اسیدسالیسیلیک در گیاه پنبه نشان داد که این ترکیب می‌تواند با القاء تجمع کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکوناز باعث مقاومت به توکسین VD-toxin در تعامل با قارچ *V. dahlia* شود (Li *et al*., 2003).



شکل ۲. بررسی نیمه‌کمی بیان ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز در رقم حساس کویر (K1)، شرایط تنش با بیمارگر(S1) ، بیمارگر به‌همراه غلظت چهار میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک (S1-4)، بیمارگر به‌همراه باکتری *P. fluorescens* (S1-Pf) و بیمارگر به‌همراه غلظت چهار میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک و باکتری *P. fluorescens* (S1-Pf-4). شکل کمیت مربوط به روشنایی باند ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز نسبت به باند *eEF1A-1* را نشان می‌دهد که با استفاده از نرم‌افزار TotalLab به‌دست آمده است.

پروتئین‌های کیتیناز گروهی از اندوکیتینازها می‌باشند که پیوند بتا-۱و۴ بین N-استیل‌گلوکزآمین موجود در ساختار کیتین که یکی از اجزا مهم دیواره قارچ‌ها محسوب می‌شود را هیدرولیز می‌کند (Leah *et al.*, 1991). لذا آنزیم‌های کیتیناز می‌توانند نقش بسیار مهمی در مقاومت علیه بیمارگرها ایفا کنند. ژن کیتیناز از گروه ژن‌های مسئول واکنش‌های دفاعی است و معمولا پس از حمله بیمارگر، سطح بیان آن در سلول‌های گیاهی افزایش می‌یابد (Ahangar *et al.*, 2015). در شرایط آزمایشگاه نشان داده شده است که آنزیم کیتیناز می‌تواند با لیز کردن نوک هیف‌های قارچ از رشد آن‌ها جلوگیری کند (Punja and Zhang, 1993). در مطالعه‌ی حاضر آلودگی به بیماری سپتورویوز توانست باعث افزایش بیان این ژن نسبت به گیاهان کنترل فاقد آلودگی گردد. تفاوت بیان ژن کیتیناز نیز در تیمار با عوامل مختلف بیوکنترلی مشهود بود. بیان این ژن نیز، در تمامی تیمارها روند مشابهی را طی کرده بود و در روز چهارم بیشترین بیان این ژن در تمامی تیمارها موردبررسی مشاهده می‌شد و تیمار با اسید سالیسیلیک و باکتری به‌صورت جداگانه باعث افزایش بیان این ژن شده بود. از روز چهارم تا روز ۲۴ آلودگی روند کاهشی در تعداد نسخه‌های ژن کیتیناز مشاهده می‌شد. در تیمار همزمان با باکتری و اسیدسالیسیلیک بیان این ژن اختلاف معنی‌داری با تیمار قارچ تنها نداشت (شکل۳).



شکل ۳. بررسی نیمه‌کمی بیان ژن کیتیناز در رقم حساس کویر (K1)، در شرایط تنش با بیمارگر (S1)، بیمارگر به‌همراه غلظت چهار میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک (S1-4)، بیمارگر به‌همراه باکتری *P. fluorescens* (S1-Pf) و بیمارگر به‌همراه غلظت چهار میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک و باکتری *P. fluorescens* (S1-Pf-4). شکل کمیت مربوط به روشنایی باند ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز نسبت به باند *eEF1A-1* را نشان می‌دهد که با استفاده از نرم افزار TotalLab به‌دست آمده است.

در این تحقیق بیشترین بیان ژن کیتیناز در رقم حساس کویر در روز چهارم مشاهده شد. در مطالعه‌ی دیگری نیز حداکثر بیان ژن کیتیناز ۷۲ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد و همچنین در مطالعه مربوط به بیان این ژن در تعامل با قارچ عامل سوختگی برگ گندم گزارش شد که در رقم حساس نسبت به مقاوم افزایش سطح تظاهر ژن کیتیناز با تاخیر و از نظر میزان در فاصله زمانی ۳ تا ۷۲ ساعت، پایین تر از رقم مقاوم است (Habibi *et al.*, 2013). تیمار با بیمارگر و کاربرد اسیدسالیسیلیک و باکتری باعث افزایش اولیه بیان این ژن نسبت به گیاهان کنترل در نقطه زمانی اول شد و این القاء افزایش بیان در نقاط زمانی دیگر مورد بررسی هم مشاهده شد. افزایش سریع بیان کیتیناز می‌تواند باعث تجزیه سریع کیتین

دیواره سلولی قارچ‌ها شده و از طریق جلوگیری از رشد بیمارگر در مزوفیل برگ و ایجاد الیگومرهای کیتین به‌عنوان محرک مکانیسم‌های دفاعی از قبیل بیان ژن‌های مرتبط با دفاع عمل کند (Sharma *et al.*, 2011). استفاده از عوامل بیوکنترلی باعث افزایش بیان این ژن در تعامل با بیمارگرهای مختلف می‌شود. در پژوهشی کاربرد تیمار ریشه‌ای باکتری *P. fluorescens* در گیاه نخود توانست باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و گلوکاناز شود (Kumar *et al.*, 2007) بررسی تیمار اسید سالیسیلیک در گیاه پنبه نشان داد که این ترکیب می‌تواند با القاء تجمع کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکوناز باعث مقاومت به توکسین VD-toxin در تعامل با قارچ *Verticillium dahlia* شود (Li *et al.*, 2003). مشاهده شده است که در گیاه موز کاربرد BTH[1] به‌عنوان آنالوگ اسیدسالیسیلیک می‌تواند واکنش‌های دفاعی گیاه را از طریق بیان بالای ژن دفاعی کیتیناز تقویت کند (Ma *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای تاثیر فرمولاسیون مایع باکتری *P. fluorescens*، در مقابله با پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت و افزایش بیان ژن کیتیناز در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد تا روز پنجم پس از تیمار با باکتری مشاهده شد. همچنین بررسی‌ها نشان داد که در گیاهان تیمار شده سه ایزوفرم از کیتیناز بیان شده‌اند درحالیکه در گیاهان کنترل هیچ ایزوفرمی بیان نشده بود (Manikandan and Raguchander, 2015). در مطالعه‌ای بررسی تاثیر اسیدسالیسیلیک در گیاه ارزن‌انگشتی نشان داد که کاربرد اسیدسالیسیلیک به‌صورت پاشش هوایی قادر است باعث القاء بیان ژن‌های کیتیناز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و حتی تغییر الگوی ایزوفرمی تولید می‌شود (Appu and Muthukrishnan, 2014).

1. Benzothiadiazole

اثر آنتاگونیستی دو مسیر سیگنال‌دهی بیوکنترلی اسیدسالسیلیک و باکتری در القا ژن‌های PR پروتئین در توتون دیده شده است. بیان ژن‌های *PR1*، *PR2* و *PR3* اسیدی در تیمار با اسیدسالیسیلیک افزایش یافته در حالی‌که بیان ژن‌های *PR5* و *PR6* در حضور اسیدجاسمونیک افزایش یافته و با اسید سالیسیلیک ممانعت می‌شود. در گیاه توتون مشاهده شده‌است که بیان ژن PR پروتئین بازی، *NtPRB1b*، به‌طور مثبتی با فعالیت مسیرهای سیگنال‌دهی اسید جاسمونیک و اتیلن و به‌طور منفی با فعالیت مسیر اسیدسالیسیلیک تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Niki *et al.*, 1998). مشاهده شده است که مسیر سیگنال‌دهی اسیدجاسمونیک با مسیر سیگنال‌دهی اسیدسالیسیلیک در گیاه آرابیدوپسیس مقابله می‌کند (Kloek *et al.*, 2001). جهش‌یافته‌های آرابیدوپسیس که سطوح بالای اسید سالیسیلیک را تجمع می‌دهند، باعث ممانعت از مسیر اسیدجاسمونیک می‌شوند (Kachroo *et al.*, 2003). با این وجود تایید بیشتر این نتیجه‌گیری‌ها نیاز به بررسی و مطالعات بیشتری در گیاهان تک‌لپه‌ای مثل گندم دارد.

در این تحقیق، الگوی بیانی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکاناز در طی ۲۴ روز پس از آلودگی و در چهار نقطه زمانی در رقم حساس کویر و در تعامل با دو القاگر مقاومت اسیدسالیسیلیک و باکتری *P. fluorescens*، مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نیمه‌کمی نتایج RT-PCR تایید نمود که بیان هر دو ژن در اثر بیماری سپتوریای‌برگی به‌طور قابل توجه و معنی‌داری افزایش یافته است. بررسی سطح تظاهر هر دو ژن در زمان‌های مختلف نشان داد که هر دو ژن دارای روند تغییراتی مشابهی در روزهای مورد بررسی هستند، ولی ژن کیتیناز نسبت به بتا-۱و۳ گلوکاناز دارای سطح بیان بیشتری است. نتایج تحقیق نشان داد که با توجه به اینکه بیان هردو ژن دارای روند افزایش معنی‌داری نسبت به نقطه زمانی اول بودند، به‌نظر می‌رسد ژن‌های

کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکاناز، در مقاومت به سوختگی برگ گندم نقش داشته باشند و کاربرد اسیدسالیسیلیک و باکتری می‌تواند با القاء افزایش تولید این آنزیم‌ها باعث القاء مقاومت میزبانی شوند.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری و همچنین دانشگاه تربیت مدرس برای فراهم آوردن امکانات این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Ahangar L, Babaeezad V, Ranjbar G, Najafizarini H, Biabani A (2015) Expression profile of defense-related genes in susceptible and resistant wheat cultivars in response to powdery mildew infection. J. Mod. Genet. 10**:** 33-46.

Appu M, Muthukrishnan S (2014) Foliar application of salicylic acid stimulates flowering and induce defense related proteins in finger millet plants. Universal J. Plant Sci. 2: 14-18.

Bockus WW, Bowden R, Hunger R, Murray T, Smiley, R (2010) Compendium of wheat diseases and pests, American Phytopathological Society (APS Press).

Bol J, Linthorst H, Cornelissen B (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 113-138.

Brown J, Kema G, Forrer HR, Verstappen E, Arraiano L, Brading P, Foster E, Fried P, Jenny E (2001) Resistance of wheat cultivars and breeding lines to septoria tritici blotch caused by isolates of *Mycosphaerella graminicola* in field trials. Plant Pathol. 50: 325-338.

Chartrain L, Brading P, Makepeace J, Brown J (2004) Sources of resistance to septoria tritici blotch and implications for wheat breeding. Plant Pathol. 53: 454-460.

Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13: 414-430.

Eyal Z (1987) The Septoria diseases of wheat: concepts and methods of disease management, CIMMYT.

Gholamnejad J, Mohammadi-goltapeh E, Sanjarian F, Safaie N, Razavi Kh (2014). The evaluation of salicylic acid effect on septoria diseases by *Mycospharella graminicola.* J. Res. Plant Dis. 2: 37-48.

Goodwin SB, M'barek SB, Dhillon B, Wittenberg AH, Crane CF, Hane JK, Foster AJ, Van der Lee T, Grimwood J, Aerts A (2011) Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. PLoS Genet. doi: 10.1371/journal.pgen.1002070

Gorjanović S (2009) A review: biological and technological functions of barley seed Pathogenesis-related proteins (PRs). J. Inst. Brew. 115: 334-360.

Gozzo F (2003) Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. J. Agri. Food Chem. 51: 4487-4503.

Guo JR, Verreet JA (2008). Formation and germination of Septoria tritici secondary conidia as affected by environmental factors. Phytopathology 156: 635–637.

Habibi M, Mirakhorli N, Shiran B, Mardi M (2013) Study of resistance related gene expression pattern to Septoria tritici Blotch (STB) in wheat (*Triticum aestivum*). J. Mod. Genet. 8:149-158.

Hajimashaalah Bazaz S, Razavi M, Ghasemi A (2014) Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for biological control of wheat crown and

root rot disease (*Fusarium culmorum*). Biocontrol. Plant. Protec. 1: 1-16 .

Hammerschmidt R (1995) Induced resistance to disease in plants. Springer Science and Business Media.

Ji C, Kuc J (1994) Purification and characterization of an acidic beta-1, 3-glucanase from cucumber and its relationship to systemic disease resistance induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 899-905.

Jongedijk E, Tigelaar H, Van Roekel JS, Bres-Vloemans SA, Dekker I, van den Elzen PJ, Cornelissen BJ, Melchers LS (1995) Synergistic activity of chitinases and β-1,3glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica 85: 173-180.

Kachroo A, Lapchyk L, Fukushige H, Hildebrand D, Klessig D, Kachroo P (2003) Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid–and jasmonic acid–mediated defense pathways in the Arabidopsis ssi2 mutant. Plant Cell 15: 2952-2965.

Kang Z, Buchenauer H (2002) Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. In: Mycotoxins in Plant Disease. Springer, pp 653-660.

Kema G, Annone JG, Sayoud R, Van Silfhout CH, Van Ginkel M, De Bree J (1996) Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem I. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. Phytopathology 86: 200-212.

Kemp G, Botha A-M, Kloppers F, Pretorius Z. (1999) Disease development and β-1, 3-glucanase expression following leaf rust infection in resistant and susceptible near-isogenic wheat seedlings. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55**:** 45-52.

Kini KR, Vasanthi N, Shetty HS (2000) Induction of β-1, 3-glucanase in seedlings of pearl millet in response to infection by *Sclerospora graminicola*. Eur. J. Plant Pathol. 106: 267-274.

Kloek AP, Verbsky ML, Sharma SB, Schoelz JE, Vogel J, Klessig DF, Kunkel BN (2001) Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. Plant J. 26: 509-522.

Kumar V, Kumar A, Verma V, Gond S, Kharwar R (2007) Induction of defense enzymes in *Pseudomonas fluorescens* treated chickpea roots against *Macrophomina phaseolina*. Indian Phytopathol. 60: 289-295.

Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. J. Biol. Chem. 266: 1564-1573.

Leubner-Metzger G, Meins Jr F (1999) Functions and Regulation of Plant β-(PR-2). In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds) Pathogenesis-related proteins in plant, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, pp, 49-76.

Li YZ, Zheng XH, Tang HI, Zhu JW, Yang JM (2003) Increase of ß-1, 3-glucanase and chitinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of *Verticillium dahliae*. Acta Bot. Sinica 45: 802-808.

Ma BC, Tang WL, Ma LY, Li LL, Zhang LB, Zhu SJ, Zhuang C, Irving D (2009) The role of chitinase gene expression in the defense of harvested banana against anthracnose disease. J. Am. Soc. Hortic Sci. 134: 379-386.

Manikandan R, Raguchander T (2015) *Pseudomonas fluorescens* (Pf1) mediated chitinolytic activity in tomato plants against *Fusarium*

oxysporum f. sp. *lycopersici*. Afr. J. Microbiol. Res. 9: 1331-1337.

Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β-1, 3-glucanase. Plant Physiol. 88: 936-942.

Mehrabi R (2006). Signaling pathways involved in pathogenicity and development of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, Dissertation, University of Wageningen.

Niki T, Mitsuhara I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y (1998) Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. Plant Cell Physiol. 39: 500-507.

Pieterse C M, van Loon LC (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends Plant Sci. 4: 52-58.

Ponomarenko A, Goodwin SB, Kema GH (2011) Septoria tritici blotch (STB) of wheat .Plant Health Instructor Index. doi:10.1094/PHI-I-2011-0407-01

Punja ZK (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens-a review of progress and future prospects. Can. J. Plant Pathol. 23: 216-235.

Punja ZK, Zhang YY. (1993) Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. J. Nematol. 25: 526-540.

Saikia R, Singh BP, Kumar R, Arora DK (2005) Detection of pathogenesis related proteins-chitinase and-1, 3-glucanase in induced chickpea. Curr. Sci. 89: 659-663.

Sharma N, Sharma K, Gaur R, Gupta V. (2011) Role of chitinase in plant defense. Asian J. Biochem. 6: 29-37.

Sharifi Tehrani A, Farzaneh M, Afshari F, Behboudi K, Kellenbergeer S, Pechy Tarr M, Keel CH, Mascher F (2011) A study of the effect of *Pseudomonas fluorescens* CHA0mcherry on the degree of root colonization in some wheat varieties and an induction of systemic resistance against leaf rust disease. Iran. J. Plant Protec. Sci. 42: 85-94.

Sharma N, Sharma KP, Guar RK, Gupa VK (2011) Role of Chitinase in Plant Defense Asian. J. Biochem. 6: 29-37

Simmons CR (1994) The physiology and molecular biology of plant 1, 3-β-D-glucanases and 1, 3; 1, 4-β-D-glucanases. Crit. Rev. Plant Sci. 13: 325-387.

Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt J A, Mueller MJ, Buchala A J, Métraux J-P, Brown R, Kazan K (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate-and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. Plant Cell 15: 760-770.

Sun J, Peng M, Wang Y, Zhao P, Xia Q (2011) Isolation and characterization of antagonistic bacteria against Fusarium wilt and induction of defense related enzymes in banana. Afri. J. Microbiol. Res. 5: 509-515.

Van der Does D, Leon-Reyes A, Koornneef A, Van Verk MC, Rodenburg N, Pauwels L, Goossens A, Körbes AP, Memelink J, Ritsema T (2013) Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOI1-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. Plant Cell 25:744-761.

Van Loon L, Van Strien E (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Molecu. Plant Pathol. 55: 85-97.

Yoshikawa M, Yamaoka N, Takeuchi Y (1993) Elicitors: their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. Plant Cell Physiol. 34: 1163-1173.