مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳
صفحه ۳۰-۱۹

بیان متفاوت ژن *NPR1* و برخی از ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی در پاسخ به مصرف اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در برنج

Different expression pattern of *NPR1* and some of pathogenesis related genes in response to salicylic acid and methyl jasmonate treatment in rice

ژاله حکمتی[۱]، علی اعلمی[۲*]، محمدمهدی سوهانی[۲]، رضا شیرزادیان‌خرم‌آباد[۲] و سیده حمیده کاروانکش[۳]

Zhale Hekmati[1], Ali Aalami[2*], Mohamad Mehdi Sohani[2], Reza Shirzadian Khorramababd[2] and Seyede Hamide Karvankesh[3]

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲- استادیار دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۳- دانش آموخته ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

1- PhD Student of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.
2- Assistant Professor, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.
3- Graduted M.s.c. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ali_aalami@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

چکیده

مسیرهای انتقال پیام توسط اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات به‌صورت آنتاگونیست یا در بعضی موارد هم‌افزا عمل می‌کنند، تنظیم تداخل این دو مسیر سبب ایجاد مقاومت در گیاهان در مقابل حمله پاتوژن‌ها می‌شود. ژن تنظیمی *NPR1* نقش مؤثری را در تنظیم تداخل مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات به عهده دارد، فعال شدن *NPR1* وابسته به میزان این دو هورمون در گیاه است. بر این اساس در این پژوهش اثر آنتاگونیستی و هم‌افزایی اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات بر الگوی بیان ژن تنظیمی *NPR1* و برخی از ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی شامل *PR1*، دیفنسین (*PDF1.2*) و تیونین (*Thi2.1*) با استفاده از روش Real time PCR در دو رقم خزر و هاشمی در زمان‌های صفر، ٦، ١٢، ٢٤ و ٤٨ ساعت بررسی شد. نتایج نشان داد ژن‌های مورد بررسی با مصرف اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در ژنوتیپ‌ها و زمان‌های مختلف، الگوی تظاهر متفاوتی داشتند که نشان دهنده وجود مسیرهای تنظیمی مرتبط بین این دو هورمون کلیدی در القای ژن‌های دفاعی است. بیان تمام ژن‌های مورد بررسی در رقم مقاوم خزر افزایش یافت درحالی‌که در رقم هاشمی الگوی بیان ژن *PR1* تغییری نشان نداد و بیان سایر ژن‌های مورد بررسی نیز از سطوح پایینی برخوردار بود. همچنین افزایش بیان ژن *NPR1* در پاسخ به تیمار با اسیدسالیسیلیک در زمان‌های زودتری نسبت به تیمار با متیل‌جاسمونات اتفاق افتاد. در کل اثر آنتاگونیستی و هم‌افزایی اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات منجر به تغییرات بیان ژن‌های مورد بررسی در زمان‌های مختلف شد، که احتمال دارد نتیجه آن در ژنوتیپ مقاوم، شکل‌گیری سیستم دفاعی مناسب در گیاه است.

واژه‌های کلیدی

اسید سالیسیلیک
آنتوگونیست
برنج
ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی
متیل جاسمونات

مقدمه

گیاهان در طول حیات خود مورد حمله تعداد زیادی از پاتوژن ها، علف‌خوارها و پارازیت‌ها قرار می‌گیرند که جهت مقابله با آن‌ها پاسخ‌های دفاعی متعددی را فعال می‌کنند (Koornneef and Pieterse, 2008). از این پاسخ‌های دفاعی می‌توان به مقاومت اکتسابی سیستمیک (Systemic acquired resistance: SAR) اشاره کرد که سبب تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و واکنش فوق حساسیت در گیاه می شود که منجر به نکروزه شدن محل آلودگی شده و به این ترتیب از گسترش بیماری جلوگیری می کند، هورمون اسیدسالیسیلیک عامل کلیدی در شکل‌گیری این نوع مقاومت محسوب می‌شود (Durrant and Dong, 2004)، نوع دیگری از پاسخ‌های دفاعی مقاومت القایی سیستمیک (Induced systemic resistance: ISR) است که در نتیجه ایجاد زخم و آسیب به بافت‌های گیاه که به‌طورمعمول توسط حشرات مکنده به‌وجودمی‌آید، تولید می‌شود، هورمون‌های اتیلن و متیل جاسمونات در شکل‌گیری این نوع مقاومت مؤثر هستند (Kessler and Baldwin, 2002). بر طبق گزارش‌های متعدد نقش کلیدی هورمون‌های اسیدسالیسیلیک، متیل‌جاسمونات و اتیلن در پاسخ‌های دفاعی و مقاومت در مقابل بیماری‌ها و آفات مشخص شده است (Von Dahl and Baldwin, 2007; Van Loon *et al.* 2006). به‌طورکلی می‌توان گفت پاتوژن‌های بیوتروف بیشتر نسبت به مقاومت القا شده توسط مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک حساس هستند و پاتوژن‌های نکروتروف و حشرات علف‌خوار توسط مقاومت القا شده به‌وسیله متیل‌جاسمونات و اتیلن سرکوب می‌شوند (Glazebrook, 2005)، البته استثناهایی هم در این زمینه وجود دارد (Thaler *et al.* 2004).

پژوهش‌های بیان ژن نشان می‌دهد که بین مسیرهای انتقال پیام اسیدسالیسیلیک، متیل‌جاسمونات و اتیلن برهمکنش وجود دارد که این برهمکنش می‌تواند از نوع مثبت یا منفی باشد، به این معنی که این هورمون‌ها می‌توانند اثرهای یکدیگر را تقویت و یا تضعیف کنند (De Vos *et al.* 2005). یکی از مثال‌های شناخته شده، تداخل مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات است (Beckers and Spoel, 2006)، در پژوهشی که روی گیاه آرابیدوپسیس انجام شد فعال شدن مسیر دفاعی اسید سالیسیلیک از طریق آلودگی با پاتوژن بیوتروف *Pseudomonas syringae* منجر به حساسیت این گیاه به پاتوژن نکروتروف *Alternaria brassicicola* که توسط مسیر دفاعی متیل جاسمونات سرکوب می‌شود، شد (Spoel *et al.* 2007). با این‌که پژوهش‌های بسیاری اثر آنتاگونیستی و تضعیف‌کننده بین این دو هورمون را نشان می‌دهد، اثر هم‌افزایی و تقویت کننده نیز بین این دو هورمون مشاهده شده است (Van Wees *et al.* 2000; Mur *et al.* 2006).

اسیدسالسیلیک بیان ژن‌های دفاعی را از طریق پروتئین تنظیمی *NPR1* (Non-expresser of pathogenesis related genes 1)، که یک ملکول کلیدی واسطه‌ی مقاومت اکتسابی سیستمیک در تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها است، افزایش می‌دهد (Dong, 2004). میزان اسیدسالیسیلیک پس از آلودگی گیاه توسط پاتوژن‌ها افزایش می‌یابد، که این امر منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه می‌شود که نتیجه آن انتقال *NPR1* از سیتوپلاسم به هسته است. *NPR1* در هسته به همراه فاکتورهای رونویسی سبب بیان برخی از ژن‌های مرتبط با ساز و کارهای مقاومت در گیاه می‌شود (Pieterse and Vanloon, 2004)، از جمله این ژن‌ها می‌توان به پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis related proteins: PRPs) اشاره کرد، که بسیاری از آن‌ها دارای فعالیت‌های ضدمیکروبی هستند (Van Loon *et al.* 2006). موتاسیون در ژن *NPR1* منجر به عدم تولید محصولات مسیر اسیدسالیسیلیک و در نتیجه حساسیت گیاه به پاتوژن‌های بیوتروف می‌شود (Dong, 2004). از طرف دیگر در پژوهشی که روی گیاه برنج انجام شد، مشاهده شد که افزایش بیان ژن *OsNPR1*، و فعال شدن *NPR1* در سیتوسول مانع ادامه مسیر انتقال پیام متیل‌جاسمونات و بیان ژن‌های این مسیر می‌شود که این امر سبب حساسیت گیاه به حشرات علف‌خوار می‌شود (Yuan *et al.* 2007).

بر این اساس با توجه به نقش کلیدی اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در فرآیند دفاع گیاهی و رفتار متفاوت آن‌ها بر تظاهر ژن‌های درگیر، در پژوهش حاضر الگوی بیان ژن تنظیمی *NPR1* و برخی از ژن‌های کد کننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در نتیجه محلول پاشی اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در دو رقم بومی و اصلاح شده برنج مورد مقایسه

و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش ارقام هاشمی (رقم بومی و رایج منطقه) و خزر (رقم اصلاح شده) مورد بررسی قرار گرفت. براساس پژوهش‌های مؤسسه تحقیقات برنج کشور در رشت (Momeni *et al*. 2006)، رقم خزر مقاوم به بیماری شایع بلاست و رقم هاشمی به این بیماری حساس است. قبل از کاشت، بذرها ضدعفونی شده و سپس در گلدان های حاوی خاک استریل کشت شدند.

تیمار گیاهان: برای اعمال تیمار از گیاهچه‌های برنج در مرحله سه‌برگی و قبل از ظهور برگ چهارم استفاده شد. برای این منظور از محلول اسیدسالیسیلیک (مرک- آلمان) با غلظت مؤثردو میلی‌مولار و محلول متیل‌جاسمونات (دویچه‌فا– هلند) با غلظت موثر ۰/۱ میلی‌مولار به‌صورت محلول پاشی در شرایط کنترل شده دمایی ۲±۲۲ درجه سانتیگراد و دوره نوری ١٤ ساعت روشنایی استفاده شد (Daw *et al*. 2008; Taheri and Tarighi, 2010). بدین‌صورت‌که ابتدا گیاهان کشت شده در گلدان به سه گروه مجزا با فاصله تقسیم و گروه اول با محلول اسیدسالیسیلیک و گروه دوم با محلول متیل‌جاسمونات و گروه سوم که نمونه‌های شاهد محسوب می‌شدند با آب مقطر محلول‌پاشی شدند. سپس نمونه‌گیری در پنج مرحله زمانی شامل صفر، ٦، ١٢، ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از تیمار (Daw *et al*. 2008) انجام شد. در هر نمونه‌گیری ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگی جدا شده، بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت و سپس به فریزر ۸۰- منتقل شد.

بررسی بیان ژن‌ها به روش Real Time PCR: جهت بررسی بیان ژن‌ها در دو نمونه تیمار و شاهد مربوط به دو رقم هاشمی و خزر، استخراج آر.ان.اِ براساس دستورالعمل کیت RNX-Plus (شرکت سیناژن) انجام شد. کیفیت و کمیت آر.ان.اِ استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر تأیید شد و پس از آن برای از بین بردن آلودگی‌های دی.ان.ای ژنومی، نمونه‌ها با DNase تیمار و سپس ساخت cDNA با استفاده از کیت Fermrntas K1621 انجام شد. پس از ساخت cDNA واکنش‌های کنترل مثبت و منفی به منظور بررسی صحت ساخت cDNA و عدم وجود آلودگی‌های ژنومی صورت گرفت و پس از تأیید cDNA ساخته شده، میزان بیان برخی از ژن‌های مرتبط با ساز و کارهای مقاومت شامل ژن تنظیم کننده مسیرهای پیام رسان، *NPR1*، سه پروتئین مهم مرتبط با بیماری‌زایی (PRP) از جمله *PR1*، دیفنسین (*PDF1.2*) و تیونین (*Thi2.1*) بررسی شد جهت نرمال‌سازی داده‌ها نیز از ژن 18S ربیوزومی به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

Table 1- Primers used in this study

ژن **Gene**	توالی آغازگر **Sequence of primer (5'-3')**	دمای اتصال (ºC) **Annealing temperature**	منبع **References**
18S rRNA	F: 5'-CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA-3' R: 5'-ACACTTCACCGGACCATTCAA-3'	58	(Jain *et al*. 2006)
OsNPR1	F: 5'-TGGCAGGTGAGAGTCTACGA-3' R: 5'-AGGTGGATTTGCACCAGAAC-3'	57	(Sugano *et al*. 2010)
OsPR1	F: 5'-CGCTGTGTGTTTGTGTTATGTC-3' R: 5'-CGTGGTTTTGTCTTTATTTCAATCC-3'	58	(Mitsuhara *et al*. 2008)
PDF1.2	F: 5'-ATCACCCTTATCTTCGCTGC-3' R: 5'-TGCTGGGAAGACATAGTTGC-3'	57	(Qu *et al*. 2010)
Thi2.1	F: 5'-GCTAGGCTTAGTCCTGCAAC-3' R: 5'-GGTGACAGTCTCAGCTTCCT-3'	56	(Sadati *et al*. 2012)

واکنش‌های Real Time PCR با استفاده از محلول SYBR Green ساخت شرکت Fermentas در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix، ٦/٥ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، دومیکرولیتر آغازگر پیشرو (۰/۳ میکرومولار)، ۲ میکرولیتر آغازگر پسرو (۰/۳ میکرومولار) و ۲ میکرولیتر cDNA (۵۰۰ نانوگرم)، انجام شد. چرخه دمایی و برنامه زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه (پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، سپس ۳۵ سیکل شامل واسرشت‌سازی (ده ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، اتصال آغازگر (٤٥ ثانیه در دمای اتصال تعیین شده در جدول یک) و بسط آغازگر (۱۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در پایان یک چرخه حرارتی از دمای ٦٠ الی ۹۵ درجه با توقف پنج ثانیه‌ای در هر مرحله برای تهیه منحنی ذوب نمونه‌ها در نظر گرفته شد.

داده‌های حاصل از Real Time PCR براساس روش $\Delta\Delta ct$ (Hunt, 2006) با داده‌های ژن مرجع نرمال شدند سپس این داده‌ها براساس آزمایش فاکتوریل‌اسپلیت در زمان در قالب طرح به‌طورکامل تصادفی تجزیه شد که پلات اصلی ترکیب دو عامل ژنوتیپ (هاشمی و خزر) و اسپری پاشی (اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات) و پلات فرعی زمان‌های نمونه‌گیری بودند. جهت مقایسه میانگین‌ها از روش توکی در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد. تجزیه داده‌ها با نرم افزار SAS نسخه نه صورت گرفت.

جدول ۲- تجزیه واریانس بیان ژنهای مورد مطالعه تحت تیمار متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در دو رقم برنج خزر و هاشمی

Table 2- Analysis of variance for expression of the studied genes under methyl jasmonate and salicylic acid treatments in two rice cultivars of Khazar and Hashemi

منبع تغییرات **Source of variation**	میانگین مربعات **MS**			
	NPR1	***PR1***	***PDF1.2***	***Thi2.1***
ژنوتیپ Genotype	2795.06 **	10465.22500**	19758.02500**	78411.02500**
محلول پاشی Spraying	13.94*	0.62500$^{n.s}$	1946.02500**	1525.22500**
محلول پاشی در ژنوتیپ Spraying*Genotype	2235.02500**	0.62500$^{n.s}$	950.62500**	1221.02500**
خطای اول Error 1	5.82500	5.82500	3.55833	9.62500
زمان Time	6768.53750**	2539.68750 **	3367.46250**	9456.16250**
زمان در ژنوتیپ Time*Genotype	1860.91250**	1920.78750**	3170.46250**	5658.83750**
زمان در محلول پاشی Time*Spraying	5264.91250**	1297.81250**	3923.21250**	8253.91250**
زمان در ژنوتیپ درمحلول پاشی Time*Genotype*Spraying	6887.08750**	1288.81250**	3504.56250**	10380.08750**
زمان در تکرار Time*Replication	16.28750 $^{n.s}$	17.91250$^{n.s}$	21.68750$^{n.s}$	35.08750**
خطای ۲ Error 2	10.3875	6.92917	5.37083	5.7708

^{ns}، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

^{ns,*} and **: Non-significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively

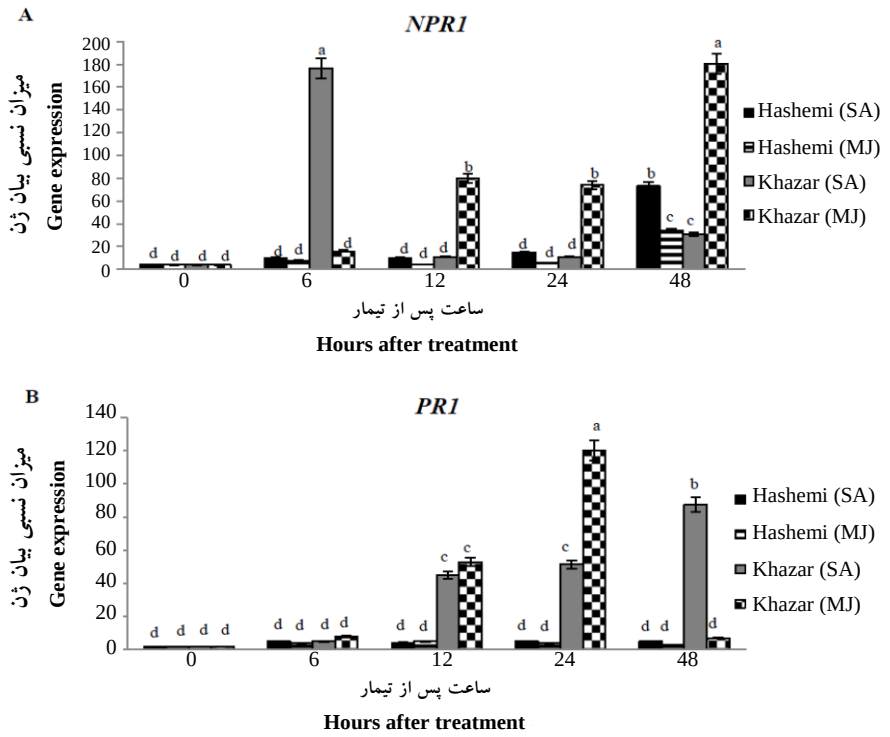
نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن‌های مورد پژوهش براساس داده‌های Real Time PCR نشان داد (جدول ۲)، اثر متقابل ژنوتیپ با محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در زمان‌های مورد بررسی برای چهار ژن یاد شده دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد است که این نشان دهنده وجود برهمکنش و رفتار متفاوت ژنوتیپ‌ها در پاسخ به مصرف اسیدسالیسیلیک و یا متیل‌جاسمونات در زمان‌های فوق است. بر این اساس جهت ارزیابی دقیق‌تر اثر (هم‌افزایی یا آنتاگونیست) این دو ترکیب در القای ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های دفاعی، بیان هر ژن در دو ژنوتیپ و در زمان‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفتند.

بررسی اثر آنتاگونیستی و هم‌افزایی اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات برالگوی بیان ژن تنظیمی *NPR1* و *PR1*: نتایج حاصل از داده‌های Real Time PCR نشان دهنده تفاوت معنی‌دار الگوی بیان ژن *OsNPR1* در رقم خزر و هاشمی در زمان‌های مختلف است، به‌نحوی‌که بیشترین میزان بیان این ژن در رقم خزر در زمان شش ساعت پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک اتفاق افتاد درحالی‌که در رقم هاشمی میزان بیان این ژن در زمان ٤٨ ساعت پس از تیمار به حداکثر مقدار خود رسید (شکل ۱A)، از آنجا که *NPR1* پروتئین تنظیمی مسیر مقاومت اکتسابی سیستمیک با واسطه اسیدسالیسیلیک محسوب می‌شود افزایش بیان این ژن پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک قابل انتظار است، مقاومت ذاتی رقم خزر و به احتمال زیاد دارا بودن مقادیر بیشتری از اسیدسالیسیلیک درونی (Silverman *et al*., 1995) باعث می‌شود که افزایش بیان این ژن در رقم خزر در زمان زودتری نسبت به هاشمی اتفاق بیافتد.

نتایج حاصل از تیمار با متیل جاسمونات متفاوت بود به‌طوری‌که افزایش بیان ژن *OsNPR1* در رقم خزر از شش ساعت پس از تیمار آغاز شد و ٤٨ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید، در رقم هاشمی نیز بیشترین میزان بیان این ژن ٤٨ ساعت پس از تیمار مشاهده شد (شکل ۱A). گزارش‌ها نشان می‌دهد که تیمار گیاه برنج با متیل‌جاسمونات سبب افزایش بیان ژن (Phenyl alanine ammonia lyase) *PAL* و نیز افزایش فعالیت آنزیم *PAL* می‌شود (Bi *et al*. 2007). این آنزیم، آنزیم کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید است که مسیر اصلی سنتز اسیدسالیسیلیک محسوب می‌شود البته سایر ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدها نیز در این مسیر ساخته می‌شوند (Hayat *et al*. 2010). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هورمون متیل‌جاسمونات با القا بیان ژن *PAL* و افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز سبب تولید اسیدسالیسیلیک شده و به احتمال زیاد به همین دلیل است که بیان ژن *NPR1* به‌تدریج و در ٤٨ ساعت پس از تیمار با متیل‌جاسمونات به حداکثر می‌رسد، به این ترتیب همکاری مثبت و اثر هم‌افزایی متیل‌جاسمونات با اسیدسالیسیلیک در جهت فعال کردن مسیر مقاومت اکتسابی سیستمیک مشاهده می‌شود. در گزارش‌های قبلی نیز تیمار گیاه برنج با اسیدسالیسیلیک یا بنزوتیادیازول (آنالوگ اسیدسالیسیلیک) سبب افزایش بیان ژن *OsNPR1* و فاکتورهای رونویسی مرتبط با آن شد (Sugano *et al*. 2010)، در پژوهش دیگری که در گیاه برنج انجام گرفت مشخص شد بیان ژن *OsNPR1* در موتانت‌های cea62 که مقادیر بالایی اسیدجاسمونیک تولید می‌کنند نسبت به نوع وحشی افزایش چشم‌گیری داشت (Liu *et al*. 2012).

تجمع اسیدسالیسیلیک سبب تولید گونه‌های اکسیژن فعال و در نتیجه شکستن پل‌های دی‌سولفیدی در فرم الیگومری *NPR1* و تبدیل شدن آن به فرم‌مونومری و فعال شدن *NPR1* در سیتوسول می‌شود (Pieterse and Van Loon, 2004)، *NPR1* در سیتوسول از طریق تداخل در کمپلکس یوبی‌کوئیتین‌لیگاز (SKP1, CDC53p/CUL1 F-boxCOI1) SCFCOI1، سبب ممانعت از ادامه مسیر انتقال پیام متیل‌جاسمونات و بیان ژن‌های مرتبط با آن می‌شود، این کمپلکس نقش کلیدی در انتقال پیام توسط متیل‌جاسمونات دارد (Xu *et al*. 2002). به این ترتیب اسیدسالیسیلیک از طریق *NPR1* سیتوپلاسمی، اثر آنتاگونیستی خود را بر مسیر انتقال پیام متیل‌جاسمونات اعمال می‌کند (Spoel *et al*. 2003). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که *OsNPR1* در حالت مونومری و فعال، فقط در سیتوپلاسم اثر ممانعت کننده بر مسیر متیل‌جاسمونات دارد، این پروتئین پس از فعال شدن جهت القا مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک به هسته منتقل شده و به همراه فاکتورهای رونویسی TGA سبب بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌شود، بنابراین در هسته تهدیدی برای مسیر انتقال پیام متیل‌جاسمونات محسوب نمی‌شود (Yuan *et al*. 2007).



شکل ۱- اثر اسیدسالیسیلیک (SA) و متیل‌جاسمونات (MJ) بر الگوی بیان ژن‌های *NPR1* و *PR1* در ارقام برنج (حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند).

Figure 1- Effect of salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MJ) on the expression of the genes *NPR1* and *PR1* in rice cultivars (Common letters are not significantly different at probability level of 5%)

همانطور که در شکل ۱A مشاهده می‌شود در ساعت‌های اولیه، اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونیت رفتار متضادی (آنتاگونیستی) در الگوی بیان این ژن ایجاد نکردند به‌نحوی‌که، در ساعاتی که برای یک ترکیب افزایش بیان وجود دارد در همان زمان برای ترکیب دیگر بیان معنی‌داری مشاهده نمی‌شود اما به تدریج با گذشت زمان (ساعت ٤٨) الگوی بیان به سمت هم‌افزایی تمایل یافته است که این موضوع ممکن است به دلیل انتقال این پروتئین به هسته و کاهش فراوانی آن در سیتوپلاسم باشد.

در این پژوهش بررسی بیان ژن *PR1* پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک نشان داد که بیان این ژن در رقم مقاوم خزر از زمان شش تا ٤٨ ساعت پس از تیمار به تدریج افزایش یافت به طوری‌که در زمان ٤٨ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید، نتایج حاصل از تیمار با متیل‌جاسمونات نیز نشان داد که بیان این ژن در رقم مقاوم خزر روند صعودی را طی کرد ولی در ٢٤ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید و سپس کاهش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد مسیر بیان این ژن از طریق اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات در رقم خزر با یکدیگر هم‌نوایی دارند. در مقابل الگوی بیان این ژن در رقم حساس هاشمی در زمان‌های مختلف پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات تفاوت معنی‌داری نشان نداد. این موضوع تأیید کننده این واقعیت است که الگوی بیان این ژن‌ها تا حد زیادی به ماهیت ژنتیک گیاه میزبان وابسته است (شکل ۱B). *PR1* بلافاصله بعد از حمله پاتوژن، افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک و فعال شدن *NPR1* و ورود آن به هسته بیان می‌شود و به‌عنوان نشانگری برای مقاومت اکتسابی سیستمیک شناخته شده است (Van Loon and Van Strien, 1999). در گزارشی تیمار گیاه برنج با اسیدسالیسیلیک سبب افزایش بیان *OsPR1* شد، از طرف دیگر کاربرد اسیدجاسمونیک و اسیدآبسیزیک روی گیاهان تیمار شده با اسیدسالیسیلیک به‌طور مؤثری سبب کاهش بیان این ژن شد، اما کاربرد اسیدجاسمونیک و اسیدآبسیزیک هرکدام به تنهایی سبب افزایش بیان ژن *PR1* شد این نتایج اثرهای آنتاگونیستی بین مسیرهای سیگنالینگ اسیدسالیسیلیک و اسیدجاسمونیک را نشان

داد (Agrawal *et al*. 2001). در پژوهشی دیگر که روی گیاه برنج انجام شد بیان ژن *OsPR1* پس از تیمار گیاه با سالیسیلیک‌اسید یا متیل‌جاسمونات افزایش یافت (Mitsuhara *et al*. 2008).

ازآنجاکه تیمار با اسیدسالیسیلیک سبب افزایش بیان *NPR1* و فعال شدن آن شده و این پروتئین تنظیمی به همراه فاکتور رونویسی TGA سبب رونویسی ژن *OsPR1* می‌شود، روند صعودی بیان ژن *OsPR1* پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک قابل انتظار است. پژوهش های انجام شده، افزایش بیان این ژن را پس از تیمار گیاه برنج با متیل‌جاسمونات نشان می‌دهد (Agrawal *et al*. 2001 Mitsuhara *et al*. 2008)، در این پژوهش نیز بیان ژن *PR1* تا ۲٤ ساعت پس از تیمار با متیل‌جاسمونات افزایش یافت اما پس‌ازآن، از آنجاکه میزان اسیدسالیسیلیک افزایش یافته است (به دلیل اثر هم‌افزایی و همکاری مثبت متیل‌جاسمونات با اسیدسالیسیلیک که سبب افزایش بیان ژن *PAL* و در نتیجه افزایش سنتز اسیدسالیسیلیک می‌شود)، اثر آنتاگونیستی اسیدسالیسیلیک بر متیل‌جاسمونات اعمال شده و مانع ادامه مسیر انتقال پیام متیل‌جاسمونات و بیان ژن‌های این مسیر می‌شود، به احتمال زیاد به همین دلیل است که بیان ژن *OsPR1* در ٤۸ ساعت پس از تیمار با متیل‌جاسمونات در رقم خزر کاهش می‌یابد.

بررسی اثر آنتاگونیستی و هم‌افزایی اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات برالگوی بیان ژن‌های دیفنسین و تیونین: در این پژوهش بررسی بیان ژن دیفنسین *OsPDF1.2* که به خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی شماره ۱۲ (*OsPR12*) منسوب است، نشان داد بیان این ژن در رقم مقاوم خزر شش ساعت پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک افزایش یافت و پس از ۱۲ ساعت به حداکثر خود رسید و پس از آن کاهش یافت (شکل ۲A).

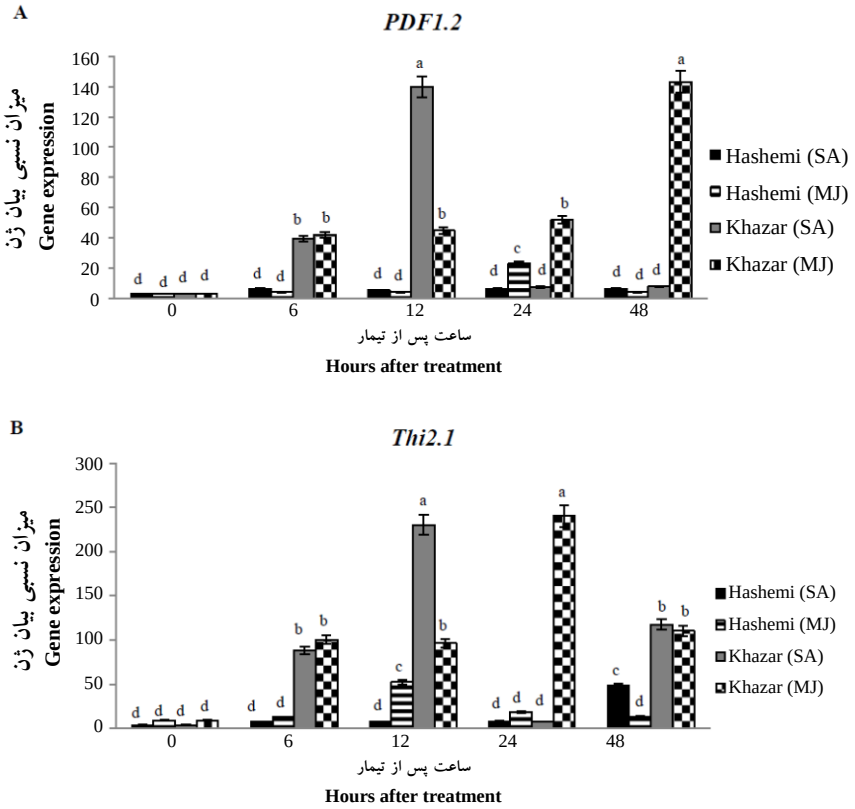
گزارش‌های حاصل از بررسی مسیر انتقال پیام متیل‌جاسمونات نشان می‌دهد که ژن‌های *COI1* (Coronatine insensitive1)، *MPK4* (Mitogen-activated protein kinase4) و *SSI2* (Suppressor of SA insensitivity2) نقش کلیدی در این مسیر دارند، این ژن‌ها در پایین دست متیل‌جاسمونات قرار گرفته‌اند و پس از افزایش متیل‌جاسمونات بیان شده و سبب بیان ژن‌های دیفنسین و تیونین می شوند. موتاسیون در این ژن‌ها، مانع ادامه مسیر انتقال پیام متیل‌جاسمونات و بیان ژن‌های دفاعی این مسیر و در عوض فعال شدن مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک می‌شود، به عبارتی دیگر این ژن‌ها تنظیم کننده منفی برای اسیدسالیسیلیک محسوب شده و مانع مسیر انتقال پیام اسیدسالیسیلیک می‌شوند و از این طریق اثر آنتاگونیستی متیل‌جاسمونات را روی اسیدسالیسیلیک اعمال می‌کنند (Kunkel and Brook, 2002). رقم خزر به دلیل مقاومت ذاتی دارای مقادیر بالایی از متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک است، در ابتدا همکاری مثبت این دو سبب افزایش بیان دیفنسین می‌شود ولی به دلیل تیمار اسیدسالیسیلیک میزان بیان *NPR1* افزایش یافته و پس از مدتی (۲٤ ساعت پس از تیمار) فرم فعال آن در سیتوسول تجمع پیدا می‌کند و از طریق اختلال در عمل کمپلکس‌یوبی‌کوئیتین‌لیگاز SCF^{COI1} مانع ادامه مسیر توسط *COI1* و بیان ژن دیفنسین می‌شود و به احتمال زیاد به همین دلیل است که بیان این ژن در ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از تیمار کاهش یافته است.

نتایج حاصل از تیمار با متیل‌جاسمونات روند صعودی بیان ژن دیفنسین *OsPDF1.2* را در رقم مقاوم خزر نشان داد به‌طوری‌که ٤۸ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید در رقم محلی حساس هاشمی تفاوت معنی‌داری در الگوی بیان این ژن پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات مشاهده نشد (شکل ۲A). از آنجاکه متیل‌جاسمونات از طریق القا ژن‌های *COI1*، *MPK4* و *SSI2* سبب بیان ژن دیفنسین می‌شود، روند صعودی بیان این ژن پس از تیمار با متیل‌جاسمونات امری قابل انتظار است. از طرفی به‌دلیل این‌که گیاه را با متیل‌جاسمونات تیمار کرده‌ایم، اثر ممانعت کننده ژن‌های فوق بر اسیدسالیسیلیک مانع از شکل‌گیری *NPR1* و اثر آنتاگونیستی اسیدسالیسیلیک بر متیل‌جاسمونات می‌شود در نتیجه بیان ژن دیفنسین تا ٤۸ ساعت پس از تیمار با متیل‌جاسمونات به‌تدریج افزایش می‌یابد. دیفنسین با تحریک پاتوژن‌ها در گیاه تولید شده (Zimmerli *et al*. 2004) و میزان بیان آن با اسیدسالیسیلیک، متیل‌جاسمونات و اتیلن تنظیم می‌شود، بیان ژن دیفنسین در گیاه آرابیدوپسیس پس از افزایش غلظت داخلی اسیدسالیسیلیک، متیل‌جاسمونات و اتیلن که در نتیجه حمله پاتوژن‌ها اتفاق می‌افتد، افزایش می‌یابد (Glazebrook *et al*.

2003). در گزارشی دیگر نیز میزان بیان ژن دیفنسین *OsPDF1.2* پس از آلودگی با عامل بیماری بلاست *Magnoporthe grisea* در ارقام خزر (مقاوم به بلاست) و طارم (حساس به بلاست) افزایش داشت و افزایش بیان این ژن در رقم خزر بیشتر از رقم طارم بود (Sadati *et al*. 2012).

بررسی بیان ژن تیونین، منسوب به خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی شماره ۱۳ (*OsPR13*) در هر دو رقم خزر و هاشمی پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک افزایش پیدا کرد به‌طوری‌که در رقم مقاوم خزر، بیشترین میزان افزایش بیان ژن در زمان ۱۲ ساعت پس از تیمار و در رقم حساس هاشمی حداکثر میزان بیان این ژن ٤٨ ساعت پس از تیمار بود، البته میزان افزایش بیان در خزر نسبت به هاشمی بیشتر بود (شکل ۲B). همانطور که در بررسی بیان ژن دیفنسین اشاره شد تجمع *NPR1* فعال در سیتوسول پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک با اختلال در عمل کمپلکس‌یوبی‌کوئیتین‌لیگاز SCF^{COI1} می‌تواند عامل کاهش بیان ژن تیونین ٢٤ ساعت پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک در رقم خزر باشد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن تیونین پس از تیمار با متیل‌جاسمونات نشان دهنده افزایش بیان این ژن در ارقام خزر و هاشمی بود به‌طوری‌که بیان این ژن در رقم خزر ٢٤ و در هاشمی ۱۲ ساعت پس از تیمار به حداکثر رسید (شکل ۲B). به‌دلیل این‌که متیل‌جاسمونات سبب القا بیان ژن‌های بالادست تیونین و دیفنسین یعنی ژن‌های *COI1*، *MPK4* و *SSI2* می‌شود، افزایش بیان ژن تیونین پس از تیمار با متیل‌جاسمونات قابل انتظار است.

از خصوصیت‌های اصلی تیونین‌ها فعالیت‌های ضد قارچی و ضد باکتریایی آن‌ها است. گزارش‌های زیادی حاکی از این است که گیاهان تراریختی که حاوی ژن تیونین هستند در مقابل حمله پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند.



شکل ۲- اثر اسیدسالیسیلیک (SA) و متیل‌جاسمونات (MJ) بر الگوی بیان ژن‌های دیفنسین (*PDF1.2*) و تیونین (*Thi2.1*) در ارقام برنج (حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند).

Figure 2- Effect of salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MJ) on the expression of the genes *PDF1.2* and *Thi2.1* (Common letters are not significantly different at probability level of 5%)

برای مثال افزایش بیان ژن تیونین جو در توتون تراریخته سبب مقاومت به *Pseudomonas syringae* و در برنج تراریخته سبب مقاومت به برخی از بیماری‌های باکتریایی شد (Iwai *et al.* 2002). در ضمن در بررسی دیگری که روی گیاه برنج انجام شد مشخص شد که بیان ژن تیونین *Thi2.1* در هر دو رقم خزر (مقاوم به بلاست) و طارم (حساس به بلاست) پس از آلودگی با قارچ بلاست افزایش یافت (Sadati *et al.* 2012). آلودگی گیاه توسط پاتوژن‌ها همچنین کاربرد خارجی ترکیب‌هایی مانند اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات میزان بیان این ژن‌ها را تغییر می‌دهد که این اختلاف در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس متفاوت است (Sels *et al.* 2008).

پاسخ‌های دفاعی در گیاهان توسط شبکه وسیعی از مسیرهای انتقال پیام شکل می‌شود که هورمون‌های اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات از عوامل اصلی دخیل در شکل‌گیری این پاسخ‌ها هستند. برهمکنش‌های پیچیده بین هورمون‌های اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات تا حدودی شناخته شده است و شامل اثرهای آنتاگونیستی و هم‌افزایی است (Peng *et al.* 2012). همانطور که قبل از این اشاره شد از عوامل دخیل در برهمکنش بین مسیرهای انتقال پیام اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات پروتئین تنظیمی *NPR1* است که اثر آنتاگونیستی اسیدسالیسیلیک را بر متیل‌جاسمونات اعمال می‌کند، از طرفی ژن‌های *COI1*، *MPK4* و *SSI2* نیز نقش مؤثری در شکل‌گیری اثر آنتاگونیستی متیل‌جاسمونات علیه اسیدسالیسیلیک دارند. از جمله عوامل دیگری که در تنظیم تداخل مسیرهای انتقال پیام اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات نقش دارند، فاکتورهای رونویسی WRKY هستند که در مسیرهای متعدد زیست شناسی به خصوص در پاسخ به تنش‌های زیستی و در شکل‌گیری مقاومت علیه پاتوژن‌ها نقش کلیدی دارند (Pandey and Somssich, 2009).

در این پژوهش نیز اثرهای آنتاگونیستی و هم‌افزایی بین این دو هورمون با دخالت ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی فوق سبب افزایش و کاهش بیان ژن‌های مورد بررسی در ارقام خزر و هاشمی شد. در این بررسی مشخص شد بیان تمام ژن‌ها در رقم مقاوم خزر پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک یا متیل‌جاسمونات افزایش یافته و این افزایش در مقایسه با رقم هاشمی از سطح بالاتری برخوردار بود که این نتایج به احتمال زیاد با مقاومت ذاتی رقم خزر به بیماری بلاست در ارتباط است. درحالی‌که در رقم هاشمی الگوی بیان ژن *OsPR1* و دیفنسین پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری نشان نداد و افزایش بیان سایر ژن‌های *NPR1* و تیونین نیز از سطوح پایینی برخوردار بود. از طرف دیگر همانطور که مشاهده شد افزایش بیان ژن‌های مورد بررسی پس از تیمار با اسیدسالیسیلیک در زمان‌های زودتری نسبت به تیمار با متیل‌جاسمونات اتفاق افتاد، این امر به‌احتمال-زیاد نقش مؤثرتر اسیدسالیسیلیک را در شکل‌گیری پاسخ‌های دفاعی مرتبط با ژن‌های مورد بررسی، نسبت به متیل‌جاسمونات مشخص می‌کند. به‌طورکلی همانطور که اشاره شد اثرهای آنتاگونیستی و هم‌افزایی اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات منجر به تغییرهای بیان ژن‌های مورد بررسی در زمان‌های مختلف شد. به دلیل دخالت تعداد زیادی از ژن‌های تنظیمی و فاکتوهای رونویسی در تنظیم تداخل مسیرهای انتقال پیام، شناخت دقیق این مسیرها به راحتی امکان‌پذیر نیست و نیازمند بررسی‌های بیشتر است.بنابراین توصیه می‌شود در پژوهش‌های آتی جهت تعیین روابط آنتاگونیستی و هم‌افزایی بین هورمون‌های اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات، بیان سایر ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی دخیل، مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

Agrawal G, Rakwal R, Jwa N, Agrawal V. 2001. Signaling molecules and blast pathogen attack activates rice *OsPR1*a and *OsPR1*b genes: A model illustrating components participating during defence/stress response. Plant Physiology and Biochemistry 39: 1095-1103.

Beckers GJM, Spoel SH. 2006. Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. Plant Biology 8: 1-10.

Bi HH, Zeng RS, Su LM. An M, Lu SM. 2007. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. Journal of Chemistry Ecology 33: 1089-1103.

Daw DB, Zang LH, Wang ZZ. 2008. Salicylic acid enhances antifungal resistance to Magnaporthe grisea in rice plants. Australasian Plant Pathology 37: 637-644.

De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van

Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Me´traux JP, Van Loon LC, Dicke M. 2005. Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. Molecular Plant Microbe Interactions 18: 923-937.

Dong X. 2004. *NPR1*, all things considered. Current Opinion in Plant Biology 7:547-552.

Durrant WE, Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. Annual Review. Phytopathology. 42: 185–209.

Glazebrook J, ChenW, Estes B, Chang HS, Nawrath C, Me´traux JP, Zhu T, Katagiri F. 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. Plant Journal 34: 217-228.

Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review Phytopathology 43: 205-227.

Hunt M. 2006. Real Time PCR Tutorial. University of South Carolina. (Access on line: http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm).

Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. Environmental and Experimental Botany 68: 14-25.

Iwai TH, Kaku R, Honkura S, Nakamura H, Ochiai T, Sasaki Y. 2002. Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. Molecular Plant Microbe Interactions 15: 515-521.

Jain M, Nijhawan A, Tiagi AK, Purana PJ. 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications 345: 646-651.

Kessler A, Baldwin IT. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. Annual Review. Plant Biolology 53: 299-328.

Koornneef A, Pieterse C. 2008. Cross Talk in Defense Signaling. Plant Physiology 146: 839-844.

Kunkel BN, Brooks D .2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Current Opinion in Plant Biology 5:325-331.

Liu X, Li F, Tang J, Wang W, Zhang F, Wang G, Chu J, Yan C, Wang T, Chu C, Li C. 2012. Activation of the Jasmonic Acid Pathway by Depletion of the Hydroperoxide Lyase OsHPL3 Reveals Crosstalk between the HPL and AOS Branches of the Oxylipin Pathway in Rice. Plos one 7(11): 1-14.

Mitsuhara I, Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Hirosea S, Ohkawa Y, Ohashi Y. 2008. Characteristic expression of 12 rice *PR1* family gene in response to pathogen infection, wounding and defense related signal compounds (121/180). Molecular Genetics and Genomics 279: 415-427.

Momeni A, Padasht Dehkaie F, Mousa nejad S, Javan nikkhah M. 2006. Determination of reducing resistance component in selected cultivar of rice. Agricultural knowledge 16(3), 135-144 (In Farsi with English abstract).

Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. Plant Physiology 140: 249-262.

Pandey SP, Somssich IE. 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. Plant Physiolpgy 150:1648-1655.

Pieterse C, Van loon LC. 2004. *NPR1*: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology 7:456-464.

Qu NA, Gan W, Bi D, Xia S, Li X, Zhang Y. 2010. Two BTB proteins function redundantly as negative regulators of defense against pathogens in Arabidopsis. Botany 88:953-960.

Sadati Z, Ghanbari MA, Babaiezad V, Rahimian H 2012. The antimicrobial peptides thionin and defensin are involved in rice resistance against Magnaporthe grisea fungus. In: 12th Genetic congress. Iran, Tehran Shahid Beheshti University (In Farsi with English abstract).

Sels J, Mathys J, De Coninck B, Cammue B, De Bolle M. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry 46:941-950.

Silverman P, Seskar M, Kanter D, Schweizer P, Metraux J. P, Raskin I. 1995. Salicylic acid in rice biosynthesis, conjugation and possible role. Plant Physiology 108: 633-639.

Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Me´ traux JP, 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.

Spoel SH, Johnson JS, Dong X. 2007. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. Proceedings of the National Academy of Sciences 104: 18842-18847.

Sugano Sh, Chang J, Miyazawa S, Masumoto C, Yazawa K, Hayashi N, Shimono M, Nakayama A, Miyao M, Takatsuji H. 2010. Role of *OsNPR1* in rice defense program as revealed by genome wide expression analysis. Plant Molecular Biology 74:549-562.

Taheri P, Tarighi S. 2010. Riboflavin induces resistance in rice against Rhizoctonia solani via jasmonate mediated priming of phenylpropanoid pathway. Journal of Plant Physiology 167: 201-208.

Thaler JS, Owen B, Higgins VJ. 2004. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. Plant Physiology 135: 530-538.

Van Loon LC, Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological Molecular Plant Pathology 55: 85-97.

Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM. 2006a. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. Trends in Plant Science 11: 184-191.

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006b. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review Phytopathology 44: 135-162.

Van Wees SCM, De Swart EAM, Van Pelt JA, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences 97: 8711-8716.

Von Dahl CC, Baldwin IT. 2007. Deciphering the role of ethylene in plant herbivore interactions. Plant Growth Regulator. 26: 201-209.

Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D. 2002. The SCFCOI1 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. Plant Cell 14:1919-1935.

Yuan Y, Zhong S, Li Q, Zhu Z, Lou Y,Wang L, Wang J, WangM, Li Q, Yang D, 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: 313–324.

Zimmerli L, Stein M, Lipka V, Schulze-Lefert L, Somerville S. 2004. Host and nonhost pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. Plant Journal 40: 633-646.