The effect of Marjrom medicinal herb extract on the expression of some genes involve in resistance to *Septoria tritici* leaf blotch in two wheat Chamran and Yavarous cultivars

Akram Abasi Manesh [1], Arash Fazeli [1*] and Siamk Beigi [2]
[1] Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Ilam university, Ilam, Iran
[2] Agricultural Jahad organization of Ilam Province, Ilam, Iran

Abstract
Leaf *Septoria tritici* anamorph *Mycosphaerella graminicola* is one of the main destructive foliar disease of wheat. Resistance cultivars and chemical pesticide are commonly methods that used to control of this disease. In this research, the effect of Marjoram extract was investigated in order to induction of resistance in two resistance and sensitive cultivars of wheat. Experiment was conducted in control (without extract) and treatment (extract) conditions on two cultivars: Chamran as resistance Yavarous as sensitive cultivar at greenhouse condition. Two days after treatment of seedling with extract, inoculation of plants had been done with Dehloran isolate of *septoria tritici* with 7×10^5 spore/ml. RNA extraction and cDNA synthesis from leaf samples were prepared at 6, 12 and 24 hours after contamination for further analysis. The results showed that the expression of *PR1* gene at investigated times between two cultivars at two conditions was different so that after 6h, the *PR1* gene expression in resistance cultivar was peaked about 2.5 fold change rather than sensitive cultivar, while the expression of Ppi gene 6h after inoculation, in Yavarous showed 2.5 fold change rather than Chamran cultivar. Application of Marjrom extract increased the expression of *PR1* gene in resistance cultivar, while *Ppi* gene expression increased in sensitive cultivar three fold changes. It is suggested that the use of methanolic extracts of Marjoram medicinal plant can induce resistance and activation of the plant defense system against *M. graminicola* fungal pathogen.
Keywords: *septoria tritici* disease, extract medical plant, wheat resistance, Real Time-PCR

* Corresponding Author: a.fazeli@ilam.ac.ir

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دهم، شمارهٔ سی و هشتم، زمستان ۱۳۹۷، صفحهٔ ۳۴-۲۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۴/۰۳
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۰۸/۰۸
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۹/۱۹

تأثیر عصارهٔ گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) در بیان برخی ژن‌های دخیل در مقاومت به عامل بیماری سپتوریوز برگی در دو رقم گندم چمران و یاواروس

اکرم عباسی منش [۱]، آرش فاضلی [۱*]، سیامک بیگی [۲]
[۱] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
[۲] سازمان جهاد کشاورزی استان ایلام، ایلام، ایران

چکیده

بیماری سپتوریوز برگی گندم که عامل آن قارچ *Mycosphaerella graminicola* است، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم است. ارقام مقاوم و سموم شیمیایی دو روش رایج برای کنترل این بیماری هستند. در پژوهش حاضر، تأثیر عصارهٔ گیاه دارویی مرزنجوش در القای مقاومت در دو رقم حساس و مقاوم گندم بررسی شد. آزمایش در شرایط بدون عصاره (کنترل) و با تیمار عصاره بر دو رقم گندم چمران (مقاوم) و یاواروس (حساس) در گلخانه انجام شد. دو روز پس از تیمار عصاره، آلودگی دو رقم با ایزولهٔ قارچ سپتوریوز دهلران جلیزی به‌مقدار ۷×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر آلوده شدند. تهیهٔ RNA و سنتز cDNA از نمونه‌های برگی در سه زمان ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی برای آنالیزهای بعدی انجام شدند. نتایج نشان دادند میزان بیان ژن *pr1* در زمان‌های مختلف بین دو رقم مقاوم و حساس پس از عصاره‌پاشی و آلودگی با ایزولهٔ قارچ، بسیار متفاوت است؛ به‌طوری‌که این میزان پس از ۶ ساعت به ۲/۵ برابر رقم حساس رسید؛ اما میزان بیان ژن *ppi* پس از ۶ ساعت تیمار، در رقم یاواروس تقریباً ۲/۵ برابر رقم چمران مشاهده شد. به کار بردن عصارهٔ مرزنجوش بیان ژن *pr1* را در رقم مقاوم و بیان ژن *ppi* را در رقم حساس افزایش داد. با توجه به اینکه بیان ژن *ppi*، ۲۴ ساعت پس از آلودگی، در رقم حساس سه برابر رقم مقاوم شد، پیشنهاد می‌شود به کار بردن عصارهٔ متانولی گیاه دارویی مرزنجوش ممکن است القا مقاومت و فعال‌شدن سیستم دفاعی گیاه را در مقابل بیماری‌زای قارچی *M. graminicola* سبب شود.

واژه‌های کلیدی: بیماری سپتوریوز، عصارهٔ گیاه دارویی، مقاومت گندم، Real Time PCR

* نگارندهٔ مسئول: نشانی پست الکترونیک: a.fazeli@ilam.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۸۴۳۲۲۲۳۴۸۷۵

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) غذای اصلی بشر در بسیاری از نقاط جهان است که در سال ۲۰۱۳ بیش از ۷۱۴ میلیون تن در جهان تولید شده است (Kiss *et al*., 2014). باتوجه‌به افزایش روزافزون جمعیت، برای پاسخ‌گویی به نیاز کشورهای در حال توسعه تا سال ۲۰۵۰ به ۶۰ درصد افزایش در واحد تولید گندم نیاز است (Singh and Trethowan., 2007; Singh *et al*., 2007). ازسویی تنش‌های زنده و غیرزنده عامل اصلی محدودکنندهٔ تولید گندم هستند که بین آنها بیماری‌های قارچی تهدیدی جدی برای شکاف بین عملکرد واقعی و دست‌یافتنی در گندم هستند (Goutam *et al*., 2013) قارچ *Mycosphaerella graminicola*، ایجادکنندهٔ بیماری سپتوریوز برگی گندم است یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برگی گندم گسترش‌یافته در بسیاری از مناطق دنیا است که در اروپا در درجهٔ اول اهمیت قرار دارد (Thomas *et al*., 2003). میزان کاهش محصول در آلودگی‌های شدید با این قارچ، ۳۱ تا ۵۳ درصد گزارش شده است (Eyal, 1981; Eyal and Ziv, 1974). استفاده از ارقام مقاوم و سموم قارچ‌کش روش‌های موجود برای کنترل این بیماری در گندم هستند (Adhikari *et al*., 2007). استفاده از ارقام مقاوم ازلحاظ اقتصادی و زیست‌محیطی روش مطمئن‌تری است (Eyal., 1981). مقاومت ژنتیکی در ارقام مختلف به دو صورت کمی و کیفی انجام می‌شود. تاکنون ۱۸ ژن اصلی مقاومت به بیماری (*Septoria Tritici* Blotch (STB)) نقشه‌یابی شده‌اند که بین آنها *Stb1* در آمریکای مرکزی بیشترین پایداری را دارد (Adhikari *et al*., 2004)؛ درحالی‌که *Stb4* که ۱۵ سال پیش در کالیفرنیا مقاومت خیلی خوبی در گندم‌ها باعث شده بود، به‌تازگی مقاومت آن شکسته شده است (Jackson *et al*., 2000). بررسی‌های انجام‌شده برای شناسایی ژن‌های مؤثر در ایجاد مقاومت به سپتوریوز برگی با روش cDNA-AFLP نشان داده‌اند علاوه‌بر این نوع مقاومت اختصاصی یا تک‌ژنی، در مدت پاسخ مقاومت گیاه به این بیماری تظاهر تعداد زیادی از ژن‌ها افزایش می‌یابد (Adhikari *et al*., 2007). تفاوت در الگوی بیان این ژن‌ها در ارقام مقاوم و حساس پس از آلودگی با قارچ *M. graminicola* ممکن است نقش اصلی را در سازوکارهای مقاومت در گندم داشته باشد. برای نمونه Sedaghatfar و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی با روش cDNA-AFLP چندین قطعهٔ مرتبط با مقاومت به بیماری لکهٔ برگی سپتوریایی (STB) دو رقم فلات (Seri 82) و فرونتانه (Frontana) را جدا کردند که قطعات چندشکلی (polymorphism) در مسیرهای مختلف بیوشیمایی نقش داشتند. نتایج حاصل از Real-Time PCR نشان دادند برخی ژن‌ها در زمان‌های ارزیابی‌شده، بیان مختلفی در ارقام حساس و مقاوم نشان می‌دهند. در سال‌های گذشته به‌دلیل بروز برخی مشکلات و تهدیدهای ناشی از مصرف سموم شیمیایی در کشاورزی، گرایش زیادی به استفاده از توانایی بالقوهٔ مواد زیستی در کنترل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز ایجاد شده است. گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن طیف وسیعی از ترکیبات زیستی فعال منبع بالقوهٔ داروهای گیاهی جدید (یا شیمی درمانی) هستند؛

زیرا داروهای گیاهی به‌علت داشتن منشأ طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی، سازگاری بیشتری با موجودات زنده دارند و عوارض جانبی کمتری ایجاد می‌کنند. Behdad و همکاران (۲۰۱۳) خاصیت ضدقارچی چند گیاه دارویی ازجمله آویشن شیرازی را علیه قارچ *Rhizopus stolonifera*، عامل پوسیدگی نرم روی میوهٔ توت‌فرنگی، بررسی کردند. براساس نتایج آنها کاربرد اسانس آویشن شیرازی در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام اثر مهارکننده در رشد میسلیوم قارچ *R. stolonifera* داشت. Salehzadeh و همکاران (۲۰۱۸) اثر عصارهٔ آویشن را در کنترل و بازدارندگی پمپ ژن NorA در ۱۰ نمونهٔ بیمارستانی بررسی کردند و نشان دادند ژن NorA در همهٔ نمونه‌ها وجود دارد و عصارهٔ آویشن اثر بازدارندگی در بیان ژن در همهٔ نمونه‌های دارای ژن یادشده نشان داد. بررسی Karisto و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد علاوه‌بر رشد پیکنیدها در ارقام مختلف که در پژوهش‌های قبلی برای تعیین حساسیت یا مقاومت ارقام استفاده می‌شد باید به‌طور هم‌زمان به رشد و تکثیر قارچ در میزبان هم توجه شود. Perello و Slusarenko (۲۰۱۳) برای توسعهٔ کشاورزی ارگانیک سازگار نشان دادند استفاده از آب سیر تا اندازه‌ای در کنترل پاتوژن‌های قارچی مؤثر است. باتوجه‌به بررسی تأثیر هفت عصارهٔ گیاه دارویی مختلف در کنترل قارچ سپتوریوز برگی در شرایط آزمایشگاهی نتایج نشان دادند عصارهٔ مرزنجوش بهترین گزینه برای کنترل رشد قارچ در محیط پتری‌دیش است (داده‌ها نشان داده نشده‌اند)؛ بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی اینکه آیا عصارهٔ این گیاه دارویی، مقاومت گیاهان حساس را به قارچ *M. graminicola* افزایش می‌دهد و نیز بررسی تأثیر عصارهٔ گیاه دارویی مرزنجوش در القای بیان برخی ژن‌های مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی گندم در دو رقم حساس (یاواروس) و مقاوم (چمران) انجام شد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری نمونه‌های گیاهی: در پژوهش حاضر، عصارهٔ گیاه دارویی مرزنجوش با روش خیساندن بامتانول ۷۰ درصد و با دستگاه هم‌زن برقی (مدل Si 100 R، شرکت Honyang، کرهٔ جنوبی) و پمپ خلاء (مدل FTVO-501، شرکت Sci Finetech، کرهٔ جنوبی) استخراج شد. در پایان برای جداسازی حلال آلی از عصاره‌ها، از دستگاه روتاری (مدل RV05 BASIC، شرکت IKA-WERKE، ژاپن) استفاده شد. تأثیر هفت عصارهٔ گیاه دارویی مختلف در بازدارندگی رشد با قارچ سپتوریوز در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج نشان دادند عصارهٔ مرزنجوش تأثیر بهتری در کنترل رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی داشت؛ بنابراین آزمایش اصلی بررسی تأثیر عصارهٔ مرزنجوش در القای مقاومت برخی ژن‌های دخیل در مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی گندم در دو رقم حساس و مقاوم در مرحلهٔ گیاهچه‌ای بود.

آلودگی نمونه‌ها و اعمال تیمار: دو رقم گندم چمران و یاواروس که به‌ترتیب مقاوم و حساس به بیماری سپتوریوز برگی گندم هستند در گلخانه در دو شرایط کنترل و تیمار کشت شدند و وقتی‌که به مرحلهٔ دوبرگی رسیدند، نیمی از گیاهان با عصارهٔ

گیاه دارویی مرزنجوش با اسپری دستی عصاره‌پاشی (تلقیح) شدند. دو روز پس از تیمار نمونه‌ها با عصاره، دو رقم با ایزولهٔ قارچ سپتوریوز دهلران جلیزی آلوده شدند که کارشناسان سازمان جهاد کشاورزی ایلام جمع‌آوری کرده بودند. غلظت اسپورها با لام هموسایتومتر (Neubar، شرکت Marienfeld، آلمان) در زیر میکروسکوپ (مدل H 730، شرکت Nedic، آلمان) تعیین شد. غلظت نهایی برای اسپورپاش ۷×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Kema *et al*., 1996). پس از اینکه سوسپانسیون قارچ به غلظت مد نظر رسانده شد، به هر لیتر از سوسپانسیون، ۱۰ قطره توین ۲۰ اضافه شد که به چسبندگی اسپورها و باقی‌ماندن آنها روی برگ هنگام اسپورپاشی منجر می‌شود. اسپورپاشی با اسپری دستی انجام شد. پس از اسپورپاشی، گیاهان در اتاقک رشد در دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰ درصد در تاریکی قرار داده شدند. نمونه‌برداری در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی در دو شرایط کنترل و تیمار و هرکدام در سه تکرار انجام شد. نمونه‌های برگی جمع‌آوری‌شده بلافاصله به ازت مایع برای استخراج RNA و سایر آنالیزهای بعدی منتقل شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از نمونه‌های برگی با کیت استخراج Cinnapure RNA (PR891620، شرکت سیناژن، ایران) انجام شد. تعیین کمیت RNA استخراج‌شده، با روش اسپکتروفتومتری انجام و برای تعیین کیفیت نمونه‌ها از روش الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. سنتز رشتهٔ اول cDNA با کیت (2-steps RT-PCR، شرکت سیناکلون، ایران) طبق مراحل زیر انجام شد. ابتدا برای سنتز رشتهٔ اول cDNA، مخلوطی شامل ۱ میکرولیتر Oligo dT (آغازگر)، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۳ میکرولیتر RNA و ۵ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز (Nuclease free Water) افزوده شد (حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود.). تیوب‌های ۰/۲ (شرکت سینا کلون، ایران) به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد در دستگاه بن‌ماری یا حمام آب گرم (مدل S 100، Honyang، کرهٔ جنوبی) و سپس به‌مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. پس از آن، نمونه‌ها به‌آرامی تکان داده شدند؛ سپس به رشتهٔ اول ساخته‌شدهٔ cDNA، ۲ میکرولیتر بافر 10 x Buffer M-Mul V، ۱ میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس M-Mul V Reverse Transcriptase و ۷ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز افزوده شد (جدول ۱)؛ سپس ۱۰ میکرولیتر از ترکیب یادشده به تیوب‌ها اضافه شد و تیوب‌ها در بن‌ماری به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد و درنهایت، به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند؛ سپس به‌مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. پس از آن به‌مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ (مدل 3-30 K، شرکت Sigma، آلمان) و به فریزر ۸۰- (مدل ALS، شرکت Angelantoni، ایتالیا) منتقل شدند.

جدول ۱- مواد استفاده‌شده برای سنتز رشتهٔ اول cDNA

مقدار	ماده
۲ میکرو لیتر	۱۰ x Buffer M-Mul V
۱۰۰ واحد یا ۱ میکرولیتر	M-Mul V Reverse Transcriptase
۷ میکرولیتر	Nuclease- free Water
۱۰ میکرولیتر	حجم نهایی واکنش

کیفیت نمونه‌ها با الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد (وزنی – حجمی) ارزیابی شد.

اندازه‌گیری بیان ژن: از واکنش Real-time PCR (RT-PCR) نیمه‌کمی برای آنالیز الگوی بیان دو ژن مرتبط با دفاع، در دورهٔ یک‌روزه پس از آلودگی استفاده شد. ارزیابی کمی در واکنش RT-PCR با کیت (qPCR GreenMaster with lowRox، شرکت تکاپو زیست، ایران) انجام شد. برای انجام واکنش RT-PCR از ۱۰۰ نانوگرم cDNA سنتزشده، آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های بررسی‌شده و ژن اکتین برای کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲– آغازگرهای طراحی‌شده برای واکنش Real time PCR

نام آغازگر	توالی	تعداد نوکلئوتید	دمای اتصال	طول قطعه
اکتین	Actin-F: 5TCCTAACCGAGCGAGGCTTCAT 3 Actin R: 5 GGAAAAGCACTTCTGGGCACC3	۲۲ ۲۱	۵۶	۱۵۱
pr1	PR 1- F: 5 TAATCTTTCCCAGGCGCAG 3 PR 1- R: 5 GTTGGAGTCGTAGTCGTAG 3	۲۵ ۲۵	۵۲	۱۲۰
ppi	PPi-F: 5 GAGATCGACCCGGACAACAG 3 PPi -R: 5 CTCCGTCTTCCTCCATTTGG 3	۲۶ ۲۶	۶۰	۱۲۶

پرایمرهای مربوط به ژن‌های *pr1* و *ppi* برگرفته از پژوهش Adhikari و همکاران (۲۰۰۷) هستند.

برای آنالیز بیان ژن با روش RT-PCR از روش مبتنی بر رنگ فلورسنس SYBR green در دو تکرار دستگاهی و سه تکرار زیستی استفاده شد. در این روش برای انجام واکنش RT-PCR از پلیت ۴۸ چاهکی ویژهٔ دستگاه Real Time PCR (مدل Step One Plus، شرکت ABI، آمریکا) با حجم واکنش نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل مواد بیان‌شده در جدول ۳ استفاده شد. برنامهٔ دمایی به‌کاررفته شامل فعال‌کردن آنزیم در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه و چرخهٔ ۴۰ تایی شامل دمای واسرشت ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، دماهای اتصال آغازگر به رشتهٔ الگو، ۵۳ و ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه بودند. درنهایت، آزمون نقطهٔ ذوب در یک چرخهٔ دمایی شامل دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و افزایش ۰/۳ درجه‌ای تا دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد برای ترسیم نمودار ذوب محصول PCR انجام شد.

جدول ۳- مواد شیمیایی و مقادیر استفاده‌شده در واکنش Real Time PCR

مادهٔ شیمیایی	مقدار استفاده‌شده	غلظت نهایی
Cdna	۱۰۰ نانوگرم	
qPCR GreenMaster with lowRox	۱۰ میکرولیتر	X۱
Primer F	۰/۸ میکرولیتر	۰/۵میکرومول
Primer R	۰/۸ میکرولیتر	۰/۵میکرومول
RNase free H2O	تا ۲۰ میکرولیتر	

تحلیل داده‌های RT-PCR و بررسی بیان نسبی هر ژن براساس روش نمودار استاندارد نسبی (relative standard curve method) برپایهٔ رابطهٔ ۱ (Livak and Schmittgen, 2001) و با نرم‌افزار محاسباتی شرکت Bio Rad و نیز با نرم‌افزار Excel نسخهٔ ۲۰۰۷ انجام شد.

رابطهٔ ۱

مقدار بیان ژن =

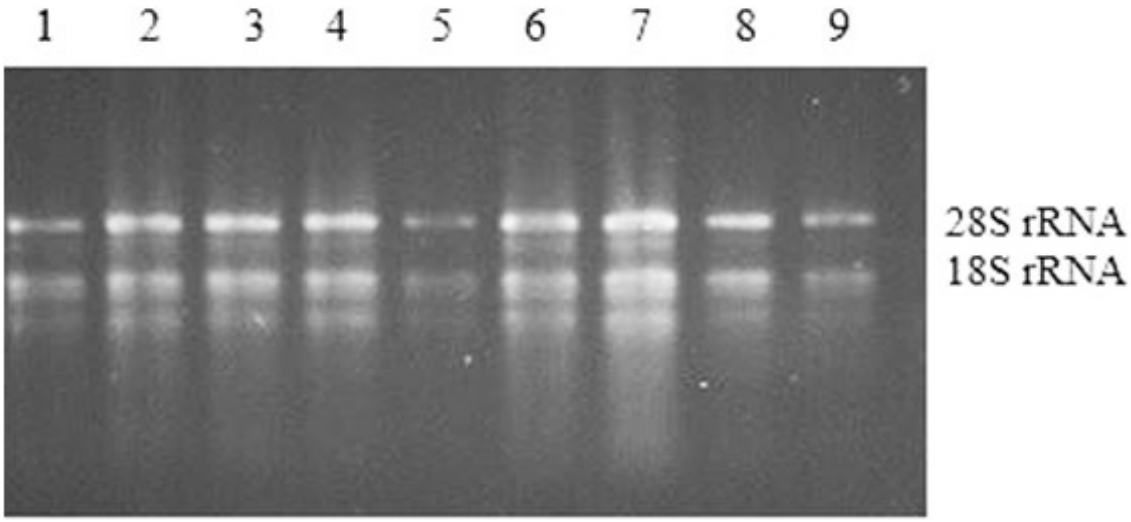
$2^{-(C_T \text{ Gene}-C_T \text{ Ref}) \text{ Stress}-(\text{mean } C_T \text{ gene}-\text{ mean } C_T \text{ Ref}) \text{ Normal}}$

مطابق با این رابطه مقدار ژن (cDNA حاصل از رونوشت) برابر با ۲ به توان منفی تفاوت آستانهٔ سیکل (Cycle Threshold=C_T) ژن هدف در تنش و ژن مرجع متناظر آن منهای تفاوت میانگین‌های آستانهٔ سیکل ژن هدف بدون تنش و ژن مرجع متناظر آن است. پایهٔ ۲ به‌دلیل دوبرابرشدن مقدار cDNA در هر چرخهٔ PCR است.

تحلیل آماری: تحلیل داده‌ها و مقایسهٔ میانگین‌ها با روش LSD و با نرم‌افزار SAS نسخهٔ ۹/۱ در سطح احتمال ۵ درصد انجام شدند.

نتایج

کمیت RNA استخراج‌شده روی ژل آگارز یک درصد و وجود دو باند 18S و 28S بدون خردشدگی نشان‌دهندهٔ کیفیت مناسب RNA استخراج‌شده است (شکل ۱).

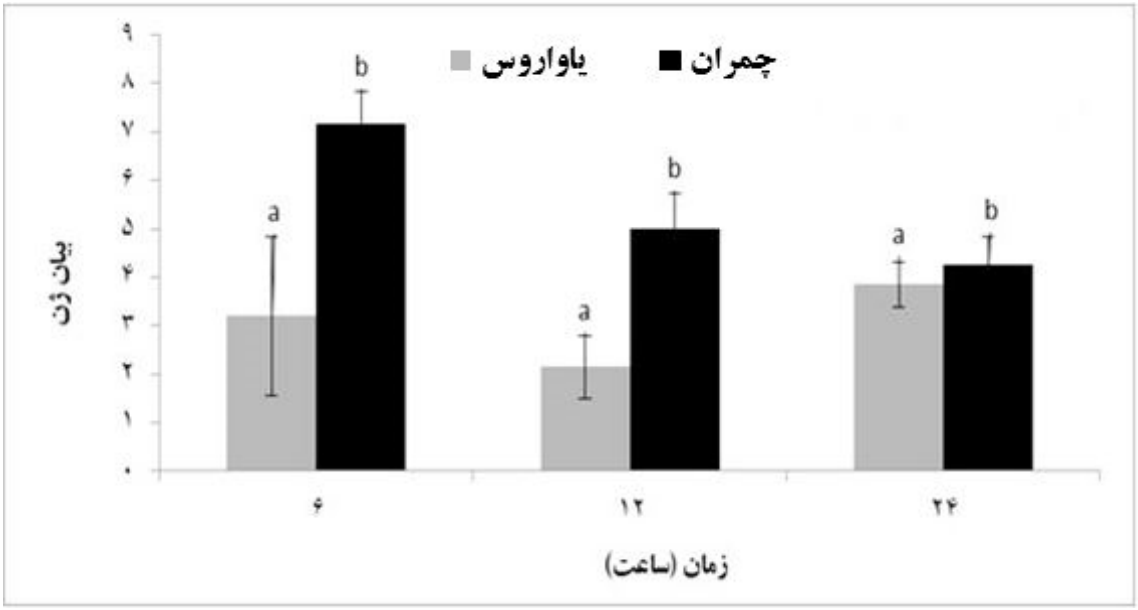


شکل ۱- RNA استخراج‌شده روی ژل آگارز- دو باند 28S و 18S در برخی نمونه‌های بررسی‌شده تشکیل شدند.

بررسی بیان ژن‌های *pr1* و *ppi* در شرایط طبیعی و تنش: مقدار بیان اندازه‌گیری‌شدهٔ هر ژن با دستگاه در زمان واقعی ثبت و تحلیل می‌شوند. ژن خانه‌دار اکیتن در زمان‌های مختلف در دو نمونهٔ بررسی‌شده مقدار C_T تقریباً یکسانی را نشان دادند که بین می‌کند شرایط محیطی بر بیان ژن‌های خانه‌دار تأثیر نمی‌گذارند؛ درحالی‌که دستگاه اندازه‌گیری، مقدار C_T را برای ژن‌های کارکردی در زمان‌های مختلف، بسیار متفاوت نشان داد.

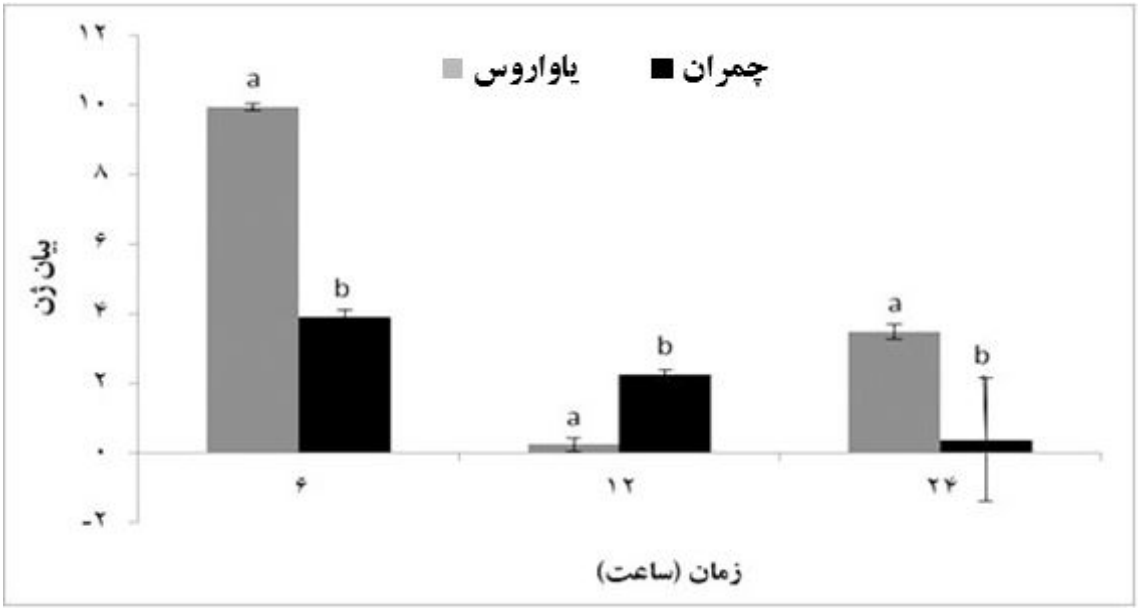
همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود میزان بیان ژن *pr1* در زمان‌های مختلف بین دو رقم مقاوم و حساس پس از عصاره‌پاشی و آلودگی با ایزولهٔ قارچ، بسیار متفاوت است؛ به‌طوری‌که ۶ ساعت پس از اعمال تیمار در رقم حساس و مقاوم میزان بیان ژن *pr1* نسبت به سایر زمان‌ها به اوج خود رسید و مقدار بیان ژن *pr1* در رقم مقاوم دو برابر بیشتر از رقم حساس بود. علاوه‌براین، میزان بیان ژن *pr1*، ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار در رقم چمران ۲/۵ برابر بیشتر از رقم یاواروس بود. اگرچه میزان بیان ژن *pr1* نسبت به زمان ۶ ساعت پس از اعمال تیمار کاهش یافت، ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، میزان بیان این ژن در رقم حساس به بیشترین مقدار رسید و در رقم مقاوم و حساس تقریباً برابر بود. میزان بیان ژن *pr1* در رقم حساس روند کاهشی - افزایشی و در رقم مقاوم روند افزایش - کاهش را در زمان‌های بررسی‌شده نشان می‌دهد.

ژن *ppi* نیز C_Tهای متفاوتی در زمان‌های مختلف و ارقام متفاوت نشان داد که بیان‌کنندهٔ میزان بیان متفاوت این ژن در دو رقم حساس و مقاوم در زمان‌های مختلف است. باتوجه‌به شکل ۳ در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تیمار، میزان بیان ژن *ppi* در رقم یاواروس تقریباً ۲/۵ برابر رقم



شکل ۲- بررسی بیان ژن *pr1* در دو رقم یاواروس و چمران در زمان‌های مختلف پس از تلقیح- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف‌معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ با آزمون LSD هستند.

چمران بود؛ درحالی‌که در زمان ۱۲ ساعت میزان بیان ژن *ppi* در هر دو رقم حساس و مقاوم کاهش یافت؛ ولی میزان بیان آن در رقم چمران ۹ برابر بیشتر از رقم یاواروس بود. ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، میزان بیان ژن *ppi* در رقم یاواروس دوباره افزایش یافت و۹ برابر بیشتر از رقم چمران شد و در رقم چمران میزان بیان این ژن کاهش یافت. به‌طورکلی میزان بیان ژن *ppi* در رقم حساس روند کاهشی - افزایشی ولی در رقم مقاوم روند کاهشی داشت و بجز زمان ۱۲ ساعت، میزان بیان ژن *ppi* در رقم یاواروس بیشتر از رقم چمران مشاهده شد.



شکل ۳- بررسی بیان ژن *ppi* در دو رقم یاواروس و چمران در زمان‌های مختلف پس از تلقیح- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف‌معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ با آزمون LSD هستند.

بحث

مصرف عصارهٔ گیاهان دارویی علاوه‌براینکه کاربرد آسان در کنترل بیماری‌های گیاهی دارد، کاهش هزینه‌های کنترل و جلوگیری از از بین رفتن تعادل بوم‌شناختی محیط را باعث می‌شود (Joseph *et al*., 2008). ترکیبات شیمیایی مرزنجوش شامل اسانس، تانن، رزین، استرول و فلاونوئید هستند (Zargari, 1996). این ترکیبات معمولاً اختلال در غشای سیتوپلاسمی، شکستن و از هم گسیختن نیروی حرکتی پروتون، جریان الکترونی و انتقال فعال و انعقاد و گلوله‌شدن محتویات سلولی را موجب می‌شوند (Caillet and Lacroix., 2006; Caillet *et al*., 2005).

Antoniw و همکاران (۱۹۸۰) اصطلاح پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن را مطرح و اعلام کردند پروتئین‌هایی هستند که گیاه آنها رمزگذاری می‌کند؛ اما تنها در شرایط پاتولوژیک یا شرایط مشابه بیان می‌شوند که بیان‌کنندهٔ منشاء غیر پاتولوژنیک این پروتئین‌ها است. PR1 با پروتئین‌های مشابه توماتین (Thaumatin) فعالیت ضدقارچی را در مجموعه‌ای از قارچ‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا نشان می‌دهد (Niderman *et al*.,

(1995. پروتئین‌های مرتبط با عامل بیماری‌زا با مقاومت به بیماری در تقابل گیاه - پاتوژن در غلات ارتباط دارند (Buchel and Linthorst, 1999; Van Loon and Van Strien, 1999). پروتئین‌هایی مانند PR2 (بتا ۱ و ۳ گلوکوناز) و PR3 (کیتیناز) فعالیت‌های ضد قارچی دارند و دیوارهٔ سلولی را تجزیه می‌کنند یا مستقیماً از رشد پاتوژن جلوگیری می‌کنند (Takeuchi *et al*., 1990; Wu *et al*., 1997; Jia and Martin, 1999) و به‌صورت PAPMs/MAMPs عمل می‌کنند (Nurnberger *et al*., 2004; Altenbach and Robatzek., 2007). پس از حملهٔ عامل بیماری‌زا گیاهان، تعدادی از سازوکارهای دفاعی شامل اکسیداسیون، تغییرات دیوارهٔ سلولی و تولید اجزاء مرتبط با دفاع مانند PRها وکیتینازها (Bolwell, 1999; Kini *et al*., 2000; Shetty *et al*., 2008) را انجام می‌دهند. این پروتئین‌ها دیوارهٔ سلولی قارچ را تجزیه و از رشد آن جلوگیری می‌کنند (Kim and Hwang., 1997).

Shetty و همکاران (۲۰۰۹) همهٔ پروتئین‌های مرتبط با عامل بیماری‌زا وکیتینازها را در برگ‌های گندم آلوده به *S. tritici* بررسی کردند و نتایج آنها نشان دادند مقاومت با تجمع اولیهٔ بتا ۱ و ۳ گلوکوناز و کیتیناز در برگ‌ها مرتبط است و براساس نتایج آنها گلیکوپرتئین‌هایی مانند اکتنسین به آپوپلاست آزاد می‌شوند و تجمع کالوز به تقویت دیوارهٔ سلولی منجر می‌شود. نتیجهٔ کلی پژوهش‌های آنها نشان داد مقاومت با تشخیص سریع و اولیهٔ پاتوژن با بتا ۱ و ۳ گلوکان در دیوارهٔ سلولی قارچ ارتباط دارد و به تجمع بتا ۱ و ۳ گلوکوناز و واکنش‌های ساختاری دفاعی منجر می‌شود که به‌طور مستقیم از رشد عامل بیماری‌زا جلوگیری و از میزبان در مقابل آنزیم‌های قارچ و مواد سمی محافظت می‌کند. ژن‌های *pr1* در مراحل نخست آلودگی القاء می‌شوند. ژن‌های *pr* به‌شدت در سه ساعت اول پس از آلوده‌کردن در ارقام مقاوم به *M. graminicola* القاء می‌شوند.

Ray و همکاران (۲۰۰۳) برپایهٔ بررسی الگوی بیان ژن در مدت چهار روز اول پس از آلوده‌کردن نشان دادند سه پروتئین وابسته به بیماری‌زایی (PR) به نام‌های PR-1، PR-2 و PR-5 در برگ‌های گیاهان آلوده، سه تا دوازده ساعت پس از آلودگی القاء شده‌اند. Adhikari و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند بیان ژن *pr1*، ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح به بیشترین مقدار می‌رسد. Fazeli (۲۰۱۲) نشان داد بیان ژن *pr1* در واکنش به قارچ *M. graminicola* در هر دو رقم مقاوم و حساس افزایش یافت و ۱۲ ساعت پس از تلقیح، میزان بیان آن در رقم مقاوم به‌طور مشخص ۵ برابر بیشتر از رقم حساس بود. براساس پژوهش‌هایی که بر ارقام مقاوم گندم انجام شدند Ray و همکاران (۲۰۰۳) این نظریه را مطرح کردند که تغییرات ایجادشده در بیان ژن‌ها در مدت دوازده تا بیست و چهار ساعت نخست آلودگی، پیروزی یا شکست میزبان را تعیین می‌کنند. پس از آن مشخص شد این. نظریه دربارهٔ همهٔ ژن‌ها صدق نمی‌کند؛ سپس این نظریه مطرح شد که دفاع میزبان دو پیک القای ژنی دارد که پیک اول در دوازده تا بیست و چهار ساعت اولیهٔ آلودگی ایجاد می‌شود و پیک دوم که خیلی قوی‌تر القاء می‌شود، دوازده تا هجده روز پس از آلوده‌کردن شروع می‌شود. همچنین پژوهش‌ها نشان دادند القای بیان این ژن‌ها

در ارقام حساس در زمان مشابه نسبت به ارقام مقاوم بسیار ناچیزتر است. Adhikari و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند پیک دوم القای بیان ژن در ارقام مقاوم دقیقاً زمانی اتفاق می‌افتد که در ارقام حساس، تودهٔ قارچی به‌سرعت در حال رشد است؛ بنابراین تغییر رشد عامل بیماری‌زا از بیوتروفیک به نکروتروفیک در ارقام مقاوم تشخیص داده شد که پاسخی قوی و موفق را باعث می‌شود. براساس بررسی‌ها نتیجه‌گیری می‌شود پاشیدن عصارهٔ گیاه دارویی مرزنجوش مقاومت را در رقم حساس، ۲۴ ساعت پس از آلودگی افزایش می‌دهد و به القای سیستم دفاعی گیاه در مقابل عامل بیماری‌زا کمک شایان توجهی می‌کند.

FKBPها یا پروتئین‌های پپتیدیل پرولیل ایزومراز (PPI) بازدارندهٔ ایمنی، از قارچ‌ها مشتق می‌شوند که از طریق اتصال به FK506 و راپامایسین عمل می‌کنند (Park *et al*., 2007). سایکلوفیلین‌های گیاهی با تنش‌های ناشی از عوامل زنده و غیرزنده القاء می‌شوند (Godoy *et al*., 2000). سایکلوفیلین‌های گیاهی فعالیت ضد قارچی دارند (Lee *et al*., 2007). Ray و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند بیشتر ژن‌های مرتبط با دفاع در دو رقم مقاوم تادیانا (Tadiana) و W7984 پس از آلودگی با سیگنالیگ، متابولیسم انرژی و سنتز پروتئین‌ها همراه هستند. بیان بیشتر ژن *ppi* در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس نشان می‌دهد تولید انرژی و مسیر سیگنالینگ هورمون‌ها در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس بیشتر فعال هستند. Adhikari و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند فعالیت این ژن در ارقام مقاوم، زمانی است که زیتودهٔ قارچ به‌طور لگاریتمی در ارقام حساس افزایش می‌یابد. Fazeli (۲۰۱۲) نشان داد میزان بیان ژن *ppi* در رقم فلات در زمان‌های انتهایی یعنی ۶ روز پس از آلودگی بود که این میزان بیان در ۶ روز پس از آلودگی افزایش یافت و به بیشترین میزان یعنی ۲ برابر نسبت به شاهد رسید. در رقم مقاوم فرونتانا (Frontana) میزان بیان ژن *ppi* نسبت به شاهد افزایش چشمگیری نشان نداشت و تنها ۲۴ ساعت پس از آلودگی، فزایش بیان دو برابری داشت. نتیجه‌گیری می‌شود با به کار بردن عصارهٔ متانولی مرزنجوش، بیان ژن *ppi* در رقم حساس، ۲۴ ساعت پس از آلودگی نسبت به رقم مقاوم بیشتر می‌شود و افزایش مقاومت رقم حساس را باعث می‌شود. نتایج پژوهش Moridikia و همکاران (۲۰۱۶) بر اثر ضد میکروبی عصارهٔ هیدروالکلی مرزهٔ سفید و نانو ذرهٔ روی اکسید در بیان ژن کواگولاز (*coa*) در نمونه‌های بالینی و استاندارد *Staphylococcus aureus* مقاوم به پنی‌سیلین با روش RT-PCR نشان دادند عصارهٔ هیدروالکلی مرزهٔ سفید بیان ژن *coa* را در شرایط آزمایشگاهی کاهش داد؛ ولی تأثیری در بیان ژن خانه‌دار *arcC* نداشت. Jalalvandi و همکاران (۲۰۱۵) اثر مهاری مرزهٔ خوزستانی را در ژن‌های اگزوآنزیم s، اگزوتوکسین A و سیستم‌های ترشحی و خارج‌کنندهٔ پمپ‌های آنتی‌بیوتیک *pseudomonas aeruginosa* با روش RT-PCR نیمه‌کمی بررسی و مشخص کردند این گیاه اثر مهاری در ژن‌های یادشده دارد که با نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر مطابقت دارد؛ زیرا گیاهان تیرهٔ نعناعیان (Lamiaceae) به‌دلیل داشتن ترکیبات شیمیایی تیمول و کارواکرول خاصیت

ضدقارچی دارند. در پژوهش Kim و همکاران (۲۰۱۳) مشخص شد کارواکرول بیان ژن‌های *lxra*، *fas leptin* و *srebp1c* را کاهش می‌دهد و ازسویی افزایش بیان ژن *sirt1* را باعث می‌شود؛ بنابراین کارواکرول بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم چربی‌ها را تعدیل و تنظیم می‌کند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

جمع‌بندی

خسارت اقتصادی ناشی از *M. graminicolla* در جهان نیازمند روش‌های مؤثر در کنترل این بیماری است. استفاده از قارچ‌کش‌ها و ارقام مقاوم که مقاومت جزئی به بیماری سپتوریای برگی دارند، درحال‌حاضر روشی رایج در کنترل این بیماری است. کاربرد عصارهٔ گیاهان دارویی یکی از منابع خوب برای مدیریت و کنترل بیماری‌ها در آینده است. گیاه مرزنجوش به‌دلیل داشتن ترکیبات کارواکرول گزینهٔ خوبی برای بررسی‌های بیشتر دربارهٔ شیوهٔ کنترل بیماری سپتوریوز است. به کار بردن عصارهٔ مرزنجوش افزایش بیان ژن *pr1* را در رقم مقاوم و افزایش بیان ژن *ppi* را در رقم حساس باعث شد. باتوجه‌به آثار کلی بیان ژن در دو رقم حساس و مقاوم نتیجه‌گیری می‌شود به کار بردن عصارهٔ گیاه دارویی فعال‌شدن سیستم دفاعی گیاه را در مقابل پاتوژن باعث می‌شود؛ به‌طوری‌که بیان ژن *ppi*، ۲۴ ساعت پس از آلودگی در رقم حساس خیلی بیشتر از رقم مقاوم می‌شود. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهند باتوجه‌به وجود ترکیب شیمیایی کارواکرول در مرزنجوش به نظر می‌رسد این ترکیب افزایش بیان ژن‌های استفاده‌شده را در پژوهش حاضر موجب می‌شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ایلام برای حمایت مالی از پژوهش حاضر و کارشناسان آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه ایلام سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

Adhikari, T. B., Balaji, B., Breeden, J. and Goodwin, S. B. (2007) Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. Physiological and Molecular Plant Pathology 71(1-3): 55-68.

Adhikari, T. B., Yang, X., Cavaletto, J. R., Hu, X., Buechley, G., Ohm, H. W., Shaner, G. and Goodwin, S. B. (2004) Molecular mapping of *Stb1*, a potentially durable gene for resistance to *septoria tritici* blotch in wheat. Theoretical and Applied Genetics 109(5): 944-953.

Altenbach, D. and Robatzek, S. (2007) Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. Molecular Plant-Microbe Interactions 20(9): 1031-1039.

Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S. and Van Loon, L. C. (1980) Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. Journal of General Virology 47(1): 79-87.

Behdad, M., Etemadi, N. A., Behdad, E. and Zeinali, H. (2013) Antifungal effects of three plant essential oils against *Rhizopus stolonifer*, the cause of soft rot on strawberry fruit. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 29(2): 399-411 (in Persian).

Bolwell, G. P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense. Current Opinion in Plant Biology 2(4): 287-294.

Buchel, A. S. and Linthorst, H. J. M. (1999) PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: Pathogenesis-related proteins in plants (Eds. Datta, S. K. and Muthukrishnan, S.) 21-47. CRC Press LLC, Boca Raton.

Caillet, S. and Lacroix, M. (2006). Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 69(12): 2961-2969.

Caillet, S., Shareck, F. and Lacroix, M. (2005) Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Protection 68(12): 2571-2579.

Eyal, Z. (1981) Integrated control of *Septoria* diseases of wheat. Plant Disease 65(9): 763-768.

Eyal, Z. and Ziv, O. (1974) The relationship between epidemics of *Septoria* leaf blotch and yield losses in spring wheat. Phytopathology 64(11): 1385-1389.

Fazeli, A. (2012) Transcriptional responses of wheat to *Septoria tritici* disease using microarray technique. PhD Thesis, Mazandaran university, Mazandaran, Iran (in Persian).

Godoy, V. A., Lazzaro, A. S., Casalongue, C. A. and San-Segundo, B. (2000) Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. Plant Science 152(2): 123-134.

Goutam, U., Kukreja, S., Tiwari, R., Chaudhary, A., Gupta, R. K., Dholakia, B. B. and Yadav, R. (2013) Biotechnological approaches for grain quality improvement in wheat: present status and future possibilities. Australian Journal of Crop Science 7(4): 469-483.

Jackson, L. F., Dubcovsky, J., Gallagher, L. W., Wennig, R. L., Heaton, J. and Vogt, H. (2000) Regional barley and common and durum wheat performance tests in California. Agronmy Progres Report 272(1): 48-56.

Jalalvandi, N., Bahador, A., AZahedi, B., Saghi, H. and Esmaeili, D. (2015) The study of inhibitory effects of *satureja khuzestanica* essence against mexa and mexr efflux genes of *pseudomonas aeruginosa* by RT-PCR. International Journal of Biotechnology 4(1): 1-8.

Jia, Y. and Martin, G. B. (1999) Rapid transcript accumulation of pathogenesis-related genes during an incompatible interaction in bacterial speck disease-resistant tomato plants. Plant Molecular Biology 40(3): 455-465.

Joseph, B., Dar, M. A. and Kumar, V. (2008) Bioefficacy of plant extracts to control *Fusarium solani* F. sp. melongenae incitant of brinjal wilt. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry 3(2): 56-59.

Karisto, P., Hund, A., Yu, K., Andregg, J., Walter, A., Mascher, F., McDonald, B. A. and Mikaberidze, A. (2018) Ranking quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch in Elite Wheat Cultivars Using Automated Image Analysis. Phytopathology 108(5): 568-581.

Kema, G. H. J., Yu, D. Z., Rijkenberg, F. H. J., Shaw, M. W., Baayen and R. P. (1996) Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Phytopathology 86(4): 777-786.

Kim, E., Choi, Y., Jang, J. and Park, T. (2013) Carvacrol protects against Hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet by enhancing SIRT1-AMPK signaling. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 50(2): 103-115.

Kim, Y. J. and Hwang, B. K. (1997) Isolation of a basic 34 kilo Dalton b-1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. Physiological and Molecular Plant Pathology 50(2):103-115.

Kini, K. R., Vasanthi, N. S. and Shetty, H. S. (2000) Induction of b-1,3-glucanase in seedlings of pearl millet in response to infection by *Sclerospora graminicola*. European Journal of Plant Pathology 106(3): 267-274.

Kiss, T., Balla, K., Veisz, O., Lang, L., Bedo, Z., Griffiths, S., Isaac, P. and Karsai, I. (2014) Allele frequencies in the VRN-A1, VRN-B1 and VRN-D1 vernalization response and PPD-B1 and PPD-D1 photoperiod sensitivity genes and their effects on heading in a diverse

set of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Molecular Breeding 34: 297-310.

Lee, S. O., Choi, G. J., Jang, K. S, Lim, H. K., Cho, K. Y. and Kim, J. C. (2007) Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal 23(2): 97-102.

Moridikia, F., Khosrovani, S., Ghaedi, M., Zoladl, M., Moridikia, A., Mohseni, R., Alamdari, A. K. and Sharifi, A. (2016) The antimicrobial effect of *Satureja mutica* hydroalcoholic extract, zinc oxide nanoparticle, and zinc complex on the coagulase gene expression in clinical and standard isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Armaghane-Danesh 21(3): 305-313 (in Persian).

Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. and Mösinger, 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.

Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunological Reviews 198(1): 249-266.

Park, S. C., Lee, J. R., Shin, S. O., Jung, J. H., Lee, Y. H., Son, H., Park, Y., Lee, S. Y. and Hahm, K. S. (2007) Purification and characterization of an antifungal protein, C-FKBP, from Chinese cabbage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(13): 5277-5281.

Perello, A., Noll, U. and Slusarenko, A. J. (2013) *In vitro* efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat. Journal of Medicinal Plants Research Full Length 7(24): 1809-1817.

Ray, S., Anderson, J. M., Urmeev, F. I. and Goodwin, S. B. (2003). Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Plant Molecular Biology 53(5): 741-754.

Salehzadeh, A., Sadat Hashemi Doulabi, M., Sohrabnia, B. and Jalali, A. (2018) The effect of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on the expression of norA efflux pump gene in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. Journal of Genetic Resources 4(1): 26-36.

Sedaghatfar, E., Zamanizadeh, H. R., Roohparvar, R., Farsad, L. K., Fazeli, A., Rezaee, S. and Mardi, M. (2012) Gene expression profiling of defense-related genes resistant to *Septoria tritici* blotch in wheat. African Journal of Biotechnology 11(72): 13633-13644.

Shetty, N. P., Jensen, J. D., Knudsen, A., Finnie, C., Geshi, N., Blennow, A., Collinge, D. B. and Jorgensen, H. J. L. (2009) Effects of beta-1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defense responses in wheat. Journal of Experimental Botany 60(15): 4287-4300.

Shetty, N. P., Jørgensen, H. J. L., Jensen, J. D., Collinge, D. B. and Shetty, H. S. (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. European Journal of Plant Pathology 121(3): 267-280.

Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Sharma, R., Joshi, A. K. and Trethowan, R. (2007) High yielding spring bread wheat germplasm for global irrigated and rainfed production systems. Euphytica 157(3): 351-363.

Singh, R. P., and Trethowan, R. (2007) Breeding spring bread wheat for irrigated and rainfed production systems of the developing world. In: Breeding major food staples (Eds. Kang, M. and Priyadarshan, P. M.) 109-140. Blackwell Publishing, Iowa.

Takeuchi, Y., Yoshikawa, M., Takeba, G., Tanaka, K., Shibata, D. and Horino, O. (1990) Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, b-1,3-endoglucanase, in soybean. Plant Physiology 93(2): 673-682.

Thomas, C., Meyer, D., Wolff, M., Himber, C., Alioua, M. and Steinmetz, A. (2003) Molecular characterization and spatial expression of the sunflower ABP1 gene.

Plant Molecular Biology 52(5): 1025-1036.

Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 55(2): 85-97.

Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Leo, N. J., Fitzsimmons, K. C., Levine, E. B., Raskin, I. and Shah, D. M. (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H2O2 in transgenic plants. Plant Physiology 115(2): 427-435.

Zargari, A. (1996) Medicinal plants. 6th edition, Tehran University Press, Tehran (in Persian).