

## Effect of *Blumeria graminis* (Powdery Mildew) on Expression of Genes Involved in Antioxidant Enzymes Pathway in Resistance Reaction of Barley

Seyedeh Sanaz Ramezanzpour<sup>1,\*</sup>, Hassan Soltanloo<sup>1</sup> and Saied Navabpour<sup>1</sup>

1- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

\*Corresponding author ✉: [ramezanzpours@gau.ac.ir](mailto:ramezanzpours@gau.ac.ir)

**Citation:** Ramezanzpour, S.S., Soltanloo, H. and Navabpour, S. (2024). Effect of *Blumeria graminis* (powdery mildew) on expression of genes involved in antioxidant enzymes pathway in resistance reaction of barley. *Plant Genetic Researches*, 10(2): 47-62. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.2.4>

(Received: June 29, 2023; Final Revised: September 16, 2023; Accepted: September 25, 2023; Published online: March 17, 2024)

### Extended abstract

#### Introduction

Barley (*Hordeum vulgare* L.), one of the first domesticated crops, holds significant agricultural importance and is globally ranked fourth among crops, following wheat, rice, and maize. Powdery mildew (*Blumeria graminis*) is one of the most important diseases in barley. Upon epidemic situation, the aerial organs of the plant are covered with a white powder that contains conidia, the causal agent of powdery mildew disease. As a result, powdery mildew has a negative effect on the photosynthetic activities of plants, leading in decreasing in yield and economic losses. Transcription of defense response genes is activated in response to barley powdery mildew disease, and elicitors of the pathogen are also involved in this response. Plant defense mechanisms against reactive oxygen species (ROS) produced in response to both biotic and abiotic stresses are involved the deployment of antioxidant enzymes. These enzymes possess the capability to either scavenge or neutralize ROS, consequently mitigating their detrimental impacts.

#### Materials and methods

In this research, the effect of fungus *Blumeria graminis* the causal agent of powdery mildew disease on the expression of genes involved in resistance reactions in barley was evaluated on a susceptible cultivar (Afzal), a semi-susceptible genotype (Line 67) and a resistant genotype (Line 104). After infection by *Blumeria graminis* at seedling stage, sampling was performed at different time points (0, 6, 12, 24, 72 and 240 hours). Changes in expression of some genes involved in responses of barley to powdery mildew were measured by quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis in 2 biological replicates. The genes encoding Chitinase, Peroxidase, Glucanase and Map kinase were studied in this research. *TEF-1 $\alpha$*  gene was used as internal control (housekeeping gene). RNA extraction was done using BioZol and cDNA synthesis was performed using MMuLV reverse transcriptase enzyme according to manufacturer's protocols. qRT-PCR reactions were done using SYBR green dye in 3 technical replications by iQ5 BioRad instrument. The expression level of studied genes in different treatments was done in REST software using the output data from iQ5 software. Relative comparison method and  $\Delta\Delta CT$  formula were used to calculate the relative expression of studied genes compared to control.

#### Results and discussion

Evaluation of molecular results showed that the Chitinase and Glucanase as the key enzymes in fungal cell wall degradation, had higher expression levels in the resistant genotype (Line 104). The transcript level of Chitinase in semi-susceptible genotype (Line 67) was lower than that of the resistant genotype (Line 104) and higher than that



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

of the susceptible genotype. Most transcripts of Chitinase gene were seen at 12 hours after infection in the resistant genotype (Line 104) while the lowest expression was recorded at the same time in the susceptible genotype. The expression levels of the other two genes (Glucanase and peroxidase) were higher in the resistant genotype (Line 104) than those in the susceptible genotype. It seems that the early expression of these genes followed by enzyme production in resistant genotypes can be due to the accumulation of free radicals and the plant's effort to remove them which lead to hypersensitivity reaction. Increasing in MAP kinase transcripts in resistant genotype (Line 104) and its depletion in susceptible cultivar confirmed MAP kinase role in hypersensitivity reaction and defense responses of barley under powdery mildew infection.

### **Conclusions**

In barley plants, resistance to powdery mildew is initiated through a hypersensitive reaction, occurring shortly after inoculation with the *Blumeria graminis* pathogen. Six hours post inoculation, the expression of genes encoding Chitinase, glucanase, Peroxidase, and Map kinase were increased. In the resistant genotype, this upregulation led to a complete hypersensitive reaction, preventing pathogen growth and development. Conversely, in the semi-susceptible genotype, delayed gene expression led to *Blumeria graminis* growth and development within the plant. No hypersensitive reaction was observed in the sensitive genotype, facilitating pathogen penetration and spread.

**Keywords:** Peroxidase, Barley, Powdery mildew, Chitinase, Glucanase, MAPK



## تأثیر قارچ *Blumeria graminis* (عامل سفیدک پودری) بر بیان ژن‌های دخیل در مسیر تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در واکنش مقاومت جو

سیده ساناز رمضانپور<sup>۱\*</sup>، حسن سلطانلو<sup>۱</sup> و سعید نواب‌پور<sup>۱</sup>

۱- دانشیار، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۸؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۳؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۱۲/۲۸)

### چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر قارچ *Blumeria graminis* (عامل سفیدک پودری) بر بیان برخی ژن‌های مرتبط با واکنش مقاومت در جو، از یک رقم حساس (افضل)، یک ژنوتیپ نیمه‌حساس (لاین ۶۷) و یک ژنوتیپ مقاوم (لاین ۱۰۴) به بیماری سفیدک پودری جو استفاده گردید. پس از کشت ژنوتیپ‌ها در گلخانه، گیاهچه‌های هفت‌روزه تلقیح شدند و نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف پس از تلقیح (۱۰-۰ روز) انجام شد. تغییر در سطح بیان ژن با استفاده از روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج مولکولی داده‌ها نشان داد که ژن‌های رمزکننده کیتیناز و گلوکاناز به‌عنوان آنزیم‌های کلیدی در تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها، بیان بیشتری در ژنوتیپ مقاوم (لاین ۱۰۴) داشتند. سطح در ژنوتیپ نیمه‌حساس (لاین ۶۷) کمتر از ژنوتیپ مقاوم (لاین ۱۰۴) و بیشتر از رقم حساس افضل بود. بالاترین میزان رونوشت‌های ژن کیتیناز ۱۲ ساعت پس از تلقیح در ژنوتیپ مقاوم (لاین ۱۰۴) و کمترین میزان بیان در زمان مشابه در رقم حساس دیده شد. سطح بیان دو ژن دیگر (گلوکاناز و پراکسیداز) نیز در ژنوتیپ مقاوم (لاین ۱۰۴) بیشتر از رقم حساس افضل بود. افزایش در تعداد رونوشت‌های ژن مپ‌کیناز در ژنوتیپ مقاوم (لاین ۱۰۴) و کاهش آن در رقم حساس افضل، تأییدکننده نقش مسیر کینازی در واکنش فوق‌حساسیت و پاسخ‌های دفاعی گیاه جو در برابر بیماری سفیدک پودری جو بود. با توجه به نتایج حاصل در این مطالعه به نظر می‌رسد واکنش فوق‌حساسیت در ژنوتیپ مقاوم بلافاصله ۶ ساعت پس از آلودگی آغاز شده و مانع نفوذ و گسترش بیمارگر در گیاه می‌شود. این واکنش در گیاهان نیمه‌حساسا و حساس جو مشاهده شد و احتمالاً به به‌دلیل تأخیر در پاسخ گیاهان نیمه‌حساس و حساس، بیمارگر فرصت کافی برای نفوذ، تکثیر و گسترش در گیاه میزبان را داشته است. از نتایج این تحقیق می‌توان در ارزیابی سطح مقاومت ارقام زراعی مورد کشت و همچنین ارزیابی مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای لاین‌های امیدبخش استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** پراکسیداز، جو، سفیدک پودری، کیتیناز، گلوکاناز، مپ‌کیناز

## مقدمه

گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) یکی از اولین گیاهان زراعی اهلی شده است. این گیاه یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی دنیا و از نظر مقدار تولید در رتبه‌ی چهارم قرار دارد که هم از کاه و کلش و هم از دانه آن استفاده می‌شود (Al-Brown, 1992; Harazi, 2004). در بسیاری از مناطق، جو اغلب در مناطق کشاورزی حاشیه‌ای با بارندگی سالانه کم (اغلب کمتر از ۲۲۰ میلی‌متر) کشت می‌شود (Al-Harazi, 2004).

سفیدک پودری (Powdery mildew) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خسارت‌زا در نواحی تولید جو می‌باشد. در حالت اپیدمی، همه قسمت‌های هوایی گیاه به وسیله پودر سفیدرنگی پوشیده می‌شود که حاوی کنیدی و کنیدی‌برهای عامل بیماری (*Blumeria graminis*) است. این بیماری اثر منفی روی فعالیت‌های فتوسنتزی گیاهان دارد که این امر باعث کاهش عملکرد و زیان اقتصادی می‌شود. در اثر این بیماری، میزان محصول، وزن هزاردانه و پروتئین در جو به ترتیب ۱۱ و ۹ درصد کاهش می‌یابد (Gawande and Patil, 2003; Murray and Brennan, 2010).

رونویسی ژن‌های پاسخ دفاعی در واکنش به سفیدک پودری جو در نتیجه آلودگی با بیمارگر فعال می‌شود و ایستورهای عمومی بیمارگر نیز در این امر دخالت دارند. ژن‌های مقاومت به سفیدک پودری به‌طور غیرمستقیم و از طریق محدود نمودن رشد و تماس بیمارگر، رونویسی ژن‌های پاسخ دفاعی را القا می‌کنند (Kruger et al., 2003). سیستم‌های دفاعی گیاهان در برابر گروه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species: ROSs) حاصل از تنش‌های زیستی و غیرزیستی، شامل آنزیم‌هایی است که قادر به جابه‌جا کردن و یا خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و واسطه‌های دارای اکسیژن هستند (Derikvand et al., 2023). پراکسیدازها از جمله آنزیم‌هایی هستند که توانایی حذف چنین ترکیبات سمی را دارند (De Marco et al., 1999). یکی دیگر از ژن‌های درگیر در واکنش مقاومت در جو، ژن کیتیناز است که از گروه ژن‌های واکنش دفاعی می‌باشد و معمولاً پس از حمله بیمارگر سطح بیان آن توسط سلول‌های گیاهی افزایش می‌یابد. (Collinge et al., 1993). القاء

کیتینازها و سایر آنزیم‌های هیدرولیتیکی، به‌عنوان مکانیسم‌های دفاعی در پاسخ به حمله بیمارگر به‌شمار می‌روند. مقاومت به بیماری توسط هیدرولازها با تجزیه دیواره سلولی قارچ‌ها ایجاد می‌شود (Sahai and Manocha 1993). بیان کیتینازها و بتاگلوکانازها به‌وسیله حمله بیمارگرها و تنش‌ها تحریک می‌شوند و چندین نقش را در مقاومت دارند، اولاً سیگنال‌های مولکولی آزاد می‌کنند که به‌عنوان پاسخ دفاعی میزبان عمل می‌کنند، ثانیاً به‌وسیله تخریب دیواره سلولی بیمارگر از رشد آنها جلوگیری می‌کنند (Mauch and Boller, 1998).

در مطالعه کروگر و همکاران (Kruger et al., 2003) مشاهده شد که الگوی بیان سه ژن کیتیناز، پراکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیلایز در لاین‌های حساس و مقاوم به سفیدک پودری جو تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح در لاین‌های حساس و مقاوم از الگوی مشابهی برخوردار بود و پس از آن تا ۷۲ ساعت پس از تلقیح تجمع رونوشت در لاین حساس متوقف شده بود. همچنین نتایج مطالعه مذکور نشان داد که در لاین‌های مقاوم میزان تجمع رونوشت متفاوت بود که به فعالیت آهسته، متوسط و سریع ژن‌های مقاومت بستگی داشت (Kruger et al., 2003). تولید  $H_2O_2$  و تغییر در گلوکاتایون، آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در عصاره برگ ایزولاین‌های حساس و مقاوم جو بین ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تلقیح با سفیدک پودری نیز در واکنش به این بیماری گزارش شده است (Vanaker et al., 2000). تجمع  $H_2O_2$  در مزوفیل سلول‌های اپیدرمی مورد حمله در واکنش فوق‌حساسیت رخ می‌دهد. در لاین مقاوم، اکسیداسیون گلوکاتایون به‌دلیل تجمع  $H_2O_2$  در مزوفیل رخ می‌دهد، سپس گلوکاتایون کل برگ و فعالیت کاتالاز به‌طور موقت افزایش می‌یابد، این تغییرات در لاین حساس گزارش نشده است (Vanaker et al., 2000). افزایش بیان پراکسیداز ۱ نیز در زمان حمله بیمارگر *B. graminis* f. sp. *tritici* در گندم گزارش شده است (Liu et al., 2005).

سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت شرایط سفیدک پودری القا می‌شوند که منجر به تنظیم هموستازی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شود. با این حال، تحت شرایط آلودگی

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از رقم حساس (افضل)، لاین نیمه‌حساس (۶۷) و لاین مقاوم (۱۰۴) به بیماری سفیدک پودری جو بر اساس مطالعه قریشی (Ghoreishi, 2014) استفاده شد.

**تهیه و تکثیر قارچ عامل بیماری سفیدک پودری:** به‌منظور تکثیر قارچ، ابتدا در چهار گلدان بذره‌های رقم حساس افضل کشت شدند بدین صورت که مخلوطی از خاک مزرعه، خاک‌برگ و ماسه با نسبت‌های ۱:۱:۲ به‌عنوان بستر بذر تهیه و در گلدان‌های پلاستیکی ریخته شد. سپس بذر رقم افضل در این گلدان‌ها کشت شدند، بعد از رسیدن گیاه به مرحله برگ‌گی، با استفاده از برگ‌های آلوده به بیماری که از مزرعه جمع‌آوری شدند، عمل تلقیح به‌صورت تماسی انجام و روی گلدان‌ها با یک پلاستیک شفاف پوشانده شد. **آلودگی با سفیدک پودری و نمونه‌برداری:** پس از کشت بذرها در داخل خاک مخلوط با خاک‌برگ، گلدان‌ها به داخل ژرمیناتور با شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت مناسب منتقل و به‌مدت دو هفته در این شرایط نگهداری شدند. پس از رسیدن گیاهان به مرحله‌ی دوبرگی، آلوده‌سازی با استفاده از برگ‌های آلوده به بیماری به‌صورت تماسی انجام شد. به‌منظور حفظ رطوبت مورد نیاز جهت رشد و نفوذ قارچ از پوشش‌های پلاستیکی استفاده شد، سپس نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف (قبل از آلوده‌سازی به‌عنوان کنترل، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت و ۳ و ۱۰ روز بعد تلقیح) در دو تکرار بیولوژیکی انجام شد. بلافاصله پس از نمونه‌برداری بافت برگ در نیتروژن مایع منجمد و به یخچال با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و نگهداری شدند.

**استخراج RNA و ساخت cDNA:** جهت استخراج RNA از بافر بایوزول (Biozol) طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد. به‌منظور حذف DNA ژنومی تیمار *DNase* برای تمامی نمونه‌ها انجام شد. ساخت کتابخانه cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استاندارد جهت تأیید ساخت cDNA صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی در زمان واقعی در حجم نهایی ۲۰

شدید سفیدک پودری، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی مهار شده و تنظیم ROS محدود می‌شود که منجر به توقف هموستازی ردوکس سلولی خواهد شد. آلودگی سفیدک پودری می‌تواند فعالیت برخی پروتئین‌های متابولیکی (عوامل رونویسی یا آنزیم‌ها) را مهار کند، متابولیسم کربن و نیتروژن سلول‌های دانه و به دنبال آن کیفیت دانه‌های گندم را تغییر دهد (Gao *et al.*, 2021).

پاسخ‌های دفاعی گیاهی با شناسایی بیمارگر آغاز می‌شوند که بر اساس اثر متقابل ژن-برای-ژن، بین ژن مقاومت گیاه (R) و ژن غیربیماری‌زای بیمارگر (Avr) و یا اتصال ایستوتورهای نژاد-غیراختصاصی به رسپتور استوار است (Martin, 1999; Scheel, 1998; Staskawicz *et al.*, 1990; Keen, 1995). سیگنال‌های حاصل از این اثر متقابل از طریق مسیرهای پیوسته به پاسخ‌های سلولی تبدیل می‌شود. مطالعات اخیر بیان می‌دارد که آبشار پروتئین‌کیناز فعال شده توسط میتوژن (Mitogen-activated protein kinase: MAPK) گیاهی یکی از نقاط مشترک پس از آلودگی بیمارگرهای مختلف و ایستوتورهای مشتق از بیمارگر می‌باشد (Romeis *et al.*, 1999; Lebrun-Garcia *et al.*, 1997; Ligterink *et al.*, 1998). فعال‌سازی موقت MAPKها پاسخ‌های دفاعی متفاوتی را القا می‌کند و به سلول اجازه می‌دهد تا با شرایط نامساعد سازگاری یابد و فعالیت پایدار آن‌ها منجر به واکنش فوق‌حساسیت (Hypersensitive response: HR) می‌شود (Widmann *et al.*, 1996; Kyriakis and Avruch, 1996).

فعالیت MAPK در سلول‌های توتون تیمار شده با زایلاناز (*Xylanase*) به‌عنوان ایستوتور قارچ (*Trichoderma viride*) و سلول‌های آراییدوپسیس تیمار شده با هارپین (*Harpin*) به‌عنوان ایستوتور باکتریایی (*Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*) با مرگ سلول HR همراه بوده است (Suzuki *et al.*, 1999; Desikan *et al.*, 1999).

هدف از این بررسی، مطالعه روند بیان ژن‌های دخیل در مسیر انتقال سیگنال مقاومت به بیماری سفیدک پودری جو، تعیین زمان شروع واکنش مقاومت در رقم مقاوم و ارزیابی وجود یا عدم وجود واکنش فوق‌حساسیت در ارقام مقاوم بود.

پلیمرز در زمان واقعی طبق شیوه‌نامه جدول ۲ انجام شد. اندازه‌گیری مقادیر افزایش یا کاهش میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در تیمارهای مختلف، در نرم‌افزار REST با استفاده از داده‌های خروجی از نرم‌افزار iQ5 انجام گرفت. جهت تجزیه و تحلیل و مقایسه نسبی بیان ژن‌ها از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  استفاده شد (Pfaffle, 2004). از نرم‌افزار Excel v. 2010 جهت ترسیم نمودارهای بیان نسبی ژن‌ها استفاده شد. در پایان هر مرحله نیز برای تأیید تکثیر اختصاصی منحنی ذوب رسم گردید.

میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط سایر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان)، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر پسر و پیشرو (هر یک با غلظت ۱۰ میکرومولار)، ۴ میکرولیتر آب دویار تقطیر شده و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA در سه تکرار فن انجام شد. توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق برای ژن‌های اختصاصی و ژن خانه‌دار *TEF-1 $\alpha$*  طراحی شد که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش و قرار دادن تیوب‌ها در دستگاه، واکنش زنجیره‌ای

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش qRT-PCR

Table 1. Characteristics of the primers used for qRT-PCR analysis

نام ژن Gene name	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (۵'-۳') Primer Sequence	دمای ذوب (سانتی‌گراد) Melting Temperature	طول محصول واکنش (bp) Amplicon length (bp)	شماره دسترسی در پایگاه NCBI NCBI Accession #
Chitinase	Forward	GGCCATTTGGTTCTGGATGA	63.11	206	AJ276226.1
	Reverse	AGCGCGTGTAGTAGCCGATG	63.67		
Proxidase	Forward	CCAAGATGAGCAACATGGACA	62.05	92	AJ003141.1
	Reverse	ACGGCCACTCACACAGTCAC	62.29		
Glucanase	Forward	CCACTTTGGGCTGTTCAATC	60.50	224	M91814.1
	Reverse	TCGAAAGATCCCCTCTTGTG	60.19		
MAP kinase	Forward	CTAGGGAAGCACTGGCATAACA5	60.28	222	AJ495775
	Reverse	TCAACAGCGAAACAGGACAG	60.02		
<i>TEF-1<math>\alpha</math></i>	Forward	TGACATGAGGCAAACACTGTGG	60.72	287	M90077.1
	Reverse	CATATCACACGGCGCTAACA-3	60.69		

جدول ۲- چرخه حرارتی qRT-PCR

Table 2. Thermal cycling of qRT-PCR

دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (C)	زمان (ثانیه) Time (seconds)	مرحله Step	تعداد چرخه Number of cycles
95	180	واسرشت	1
95	10	واسرشت	40
60	30	اتصال	
72	30	تکثیر	1
72	1200	تکثیر نهایی	
55-95	10	ذوب	81

## نتایج و بحث

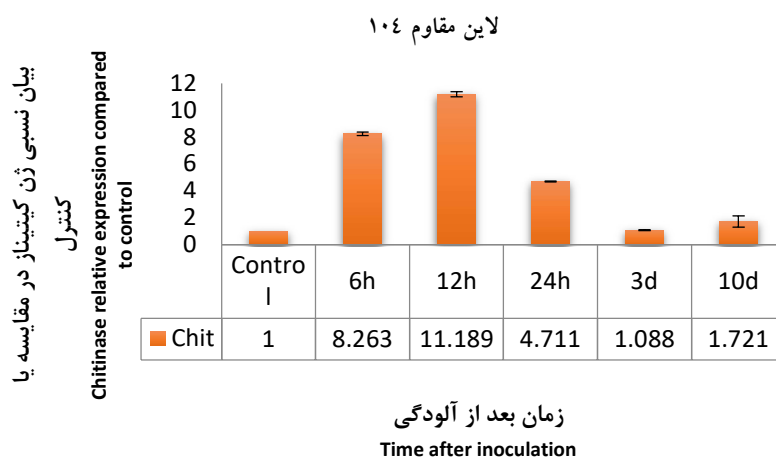
تأییدکننده تلاش ناموفق گیاه برای مقابله با بیماری طی تنش می‌باشد (شکل ۳).

کیتینازهای گیاهی نقش مهمی در دفاع میزبان در برابر بیمارگرهای قارچی دارند و افزایش آن پس از آلودگی با سفیدک پودری در گندم در مطالعات متعدد گزارش شده است (Zheng *et al.*, 2020; Akagi *et al.*, 2011; Jacobs *et al.*, 1999). افزایش زودهنگام تعداد رونوشت‌های این ژن در مقابله با بیماری سفیدک پودری در لاین مقاوم (۱۰۴) بیانگر نقش این ژن در القا مقاومت به قارچ *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei graminis* بود که نتایج مطالعه حاضر در این خصوص با نتایج مطالعه ماچ و بولر (Mauch and Boller, 1998) که بیان نمودند کیتینازها به وسیله حمله بیمارگر و تنش تحریک شده و فعالیت آن پس از القاء مقاومت به قارچ *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* افزایش پیدا می‌کند، مطابقت دارد. به نظر می‌رسد تأخیر در بیان این ژن در لاین نیمه حساس (۶۷) و رقم حساس افضل تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی فرصت کافی را جهت تکثیر و استقرار بیمارگر فراهم می‌آورد. به همین دلیل در مطالعه فرانسیس و همکاران (Francis *et al.*, 2009) پیشنهاد شده است که با استفاده از مواد القاکننده که باعث افزایش بیان برخی از ژن‌های PR در گیاهان می‌شوند، افزایش مقاومت نسبت به عوامل بیماری‌زا حاصل می‌شود.

**بررسی الگوی بیان ژن کیتیناز:** همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، میزان بیان ژن کیتیناز در ساعات اولیه پس از آلودگی در لاین مقاوم (۱۰۴) افزایش قابل توجهی داشت به طوری که در ۶ ساعت پس از آلودگی حدود ۸ برابر نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت و در ۱۲ ساعت بعد از آلودگی به بیش‌ترین میزان خود رسید. هرچند در ساعات و روزهای بعدی تعداد رونوشت‌ها کاهش یافت، اما در تمام مراحل، بیان آن نسبت به نمونه شاهد بیشتر بود.

همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود سطوح بیان ژن کیتیناز در لاین نیمه حساس (۶۷) در ساعات اولیه پس از آلودگی، کم بود که نشان‌دهنده استقرار بیمارگر در گیاه میزبان و پیشرفت بیماری می‌باشد، اما در ۲۴ ساعت بعد میزان بیان ژن به طور قابل توجهی (در حدود ۱۵ برابر نسبت به کنترل) افزایش یافت، همچنین به ترتیب در سه روز و ده روز پس از آلودگی سطح بیان به حدود ۷ برابر و ۶ برابر نسبت به کنترل رسید، این نتایج نشان می‌دهد که عدم توانایی گیاه برای مقابله با این بیماری در ساعات اولیه منجر به استقرار نسبی بیماری گردیده است.

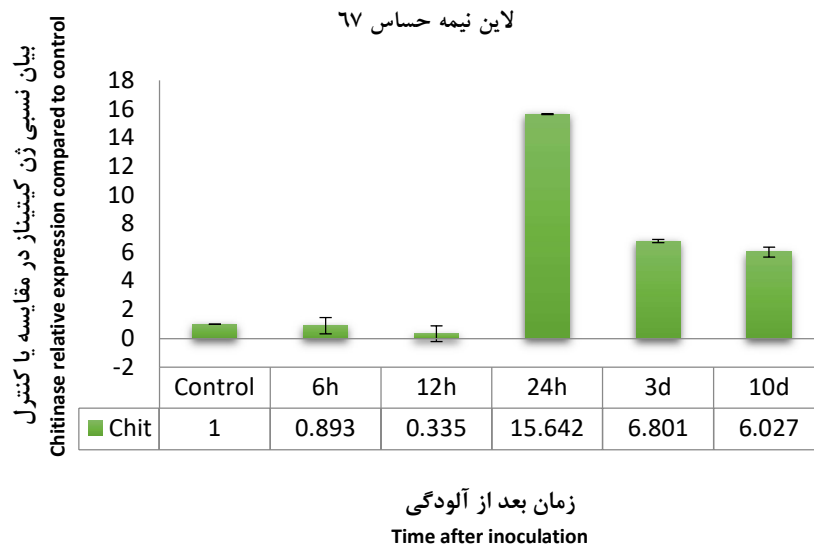
در رقم حساس افضل افزایش میزان بیان ژن کیتیناز ۲۴ ساعت بعد از آلوده‌سازی مشاهده شد، ولی در نهایت در سه و ده روز پس از آلودگی میزان بیان به مقدار زیادی کاهش یافت که



شکل ۱- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن کیتیناز در لاین مقاوم (۱۰۴)، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد ( $\pm$ SD)

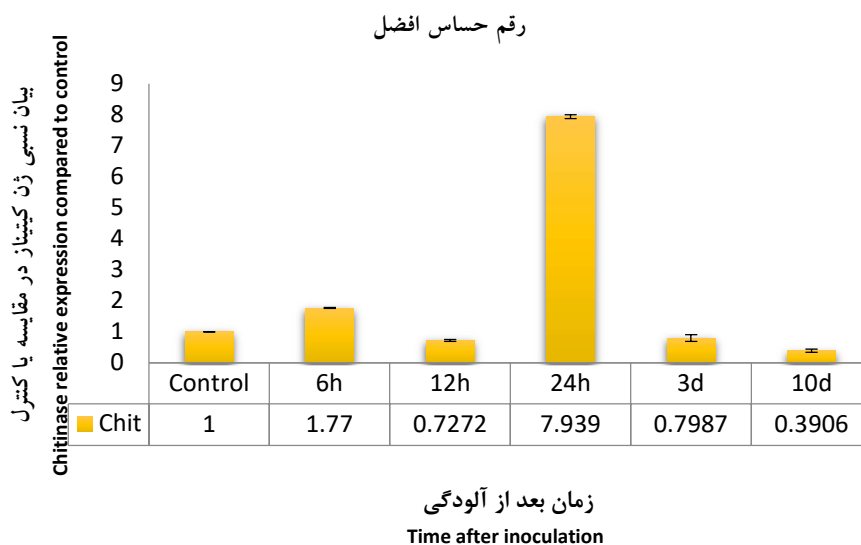
هستند (d: روز بعد از آلودگی، h: ساعت بعد از آلودگی)

Figure 1. qRT-PCR analysis of chitinase gene in the resistant line (104). Bars indicate the standard deviation ( $\pm$ SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)



شکل ۲- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن کیتیناز در لاین نیمه حساس (۶۷)، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد ( $\pm$ SD) هستند (d: روز بعد از آلودگی، h: ساعت بعد از آلودگی)

Figure 2. qRT-PCR analysis of chitinase gene in the semi-susceptible line (67), Bars indicate the standard deviation ( $\pm$ SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)



شکل ۳- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن کیتیناز در رقم حساس افضل، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد ( $\pm$ SD) هستند (d: روز بعد از آلودگی، h: ساعت بعد از آلودگی)

Figure 3. qRT-PCR analysis of chitinase gene in the Susceptible line (Afzal), Bars indicate the standard deviation ( $\pm$ SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)

تیمار کنترل بیان بالاتری داشت. این نتایج نشان می‌دهد که در این لاین در مرحله جوانه‌زنی اسپور و نفوذ هیف بیان ژن گلوکاناز منجر به مقاومت می‌شود. گیاه پس از این که در معرض حمله بیمارگر قرار می‌گیرد، دامنه‌ی وسیعی از واکنش‌های عمومی دفاعی را مانند تغییر ساختار دیواره

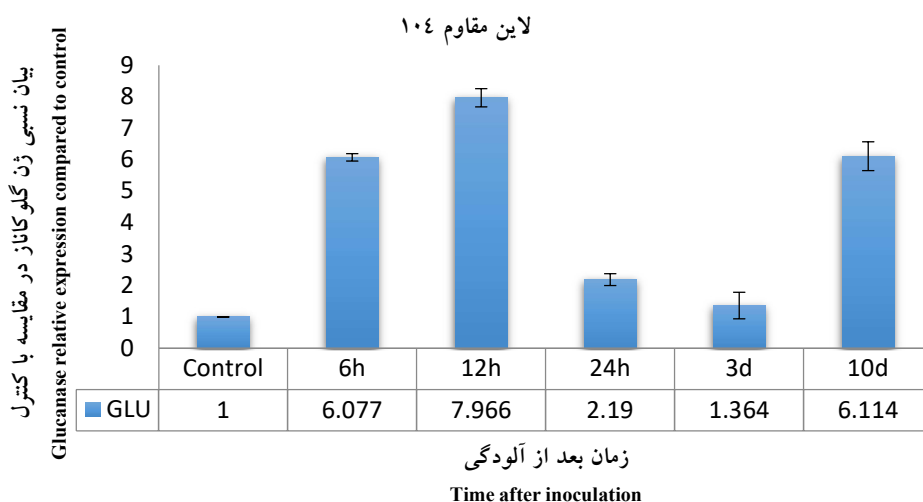
بررسی الگوی بیان ژن گلوکاناز: همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود در لاین مقاوم (۱۰۴) در تیمارهای ۶ ساعت و ۱۲ ساعت پس از آلودگی میزان بیان ژن گلوکاناز به‌طور معنی‌دار افزایش نشان داد. پس از آن در ۲۴ ساعت و ۳ روز بعدی این نسبت کاهش یافت ولی همواره نسبت به

آنکه ممکن است سیگنال‌های مولکولی آزاد کنند که به-عنوان پاسخ دفاعی میزبان فعال عمل می‌کنند، ثانیاً آن‌ها به‌وسیله تخریب دیواره سلولی بیمارگر یا اختلال در رسوب آن از رشد بیمارگر جلوگیری می‌کنند.

در لاین نیمه‌حساس (۶۷) (شکل ۵)، در تیمار ۶ ساعت میزان تظاهر ژن مورد بررسی حدود ۷/۶ برابر نسبت به نمونه کنترل، افزایش نشان داد که می‌تواند بیانگر واکنش دفاعی ژنوتیپ در برابر جوانه‌زنی اسپور باشد، ولی کاهش بیان ژن تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی در این ژنوتیپ می‌تواند نشان‌دهنده تلاش ناموفق گیاه در برابر مهار بیمارگر و گسترش هیف و تا حدودی پیشرفت بیماری باشد.

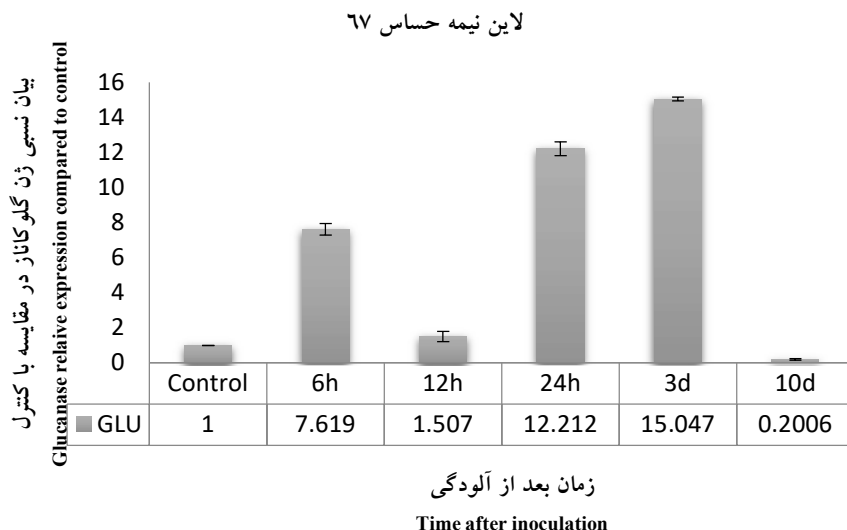
عدم تغییر و حتی کاهش بیان ژن در تمام تیمارها در رقم حساس افضل (شکل ۶) نشان‌دهنده نفوذ و غلبه بیمارگر بر واکنش دفاعی اولیه گیاه و تکثیر وسیع هیف‌های قارچ و مغلوب شدن گیاه در برابر بیمارگر می‌باشد. به‌طور کلی در مقایسه روند بیان رونوشت آنزیم گلوکاناز در سه ژنوتیپ در پاسخ به بیماری سفیدک پودری، افزایش بیان ژن در ژنوتیپ مقاوم و متحمل و کاهش در ژنوتیپ حساس مشاهده شد که تأییدکننده‌ی نقش مهم این آنزیم در واکنش دفاعی می‌باشد.

سلولی، انفجار اکسیداسیونی و تولید ترکیبات دفاعی مانند پروتئین‌های PR (مثل کیتینازها و گلوکانازها) را فعال می‌کند (Shetty et al., 2008). زمانی که گیاه در معرض آلودگی یک بیمارگر قارچی قرار می‌گیرد، ترکیب دیواره سلولی گیاه بسیار حائز اهمیت است. ممانعت از سنتز دیواره سلولی و تجزیه دیواره سلولی قارچ‌ها یکی از سازوکارهای مهمی است که توسط گیاه برای مقابله با حمله قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Balasubramanian et al., 2012). گلوکانازها گروه مهمی از آنزیم‌های هیدرولیتیک متعلق به پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی هستند (Liu et al., 2010) که می‌توانند دیواره سلولی بیمارگرها را تخریب کرده و از رشد آن‌ها جلوگیری کنند (Vu et al., 1997). در گیاهان آلوده به بیمارگرهای قارچی گلوکاناهای گیاهی توسط آنزیم‌های گلوکاناز شکسته و به الیگوساکاریدها تجزیه می‌شوند که این امر منجر به فعال شدن پاسخ مصنوعیت در گیاه می‌شود (Pontiggia et al., 2020). ماچ و بولر (Mauch and Boller, 1998) بیان نمودند کیتیناز و بتاگلوکاناز با حمله بیمارگر و تنش تحریک می‌شوند و چندین نقش را در مقاومت دارند، اول



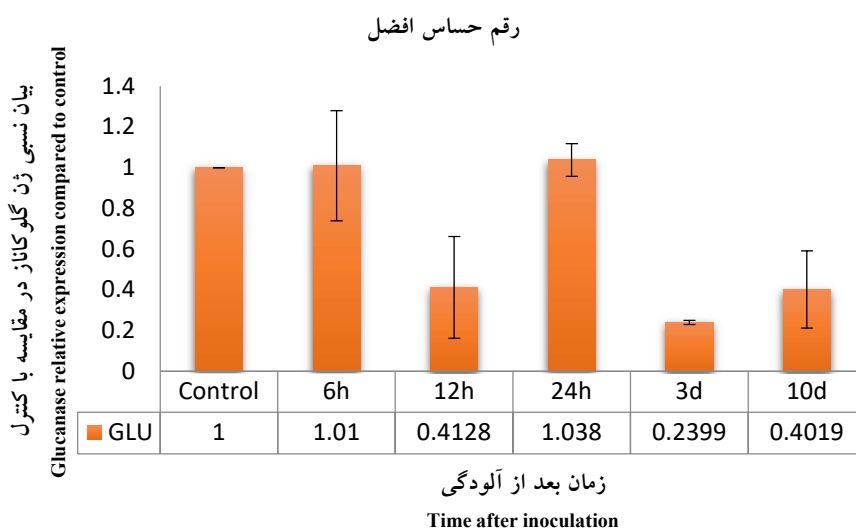
شکل ۴- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن گلوکاناز در لاین مقاوم (۱۰۴)، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد ( $\pm$ SD) هستند (d: روز پس از آلودگی، h: ساعت پس از آلودگی)

Figure 4. qRT-PCR analysis of glucanase gene in the resistant line (104), Bars indicate the standard deviation ( $\pm$ SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)



شکل ۵- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن گلوکاناز در لاین نیمه حساس (۶۷)، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد هستند (±SD) (d: روز پس از آلودگی، h: ساعت پس از آلودگی)

Figure 5. qRT-PCR analysis of glucanase gene in the semi-susceptible line (67), Bars indicate the standard deviation (±SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)



شکل ۶- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن گلوکاناز در رقم حساس افضل، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد (±SD) هستند (d: روز پس از آلودگی، h: ساعت پس از آلودگی)

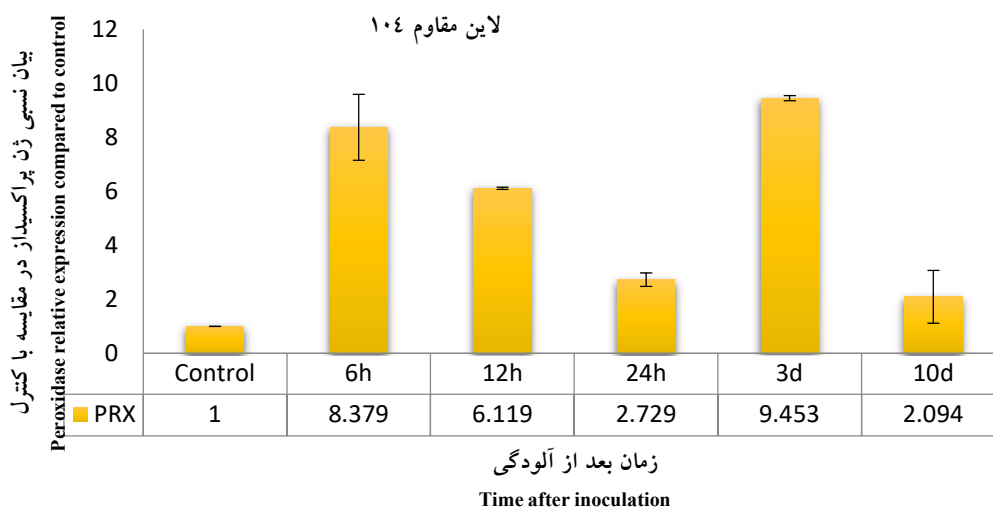
Figure 6. qRT-PCR analysis of glucanase gene in the susceptible line, Bars indicate the standard deviation (±SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)

کنترل افزایش داشت. پس از آن بیان این ژن کاهش یافته و مجدداً ۳ روز پس از آلودگی به میزان بیان به‌طور قابل-توجهی افزایش یافت و به حدود ۹ برابر نمونه کنترل رسید.

بررسی الگوی بیان ژن پراکسیداز: همان‌طور که در شکل ۷ دیده می‌شود میزان بیان ژن پراکسیداز نیز ۶ ساعت پس از آلودگی در لاین مقاوم (۱۰۴) به میزان ۸ برابر نسبت به

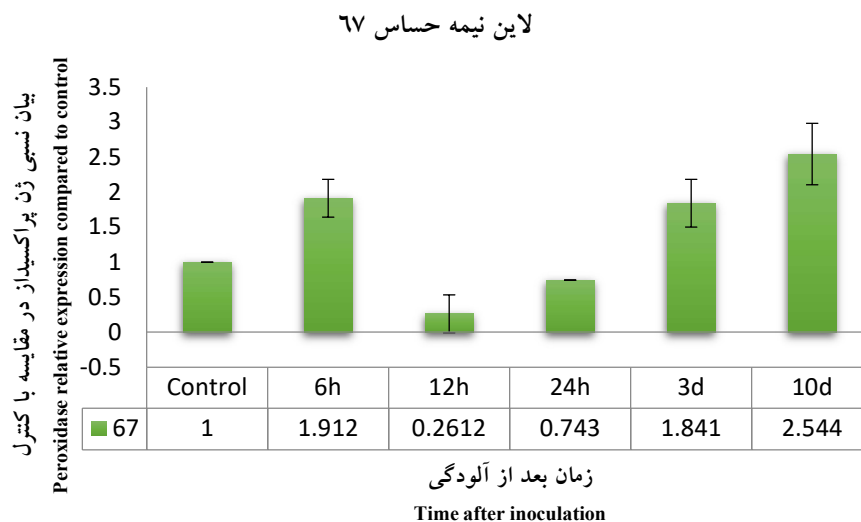
گیاهان به‌وسیله رهیافت مقاومت، مانند تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، پاسخ فوق‌حساسیت، تجمع سلول-های مرده در اطراف ناحیه آلودگی، بیان ژن‌های مرتبط با بیمارگر و دیگر پپتیدهای سمی، سنتز فیتوالکسین و تثبیت دیواره سلولی می‌باشد (Hammond-Kosack and Jones, 1996). تولید واسطه‌های اکسیژنی در طول انفجار اکسیداتیو مشخصه‌ای از پاسخ دفاعی در گیاهان است. در این فرآیند سطوح ROS، به‌طور ویژه آنیون سوپراکسید ( $O_2^-$ ) و هیدروژن پراکسید ( $H_2O_2$ ) افزایش یافته، بیمارگر از بین رفته و یا کلنی‌ها توسط پاسخ دفاعی در بافت‌های گیاهی آلوده محدود می‌شوند (Levine et al., 1994). به نظر می‌رسد بیان سریع این ژن و به دنبال آن تولید آنزیم در ژنوتیپ‌های مقاوم می‌تواند به‌دلیل تجمع رادیکال‌های آزاد و تلاش گیاه برای حذف آن‌ها و واکنش فوق‌حساسیت باشد (Hu et al., 2020). در یکوند و همکاران (Darivand et al., 2023) در مطالعه خود بر نقش آنزیم پراکسیداز در پاسخ به تنش‌های زیستی تأکید نمودند.

به نظر می‌رسد این ژن در فاصله کوتاهی پس از آلودگی، در ژنوتیپ مقاوم فعال می‌شود و با تقویت دیواره سلولی گیاه مانع گسترش بیمارگر می‌گردد. همچنین الگوی بیان این ژن به‌صورت عرضه و تقاضا توسط گیاه کنترل می‌شود. در لاین نیمه‌حساس (۶۷) (شکل ۸) افزایش بیان ناچیزی در برخی تیمارها مشاهده شد که خود بیانگر واکنش ناکافی و ناقص این ژنوتیپ می‌باشد. از سوی دیگر تأخیر طولانی (۱۰ روزه) در افزایش بیان این ژن در رقم حساس افضل به‌وضوح بیانگر نقش ارزنده این ژن در واکنش دفاعی گیاه جو نسبت به بیماری سفیدک پودری است. از آنجایی که آنزیم پراکسیداز به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت در حذف رادیکال‌های آزاد ایفای نقش می‌کند، عدم بیان به‌موقع این ژن می‌تواند منجر به تجمع رادیکال‌های آزاد، تنش اکسیداتیو و خسارت جدی به گیاه شود. تولید  $H_2O_2$  یکی از نشانه‌های قطع اکسیداتیو است که یکی از سریع‌ترین رویدادهای در ارتباط با پاسخ فوق‌حساسیت در تعامل گیاه-بیمارگر می‌باشد. در طول یک واکنش ناسازگار، پاسخ سلول‌های



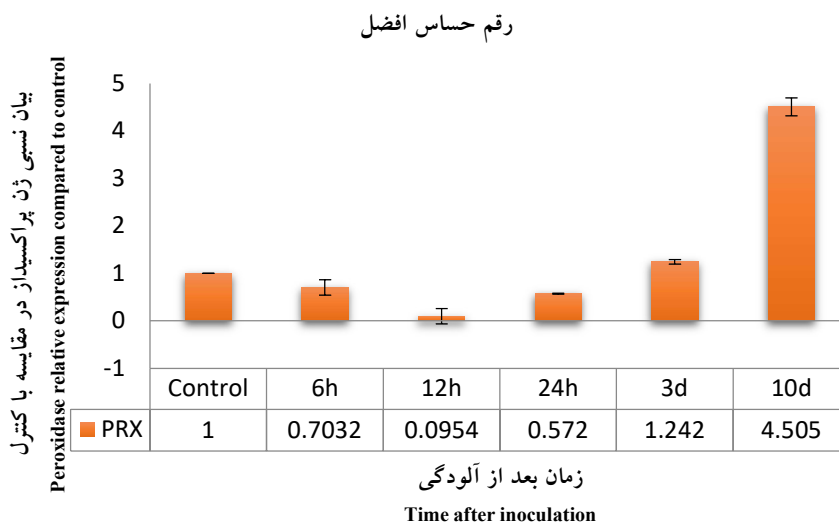
شکل ۷- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن پراکسیداز در لاین مقاوم (۱۰۴)، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد ( $\pm$ SD) هستند (d: روز پس از آلودگی، h: ساعت پس از آلودگی)

Figure 7. qRT-PCR analysis of peroxidase gene in the resistant line (104), Bars indicate the standard deviation ( $\pm$ SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)



شکل ۸- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن پراکسیداز در لاین نیمه حساس (۶۷)، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد (±SD) هستند (d: روز پس از آلودگی، h: ساعت پس از آلودگی)

Figure 8. qRT-PCR analysis of peroxidase gene in the semi-susceptible line (67), Bars indicate the standard deviation (±SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)



شکل ۹- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن پراکسیداز در لاین حساس (۱۰۴)، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد (±SD) هستند (d: روز پس از آلودگی، h: ساعت پس از آلودگی)

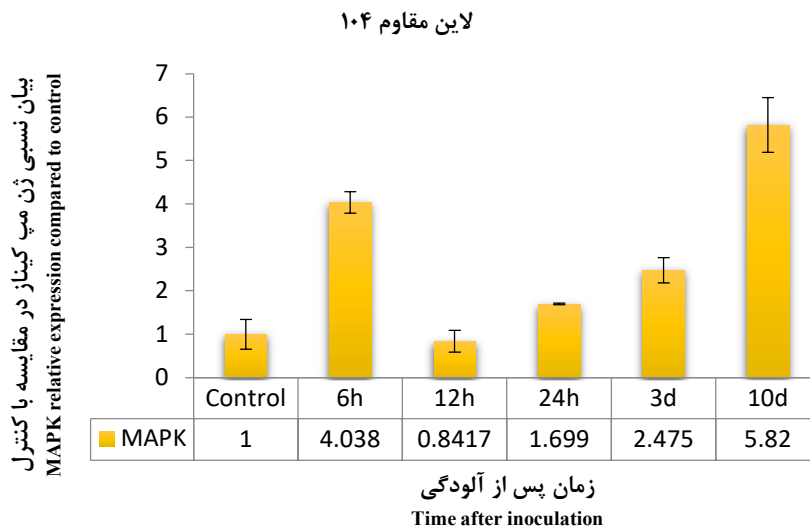
Figure 9. qRT-PCR analysis of peroxidase gene in the susceptible line (104), Bars indicate the standard deviation (±SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)

تلقیح بیماری نسبت به تیمار کنترل افزایش نشان داد. تجمع رونوشت‌های این ژن با سرعت زیاد و در کمترین زمان (شش ساعت پس از آلودگی) به حدود ۴ برابر تیمار کنترل

بررسی بیان ژن مپ‌کیناز: همان‌طور که در شکل ۱۰ نشان داده شده است، بیان ژن مپ‌کیناز در لاین مقاوم (۱۰۴) به سفیدک پودری در اغلب زمان‌های نمونه‌برداری پس از

لاین مقاوم (۱۰۴) بود. همان‌طور که در شکل ۱۱ نشان داده شده است، در اغلب زمان‌های نمونه‌برداری پس از آلودگی بیان این ژن تغییر قابل‌توجهی نسبت به تیمار کنترل نداشت، تنها در فاصله زمانی ۱۲ ساعت پس از شروع آلودگی افزایش چشمگیری در تعداد رونوشت‌های این ژن رخ داد و پس از آن روند کاهشی را در پی داشت. این افزایش در میزان بیان ژن مپ‌کیناز می‌تواند گواهی بر تلاش گیاه برای فعال‌سازی آبشار کینازی و واکنش‌های مقاومت باشد که در نتیجه کاهش در تعداد رونوشت‌ها در زمان‌های بعدی با شکست همراه بود و منجر به بروز حساسیت در گیاه شد. روند بیان ژن مپ‌کیناز در لاین نیمه‌حساس (۶۷) در حدواسط لاین مقاوم و ژنوتیپ حساس قرار داشت. همان‌طور که انتظار می‌رفت و در شکل ۱۲ نیز به‌وضوح مشخص است، بیان ژن مپ‌کیناز در کلیه زمان‌های نمونه‌برداری در رقم حساس افضل پس از شروع آلودگی نسبت به تیمار کنترل کاهش نشان داد که به‌خوبی بیانگر عدم موفقیت گیاه در فعال‌سازی آبشار کینازی و واکنش حساسیت می‌باشد.

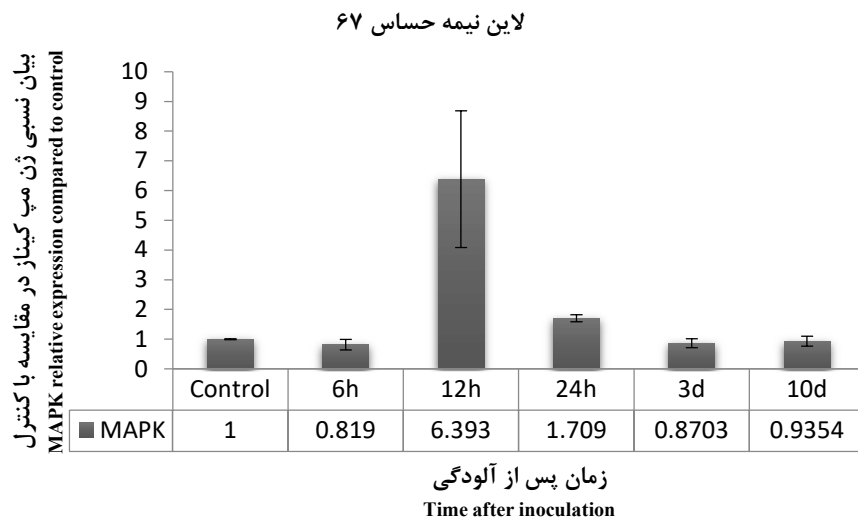
رسید که خود بیانگر واکنش سریع مسیر آبشار کینازی است. از آنجایی که این ژن در مسیر آبشار سه‌گانه کینازی به‌عنوان آخرین مپ‌کیناز فعال می‌شود؛ بنابراین می‌توان به القاء سریع این آبشار در شرایط بیماری سفیدک پودری جو پی برد. القاء سریع این ژن در گندم در پاسخ به بیماری سفیدک پودری در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (Li et al., 2019). در ۱۲ ساعت پس از آلودگی بیان این ژن کاهش یافت و تقریباً به میزان اولیه خود در تیمار کنترل رسید. پس از آن و در نمونه‌برداری‌های بعدی روند افزایش این ژن به‌خوبی حفظ شد و ۱۰ روز پس از شروع بیماری به بالاترین میزان خود رسید. همان‌طور که پیش‌تر نیز ذکر شد، آبشار کینازی در واکنش فوق‌حساسیت نیز حائز اهمیت است و افزایش بیان سریع این ژن شش ساعت پس از آلودگی در لاین مقاوم (۱۰۴) را می‌توان به نقش این آبشار در القاء واکنش فوق‌حساسیت مرتبط دانست و افزایش بعدی در تعداد رونوشت‌های ژن می‌تواند به نقش آن در واکنش‌های مقاومت اشاره داشته باشد. تغییرات در تعداد رونوشت‌های این ژن در لاین نیمه‌حساس (۶۷) متفاوت از



شکل ۱۰- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن مپ‌کیناز در لاین مقاوم (۱۰۴)، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد ( $\pm$ SD)

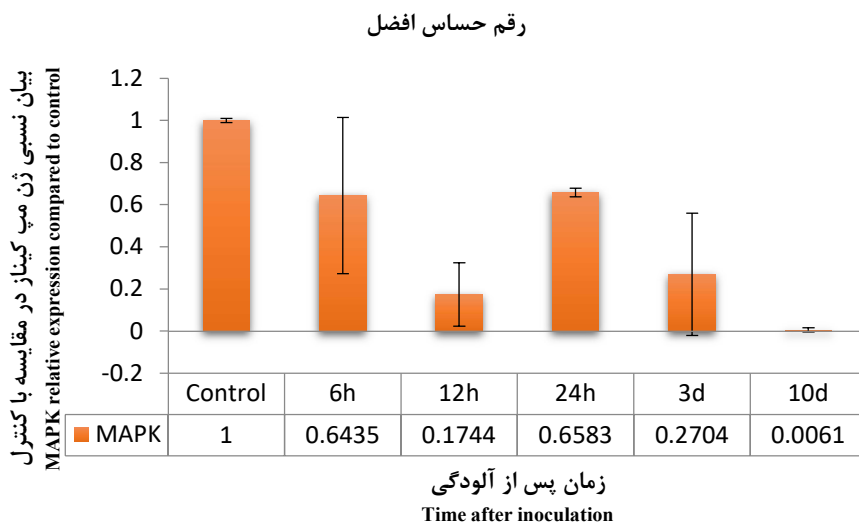
هستند (d: روز پس از آلودگی، h: ساعت پس از آلودگی)

Figure 10. qRT-PCR analysis of MAPK gene in the resistant line (104), Bars indicate the standard deviation ( $\pm$ SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)



شکل ۱۱- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن مپ کیناز در لاین نیمه حساس (۶۷)، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد (±SD) هستند (d: روز پس از آلودگی، h: ساعت پس از آلودگی)

Figure 11. qRT-PCR analysis of MAPK gene in the semi-susceptible line (67), Bars indicate the standard deviation (±SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)



شکل ۱۲- تجزیه و تحلیل qRT-PCR بیان ژن مپ کیناز در رقم حساس افضل، میله‌ها بیانگر انحراف معیار استاندارد (±SD) هستند (d: روز پس از آلودگی، h: ساعت پس از آلودگی)

Figure 12. qRT-PCR analysis of MAPK gene in the susceptible line Afzal, Bars indicate the standard deviation (±SD), (d: days after inoculation, h: hours after inoculation)

واکنش در همان ساعات اولیه آلودگی (۶ ساعت پس از آلودگی با بیمارگر) با افزایش بیان ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز، پراکسیداز و مپ کیناز آغاز می‌شود. در ژنوتیپ مقاوم به دنبال

به‌طور کلی و بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان اذعان داشت که واکنش مقاومت در گیاه جو نسبت به بیماری سفیدک پودری به‌صورت فوق‌حساسیت می‌باشد و این

فوق حساسیت، بیمارگر فرصت کافی برای استقرار، تکثیر و گسترش را در گیاه به دست می‌آورد. این واکنش در ژنوتیپ حساس به دلیل تأخیر طولانی‌تر و یا عدم بیان ژن روی نخواهد داد و بیمارگر از همان ساعات اولیه زمان و شرایط مناسبی برای استقرار و حمله به گیاه میزبان را دارا می‌باشد.

افزایش بیان این ژن‌ها و تولید آنزیم‌های مرتبط با واکنش فوق حساسیت به طور کامل رخ داده که منجر به توقف رشد و تکثیر بیمارگر در سلول‌های اطراف محل آلودگی و به دنبال آن مانع گسترش بیمارگر می‌شود. در ژنوتیپ‌های نیمه حساس به دلیل تأخیر در بیان ژن‌های مرتبط با واکنش

## References

- Akagi, A., Dandekar, A.M. and U Stotz, H.** (2011). Resistance of *Malus domestica* fruit to *Botrytis cinerea* depends on endogenous ethylene biosynthesis. *Phytopathology*, **101**: 1311-1321.
- Al-Harazi, M.** (2004). Barley in the Republic of Yemen. *9<sup>th</sup> International Barley Genetics Symposium*, Brno, Czech Republic.
- Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J. and Sakthivel, N.** (2012). Plant  $\beta$ -1,3-glucanases: Their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*, **34**: 1983-1990.
- Brown, A.H.D.** (1992). Genetic variation and resources in cultivated barley and wild *Hordeum*. In: Munck, L. Ed., *Barley Genetics*, pp. 669-682. Munksgaard Int. Publ. Ltd., Copenhagen, DE.
- Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U. and Vad, K.** (1993). Plant chitinases. *The Plant Journal*, **3**: 31-40.
- Derikvand, F., Bazgir, E., Darvishnia, M. and Mirzaei Najafgholi, H.** (2023). Evaluation the activity of peroxidase and catalase enzymes and the expression level of *PR1* and *PR8* genes in apple fruit following brown rot (*Monilinia laxa*) disease. *Plant Genetic Researches*, **10(1)**: 29-42 (In Persian).
- De Marco, A., Guzzardi, P. and Jamet, E.** (1999). Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiology*, **120**: 371-382.
- Desikan, R., Clarke, A., Atherfold, P., Hancock, J.T. and Neill, S.J.** (1999). Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defence responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Planta*, **210**: 97-103.
- Francis, M.I., Redondo, A., Burns, J.K. and Graham, J.H.** (2009). Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *European Journal of Plant Pathology*, **124**: 283.
- Gao, H., Niu, J., Zhao, W., Zhang, D., Li, Sh. and Liu, Y.** (2021). Effect of powdery mildew on antioxidant enzymes of wheat grain. *Plant Pathology*, **71**: 901-916.
- Gawande, V.L. and Patil, J.V.** (2003). Genetics of powdery mildew (*Erysiphe polygoni* D. C.) resistance in Mungbean (*Vigna radiate* L. Wilczek). *Crop Protection*, **22**: 267-571.
- Ghoreishi, S.** (2014) Study on quantitative changes in transcripts of some defense genes in cultivated barley in response to powdery mildew. M.Sc., Thesis, Gorgan. University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran (In Persian).
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G.** (1996). Resistance gene dependent plant defence responses. *Plant Cell*, **8**: 1773-1791.
- Hu, Y., Zhong, S., Zhang, M., Liang, Y., Gong, G., Chang, X., Tan, F., Yang, H., Qiu, X., Luo, L. and Luo, P.** (2020). Potential role of photosynthesis in the regulation of reactive oxygen species and defence responses to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**: 767.
- Jacobs, A.K., Dry, I.B. and Robinson, S.P.** (1999). Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*, **48**: 325-336.
- Keen, N.T.** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics*, **24**: 447-463.
- Kruger, W.M., Szabo, L.J. and Zeyen, R.J.** (2003). Transcription of the defense response gene chitinase IIb, PAL and peroxidase is induced by the barley powdery mildew fungus and is only indirectly modulated by R genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **63**: 167-168.
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J.** (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays*, **18**: 567-577.

- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A. and Pugin, A.** (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant Journal*, **15**: 773-781.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C.H.** (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**: 583-593.
- Li, Y., Guo, G., Zhou, L., Chen, Y., Zong, Y., Huang, J., Lu, R. and Liu, C.** (2019). Transcriptome analysis identifies candidate genes and functional pathways controlling the response of two contrasting barley varieties to powdery mildew infection. *International Journal of Molecular Science*, **21**: 151.
- Ligterink, W., Kroj, T., Zur Nieden, U., Hirt, H. and Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*, **275**: 2054-2057.
- Liu, G., Sheng, X., Greenshields, D.L., Ogieglo, A., Kaminskyj, S. and Selvaraj, G.** (2005). Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from powdery mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns. *The American Phytopathological Society*, **18**: 730-741.
- Liu, B., Xue, X., Cui, S., Zhang, X., Han, Q., Zhu, L., Liang, X., Wang, X., Huang, L., Chen, X. and Kang Z.** (2010). Cloning and characterization of a wheat  $\beta$ -1,3-glucanase gene induced by the stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Biology Reports*, **37**: 1045-1052.
- Martin, G.B.** (1999). Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**: 273-279.
- Mauch, F. and Boller, T.** (1998). Antifungal hydrolases in pea tissue. II. inhibition of fungal growth by combination of chitinase. *Plant Physiology*, **88**: 936-942.
- Murray, G.M. and Brennan, J.P.** (2010). Estimating disease losses to the Australian barley industry. *Australasian Plant Pathology*, **39**: 85-96.
- Pfaffle, M.W.** (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin, S.A. Ed., *A-Z of Quantitative PCR*, pp. 87-112, International University Line (IUL), USA.
- Pontiggia, D., Benedetti, M., Costantini, S., De Lorenzo, G. and Cervone, F.** (2020). Dampening the DAMPs: how plants maintain the homeostasis of cell wall molecular patterns and avoid hyper-immunity. *Frontiers in Plant Science*, **11**: 613259.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H. and Jones, J.D.G.** (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of map kinases in tobacco cell cultures and Leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate response. *Plant Cell*, **11**: 273-287.
- Sahai, A.S. and Manocha, M.S.** (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews*, **11**: 317-338.
- Scheel, D.** (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**: 305-310.
- Shetty, N.P., Jorgensen, 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**: 267-280.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. and Jones, J.D.G.** (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, **268**: 661-667.
- Suzuki, K., Yano, A. and Shinshi, H.** (1999). Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Physiology*, **119**: 1465-1472.
- Vanaker, H., Carver, T.L.W. and Foyer, C.H.** (2000). Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation in Mesophyll Cells Leads to Induction of Glutathione during the Hyper-Sensitive response in the Barley-Powdery Mildew Interaction. *Plant Physiology*, **123**: 1289-1300.
- Vu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Leon, J., Fitzsimmons, K.C., Levine, E.B., Raskin, I. and Shah, D.M.** (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic plants. *Plant Physiology*, **115**: 427-435.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. and Johnson, G.L.** (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Review*, **79**: 143-180.
- Zheng, H., Dong, L., Han, X., Jin, H., Yin, C., Han, Y., Li, B., Qin, H., Zhang, J., Shen, Q., Zhang, K. and Wang, D.** (2020). The TuMYB46L-TuACO3 module regulates ethylene biosynthesis in einkorn wheat defense to powdery mildew. *New Phytology*, **225**: 2526-2541.