آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۳، شماره ۱، شهریور ۱۳۹٤

مطالعه الگوی بیان ژن در گیاه *Citrus grandis* آلوده به باکتری *Candidatus* Liberibacter asiaticus عامل بیماری میوه سبز مرکبات

پیمان طاهری[۱]، مریم غایب زمهریر[۲]✉، جابر کریمی[۱]، ناصر فرخی[۳]، امیر محمد ناجی[۱]، علی علیزاده[۲] و حسین غلامپور[۱]

۱- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران؛ ۲- آزمایشگاه پروکاریوت شناسی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛ ۳- دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
(تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۲؛ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۳)

چکیده

بیماری میوه سبز مرکبات از جمله مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در مناطق جنوبی کشور می‌باشد. با توجه به ماهیت بیماری، استفاده از ارقام مقاوم مناسب‌ترین راهکار در جهت مبارزه با این بیماری می‌باشد. در راستای شناسایی مکانیسم مقاومت، در این تحقیق برهمکنش میزبان- پاتوژن در گیاه نسبتاً مقاوم سلطان مرکبات (*Citrus grandis*) با روش cDNA-AFLP در طی ٤ ماه پس از ایجاد آلودگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده حاکی از وجود ۲۵ قطعه پلی مورف از نسخه‌های ژنی موجود در برگ گیاهان مورد مطالعه بود که از این تعداد توالی ١٦ قطعه شبیه به نسخه‌های میزبان بود و ۵ قطعه شباهت به توالی DNA باکتری داشت و ٤ قطعه دیگر با توالی‌های ثبت شده در بانک‌های اطلاعاتی ژن شباهتی نداشتند. بیان تعدادی از توالی‌ها به روش Semiquantive RT-PCR به طور کمی ارزیابی شد. نتایج cDNA-AFLP و Semiquantive RT-PCR نشان داد که بیان بسیاری از ژن‌های سلطان مرکبات در طی آلودگی افزایش یافت. افزایش بیان این ژن‌ها در ارتباط با واکنش‌های مقاومت القایی در گیاه می‌باشد. بنا بر دانش ما، این مطالعه اولین بررسی روی تغییرات بیان ژن‌های سلطان مرکبات و *Candidatus* Leiberibacter asiaticus است که در طی بیماری اتفاق می‌افتد. نتایج این تحقیق می‌تواند به پیشرفت اطلاعات مولکولی مربوط به روند بیماری و شناسایی ژن‌های دخیل در آن کمک نماید.

واژه‌های کلیدی: میوه سبز مرکبات، *Candidatus* Leiberibacter asiaticus، cDNA-AFLP، *Citrus grandis*.

Study of gene expression pattern in *Citrus grandis* plants infected by *Candidatus* Liberibacter asiaticus causal agent of citrus greening disease

P. TAHERI[1], M. GHAYEB ZAMHARIR[2]✉, J. KARIMI[1], N. FARROKHI[3], A. MOHAMMAD NAJI[1], A. ALIZADEH[2] and H. GHOLAMPOUR[1]

1- Agricaltural biotechnology Group, Agricalture department, Shahed University, Tehran, Iran; 2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; 3- Agriculture department, Shahrod Technology University, Shahrod, Iran

Abstract

Citrus greening has been reported from south of Iran in 2007. The molecular basis of compatibility and disease development in this system is poorly understood. We have carried out a cDNA-AFLP analysis to identify resistance genes of *Citrus grandis* and *Candidatus* Leiberibacter aciaticus susceptibility genes in late infection development stage. Selective amplifications with 10 primer combinations allowed the visualization of about 25 transcript-derived fragments (TDFs) in inoculated leaves, which were differentially expressed. We sequenced 16 fragments, which were identified as *Citrus grandis* transcripts after homology searching, while 5 were homologous to sequences in NCBI databases and were attributed to *Candidatus* Leiberibacter asiaticus. Many *Citrus grandis* genes spanning almost all functional categories were upregulated during infection. This study provides the first global catalogue of *Citrus grandis* and *Candidatus* Leiberibacter asiaticus genes expressed during inoculation, together with their functional annotations. This will help to elucidate the molecular basis of the resistance process and identify genes and chemicals that could help to inhibit the pathogen.

Key words: *Candidatus* Leiberibacter asiaticus, cDNA-AFLP, *Citrus grandis*, Citrus greening.

✉ **Corresponding author: zamharir2005@yahoo.com**

مقدمه

سلطان مرکبات با نام علمی *C. grandis* از خانواده Rutaceae و زیر خانواده Aurantioideae می‌باشد (Fotohi Ghazvini and Fatahi Moghaddam, 2005). بیماری میوه سبز مرکبات یا huanglongbing (hlb) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در ایران است (Salehi *et al*., 2010). عامل بیماری میوه سبز مرکبات ابتدا از پسیل آسیایی مرکبات، در استان‌های سیستان وبلوچستان، هرمزگان و کرمان و درمنطقه رستاق داراب (استان فارس) گزارش گردید (Salehi *et al*., 2010) و در سال ۱۳۹۱ فرم آسیایی این بیماری از درختان پرتقال و نارنگی در استان کرمان گزارش شد (Salehi *et al*., 2012).

مهم‌ترین علایم در درختان آلوده شامل کم پشت بودن و کوتاهی، مرگ ترکه‌ها، زردی شاخساره یا ریزش شدید میوه، ایجاد رنگ سبز در سطح و در قسمت میانی میوه می‌باشد (Akhtar and Ahmad, 1999).

عامل بیماری یک باکتری گِرم منفی سخت کِشت و محدود به آوند آبکشی است (Ute and Kim, 2008). این باکتری بیرون از سلول‌های میزبان زنده نمی‌ماند، به همین دلیل مطالعه آن سخت می‌باشد. از نظر تاکسونومی این باکتری در خانواده Phyllobacteriaceae قرار دارد. نام علمی جنس آن *Candidatus* Liberibacter است که بر اساس پراکنش جغرافیایی سه گونه *Ca.* L. asiaticus، *Ca.* L. africanus و *Ca.* L. americanus از آن گزارش شده است (Bove, 2006). دو گونه از پسیل مرکبات Kuwayama *Diaphorina citri* (پسیل آسیایی) و Del Guerico *Trioza erytreae* (پسیل آفریقایی) توانایی انتقال پاتوژن میوه سبز را دارند (Bove, 2006). باکتری عامل HLB می‌تواند بیشتر رقم‌ها، گونه‌ها، هیبریدها و نیز خویشاوندان مرکبات را آلوده کند (Sindhuja and Ehsani, 2010). گونه‌های مختلف مرکبات آلوده شده به HLB درجه متفاوتی از علائم را نشان می‌دهند. نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد گونه *C. grandis* (سلطان مرکبات) دارای تحمل نسبی و گونه‌های *C. reticulate* (نارنگی) و *C. sinensis* (پرتقال) دارای حساسیت فراوان در برابر بیماری می‌باشند (رفرنس). همچنین مشخص گردیده است که گریپ فروت، لیمو ترش و *C. aurantifoli*a جزو ارقام متحمل محسوب می‌شوند (Ute and Kim, 2008; Chang *et al*., 1993).

جهت کنترل بیماری روش‌هایی از قبیل مبارزه با حشرات ناقل، استفاده از آنتی بیوتیک و همچنین ارقام مقاوم معرفی گردیده‌اند (Fotohi and Fttahimoghadam, 2005). به منظور دستیابی به ارقام مقاوم و منابع ژنتیکی مقاومت، درک مکانیسم مولکولی فعل و انفعالات مربوط به برهمکنش میزبان – پاتوژن ضروری می‌باشد که برای این منظور از تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ژن استفاده می‌شود (Hideo *et al*., 2006). جهت بررسی بیان ژن از روش‌هایی از قبیل نورثتن بلات[1] (Christian *et al*., 1998)، میکروواری یا آزمون ریز آرایه (Christian *et al*., 1998)، ماکروواری (Christian *et al*., 1998)، differential display (Christian *et al*., 1998)، serial analysis of gene expression (SAGE)، expressed sequence tag (EST) analysis (Ryan *et al*., 2002)، هیبریداسیون کاهشی[2] (Moody, 2001)، cDNA-AFLP (Francesca *et al*., 2005) و SSH(Suppression subtractive hybridization) استفاده می‌گردد. روش cDNA-AFLP برای بررسی سطوح کمّی بیان ژن در موجودات مختلف که داری ژنوم بزرگ هستند، مناسب می‌باشد. همچنین این روش برای تجزیه و تحلیل بیان ژن، در موجوداتی که توالی ژنوم آن‌ها برای تهیه ریزتراشه‌ها DNA یا ریز آرایه ناقص است نیز به کار می‌رود (Marinik *et al*., 2007). در این روش از انگشت نگاری mRNA در ژل، برای تعیین تفاوت طول قطعات تکثیر شده cDNA (cDNA-AFLP) استفاده می‌شود، به عبارت دیگر این روش برای تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های دخیل در چرخه‌های بیولوژیکی خاص در گیاهان و میکروارگانیسم‌های دیگر استفاده می‌گردد. cDNA-AFLP بر طبق اصول AFLP انجام می‌شود

۱– Northern blots

۲– Subtractive hybridization

(Marnik *et al*., 2007).

در این بررسی از روش cDNA-AFLP برای ارزیابی الگوی بیان ژن در سلطان مرکبات مایه زنی شده با باکتری عامل میوه سبز مرکبات استفاده شده است.

روش بررسی

۱- تهیه نهال سلطان مرکبات: نهال‌های سلطان مرکبات پیوند زده شده روی پایه نارنج از نهالستان فجر ساری در استان مازندران تهیه گردید. نهال‌ها دارای گواهی سلامت از سازمان حفظ نباتات و فاقد علایم بیماری‌های قارچی و باکتریایی بودند. نهال‌ها پس از انتقال به گلخانه قرنطینه موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، در خاک سبک کشت شده و در دمای ۲۰°C–۱۸ و در نسبت روشنایی ۸:۱۶ ساعت با مقدار نور طبیعی قرار داده شدند. پس از گذشت ۴ ماه نهال‌های با قطر مناسب با پیوندک آلوده مایه زنی شدند.

۲- تهیه پیوندک آلوده به بیماری میوه سبز مرکبات و آلوده‌سازی نمونه‌ها: از جست‌های[1] تازه روییده پرتقال آلوده به بیماری میوه سبز مرکبات در جیرفت، جهت تهیه پیوندک استفاده شد. جهت مایه‌زنی از پیوندک آلوده به روش جانبی روی سلطان مرکبات و نارنگی (به عنوان شاهد برای تشخیص زمان بروز علایم در گیاه حساس) پیوند زده شد. در نمونه‌های کنترل منفی، از نهال‌های سالم سلطان مرکبات، پیوندک‌هایی روی همان پایه پیوند زده شد.گیاهان پیوندی در شرایط مرطوب و مناسب برای رشد پیوندک قرار گرفتند. چهار ماه پس از پیوند، آلودگی به باکتری عامل میوه سبز مرکبات به روش PCR و با استفاده از آغازگرهای A2/J5 (Triwiratno *et al*., 1999) مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأیید وجود آلودگی در نهال‌های سلطان مرکبات، نمونه برداری به طور هم زمان از دو گیاه سالم و چهار گیاه آلوده انجام شد. پس از برداشت، نمونه‌ها بلافاصله به ازت مایع منتقل شدند و تا انجام مراحل بعدی در ۸۰°C – نگهداری شدند.

۴- جداسازی RNA کل از گیاه: قبل از انجام عمل استخراج، دسته هاون و هاون‌های مورد نیاز در فویل آلومینیومی پیچیده شد و به مدت دو ساعت در دمای ۱۸۰°C قرار گرفت. برای استخراج RNA ابتدا با استفاده از ازت مایع، هاون و دسته آن سرد شده و نمونه‌ها به کمک ازت مایع پودر شدند. از هر نمونه ۰/۱ گرم داخل ویال‌هایی که در ازت مایع خنک شده بودند، ریخته شد. استخراج RNA با استفاده از روش CTAB (Chung and Scott, 2009) انجام شد. برای ارزیابی کمی و کیفی RNA استخراج شده، یک میکرولیتراز نمونه استخراج شده در دستگاه Nanodrap (ND1000, Wilmington,USA) در جذب‌های نوری ۲۶۰/۲۸۰و ۲۶۰/۲۳۰ ارزیابی گردید. برای ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده، نمونه‌ها در ژل آگارز (w/v) ۱/۲ ٪ الکتروفورز شدند. دستگاه الکتروفورز و ظروف مورد استفاده برای عاری شدن از RNase در آب DEPC تیمار شدند و بافر مورد نیاز و ژل نیز با آب DEPC تهیه شد.

۵- سنتز cDNA و انجام cDNA-AFLP: سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis ساخت شرکت فرمنتاز (Fermentas) و توسط پرایمر Random و OligoT انجام شد. برای ارزیابی کیفی نمونه‌ها مقدار ۵ میکرولیتر از هر نمونه cDNA، با یک میکرولیتر بافر بارگذاری DNA مخلوط و در ژل آگارز ۱/۲ درصد در ولتاژ ۷۵ ولت، و بافر TAE(1×) به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و نهایتاً از ژل تهیه شده روی نور UV عکس گرفته شد. آنالیز cDNA-AFLP نمونه‌های مذکور به روش بچم و همکاران انجام شد (Bachem *et al*., 1996). برای این منظور از ۱۰ ترکیب پرایمری (جدول ۱) استفاده گردید.جهت بررسی قطعات تکثیری از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶٪ استفاده شد و ژل‌ها با استفاده از نیترات نقره رنگ آمیزی شدند.

۱- flashes

جدول ۱- ترکیب وتوالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش cDNA- AFLP

Table 1. Primers sequencing and combination using in cDNA-AFLP analysis

Primer sequences	Primer combination
5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC-3'/5'-GAC TGC GAT CCA ATT CGT C-3'	M-AC , E-46
5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT-3'/5'-GAC TGC GAT CCA ATT CGTC-3'	M-CT , E-TC
5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC-3'/5'-GAC TGC GAT CCA ATT CTA T-3'	M-AC , E-TAT
5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT-3'/5'-GAC TGC GAT CCA ATT CTA T-3'	M-CT , E-TAT
5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC-3'/5'-GAC TGC GAT CCA ATT CGT T-3'	M-AC , E-GTT
5'-GAT GAG TCC TGA GTA AGA-3'/5'-GAC TGC GAT CCA ATT CGT-3'	M-GA, E-GT
5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT-3'/5'-GAC TGC GAT CCA ATT CGT T-3'	M-CT , E-GTT
5'-GAT GAG TCC TGA GTA AGA-3'/5'-GAC TGC GAT CCA ATT CTA T-3'	M-GA , E-TAT
5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT-3'/5'-GAC TGC GAT CCA ATT CGT-3'	M-CT , E-GT
/5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC-3'/5'-GAC TGC GAT CCA ATT CGAC-3'	M-AC , E-GAC

باندهایی که در تیمارهای سالم و آلوده متفاوت بودند از روی ژل انتخاب گردیده و پس از جداسازی از روی ژل خالص سازی گردیدند (Bachem *et al.*, 1996). به منظور تکثیر نواحی TDFs[1]، واکنش PCR با استفاده از قطعات خالص شده فوق به عنوان قالب DNA و ترکیب پرایمری مربوطه مجدداً صورت پذیرفت (Bachem *et al.*, 1996).

۸- آنالیز توالی‌ها: جهت بررسی ترادف قطعات بدست آمده، فرآورده حاصل از واکنش PCR به طور مستقیم به شرکت فزاپژوه ارسال شد. ارزیابی نتایج تعیین توالی با مقایسه توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) به کمک نرم افزار nucleotide blast، blastx و tblastx انجام گرفت. درصد تشابه هر TDF با سایر اطلاعات موجود در بانک ژن مشخص گردید. برای تأیید نتایج ارزیابی cDNA-AFLP از روی TDF شماره ۶۳ پرایمرهای '63F:5'CCATTGCAGGGATTCATCTT3 و '63R:5'TACGTATCGAACGCAAACCA3 با استفاده از نرم افزار الیگو طراحی شد و به روش Semiquantitive RT-PCR بیان کمی آن ارزیابی شد (Sperisen *et al.*, 1992).

نتیجه و بحث

مایه زنی نهال‌های سلطان مرکبات و جداسازی RNA کل از گیاه:

نتایج انتقال بیماری توسط پیوند از گیاهان آلوده به نهال‌های نارنگی مشخص نمود که علایم بیماری چهار ماه پس از مایه‌زنی در برگ‌ها نمایان می‌شود. این در حالی بود که در طول این زمان گیاهان مایه زنی شده سلطان مرکبات هیچگونه علائمی نشان ندادند. ارزیابی کیفی RNA استخراج شده در ژل آگاروز ۱/۲ درصد حاکی از کیفیت مناسب RNA استخراج شده با روش CTAB می‌باشد (شکل ۱). میزان جذب نوری نمونه RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر بیانگر کمیت RNA می‌باشد (جدول ۲).

cDNA-AFLP: در مجموع ۲۶ قطعه از نسخه‌های ژنی از آنالیز cDNA-AFLP در برگ سلطان مرکبات مورد مطالعه به دست آمد که در گیاهان سالم در مقایسه با گیاهان آلوده بیان متفاوتی داشتند (شکل ۲). اندازه این قطعات بین ۲۵۰-۵۰۰ جفت باز تخمین زده شد. بررسی توالی‌های پروتئینی مربوط به این قطعات نشان می‌دهد که توالی ۱۶ قطعه شبیه به نسخه‌های میزبان و پنج قطعه شبیه به پروتئین‌های باکتری می‌باشد. توالی چهار قطعه دیگر با

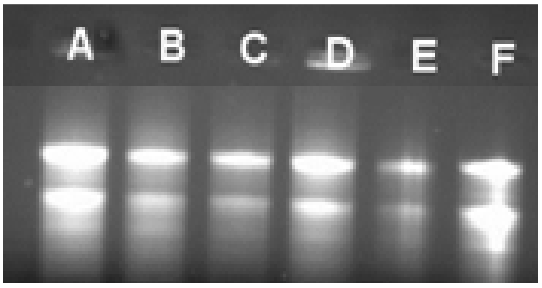
۱- Transcript derived fragments

توالی‌های ثبت شده در بانک‌های اطلاعاتی شباهتی نداشتند.

جدول ۲- ارزیابی نمونه‌ها با دستگاه نانودراپ

Table 2. RNA Samples assay by nanodrop

260/230	260/280	Concentration (ng/µl)	RNA Sample
2/31	2/03	354/4	*Citrus grandis* healthy 1
2/38	2/05	238	*Citrus grandis* healthy 2
2/34	2/06	198/6	*Citrus grandis* infected 1
2/21	2/04	347/9	*Citrus grandis* infected 2
2/27	2/06	343/7	*Citrus grandis* infected 3
2/43	2/01	134/3	*Citrus grandis* infected 4



شکل ۱- الگوی الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲ ٪ نمونه‌های RNA استخراج شده از سلطان مرکبات، چاهک‌های A,B نمونه‌های سالم سلطان مرکبات و چاهک‌های C-F مربوط به نمونه‌های مایه‌زنی با عامل میوه سبز مرکبات است.

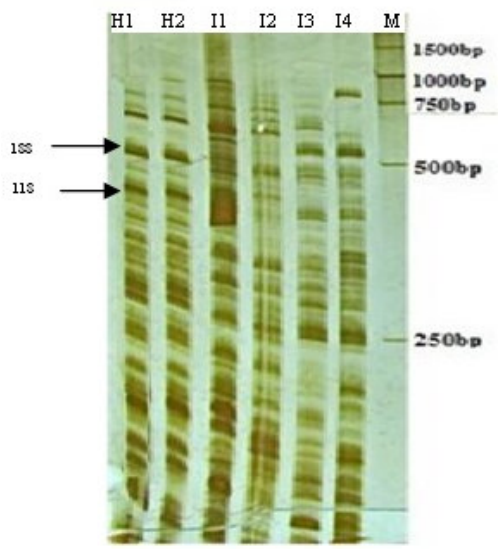
Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of RNA samples of *C. Grandis* infected by *Candidatus* Leiberibacter asiaticus (C-F) and healthy plants (A-B).

جدول ۳- مشابهت توالی TDFs با سایر توالی‌های شناسایی شده در پایگاه داده NCBI

Table 3. Homologies of TDFs to sequences in the databases

TDF	Accetion number	Length(bp)	I/R[1]	Annotation	Evalue
				Stress respones/defenses	
17	JZ775571	349	I	*Populus trichocarpa* chorismate synthase (CS2),	2e-47
33	JZ775574	606	I	*Ricinus communis* UDP-glucosyltransferase, putative,	1e-17
89	JZ775578	324	I	*Vitis vinifera* probable methyltransferase PMT9-like	1e-10
119	JZ775572	462	I	*Arabidopsis thaliana* BI1-like protein (AT4G15470) mRNA	3e-04
				transporte	
712	JZ775577	367	I	*Arabidopsis thaliana* Vps51/Vps67 family (components of vesicular transport) protein (AT1G10385)	9e-32
63	JZ775576	549	I	*Ricinus communis* auxin:hydrogen symporter, putative, mRNA	1e-32
				Protein synthesis destination	
118		345	R	*Decumaria barbara* 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	8e-23
220		332	I	*Dirachma socotrana* 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	1e-163
46		216	R	*Opuntia* sp. MCCPL-2012 cultivar Palma redonda clone 31 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3e-39
413		211	R	*Astragalus sieversianus* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1e-24
188		562	R	*Cymbomonas tetramitiformis* 18S rRNA gene	2e-05
				Photosynthesis	
613	JZ775602	286	I	*Ilex cornuta voucher* FLAS:M.J. Moore 308 ATP synthase	8e-26
611	JZ775600	456	I	*Citrus sinensis* chloroplast,	5e-06
				Cell metabolism	
51	JZ775575	196	I	*Solanum tuberosum* phosphoglycerate mutase	7e-21
				Pathogen related TDFs	
31	JZ775574	379	I	Uncultured bacterium clone TZ39 16S ribosomal RNA	2e-13
34	JZ775584	304	I	Uncultured bacterium clone DB-D11 16S ribosomal RNA	2e-37
37		342	R	Uncultured bacterium clone DB-D11 16S ribosomal RNA	3e-29
				Unknown function	
32	JZ775574	361	I	*Ricinus communis* UDP-glucosyltransferase, putative,	0.34
39	JZ775581	178	I	*Thielavia terrestris* NRRL 8126 glycoside hydrolase family 32	0.020
612	JZ775602	245	I	*Rhodopseudomonas palustris* DX-1, complete genome	0.77
222	JZ775580	216	R	*	2.3
12	JZ775570	220	R	*	
18	JZ775579	350	I	*	
223	JZ775573	250	R	*	

1- Induced/ reduced; *No similarity find in databases.



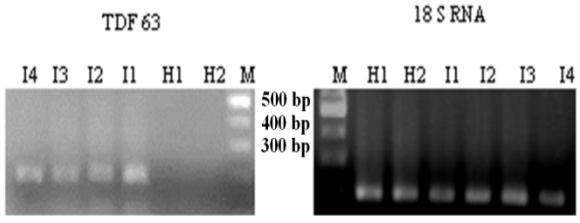
شکل ۲- نتایج حاصل از الکتروفورزCDNA-AFLP با ترکیب پرایمری EGAC-MCG برروی ژل پلی آکریل آمید. ردیف‌های H1-H2 مربوط به نمونه‌های سالم، ردیف‌های I1_I4 مربوط به نمونه‌های آلوده و M سایز مارکر می‌باشد. فلش‌ها نشان دهنده‌ی پلی مورف شماره ۱۱۸ و ۱۸۸ می‌باشد.

Fig. 2. Representative results of polyacrylamide gel of cDNA-AFLPs generated by the primer; combinations EGAC-MCG. Wells H1-H2, I1-I4and M present non-infected, infected and 100 bp DNA size marker, respectively. Arrows represents a differentially expressed transcript-derived fragments (DE-TDFs) 118 and 188

از تعداد ۲٦ قطعه ارسال شده برای توالی یابی، حدوداً ۲۰٪ مربوط به Stress Responses/Defenses، ۹٪ مربوط به Transporter، ۲۰٪ مربوط به Protein Synthesis Destination، ۱۳٪ مربوط به Photosynthesis and Energy، ۵٪ مربوط به Cell Wall، ۵٪ مربوط به Cell Metabolism، ۲۰ ٪ مربوط به Pathogen Related TDF و ۸٪ با عملکرد نامعلوم می‌باشند.

نتایج ارزیابی کمی رونوشت ٦۳ به روش Semiquantitive RT-PCR تأیید کننده نتایج CDNA-AFLP می‌باشد و افزایش بیان این رونوشت را در نمونه‌های سلطان مرکبات مایه زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات نشان می‌دهد (شکل ۳).

۱- رونوشت مشابه با ژن ناقل‌های اکسینی: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که رونوشت ٦۳ (جدول ۳) که مشابه به ژن ناقل‌های اکسینی می‌باشد در گیاهان سلطان مرکبات مایه زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات افزایش بیان داشته‌اند. نتایج ارزیابی به روش نیمه کمی (Semiquantitative PCR) نیز این داده‌ها را تأیید می‌کند (شکل ۳). یکی از مهم‌ترین سیستم‌های انتقالی درون گیاه، حامل‌های انتقال اکسین می‌باشند. یکی از نقش‌های فیتوهورمون اکسین در برهمکنش میزبان – پاتوژن تنظیم پاسخ‌های دفاعی میزبان است. سطح درونی ایندول-۳- استیک اسید به صورت طبیعی در گیاه در حد پایینی قرار دارد و پس از بروز زخم و ایجاد آلودگی برای محدود کردن آلودگی افزایش می‌یابد (Mayda *et al*., 2000). نقش فعل و انفعالات اکسینی در واکنش دفاعی گیاه به عوامل بیماری‌زای باکتریایی مطالعه شده است به عنوان مثال دفاع گیاه در برابر عوامل بیماری‌زایی مانند *Pseudomonas syringae* یا *Alternaria brassicicola* که وابسته به اتیلن می‌باشد تحت تأثیر فیتوآلکسین‌هایی مانند Camalexin قرار می‌گیرد (Chaouch *et al*., 2010). علاوه بر این، سرکوب سیستم‌های انتقالی اکسینی باعث جلوگیری از فعالیت SA، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و فیتوآلکسین‌هایی مانند Camalexin می‌گردد (Robert *et al*., 2011). لذا به نظر می‌رسد در سلطان مرکبات مایه‌زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات نیز از طریق مکانیسم‌های مشابه فوق در مقابل پاتوژن عامل میوه سبز مرکبات مقاومت نموده و افزایش بیان رونوشت ٦۳ (جدول ۳) در راستای تنظیم غیر مستقیم واکنش‌های دفاعی گیاه میزبان بوده است.



شکل ۳- عکس ژل‌های آگارز فرآورده‌های Semiquantitive PCR ، I1-I4 مربوط به نمونه‌های آلوده و H1-H2 مربوط به نمونه‌های سالم است.

Fig. 3 .Agarose gel electerophoresis of Semiquantitive PCR products, Lane I1-I4 related to infected samples and Lane H1-H2 related to healthy ones.

۲- رونوشت شبیه به Chorismate Synthase: نتایج نشان داد که بیان رونوشت ۱۷ (جدول ۳) که شبیه ژن Chorismate Synthase در گیاهان مایه‌زنی شده سلطان مرکبات با عامل میوه سبز مرکبات در مقایسه با گیاهان سالم افزایش بیان داشته‌اند. مسیر Shikimate که در باکتری‌ها، مخمرها وسلول‌های گیاهی شناسایی شده است منجر به سنتز اسید Chorismic شده که نقش اساسی در تولید ترکیبات معطر، اسیدهای آمینه فنیل آلانین و تیروزین، مشتقات ایندول و تریپتوفان، Dihydroxybenzoic Acid (DHB)، که برای بیوسنتز انتروباکتین استفاده می‌شود، بسیاری از آلکالوئیدها وهورمون‌های گیاهی مانند اسید سالیسیلیک دارد (Giles, 1978; Pittard, 1987; Wildermuth *et al*., 2001). سالیسیلیک اسید همچنین نقش مهمی در مقاومت بر علیه پاتوژن‌ها ایفا نموده (Van Huijsduijnen *et al*., 1986) که شامل ایجاد مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR)[1] می‌باشد و در زمان حمله پاتوژن در یک بخش از گیاه باعث مقاومت در بخش‌های دیگر گیاه می‌گردد (Taiz and Zeiger, 2002). یکی از نقش‌های ژن Chorismate Synthase در برهمکنش میزبان – پاتوژن تنظیم پاسخ‌های دفاعی میزبان است (Van Huijsduijnen *et al*., 1986) که ممکن است چنین نقشی را در سلطان مرکبات داشته باشد که اثبات آن نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.

۳- رونوشت شبیه به ژن NADH dehydrogenase: نتایج نشان داد که رونوشت ۳۷ (جدول ۳) که شبیه به NADH dehydrogenase می‌باشد در گیاهان سلطان مرکبات مایه‌زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات نسبت به گیاهان سالم افزایش بیان داشته‌اند. NADH دهیدروژناز (که به عنوان Ubiquinone Reductase و یا کمپلکس ۱ در غشا میتوکندری مطرح می‌باشد) یک آنزیم واقع در غشای داخلی میتوکندری است که انتقال الکترون از NADH به کوآنزیم Q (COQ) را کاتالیز می‌نماید و به عنوان یکی از آنزیم‌های ورودی مهم در فرآیند فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری می‌باشد (Nakamaru-Ogiso *et al*., 2010). مشتقات NADH به عنوان یک عامل مهم شرکت کننده در فرآیندهای انتقال الکترون در غشاهای سلولی جهت تولید انرژی عمل می‌نمایند. NADH موجب به افزایش تولید ATP، به عنوان مهم‌ترین منبع تولید انرژی سلولی می‌باشد، می‌گردد. افزایش تولید ATP به نوبه خود تولید انرژی سلولی می‌شود (Grivennikova *et al*., 2007). تولید انرژی با تأثیر بر سوخت و ساز کلی گیاه عامل کلیدی برای نگهداری گیاه در شرایط تنشی مختلف می‌باشد (Federico *et al*., 2012). گیاه سلطان مرکبات، گیاهی نسبتاً مقاوم در برابر بیماری میوه سبز مرکبات می‌باشد (Ute and Kim, 2008; Chang *et al*., 1993) و به انرژی بیشتری در مقابل گیاهان سالم برای دفاع از گیاه در برابر پاتوژن نیازمند است. بنابراین به نظر می‌رسد افزایش بیان رونوشت ۳۷ در راستای تأمین انرژی مورد نیاز برای ایجاد مقاومت در گیاه سلطان مرکبات مایه زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات باشد.

٤- رونوشت شبیه به ژن UDP-Glucosyltransferase : بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیان دو رونوشت ۳۲ و ۳۳ (جدول ۳) که شبیه به ژن‌هایGlucosyltransferase است در گیاهان مایه‌زنی شده سلطان مرکبات با عامل میوه سبز مرکبات نسبت به گیاهان سالم افزایش یافته است. یکی از ژن‌های مهم دخیل در مسیرهای متابولیکی و سلولی Glucosyltransferase می‌باشد. این آنزیم یکی از مهم‌ترین اجزا دخیل در دفاع سلولی در برابر استرس‌های محیطی و زیستی می‌باشد. (UGT) UDP-glycosyltransferases نقش مهمی در ساخت متابولیت‌های ثانویه گیاه و مواجهه با استرس‌های محیطی و یا پاسخ‌های مناسب بر علیه پاتوژن‌ها بر عهده دارند (Albrecht, 2012). همچنین نقش این ژن در مقاومت آرابیدوپسیس به *Pseudomonas syringae* pv *tomato* ثابت شده است (Langlois-Meurinne, 2005). لذا به نظر می‌رسد در سلطان مرکبات مایه زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات که در مقابل پاتوژن عامل میوه سبز مرکبات مقاومت نموده، افزایش

۱- systemic acquired resistance

بیان این رونوشت در راستای تنظیم غیر مستقیم واکنش‌های دفاعی گیاه میزبان بوده است. این نظریه نیاز به بررسی‌های جامع‌تر دارد.

۵- رونوشت شبیه به ATP Synthase : بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیان رونوشت ٦١٣ (جدول ۳) که شبیه به ژن‌های ATP Synthase است در گیاهان مایه زنی شده سلطان مرکبات با عامل میوه سبز مرکبات نسبت به گیاهان سالم افزایش یافته است. ATP Synthase آنزیمی است که می تواند ATP را از ADP و فسفات سنتز کند. این آنزیم در میتوکندری و کلروپلاست هر دو حضور دارد. مهار ATP می‌تواند به عنوان مکانیسم احتمالی بیماری‌زایی در گیاه باشد (Federico *et al*., 2012). افزایش بیان رونوشت ٦١٣در گیاهان سلطان مرکبات ٤ ماه پس از مایه‌زنی با عامل میوه سبز مرکبات که هنوز علائم بیماری را بروز نداده‌اند، می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت‌های متابولیسمی و دفاعی گیاه باشد.گیاه برای مقابله با عامل بیماری‌زا مکانیسم‌های متنوعی را فعال می‌نماید تا به مقابله با عامل بیماری‌زا بپردازد. فعال کردن این مکانیسم‌ها مستلزم سنتز و به کارگیری ATP بیشتر در سطح گیاه می‌باشد که در نتیجه منجر به افزایش بیان ژن‌های دخیل در سنتز ATP می‌گردند (Federico *et al*., 2012).

٦- رونوشت شبیه به Glycoside Hydrolase: بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیان رونوشت ۳۹ (جدول ۳) که شبیه به ژن‌های Glycoside Hydrolase است. در گیاهان مایه زنی شده سلطان مرکبات با عامل میوه سبز مرکبات نسبت به گیاهان سالم افزایش یافته است. در گیاهان آنزیم Glycoside Hydrolase یکی از آنزیم‌های اصلی کنترل کننده متابولیسم نشاسته می‌باشد (Wang *et al*., 2009). در گیاهان این آنزیم‌ها در فرآیندهای مختلف و متنوعی درگیر هستند که شامل متابولیسم نشاسته، دفاع در برابر پاتوژن‌ها و بازیابی دیواره سلولی می‌باشد (Minic and Jouanin, 2006). افزایش بیان رونوشت ۳۹ در گیاهان سلطان مرکبات ممکن است در راستای دفاع فیزیکی گیاه در برابر گسترش پاتوژن عامل میوه سبز مرکبات باشد.برای تأیید این موضوع پیشنهاد می‌گردد مطالعات هیستوپاتولوژیکی بر روی نمونه‌های مورد مطالعه انجام پذیرد.

۷- رونوشت‌های شبیه به ژن‌های ریبوزومی گیاه: رونوشت‌های ۲۲۰، ٤٦، ٤١٣ و ۸۸ شبیه ژن‌های SrRNA ۱۸ بودند که بیانشان در گیاهان سلطان مرکبات مایه زنی شده با Las افزایش نشان می‌دهد ولی رونوشت ۱۱۸در این گیاهان بیانش کاهش یافته بود. واکنش به تنش‌ها مرتبط با مکانیسم‌های محافظتی سلول‌ها است که در برخی موارد توسط سنتز پروتئین بروز می‌یابد. افزایش سنتز پروتئین‌ها که در شرایط تنش اتفاق می‌افتد برای انطباق موجود با شرایط است. ژنوم موجود در برابر تنش‌ها پایدار است، اما ترانس-کریپتوم (جمعیت mRNA) و پروتئوم (جمعیت پروتئین) در طول توسعه تنش زیستی و غیر زیستی تغییر می‌کند (Kosakivskaet *et al*., 2008). بنابراین در هنگام تنش گیاهان واکنش‌های متفاوتی در سطح پروتئوم از خود بروز می‌دهند و در برخی موارد سنتز پروتئین در گیاه افزایش می‌یابد، پس ممکن است که با توجه به تنش زیستی که به سلطان مرکبات در واکنش به آلودگی با عامل میوه سبز مرکبات وارد شده است، گیاه برای مقابله با عامل بیماری، پروتئین‌سازی را افزایش داده است در نتیجه تغییر در بیان ژن‌های rRNA می‌توانسته است در این راستا بوده باشد (Kosakivskaet *et al*., 2008).

۸- رونوشت شبیه به Methyltransferase : بر اساس نتایج حاصل از این بررسی بیان رونوشت ۸۹ (جدول ۳) در گیاهان مایه زنی شده سلطان مرکبات با عامل میوه سبز مرکبات نسبت به گیاهان سالم افزایش یافته است.آنزیم Methyltransferase که به عنوان آنزیم Methylase نیز شناخته شده است یک نوع آنزیم ترانسفراز است که انتقال گروه متیل از یک دهنده به یک پذیرنده را بر عهده دارد. متیلاسیون اغلب در بخش نوکلئیک در ساختار DNA یا اسیدهای آمینه در ساختار پروتئین رخ می‌دهد. Methytransferases یک گروه

متیل واکنشی را به گوگرد در S-آدنوزیل متیونین (SAM) متصل می نمایند (Li *et al*., 1992). این آنزیم فعالیت‌های مختلفی را در سلول بر عهده دارد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که در گیاهان متیل سالیسیلات از سالیسیک اسید توسط آنزیم Methyltransferases سنتز می‌شود. متیل سالیسیلات نقش بسیار مهمی در دفاع برابر آفات و پاتوژن‌ها بر عهده دارد (Liu *et al*., 2010). بسیاری از MESA که پس از حمله پاتوژن‌ها تجمع می‌یابند توسط benzoic acid/SA carboxyl methyltransferase 1 (Atbsmt1) سنتز می‌شوند. با توجه به نقش‌های مختلف این آنزیم در سلول ارتباط افزایش بیان این آنزیم در گیاه سلطان مرکبات مایه‌زنی شده با عامل بیماری میوه سبز مرکبات باید بیشتر بررسی شود.

۹- رونوشت‌های مربوط به پاتوژن[1]: بر اساس نتایج حاصل از این بررسی بیان رونوشت‌های ۳۱، ۳٤، ۳۷ (جدول ۳) در گیاهان مایه زنی شده سلطان مرکبات با عامل میوه سبز مرکبات نسبت به گیاهان سالم افزایش یافته است و رونوشت ۲۲۲ در گیاهان مایه‌زنی شده سلطان مرکبات با عامل میوه سبز مرکبات نسبت به گیاهان سالم کاهش یافته است. افزایش بیان ژن‌های میزبان به نظر می‌رسد در فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی از میزبان که منجر به رسوب کالوس در بافت آبکش می‌گردد مؤثر می‌باشد (Wang *et al*., 2009). این امر نشان می‌دهد پاتوژن در گیاه فعال است ولی مکانیسم‌های مقاومتی گیاه مانع از بروز علایم و بیماری‌زایی پاتوژن شده است.

۱۰- رونوشت شبیه به پروتئین BI-1[2]: بر اساس نتایج حاصل از این بررسی بیان رونوشت ۱۱۹ (جدول ۳) در گیاهان مایه‌زنی شده سلطان مرکبات با عامل میوه سبز مرکبات نسبت به گیاهان سالم افزایش یافته است. تنظیم مرگ سلولی، مرتبط با سیستم‌های دفاع گیاهان در مقابله با پاتوژن‌ها می‌باشد. نقش BI-1 در مرگ برنامه ریزی شده سلولی (PCD) ناشی از تنش‌های زیستی و غیر زیستی در گیاهان است که معمولاً با تغییر در وضعیت نقل و انتقالات سلولی و سطح کلسیم سیتوپلاسمی ایفای نقش می‌نماید (Ralph *et al*., 2002). با توجه به اینکه واکنش فوق حساسیت در گیاهان مشاهده نشد ارتباط و نقش افزایش بیان این پروتئین در گیاه سلطان مرکبات مایه‌زنی شده باید بیشتر بررسی شود.

۱۱- رونوشت شبیه به Vps51/Vps67 family[3]: بر اساس نتایج حاصل از این بررسی بیان رونوشت ۷۱۲ (جدول ۳) در گیاهان مایه زنی شده سلطان مرکبات با عامل میوه سبز مرکبات نسبت به گیاهان سالم افزایش یافته است. وظیفه اصلی این خانواده حمل و نقل و انتقال از ابتدا و انتهای اندوزوم‌ها به سمت گلژی می‌باشد. خانواده Vps51 به عنوان یکی از مهم‌ترین ترکیبات درگیر در نقل و انتقالات آوندی در گیاه مطرح می‌باشد (Siniossoglou *et al*., 2002). با توجه به آوندی بودن زیستگاه پاتوژن باید تأثیر افزایش بیان این ترکیبات در برهمکنش سلطان مرکبات یا پاتوژن عامل میوه سبز مرکبات بیشتر بررسی شود.

۱۲- رونوشت‌های با عملکرد نامعلوم: بر اساس نتایج حاصل از این بررسی بیان رونوشت‌های ۱۲، ۱۸، ۲۲۳ (جدول ۳) در گیاهان مایه زنی شده سلطان مرکبات با عامل میوه سبز مرکبات به صورت نامعلوم می‌باشد. این ژن‌ها (رونوشت‌ها) ممکن است مربوط به ژن‌هایی باشند که در بیماری‌زایی دخیل هستند و یا ژن‌های مربوط به پاتوژن باشند و یا در واکنش حساسیت یا تحمل گیاه نقش دارند. تعیین نقش دقیق هر کدام از این رونوشت‌ها در برهمکنش سلطان مرکبات با عامل بیماری میوه سبز مرکبات نیاز به بررسی تکمیلی دارد.

آزمایشات به خوبی نشان داد که تفاوت آشکاری میان الگوی بیان ژن در گیاه سلطان مرکبات مایه زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات پس از مدت چهار ماه ایجاد گردید.پس از گذشت این زمان و با تعیین توالی ۲۵ قطعه رونوشتی، نتایج خوبی به دست آمد. افزایش بیان این ژن‌ها در ارتباط با

۱- Pathogen related TDF

۲- Inhibitor BAX

۳- Vacoular protein sorting

واکنش‌های مقاومت القایی در گیاه می‌باشد. بر عکس ژن‌هایی که بیان آن‌ها در سلول‌های مایه‌زنی شده کاهش یافته بود، متعلق به پروتئین‌های باکتری پاتوژن بود. یکی از کمبودهای موجود برای مطالعه برهمکنش سلطان مرکبات مایه‌زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات عدم وجود اطلاعات کامل ژنومی برای میزبان می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیان اغلب توالی‌های ژنی به دست آمده در طی پروسه آلودگی افزایش داشته است. تعدادی از توالی‌های ژنی که بیانشان در طی برهمکنش سلطان مرکبات مایه زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات تغییر کرد، به صورت عمومی در واکنش گیاهان با سایر تنش‌های زیستی و غیر زیستی نیز تغییر می‌نماید. در مقابل تعدادی از پلیمورف‌های مشاهده شده در این بررسی که شباهت با ژن‌های BI-1 دارند، احتمالاً نقش اختصاصی در این برهمکنش به عهده دارند. تعدادی از توالی‌های ژنی که در این مطالعه به دست آمده است، شباهتی با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن نداشتند و این احتمال وجود دارد که در تعامل نیمه سازگار برهمکنش سلطان مرکبات مایه‌زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات درگیر باشند. این بررسی تنها تعدادی از حلقه‌های گم شده برهمکنش سلطان مرکبات مایه زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات را نمایان نموده است و برای مشخص شدن چرخه کامل بیماری‌زایی این پاتوژن هنوز مطالعات زیادی باید انجام شود. بنابر اطلاعات ما این مطالعه اولین بررسی بر روی تغییرات بیان ژن‌های سلطان مرکبات و *Candidatus* Leiberibacter asiaticus است که در طی بیماری اتفاق می‌افتد. این نتایج می‌تواند به پیشرفت اطلاعات مولکولی مربوط به روند بیماری و شناسایی ژن‌های دخیل در آن کمک نماید.

References

AKHTAR, M. A. and I. AHMAD, 1999. Incidence of citrus greening disease in Pakistan. Pakistan Journal of Phytopathology. 11: 1–5

ALBRECHT, U. and D. BOWMAN, 2012. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with Candidatus Liberibacter asiaticus. Plant Science. 1: 185–186.

BACHEM, C., R. HOEVEN, S. BRUIJN, D. VREUGDENHIL, M. ZABEAU and R. VISSER, 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during Potato tuber development. The Plant Journal, 9:745-753.

BOVE, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology, 88: 7-37.

CHRISTIAN, W. B., J. RONALD and G. F. V. RICHARD, 1998. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. Plant Molecular Biology Report, 16: 157–173.

ChUNG, T. and A. SCOTT, 2009. Standard operating procedure hazardous chemicals (CTAB RNA Extraction Method). Divison Life Sciences Building, Lab B310.

FEDRICO, M., L. U. SANDRA, A. UTE, L. RUSSELL, L. MY, B. MONICA, B. VINCENT, F. JOSEPH, L. ELIZABETH, Z. WEIXEIXIANG, L. DAWEI, D. RAISSA, E. CEISTINA, D. KIM and M. ABHAYA, 2012. Transcriptome Profiling of Citrus Fruit Response to Huanglongbing Disease. PLoS ONE. 7 (5): e38039

FOTOHI GHAZVINI, R. and J. FATAHI MOGHADDAM, 2005. Citrus growing in Iran. Second Edition, Gilan University Publication.

FRANCESCA, D., V. CARLO, M. ALESSIO, B. MARCO and G. LUCIANA, 2005. Improvement of the cDNA-AFLP method using fluorescent primers for transcription analysis in bacteria. Journal of Microbiological Methods, 63:211 – 215.

GARNIER, M., G. MARTIN-GROS and J. M. BOVEH, 1987. Monoclonal antibodies against the bacteria–like

organism associated with citrus greening disease. Annales de 1'Institut Pasteur Microbiology. 138: 639–650.

GILS, N. H. 1978. The organisation, function and evolution of gene clusters in eukaryotes. American Naturalist,112: 641-657.

HIDEO, M., R. STEFANIE, I. AKIKO, S. HIROMASA, K. SOPHIEN, W. PETER, K.GUNTER, R. MONIKA, H. DETLEV and T. RYOHEI, 2003. Gene expression analysis of plant host–pathogen interactions by Super SAGE. PNAS. 100 (26): 15718–15723.

LANGLOIS-Meurinne M., C. M. M.GACHON and P. SAINDRENAN, 2005. Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes UGT73B3 and UGT73B5 is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in Arabidopsis. Plant Physiology, 139: 1890–1901.

LI, E., T. BESTOR and R. JAENISCH, 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell, 69 (6): 915–26.

LIEVENS, S., G. SOFIE and H. MARCELLE, 2001. A critical evaluation. Nucleic acids research, 29 (17): 3459-3468.

LIU, P., Y. YANG, E. PICHERSKY and D. F. KLESSIG, 2010. Altering expression of benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase 1 compromises systemic acquired resistance and PAMP-triggered immunity in Arabidopsis. Molecular Plant Microbe Interactions, 23(1): 82-90.

MARNIK, V., D. P. JOHAN, J. V. E. MICHIEL, 2007. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. Nature Protocools, 2 (6): 1399 – 1413.

MAYDA, E., B. MAUCH-MANI, P. VERA, 2000. Arabidopsis dth9 mutation identifies a gene involved in regulating disease susceptibility without affecting salicylic acid-dependent responses. Plant Cell, 12: 2119-2128.

MAYDA, E., C. MARQUES, V. CONEJERO and P. VERA, 2000. Expression of a pathogen- induced gene can be mimicked by auxin insensitivity. Mollecular Plant Microbe Interactions, 13(1):23-31.

MINIC, Z. and L. JOUANIN, 2006. Plant glycoside hydrolases involved in cell polysaccharide degradation wall. Plant Physiology and Biochemistry, 44(7-9): 435-49.

MOODY, D. E., 2001. Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression.American Society of Animal Science. 79: E128–E135

NAKAMARU-OGISO, E., H. HAN, A. MATSUNO-YAGI, E. KEINAN, S. SINHA, T. YAGI and T. OHNISHI, 2010. The ND2 subunit is labeled by a photoaffinity analogue of asimicin, a potent complex I inhibitor. FEBS Letters. 584 (5): 883–8.

RYAN, M. F., R. JEFFREY, Y. TAKUMI, LI-LI, B. JOSHUA, E. J. KATHRINE, D. TUDOR, V. J. RODERICK and R. G. STEVEN, 2002. Global Analysis of Gene Expression: Methods, Interpretation, and Pitfalls. Exprimental Nephrology, 10:64–74

SALEHI, M., M. FAGHIHI, A. BAGHERI, M. ZAKERI and K. IZADPANAH, 2010. Further studies on citrus huanglongbing disease in Southern Iran. In proceeding of 19th Iranian plant protection congres, 31 July- 3 August, IRIPP, Tehran. P: 473.

SALEHI, M., M. FAGHIHI, R. KHANCHEH, A. BAGHERI and K. IZADPANAH, 2012. Distribiution of citrus huanglongbing disease and its vector in southern Iran. Iranian journal of plant pathology. 48 (2): 195-208.

SINDHUJA, S. and R. EHSANI, 2010. Mid-infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing (greening) in citrus leaves. Talanta. 83: 574–581.

SPERISEN, P., S. M. WANG, P. REICHENBACH and M. NABHOLZ, 1992. A PCR-based assay for reporter gene expression. PCR Methods Appllications, 1:164–170.

TAIZ, L. and E. ZEIGER, 2002. Plant Physiology. Third Edition, page 306.

UTE, A. and D. B. KIM, 2008. Gene expression in *Citrus*

sinensis (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus* Liberibacter asiaticus causing Huanglongbing in Florida. Plant Science, 175: 291–306

UTE, A. and D. KIM, 2012. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus* Liberibacter asiaticus. Plant Science, 185: 118–130.

Van DER MERWE A. J. and F. G. ANDERSEN, 1937, Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? Farming South Africa Magazin, 12: 439-440.

Van HUIJSDUIJNEN, R. A., S. W. ALBAS, R. H. DE RIJK and J. F. BOL, 1986. Induction by Salicylic Acid of Pathogenesis-related Proteins and Resistance to Alfalfa Mosaic Virus Infection in Various Plant Species. Journal of General Virology, 67 (10): 2135.

VANLOON, L. C. and E. STRLEN, 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiologycal and Molecullar Plant Pathology, 55: 85-97.

WILDERMUTH, M. C., J. DEWDNEY, G. WU and F. M. AUSUBEL, 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature. 414 (6863): 562–5.

ZHAO, X. 1981. Citrus yellow shoot disease (huang-longbing) in China- a review. Procceeding of International Society Citriculture Conference, 1: 466-469.