

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

Fatemeh Derikvand¹, Eidi Bazgir^{2,*}, Mostafa Darvishnia³ and Hossein Mirzaei Najafgholi⁴

1- Ph.D. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

3- Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

4- Assistante Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding author ✉: bazgir.ei@lu.ac.ir

Citation: 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. <http://dx.doi.org/10.22034/pgr.10.1.2>

(Received: June 20, 2023; Final Revised: September 05, 2023; Accepted: September 13, 2023; Published online: September 21, 2023)

Extended abstract

Introduction

Apple is one of the most important economic products of Iran and the world. Apple brown rot disease (*Monilinia laxa*) is one of the important diseases that cause yield reduction in pre-harvest and post-harvest stages. Increasing the activity of defense enzymes, including antioxidant enzymes such as peroxidase and catalase, is an approach to enhance apple defense system. Increasing the activity of antioxidant enzymes can reduce the excessive amount of malondialdehyde (MDA) produced by plants under stress, thereby maintaining the stability of the cell membrane and increasing the plant's tolerance to stress. Proline is a protective amino acid maintaining cell membranes and plant enzymes that regulates the osmotic balance of the cytoplasm. Many genes are activated or deactivated upon plant's response to the pathogen, and their expression may also increase or decrease following infections. Therefore, it is necessary to study and track the level of gene expression during biotic stresses, especially defense genes that play an important role in response to stress response. The aim of the present research was to show how genes respond to biotic stress.

Materials and methods

Golden Delicious apples were used in this study. The contents of hydrogen peroxide, malondialdehyde and proline were measured. Some defense related compounds of apple fruit, including peroxidase and catalase enzymes, was recorded following *M. laxa* inoculation. Extraction and measurement of peroxidase and catalase enzymes were done on days 0, 3, 6, 9, and 12 days after inoculation. Also, the changes in the expression of PR1 and PR8 genes in response to brown rot pathogen was studied at 12, 24, 48 and 96 hours post inoculation.

Results and discussion

The inoculation of *M. laxa* greatly increased the level of H₂O₂. The amount of H₂O₂ was increased from day 6 and reached its highest level of 31.45 μmolg-1FW on day 12. MDA content increased strongly on day 9, and



©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.

reached a peak of 5.44 mg g-1FW on day 12. Inoculation with *M. laxa* increased the permeability of apple fruit cell membranes. Inoculation of *M. laxa* also strongly increased the proline level at day 6. The activities of two enzymes, catalase and peroxidase, were significantly changed in the tissue of the control fruit compared to the fruits infected with *M. laxa*. In examining the activity of peroxidase and catalase enzymes, a similar trend was observed for these enzymes. Compared to the control, inoculation with the pathogen caused a significant increase in POD activity on day 3, which reached its highest level on day 3 (48.17 U/mg protein min) and then began to decrease rapidly. CAT activity also showed the same trend. After inoculation, CAT activity increased significantly and peaked on day 3 (37.12 U/mg protein min) and then decreased rapidly. The results of analysis of variance of resistance genes expression at different time points were significant. After 48 hours, the expression of PR1 and PR8 genes was observed to be the highest compared to the control. The expression of PR1 and PR8 genes was observed to be 3 and 8 times higher than the control, respectively.

Conclusion

The cell wall is the first barrier to *M. laxa* invasion, i.e., the mechanical strength of the apple cell wall is crucial to protect apple fruit from pathogenic fungi infections. ROS production is an important signal of the apple immune response, which can improve the defense ability through the mechanism of ROS production and scavenging. Expression of PR-associated proteins also directly improves resistance to pathogens. Results of present study showed that a series of defense reactions against *M. laxa* were induced during infection in Golden Delicious apple fruits, including increasing in defense-related enzyme activities and increased expression of PR genes. *M. laxa* suppress the apple defense system and causes apple early fruit rot. These findings highlight the importance of the defense mechanisms of plants against pathogens.

Keywords: PR proteins, Brown rot, Apple, Antioxidant enzyme activity, Reactive oxygen species



بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و میزان بیان ژن‌های PR1 و PR8 در میوه سیب تحت تنش با قارچ عامل پوسیدگی قهوه‌ای (*Monilinia laxa*)

فاطمه دریکنند^۱، عیدی بازگیر^{۲*}، مصطفی درویش‌نیا^۳ و حسین میرزایی نجفقلی^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۳- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۴- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۳۰؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۲؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۰۶/۳۰)

چکیده

سیب یکی از مهم‌ترین محصولات اقتصادی ایران و جهان به‌شمار می‌رود. بیماری پوسیدگی قهوه‌ای سیب (*Monilinia laxa*) یکی از بیماری‌های مهم است که باعث کاهش عملکرد در مراحل قبل از برداشت و پس از برداشت می‌شود. در این تحقیق میزان تغییرات برخی از ترکیبات دفاعی میوه سیب از جمله آنزیم‌های پروکسیداز و کاتالاز، پس از مایه‌زنی با قارچ *M. laxa* بررسی شد. استخراج و اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به‌ترتیب در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری انجام شد. همچنین در این مطالعه روند تغییرات بیان ژن‌های PR1 و PR8 علیه بیمارگر پوسیدگی قهوه‌ای در میوه سیب پس از تلقیح با بیمارگر در فاصله زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت به‌همراه شاهد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس بیان ژن‌های مقاومت در سطوح مختلف زمان اعمال تیمار معنی‌دار بود. بیشترین میزان بیان ژن‌های PR1 و PR8 بعد از ۴۸ ساعت نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. در این تحقیق، بیان ژن‌های PR1 و PR8 برای اولین بار علیه بیمارگر قارچی در سیب بررسی شده است و امید می‌رود یافته‌های پژوهش حاضر در توسعه روش‌های اصلاحی برای مقاومت به بیمارگرهای مهم انباری سیب برای نگه‌داری طولانی‌مدت آن مفید باشد.

واژگان کلیدی: پروتئین‌های PR، پوسیدگی قهوه‌ای، سیب، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی، گونه‌های اکسیژن فعال

مقدمه

گیاهان در طول زندگی خود معمولاً با عوامل بیماری‌زای زیادی دست‌وپنجه نرم می‌کنند که عموماً منجر به مجموعه‌ای از اختلالات در روند رشد و نمو و خسارت به محصول آن‌ها می‌شود. میوه سیب (*Malus domestica*) یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی از نظر اقتصادی در جهان است. سیب‌ها به‌عنوان عمده‌ترین میوه‌های معتدل تجاری، معمولاً برای مدت طولانی در انبارهای سرد نگهداری می‌شوند تا عمر مفیدشان افزایش یابد، اما کسری از این سیب‌ها از بین می‌روند زیرا انبار سرد نمی‌تواند مانع از فساد سیب ناشی از عوامل بیماری‌زا شود (FAO, 2018). از عوامل مهم بیماری‌زا در انبار می‌توان به پوسیدگی قهوه‌ای اشاره نمود. پوسیدگی قهوه‌ای یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی میوه‌های هسته‌دار و دانه‌دار است، که ناشی از گونه‌های *Monilinia* است که می‌تواند منجر به تلفات قابل‌توجهی قبل از برداشت و پس از برداشت در سراسر جهان شود (Hu et al., 2011). در گیاهان چندین واکنش دفاعی در سطوح مختلف فیزیولوژیکی، مولکولی و سلولی و به‌دنبال آن فعال شدن تعداد زیادی از ژن‌ها با عملکردهای شناخته‌شده و ناشناخته در پاسخ به عوامل بیمارگر و کاهش افت بهره‌وری توسعه یافته است. چنین پاسخ‌هایی اغلب شامل فعال‌سازی واکنش فوق‌حساسیت (Hypersensitivity reaction: HR) می‌شود که مشخص‌ترین نشانه مقاومت است و عموماً با مرگ سلولی در محل عفونت قابل تشخیص است (Lamb and Dixon, 1997). سیستم مهار گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species: ROS) در گیاهان تعادل ROS را تنظیم می‌کند و برای حفظ حالت اکسیداسیون و کاهش طبیعی سلول‌ها عمل می‌کند. هنگامی که بیمارگرها گیاهان را آلوده می‌کنند، ROS تولید می‌شود و به‌سرعت منفجر می‌شود (Dodds and Rathjen, 2010; Dou and Zhou, 2012). ROS‌های رایج شامل پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-) هستند (Mditshwa et al., 2017; Tian et al., 2015; Zhang et al., 2013).

(al., 2013). با این حال، تولید بیش‌ازحد ROS می‌تواند باعث آسیب به سلول‌های میزبان شود (Berni et al., 2018). برای حفظ بهترین حالت رشد، مقادیر بیش‌ازحد ROS باید به‌طور مؤثر حذف شود تا سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه فعال شود (Tanveer et al., 2017; Jahanbakhsh et al., 2022; Rafeie et al., 2023; Godehkahriz et al., 2023). سیستم دفاعی آنزیمی آنتی‌اکسیدانی گیاهان در درجه اول شامل سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase: SOD)، پراکسیداز (Peroxidase: POD)، کاتالاز (Catalase: CAT) و آسکوربات پراکسیداز (Ascorbate Peroxidase: APX) است (Li et al., 2016). SOD تبدیل (O_2^-) به (H_2O_2) را کاتالیز می‌کند، سپس CAT و POD، H_2O_2 را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کنند؛ بنابراین، تعادل متابولیسم ROS سلولی را بازیابی می‌کند (Zhang et al., 2016). مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde: MDA) محصول پراکسیداسیون لیپیدی غشایی است که طی تنش تولید می‌شود و محتوای آن اغلب به‌عنوان نشانگری برای اندازه‌گیری درجه پراکسیداسیون لیپید غشا استفاده می‌شود (Li et al., 2016). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌تواند مقدار بیش‌ازحد MDA تولیدشده توسط گیاهان تحت تنش را کاهش دهد، در نتیجه پایداری غشای سلولی را حفظ کرده و تحمل گیاه را به تنش افزایش می‌دهد (Balal et al., 2012). پرولین یک ماده محافظ غشای سلولی و آنزیم‌های گیاهی است که تعادل اسمزی سیتوپلاسم را تنظیم می‌کند (Xing et al., 2017). افزایش بیان و تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis-related protein: PR) نتیجه نهایی القای پاسخ‌های دفاعی است (Bonasera et al., 2006). بیشتر PRها فعالیت ضدقارچی دارند و می‌توانند به‌طور مستقیم بیمارگرها را از بین ببرند یا از گسترش بیماری‌ها جلوگیری کنند (Van Loon et al., 2006). در حال حاضر، PR1 و PR8 (Liu et al., 2013) شناخته‌ترین پروتئین‌های پاسخ‌گو به بیمارگر در میوه سیب هستند. اکثر مطالعات در حال حاضر از گیاهان مدل مانند *Arabidopsis thaliana* و

سوسپانسیون مورد نظر تزریق و برای گروه کنترل با همان حجم آب استریل استفاده شد. سیب‌های تیمار شده در ظروف یک‌بارمصرف پلاستیکی قرار داده شدند و سپس این ظروف در نایلون فریزر قرار داده شدند (Grzegorzczak *et al.*, 2017). میزان پوسیدگی و قطر ضایعات با استفاده از دستگاه کولیس با نمایشگر دیجیتال تعیین شد. بعد از گذشت ۳۰ روز، میزان پوسیدگی برای هر تیمار (کنترل و بیمارگر) برحسب میلی‌متر محاسبه شد (Cardoso *et al.*, 2004). آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی و برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. برای استخراج RNA در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶ ساعت و تهیه عصاره آنزیمی (زمان‌های ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲ روز پس از آلودگی) از سیب تلقیح شده با اسپور قارچ و همچنین گروه شاهد نمونه برداری انجام شد و سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد و به یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و نگهداری شدند.

تعیین محتوای H₂O₂، MDA و پرولین: محتوای پراکسید هیدروژن با استفاده از کیت سنجش پراکسید هیدروژن/پراکسیداز (Solarbio، چین) و قرائت در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه میکروپلیت‌خوان اندازه‌گیری شد (Wang *et al.*, 2009). محتوای مالون‌دی‌آلدئید نیز با استفاده از تیوباربتوریک اسید به عنوان معرف و بر اساس روش (Wang *et al.*, 2009) اندازه‌گیری شد. همچنین محتوای پرولین با استفاده از روش رنگ‌آمیزی نین‌هیدرین اندازه‌گیری شد (Wang *et al.*, 2015).

تعیین فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) طبق روش وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2014) تعیین شد. برای تهیه عصاره آنزیمی از محلول ۰/۸ مولار کلرید پتاسیم (KCl) و بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (pH=7) استفاده شد. مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از مایع رویی برای تعیین فعالیت آنزیم استفاده شد. فعالیت POD با اندازه‌گیری اکسیداسیون گایاکول تعیین شد. یک واحد POD به عنوان مقدار آنزیمی که باعث افزایش ۰/۱ جذب در ۴۷۰ نانومتر بر دقیقه می‌شود، تعریف شد. فعالیت CAT با

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) برای بررسی مقاومت گیاهان در برابر عفونت توسط عوامل بیماری‌زا استفاده می‌کنند (Mandal *et al.*, 2009).

قارچ *M. laxa* عامل پوسیدگی قهوه‌ای در میوه سیب در باغ و پس از برداشت در انبار شناخته می‌شود. با وجود این، اطلاعات کمی در مورد پاسخ دفاعی سیب به عفونت توسط *M. laxa* وجود دارد. هدف از این مطالعه شناخت بیشتر مکانیسم دفاعی میوه‌های سیب در هنگام آلودگی به *M. laxa* می‌باشد. بدین منظور در پژوهش حاضر تغییرات پویا در محتوای ROS و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سیستم‌های دفاعی (مکانیسم میوه به بیمارگر) در میوه سیب در طول عفونت با *M. laxa* و همچنین تغییرات بیان گروهی از PRهای دخیل در دفاع ضدقارچی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (qRT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه قارچ: در این مطالعه از سیب رقم گلدن دلشز به صورت سالم و بدون هیچ علائم بیماری که از باغات استان لرستان، شهرستان خرم‌آباد، جمع‌آوری شده بودند، استفاده شد. اندازه میوه‌ها یکسان و در حدود ۱۹۰± گرم بود. میوه‌ها در انبار دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان نگهداری شدند. جدایه قارچی *Monilinia laxa* با کد (strain number MLULK30) از میوه‌های سیب آلوده به پوسیدگی قهوه‌ای جداسازی شده و ضمن تأیید بیماری-زایی این جدایه برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها: سوسپانسیون اسپور کشت‌های ۱۰ تا ۱۴ روزه قارچ تهیه و غلظت آن، با استفاده از لام هموسیتومتر در حدود 1×10^6 تنظیم شد. در این آزمون برای هر کدام از تیمارها سه تکرار نظر گرفته شد. بعد از ضدعفونی سیب‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۲ دقیقه و شستشو مکرر با آب مقطر، در نهایت میوه‌ها به مدت ۵ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند، سپس بر روی هر سیب یک چاهک با سوزن استریل به قطر نیم میلی‌متر و به عمق سه میلی‌متر ایجاد شد. درون هر سوراخ به میزان ۲۰ میکرولیتر از

بررسی الگوی بیان ژن‌های منتخب با روش **Real time PCR** از **cDNA**های رقیق‌شده به‌عنوان الگو در شرایط کاملاً یکسان با **cDNA**های مورد استفاده در هر نمونه برای ژن کنترل داخلی **actin** برای تمام نمونه‌ها، در واکنش **Real time PCR** استفاده شد. غلظت‌های تمام مواد موجود در واکنش برای تمام نمونه‌ها یکسان بود. واکنش‌ها در دستگاه **MyCycler™** شرکت **Thermal Cycle** و برای سنجش میزان بیان ژن‌های مورد نظر **PR1** و **PR8** در نمونه‌های مختلف از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به‌منظور بررسی تغییرات بیان ژن نسبت به نمونه‌های شاهد محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). در این آزمایش ژن کنترل داخلی **Actin** جهت نرمال‌سازی مقادیر بیان ژن‌ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار **GraphPad Prism 9** صورت گرفت. شرایط دمایی و زمانی **Real time PCR** در جدول ۲ نشان داده شده است. **تحلیل آماری**: تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای **Excel** و **SAS** انجام شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن صورت گرفت.

استفاده از طیف‌سنجی فرابنفش تعیین شد. یک واحد **CAT** به‌عنوان مقدار آنزیمی که باعث افزایش ۰/۱ جذب در ۲۷۰ نانومتر بر دقیقه می‌شود، تعریف شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: استخراج **RNA** کل با استفاده از کیت استخراج **RNA (RNXplus)** و مطابق با شیوه‌نامه شرکت سیناژن، ایران انجام شد. برای ارزیابی کمیت و کیفیت **RNA** استخراج‌شده از دستگاه اسپکتوفتومتری نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد استفاده شد. در اسپکتوفتومتری نانودراپ میزان جذب نور با طول‌موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید و نسبت طول‌موج **A260/A230** و **A260/A280** جهت بررسی آلودگی‌های پلی فنلی، پلی ساکارییدی و پروتئینی محاسبه شد. قبل از سنتز **cDNA**، برای حذف آلودگی احتمالی **DNA** ژنومی، از تیمار با آنزیم **DNase I** طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده (**RevertAid** Reverse Transcriptase شرکت **Thermo Scientific**، آلمان) استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده برای این مطالعه که شامل ژن‌های **PR1**، **PR8** و ژن کنترل داخلی **Actin** با استفاده از نرم‌افزار **AlleleID** (نسخه ۶) طراحی شدند (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در تجزیه و تحلیل **RT-qPCR** بیان ژن‌های **PR**

Table 1. Primers used for **RT-qPCR** analysis of **PR** genes expression

نام ژن Gene name	توالی آغازگر Primer Sequence (5'-3')	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)
PR1	F: GCAGCAGTAGGCGTTGGTCCCT R: CCAGTGCTCATGGCAAGGTTTT	58
PR8	F: GCCACTGCAACCCCGCTAGT R: GCGGGCGCGAATCTGACTGA	52
Actin	F: TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT R: TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC	60

جدول ۲- شرایط زمانی و دمایی واکنش **Real time-PCR**

Table 2. Real-Time qPCR cycling time and temperatures

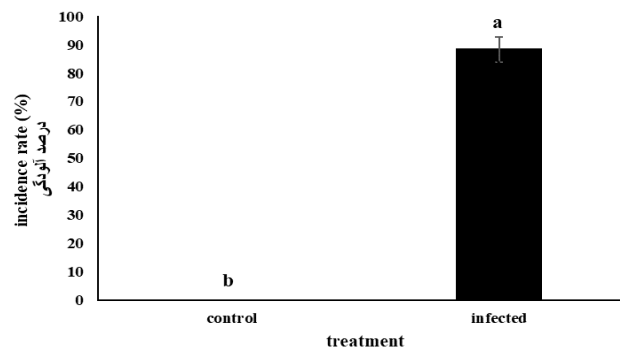
واکنش Reaction	زمان Time	دما (سانتی‌گراد) Temperature (°C)
واسرشته‌سازی اولیه Primary Denaturation	2min	94
واسرشته‌سازی Denaturation	15 sec	94
اتصال Anneling	15 sec	58
گسترش Extension	15 sec	72
گسترش نهایی Final Elongation	10 min	72

نتایج و بحث

بررسی اثر قارچ *Monilinia laxa* در میوه ذخیره‌شده سیب در انبار: میوه‌های سیب که با قارچ تلقیح داده‌شده پس از ۳۰ روز، تعداد زیادی از این میوه‌ها به دلیل آلودگی توسط قارچ *M. laxa* با نرخ بروز ۸۷/۴ درصد (شکل ۱) بیمار شدند و برخی از میوه‌ها به‌طور کامل سیاه شدند. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد قارچ *M. laxa* بر روی میوه سیب در مقایسه با شاهد تأثیر معنی‌داری دارد.

اثرات *Monilinia laxa* بر محتوای H_2O_2 ، MDA و پرولین: تلقیح *M. laxa* به‌شدت سطح H_2O_2 را افزایش داد به‌طوری‌که که از روز ۶ رو به افزایش گذاشت و در روز ۱۲ به بالاترین سطح خود به $31/45 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ رسید (شکل ۲-۱). در مقایسه با شاهد، عفونت با *M. laxa* باعث انفجار سریع و تجمع ROS در میوه سیب شد. تلقیح با *M. laxa* باعث افزایش نفوذپذیری غشاهای سلولی میوه سیب شد، که نشان داد محتوای MDA به‌شدت در روز ۹ افزایش یافته است و در روز ۱۲ به اوج خود و به $5/44 \text{ mg g}^{-1}\text{FW}$ رسید (شکل ۲-۲). تلقیح *M. laxa* همچنین به‌شدت سطح پرولین را در روز ۶ افزایش داد و سپس به‌آرامی

کاهش یافت، به‌طوری‌که پرولین در روز ۶ پس از تلقیح به بالاترین سطح خود ($0/73 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$) رسید (شکل ۲-۳). اثر بیمارگر *Monilinia laxa* بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: فعالیت دو آنزیم در بافت میوه شاهد در مقایسه با میوه‌های آلوده به *M. laxa* تغییر معنی‌داری داشت. در مقایسه با شاهد، تلقیح با بیمارگر باعث افزایش قابل‌توجهی در فعالیت POD در روز سوم شد که به بالاترین سطح خود در روز ۳ ($48/17 \text{ U/mg protein min}$) رسید و سپس به‌سرعت شروع به کاهش کرد، در نتیجه مقداری کمتر از مقدار کنترل در روز ۳ ایجاد کرد درصد افزایش فعالیت آنزیم مذکور (۹۸ درصد) در روز ۳ انبارداری در تیمار قارچ نسبت به شاهد بود (شکل ۳-۱). فعالیت CAT نیز همین روند را نشان داد (شکل ۳-۲). پس از تلقیح، فعالیت CAT به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت و در روز ۳ ($37/12 \text{ U/mg protein min}$) به اوج خود رسید و سپس به‌سرعت کاهش یافت. درصد افزایش فعالیت آنزیم مذکور (۵۸/۷ درصد) در روز ۳ انبارداری در تیمار قارچ نسبت به شاهد بود (شکل ۳-۲).



شکل ۱- اثر *Monilinia laxa* در پوسیدگی قهوه‌ای سیب پس از ۳۰ روز.

Figure 1. Effect of *Monilinia laxa* causing brown rot of apples after 30 days

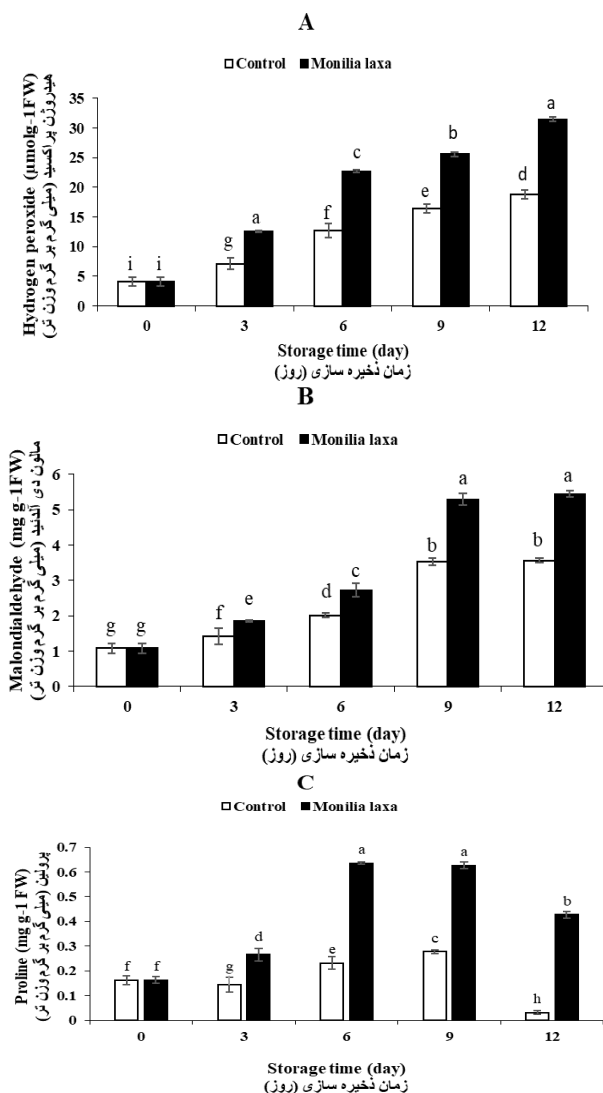
جدول ۳- تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های اثر *Monilinia laxa* در پوسیدگی قهوه‌ای سیب پس از ۳۰ روز

Table 3- Analysis of variance of *Monilinia laxa* effect causing brown rot of apples after 30 days

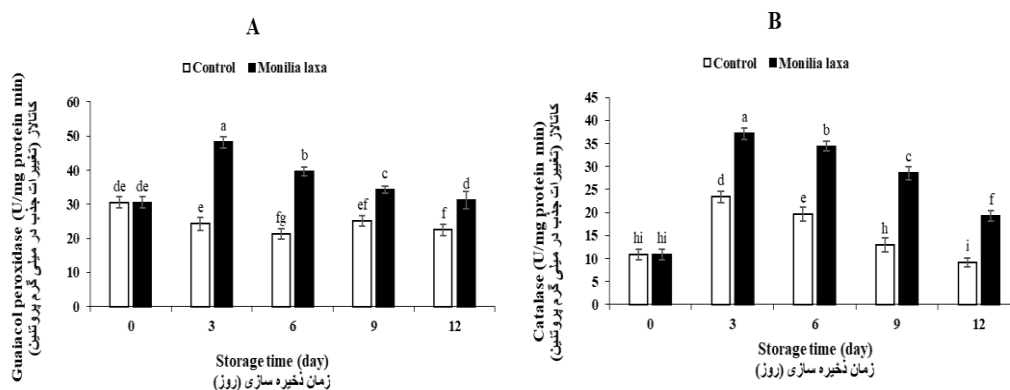
منبع تغییرات Source of variations	درجه آزادی Degree of freedom	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean square
Treatment تیمار	1	11736.0	11736.0**
Error خطا	4	3.8	0.9

** : معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

** : Significant at 1% probability level



شکل ۲- اثر *Monilia laxa* بر محتوای پراکسید هیدروژن (A)، مالون دی آلدئید (B) و پرولین (C) در میوه سیب.
Figure 2. Effect of *Monilia laxa* on the contents of (A) H₂O₂, (B) MDA and (C) proline in apple fruit



شکل ۳- اثر *Monilia laxa* بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در میوه سیب. پس از فواصل مختلف، بافت‌های میوه برای تعیین فعالیت پراکسیداز (A) (POD) و کاتالاز (B) (CAT) جمع‌آوری شد.

Figure 3. Effect of *Monilia laxa* on antioxidant enzymes activities in apple fruit following inoculation with *M. laxa*. After the various intervals, fruit tissues were collected to determine the activities of peroxidase (POD) (A), and catalase (CAT) (B).

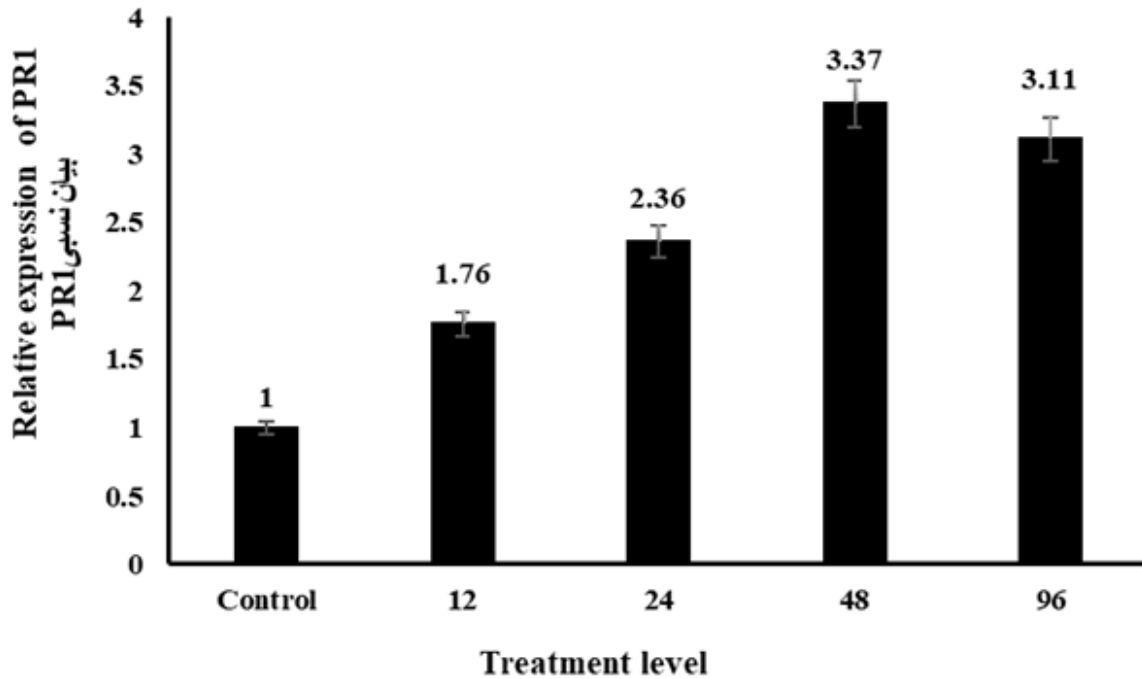
(شکل ۴). نتایج حاصل این مطالعه نشان داد که بین سطح بیان در تیمار زمانی صفر میزان بیان ژن PR1 تقریباً برابر شاهد (کنترل) بود. از طرفی دیگر با افزایش زمان، میزان بیان در ژن PR1 نسبت به بیان این ژن به تیمار کنترل بیشتر بود. همان‌طوری که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، میزان بیان ژن PR1 در تیمارهای زمانی ۱۲ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱/۷۶FC و ۳/۳۷FC بود. بیشترین و کمترین میزان بیان ژن در تیمار زمانی صفر و ۴۸ ساعت به ترتیب مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین به روش دانکن نشان داد که، بیان ژن PR8 در سطوح مختلف تیمارهای زمانی در میوه سیب اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد و روندی افزایشی بیان ژن PR8 نسبت به گیاه در زمان پایین‌تر و گیاه شاهد داشت. میزان بیان ژن در تیمارهای زمانی ۴۸، به میزان ۷ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۵). بیشترین و کمترین میزان بیان در تیمار زمانی ۴۸ و ۱۲ ساعت به ترتیب با میزان بیان ۷/۶۸FC و ۴/۳۹FC مشاهده شد. میزان بیان ژن PR8 نسبت به PR1 در زمان‌های مورد مطالعه بیشتر بود دلیل این امر می‌تواند اهمیت این ژن در پاسخ به تنش‌های زیستی ذکر کرد.

بررسی بیان ژن PR1 و PR8 علیه بیمارگر قارچی *Monilinia laxa* در زمان‌های مختلف: به منظور بررسی بیان ژن PR1 و مقایسه میزان بیان نسبی آن، ابتدا استخراج RNA از میوه‌های سیب با اعمال تیمارهای زمانی مختلف علیه بیمارگر جدایه قارچ پوسیدگی قهوه‌ای (*M. laxa*) صورت گرفت (شکل ۴). پس از مشاهده RNA استخراج شده و اینکه از کمیت و کیفیت خوبی برخوردار باشد و دو باند مربوط به 28S rRNA و 18S rRNA به خوبی و بدون شکستگی قابل تشخیص باشند سپس سنتز cDNA، با استفاده از آغازگر-های اختصاصی ژن PR1 و ژن کنترل داخلی actin آزمایش Real time-PCR صورت گرفت و بیان ژن مورد نظر به همراه شاهد مقایسه شد. نتایج تجزیه واریانس برای ژن PR1 در میوه سیب مورد نظر در زمان‌های مختلف در تلقیح با قارچ، وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح یک درصد را نشان داد (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین حاصل از سیب با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که با افزایش زمان بعد از تلقیح، سطح بیان ژن PR1 به میزان ۳ برابر در تیمار زمانی ۴۸ ساعت افزایش یافت و این افزایش بیان دارای اختلاف معنی‌داری بود

جدول ۴- تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های بیان ژن‌های PR1 و PR8 در میوه سیب در برابر بیمارگر قارچی *Monilinia laxa* در زمان‌های مختلف نگهداری

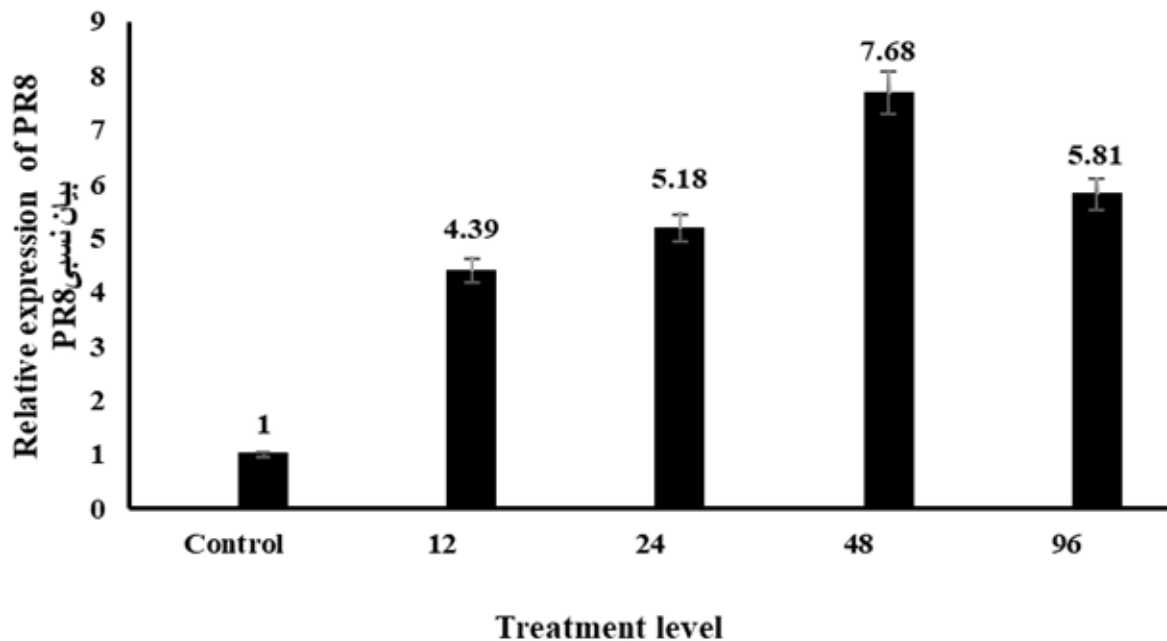
Table 4- Analysis of variance on the data of PR1 and PR8 genes expression in apple fruit against the fungal pathogen *Monilinia laxa* at different storage times

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	مجموع مربعات Mean square	
		PR1 gene	PR8 gene
تیمار Treatment	4	2.85**	18.30**
خطا Error	10	0.30	0.33
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		4.70%	3.36%



شکل ۴- بیان نسبی ژن PR1 در میوه سیب علیه بیمارگر قارچی *Monilinia laxa* در زمان‌های مختلف

Figure 4. The relative expression of PR1 gene in apple fruit against the fungal pathogen *Monilinia laxa* at different time points



شکل ۵- بیان نسبی ژن PR8 در میوه سیب علیه بیمارگر قارچی *Monilinia laxa* در زمان‌های مختلف

Figure 5. Relative expression of PR8 gene in apple fruit against the fungal pathogen *Monilinia laxa* at different time points

و معمولاً در منطقه مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی مورد مطالعه قرار می‌گیرند. این آنزیم‌ها باعث کاهش سمیت ناشی از ROS بر روی میوه سیب شدند، در نتیجه باعث مقاومت سیب در برابر *Botrytis cinerea* شد (Meng et al., 2019). ما دریافتیم که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پس از عفونت *M. laxa* به درجات مختلفی افزایش یافته است (شکل ۳- A و B-۳). در پژوهشی که توسط یانگ و همکاران (Yang et al., 2017) صورت گرفت آنزیم‌های مربوط به دفاع در سیب، مانند CAT و POD باعث کاهش میزان تولید ROS توسط آنزیم‌های مربوط به دفاع در سیب شد. این نشان می‌دهد که سیستم آنتی‌اکسیدانی در مراحل اولیه مقاومت سیب به عفونت *M. laxa* نقش فعالی دارد. ما دریافتیم که دو نوع فعالیت آنزیمی به درجات مختلف در روز ۴ کاهش یافته است، که نشان می‌دهد فعالیت آنزیمی تولیدشده توسط خود سیب برای کاهش ROS اضافی آن کافی نیست. بنابراین، ROS باعث آسیب به سلول‌ها و غیرفعال کردن آنزیم‌ها می‌شود. MDA محصول نهایی تجزیه پراکسیداسیون لیپیدی غشایی است و محتوای آن می‌تواند میزان آسیب گیاه را منعکس کند (Zhang and Shi, 2015). محتوای MDA در مراحل اولیه (۱۲-۰ روز) عفونت *M. laxa* به طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۱). هنگامی که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت، محتوای MDA همچنان در حال افزایش بود. اگرچه گزارش شده است که افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی می‌تواند تولید بیش از حد MDA توسط گیاهان را کاهش دهد (Balal et al., 2012)، تجمع بیش از حد MDA می‌تواند منجر به نشت سیتوپلاسم و مرگ سلولی در موارد شدید شود (Hui et al., 2013). آسیب به سیستم غشای سلولی ممکن است به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی ناشی از رادیکال‌های آزاد و ROS مربوط باشد. گیاهان می‌توانند پرولین، که یک تنظیم‌کننده مهم اسمزی برای جلوگیری از دست دادن بیش از حد آب ناشی از عفونت بیمارگر است را حفظ و همچنین باعث ثبات غشای سلولی شوند (Delauney and Verma, 1993).

گیاهان معمولاً در مواجهه با عفونت بیمارگر از طریق دو سیستم دفاعی شامل سیستم ایمنی گیاه و دیگری سیستم دفاعی ناشی از بیماری‌زایی، یک پاسخ ایمنی ایجاد می‌کنند. پاسخ متقابل بین دو سیستم باعث فعال شدن مسیرهای پیام‌رسانی متعدد در گیاه، تغییر در سطوح هورمون‌ها و تولید پروتئین‌های مقاوم به بیماری برای پاسخ به عفونت می‌شود. در مطالعه حاضر، ما نمونه‌های سیب آلوده و سالم را در دوره‌های زمانی مختلف مورد بررسی قرار دادیم تا مکانیسم پاسخ دفاعی میوه سیب (رقم گلدن دلشز) به عفونت *M. laxa* را با نظارت بر، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی و تغییرات بیان ژن‌های کدکننده PRsها بررسی کنیم. پس از آلوده شدن سیب توسط بیمارگر، پاسخ دفاعی اولیه ارتباط نزدیکی با تجمع ROS داشت (Cao et al., 2017). ROS عمدتاً در غشای پلاسمایی گیاهان توسط NADPH اکسیداز و در پراکسی‌زوم‌ها و میتوکندری‌ها به عنوان یک محصول جانبی که توسط انواع اکسیدازها کاتالیز می‌شود، تولید می‌شود (Berni et al., 2018). تولید سریع و شیوع ROS یک واکنش اولیه به ادراک گیاه از آلوده شدن توسط یک بیمارگر است (Dou and Zhou, 2012). ما دریافتیم که H_2O_2 به طور قابل توجهی در مراحل اولیه عفونت افزایش یافته است (شکل ۲-A). ROS در مکانیسم مقاومت به بیماری گیاهی نقش دارد، برای بیمارگرها سمی است و مستقیماً آن‌ها را عقیم می‌کند (Shetty et al., 2008). با این حال، ROS بیش از حد با پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک در سلول‌های میزبان واکنش نشان می‌دهد و باعث پراکسیداسیون غشای سلولی و غیرفعال شدن آنزیم‌ها می‌شود که در نتیجه منجر به اختلال متابولیسمی سلول و مرگ میزبان می‌شود (Wang et al., 2016). سیستم پاک‌سازی کامل ROS، تعادل ROS میزبان را تنظیم می‌کند و در نتیجه حالت اکسیداسیون و کاهش طبیعی سلول‌ها را حفظ می‌کند و آسیب به سلول‌های میزبان را کاهش می‌دهد (Bin-Mohsin et al., 2017). افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی مانند SOD، POD و CAT، در محافظت از سلول‌های زنده از آسیب احتمالی، ROS نقش مهمی داشته

است. تجمع مقادیر زیادی ROS در میوه سیب می‌تواند منجر به اختلال متابولیک سلول‌های میوه سیب در طی فرآیند آلودگی به *M. laxa* شود (Berni et al., 2018) و سیستم دفاعی گیاه از بین می‌رود که منجر به لیز شدن سلول‌های اپیدرمی می‌شود (Yim et al., 2013). مقاومت به بیماری در میوه‌های برداشت‌شده، از جمله به پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) مرتبط است. تولید ROS سیگنال‌های مهمی از پاسخ ایمنی سیب است که می‌تواند توانایی دفاعی را از طریق مکانیسم تولید و پاک‌سازی ROS بهبود بخشد. بیان پروتئین‌های مرتبط با PR نیز مستقیماً مقاومت در برابر بیمارگرها را بهبود می‌بخشد که همه آن‌ها در پاسخ میوه سیب در برابر عفونت به *M. laxa* شرکت داشتند. این مطالعه نشان داد که یک سری واکنش‌های دفاعی علیه *M. laxa* در طول عفونت در میوه‌های سیب رقم گلدن دلشیز، از جمله افزایش فعالیت‌های آنزیمی مرتبط با دفاع و افزایش بیان ژن‌های PR ایجاد شد. *M. laxa* با از بین بردن سیستم دفاعی سیب باعث تخریب زودهنگام آن می‌شود. این یافته‌ها اهمیت کشف مکانیسم دفاعی گیاهان در برابر بیمارگرها را برجسته می‌کند، اما تحقیقات بیشتری برای درک تعاملات بین سیستم دفاعی میوه سیب و بیمارگرهای دخیل در بیماری سیب شایسته است.

PRها انواعی از پروتئین‌های ترشح‌شده توسط سلول‌های گیاهی هستند که به راحتی هیدرولیز نمی‌شوند، وزن مولکولی کمی دارند و به‌طور خاص در پاسخ به استرس زیستی خارجی تجمع می‌یابند (Wang et al., 2018). بیشتر PRها اثرات ضدقارچی مستقیم دارند و گیاهان تراریختی که PR را بیان می‌کنند می‌توانند مقاومت خود را در برابر برخی از میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا را بهبود بخشند (Sels et al., 2008). تحقیقات قابل‌توجهی بر روی پروتئین‌های دفاعی (PR1، PR2، PR4 و PR8) که می‌توانند دیواره سلولی بیمارگرها را تخریب کنند، انجام‌شده است (Odintsova et al., 2009). در بین پروتئین‌های PR، کیتیناز و 3-β-1-گلوکاناز (3-GA,β-1) نقش مهمی در مقاومت میوه به بیماری دارند که باعث مقاومت سیب‌های آلوده به *Botryosphaeria berengeriana* شدند (Sun et al., 2018). سطوح بیان PR1 و PR8 پس از تلقیح با *M. laxa* در مقایسه با شاهد به‌سرعت افزایش یافت (شکل ۴ و ۵). این مشاهدات با نتایج مطالعه ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2016) مطابقت دارد. این نشان می‌دهد که بیان ژن‌های PR ممکن است در پاسخ دفاعی میوه سیب به عفونت با *M. laxa* دخیل باشد. پروتئین‌های PR دارای توانایی ضد قارچی برای نفوذپذیری غشاهای قارچی و تخریب دیواره سلولی بیمارگر با استفاده از یک سری فعالیت‌های آنزیمی

References

- Balal, R.M., Khan, M.M., Shahid, M.A., Mattson, N.S., Abbas, T., Ashfaq, M., Garcia-Sanchez, F., Ghazanfer, U., Gimeno, V. and Iqbal, Z. (2012). Comparative studies on the physiobiochemical, enzymatic, and ionic modifications in salt-tolerant and salt-sensitive citrus rootstocks under NaCl stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **137**(2): 86-95.
- Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., Sergeant, K., Hausman, J.F., Lutts, S., Cai, G. and Guerriero, G. (2019). Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, **161**: 98-106.
- Bin-Mohsin, B., Ahmed, N., Adnan, Khan, U. and Tauseef Mohyud-Din, S. (2017). A bioconvection model for a squeezing flow of nanofluid between parallel plates in the presence of gyrotactic microorganisms. *The European Physical Journal Plus*, **132**: 1-12.
- Bonasera, J.M., Kim, J.F., and Beer, S.V. (2006). PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology*, **6**(1): 1-12.
- Cao, J.J., Yu, Z.C., Zhang, Y., Li, B.H., Liang, W.X. and Wang, C.X. (2017). Control efficiency of exogenous melatonin against post-harvest apple grey mold and its influence on the activity of defensive enzymes. *Journal of Plant Physiology*, **53**(1753): 1760.
- Cardoso, J.E., Santos, A.A., Rossetti, A.G. and Vidal, J.C. (2004). Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in semiarid north-eastern Brazil. *Plant Pathology*, **53**(3): 363-367.

- Delauney, A.J. and Verma, D.P.S.** (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, **4(2)**: 215-223.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P.** (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, **11(8)**: 539-548.
- Dou, D. and Zhou, J.M.** (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host & Microbe*, **12(4)**: 484-495.
- Etebarian, H.R., Sholberg, P.L., Eastwell, K.C. and Saylor, R.J.** (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, **51(7)**: 591-598.
- FAO.** (2018). FAOSTAT download data for apples. Available online at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Grzegorzczak, M., Żarowska, B., Restuccia, C. and Cirvilleri, G.** (2017). Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiology*, **61**: 93-101.
- Hu, M.J., Cox, K.D., Schnabel, G. and Luo, C.X.** (2011). *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *PLoS One*, **6(9)**: e24990.
- Hui, Z.M., Wang, Z.Z., Hu, Y., Deng, M.M. and Zhang, Z.W.** (2013). Effects of 24-epibrassinolide on the antioxidant system and osmotic adjustment substance in grape seedlings (*V. vinifera* L.) under chilling stress. *Scientia Agricultura Sinica*, **46**: 1005-1013.
- Jahanbakhsh Godehkahriz, S., Jalali Shahko, F. and Raisi Sadati, S.Y.** (2023). Studying the expression pattern of *aox2* and *pal2* genes associated with the production of antioxidants and flavonoids in yarrow plant following salicylic acid treatment. *Plant Genetic Researches*, **9(2)**: 31-40 (In Persian).
- Lamb, C. and Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Biology*, **48(1)**: 251-275.
- Li, Y., Lu, H., Cheng, Q., Li, R., He, S. and Li, B.** (2016). Changes of reactive oxygen species and scavenging enzymes of persimmon fruit treated with CO₂ deastringency and the effect of hydroxyl radicals on breakdown of cell wall polysaccharides in vitro. *Scientia Horticulturae*, **199**: 81-87.
- Liu, J., Wisniewski, M., Artlip, T., Sui, Y., Droby, S. and Norelli, J.** (2013). The potential role of PR-8 gene of apple fruit in the mode of action of the yeast antagonist, *Candida oleophila*, in postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, **85**: 203-209.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, **25(4)**: 402-408.
- Mandal, S., Mallick, N. and Mitra, A.** (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47(7)**: 642-649.
- Mditshwa, A., Fawole, O.A., Vries, F., van der Merwe, K., Crouch, E. and Opara, U.L.** (2017). Impact of dynamic controlled atmospheres on reactive oxygen species, antioxidant capacity and phytochemical properties of apple peel (cv. Granny Smith). *Scientia Horticulturae*, **216**: 169-176.
- Meng, L., Yu, C., Xue, D., Li, B., Liang, W. and Wang, C.** (2019). Control efficiency of BHT against postharvest apple grey mold and its influence on the activity of defensive enzymes and content of malondialdehyde. *Journal of Plant Protection*, **46(3)**: 686-692.
- Odintsova, T.I., Vassilevski, A.A., Slavokhotova, A.A., Musolyamov, A.K., Finkina, E.I., Khadeeva, N.V., Rogozhin, E.A., Korostyleva, T.V., Pukhalsky, V.A., Grishin, E.V. and Egorov, T.A.** (2009). A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif. *The FEBS Journal*, **276(15)**: 4266-4275.
- Rafeie, M., Amerian, M.R., Sorkhi, B., Heidari, P. and Asghari, H.R.** (2020). Effect of exogenous brassinosteroid application on grain yield, some physiological traits and expression of genes related to this hormone signaling pathway in wheat under drought stress. *Plant Genetic Researches*, **6(2)**: 157-172 (In Persian).
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P. and De Bolle, M.F.** (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46(11)**: 941-950.
- 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**: 267-280.
- Sun, T., Li, J., Wang, T., Niu, N. and Xu, J.** (2018). Difference in protein expression of apple leaves with different resistance response to *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola* infection. *Acta Horticulturae Sinica*, **45(3)**: 409-420.

- Tanveer, M. and Shah, A.N.** (2017). An insight into salt stress tolerance mechanisms of *Chenopodium album*. *Environmental Science and Pollution Research*, **24**: 16531-16535.
- Tian, S., Torres, R., Ballester, A.R., Li, B., Vilanova, L. and González-Candelas, L.** (2016). Molecular aspects in pathogen-fruit interactions: Virulence and resistance. *Postharvest Biology and Technology*, **122**: 11-21.
- Van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**: 135-162.
- Wang, C.X., Chen, X.L., and Li, B.H.** (2014). Effects of *Valsa mali* var. *mali* infection on defense enzymes activity and MDA content in apple callus. *Chih Wu Sheng Li Hsueh T'ung Hsun*, **50** :909-916.
- Wang, F., Zeng, B., Sun, Z. and Zhu, C.** (2009). Relationship between proline and Hg²⁺-induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **56**: 723-731.
- Wang, H., Yang, L., Li, Y., Hou, J., Huang, J. and Liang, W.** (2016). Involvement of ABA-and H₂O₂-dependent cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase in maintaining redox homeostasis in soybean roots under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **107**: 126-136.
- Wang, X.D., Bi, W.S., Jing, G.A.O., Yu, X.M., Wang, H.Y. and Liu, D.Q.** (2018). Systemic acquired resistance, NPR1, and pathogenesis-related genes in wheat and barley. *Journal of Integrative Agriculture*, **17(11)**: 2468-2477.
- Wang, Y.F., Pan, F.B., Zhan, X., Wang, G.S., Zhang, G.D., Hu, Y.L., Chen, X.S. and Mao, Z.Q.** (2015). Effects of five kinds of phenolic acid on the function of mitochondria and antioxidant systems in roots of *Malus hupehensis* Rehd. seedlings. *Acta Ecologica Sinica*, **35**: 6566-6573.
- Xing, J.H., Pan, D.Z., Tan, F.L. and Chen, W.** (2017). Effects of NaCl stress on the osmotic substance contents in *Kandelia candel* roots Ecol. *Environmental Science*, **26(1865)**: 1871.
- Yang, Y., Lu, X., Jin, J. and Bai, R.** (2017). Effects of CaCl₂ on the AsA-GSH cycle of sour jujube seedlings under NaCl stress. *Acta Horticulturae Sinica*, **44(5)**: 953-962.
- Yim, B., Smalla, K. and Winkelmann, T.** (2013). Evaluation of apple replant problems based on different soil disinfection treatments—links to soil microbial community structure?. *Plant and Soil*, **366**: 617-631.
- Zhang, L., Liu, J., Wang, X. and Bi, Y.** (2013). Glucose-6-phosphate dehydrogenase acts as a regulator of cell redox balance in rice suspension cells under salt stress. *Plant Growth Regulation*, **69**: 139-148.
- Zhang, Y., Shi, X., Li, B., Zhang, Q., Liang, W. and Wang, C.** (2016). Salicylic acid confers enhanced resistance to *Glomerella* leaf spot in apple. *Plant Physiology and Biochemistry*, **106**: 64-72.