

پرایمینگ مقاومت علیه *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* در آرابیدوپسیس با استفاده از ترکیب‌های فرار *Bacillus subtilis*

روح‌الله شریفی^{۱*}، نسرین کاظمی^۲، مسعود احمدزاده^{۳*} و کیوان بهبودی^۴

۱. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی گیاهی، دانشگاه پیام نور همدان

۳ و ۴. استاد و دانشیار، بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲۹)

چکیده

ترکیب‌های فرار میکروبی نقش عمده‌ای در افزایش رشد گیاه و محافظت آن در برابر بیماری‌های گیاهی دارند. در این پژوهش نقش ترکیب‌های فرار سویه *Bacillus subtilis* GB03 در افزایش رشد آرابیدوپسیس و القای مقاومت به بیمارگر *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 بررسی شد. گیاهچه‌های آرابیدوپسیس در پتری‌های دو بخشی در معرض ترکیب‌های فرار سویه آنتاگونیست قرار گرفتند. ترکیب‌های فرار توانستند به‌صورت معنی‌داری رشد گیاه را در مقایسه با شاهد افزایش دهند. تیمار با ترکیب‌های فرار، شاخص بیماری ناشی از *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 را از ۸۰ به ۴۰ درصد کاهش دادند. جمعیت بیمارگر در تیمار با باکتری آنتاگونیست بیشینه به $1/1 \times 10^6$ در گرم وزن تر اندام‌های هوایی رسید درحالی‌که جمعیت بیمارگر در شاهد تا $1/3 \times 10^8$ افزایش پیدا کرد. برای مشخص شدن مسیر پیام‌رسانی درگیر در مقاومت، بیان سه ژن *PR-1*، *PDF1.2* و *ChiB* به ترتیب به‌عنوان نشانگر مسیرهای سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن ارزیابی شد. ترکیب‌های فرار باعث افزایش سریع و قوی بیان ژن‌های *PR-1* و *PDF1.2* شد. بیان قوی و سریع این ژن‌ها بیانگر پرایمینگ هر دو مسیر جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید است. در مجموع ترکیب‌های فرار سویه *B. subtilis* GB03 نه تنها می‌توانند رشد گیاه را به‌صورت شایان‌توجهی افزایش دهند بلکه باعث افزایش بیان ژن‌های مقاومت و درنهایت کاهش بیماری در آرابیدوپسیس نیز شدند.

واژه‌های کلیدی: القای مقاومت سیستمیک، باسیلوس، ترکیب‌های فرار، جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید.

Priming of resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Arabidopsis by volatiles of *Bacillus subtilis*

Rouhollah Sharifi^{1*}, Nasrin Kazemi², Masoud Ahmadzadeh^{3*} and Keivan Behboudi⁴

1. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Razi University, Kermanshah, Iran

2. M.Sc. Student, Department of Plant Biology, Payame Noor University, Hamadan Iran

3, 4. Professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Apr. 26, 2016 - Accepted: Dec. 19, 2016)

ABSTRACT

Microbial volatiles have an important role in plant growth promotion and protecting them against plant pathogens. In this work, we evaluated whether *B. subtilis* volatiles promote plant growth and induce resistance against *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Arabidopsis seedlings were exposed to bacterial volatiles in two compartments I-plate system. Volatiles increased plant growth significantly compared to control. Exposure of plant with bacterial volatiles reduced disease index from 80% to 40%. Pathogenic bacterial population in plant leaves reached up to 1.1×10^6 CFU/g aerial part wet weight in volatile treatment, however pathogen population reached up to 1.3×10^8 in control plants. Expressions of *PR-1*, *PDF1.2*, and *ChiB* have been evaluated as marker genes for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene-dependent pathways, respectively. Bacteria volatiles boosted the expression of *PR-1* and *PDF1.2*, significantly. These genes expressed strongly and rapidly which represented plant defense priming by bacteria volatiles. In conclusion, volatiles from *B. subtilis* GB03 not only improved plant growth significantly but also increased expression of defense-related genes and eventually suppressed disease in *Arabidopsis*.

Keywords: Bacillus, induced systemic resistance, jasmonic acid, salicylic acid, volatiles compounds.

مقدمه

ترکیب‌های فرار ترکیب‌هایی هستند که در شرایط طبیعی به حد کافی فشار بخار دارند که تبخیر و به‌صورت گاز وارد اتمسفر شوند. این گروه از مواد شیمیایی حاوی ترکیب‌هایی با وزن مولکولی پایین (کمتر از ۳۰۰ گرم بر مول) هستند. مانند الکل‌ها، آلدئیدها، کتون‌ها و هیدروکربن‌ها (Kai et al., 2009). ترکیب‌های فرار واسطه ارتباط بین موجودها هستند که به‌صورت پیام‌های جذب‌کننده، دفع‌کننده یا هشداردهنده برای موجودها در همهٔ سلسله‌ها استفاده می‌شوند (Schulz & Dickschat, 2007). ترکیب ۱-اوکتن-۳-اول^۱ از باکتری *Paenibacillus polymixa* به‌شدت باعث کاهش رشد میسلیم و جلوگیری از جوانه‌زنی قارچ *Botrytis cinerea* شده است (Kishimoto et al., 2007). درک این ترکیب‌ها توسط گیاه منجر به فعال شدن طیف گسترده‌ای از مسیرهای پیام‌رسانی می‌شود که در نهایت نه‌تنها رشد گیاه را به‌صورت شایان‌ملاحظه‌ای افزایش می‌دهند (Ryu et al., 2003) بلکه مقاومت گیاه به بیمارگرها نیز افزایش می‌یابد. نخستین بار ریو و همکاران در سال ۲۰۰۳ پدیده اثرگذاری ترکیب‌های فرار باکتری‌ها را روی گیاهان توصیف کردند و دریچه‌ای را روی این زمینه از تحقیقات باز کردند (Ryu et al., 2003). در آن گزارش یاد شده است که ترکیب‌های فرار نه‌تنها می‌توانند رشد گیاه را تا شش برابر افزایش دهند بلکه به‌صورت کارآمدی مقاومت گیاه را در برابر بیمارگرهای مهاجم تحریک می‌کنند. ترکیب ۳و۲ بوتان دیول به‌عنوان عامل اصلی اثرگذاری مشاهده شده در نظر گرفته شد (Ryu et al., 2004). این نتیجه با تحقیقات تکمیلی روی *Pseudomonas chlororaphis* نیز تأیید شد و نشان می‌داد که بوتان‌دیول نه‌تنها در افزایش رشد گیاه بلکه در افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده نیز مؤثر است (Cho et al., 2008). گیاهان در طول تاریخ تکامل در معرض هجوم بیمارگرهای چندی بوده‌اند و در نتیجه سازوکارهای کارآمدی را علیه آن‌ها توسعه داده‌اند. گیاهان

الایستورهای میکروبی همچون تازک، پتیدوگلیکان، کیتین و ترکیب‌های فرار را تشخیص می‌دهند (Newman et al., 2013) و از راه هورمون‌های دفاعی همچون سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید پیام مقاومت را در سراسر گیاه پخش می‌کنند (Glazebrook, 2005). مسیر سالیسیلیک اسید بیشتر توسط بیمارگرهای نکروزه‌کننده و برخی ترکیب‌های شیمیایی ایجاد می‌شود و باعث افزایش بیان ژن‌های مقاومت مانند پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و برخی آنزیم‌ها و مواد فنلی می‌شود. این مسیر بیشتر علیه بیمارگرهای بیوتروف مؤثر است (Pieterse et al., 2012). در برابر مسیر وابسته به جاسمونیک اسید توسط باکتری‌ها و قارچ‌های سودمند ریشه و برخی مواد شیمیایی القاء می‌شود. در این مسیر ژن‌های دفاعی افزایش بیان ندارند بلکه با افزایش تولید فرم غیرفعال MAP^۲ کینازها و تغییر در کروماتین و هیستون‌ها گیاه آمادهٔ افزایش سریع و قوی بیان ژن‌های دفاعی پس از حملهٔ بیمارگر می‌شود. به این پدیده در اصطلاح پرایمینگ ژن‌های دفاعی می‌گویند (Conrath et al., 2015). مسیر جاسمونیک اسید بیشتر علیه بیمارگرهای نکروتروف مانند *Botrytis Rhizoctonia* و *Alternaria* مؤثر است.

هدف از آن پژوهش این است که: (۱) نقش ترکیب‌های فرار باسیلوس در افزایش رشد و مقاومت آرابیدوپسیس در برابر بیمارگر همی‌بیوتروف *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ارزیابی شود. (۲) مسیرهای پیام‌رسانی مقاومت که با ترکیب‌های فرار فعال می‌شوند شناسایی شوند و (۳) مشخص شود که آیا پدیدهٔ پرایمینگ ژن‌های مقاومت رخ می‌دهد؟

مواد و روش‌ها

ریزجانداران مورد استفاده

سویهٔ *B. subtilis* GB03 از گروه بیماری‌شناسی دانشگاه آوبورن^۳ آمریکا تهیه شد. این سویه به‌عنوان پایه برای تولید چند فرمولاسیون تجاری از جمله فراوردهٔ شناخته‌شدهٔ کودیاک استفاده می‌شود. سویهٔ

2. Mitogen Activated Protein Kinase
3. Auburn University

1. 1-octen-3-ol

یک بخش آن ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS و در بخش دیگر آن ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت TSA^۳ ریخته شده بود. شمار پنج گیاهچه آرابیدوپسیس در بخش حاوی محیط کشت MS به صورت یکنواخت نشاکاری شدند. در بخش دیگر پتری یک قرص کاغذ جاذب سترون به قطر ۵ میلی‌متر قرار داده شد و میزان ۳۰ میکرولیتر سوسپانسیون 1×10^9 CFU/ml باکتری معارض یا آنتاگونیست به آن اضافه شد. در شاهد، ۳۰ میکرولیتر آب مقطر سترون اضافه شد. پتری‌ها با پارافیلیم به خوبی مسدود شدند و برای مدت ۱۴ روز در اتاقک رشد با شرایط یادشده در بالا قرار داده شدند. با توجه به تخریبی بودن نمونه‌برداری برای تعیین جمعیت بیمارگر و بررسی بیان ژن‌ها، برای هر کدام از موارد دست‌کم سه تکرار در نظر گرفته شد.

باکتری بیمارگر به مدت یک شب در محیط لورابراتانی حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ریفامپسین کشت داده شد. سوسپانسیون حاصل سانتریفوژ شده و با آب مقطر حاوی یک درصد امولسیون‌کننده سلوت^۴ به جمعیت 1×10^7 CFU/ml رسانده شد. پتری‌های حاوی گیاهچه آرابیدوپسیس از اتاقک رشد خارج شده و در شرایط سترون میزان ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر به چهار برگ خوب رشد کرده هر گیاهچه آرابیدوپسیس تلقیح شد. سپس پتری‌ها به مدت سه روز در اتاقک رشد با شرایط یکسان نگهداری شدند تا نشانه‌های بیماری ظهور کند. ارزیابی میزان بیماری‌زایی بر پایه شاخص ۰-۵ لی و همکاران (Lee et al., 2012) انجام گرفت و در نهایت داده‌ها به درصد تبدیل شدند.

برای تعیین جمعیت بیمارگر در برگ‌ها، گیاهچه‌ها در زمان‌های صفر، سه و شش روز پس از مایه‌زنی از ریشه قطع شدند و با اتانول ۷۰ درصد به مدت ده ثانیه ضدعفونی سطحی شدند. گیاهچه‌ها در محلول ۱۰ میلی‌مولار $MgCl_2$ به صورت همگن (هموزن) درآمدند. پس از چند بار رقیق‌سازی (سری رقت) در محلول یکسان میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول

یادشده توانایی مطلوبی در کنترل بیماری‌های ریشه‌گندم، خیار، لوبیا و خودفرنگی ناشی از جنس‌های مختلف قارچی همچون *Rhizoctonia* و *Pythium* نشان داده است (Ongena & Jacques, 2008; Thakore, 2006). سویه *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 از پژوهشگاه ملی ژنتیک کره جنوبی تهیه شد. این سویه قادر به ایجاد بیماری در گوجه‌فرنگی و آرابیدوپسیس است.

به منظور نگهداری درازمدت باکتری، در آغاز سویه‌های یادشده به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت لورابراتانی و در دمای ۳۶ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. ۰/۵ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون غلیظ با ۰/۵ میلی‌لیتر از گلیسرول ۴۰ درصد سترون مخلوط شده، و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

تأثیر ترکیب‌های فرار سویه GB03 در مهار بیمارگر در این پژوهش از بذر رقم Col-0 آرابیدوپسیس استفاده شد. بذرها به مدت ده دقیقه در محلول هیپوکلیت سدیم ۱ درصد و روی دستگاه شیکر رفت و برگشتی ضدعفونی شدند. به منظور رفع هیپوکلیت سدیم اضافی، بذرها چهار بار با آب مقطر سترون، شستشو داده شدند.

بذرها با پیپت پاستور سترون درون پتری‌های ۹ سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت موراشیک و اسکوگ^۱ (۱/۵ گرم در لیتر سوکروز، ۴/۴ گرم در لیتر نمک‌ها و ویتامین‌های MS و ۸ گرم در لیتر آگار گیاهی که pH آن با KOH به ۵/۸ رسید) پخش شدند (Lee et al., 2012). به منظور سرمادهی بذرها، پتری‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند و در روز بعد به اتاقک رشد با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و با شدت نور ۸۰۰۰ لوکس زیر نور لامپ‌های فلورسنت منتقل شدند. تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برقرار شد. پتری‌ها به مدت ۷۲ ساعت در این شرایط نگهداری شدند. پتری‌های دو بخشی^۲ تهیه شد که در

3. Tryptone soy agar
4. Selvet

1. Murashige and Skoog (MS)
2. I-plate

۴ درجه سلسیوس رسانده شد. به هر یک از نمونه‌ها ۹ میکرولیتر از محلول حاوی اجزای زیر اضافه شد. ۲ میکرولیتر بافر $\times 10$ ، ۲ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر بازدارنده RNase، ۱ میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV-RT، ساخت امریکا) و ۳ میکرولیتر آب مقطر بدون RNase، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس با قرار دادن آن‌ها در ۷۰ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه فعالیت آنزیم متوقف شد. برای اطمینان از ساخت cDNA، افزایش ژن اکتین آرآییدوپسیس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و در شرایط زیر انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۲۰ میکرولیتر از PCRpremix (شرکت بیونیر کره جنوبی^۳)، ۱ میکرولیتر از غلظت ۱۰ پیکومول آغازگرهای اکتین، ۱ میکروگرم از نمونه cDNA که در نهایت به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید. فزون‌سازی با برنامه زمانی سه دقیقه و اسرشتی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس، شمار ۳۹ چرخه شامل سی ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، سی ثانیه در ۶۰ درجه سلسیوس و سی ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر (مدل ای‌سایکلر^۴ ساخت شرکت بیورد امریکا) انجام شد.

واکنش Real-time PCR

در این مرحله میزان بیان سه ژن، *PR-1* به‌عنوان نشانگر مسیر وابسته به سالیسیک اسید، ژن *PDF1.2* به‌عنوان نشانگر مسیر وابسته به جاسمونیک اسید و *ChiB* به‌عنوان نشانگر مسیر وابسته به اتیلن بررسی شد (Song et al., 2015). از ژن اکتین به‌عنوان ژن خانه‌دار (کنترل داخلی) استفاده شد (جدول ۱).

رقیق‌شده مورد نظر روی تشتک پتری حاوی محیط کشت لوریبارتانی حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ریفامپیسین کشت داده شد

به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مقاومت در فاصله‌های زمانی ۰، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت پس از تلقیح بیمارگر نمونه‌برداری انجام شد. برای نمونه‌برداری، همه گیاهچه‌های سه پتری در هر تیمار از قسمت ریشه جدا شده و بی‌درنگ به لوله‌های حاوی نیتروژن مایع منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان بررسی در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای پیام‌رسانی

استخراج RNA کل و ساخت cDNA

نمونه‌ها از فریز ۸۰- خارج شده و درون نیتروژن مایع قرار داده شدند. هاون‌های چینی با بازدارنده RNase به‌خوبی تمیز شده، با نیتروژن مایع سرد شدند. در همه مراحل با افزودن نیتروژن مایع از ذوب شدن نمونه‌ها جلوگیری شد. نمونه‌ها درون هاون پودر شده و به لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری دربار منتقل و درون نیتروژن مایع قرار داده شدند. استخراج RNA کل با استفاده از تریزول (اینویترژن، امریکا^۱) و بر پایه دستورکار شرکت سازنده انجام شد.

برای تعیین غلظت RNA از فناوری نانودراپ^۲ که با آب بدون RNase کالیبره شده بود، استفاده شد. جذب نمونه‌ها در دو طول‌موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده و نسبت جذبی $260/280$ محاسبه شد. نمونه‌های که نسبت جذبی آن‌ها بالاتر از $1/8$ بود، پذیرفته شدند و در غیر این صورت دوباره استخراج RNA صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده در نمونه‌ها با الکتروفورز در ژل اگاروز ۱ درصد ارزیابی شد.

به‌منظور تولید cDNA میزان ۲ میکروگرم از RNA استخراج‌شده در حجم ۱۰ میکرولیتر آب بدون RNase تهیه شد. ۱ میکرولیتر از آغازگر OligodT به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس دمای آن‌ها به

3. Bioneer, South Korea
4. Icyler Bio-Rad

1. Invitrogen, Curlsbad, USA
2. NanoDrop Technology

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences	Accession numbers
PR1_F	5'-CCAGACAAGTCACCGCTACCC-3'	PR1 (AT2G14610)
PR1_R	5'-CCCTAAAGAACGACACCGTCAA-3'	PR1 (AT2G14610)
PDF1.2_F	5'-AATGAGCTCTCATGGCTAAGTTTGCTTCC-3'	PDF1.2 (AT5G44420)
PDF1.2_R	5'-AATCCATGGAATACACACGATTTAGCACC-3'	PDF1.2 (AT5G44420)
ChiB_F	5'-GCTTCAGACTACTGTGAACC-3'	CHIB (AT3G12500)
ChiB_R	5'-TCCACCGTTAATGATGTTTCG-3'	CHIB (AT3G12500)
AtActin_F	5'-GTTAGCAACTGGGATGATATGG-3'	AtACT2 (AT3G18780)
AtActin_R	5'-CAGACCAATCGTGATGACTTGCCC-3'	AtACT2 (AT3G18780)

روش مدل خطی^۳ SAS، (SAS institute, SAS 9.1, Cary, NC) انجام گرفت. نرمال بودن پراکنش داده‌ها پیش از تجزیه آماری با نرم‌افزار SAS آزمایش شد.

نتایج و بحث

در این آزمون از پتری‌های دو بخشی استفاده شد که در آن گیاه در معرض ترکیب‌های فرار ناشی از سویه^۱ *B. subtilis* GB03 قرار می‌گرفت. در پتری شاهد که بدون سویه^۱ آنتاگونیست و در پی آن ترکیب‌های فرار ناشی از آن بود، گیاهان به شدت توسط بیمارگر آلوده شدند و میزان آلودگی به بیش از ۸۰ درصد رسید (شکل ۱). اما ترکیب‌های فرار ناشی از سویه^۱ *B. subtilis* GB03 می‌توانستند، گسترش بیماری را به شدت کاهش دهند و به ۱۰ درصد برسانند. ترکیب‌های فرار نه تنها شدت بیماری را کاهش دادند بلکه به صورت معنی‌داری رشد گیاهچه‌های آراییدوپسیس را نیز افزایش دادند (شکل ۱). میانگین وزن پنج بوته یک پتری دیش ۰/۹ گرم بود و تیمار با ترکیب‌های فرار این میزان را به ۳/۴ گرم رساند. گزارش‌های دیگری از افزایش رشد گیاه به واسطه^۲ ترکیب‌های فرار وجود دارد. وسپرم و همکاران (Vespermann *et al.*, 2007) نشان دادند که باکتری‌های متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Serratia*، *Pseudomonas* و *Burkholderia* می‌توانند کم‌وبیش رشد آراییدوپسیس را افزایش دهند. نقش ترکیب‌هایی همچون بوتان دیول (Rudrappa *et al.*, 2010; Ryu *et al.*, 2003) و استوبین در افزایش رشد گیاه به اثبات رسیده است. البته گزارش‌های محدودی از تأثیر منفی ترکیب‌های فرار در رشد گیاه موجود است. سیانید هیدروژن که توسط گروه کوچکی از باکتری‌ها از جمله

مخلوط واکنش (۱۰ میکرولیتر) شامل ۵ میکرولیتر مخلوط پایه^۱ بریلیون سایبر گرین^۱ (ساخت شرکت بیورد آمریکا)، ۱ میکرولیتر از cDNA، ۱ میکرولیتر از محلول ۱۰ پیکومول هر یک از آغازگرها بود که با ۳ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. برای هر نمونه افزون بر سه تکرار آزمایشی، سه تکرار تکنیکال هم در نظر گرفته شد. واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از دستگاه Chromo4 Real-Time-PCR (ساخت شرکت بیورد آمریکا) و بر پایه برنامه‌ریزی زیر انجام گرفت.

واسرشت اولیه به مدت ده دقیقه در ۹۵ درجه^۱ سلسیوس، آنگاه چهل چرخه در شرایط ۹۵ درجه^۱ سلسیوس به مدت سی ثانیه برای واسرشت‌سازی، ۶۰ درجه^۱ سلسیوس به مدت سی ثانیه برای اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه^۱ سلسیوس به مدت ۴۲ ثانیه برای بسط انجام شد. میزان نسبی RNA با استفاده از نرمال کردن بر پایه^۲ میزان بیان mRNA ژن اکتین محاسبه شد. برای محاسبه از رابطه^۲ زیر استفاده شد.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Target}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Ref}}(\text{control-sample})}}$$

که در آن E نمایانگر کارایی فزون‌سازی است و هنگامی که کارایی افزایش ۱۰۰ درصد باشد بدین معنی است که شمار کپی‌ها در هر سیکل دو برابر می‌شود.

محاسبه‌های آماری

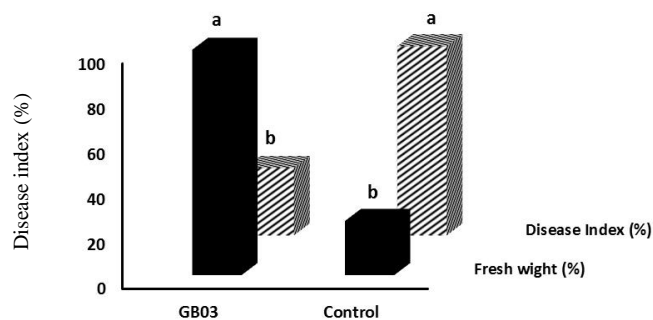
تجزیه^۱ واریانس و مقایسه^۲ میانگین صفات به روش حداقل تفاوت معنی‌دار^۲ ($P < 0/05$) و با استفاده از

3. General linear model

1. Brillion SYBR green
2. Least significant difference

Blom *et al.*,) هیدروژن خالص این فرضیه را تأیید کرد (2011). در یک گزارش گونه *Serratia odorifera* که تولید سیانید در آن قابل اغماض است باعث بازدارندگی از رشد آرابیدوپسیس شده است. این تأثیر منفی به دلیل تولید دی‌متیل دی‌سولفید و ترکیب غیر آلی آمونیاک بوده است (Girón-Calva *et al.*, 2012).

سودومونادها و کروموباکتریومها تولید می‌شود به‌عنوان عامل اصلی اثر زیانبار سودومونادهای ریزوسفر گندم در نظر گرفته شده است (Blom *et al.*, 2011). بررسی‌های بعدی روی آرابیدوپسیس با استفاده از جهش‌یافته (موتانت) سیانید هیدروژن سویه *Pseudomonas protegens* CHA0 و همچنین استفاده از سیانید

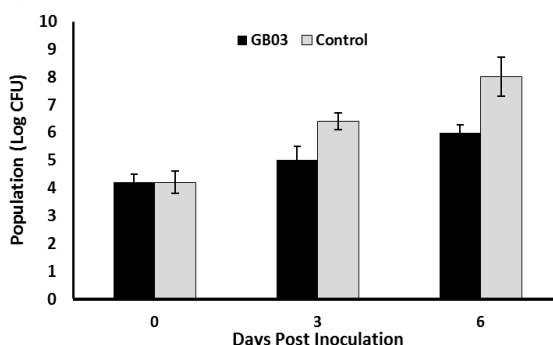


شکل ۱. تأثیر ترکیب‌های فرار سویه *Bacillus subtilis* GB03 در افزایش رشد آرابیدوپسیس و کاهش شدت بیماری باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. وزن خشک در تیمار (۳/۴ گرم) به‌عنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده است و درصد وزنی شاهد نسبت به آن سنجیده شده است.

Figure 1. Effects of volatiles from *Bacillus subtilis* GB03 on Arabidopsis growth promotion and suppression of disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

مایه‌زنی رسید (شکل ۲). تیمار با ترکیب‌های فرار گسترش بیمارگر در بافت‌های برگ‌ها را به‌صورت شایان‌توجهی کاهش داد. در تیمار با ترکیب‌های فرار پس از شش روز از مایه‌زنی جمعیت بیمارگر به $10^6 \times$ (یاخته باکتری در گرم وزن‌تر اندام‌های هوایی) رسید. این نتایج برابر با نتایج به‌دست‌آمده از ارزیابی شدت بیماری بود.

افزون بر شدت بیماری، میزان افزایش باکتری بیمارگر در بافت‌های برگ‌ها نیز با روش چندبار رقیق‌سازی انجام شد. نتایج نشان داد، در شاهد جمعیت بیمارگر در برگ‌ها به سرعت افزایش پیدا کرد و از $10^4 \times 3$ (یاخته باکتری در گرم وزن‌تر اندام‌های هوایی) در روز مایه‌زنی به $10^8 \times 1/3$ (یاخته باکتری در گرم وزن‌تر اندام‌های هوایی) در شش روز پس از



شکل ۲. تأثیر ترکیب‌های فرار سویه *Bacillus subtilis* GB03 در رشد جمعیت بیمارگر *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 در آرابیدوپسیس. جمعیت باکتری در زمان‌های معین و با استفاده از چندبار رقیق‌سازی انجام گرفت. در نهایت داده‌ها به‌صورت لگاریتم جمعیت در گرم وزن‌تر اندام‌های هوایی نشان داده شده است.

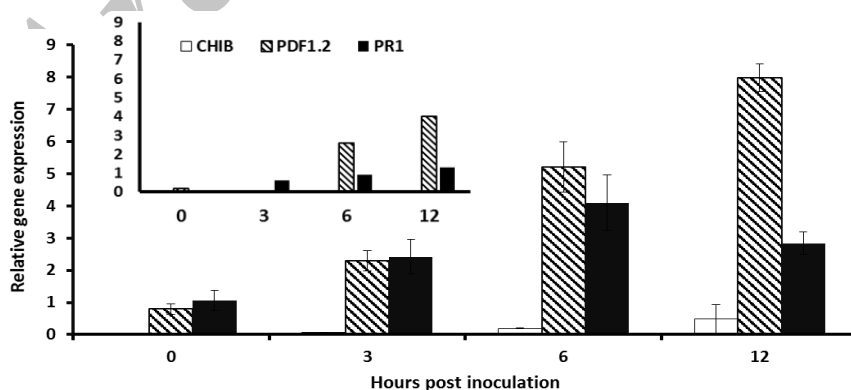
Figure 2. Effects of volatiles from *Bacillus subtilis* GB03 on population growth of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in Arabidopsis. Bacterial population have been determined by serial dilution method after 0, 3 and 6 days. Data converted to log CFU/g wet weight of aerial parts.

عامل‌های خارجی باعث می‌شود که گیاه بسیار سریع‌تر و قوی‌تر از معمول به تنش‌ها پاسخ بدهد (Conrath *et al.*, 2006). تیمار با ترکیب‌های فرار باعث افزایش بیان ژن *PDF1.2* در روبارویی با بیمارگر شد. بیان این ژن در طول زمان بررسی به صورت خطی افزایش پیدا کرد و در ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی با هشت برابر افزایش به بیشینه خود رسید. بنابراین مشخصه خاص پرایمینگ در مورد ژن *PDF1-2* نیز دیده شد. افزایش بیان ژن *PDF1-2* علیه نیمه بیوتروف‌ها معمول نیست (Pieterse *et al.*, 2012) ولی باکتری *Pseudomonas syringae* (آنتی‌بیوتیک) کروماتین آن را فعال می‌کند (Brooks *et al.*, 2005). این پادزی تقلیدکننده هورمون جاسمونیک اسید در گیاه است و از این روش باعث فعال شدن مسیر وابسته به جاسمونیک اسید در گیاه می‌شود. شایان توجه است که مسیر اتیلن در این پاتوسیستم به حالت پرایمینگ در نیامد و ترکیب‌های فرار سوپه آنتاگونیست نمی‌توانستند تغییر چشمگیری در بیان ژن *ChiB* به وجود آورند. این نتایج با کارهای پیشین همخوانی نداشت. در القای مقاومت به بیمارگر *Pectobacterium caratovorum* مسیر غالب در القای مقاومت به این بیمارگر، مسیر اتیلن بود و مسیرهای سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید تأثیر شایان توجهی نداشتند (Ryu *et al.*, 2004).

بررسی کمی بیان ژن‌های نشانگر مقاومت

میزان بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای پیام‌رسانی مختلف به صورت کمی و با استفاده از روش PCR در زمان واقعی اندازه‌گیری شد. ژن *PR-1a* به عنوان نشانگر مسیر وابسته به سالیسیلیک اسید استفاده شد. فعال شدن این مسیر بیشتر علیه بیمارگرهای بیوتروف و همی‌بیوتروف مؤثر است (Glazebrook, 2005). ژن *PDF1.2* هم توسط مسیرهای جاسمونیک اسید و اتیلن فعال می‌شود. برای جداسازی این دو مسیر آخر از هم، ژن *ChiB* نیز استفاده شد که تنها توسط مسیر اتیلن بیان می‌شود. اگر *PDF1-2* افزایش بیان داشته باشد ولی *ChiB* تحت تأثیر قرار نگیرد، نشان‌دهنده این است که تنها مسیر اسید جاسمونیک فعال شده است (Pieterse *et al.*, 2012).

پس از مایه‌زنی بیمارگر، بیان ژن *PR-1* به سرعت افزایش پیدا کرد و در شش ساعت پس از مایه‌زنی با بیش از چهار برابر افزایش به بیشینه خود رسید (شکل ۳). با گذشت زمان بیان ژن نیز کاهش پیدا کرد. با توجه به اینکه بیمارگر مورد استفاده در این پژوهش یک بیمارگر نیمه بیوتروف است، مسیر سالیسیلیک اسید که نشانگر آن ژن *PR-1* است علیه آن بیشتر مؤثر است. همان‌طور که از الگوی بیان ژن *PR-1* مشخص است این ژن حالت مشخص پرایمینگ را نشان داده است. در پرایمینگ، القاء گیاه توسط



شکل ۳. تأثیر ترکیب‌های فرار بر بیان نسبی ژن‌های مقاومت *PR1*، *PDF1.2* و *CHIB* به ترتیب مرتبط با مسیرهای سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن. بیان ژن‌ها از زمان ۰-۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی بیمارگر اندازه‌گیری شد. گراف داخلی مربوط به بیان ژن‌ها در شاهد بدون تیمار با ترکیب‌های فرار است.

Figure 3. Effects of *B. subtilis* volatiles on relative expression of *PR1*, *PDF1.2*, and *CHIB* as markers of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene, respectively. Gene expression assessed 0-12 hours post pathogen inoculation. Internal graph represents gene expression in control.

نتیجه‌گیری کلی

یکی از کاستی‌های القای مقاومت سیستمیک در گیاه به‌ویژه به‌واسطهٔ مواد شیمیایی و بیمارگرها، هزینه‌های است که این مقاومت به گیاه تحمیل می‌کند و در پی آن باعث کاهش رشد گیاه می‌شود (Heil, 2002). گزارش‌ها در مورد مواد القاکنندهٔ مقاومت همانند BTH و INA نشان می‌دهند که این مواد به‌محض کاربرد باعث فعال شدن واکنش‌های دفاعی در گیاه می‌شوند که نتیجهٔ ظاهری آن با کاهش رشد گیاهچه‌ها شایان ارزیابی است (Hahm et al., 2012). علت این پدیده را چنین تفسیر می‌کنند که گیاه منابع محدودی دارد و صرف این منابع در واکنش مقاومت باعث خارج شدن این منابع از مسیر افزایش رشد گیاه می‌شود. در حقیقت گیاه سازوکاری را برای تخصیص هزینه‌ها استوار کرده است که در نبود بیمارگر مقاومت گیاه در حالت کمینه قرار می‌گیرد. حال فعال کردن مقاومت با القاکننده‌ها و در نبود بیمارگر باعث تحمیل هزینه‌های اضافی به گیاه می‌شود (Heil, 2001). البته در مورد القای مقاومت با باکتری‌های محرک رشد گیاه به‌طور معمول کاهش رشد دیده نمی‌شود. در این پژوهش القای مقاومت با ترکیب‌های فرار سویهٔ *B. subtilis* GB03 نه‌تنها باعث کاهش رشد گیاه نشد، بلکه نسبت به شاهد رشد آن چند برابر افزایش پیدا کرد. برای تفسیر این نتیجه امکان بروز پدیدهٔ

پرایمینگ در گیاه، با ارزیابی ژن‌های نشانگر بررسی شد. بنابر تعریف، در گیاه پیش‌تیمار شده با عامل القاکننده، تغییر چشم‌گیری در بیان ژن‌های مقاومت دیده نمی‌شود. اما با تلقیح بیمارگر، ژن‌های مقاومت افزایش بیان سریعی را نسبت به حالت پیش‌تیمارنشده نشان می‌دهند (Conrath, 2011). به عبارتی پرایمینگ باعث پاسخ سریع‌تر و قوی‌تر به بیمارگر می‌شود. در این پژوهش نیز قرار گرفتن آرابیدوپسیس در معرض ترکیب‌های فرار سویهٔ *B. subtilis* GB03 باعث تغییر چشمگیری در بیان ژن‌های مقاومت نشد. اما با تلقیح بیمارگر بیان ژن‌های نشانگر به‌ویژه ژن‌های *PDF1.2* و *PR1* به‌سرعت افزایش پیدا کرد و در کمترین زمان ۶ یا ۱۲ ساعت به بیشینهٔ خود رسیدند. در گیاهچه‌های پیش‌تیمارنشده این افزایش بیان با تأخیر صورت گرفت و هیچ‌گاه به آن بیشینه نرسید. با توجه به این تفسیرها می‌توان چنین نتیجه گرفت که علت کاهش نیافتن رشد گیاه در تیمار با ترکیب‌های فرار سویهٔ *B. subtilis* GB03، سویای از تأثیر محرک رشدی آن‌ها در بروز پدیدهٔ پرایمینگ توسط این ترکیب‌ها است. ترکیب‌های فرار به‌جای اینکه باعث افزایش مستقیم بیان ژن‌های دفاعی شوند و از این بابت هزینه‌های بی‌خودی را به گیاه تحمیل کنند، تنها واکنش دفاعی گیاه را به حالت آماده‌باش در می‌آورند و تنها در زمان حضور بیمارگر این واکنش‌ها به فعل می‌رسند.

REFERENCES

- Blom, D., Fabbri, C., Eberl, L. & Weisskopf, L. (2011). Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Applied Environmental Microbiology*, 77, 1000-1008.
- Brooks, D. M., Bender, C. L. & Kunkel, B. N. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* 6, 629-639.
- Cho, S. M., Kang, B. R., Han, S. H., Anderson, A. J., Park, J. Y., Lee, Y. H., Cho, B. H., Yang, K. Y., Ryu, C. M. & Kim, Y. C. (2008). 2R, 3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 21, 1067-1075.
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, 16, 524-531.
- Conrath, U., Beckers, G. J., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M. A., Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., Pozo, M. J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L. & Mauch-Mani, B. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 19, 1062-1071.
- Conrath, U., Beckers, G.J., Langenbach, C. J. & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 97-117.
- Girón-Calva, P. S., Molina-Torres, J. & Heil, M. (2012). Volatile dose and exposure time impact perception in neighboring plants. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 226-228.

8. Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.
9. Hahm, M. S., Sumayo, M., Hwang, Y. J., Jeon, S. A., Park, S. J., Lee, J. Y., Ahn, J. H., Kim, B. S., Ryu, C. M. & Ghim, S. Y. (2012). Biological control and plant growth promoting capacity of rhizobacteria on pepper under greenhouse and field conditions. *Journal of Microbiology*, 50, 380-385.
10. Heil, M. (2001). The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *European Journal of Plant Pathology*, 107, 137-146.
11. Heil, M. (2002). Ecological costs of induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 345-350.
12. Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B. & Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 1001-1012.
13. Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. & Takabayashi, J. (2007). Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 35-37.
14. Lee, B., Farag, M. A., Park, H. B., Kloepper, J. W., Lee, S. H. & Ryu, C. M. (2012). Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS One* 7, e48744.
15. Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J.T. & Erbs, G. (2013). MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern) triggered immunity in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-25.
16. Ongena, M. & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides versatile weapon for plant disease control. *Trends in microbiology*, 16, 115-125.
17. Pieterse, C. M., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489-521.
18. Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L., Kunjeti, S. G., Donofrio, N. M., Czymbek, K. J., Paul, W. P. & Bais, H. P. (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative and Integrative Biology*, 3, 130-138.
19. Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W. & Pare, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134, 1017-1026.
20. Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W. & Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4927-4932.
21. Schulz, S. & Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 24, 814-842.
22. Song, G. C., Choi, H. K. & Ryu, C.-M. (2015). Gaseous 3-pentanol primes plant immunity against a bacterial speck pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* via salicylic acid and jasmonic acid-dependent signaling pathways in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science* 6:821. doi: 10.3389/fpls.2015.00821
23. Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology Letters* 2, 194-208.
24. Vespermann, A., Kai, M. & Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5639-5641.