Archive of SID

کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۴، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴ (۲۲-۱۳)

تأثیر احساس برخی الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب شناخته‌شده در افزایش مقاومت گیاه آرابیدوپسیس

۱. وحید فلاح‌زاده ممقانی*؛ ۲. مسعود احمدزاده؛ ۳. کیوان بهبودی
۱. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
۲ و ۳. استاد و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۵/۶)

چکیده

الگوی‌های مولکولی مرتبط با میکروب (Microbe-associated molecular patterns-MAMPs) نقش کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی ذاتی (Innate immunity) در جانوران و به‌صورت مشابهی، به‌عنوان انگیزنده‌های (Elicitors) پاسخ‌های دفاعی در گیاهان دارند. با وجود این، بررسی‌های زیادی دربارهٔ اهمیت واقعی آن‌ها در مقاومت گیاه نسبت به بیمارگرها وجود ندارد. در این تحقیق اثر مشتقات فاکتور نسخه‌برداری Ef-Tu و فلاژلین به‌عنوان MAMPهای شناخته‌شده، در افزایش مقاومت گیاه آرابیدوپسیس نسبت به بیمارگرهای مهم قارچی و باکتریایی بررسی شد. پیش‌تیمار گیاهان Col-0 با هر دو MAMP به‌صورت معنی‌داری مقاومت گیاهان نسبت به قارچ‌های *Botrytis cinerea* و *Alternaria brassicicola* را افزایش داد. پیش‌تیمار برگ‌های Col-0 با هر دو MAMP، منحنی رشد باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC3000) را به‌صورت معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد و باعث کاهش سرعت رشد آن شد. علاوه بر این، جمعیت باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*306) که به‌عنوان غیربیماریزا روی آرابیدوپسیس مطرح است، در برگ‌های گیاهان وحشی که با MAMPها تیمار نشده بودند، بدون تغییر باقی ماند و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح، نه کاهش و نه افزایش نشان داد. هرچند پیش‌تیمار برگ‌های این گیاه با elf18 به کاهش جمعیت باکتری منجر شد. نتایج این تحقیق نقش ایمنی ذاتی در افزایش مقاومت گیاه نسبت به بیمارگرها را نشان داد.

کلیدواژگان: آرابیدوپسیس، ایمنی ذاتی، MAMP، *Pseudomonas*، *Xanthomonas*، *Botrytis*، *Alternaria*

مقدمه

گیاهان پیوسته در معرض بیمارگرهای میکروبی قرار دارند، با این حال، آن‌ها نسبت به بسیاری از میکروب‌ها مقاوم‌اند. بدیهی است که گیاهان سدها و مکانیزم‌های دفاعی کارآمدی علیه این میکروب‌ها دارند. میکروب‌ها برای دسترسی به گیاه روش‌هایی را برای ورود از طریق زخم‌ها، منافذ و روزنه‌های هوایی یا نفوذ فعال از طریق سطح برگ یا ریشه دارند. با این حال، بعد از قرارگیری در داخل گیاه نیز بیمارگر با سدهای دفاعی همچون دیوارهٔ سلولی یا متابولیت‌های ثانویه قرار می‌گیرد

* تلفن: ۰۴۱۳۴۳۲۷۵۰۰
E-mail: fallahzadeh@azruniv.edu

www.SID.ir

Archive of SID

(Nuernberger and Lipka 2005). علاوه بر این سدهای دائمی، گیاهان یک‌سری سیستم‌های دفاعی قابل تحریک هم دارند که در زمان احساس میکروب‌ها توسط گیاه وارد عمل می‌شوند. گیاهان برای شناسایی میکروب‌ها گیرنده‌های شناساگر الگو (Pattern recognition receptors-PRR) در غشای پلاسمایی دارند که الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب (Microbe-associated molecular patterns-MAMPs) را از طریق دامنه‌های (Domains) خارج‌سلولی شناسایی و پیام‌رسانی داخل‌سلولی برای تحریک واکنش‌های دفاعی را فعال می‌کنند. این فرآیندها به‌عنوان ایمنی القاشده از طریق MAMP (MAMP triggered immunity-PTI) نامیده می‌شوند (Chisholm *et al.* 2006, Jones and Dangl 2006).

شناسایی MAMPها واکنش‌های دفاعی را از طریق عناصر میانی همچون نشر یونی در طول غشای پلاسمایی، بیوسنتز اتیلن و تحریک آبشار کینازهای پروتئینی فعال‌شونده توسط میتوژن (mitogen-activated protein kinase-MAPK) فعال می‌کنند. واکنش‌های دفاعی معمول گیاه تولید فرم‌های فعال اکسیژن (ROS)، تجمع کالوز و تحریک نسخه‌برداری ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین‌هایی همچون دیفنسین (پروتئین‌های ضدمیکروبی)، آنزیم‌های لیتیک و آنزیم‌های سنتزکنندهٔ فیتوالکسین‌ها (متابولیت‌های ثانویهٔ ضد میکروبی) است (Nurnberger *et al.* 2004). وقایع اولیه در انتقال پیام (Signal transduction) عبارتند از: فسفوریلاسیون پروتئین (Felix *et al.* 1999)، تغییرات نفوذپذیری یونی غشای پلاسمایی که به نشر به سمت بیرون K^+ و Cl^- و نشر به سمت داخل H^+ و Ca^{2+} منجر می‌شود و فضای بین‌سلولی را قلیایی می‌کند (Jabs *et al*. 1997, Sacks *et al.* 1993, Zimmermann *et al.* 2007) افزایش تولید اتیلن و انفجار اکسیداتیو (Oxidative burst) (Dixon *et al.* 1994, Felix *et al.* 1992). در مقایسه با دفاع وابسته به ژن R، پاسخ‌ها به انگیزنده‌های عمومی همیشه به‌صورت مرگ‌سلولی همراه با واکنش فوق حساسیت ظاهر نمی‌شود و نقش دقیق انگیزنده‌های عمومی در مقاومت گیاه نسبت به بیماری‌ها کمتر شناخته شده است. از جمله MAMPهای شناخته‌شده که به‌عنوان انگیزنده‌های عمومی در گیاهان عمل می‌کنند عبارتند از: کیتین (Felix *et al*. 1993) و ارگسترول (Granado *et al.* 1995) در قارچ‌ها و فلاژلین (Felix *et al.* 1999) و لیپوپلی‌ساکارید (Dow *et al.* 2000) از باکتری‌ها. یک زیردامنهٔ بسیار محافظت‌شده از انتهای آمینی فلاژلین توسط بسیاری از گیاهان به‌عنوان MAMP شناخته می‌شود. پپتیدهای سنتزشدهٔ ۱۵ (flg15) و ۲۲ (flg22) آمینواسیدی که این زیردامنه را پوشش می‌دهند در غلظت‌های زیر نانومولار فعال‌اند (Felix *et al.* 1999). فاکتور نسخه‌برداری EF-Tu باکتری‌ها، MAMP توصیف‌شدهٔ دیگری است که از استرینی از *E. coli* خالص‌سازی شد که در آن ژن FliC (مسئول سنتز زیرواحد سازندهٔ فلاژلین) حذف شده است و هنوز می‌تواند پاسخ‌های دفاعی اولیه در آرابیدوپسیس را تحریک کند (Kunze *et al.* 2004). قسمت فعال این پروتئین ناحیه‌ای ۱۸ آمینواسیدی استیله در انتهای آمینی است که توسط گیرنده‌ای به نام EFR (EF-Tu receptor) در غلظت‌های پیکومولار احساس می‌شود.

در این تحقیق اثر احساس پپتیدهای flg22 و elf18 به‌عنوان ناحیهٔ فعال MAMPهای شناخته‌شده در افزایش مقاومت گیاه *Arabidopsis thaliana* نسبت به چهار بیمارگر قارچی و باکتریایی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

گیاهان جهش‌یافته، پپتیدها و بیمارگرها

پپتیدهای مورد استفاده در این آزمایش توسط شرکت Genscript (Piscataway, USA) سنتز شدند و استوک‌های آن با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار در آب دیونیزه تهیه شد. elf18 و flg22 به‌عنوان مشتقات کاملاً فعال EF-Tu و فلاژلین استفاده شدند.

گیاهان آرابیدوپسیس (Col-0) موتانت *fls2* (بدون گیرندهٔ تاژک) و *efr-1*که با الحاق T-DNA تهیه شده بودند (Heese *et al.* 2007, Zipfel *et al.* 2006)، از مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی گیاهی آلمان (ZMBP) تهیه شدند.

قارچ‌های بیمارگر *Botrytis cinerea* و *Alternaria brassicicola* و همچنین، باکتری *Pseudomonas*

www.SID.ir

Archive of SID

syringae pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) و *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 (XAC 306) از کلکسیون بیمارگرهای گیاهی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی گیاهی آلمان تهیه شدند (Jehle *et al.* 2013).

اثر elf18 و flg22 بر رشد قارچ‌های بیمارگر در محیط کشت مایع

Botrytis cinerea و *Alternaria brassicicola* روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) در دمای ۲۲ درجهٔ سلسیوس کشت شدند. کنیدی‌ها به‌آرامی از کشت‌های هشت‌روزه روی PDA جمع‌آوری شدند و در محیط مایع عصارهٔ سیب‌زمینی دکستروز (PDB) که با ۰/۱ درصد توئین ۸۰ (Tween 80) همراه شده بود تعلیق شدند. سوسپانسیون به‌دست‌آمده از پارچهٔ مخصوص (Miracloth, Merck) عبور داده شد تا اسپورهای قارچی از آگار تفکیک شوند. غلظت اسپورها به میزان 10^5 کنیدی در هر میلی‌لیتر تنظیم و استفاده شد. ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر PDB با غلظت‌های مختلفی از flg22 و elf18 با ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کنیدیایی تلقیح شدند و در شیکر انکوباتور به‌مدت پنج روز در دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. میسلیوم‌ها روی فیلترهای توزین‌شده واتمن شمارهٔ ۱ جمع‌آوری شدند و با آب مقطر استریل شست‌وشو شدند. فیلترهای میسلیوم‌دار در داخل پتری‌های شیشه‌ای قرار داده شدند. ابتدا، به‌مدت ۶ ساعت در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد و سپس، یک شب در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت، وزن خشک میسلیوم‌ها تعیین شدند (Abdelillah *et al.* 2013).

اثر elf18 و flg22 بر منحنی رشد باکتری‌ها در محیط کشت مایع

ایزوله‌های باکتری روی محیط کشت LB آگار حاوی ریفامپسین (در مورد *Pst* DC3000) و جنتامایسین (در مورد *XAC* 306) کشت شدند و یک تک کلون از این محیط‌ها به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع منتقل و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت یک شب در شیکر انکوباتور قرار داده شد. از این کشت‌های سلولی سوسپانسیون‌هایی با جمعیت 10^5 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شد و برای مایه‌زنی محیط کشت‌های حاوی پپتیدها استفاده شد. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف پپتیدها بر منحنی رشد باکتری‌ها، ارلن‌هایی با ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB آنتی‌بیوتیک‌دار و همراه‌شده با غلظت‌های مختلف elf18 و flg22 با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی تهیه‌شده، مایه‌زنی شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت، قرار داده شدند. در طول این مدت برای اندازه‌گیری جذب نوری محیط کشت‌ها، نمونه‌های ۱۰۰ میکرولیتری از محیط‌های کشت گرفته شده و با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد.

کشت گیاهان

بذور گیاهان وحشی و جهش‌یافته *A. thaliana* در خاک GS 90 (Gebrüder Patzer, Sinntal-Jossa, Germany) حاوی ورمیکولیت (به نسبت ۵ قسمت ورمیکولیت در ۲۱ قسمت خاک) که با حشره‌کش کنفیدور (Confidor) ۰/۰۳۵ درصد آبیاری شده بود، کشت شدند. برای دو هفتهٔ اول، گیاهان در داخل اتاقک کشت Percival با شرایط روزکوتاه (دورهٔ نوری ۸ ساعته، دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵ درصد) قرار داده شدند و سپس، به‌مدت ۵ هفته در اتاقک اقلیمی (دورهٔ نوری ۸ ساعته، دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵۰ درصد) قرار داده شدند.

آزمون‌های رشد باکتریایی

باکتری‌های (Pst DC3000) (با ژن مقاومت به ریفامپسین) و *Xanthomonas axonopidis* pv. *citri* 306 (*Xac* 306) (با ژن مقاومت به جنتامایسین) روی تشتک‌های حاوی محیط کشت LB با آنتی‌بیوتیک‌های مربوطه کشت شدند و بعد از رشد، تک‌کلنی‌هایی از باکتری‌ها به محیط مایع LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مربوطه منتقل شدند و به‌مدت ۲۰ ساعت، در شیکر انکوباتور به‌ترتیب با دمای ۲۸ و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. باکتری‌ها با سانتریفیوژ جمع‌آوری و در محلول ۱۰ میلی‌مولار $MgCl_2$ تعلیق شدند. غلظت آن‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

به میزان 10^5 سلول در میلی‌لیتر تنظیم شد. بعد از محلول‌پاشی گیاهان با محلول‌های ۱۰ میکرومولار پپتیدها و آب دیونیزه (به‌عنوان شاهد)، گیاهان به‌مدت ۱۲ ساعت، در اتاقک کشت تحت شرایط رطوبت اشباع قرار داده شدند. سپس، سوسپانسیون باکتری‌های تهیه‌شده با سرنگ به برگ‌های گیاهان تزریق شدند تا بخشی از برگ‌ها به حالت آب‌سوخته درآید. محلول ۱۰ میلی‌مولار کلریدمنیزیم نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. بعد از تزریق باکتری‌ها، برگ‌ها در زمان‌های مختلف جمع‌آوری شدند و بعد از ضد عفونی سطحی (۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد) و شست‌وشو با آب دیونیزه، جمعیت باکتری‌ها در داخل آن‌ها ارزیابی شد.

کشت قارچ‌ها و مایه‌زنی گیاهان

سوسپانسیون کنیدی قارچ‌های *B. cinerea* و *A. brassicicola* طبق روش توضیح داده‌شده، تهیه شد. در هنگام مایه‌زنی سوسپانسیون کنیدی *B. cinerea* با محیط PDB به میزان 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم و استفاده شد. اسپورهای *A. brassicicola* نیز با آب دیونیزهٔ سترون به میزان مشابهی رقیق‌سازی شدند. بعد از محلول‌پاشی گیاهان با محلول ۱۰ میکرومولار پپتیدها و آب دیونیزه (به‌عنوان شاهد) گیاهان به‌مدت ۱۲ ساعت، در اتاقک کشت تحت شرایط رطوبت اشباع قرار داده شدند. برای مایه‌زنی، هر برگ با دو قطرهٔ ۵ میکرولیتری از سوسپانسیون اسپور قارچی مایه‌زنی شدند. گیاهان مایه‌زنی‌شده در رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد، ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و شرایط روزکوتاه نگه‌داری شدند. شدت بیماری در مورد *B. cinerea* سه روز بعد از مایه‌زنی، براساس اندازه‌گیری قطر لکه‌ها و در مورد *A. brassicicola* هفت روز بعد از مایه‌زنی، براساس ناحیهٔ تخریب‌شدهٔ برگ ارزیابی شد.

نتایج

elf18 و flg22 اثر مستقیم بازدارنده بر رشد باکتریایی و قارچی نداشتند

قبل از بررسی اثر پپتیدها بر بیماریزایی بیمارگرهای قارچی و باکتریایی در آرابیدوپسیس، اثر مستقیم آن‌ها بر این بیمارگرها در محیط کشت مایع بررسی شد. وجود غلظت‌های مختلف پپتیدها در محیط کشت PDB هیچ اثر معنی‌داری بر وزن خشک نهایی میسلیوم بیمارگرهای قارچی نداشت (شکل ۱ـ الف و ب). نتایج مشابهی در آزمون رشد باکتریایی مشاهده شد و الگوی منحنی رشد هر دو بیمارگرهای باکتریایی در محیط کشت LB معمولی و محیط کشت LB همراه‌شده با پپتیدها مشابه بود (شکل ۲ـ الف و ب).

اثر MAMPها بر بیماریزایی بیمارگرهای قارچی

برای بررسی اینکه آیا ادراک فلاژلین و Ef-Tu می‌تواند مقاومت گیاه آرابیدوپسیس را علیه بیمارگرهای قارچی افزایش دهد، گیاهان آرابیدوپسیس وحشی Col-0 و جهش‌یافته‌های efr1 (بدون گیرندهٔ EF-Tu) و fls2-17 (بدون گیرندهٔ تاژک) با پپتیدهای مربوطه پیش‌تیمار شدند و بعد از ۱۲ ساعت، گیاهان با بیمارگرهای قارچی مایه‌زنی شدند. همان‌طور که در شکل ۳ قابل مشاهده است، قطر لکه‌های ایجادشده توسط *B. cinerea* روی گیاهان Col-0 که با flg22 تیمار شده بودند به میزان ۳۳ درصد کمتر از آن‌هایی است که با محیط کشت PDB (به‌عنوان شاهد) تیمار شده‌اند. مقاومت گیاهان وحشی که با elf18 پیش‌تیمار شده بودند، بیشتر از آن‌هایی بودند که با flg22 تیمار شده بودند و متوسط قطر لکه‌ها در این گیاهان ۲ میلی‌متر بود. پیش‌تیمار گیاهان جهش‌یافته با هیچ‌کدام از پپتیدها اثر معنی‌داری بر مقاومت آن‌ها علیه *B. cinerea* نداشت (شکل ۳ـ الف و ب). نتایج حاصل از زیست‌سنجی آزمون بیماریزایی *A. brassicicola* نیز کمابیش مشابه بیماریزایی *B. cinerea* بود (شکل ۴ـ الف و ب). پیش‌تیمار گیاهان جهش‌یافته با پپتیدها هیچ اثری بر بیماریزایی این بیمارگر نداشت، اما پیش‌تیمار گیاهان وحشی Col-0 با flg22 به کاهش ۴۱ درصدی و با elf18 به کاهش ۲۴ درصدی قطر لکه‌ها منجر شدند. میزان تأثیرگذاری flg22 در این آزمون بیشتر از میزان تأثیرگذاری آن در آزمون *Botrytis* بود.

اثرMAMPها بر منحنی رشد باکتری‌های بیماریزا در برگ‌های آرابیدوپسیس

گیاهان آرابیدوپسیس وحشی و جهش‌یافته، طبق

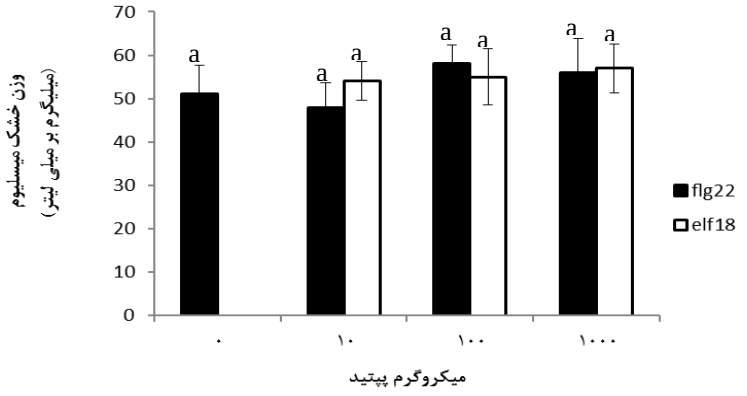
www.SID.ir

Archive of SID

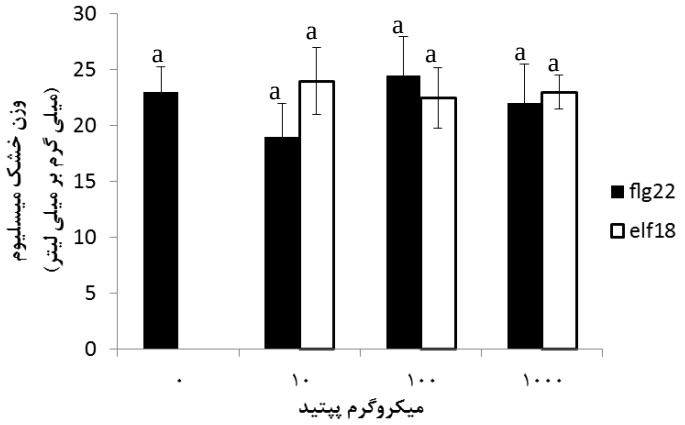
توضیحات داده‌شده، با پپتیدها تیمار شدند و بعد از ۱۲ساعت، با استفاده از سرنگ بدون سوزن با باکتری *Pst* DC3000 مایه‌زنی شدند. بعد از انجام مایه‌زنی، برگ‌های مایه‌زنی‌شده در زمان‌های مختلف برداشت شدند تا رشد باکتری در داخل آن‌ها ارزیابی شود. رشد باکتری به‌صورت چشمگیری در برگ‌های گیاهان وحشی پیش‌تیمارشده با flg22 (به میزان ۴۴ برابر) و elf18 (۱۴۰به میزان برابر) کاهش پیدا کرد (شکل ۵ـ الف). پیش‌تیمار گیاهان fls2-17 و elr1، به‌ترتیب با پپتیدهای flg22 و elf18 اثر معنی‌داری بر تکثیر و جمعیت باکتری، به‌ترتیب در جهش‌یافته‌های fls2-17 و efr1 نداشت و جمعیت باکتری در بوته‌های شاهد تیمارشده با آب مقطر سترون و بوته‌های تیمارشده با پپتیدها یکسان بود (شکل ۵ـ ب).

اثر MAMPها بر منحنی رشد یک باکتری غیربیماریزا در برگ‌های آرابیدوپسیس

برای مشاهدهٔ اینکه پیش‌تیمار گیاه آرابیدوپسیس با MAMPها، اثری بر منحنی رشد یک باکتری غیربیماریزا در برگ‌های آرابیدوپسیس دارد، استرین 306 *Xac* به‌عنوان یک بیمارگر ناسازگار استفاده شد. جمعیت این باکتری بعد از گذشت سه روز از زمان مایه‌زنی روی گیاهان وحشی و جهش‌یافته، تغییری نکرد (شکل ۶). با این حال، پیش‌تیمار گیاهان وحشی با elf18 توانست به‌صورت معنی‌داری تراکم سلولی باکتری را بعد از ۲۴ ساعت، کاهش دهد (شکل ۶، A). تراکم سلولی در گیاهان وحشی پیش‌تیمارشده با آب و گیاهان جهش‌یافتهٔ تیمارشده با پپتیدها یا آب ثابت بود و تا ۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی، ثابت بود (شکل ۶ـ الف و ب).



(الف)

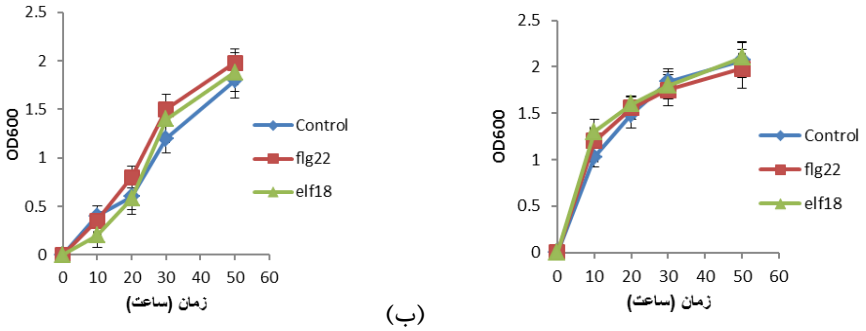


(ب)

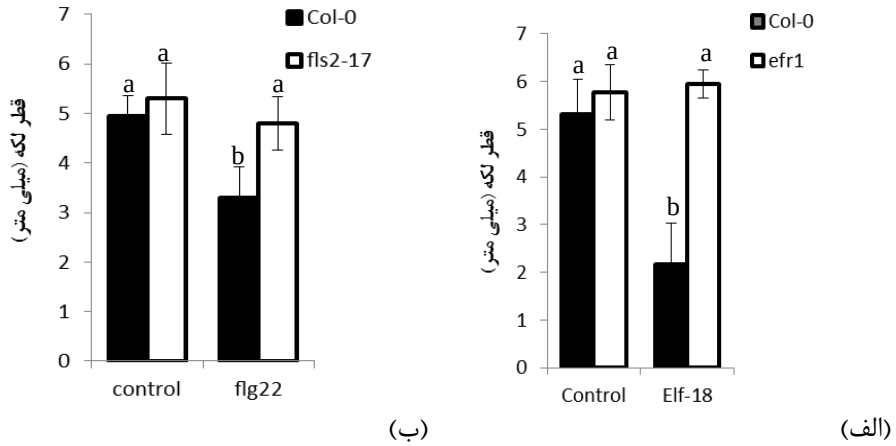
شکل ۱. اثر مستقیم elf18 و flg22 بر وزن خشک میسلیومی *B. cinerea* (الف) و *A. brassicicola* در محیط کشت عصارهٔ سیب‌زمینی دکستروز بعد از پنج روز (ب). ستون‌ها و نوار خطاها، نشان‌دهندهٔ میانگین‌ها و انحراف معیارها هستند. حروف مشابه بیانگر نداشتن اختلاف آماری در سطح ۵ درصد هستند (تعیین‌شده با آزمون فیشر).

www.SID.ir

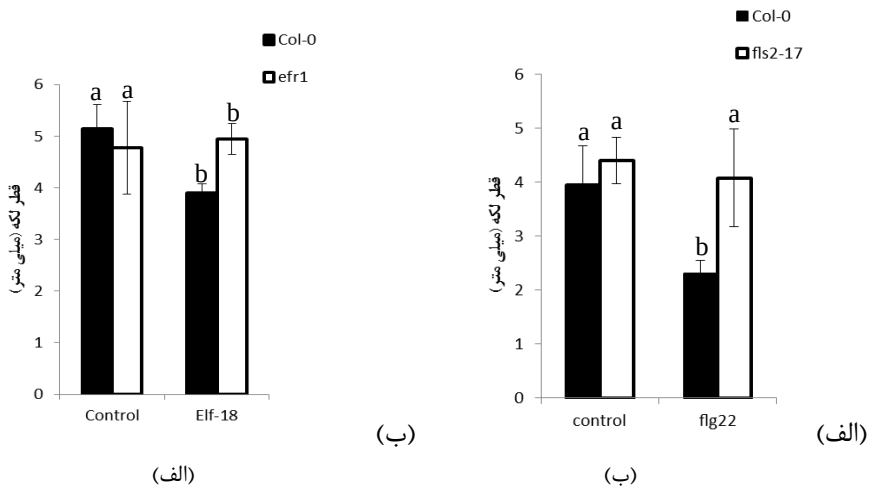
Archive of SID



شکل ۲. اثر مستقیم elf18 و flg22 بر منحنی رشد *Pst* DC3000 (الف) و *Xac* 306 (ب) در محیط کشت LB در طول ۴۸ ساعت. منحنی‌ها نشان‌دهندهٔ میانگین‌ها و نوارهای خطا نشان‌دهندهٔ انحراف معیار هستند.



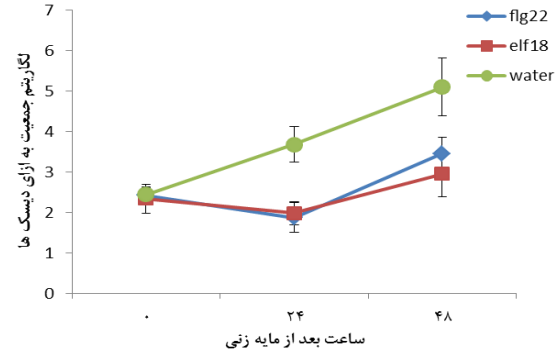
شکل ۳. اثر elf18 (الف) و flg22 (ب) بر مقاومت گیاهان *A. taliana* علیه *B. cinerea*. گیاهان وحشی *A. thaliana* (Col-0) و جهش یافته‌های آن‌ها با ۱۰ میکرومولار flg22 و elf18 محلول‌پاشی شدند و بعد از ۱۲ ساعت، با قارچ *B. cinerea* مایه‌زنی شدند. ستون‌ها و نوار خطاها، نشان‌دهندهٔ میانگین‌ها و انحراف معیارها هستند. حروف مشابه بیانگر نداشتن اختلاف آماری در سطح ۵ درصد هستند (تعیین‌شده با آزمون فیشر).



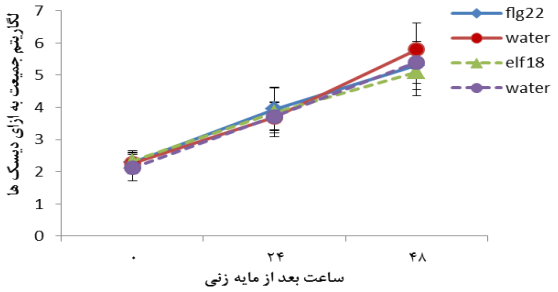
شکل ۴. اثر elf18 (الف) و flg22 (ب) بر مقاومت گیاه *A. thaliana* علیه *A. brassicicola*. گیاهان وحشی *A. thaliana* (Col-0) و گیاهان جهش‌یافته با ۱۰ میکرومولار flg22 و elf18 محلول‌پاشی شدند و بعد از ۱۲ ساعت، با قارچ *A. brassicicola* مایه‌زنی شدند. ستون‌ها و نوار خطاها، نشان‌دهندهٔ میانگین‌ها و انحراف معیارها هستند. حروف مشابه بیانگر نداشتن اختلاف آماری در سطح ۵ درصد هستند (تعیین‌شده با آزمون فیشر).

www.SID.ir

Archive of SID

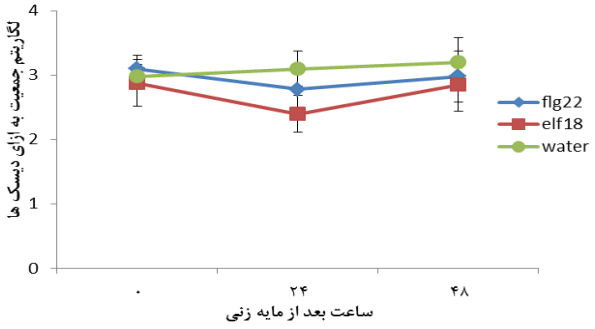


(الف)

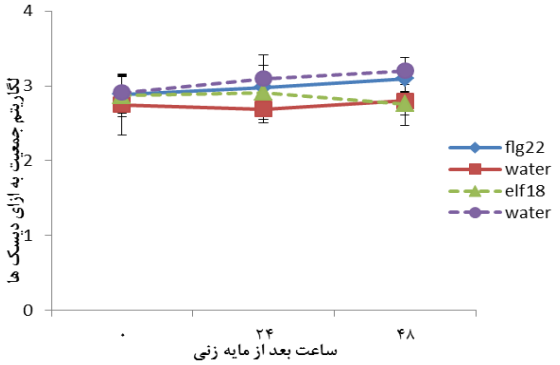


(ب)

شکل ۵. اثر elf18 و flg22 بر مقاومت گیاه *A. thaliana* علیه *Pst* DC3000. گیاهان تیپ وحشی *A. thaliana* (الف)، و جهش یافته‌های efr1 (ب، خطوط منقطع) و fls2-17 (ب، خطوط ممتد) با ۱۰ میکرومولار flg22 و elf18 محلول‌پاشی شدند و بعد از ۱۲ ساعت، با باکتری *Pst* DC3000 مایه‌زنی شدند. منحنی‌ها میانگین‌ها (تعداد تکرار=۸) و نوار خطاها انحراف معیار را نشان می‌دهند.



(الف)



(ب)

شکل ۶. اثر elf18 و flg22 بر مقاومت گیاه *A. thaliana* علیه *Xac* 306. گیاهان تیپ وحشی *A. thaliana* (الف)، و جهش‌یافته‌های efr1 (ب، خطوط منقطع) و fls2-17 (ب، خطوط ممتد) با ۱۰ میکرومولار flg22 و elf18 محلول‌پاشی شدند و بعد از ۱۲ ساعت، با باکتری *Xac* 306 مایه‌زنی شدند. منحنی‌ها میانگین‌ها (تعداد تکرار=۸) و نوار خطاها انحراف معیار را نشان می‌دهند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

گیاهان در طبیعت در معرض دستهٔ وسیعی از میکروب‌ها هستند و با آن‌ها تعامل دارند. بسیاری از این میکروب‌ها ممکن است بیمارگرهای بالقوه علیه هرکدام از گیاهانی باشند که باید از خود دفاع کنند. در سال‌های اخیر، دیدگاه جدیدی از دفاع گیاهی علیه میکروب‌ها شکل گرفته است که در آن، گیاه پاسخ‌های دفاعی علیه میکروب‌ها را به‌صورت چندلایه‌ای از خود نشان می‌دهد. همچنین، دفاع مرتبط با واکنش فوق حساسیت (HR) در دهه‌های اخیر، بیشترین توجه را به خود اختصاص داده است. با وجود این، کشف اینکه گیاهان می‌توانند MAMPها را ادراک کنند، به افزایش فهم ما از پدیده‌ای به نام ایمنی ذاتی (innate immunity) منجر شده است (Underwood, 2006).

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که ایمنی ذاتی می‌تواند نقش اساسی در مقاومت گیاه علیه دستهٔ وسیعی از بیمارگرها داشته باشد. پیش‌تیمار گیاهان Col-0 با هر دوی MAMPهای شناخته‌شده، به‌صورت معنی‌داری مقاومت آن‌ها علیه قارچ‌های *B. cinerea* و *A. brassicicola* را افزایش داد که در این تحقیق به‌عنوان بیمارگرهای قارچی مدل استفاده شدند.

تیمار گیاهان آرابیدوپسیس با flg22 به قلیایی‌شدن فضای خارج‌سلولی (Felix *et al.* 1999)، تجمع کالوز، تولید و افزایش پروتئین دفاعی PR1 و انفجار اکسیداتیوی منجر می‌شود (Gomez-Gomez *et al.* 1999). در تحقیقات مختلفی کالوز به‌عنوان یک پاسخ ساختاری افزایش مقاومت توسط گیاه برای جلوگیری از نفوذ قارچ شناخته شده است (Aist, 1976; Bayles *et al.* 1990; Beckman *et al.* 1982; Stanghellini and Aragaki, 1966). این فرضیه با بررسی‌های Bayles *et al.* (1990) قوت گرفت که در آن بازداری از سنتز کالوز با 2-deolly-D-glucose (DDG) در گیاهان مقاوم به افزایش قدرت نفوذ قارچ بیمارگر منجر شد. Alexander *et al.* (1993) گزارش کردند که گیاه ترنسژنیک *N. tabacum* cv Xanthi nc، که به‌صورت پیوسته پروتئین PR-1a را تولید می‌کرد، علیه بیمارگرهای *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* و *Peronospora tabacina* مقاومت بالاتری نسبت به گیاه وحشی نشان داد. همچنین، Niderman *et al.* (1995) فعالیت ضد قارچی پروتئین‌های PR-1 توتون و تنباکو را علیه *Phytophthora infestance* نشان دادند. فرم‌های فعال اکسیژن (انفجاری اکسیداتیوی) می‌توانند به‌صورت مستقیم علیه بیمارگرها بازدارنده باشند یا به‌صورت غیرمستقیم با ایجاد اتصالات عرضی در دیوارهٔ سلولی به افزایش مقاومت گیاه علیه آن‌ها منجر شوند. علاوه بر این فرم‌های فعال اکسیژن ممکن است به‌عنوان سیگنال‌های استرس ثانویه برای تحریک پاسخ‌های دفاعی میزبان عمل کنند (Apel and Hirt 2004).

میکروارگانیسم مدل دیگری که در این تحقیق استفاده شد، *Pst* DC3000 بود. این باکتری که عامل بیماری لکه‌باکتریایی گوجه‌فرنگی است، به‌دلیل قابلیت بیماریزایی روی آرابیدوپسیس به‌عنوان بیمارگر مدل برای بررسی اساس مولکولی برهم‌کنش‌های گیاه بیمارگر استفاده شده است (Katagiri 2002, Abramovitch 2014). این استرین به‌عنوان بیمارگر باکتریایی مدل برای بررسی اثر flg22 و elf18 بر مقاومت آرابیدوپسیس استفاده شد. منحنی رشد باکتری *Pst* DC3000 در برگ‌های آرابیدوپسیس که با هر دو پپتیدهای مورد استفاده تیمار شده بودند، به‌صورت معنی‌داری تحت تأثیر قرار گرفت. تراکم سلولی این استرین در گیاهان تیمارشده با پپتیدها در مقایسه با گیاهان تیمارنشدهٔ شاهد، ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی، به‌صورت چشمگیری کاهش پیدا کرد. این نتایج، مشابه نتایج Thürig *et al.* (2006) است که در آن PTI ناشی از PEN (یک نوع MAMP جدید از قارچ *Penicillium chrysogenum* بر آربیدوپسیس را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که PEN می‌تواند به‌صورت چشمگیری رشد باکتری *Pst* DC3000 را کاهش دهد.

همچنین، در این تحقیق میکروارگانیسم غیربیماریزای دیگری روی آرابیدوپسیس استفاده شد. جمعیت این استرین تا ۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی، در داخل برگ‌های گیاهان وحشی که با پپتیدها تیمار نشده بودند، ثابت ماند. با وجود این، شمار باکتری‌ها در گیاهان پیش‌تیمارشده با elf18 به‌صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد. این نتایج، مشابه نتایج Chuanfu and Zhonglin (2012) است که نشان دادند که تراکم سلولی *Xac* 306 به‌مدت پانزده روز بعد از مایه‌زنی، در برگ‌های

www.SID.ir

Archive of SID

آرابیدوپسیس، ثابت ماند. هرچند، در تحقیق مذکور مشخص شده است که این باکتری می‌تواند جمعیت خود را در گیاهان آرابیدوپسیس جهش‌یافتهٔ nho1، eds1، eds5، و pad4 افزایش دهد. این ژن‌ها نقش مهمی در مسیرهای دخیل در افزایش مقاومت گیاه دارند. بنابراین، به نظر می‌رسد که این باکتری در داخل برگ‌ها تکثیر می‌یابد، اما بخشی از جمعیت آن‌ها بر اثر مکانیسم‌های دفاعی گیاه کاهش می‌یابند و در نهایت، بین تکثیرسلولی و مرگ‌سلولی تعادلی پایدار به‌وجود می‌آید. اما پیش‌تیمار گیاه با یک انگیزندهٔ خالص به فعال‌شدن بیشتر سیستم‌های دفاعی گیاه منجر شده است و باعث کاهش جمعیت باکتری می‌شود.

REFERENCES

Abdelillah A, Houcine B, Halima MD, Imane Z, Djamal Eddine S, Abdallah M, Daoudi C (2013) Evaluation of antifungal activity of free fatty acids methyl esters fraction isolated from Algerian *Linum usitatissimum* L. seeds against toxigenic *Aspergillus.* Asian Pac J Trop Biomed 3: 443-448.

Abramovitch RB, Martin GB (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. Current Opinion in Plant Biology 7: 356-364.

Aist JR (1976) Papillae and related wound plugs of plant cells. Annual Review of Phytopathogy 14: 145-163.

Alexander D, Goodman, RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich, L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J (1993) Increased tolerance to 2 oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis related protein-1a. Procceding of National Academic Science 90: 7327-7331.

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. AnnualReview of Plant Biology 55: 373-99.

Bayles CJ, Ghemawat MS, Aist JR (1990) Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of callose formation. papilla deposition and resistance to powdery mildew in an ml-o barley mutant. Physiol. Mol. Plant Pathology 36: 63-72.

Beckman CH, Mueller WC, Teuier BJ, Harrison NA (1982) Recognition and callose deposition in response to vascular. infection in fusa rium wilt-resistant or susceptible tomato plants. Physio1. Plant Pathology 20:1-10.

Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124: 803-814.

Chuanfu A, Zhonglin M (2012) Not-host defense response in a novel *Arabidopsis-Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathosystem. PLoS one 7: 1-12.

Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. Annual Review of Phytopathology 32: 479-501.

Dow M, Newman MA, von Roepenack E (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. Annual Review of Phytopathology38: 241-261.

Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. Plant Journal 18: 265-276.

Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Basse CW, Boller T (1991) Elicitor induced ethylene biosynthesis in tomato cells. Plant Physiology 97: 19-25.

Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Boller T (1991) Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. Procceding of National Academic Science USA 88:8831-4.

Felix G., Regenass M, Boller T (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells. Induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. The Plant Journal 4: 307-316.

Gomez-Gomez L, Felix G, Boller T (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Jounal18: 277-84.

Granado J, Felix G, Boller T (1995) Perception of fungal sterols in plants: subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalinization in tomato cells. The Plant Physiology 107: 485-490.

Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AM, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. Procceding of National Academic Science USA 104: 12217-12222.

Ito Y, Kaku H, Shibuya N (1997) Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. The Plant Journal 12: 347-356.

Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D (1997) Elicitor stimulated ion fluxes and O^{2-} from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Procceding of National Academic Science USA 94: 4800-5.

www.SID.ir

Archive of SID

Jaffe MJ, Leopoid AC (1984) Callose deposition during gravitropism of *Zea mays* and *Pisum sativum* and its inhibition by 2-deoxy-D-glucose. Planta 161: 20-26.

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444: 323-329.

Katagiri F, Thilmony R, He SY (2002) The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas syringae Interaction. The Arabidopsis Book, Rockville, MD, USA: American Society of Plant Biologists 11-35.

Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. Plant Cell 16: 3496-507.

Niderman T, Genetet I, Bruyère T, Gees R, Stinzi A, Legrand M, Fritig B, Mösinger E (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: Isolation and characterization of three 14 kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. Plant Physiology 108: 17-22.

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

Nuernberger T, Lipka V (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Molecular plant pathology 6: 335-345.

Sacks WR, Ferreira P, Hahlbrock K, Jabs T, Nürnberger T (1993) Elicitor recognition and intracellular signal transduction in plant defense. In: Nester EW, Verma DPS, editors. Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions. Dordrecht: Kluwer, p. 485-95.

Slanghellini ME, Rasmussen SL, Vandemark GJ (1993) Relationship of callose deposition to resistance of lelluce to *Plasmopara lactucae*. Phytopathology 83: 1498-1501.

Stanghellini ME, Aragaki M (1966) Relation of periderm formation and callose deposi tion to anthracnose resistance in papaya fruit. Phytopathology 56: 444-450.

Thürig B, Felix G, Binder A, Boller T, Tamm L (2006) An extract of *Penicillium chrysogenum* elicits early defense-related responses and induces resistance in *Arabidopsis thaliana* independently of known signalling pathways. Physiology and Molecular Plant Pathology67: 180-193.

Underwood WR (2006) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana:* induction and suppression by *Pseudomonas syringae.* A dissertation submitted to Michigan State University.

Zimmermann S, Nurnberger T, Frachisse J-M,Wirtz W, Guern J, Hedrich R (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca_2C-permeable ion channel involved in pathogen defense. Procceding of National Academic Science USA, 94: 2751-5.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. Cell 125: 749-760.

Jehle AK, Lipschis M, Albert M, Fallahzadeh-Mamaghani V, Fürst U, Mueller K, Felix G (2013) The Receptor-like Protein ReMAX of Arabidopsis thaliana Detects the novel MAMP emax from *Xanthomonas.* Plant cell 25: 2330-2340.

www.SID.ir