مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

القای بیان چند ژن مرتبط با بیماری‌زایی در گیاه توتون تیمار شده با هورمون‌های اسید سالیسیلیک و جاسمونیک اسید به دنبال آلودگی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

فریده فرج اللهی[1*]، ولی الله بابایی‌زاد[2]، حشمت الله رحیمیان[3]

[1]کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

[2]دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

[3]استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۶

چکیده

توتون به عنوان گیاهی مدل، امروزه به طور چشمگیری در تحقیقات مولکولی با هدف درک مبانی تعاملات بیمارگر و گیاه استفاده می‌شود. بیماری باکتریایی آتشک توتون گسترش جهانی دارد و خسارت قابل توجهی به توتون وارد می‌کند. عامل این بیماری *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*Pst*) می‌باشد. القای ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی که در مقاومت به بیماری‌ها ایفای نقش می‌کنند می‌تواند در کاهش شدت بیماری مؤثر باشد. شواهد نشان می‌دهد که هورمون‌های گیاهی در بیان این ژن‌ها در گیاهان مؤثر بوده و موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌گردند. علاوه بر این سیستم دفاعی گیاه را از طریق فعال‌سازی رونویسی ژن‌های مرتبط با مکانیسم دفاعی گیاه را تحریک نموده و باعث تنظیم مقاومت القایی می‌گردند. در این تحقیق، بیان ژن‌های *PR1*، *PR5*، *PAL*، *Catlase* و *WRKY12* در گیاه توتون تیمار شده با هورمون اسید سالیسیلیک با غلظت ۳ میلی‌مولار و اسید جاسمونیک با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار و گیاه شاهد، پس از آلودگی با باکتری *Pseudomonas syrigae* pv. *tabaci* در چند بازه زمانی با استفاده از تکنیک Quantitative Real time PCR (QRT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار اسید جاسمونیک و به خصوص اسید سالیسیلیک باعث تغییرات قابل توجه در بیان این ژن‌ها پس از تزریق باکتری شده است.

واژه‌های کلیدی: *آتشک توتون، اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک، QRT-PCR، ژن‌های مقاومت.*

*نویسنده مسئول: فریده فرج اللهی تلفن: ۰۹۱۱۱۱۸۸۷۴۲ Email: farideh.farajollahi@gmail.com

مقدمه

توتون گیاه عالی گلدار، از راسته دو لپه‌ای‌ها، از خانواده Solonaceae و با نام علمی *Nicotiana tabacum* می‌باشد. گیاه توتون در چند دهه اخیر به یک سیستم مدل برای اهداف مهندسی ژنتیک تبدیل شده است. امروزه گیاه توتون به عنوان ابزاری برای بدست آوردن دانش بنیادی در بیولوژی گیاهی مبدل شده است. با پیشرفت‌های علم مولکولی گیاهی توتون به عنوان یک کارخانه گیاهی برای اهدافی چون سیستم تولید پروتئین‌های نوترکیب، آنزیم‌های صنعتی و آنتی‌بادی‌ها توسعه یافته است (Ganapathi *et al*., 2004).

بیماری آتشک توتون گسترش جهانی دارد. بیمارگر *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* علاوه برتوتون، سویا را هم آلوده می‌کند. آتشک هم در خزانه و هم در مزرعه خسارت می‌زند. گیاهچه‌های آلوده ممکن است بمیرند. در بوته‌های توتون در مزرعه، لکه‌های بزرگ، نامنظم و مرده روی برگ ظاهر می‌شود؛ لکه‌ها و برگ‌های آلوده می‌ریزند که این پدیده محصول را از نظر تجاری بی‌ارزش می‌کند (Agrios, 2005).

استراتژی مقاومت به بیماری جزء مهمی از کشاورزی مدرن می‌باشد که کاربرد مواد شیمیایی را کاهش داده و سبب ایجاد کشاورزی سالم می‌گردد. گیاهان توسط مکانیسم ساختاری و مقاومت القایی از خود در برابر بیمارگرها دفاع می‌کنند (Sticher *et al*., 1997; Heil and Bostock, 2002). استفاده از مهندسی ژنتیک یکی از روش‌های کارآمد جهت تولید گیاهان مقاوم به بیمارگرها می‌باشد (Lillemo *et al*., 2008; He *et al*., 2009).

در این میان ژن‌های مقاومت به خصوص ژن‌های سنتزکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PRs) بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند که می‌توان از آن‌ها در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به عوامل تنش‌زا استفاده کرد (Kogel and Langen, 2005; Van Loon and Pieterse, 2006). پروتئین‌های PR تولید شده توسط این دسته از ژن‌ها، موجب تخریب دیواره‌های سلول قارچی، ایجاد اختلال درغشاهای سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماری‌زایی و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می‌شوند (Dahleen *et al*., 2001). بیان این پروتئین‌ها در گیاه در برابر بیمارگرهای مختلف به صورت اختصاصی انجام می‌شود (Thomma *et al*., 1998).

در میان PR پروتئین‌ها، PR1 از مهمترین آنها در مقاومت به بیمارگرهای مختلف می‌باشد (Van Loon and Pieterse, 2006). اگرچه عملکرد بیوشیمیایی خاصی برای آن در نظر گرفته نشده اما نقش ضد میکروبی آن توسط محققین گزارش شده است (Rauscher *et al*., 1999; Sels *et al*., 2008). این پروتئین بر روی غشا موثر است و احتمالا در

ضخیم شدن دیواره سلولی و جلوگیری از گسترش بیمارگر در آپوپلاست نقش دارند. مشخص شده که ژن‌های *PR1* توتون به واسطه‌ی سیستم سیگنال‌رسانی وابسته به مسیرهای SA، JA و یا اتیلن القا می‌شود. مسیرهای وابسته به جاسمونیک اسید و یا مسیرهای وابسته به اتیلن در القای بیان بعضی از ژن‌های PR1 بازی، نقش دارند. در حالی که مسیر وابسته به SA در القای ژن‌های PR1 اسیدی موثر می‌باشد (Vidhyasekaran, 2002).

پروتئین‌های متعلق به خانواده PR5 به دلیل تشابهات توالی آن‌ها با پروتئین گیاهی تائوماتین (Thaumatin) به پروتئین‌های شبه تائوماتین Thaumatin-like(TL) معروف هستند (Moralejo *et al.*,1999). گروه پروتئین‌های PR5 تاکنون از توتون، آرابیدوپسیس، برنج، گندم و بسیاری گیاهان دیگر جدا شده‌اند (Vigers *et al.*, 1991). تجمع این پروتئین‌ها در گیاهان در واکنش به موقعیت‌های استرس‌زا مانند غلظت‌های نمک بالا، زخم‌ها یا حمله بیمارگرها دیده شده است. این پروتئین‌ها، نفوذپذیری غشای سلولی بیمارگر را تغییر می‌دهد (Kitajima and Sato, 1999). فرم‌های بازی پروتئین‌های PR5 شبیه اسموتین می‌باشند. اسموتین یک پروتئین القایی است که در اثر تنش شوری در توتون ردیابی شده است. بنابراین فرم‌های بازی را اسموتین می‌خوانند. پروتئین‌های PR5 خنثی در گیاهان سالم وجود ندارد ولی به وسیله اتیلن القا می‌شوند (Vidhyasekaran, 2002).

با توجه به گزارشاتی مبنی بر دخالت مشتقات مسیر بیوشیمیایی فنیل پروپانوئید در مواجهه با انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی (Campbell and Elis, 1992; Xu *et al.*, 2012) می‌توان به بررسی تغییرات آنزیم‌های این مسیر از جمله فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) اشاره کرد. ژن PAL از طریق دخالت در مسیرهای سنتز فنیل پروپانوئیدها و ایزوفلاونوئیدها که فعالیت فیتوآلکسینی دارند در مقاومت گیاه نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. این ژن در مسیر بیوسنتز اسید سالیسیلیک و دیگر ترکیبات وابسته دفاعی دخیل بوده و یک ترکیب سیگنال‌دهی کلیدی برای فعال‌سازی ژن‌های وابسته دفاعی، کاتالیز کننده‌ها و فاکتورهای رونویسی است (Stotz *et al.*, 2009).

تغییرات مسیرهای سیگنال‌دهی ذاتی، ازجمله SAR و ISR، می‌تواند باعث فعال شدن تعدادی از عوامل رونویسی و افزایش بیان تعداد زیادی از ژن دفاعی شود. اشکال اصلی فعال‌سازی کل مسیرهای سیگنال‌دهی، کاهش تناسب هزینه و عملکرد بالقوه در ارتباط با بیان ساختاری تعداد زیادی از ژن‌ها است. بنابراین، ژن‌هایی که بخشی از مسیر را فعال می‌کنند یا مسیر را تقویت می‌کنند، نامزدهای ایده‌آل هستند. ژن نامزد بالقوه برای مهندسی ژنتیک، شامل فاکتورهای رونویسی مانند WRKY، ERF1 و NPR1 می‌باشد.

خانواده ژنی WRKY نماینده مهمترین گروه عوامل تنظیم کننده رونویسی است (Zhang and

Wang, 2005). باند شدن فاکتورهای رونویسی به DNA برای فعال‌سازی ژن‌های *PR* مهم است (Van Loon and Pieterse , 2006). یکصد نوع ژن WRKY در برنج شناسایی شده است. بیان ژن WRKY12 در برنج در اثر باکتری *Xoo* موجب افزایش بیان *NPR1*، *PR1b*، فنیل آلانین آمونیالیاز (*PAL*) و پراکسیداز (pox) می‌شود. افزایش بیان *WRKY70* در آرابیدوپسیس باعث مقاومت به باکتری‌های *Pseudomonas syringe* و *Pectobacterium carotovora* می‌شود (Li *et al*., 2004; Li *et al*., 2006). پیشنهاد شد که *WRKY* یک تنظیم کننده رونویسی در آبشارهای سیگنالی وابسته به JA و SA است (Song and Goodman, 2001). نتیجه بیان ژن *WRKY* در توتون موجب افزایش سطح پاسخ مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و HR می‌شود (Oh *et al*., 2008). پیشنهاد شده است که فاکتور فعال‌سازی رونویسی *WRKY12* در توتون با متصل شدن به توالی حفاظت شده‌ای در پروموتور ژن *PR1* به نام WK-boxes (TTTTCCAC)، موجب بیش‌بیانی ژن *PR1* می‌شود(Verk *et al*., 2010).

اسید سالیسیلیک در برگ‌ها و ساختمان‌های زایشی گیاه یافت شده است (Raskin, 1992). سالیسیلیک اسید یک مولکول سیگنال داخلی است که در گیاهان وجود دارد و پس از آلودگی به وسیله بیمارگرها، به طور سیستمیک تجمع پیدا می‌کند. پروتئین متصل به سالیسیلیک اسید در گیاهان ردیابی و مشخص شده است که یک کاتالاز است. کاتالاز فعالیت آب اکسیژنه (H_2O_2) را متوقف کرده و سالیسیلیک اسید هم از این فعالیت کاتالاز جلوگیری می‌کند. افزایش سطوح H_2O_2 در گیاه، به واسطه مهار آنزیم‌های کاتالاز، در فعال شدن واکنش‌های دفاعی نقش دارد (Vidhyasekaran, 2002). اسید سالیسیلیک سیستم دفاعی گیاه را از طریق القای رونویسی گروه مشخصی از ژن‌های مرتبط با دفاع و توسعه مقاومت سیستمیک تحریک می‌کند. مطالعات نشان داد که میزان بیان برخی PR پروتئین‌ها بعد از تیمار گیاهچه‌ها با سالیسیلیک اسید افزایش یافته است (Yang *et al*., 2013).

جاسمونات‌ها و استرمتیل آنها گروه دیگری از تنظیم کنندگان رشد گیاهان، و از مشتقات اسید لینولینیک محسوب می‌شوند که از طریق مسیر بیوسنتزی اکتادکانوئید سنتز می‌شوند (Schaller, 2001). در آغاز جاسمونات‌ها به خاطر فعالیت بازدارندگی رشدی مورد توجه قرار گرفتند ولی امروزه مشخص شده که این ترکیبات در بیشتر گونه‌های گیاهی وجود داشته و تأثیر آنها درافزایش میزان بیان ژن‌های خاص گیاهی در هنگام واکنش به ایجاد زخم مورد توجه قرار گرفته است (Yu *et al*., 2002). جاسمونات‌ها به عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا که منجر به تجمع متابولیت‌های

ثانویه می‌شود معرفی شده‌اند (Schmidt and Delaney, 2010).

مطالعات اندکی در زمینه استفاده از هورمون‌های گیاهی به منظور القای بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و ایجاد مقاومت در گیاه صورت گرفته است. بنابراین هدف از این پژوهش، ارزیابی میزان بیان ژن‌های *PR1*، *PR5*، *PAL*، *Catalase* و *WRKY12* در سطح RNA تحت تیمار دو هورمون سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در گیاه توتون است تا از این طریق درک بهتر مسیر القا و عکس العمل گیاه توتون امکان پذیر گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه وکشت باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

این مطالعه در سال ۱۳۹۴ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. در این بررسی از سویه استاندارد باکتری *Pseudomonas syringae* pv. tabaci از کلکسیون باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی دانشگاه گوتینگن آلمان (GCPB) با شماره کاتالوگ GCPB113 و شماره ثبت 460134043 اهدایی آقای دکتر خدایگان، دانشگاه ولیعصر رفسنجان استفاده شد. باکتری *Pst* در محیط کشت جامد اختصاصی king B به مدت یک ماه در دمای ۲۷°C قابل نگهداری می‌باشد.

آزمون بیماری‌زایی

از کشت ۲۴ ساعته باکتری Pst در محلول ۱۰ میلی مولار $Mgcl_2$ سوسپانسیونی با غلظت 10^8 سلول (CFU) در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. حدود ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به وسیله سرنگ مخصوص به فضای میان‌برگی برگ‌های توتون تزریق شد. از محلول ۱۰ میلی‌مولار $MgCl_2$ نیز برای تزریق در گیاهان شاهد استفاده شد (Klement *et al*., 1990). جهت تأمین رطوبت و دمای مناسب برای فعالیت باکتری در گیاه، پس از قرار دادن پوشش پلاستیکی، نمونه‌ها در اتاقک رشد (Plant Growth Chamber) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۵ درصد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد. ظهور لکه‌های آبسوخته در برگ‌ها بعد از ۳–۴ روز نشانه مثبت بودن آزمون بیماریی‌زایی تلقی شد.

تهیه گیاهچه

نشاهای توتون رقم K326 از انستیتو تحقیقات توتون ایران– تیرتاش بهشهر دریافت شد. نشاهای دارای ارتفاع ۵–۷ سانتی‌متر و ۴–۵ برگ انتخاب و به گلدان‌های حاوی خاک اتوکلاو شده منتقل شد. گلدان‌ها در اتاقک رشد تحت شرایط دمایی ۲۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰ درصد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

تعدادی از گیاهچه‌ها با محلول اسید جاسمونیک با غلظت ۰/۵ mM اسپری شدند. جهت حل نمودن

اسید جاسمونیک ابتدا آن را با اتانول (چهار درصد حجمی) حل نموده سپس با آب مقطر به حجم رسانیده شد (Traw and Bergelson, 2003). همچنین تعدادی گیاهچه با محلول اسید سالیسیلیک با غلظت ۳ mM تیمار شدند. جهت حل نمودن اسید سالیسیلیک ابتدا آن را با اتانول (ده درصد حجمی) حل نموده و سپس با آب مقطر به حجم رسانیده شد (Muchembled *et al*., 2006). گیاهچه‌های تیمار شده با جاسمونیک اسید به مدت ۷ روز و گیاهچه‌های تیمار شده با سالیسیلیک اسید به مدت ۲ روز زیر پوشش پلاستیکی در ژرمیناتور نگهداری شد. تعدادی گیاهچه هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

از کشت ۲۴ ساعته باکتری *Pst* سوسپانسیونی با $۱۰^{۷}$cfu/ml در محلول ۱۰ میلی مولار $Mgcl_2$ تهیه شد. جذب نوری سوسپانسیون *Pst* با این غلظت پس از غلظت سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر می‌بایست در حدود ۰/۰۱ تا۰/۰۲ باشد. برای مایه‌زنی، حدود ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله به وسیله سرنگ مخصوص به فضای میان‌برگی جوانترین دو برگ هر گیاه تزریق شد. در هر برگ، یک نقطه ما بین رگبرگ‌های اصلی برای تزریق در نظر گرفته شد. جهت فراهم آوردن شرایط مناسب برای فعالیت باکتری در نسوج گیاه، برای بالا بردن سطح رطوبت تا مرز ۸۰ درصد، گیاهان با پوشش پلاستیکی پوشانده و در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پوشش پلاستیکی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی برداشته شد. نمونه‌برداری از بافت برگی گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد در فاصله زمانی ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از آلودگی انجام گرفت و در فریزر با دمای $-^{o}۷۰C$ نگهداری شدند.

استخراج RNA و زدودن DNA ژنومی از نمونه‌ها

برای اســـتخراج RNA از نمونه‌های نگهداری شـــده در فریزر $-^{o}۷۰C$ از بافر TRIZOL (شـــرکت Invitrogen) اســـتفاده شـــد. به منظور زدودن DNA ژنومی از نمونه‌های RNA، از کیت RQ1 RNase-free DNase ساخت شرکت Fermentas ا ستفاده شد. کمیت و کیفیت RNA، با ا ستفاده از ژل آگارز و اسپکتوفتومتر ارزیابی گردید.

ساخت و بررسی کیفیت cDNA

سنتز cDNA با استفاده از AccuPowerR CycleScript RT PreMix (dN6) kit انجام شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت بررسی کیفیت نمونه‌های cDNA سنتز شده از PCR با آغازگر اختصاصی Actin استفاده گردید.

بررسی میزان بیان ژن‌ها به کمک روش Quantitative Real- time PCR

بیان ژن با تکنیک Quantitative real- time PCR انجام شد. برای این منظور از دستگاه Applied Biosystems® StepOnePlus™ Real-Time PCR استفاده شد. در این واکنش از کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) شرکت Thermo استفاده شد.

به منظور بررسی بیان ژن ازآغازگر اختصاصی پیشرو و برگشتی ژن Actin به عنوان کنترل داخلی (Housekeeping) و همچنین آغازگر پیشرو و برگشتی ژن *PR1*، *PR5*، *PAL*، *Catalase* و *WRKY12* برای تکثیر cDNA در RT-PCR استفاده شد (Schmidt and Delaney, 2010).

هر واکنش PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر حاوی یک میکرولیتر cDNA الگو، ۸ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر و ۴ میکرولیتر آب عاری از Nuclease انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای اتصال آغازگرها، سپس رسم منحنی ذوب با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و افزایش دمای ۱ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و نگهداری در این دما به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. مقدار تکثیر در انتهای هر چرخه توسط دستگاه اندازه‌گیری شد. سپس تغییرات نسبی بیان ژن‌های مورد بررسی نسبت به ژن اکتین نرمالیزه شد. در نهایت محاسبه و تغییرات بیان ژن نیز مطابق با فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ اندازه‌گیری شد (Livak and Schmittgen, 2001).

$\Delta\Delta C_T$= (ΔC_T نمونه‌کنترل- ΔC_T نمونه آزمایش)

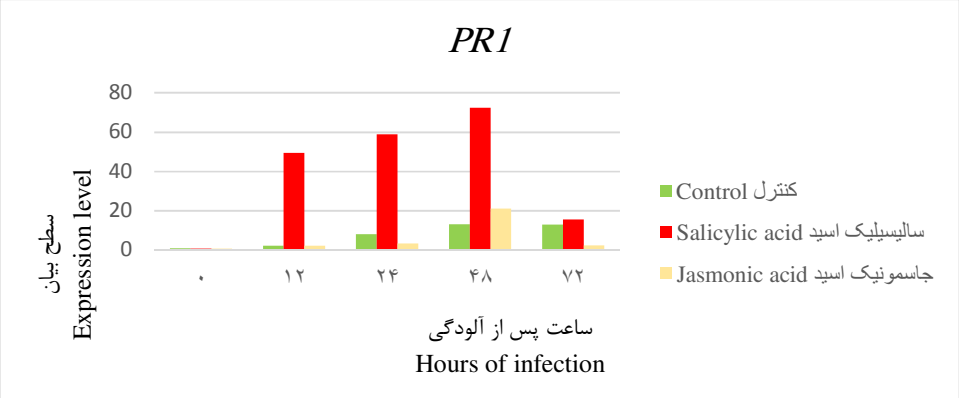
ΔC_T = (C_T ژن خانه‌دار - C_T ژن هدف)

نتایج و بحث

در این تحقیق الگوی بیان چند ژن در گیاه توتون، در طی ۵ بازه زمانی پس از آلودگی به باکتری *Pst* در سه تیمار سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و شاهد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج Real time PCR تأیید کرد که سطح بیان ژن‌های *PR1*، *PR5*، *PAL* و *WRKY12* در هر سه تیمار سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و شاهد بعد از آلودگی افزایش و سطح بیان ژن *Catalase* کاهش پیدا کرد. بررسی روند تغییرات بیان این ژن نشان می‌دهد که سطح تظاهر این ژن‌ها در زمان‌های مختلف پس از آلودگی در این سه تیمار متفاوت می‌باشد. در گیاه شاهد میزان بیان ژن *PR1b* در پاسخ به آلودگی باکتریایی از ساعت ۱۲ پس از مایه‌زنی افزایش اندکی داشت و تا ۴۸ ساعت پس از آلودگی نیز این افزایش بیان ادامه

داشت. نرخ بیان این ژن در زمان اوج حدود ۱۴/۱ برابر نسبت به زمان صفر افزایش داشت. سپس نرخ بیان ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی به کمترین میزان بیان خود رسید. در گیاهان تیمار شده با هورمون سالیسیلیک اسید میزان بیان این ژن در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی جهش قابل توجهی داشت (۶۵/۱ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). پس از آن نیز بیان این ژن تا ۴۸ ساعت پس از آلودگی به افزایش خود ادامه داد و بیشینه بیان این ژن نیز در همین ساعت مشاهده شد (۹۵/۳۹ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و در ساعت ۷۲ پس از مایه‌زنی به کمترین میزان بیان خود یعنی در حدود ۲۰/۳ برابر بیشتر از بیان این ژن در زمان صفر رسیده است.

در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید نیز میزان بیان این ژن در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی شروع به افزایش کرد و بیان آن نیز تا ۴۸ ساعت پس از آلودگی به افزایش خود ادامه داد و بیشینه بیان نیز در همین ساعت مشاهده شد (حدود ۲۸/۹برابر افزایش نسبت به زمان صفر). نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و در ساعت ۷۲ پس از مایه زنی به کمترین میزان بیان خود یعنی در حدود ۳/۲ برابر بیشتر از بیان این ژن در زمان صفر رسید. نرخ بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید در زمان اوج بیان (۴۸ ساعت پس از مایه زنی) ۱/۶ برابر بیشتر از بیان این ژن در گیاهان شاهد در بازه زمانی فوق می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی بیان ژن *PR1b* در گیاه شاهد، تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با باکتری *Pst*

Figure 1- *PR1b* pattern of gene expression in control plants, treated with salicylic acid, jasmonic acid in various times after infection with *Pst*.

پروتئین PR1 در بافت‌های مختلف گیاهی مثل دیواره سلولی، دستجات آوندی و واکوئل‌ها وجود دارد (Hoegen *et al*., 2002; Grunwald *et al*., 2003). PR1 ها، به عنوان شاخصی برای مقاومت القایی سیستمیک (SAR) شناخته شدند (Schulthesis *et al*., 2003). نقش ژن *PR1* در دفاع توتون علیه باکتری *Pst* به خوبی ثابت شده است (Block *et al*., 2005). در این بررسی بیان ژن *PR1b* در همان ساعت‌های اولیه پس از آلودگی (۱۲ساعت پس از آلودگی) افزایش یافت، که طبق آنالیز شیره استخراج شده از آوند آبکش ناحیه دمبرگِ گیاهان مایه‌کوبی شده با سوسپانسیون باکتری، مشخص شد که اولین افزایش تجمع اسید سالیسیلیک در ۱۲ ساعت پس از تلقیح باکتری صورت می‌گیرد (Rasmussen *et al*., 1991). این افزایش بیان در هر سه تیمار تا زمان ۴۸ ادامه یافت. بالا بودن بیان ژن *PR1b* هم در گیاهان شاهد و هم در گیاهان تیمار شده با هورمون‌های سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نشان‌دهنده القای این ژن در تعامل باکتری *Pst* با توتون است. تجمع نسخه‌های این ژن ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی در هر سه تیمار سیر نزولی را طی نمود که احتمالا به دلیل کم شدن تحریک باکتری در گیاهان تیمار شده و مستقر شدن پاتوژن در گیاه و کارآمد نبودن بیان بیشتر این ژن در گیاه شاهد می‌باشد. میزان بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید در تمامی بازه‌های زمانی بعد از آلودگی به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان شاهد بود. این افزایش را می‌توان به این صورت توجیه کردکه تیمار سالیسیلیک باعث افزایش مولکول سیگنال اسید سالیسیلیک می‌شود که سبب فعال شدن ژن *NPR1* و به دنبال آن افزایش بیان ژن *PR1* و القای مکانیسم SAR در گیاه می‌شود (Shah and Klessing, 1999; Rate 2001). بنابراین گیاه با افزایش بیان این ژن در زمان ۴۸ سبب ایجاد مرگ سلولی برنامه ریزی شده می شود تا از توسعه بیمارگر در سلول میزبان جلوگیری کند و بدین صورت موجب مقاومت گیاه شود. نتایج بررسی‌های دیگر محققین نیز بیانگر افزایش بیان این ژن پس از آلودگی در گیاهان بود (Yang *et al*., 2013).

از طرفی با توجه به افزایش بیان ژن *PR1b* در ۱۲ ساعت پس از آلودگی و شناخته شدن آن به عنوان یک مارکر مقاومت القایی تحریک شده توسط SA (Ingrid *et al*., 2005) و همچنین با توجه به یافته‌های محققین مبنی بر این که SA غالباً در دفاع گیاهان در مقابل پاتوژن‌های بیوتروف موثر واقع می‌گردد (Glazebrook, 2005)، می‌توان نتیجه گرفت که *Pst* در تعامل با توتون، مشابه ارگانیسم‌های همی‌بیوتروف رفتار نموده و توتون در ابتدا با فعال نمودن مسیرهای دفاعی وابسته به SA به حمله این پاتوژن عکس‌العمل نشان می‌دهد.

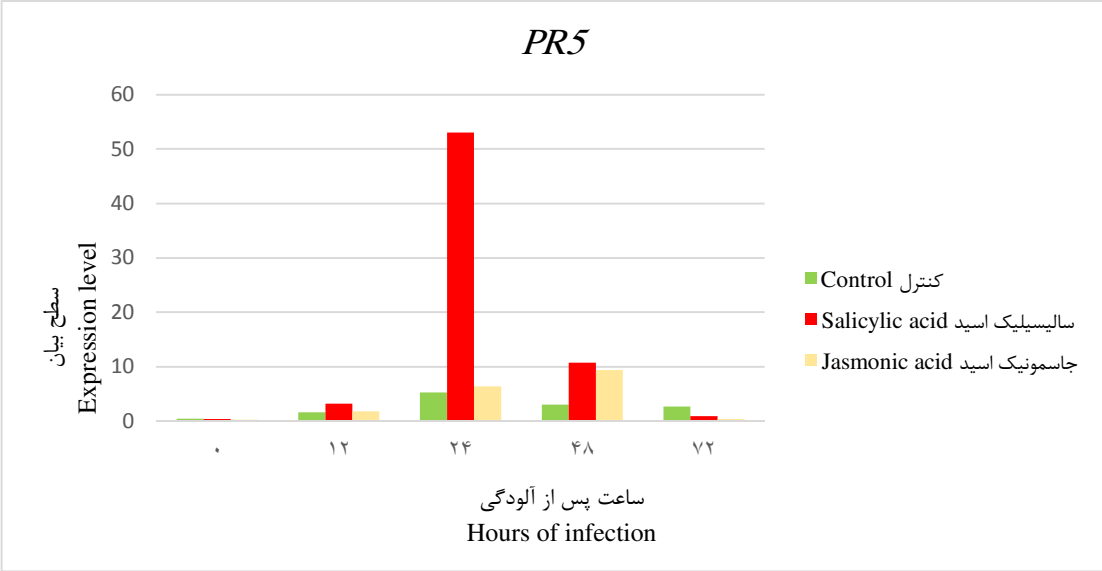
در گیاهان شاهد میزان بیان *PR5* در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی جهش

قابل توجهی داشت (در حدود ۳ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). پس از آن نیز بیان این ژن تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی به افزایش خود ادامه داد و بیشینه بیان این ژن نیز در همین ساعت مشاهده شد (حدود ۱۱/۴ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و در ساعت ۷۲ پس از مایه‌زنی به کمترین میزان بیان خود یعنی حدود ۵/۸ برابر بیشتر از بیان این ژن در زمان صفر رسیده است.

در گیاهان تیمار شده با هورمون سالیسیلیک اسید میزان بیان این ژن در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی جهش قابل توجهی داشت (۸/۴ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). پس از آن نیز بیان این ژن تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی به افزایش خود ادامه داد و بیشینه بیان این ژن نیز در همین ساعت مشاهده شد (۱۳۹/۶ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و در ساعت ۷۲ پس از مایه‌زنی به کمترین میزان بیان خود یعنی در حدود ۲/۳ برابر بیشتر از بیان این ژن در زمان صفر رسیده است. نرخ بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید در زمان اوج بیان (۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی) ۱۰ برابر بیشتر از بیان این ژن در گیاهان شاهد در زمان اوج بیان (۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی) می‌باشد.

در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید نیز میزان بیان این ژن در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش داشت (۷/۱ برابر نسبت به زمان صفر) و پس از آن نیز بیان این ژن تا ۴۸ ساعت پس از آلودگی به افزایش خود ادامه داد و بیشینه بیان این ژن نیز در همین ساعت مشاهده شد (حدود ۳۷/۵ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و در ساعت ۷۲ پس از مایه‌زنی به کمترین میزان بیان خود یعنی ۱/۵ برابر بیشتر از بیان این ژن در زمان صفر رسید. نرخ بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید در زمان اوج بیان (۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی) ۱/۷ برابر بیشتر از بیان این ژن در گیاهان شاهد در زمان اوج بیان (۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی) می‌باشد (شکل ۲).

پروتئین PR5 یا Thaumatin Like Protein سبب تغییر نفوذپذیری اجزای ساختاری دیواره سلولی باکتری شده و در نهایت سبب مرگ سلول باکتری می‌گردد (Vidhyasekaran, 2002).



شکل ۲- الگوی بیان ژن *PR5* در گیاه شاهد، تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با باکتری *Pst*

Figure 2- *PR5* pattern of gene expression in control plants, treated with salicylic acid and jasmonic acid in various times after infection with *Pst*.

نتایج حاصله از آنالیز بیان ژن *PR5* هم در گیاهان شاهد و هم در گیاهان تیمار شده با هورمون‌های سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید هم گویای این مطلب می‌باشد که سطح بیان ژن *PR5* همانند الگوی *PR1b* در ساعت ۱۲ پس از مایه‌زنی شروع به افزایش می‌کند. افزایش بیان ژن‌های القاء شونده توسط SA در این ساعت رابطه مستقیم با افزایش تجمع این مولکول سیگنال دارد. فعالیت ضدقارچی *PR5* در گیاه آرابیدوپسیس طی آلودگی با قارچ‌های ورتیسیلیم و فوزاریوم مشاهده شد (Fitzgerald *et al.*, 2004; Xu and Reddy 1997). افزایش بیان اسموتین، یک عضو از خانواده پروتئین PR5، در گیاه سیب زمینی تراریخته، منجر به ایجاد مقاومت در برابر قارچ *Phytophthora infestans* شد (Liu *et al.*, 1994). در این مطالعه میزان نسخه‌های *PR5* در هر سه تیمار، پس از آلوده‌سازی گیاهان با *Pst* افزایش یافت، اما میزان بیان آن در تیمارها متفاوت بود. در گیاه شاهد همانند گیاه تیمار شده با سالیسیلیک اسید بیان ژن *PR5* ۲۴ ساعت پس از آلودگی به اوج خود رسید ولی میزان بیان آن نسبت به تیمار سالیسیلیک اسید بسیار پایین‌تر بود که این امر بیانگر اهمیت هورمون سالیسیلیک اسید در تعامل گیاه با باکتری *Pst* است. اما در تیمار جاسمونیک اسید بیان این ژن ۴۸

ساعت پس از آلودگی به حداکثر ر سید و نرخ بیان آن در همه بازه‌ها بیشـــتر از گیاه شـــاهد و کمتر از تیمار سالیسیلیک اسید بود. نتایج بررسی‌های دیگر محققین نیز بیـانگر افزایش بیـان این ژن پس از آلودگی در گیاهان بود (Yang *et al*., 2013).

در گیاهان شاهد میزان بیان ژن *WRKY12* در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه زنی شروع به افزایش کرد و تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی نیز این افزایش بیان ادامه داشت. نرخ بیان این ژن در زمان اوج در حدود ۷/۱ برابر نسبت به زمان صفر افزایش داشت.

در گیاهان تیمار شده با هورمون سالیسیلیک اسید میزان بیان این ژن در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش داشت (در حدود ۳ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). پس از آن نیز بیان این ژن تا ۴۸ ساعت پس از آلودگی به افزایش خود ادامه داد و بیشینه بیان این ژن نیز در همین ساعت مشاهده شد(در حدود ۲۱ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و در ساعت ۷۲ پس از مایه‌زنی به کمترین میزان بیان خود یعنی در حدود ۱/۱ برابر بیشتر از بیان این ژن در زمان صفر رسیده است. نرخ بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید در زمان اوج بیان (۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی) ۵/۵ برابر بیشتر از بیان این ژن در گیاهان شاهد در زمان اوج بیان (۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی) می‌باشد.

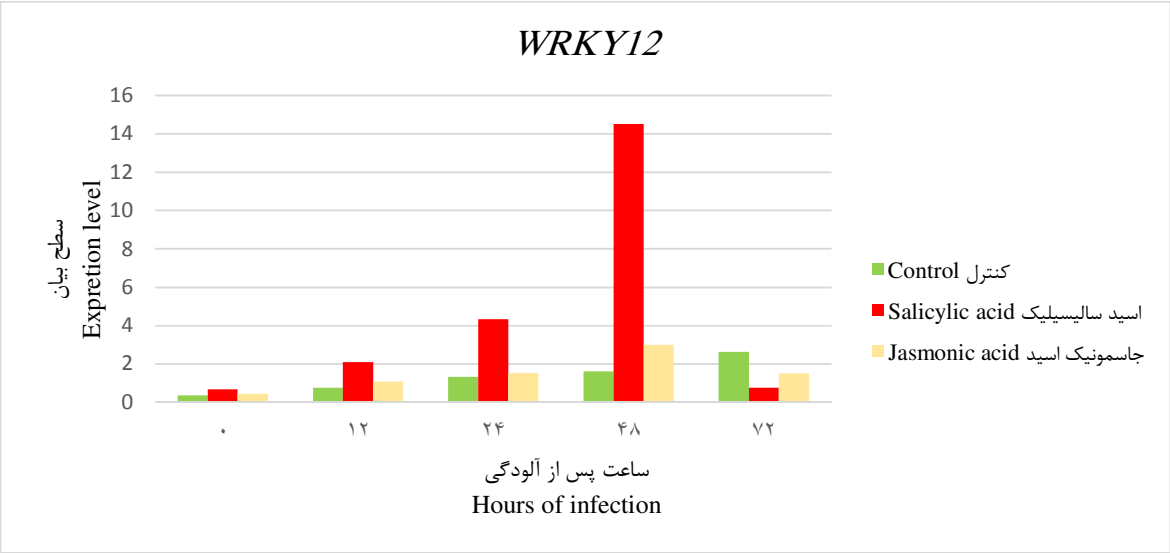
در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید نیز میزان بیان این ژن در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی جهش اندکی داشته و پس از آن نیز بیان این ژن تا ۴۸ ساعت پس از آلودگی به افزایش خود ادامه داد و بیشینه بیان این ژن نیز در همین ساعت مشاهده شد (در حدود ۶/۵ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و در ساعت ۷۲ پس از مایه‌زنی به کمترین میزان بیان خود یعنی در حدود ۳/۳ برابر بیشتر از بیان این ژن در زمان صفر رسیده است. نرخ بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید در زمان اوج بیان (۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی) ۱/۱ برابر بیشتر از بیان این ژن در گیاهان شاهد در زمان اوج بیان (۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی) می‌باشد (شکل۳).

متصل شدن فاکتور رونویسی WRKY12 به DNA برای فعال‌سازی ژن پایین دست *PR1b* مهم استد (Verk *et al*., 2010). پروتئین‌های NPR1 با اعضای خانواده WRKY واکنش داده و بیان ژن پایین دست را تحریک می‌نمایند (Johnson *et al*., 2003). سرکوب شدن این فاکتورهای رونویسی از بیان ژن‌های *PR* جلوگیری می‌کند (Boyle *et al*., 2009). افزایش بیان ژن *WRKY45* در گیاه برنج منجر به ایجاد مقاومت وابسته به مسیر SA در برابر بیماری بلاست می‌شود (Shimono *et al*., 2012). مشاهده شد که افزایش بیان ژن *NtWRKY12* در توتون منجر

به افزایش مقاومت به عوامل باکتریایی بیماری‌زا در توتون شده است (Verk *et al*., 2010). در تحقیق مشاهده شد که در موتانت‌هایی با کاهش عملکرد *WRKY70*، مقاومت وابسته به SA در برابر پاتوژن‌های قارچی *Erysiphe cichoracearum* مختل شده است (Li *et al*., 2006). در این پژوهش با توجه به حداکثر بیان ژن *NtWRKY12* در ساعت ۴۸ پس از مایه‌زنی باکتری و دیگر نتایج به دست آمده می‌توان گفت که این ژن نقش مهمی درمسیرهای سیگنال‌دهی دفاعی و بیان ژن‌هایی مانند *PR1b* دارد. نتایج بررسی‌های دیگر محققین نیز بیانگر افزایش بیان این ژن پس از آلودگی در گیاهان بود (Yang *et al*., 2013). اختلاف چشمگیر بیان ژن *NtWRKY12* در گیاهان شاهد و تیمار شده با سالیسیلیک اسید در تمام زمان‌های مورد بررسی بیانگر نقش مهم سالیسیلیک اسید در دفاع علیه *Pst* است.

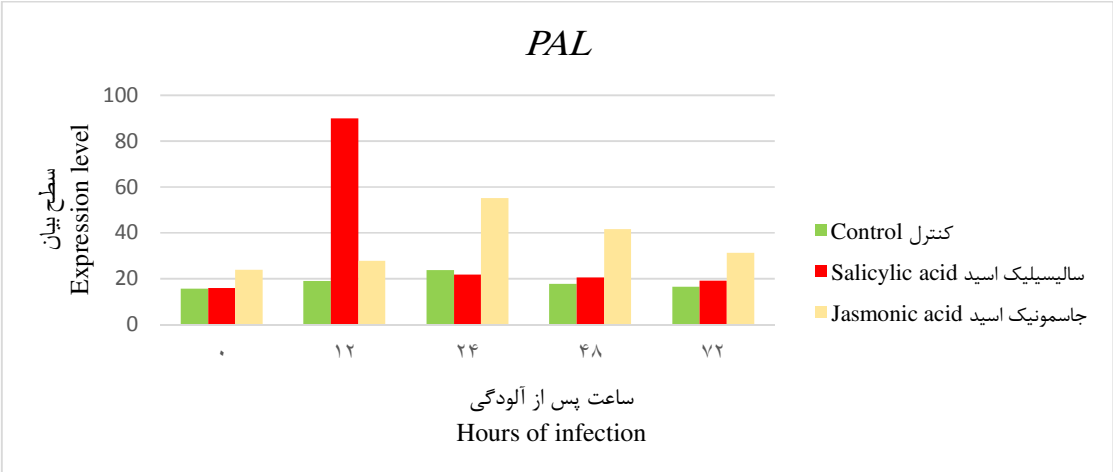
در گیاهان شاهد میزان بیان ژن *PAL* در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی شروع به افزایش کرد. پس از آن نیز بیان این ژن تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی به افزایش خود ادامه داد و بیشینه بیان این ژن در همین ساعت مشاهده شد (حدود ۱/۵ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی به کمترین میزان بیان خود یعنی در حدود ۱/۱ برابر بیشتر از زمان صفر رسید.

در گیاهان تیمار شده با هورمون سالیسیلیک اسید میزان بیان این ژن در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی جهش قابل توجهی داشته و بیشینه بیان این ژن در همین ساعت مشاهده شد (در حدود ۵/۶ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی به کمترین میزان بیان خود یعنی در حدود ۱/۲ برابر بیشتر از زمان صفر رسید. ضمناً نرخ بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید در زمان اوج بیان (۱۲ ساعت پس از مایه زنی) ۳/۸ برابر بیشتر از بیان این ژن در گیاهان شاهد در زمان اوج بیان (۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی) می‌باشد. در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید میزان بیان این ژن در پاسخ به آلودگی باکتریایی ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی جهش اندکی داشت و تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی به افزایش خود ادامه داد و بیشینه بیان این ژن در همین ساعت مشاهده شد (حدود ۲/۳ برابر افزایش نسبت به زمان صفر). نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی به کمترین میزان بیان خود یعنی حدود ۱/۳ برابر بیشتر از زمان صفر رسید. ضمناً نرخ بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید در زمان اوج بیان (۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی) ۲/۳ برابر بیشتر از بیان این ژن در گیاهان شاهد در زمان اوج بیان (۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی) می‌باشد (شکل ۴)



شکل ۳- الگوی بیان ژن *WRKY12* در گیاه شاهد، تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با باکتری *Pst*

Figure 3- *WRKY12* pattern of gene expression in control plants, treated with salicylic acid and jasmonic acid in various times after infection with *Pst*.



شکل ۴- الگوی بیان ژن *PAL* در گیاه شاهد، تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با باکتری *Pst*

Figure 4- *PAL* pattern of gene expression in control plants, treated with salicylic acid and jasmonic acid in various times after infection with *Pst*.

محصـول ژن Phenylalanin ammonia lyaze آنزیمی حیاتی در مسیر Phenylpropanoid بوده که اولین واکنش در تولیـد ترکیبـات طبیعی فنیـل پروپانوئیدی مثل لیگنین، رنگ‌دانه‌ها، فلاوونوئید و فیتوالکسین را کاتالیز می‌کند (Blilou *et al*., 2000).

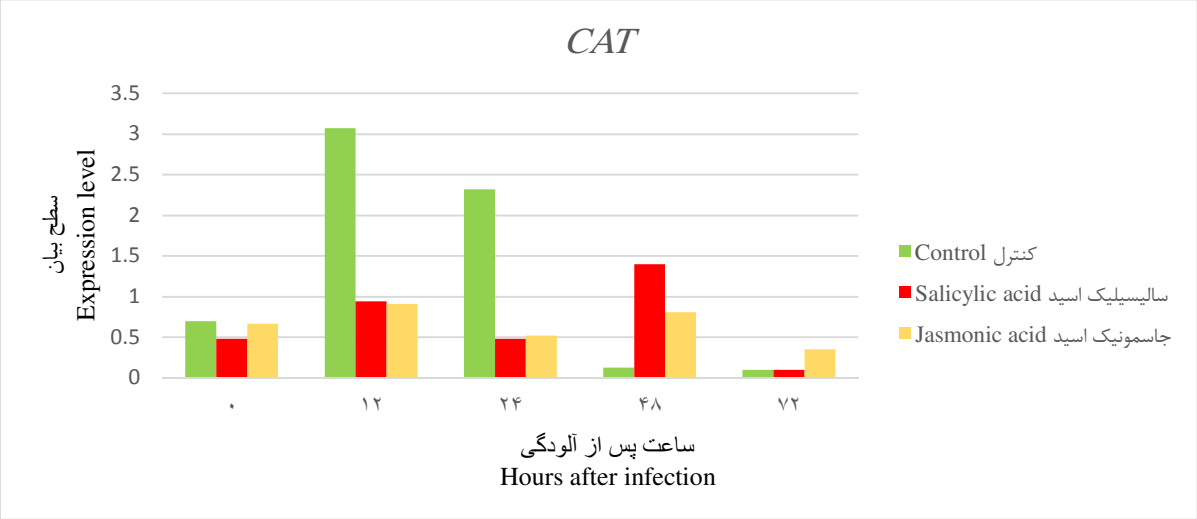
مشخص شده که افزایش مقدار RNA پیامبر PAL، مبنای افزایش فعالیت آن می‌باشـــد. گیاهان توتون که فعالیت PAL در آن‌ها کم می‌باشد، لیگنین کمتری در دیواره داشته و نسبت به تهاجم بیمارگرها حسـاس‌تر می‌باشـند (Vidhyasekaran, 2002). با توجه به اطلاعات بدســـت آمده و همچنین با توجه به مطالب ذکر شـــده پیرامون بررســـی نقش آنزیم PAL، می‌توان گفت که فیتوالکســـین‌ها در مقاومت توتون به باکتری *Pst* نقش بسـزایی دارند. همچنین مشخص شد که این آنزیم نقش مهمی در HR دارد که تفاســـیر ما را پیرامون تعاملات باکتری *Pst* و توتون تائید می‌نماید (Silva *et al*., 2006). همچنین این آنزیم اولین آنزیم دخیـل در مســـیر ســـنتز فیتوآلکســـین‌ها اســـت (Coquoz *et al*., 1998). افزایش بیان *PAL* در گیاه توتون با افزایش تجمع ترکیبـات فنلی ضـــــدمیکروبی، مقـاومـت بـه *Cecospora nicotiana* و *Phytophthora parasitica* pv. *nicotiana* را افزایش می‌دهـد (Way *et al*., 2002; Shadle *et al*., 2003). همچنین پژوهش های قبلی نقش ژن *PAL* را در مقاومت گیاه برنج به باکتری *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae* نشان می دهد (Heydarinezhad *et al*., 2016). با این حال، مواردی گزارش شـده که تغییر درترکیبات فنلی، منجر به افزایش حساسیت در برابر عوامل بیماری‌زا شده است (Hanhineva *et al*., 2009). ترکیبات *PAL* در واکنش‌های مقاوم بسیار سریع‌تر از واکنش‌های حساس تجمع پیدا می کنند که این با نتایج به دســـت آمده در این تحقیق همخوانی دارد. در این پژوهش مشـــخص شـــد که ترکیبات *PAL* در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید سریع‌تر از گیاهان شاهد و همچنین تیمار شده با جاســـمونیک اســـید تجمع پیدا می‌کنند. نتایج بررســـی‌های دیگر محققین نیز بیانگر افزایش بیان این ژن پس از آلودگی در گیاهان بود (Yang *et al*., 2013). فیتوآلکســـین ها نیز بعد از آســـیب برگشـــت‌ناپذیر به غشـــای ســـلول در گیاه تجمع می‌یابند. فیتوآلکسـین‌ها به سـرعت در هم‌کنش‌های مقاوم/ ناسازگار که به صورت واکنش فوق‌حساسیت قابل تشـــخیص هســـتند، تجمع پیدا می‌کنند. مرگ ســـلولی، قبل از تجمع فیتوآلکســـین‌ها درون بافت آلوده اتفاق می‌افتد (Vidhyasekaran, 2002).

در گیاهان شاهد سطح فراوانی رونوشت‌های ژن *CAT*، ۱۲ پس از آلودگی افزایش قابل توجهی داشت (حدود ۴/۳ برابر) و سپس روند کاهشی به خود گرفت. نرخ بیان این ژن در گیاهان شاهد در زمان اوج بیان (۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی) حدود ۳/۲ برابر بیشتر از بیان این ژن در گیاهان تیمار شده

با سالیسیلیک اسید در زمان اوج بیان می‌باشد. نرخ بیان این ژن در گیاهان شاهد در زمان اوج بیان (۱۲ ساعت پس از مایه زنی) حدود ۳/۳ برابر بیشتر از بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید در زمان اوج بیان (۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی) می‌باشد.

در گیاهان تیمار شده با هورمون سالیسیلیک اسید برخلاف آنچه در الگوی بیان ژن کاتالاز در گیاهان شاهد مشاهده شد، سطح فراوانی رونوشت‌های ژن *CAT* در ساعت ۱۲ پس از ایجاد آلودگی افزایش ناچیزی داشت (در حدود ۱/۹ برابر افزایش نسبت به زمان صفر) و سپس تا زمان ۷۲ پس از تلقیح به شدت کاهش یافت.

در گیاهان تیمار شده با هورمون جاسمونیک اسید میزان سطح فراوانی رونوشت‌های این ژن ۱۲ ساعت پس از ایجاد آلودگی افزایش ناچیزی داشت (در حدود ۱/۳ برابر افزایش نسبت به زمان صفر) و سپس تا زمان ۷۲ پس از تلقیح به شدت کاهش یافت (شکل ۵).



شکل ۵- الگوی بیان ژن *CAT* در گیاه شاهد، تیمار شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با باکتری *Pst*

Figure 5- *CAT* pattern of gene expression in control plants, treated with salicylic acid and jasmonic acid in various times after infection with *Pst*.

انفجار اکسیداتیو با هدف قرار دادن مستقیم بیمارگر در اولین مراحل آلودگی، به عنوان اولین مرحله دفاعی گیاهان مقاوم به شمار می‌رود. کاتالاز که H_2O_2 را تجزیه می‌کند، باکتری را مقابل اثرات

AOS محافظت می‌کنند و موجب کاهش اثرات تنش های اکسیداتیو که به وسیله عوامل محیطی مختلف ایجاد می‌شود، می‌گردند. در این مطالعه در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید و همچنین جاسمونیک اسید، سطوح پایین بیان ژن *CAT* موجب مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (PCD) به عنوان پاسخی بر علیه عوامل بیماری‌زای باکتریایی فعال می‌شود که نشان دهنده‌ی حضور و فعالیت سیستمی سرکوبگر در مسیر بیان این ژن می‌باشد. این نتایج با یافته‌های محققین دیگر مطابقت دارد (Yang *et al*., 2013). در حالی که در گیاه شاهد سطح بالای بیان ژن *CAT* موجب حذف مولکول سیگنال H_2O_2 می‌شود (Neill *et al*., 2002). بنابراین به جهت فعال‌سازی واکنش فوق‌حساسیت که خود به تجمع مولکول H_2O_2 وابسته است، می‌بایست بیان و فعالیت ژن *CAT* سرکوب شوند (Mittler *et al*., 2004).

مطالعات نشان می‌دهد که گیاهان در مقابله با عوامل بیوتروف عمدتا با مکانیسم‌های مرگ سریع سلولی، محکم کردن دیواره سلولی در محل نفوذ بیمارگر و با افزایش تولید بعضی از پروتئین‌های ضد میکروبی مثل پروتئین‌های PR از نفوذ و توسعه بیمارگر در خود جلوگیری می‌کنند. پیش نیاز تولید ارقام مقاوم، شناسایی مکانیسم‌های درگیر در واکنش به عوامل بیماری‌زا است که منجر به ظهور مقاومت در ارقام مقاوم و حساسیت در ارقام حساس گیاهی می‌شود (Baker *et al*., 1997). بنابراین درک درست از روند تخریب بیماری و همچنین مقاومت میزبان به بیمارگر ممکن است به محقق کمک کند تا با ایده‌های تحقیقاتی بیشتری برای غلبه بر بیماری گام بردارد. با توجه به تغییرات مشاهده شده نقش ژن‌های مطالعه شده در این تحقیق در مقاومت به بیمارگرهای مختلف در گیاهان بخوبی روشن است. در آلودگی آتشک توتون، تصور می‌شود این ژن‌ها در ارتباط با پاسخ‌های دفاعی گیاه دارای نقش باشند. با توجه به نتایج این تحقیق، هورمون سالیسیلیک اسید قادر به القای بیشتر ژن‌های *PAL*، مرتبط با بیماری‌زایی (*PR1*، *PR5*) و فاکتور رونویسی *WRKY12* در مقایسه با JA در گیاه توتون است. علاوه بر این در گیاهان تیمار شده با هورمون‌های فوق، آنزیم کاتالاز کاهش قابل توجهی یافت که خود باعث افزایش تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بیشتر شدن پاسخ مقاومتی مرگ سلولی و افزایش مقاومت گیاه به آتشک توتون می‌شود. در مجموع می‌توان گفت این هورمون‌ها به عنوان القا کننده زیستی کارآمد بوده و از طریق القای سیستم بیان ژن و تولید آنزیم‌ها باعث مقاومت گیاه به بیماری آتشک توتون می‌شوند. با توجه تاثیر بیشتر هورمون SA می‌توان از آن در مدیریت این بیماری با تیمار آن روی گیاه و یا تولید تراریخت‌هایی از توتون که در آن تولید این هورمون بیشتر باشد و یا تراریخت‌هایی که دارای سطح بیشتری از ژن *PAL* یا سرکوب کننده‌های آنزیم کاتالاز باشد، بهره جست.

منابع

Agrios GN (2005). Plant pathology. 5th ed. Academic press, San Diago, 922.

Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997). Signaling in Plant Microbe Interactions. Science 276: 726-733.

Blilou I, Ocampo JA, Garcia-Garrido JM (2000). Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae. Journal of experimental botany 51: 1969-1977.

Block A, James R (2011). Plant targets for Pseudomonas syringae type III effectors. Plant Physiology 123: 1341–1356.

Boyle P, Su EL, Rochon A, Shearer HL, Murmu J, ChuJY, Fobert PR, Despres C (2009). The BTB/POZ domain of the Arabidopsis disease resistance protein NPR1 interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function. Plant Cell 21: 3700–3713.

Campbell MM, Ellis BE (1992). Fungal elicitor- medated responses in pine cell cultures: III. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase. Plant Physiology 98: 62-70.

Coquoz J, Buchala A, Metraux JP (1998). The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. Plant Physiology Biochemistry 117: 1095-1101.

Dahleen L, Okubara PA, Blech AE (2001). Transgenic approaches to combat fusarium head blight in wheat and barley. Crop Science 41: 628-637.

Fitzgerald HA, Chern MS, Navarre R, Ronald PC (2004). Overexpression of (At)NPR1 in rice leads to a BTH- and environmentinduced lesion-mimic/cell death phenotype. Molecular Plant-Microbe Interaction 17: 140-151.

Ganapathi TR, Suprasanna P, RaoPS, Bapat VA (2004).Tobacco (Nicothiana tobacum L.)A model system for tissue culture intervention and genetic engineering. Indian Journal of Biotechnology 3: 171-184.

Glazebrook J (2005). Contrating mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology 43: 205–227.

Grunwald I, Rupprecht I, Schuster G, Kloppstech K (2003). Identification of guttation fluid proteins: the presence of pathogenesis- related proteins in noninfected barley plant. Physiologia Plantarum 119: 192-202.

Hanhineva K, Kokko H, Siljanen H, Rogachev I, Aharoni A, Karenlampi SO (2009). Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (Fragariaxananassa). Journal Experimental Botany 60: 2093-2106.

He R, Chang Z, Yang Z, Zhan H, Zhang X, Liu J. (2009). Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene Pm43 introgreessed from Thinopyrum intermedium into wheat. Theoretical and Applied Genetics 118: 1173-1180.

Heil M, RM Bostock (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. Annual Botany 89: 503-512.

Heydari-Nezhad AM, Babaeizad V, Rahimian H (2016). Studying PR2 and PAL genes involvement in rice resistance against Acidovorax avenae subsp. Avenae. Journal of Agricultural Biotechnology 7: 67-82 (In Farsi).

Hoegen E, Stromberg A, Pihlgren U, Kombrink E (2002). Primary structure and tissue specific expression of the pathogenesis- related protein PR-1b in potato. Molecular Plant Pathology 3: 329-345.

Johnson C, Boden E, Arias J (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. Plant Cell 15: 1846-1858.

Kitajima S, Sato F (1999). Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function. Journal of Biochemistry 125: 1-8.

Klement Z, Rudolph K, Sands DC (1990). Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapset 568.

Kogel KH, Langen G (2005). Induced disease resistance and gene expression in cereals. Journal Cellular Microbiology 11: 1555-1564.

Li J, Brader G, Palva ET (2004). The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. Plant Cell 16: 319-331.

Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. Plant Journal 46: 477-491.

Lillemo M, Asalf B, Singh RP, Huerta-Espino J, Chen XM, He ZH Bjrnstad A (2008). The adult plant rust resistance loci Lr34/Yr18 andLr46/Yr29 are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line saar. Theoretical and Applied Genetics 116: 1155-1166.

Liu D, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA (1994). Osmotinoverexpression in potato delays development of disease symptoms. proceedings of the national academy of sciences USA 91: 1888–1892.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 -(ΔΔCT) CT method. Methods 25: 402-408.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant science 9: 490–498.

Moralejo FJ, Cardoza RE, Gutierrez S, Martin JF (1999). Thaumatin production in Aspergillus awamori by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage. Applied and Environmental Microbiology 65: 1168–1174.

Muchembled J, Lounes-Hadj shahraoui A, Grandmougin-Fer jani A, Sanchollen M (2006). Changes in lipid composition of Blumeria graminis f.sp. tritici conidia produced on wheat leaves treated with heptanoyl SA. Phythochemistry 67: 1104-1109.

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. Journal of Experimental Botany 53: 1237–1247.

Oh S, Baek K, Park J, Yi S, Yu S, Kamoun S, Choi D (2008). Capsicum annuum WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. New Phytology 177: 977–989.

Raskin I (1992). SalisylateT a new plant hormone. Plant Physiology 99: 799-803.

Rasmussen J, Hammerschmidt R, Zook NM (1991). Systemic Induction of Salicylic Acid Accumulation in Cucumber after Inoculation with Pseudomonas syringae pv syringae. Plant Physiology 97: 1342-1347.

Rate DN, Greenberg JT (2001). The Arabidopsis aberrant growth and death2 mutant shows resistance to Pseudomonas syringae and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. Plant Journal 27: 203-2110.

Rauscher M, Adam AL, Wirtz S, Guggenheim R, Mendgen K, Deising HB (1999). PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. Plant Journal 19: 625-633.

Schaller F (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. Journal Experimental Botany 52: 11-23.

Schmidt G, Delaney S (2010). Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (Nicotiana tabacum) during development and abiotic stress. Molecular Genetics and Genomics 283: 233-241.

Schulthesis H, Derchert C, Kogel KH, Huckelhoven R (2003). Functional analysis of barley PAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. Plant Journal 36: 589-601.

Sels J, Mathys M, De Coninck BMA, Cammue BPA (2008). Plant pathogenesis- related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry 46: 941-950.

Shadle GL, Wesley SV, Korth KL, Chen F, Lamb C, Dixon RA. (2003). Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. Phytochemistry 64: 153-161.

Shah J, Klessig DF (1999). Salisylic acid: signal perception and transduction. In: Libbenga K, Hall M, Hooykaas PJJ (Eds.). new comprehensive biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology Plant hormones. Elsevier UK: 513-554.

Silva MD, Várzea V, Guimarães LG, Azinheira HG, Nicole M (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. Brazil Journal of Plant Physiology 18: 119-147.

Shimono M, Koga H, Akagi A, Hayashi N, Goto S, Sawada M, Kurihara T, Matsushita A, Sugano S, Jiang CJ, Kaku H, Inoue H, Takasuji H (2012). Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterialdisease resistance. Molecular Plant Pathology 13: 83–94.

Song F, Goodman RM, (2001). Molecular biology of disease resistance in rice. Physiological and Molecular Plant Pathology 59: 1-11.

Sticher L, Mauchmani B, Metraux JP (1997). Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 35: 235- 270.

Stotz HU, Thomson J, Wang Y (2009). Plant defensins: defense, development and application. Plant Signaling & Behavior 4: 1010-1012.

Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B,Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF (1998). Separate Jasmonate- dependent and salicylate- dependent defense-response pathway s in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceeding of the Nothinal Academy of Science of USA 95: 15107-15111.

Traw MBd, Bergelson J (2003). Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid and gibberellin induction of trichomes in Arabidopsis. Plant Physiology 133: 1367-1375

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006). Significance of inducible defense- related proteins in infected plants. Annual Review Phytopathology 44: 135-162.

Verk MC, Neeleman L, Bol JF, Huub JM (2010). Tobacco Transcription Factors NtWRKY12 and TGA2.2 Interact in vitro and in vivo and Activate PR-1a Gene Expression. Plant Physiology 123: 1341–1356.

Vidhyasekaran P (2002). Bacterial Disease Resistance in Plants: Molecular Biology and Biotechnological Application.

Vigers AJ, Roberts WK, Selitrennikoff CP (1991). A new family of plant antifungal proteins. Molecular Plant Microbe Interactions 4: 315-323.

Way HM, Kazan K, Mitter N, Goulter KC, Birch RG, Manners JM (2002). Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyasegene from Stylosanthes humilisin transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth. Physiology Molecular Plant Pathology 60: 275-82.

Xu H, Reddy ASN (1997). Cloning and expression of a PR5-like protein from Arabidopsis: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. Plant Molecular Biology 34: 949–959.

Yang L, li W, Guohua C, Shanshan J, Liping S, Dequan L (2013). Response of tobacco to the Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 is mainly dependent on salisylic acid signaling pathway. FEMS Microbiology Letters 344: 77-85.

Yu KW, Gao W, Hahn EJ, Paek KY (2002). Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of panax ginseng C.A. Mayer. Journal of Biochemistry 11: 211-215.

Zhang Y, Wang L (2005). The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. BMC Evolutionary Biology 5: 1–12.

Induction of several Pathogenesis-Related genes in tobacco plants treated by salicylic and jasmonic acid after challenging with Pseudomonas syringae pv. Tabaci

Farajollahi F.[1]*, Babaeizad V.[2], Rahimian H.[3]

[1]Master in Plant Pathology of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
[2]Associate Professor in Plant Protection Department of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
[3]Professor in Plant Protection Department of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Abstract

Tobacco as a model plant (owing to certain features) is extensively used in molecular research with the aims to understand the fundamental plant and pathogen interactions. Fire blight bacterial disease of tobacco (Pseudomonas syringae pv. tabaci (Pst)) causes considerable damage to tobacco worldwide. Induction of genes associated with virulence that play a role in resistance to diseases can be effective in reducing the severity of disease. The evidence suggests that plant hormones are effective in gene expression in plants and increase the production of secondary metabolites. In addition, they stimulate the immune system of plant through the activation of transcription of genes linked with plant defense mechanisms that regulate the induced resistance. In this study, the expression of PR1, PR5, Pal, Catalase and WRKY12 in tobacco plants treated with salicylic acid at a concentration of 3 mM and tobacco plant treated with jasmonic acid at a concentration of 0.5 mM and also control plant in times 0, 12, 24, 48 and 72 after injection of Pseudomonas syrigae pv. tabaci was investigated by Quantitative Real-time PCR (QRT-PCR) technique. The results showed that jasmonic acid and particularly salicylic acid treatments caused significant changes in the expression of these genes after bacterial injection.

key words: *Fire blight, Salicylic acid, Jasmonic acid, QRT-PCR, Resistance genes*.

* Corresponding Author: Farajollahi F. Tel: +989111188742 Email: farideh.farajollahi1989@gmail.com