

تأثیر احساس برخی الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب شناخته شده در افزایش مقاومت گیاه آراییدوپسیس

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 درباره 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 آراییدوپسیس 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* (Xac306) که به‌عنوان غیربیماریزا روی آراییدوپسیس 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: آراییدوپسیس، ایمنی ذاتی، MAMP، *Pseudomonas*، *Botrytis*، *Xanthomonas*، *Alternaria*

مقدمه

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 دیواره سلولی یا متابولیت‌های ثانویه قرار می‌گیرد

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

شناخته شده که به عنوان 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 زیردامنه بسیار محافظت شده از انتهای آمینی فلاژلین توسط بسیاری از گیاهان به عنوان MAMP شناخته می‌شود. پپتیدهای سنتز شده ۱۵ (flg15) و ۲۲ (flg22) آمینواسیدی که این زیردامنه را پوشش می‌دهند در غلظت‌های زیر نانومولار فعال اند (Felix et al. 1999). فاکتور نسخه برداری EF-Tu باکتری‌ها، MAMP توصیف شده دیگری است که از استرینی از *E. coli* خالص سازی شد که در آن ژن FliC (مسئول سنتز زیرواحد سازنده فلاژلین) حذف شده است و هنوز می‌تواند پاسخ‌های دفاعی اولیه در آرآبیدوپسیس را تحریک کند (Kunze et al. 2004). قسمت فعال این پروتئین ناحیه‌ای ۱۸ آمینواسیدی استیل 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 به عنوان ناحیه فعال MAMP‌های شناخته شده در افزایش مقاومت گیاه *Arabidopsis thaliana* نسبت به چهار بیمارگر قارچی و باکتریایی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

گیاهان جهش یافته، 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 به عنوان مشتقات کاملاً فعال EF-Tu و فلاژلین استفاده شدند.

گیاهان آرآبیدوپسیس (Col-0) موتانت *fls2* (بدون گیرنده 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*

(Nuernberger and Lipka 2005). علاوه بر این سدهای دائمی، گیاهان یک سری سیستم‌های دفاعی قابل تحریک هم دارند که در زمان احساس میکروپها توسط گیاه وارد عمل می‌شوند. گیاهان برای شناسایی میکروپها گیرنده‌های شناساگر الگو (Pattern recognition receptors-PRR) در غشای پلاسمایی دارند که الگوهای مولکولی مرتبط با میکروپ (Microbe-associated molecular patterns-MAMPs) را از طریق دامنه‌های (Domains) خارج سلولی شناسایی و پیام‌رسانی داخل سلولی برای تحریک واکنش‌های دفاعی را فعال می‌کنند. این فرآیندها به عنوان ایمنی القا شده از طریق MAMP triggered (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 فعال شونده توسط میتوزن (mitogen-activated protein kinase-MAPK) فعال می‌کنند. واکنش‌های دفاعی معمول گیاه تولید فرم‌های فعال اکسیژن (ROS)، تجمع کالوز و تحریک نسخه برداری ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی همچون دیفنسین (پروتئین‌های ضد میکروبی)، آنزیم‌های لیتیک و آنزیم‌های سنتزکننده فیتوالکسین‌ها (متابولیت‌های ثانویه 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 بین سلولی 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 به صورت مرگ سلولی 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

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 پیتیداها استفاده شد. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف پیتیداها 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 درجه سانتی‌گراد به مدت 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 (Gebrüder Patzer, Sinntal-Jossa, Germany) GS 90 حاوی ورمیکولیت (به نسبت ۵ قسمت ورمیکولیت در ۲۱ قسمت خاک) که با حشره‌کش کنفیدور (Confidor) ۰/۳۵ درصد آبیاری شده بود، کشت شدند. برای دو هفته اول، گیاهان در داخل اتافک کشت Percival با شرایط روز کوتاه (دوره نوری ۸ ساعته، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵ درصد) قرار داده شدند و سپس، به مدت ۵ هفته در اتافک اقلیمی (دوره نوری ۸ ساعته، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵۰ درصد) قرار داده شدند.

آزمون‌های رشد باکتریایی

باکتری‌های (*Pst* DC3000) (با ژن مقاومت به ریفامپسین) و *Xanthomonas axonopodis* 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 به مدت ۲۰ ساعت، در شیکر انکوباتور به ترتیب با دمای ۲۸ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. باکتری‌ها با سانتریفیوژ جمع‌آوری و در محلول ۱۰ میلی‌مولار $MgCl_2$ تعلیق شدند. غلظت آن‌ها

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 درجه سلسیوس کشت شدند. کنیدی‌ها به آرامی از کشت‌های هشت‌روزه روی PDA جمع‌آوری شدند و در محیط مایع عصاره سیب‌زمینی دکستروز (PDB) که با ۰/۱ درصد توپین ۸۰ (Tween 80) همراه شده بود تعلیق شدند. سوسپانسیون به دست‌آمده از پارچه 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 به مدت پنج روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. میسلیم‌ها روی فیلترهای توزین‌شده واتمن شماره ۱ جمع‌آوری شدند و با آب مقطر استریل شست‌وشو شدند. فیلترهای میسلیم‌دار در داخل پتری‌های شیشه‌ای قرار داده شدند. ابتدا، به مدت ۶ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سپس، یک شب در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت، وزن خشک میسلیم‌ها 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 تک‌کلون از این محیط‌ها به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب در شیکر

وجود غلظت‌های مختلف پپتیدها در محیط کشت PDB هیچ اثر معنی‌داری بر وزن خشک نهایی میسلیموم بیمارگرهای قارچی نداشت (شکل ۱- 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 ۲- 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 گیرنده EF-Tu) و *fls2-17* (بدون گیرنده 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 ۳- الف و ب). نتایج حاصل از زیست‌سنجی آزمون بیماری‌زایی *A. brassicicola* نیز کمابیش مشابه بیماری‌زایی *B. cinerea* بود (شکل ۴- 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.

اثر MAMPها بر منحنی رشد باکتری‌های بیمارزا در برگ‌های آرابیدوپسیس
گیاهان آرابیدوپسیس وحشی و جهش‌یافته، طبق

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 10^5 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 دیونیزه 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 قطره ۵ میکرولیتری از سوسپانسیون اسپور قارچی مایه‌زنی شدند. گیاهان مایه‌زنی‌شده در رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد، ۲۲ درجه سانتی‌گراد و شرایط روز کوتاه 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 ناحیه تخریب‌شده برگ ارزیابی شد.

نتایج

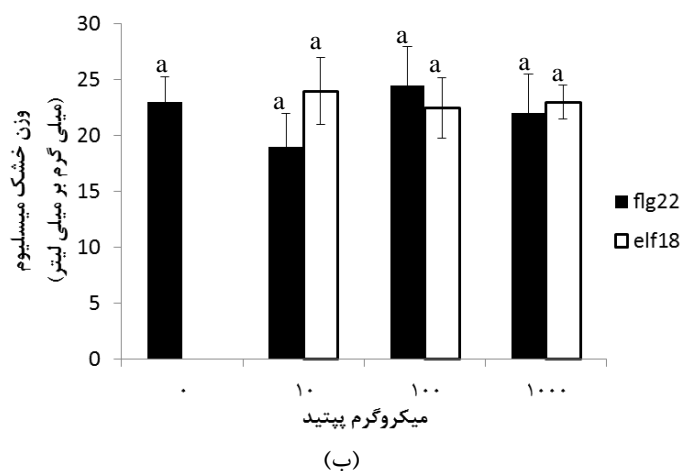
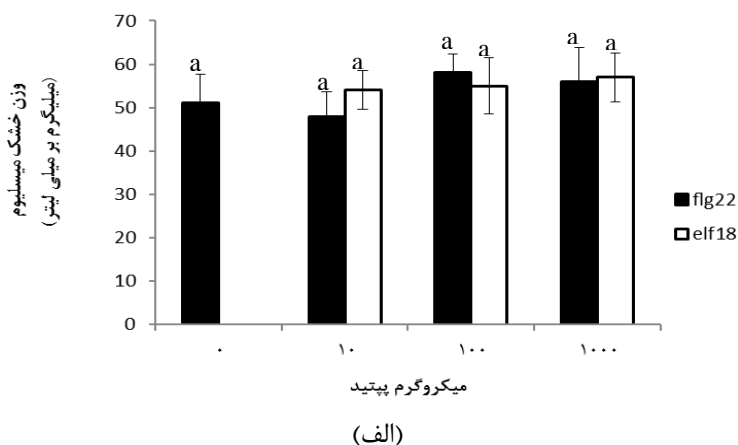
elf18 و flg22 اثر مستقیم بازدارنده بر رشد باکتریایی و قارچی نداشتند

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.

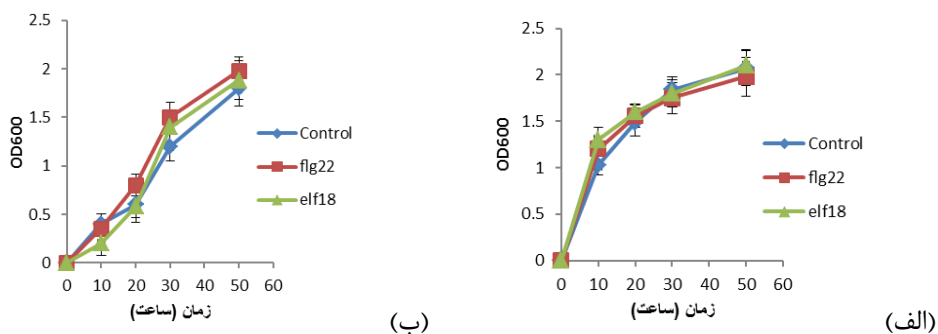
اثر MAMPها بر منحنی رشد یک باکتری غیربیماریزا در برگ‌های آرابیدوپسیس

برای مشاهده اینکه پیش‌تیمار گیاه آرابیدوپسیس با MAMPها، اثری بر منحنی رشد یک باکتری غیربیماریزا در برگ‌های آرابیدوپسیس دارد، استرین *Xac 306* 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 پیش‌تیمار شده با آب و گیاهان جهش‌یافته تیمار شده با پپتیدها یا آب ثابت بود و تا ۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی، ثابت بود (شکل ۶- الف و ب).

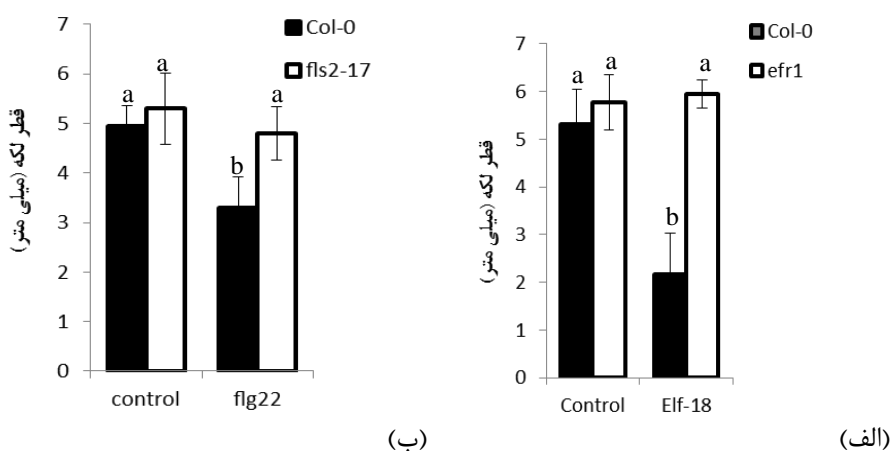
توضیحات داده‌شده، با پپتیدها تیمار شدند و بعد از ۱۲ ساعت، با استفاده از سرنگ بدون سوزن با باکتری *Pst DC3000* مایه‌زنی شدند. بعد از انجام مایه‌زنی، برگ‌های مایه‌زنی‌شده در زمان‌های مختلف برداشت شدند تا رشد باکتری در داخل آن‌ها ارزیابی شود. رشد باکتری به‌صورت چشمگیری در برگ‌های گیاهان وحشی پیش‌تیمار شده با *flg22* (به میزان ۴۴ برابر) و *elf18* (۱۴۰ به میزان برابر) کاهش پیدا کرد (شکل ۵- الف). پیش‌تیمار گیاهان *elf1* و *fls2-17*، 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 تیمار شده با آب مقطر سترون و بوته‌های تیمار شده با پپتیدها یکسان بود (شکل ۵- ب).



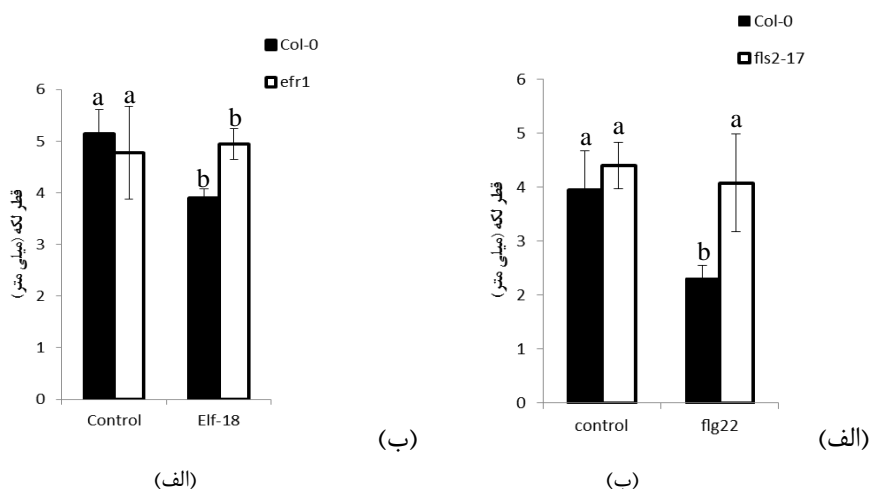
شکل ۱. اثر مستقیم *elf18* و *flg22* بر وزن خشک میسلیمومی *B. cinerea* (الف) و *A. brassicicola* در محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز بعد از پنج روز (ب). ستون‌ها و نوار خطاها، نشان‌دهنده میانگین‌ها و انحراف معیارها هستند. حروف مشابه بیانگر نداشتن اختلاف آماری در سطح ۵ درصد هستند (تعیین‌شده با آزمون فیشر).



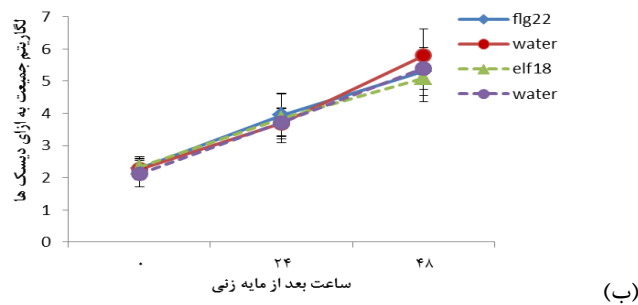
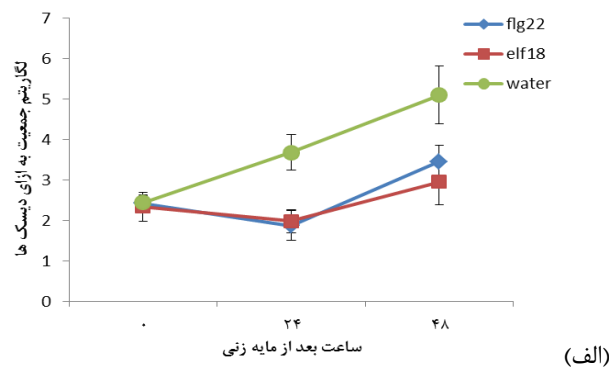
شکل ۲. اثر مستقیم flg22 و elf18 بر منحنی رشد *Pst* DC3000 (الف) و *Xac* 306 (ب) در محیط کشت LB در طول ۴۸ ساعت. منحنی‌ها نشان‌دهنده میانگین‌ها و نوارهای خطا نشان‌دهنده انحراف معیار هستند.



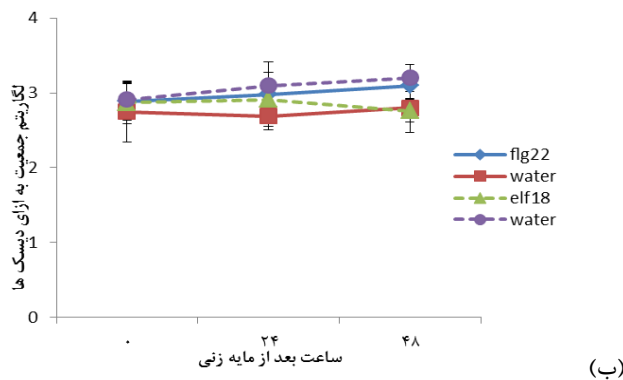
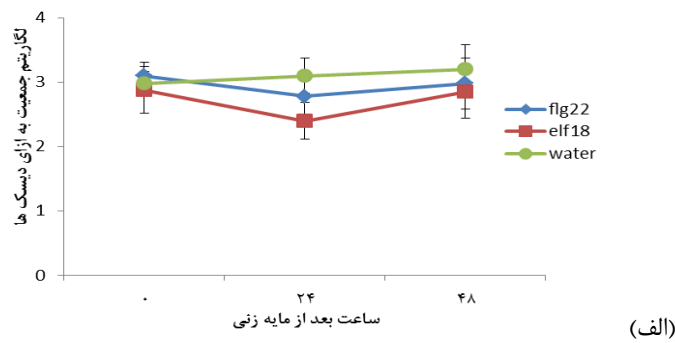
شکل ۳. اثر elf18 (الف) و flg22 (ب) بر مقاومت گیاهان *A. thaliana* علیه *B. cinerea* گیاهان وحشی *A. thaliana* (Col-0) و جهش یافته‌های آن‌ها با ۱۰ میکرومولار flg22 و elf18 محلول‌پاشی شدند و بعد از ۱۲ ساعت، با قارچ *B. cinerea* مایه‌زنی شدند. ستون‌ها و نوار خطاها، نشان‌دهنده میانگین‌ها و انحراف معیارها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



شکل ۵. اثر flg22 و elf18 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 محلول پاشی 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.



شکل ۶. اثر flg22 و elf18 بر مقاومت گیاه *A. thaliana* علیه *Xac 306*. 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 محلول پاشی 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.

بحث

فعالیت ضد قارچی پروتئین‌های PR-1 توتون و تنباکو را علیه *Phytophthora infestance* نشان دادند. فرم‌های فعال اکسیژن (انفجاری اکسیداتیوی) می‌توانند به صورت مستقیم علیه بیمارگرها بازدارنده باشند یا به صورت غیرمستقیم با ایجاد اتصالات عرضی در دیواره سلولی به افزایش مقاومت گیاه علیه آن‌ها منجر شوند. علاوه بر این فرم‌های فعال اکسیژن ممکن است به عنوان سیگنال‌های استرس ثانویه برای تحریک پاسخ‌های دفاعی میزبان عمل کنند (Apel and Hirt 2004).

میکروارگانسیم مدل دیگری که در این تحقیق استفاده شد، *Pst* DC3000 بود. این باکتری که عامل بیماری لکه‌باکتریایی گوجه‌فرنگی است، به دلیل قابلیت بیماریزایی روی آرابیدوپسیس به عنوان بیمارگر مدل برای بررسی اساس مولکولی برهم‌کنش‌های گیاه بیمارگر استفاده شده است (Katagiri 2002, Abramovitch 2014). این استرین به عنوان 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، به صورت معنی‌داری تحت تأثیر قرار گرفت. تراکم سلولی این استرین در گیاهان تیمار شده با پپتیدها در مقایسه با گیاهان تیمار نشده شاهد، ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی، به صورت 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 آرابیدوپسیس را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که PEN می‌تواند به صورت چشمگیری رشد باکتری *Pst* DC3000 را کاهش دهد.

همچنین، در این تحقیق میکروارگانسیم 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 پیش‌تیمار شده با *elf18* به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد. این نتایج، مشابه نتایج Chuanfu and Zhonglin (2012) است که نشان دادند که تراکم سلولی *Xac* 306 به مدت پانزده روز بعد از مایه‌زنی، در برگ‌های

گیاهان در طبیعت در معرض دستة وسیعی از میکروب‌ها هستند و با آن‌ها تعامل دارند. بسیاری از این میکروب‌ها ممکن است بیمارگرهای بالقوه علیه هر کدام 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 به صورت 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 دستة وسیعی از بیمارگرها داشته باشد. پیش‌تیمار گیاهان Col-0 با هر دوی MAMPهای شناخته‌شده، به صورت معنی‌داری مقاومت آن‌ها علیه قارچ‌های *B. cinerea* و *A. brassicicola* را افزایش داد که در این تحقیق به عنوان بیمارگرهای قارچی مدل استفاده شدند.

تیمار گیاهان آرابیدوپسیس با *flg22* به قلیایی شدن فضای خارج سلولی (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 به عنوان 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; Aragaki, 1966). این فرضیه با بررسی‌های Bayles et al. (1990) قوت گرفت که در آن بازداری از سنتز کالوز با 2-deolily-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 به صورت 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)

تکثیر می‌یابد، اما بخشی از جمعیت آن‌ها بر اثر مکانیسم‌های دفاعی گیاه کاهش می‌یابند و در نهایت، بین تکثیر سلولی و مرگ سلولی تعادلی پایدار به وجود می‌آید. اما پیش‌تیمار گیاه با یک انگیزندهٔ خالص به فعال شدن بیشتر سیستم‌های دفاعی گیاه منجر شده است و باعث کاهش جمعیت باکتری می‌شود.

آرابیدوپسیس، ثابت ماند. هرچند، در تحقیق مذکور مشخص شده است که این باکتری می‌تواند جمعیت خود را در گیاهان آرابیدوپسیس جهش‌یافتهٔ *nho1*، *eds5*، *eds1* 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

REFERENCES

- Abdelillah A, Houcine B, Halima MD, Imane Z, Djamel 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 Phytopathology* 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. *Proceeding of National Academic Science* 90: 7327-7331.
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review 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. *Physiol. 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 Phytopathology* 38: 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. *Proceeding 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 alkalization, 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 Journal* 18: 277-84.
- Granado J, Felix G, Boller T** (1995) Perception of fungal sterols in plants: subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalization in tomato cells. *The Plant Physiology* 107: 485-490.
- Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AM, He K, Li J, Schroeder JJ, Peck SC, Rathjen JP** (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceeding 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 O²⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceeding of National Academic Science USA* 94: 4800-5.

- Jaffe MJ, Leopold 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, Mössinger 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.
- Nürnberg 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, Nürnberg 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 lettuce to *Plasmopara lactucae*. *Phytopathology* 83: 1498-1501.
- Stanghellini ME, Aragaki M** (1966) Relation of periderm formation and callose deposition 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 Pathology* 67: 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, Nürnberg T, Frachisse J-M, Wirtz W, Guern J, Hedrich R** (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca₂C-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceeding 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.