مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷

اثر بتا آمینو بوتیریک اسید (BABA) در القا مقاومت در گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری *Pseudomonas syringae pv. Syringa*

هاجر پورابطحی .M.Sc*، علی مقدم .Ph.D ، زهره حیدریان .Ph.D

- دانشگاه شیراز، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، شیراز، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: hajar.pourabtahi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۳

چکیده

هدف: به‌منظور بررسی اثر بتا آمینو بوتیریک اسید (BABA) در القا مقاومت سیستمیک در گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری *Pseudomonas syringae pv. syringa* این مطالعه انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: گیاهان گوجه‌فرنگی رقم مجار در مرحله‌ی چهار برگی انتخاب شدند. برای هر گلدان ۷۰ میلی‌لیتر محلول ۲۵۰ میلی‌مولار، از BABA تهیه شد. محلول فوق روی برگ‌های گیاه اسپری شد. گلدان‌های تیمار شده درشرایط کنترل شده (۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و هشت ساعت تاریکی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) به‌مدت ۲ روز قبل از القا باکتری نگه‌داری شدند. پس از دو روز، باکتری به گیاه تلقیح شد. RNA کل از برگ‌ها در زمان‌های صفر، ۲۴، ۷۲، ۹۶ ساعت پس از تلقیح باکتری استخراج شد. cDNA سنتز شد و الگوی بیان ژن به‌روش RT – PCR مورد سنجش و بررسی قرار گرفت.

نتایج: میزان بیان سه ژن مرتبط با دفاع (PR1، NCED و SPR2)، در نتیجه آلودگی با باکتری افزایش می‌یابد. با این‌حال، پیش‌تیمار با BABA منجر به افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های مقاومت در پاسخ به چالش پاتوژن نسبت به گیاه شاهد شد و علایم ظاهری بیماری (به‌صورت لکه‌های گرد و نامنظم تا قهوه‌ای و سیاه با کلروز) که باعث خسارت در گوجه‌فرنگی می‌شود، کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: .پیش‌تیمار گیاه توسط BABA باعث تقویت سیستم دفاعی گیاه می‌شود و اثر بخشی فوق‌العاده این القاگر را در ایجاد مقاومت در گیاه را نشان می‌دهد. در نتیجه می‌توان از این القاگر در جهت کنترل *P. syringae pv. Syring a* در گوجه‌فرنگی استفاده کرد.

واژگان کلیدی : بتا آمینو بوتیریک اسید، *Pseudomonas syringae pv. Syringe*، مقاومت القایی، PR1، NCED و SPR2

مقدمه

تنش به مفهوم تغییر شرایط طبیعی و بهینه فیزیولوژی گیاه است که رشد و توسعه گیاهان را به‌شدت کاهش می‌دهد. آفات و بیماری‌ها از جمله عوامل تنش‌زای زیستی هستند که برروی عملکرد محصولات کشاورزی تاثیر می‌گذارند. در ۵۰ سال گذشته، شایع‌ترین استراتژی مبارزه با آفات و بیماری‌ها، استفاده از آفت‌کش‌ها و سموم شیمیایی بوده است. در سال‌های اخیر کاهش مصرف سموم شیمیایی در انگلیس گزارش شده است. دلیل عمده این کاهش، کاهش آفات و بیماری نیست، بلکه تحقیقاتی است که امروزه خطرات احتمالی سموم شیمیایی را برجسته کرده و منجر به محدودیت در استفاده از آن‌ها شده است (۱). با توجه به اهمیت این موضوع، دنیای امروز نیازمند نوآوری روش‌های کنترلی جایگزین برای موفقیت در تولید محصولات کشاورزی با کیفیت و دستیابی به نیازهای غذایی آینده در یک روش پایدار است (۱). یکی از روش‌های کنترلی، افزایش مکانیسم‌های دفاعی گیاهان است. گیاهان در مقابل بیمارگر (پاتوژن) از مکانیسم‌های متفاوتی برای دفاع از خود و مقاومت در برابر پاتوژن استفاده می‌کنند. تاکنون انواع مختلفی از مقاومت گیاهان علیه بیمارگرهای گیاهی شناخته شده است که می‌توان به مقاومت غیر میزبانی، مقاومت القایی و مقاومت ذاتی (basal) گیاه اشاره کرد (۲). هورمون‌های گیاهی از جمله اتیلن (ET) Ethylen، جاسمونیک‌اسید (JA)، اسید آبسیزیک Absisic acide (ABA) و اسید سالسیلیک Salicillic acide (SA) باعث ایجاد مقاومت ذاتی در گیاه می‌شوند. بخشی از مقاومت ذاتی (basal)، مقاومت القایی (Induced resistance) است که این نوع مقاومت در گیاه سالم فعال نیست. مقاومت القایی به وسیله عوامل زیستی یا غیر زیستی در گیاه فعال می‌شود.

از انواع مهم مقاومت القایی (Systemic Acquired Resistance) SAR و (Induced Systemic Resistance) ISR می‌باشند (۳).

القای SAR با افزایش موضعی و سیستمیک SA همراه است. همچنین بیان گروهی از ژن‌های وابسته به بیماری‌زایی Pathogenesis-related genes (PR) همراه با این نوع مقاومت دیده می‌شود (۴ و ۳).

یکی دیگر از انواع مقاومت القایی، ISR می‌باشد. باکتری‌ها (Plant growth promoting rhizobacteria) و یا قارچ‌های پاتوژن (Plant growth promoting fungi) افزایش دهنده‌ی رشد گیاهان در محیط ریشه، توانایی ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه را دارند. این قارچ‌ها باعث ایجاد و پراکندگی سیگنال درگیاه می‌شوند که منجر به ظهور مقاومتی به نام ISR می‌شود. در این نوع مقاومت سیگنال‌های اصلی ET و JA می‌باشند، ولی تحقیقات اخیر نشان داده است که SA نیز در ایجاد این نوع مقاومت نقش داشته است (۵).

مقاومت ناشی از القا در گیاه به‌صورت افزایش بیان ژن‌های دفاعی گیاه بر علیه تنش‌ها ظاهر می‌گردد. امروزه می‌توان با استفاده از ترکیبات شیمیایی القا کننده‌ی مقاومت در تعدادی از گیاهان، با افزایش دادن ژن‌های دفاعی، یک وضعیت فیزیولوژیکی منحصر به فرد بنام مستعد سازی (priming) ایجادکرد، به‌طوری‌که گیاه، وقتی دوباره در معرض استرس قرار گرفت دارای یک قابلیت مقاومت دربرابر بیماری و عامل عفونی است (۶). ظرفیت اسید بتا آمینو بوتیریک (β-amino butyric acid) (BABA) برای القا مقاومت در گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی سال‌ها است که مورد توجه بوده است (۷). تا به امروز مشخص شده است که BABA مسیر دفاعی را تقویت می‌کند که مناسب‌ترین راه برای مقابله با وضعیت استرس می‌باشد (۷). BABA معمولا پاسخ‌های دفاعی را مستقیما القا نمی‌کند، اما گیاه را برای واکنش سریعتر و یا قویتر به استرس آماده می‌کند. جالب توجه است که حالت پایه القا شده توسط BABA نیز می‌تواند به فرزندان یک گیاه از طریق دانه‌های آن انتقال داده شود (۷). به‌طور کلی پذیرفته شده است که BABA، یک آمینو اسید غیر پروتئینی و یک

عامل پرایمر قوی SAR در گیاهان است. اثرات بالای القا BABA در افزایش مقاومت در بسیاری از سیستم‌های بیماری‌زای گیاهی نشان داده شده است (۸ و ۹ و۱۰). به‌علت اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی و اثرات مخرب باکتری *P syringae pv. Syring* بر روی این گیاه که گاهی بیش از ۸۰ درصد یک گلخانه را تحت تاثیر قرار می‌دهد و کاهش قابل توجه‌ی در عملکرد گوجه‌فرنگی ایجاد می‌کند (۱۱) و همچنین به‌منظور پی بردن به ساز و کار ایجاد مقاومت القایی براثر کاربرد BABA در گیاه تحت شرایط تنش با این باکتری، این پژوهش طراحی و اجرا شد. در این مطالعه، از سه ژن که در نتیجه‌ی القای مقاومت در گیاه افزایش می‌یابند به‌عنوان مارکر استفاده شد. هر گونه تغییر در بیان این سه ژن (PR1 (Pathogenesis related genes نشانگر مقاومت SAR و systemin-promediated responses (SPR2) و 9-*cis*- (NCED) epoxycarotenoid dioxygenaset به‌عنوان مارکرهایی که در ایجاد مقاومت ISR نقش دارند) بیان‌گر ایجاد مقاومت القایی در این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه: ابتدا ماسه‌ی رودخانه‌ای، دوبار به فاصله زمانی یک روز اتوکلاو می‌شود. بذر گوجه‌فرنگی (Lycopersicon esculentum Mill) در خزانه‌ای که خاک اتو کلاو سرد شده در آن وجود دارد کاشته و پس از سه هفته که نشاها رشد کردند به گلدان‌های یک کیلوگرمی که حاوی پیت ماس و ماسه به نسبت مساوی بود انتقال دادیم و گلدان‌ها در شرایط اتاق کشت (۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و هشت ساعت تاریکی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شد. گیاهان ۳ مرتبه در هفته و از قسمت زیر گلدانی آبیاری شد. و به‌طور هفتگی با کود هوگلند تغذیه شدند. پس از رسیدن گیاه به مرحله‌ی چهار برگی گیاهان به‌وسیله‌ی مقادیر تعیین شده از غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار BABA (برای هر گلدان ۷۰ میلی‌لیتر از محلول ۲۵۰ میلی مولار (BABA) محلول‌پاشی شد. در این آزمون از طرح کاملا تصادفی استفاده شد. در این طرح‌ها تیمارها به‌طور کاملا تصادفی در کرت‌ها قرار می‌گیرند، به‌طوری‌که شانس همه‌ی تیمارها برای قرار گرفتن در هر یک از طرح‌ها با هم برابر است.

تهیه محیط کشت باکتریایی و بیمارگر: محیط کشت مورد استفاده جهت کشت باکتری، *Pseudomonas syringae pv. Syringe* محیط King and Bertani (KB) می‌باشد. برای تهیه‌ی جدایه‌های سودوموناس، باکتری روی محیط KB جامد کشت داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، باکتری‌های تک کلون به محیط کشت سوسپانسیون LB انتقال یافت. سپس سوسپانسیون‌های باکتری‌یایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری‌شد. رشد باکتری‌ها در محیط کشت را می‌توان با خواندن چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر سنجید.

گیاهان در مرحله‌ی چهار برگی توسط BABA محلول‌پاشی شدند و پس ازگذشت ۴۸ ساعت، باکتری به گیاه تلقیح شد. تیمارها شامل: گیاه + باکتری، گیاه +BABA+ باکتری، گیاه+ BABA و گیاه شاهد بودند که برای هرکدام ۳ تکرار در نظر گرفته شد. میزان بیان ژن‌های PR1، NCED و SPR2 (به ترتیب در نمودارهای ۱، ۳ و ۲ نشان داده شده است) به‌عنوان مارکرهای القایی مقاومت (SAR , ISR) در زمان‌های مختلف صفر، ۲۴، ۷۲، ۹۶ ساعت پس از اعمال تنش، با استفاده از آزمایش Real Time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

استخراج RNA: استخراج RNA با استفاده از کیت Plus-RNXTM شرکت سیناژن براساس دستورالعمل شرکت انجام شد.

تیمار DNase: حذف DNA از RNA استخراج شده با آنزیم DNase I شرکت Vivantis انجام شد.

سنتز cDNA سنتزcDNA با استفاده از کیت cDNA synthetase شرکت Vivantis و پرایمر oligo dT طی دو مرحله انجام شد.

توالی ژن‌ها از سایت ncbi تهیه شد و آغازگرها توسط نرم افزار آلل ای دی (Allel IDi) طراحی شد (جدول ۱).

تکثیر ژن: برای تکثیر قطعه ژن، از آغازگرهای اختصاصی این ژن‌ها استفاده شد. از میان این ژن‌ها یک جفت Forward و Reverse، با طول قطعه قابل تکثیر توسط دو پرایمر اول ۱۴۰ جفت باز و با مواد مورد نیاز انجام پذیرفت.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

ژن	توالی رفت	توالی برگشت
PR1	5 '- GCC AGA CTA TAA CTA GCT ACC – 3'	5 '- GAA CCA CCA CCC ATT GTT GC - 3'
SPR2	5 '- AAG CCA CAG AAC TCA TCA TCA G - 3'	5' - GCC AGC AAG GGA AAG GGT AG - 3'
NCED	5 '- GCT TAT TTG GCT ATC GCT GAA -3'	5' - CGT CTT CTT CCT TGC TGT TGG - 3'
ef1a	5 '- GCC ACA CCT CGC ACA TTG - 3'	5 '- GCC AGC ATC ACC ATT CTT G -3'

برای انجام Real time RT-PCR (Relative) از دستگاه Bioer ساخت کشور چین استفاده شد. و از کیت SYBR برای تهیه مواد واکنش Real time RT-PCR استفاده شد. ابتدا همه نمونه‌های cDNA ساخته شده ۵ برابر رقیق شدند (به‌منظور کاهش دادن خطای پایپتینگ). مقدار ۵ میکرولیتر از cDNA رقیق شده به‌عنوان الگو در شرایط یکسان برای تمام نمونه‌ها در جریان واکنش Real time RT-PCR بکار گرفته شد. فرآیند PCR با استفاده از پرایمرهای کنترل داخلی ef1 و پرایمرهای ژن اصلی انجام شد. غلظت تمام مواد موجود در واکنش برای تمام نمونه‌ها یکسان بود. کمی سازی و تعیین الگوی بیان ژن‌ها (ژن PR1 در سیگنالینگ اسید سالسیلیک (SAR)، ژن SPR2 در سیگنالینگ جاسمونیک اسید و ژن NCED در سیگنالینگ اسید آبسیزیک (هردو ژن در ایجاد مقاومت القایی ISR) تحت تنش بیمارگر و در حضور و عدم حضور ماده‌ی القا کننده (BABA) توسط Real time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر آستانه‌ای توسط نرم افزار داخلی دستگاه مطابق فرمول $2^{(\Delta CT\ Target\ -\ \Delta CT\ actin)}$ محاسبه شد. پردازش داده‌ها و رسم نمودار با استفاده از نرم افزار Exeel انجام‌شد.

آنالیز داده‌ها

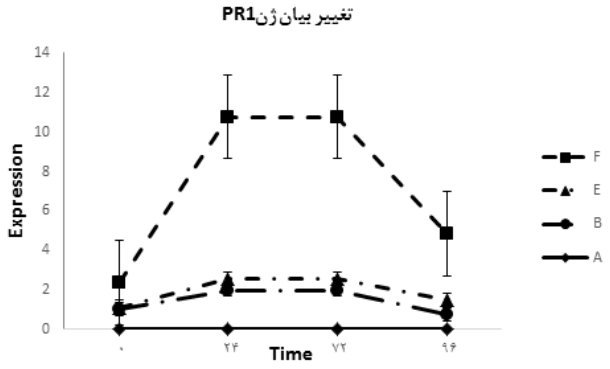
آنالیز تجزیه واریانس داده‌ها بـا اسـتفاده از نرم افزار SAS (SAS Institute, 2005) انجام پـذیرفت و میـانگین بـا اسـتفاده از روش دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند (p=۰/۰۵)

نتایج

تاثیر القاگر BABA بر بیان ژن PR1

میزان بیان ژن PR1 در نتیجه‌ی حضور القاگر و عدم حضور القاگر مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بیان این ژن در حضور

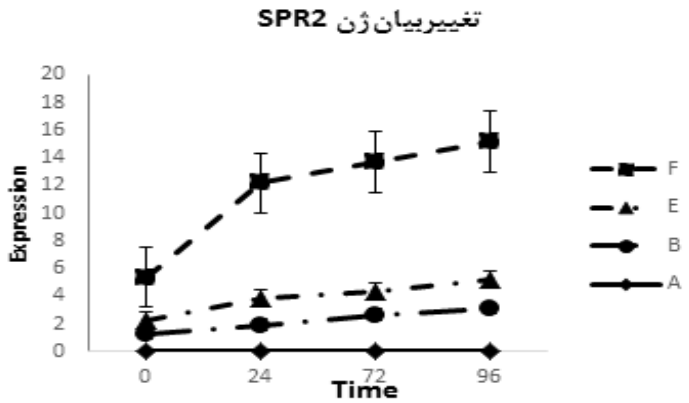
باکتری بدون دخالت القاگر نسبت به شاهد افزایش می‌یابد (نمودار ۱ منحنی B). همچنین PR1 هنگامی‌که گیاه با محلول ۲۵۰ میلی‌مولار BABA، محلول‌پاشی شد، افزایش بیان نشان داد (بدون هیچ‌گونه تلقیحی با باکتری) (منحنی E). افزایش بیان ژن هنگامی نسبت به گیاهان منحنی B و E معنی‌دار (براساس نرم افزار SAS) است که، گیاه را قبل از تلقیح باکتری، با محلول ۲۵۰ میلی‌مولار BABA پیش‌تیمار کنیم (نمودار ۱منحنی F). در حقیقت کاربرد القاگر و باکتری با هم باعث افزایش معنی‌دار در بیان این ژن می‌شود. این بدان معنی است که گیاه پیش‌تیمار شده، از طریق افزایش میزان رونوشت‌برداری واکنش سریع‌تری نسبت به تنش باکتریایی داشته است. میزان بیان ژن مذکور در هر سه منحنی B و E و F (نمودار ۱) تا ۲۴ ساعت حرکت صعودی دارد، تا ساعت ۴۸ ثابت می‌ماند و در ساعت ۷۲ کاهش ژن را مشاهده کردیم. احتمالا تیمار با BABA، تلقیح با باکتری و تاثیر هردو به‌طور هم‌زمان باعث ایجاد سازو کارهایی می‌شود که به موجب آن بیان ژن PR1 در ابتدا صعودی و پس از آن روند نزولی را طی کند. چنین کاهشی می‌تواند ناشی از عمل سایر ژن‌های دخیل در این مکانیسم باشد.



نمودار ۱: تاثیر BABA روی گیاه گوجه‌فرنگی در القا مقاومت SAR در نتیجه‌ی حضور و عدم حضور بیمارگر. ژن PR1 به‌عنوان مارکر انتخابی این مقاومت در نظر گرفته شده است. A : گیاه شاهد، B : اثر باکتری بدون هیچ پیش‌تیمار با BABA، E : پیش‌تیمار گیاه با BABA بدون اثر باکتری،F : پیش‌تیمار گیاه با BABA و پس از آن تلقیح با باکتری. بارها نمایانگر میانگین ± انحراف از استاندارد می‌باشد و بارها براساس میانگین بیان ۳ تکرار±استاندارد ترسیم شده‌اند.

تاثیر القاگر BABA بر بیان ژن SPR2

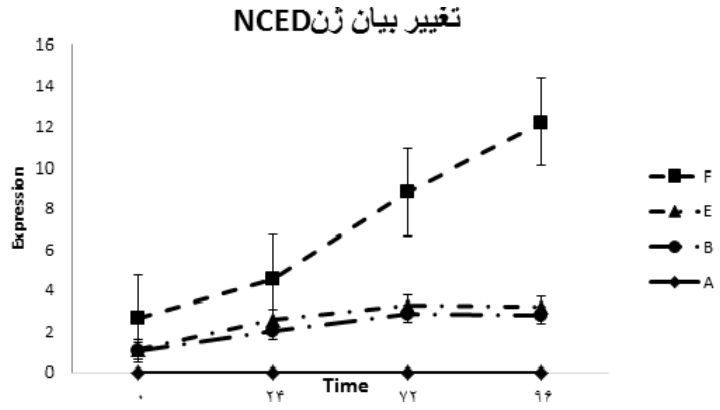
میزان نسبی mRNA ژن SPR2 با افزایش زمان، در تنش باکتری نسبت به گیاه شاهد افزایش می‌یابد (نمودار ۲منحنی B). این افزایش ژن در گیاه محلول‌پاشی شده با BABA (نمودار ۲ منحنی E) نیز محسوس بود. هنگامی‌که گیاه با BABA پیش‌تیمار شد و پس از آن توسط باکتری تلقیح شد، ژن SPR2 با افزایش زمان، میزان رونوشت‌برداری را به‌طور معنی‌داری افزایش داد و در آخرین زمان اندازه‌گیری یعنی در ساعت ۹۶ پس از تنش به بالاترین میزان خود رسید.



نمودار ۲: تاثیر BABA روی گیاه گوجه‌فرنگی در القا مقاومت ISR در نتیجه‌ی حضور و عدم حضور بیمارگر. ژن SPR2 به‌عنوان مارکر انتخابی این مقاومت در نظر گرفته شده است. A : گیاه شاهد، B: اثر باکتری بدون هیچ پیش‌تیمار با BABA، E : پیش‌تیمار گیاه با BABA بدون اثر باکتری ،F : پیش‌تیمار گیاه با BABA و پس از آن تلقیح با باکتری بارها نمایانگر میانگین ± انحراف از استاندارد می‌باشد و بارها براساس میانگین بیان ۳ تکرار±استاندارد ترسیم شده‌اند.

تاثیر القاگر BABA بر بیان ژن NCED

نتایج آنالیز بیان ژن NCED در نمودار ۳ به‌وضوح بیان می‌کند که تنش باکتری و محلول‌پاشی با BABA (منحنی‌های B و E در نمودار ۳) موجب افزایش بیان این‌ژن می‌شوند، اما قابل توجه نمی‌باشد. در این نمودار نیز، همانند دو ژن دیگر، افزایش بیان هنگامی روند صعودی قابل ملاحظه از خود نشان می‌دهد که گیاه توسط BABA پیش‌تیمار شود و پس از آن با باکتری تلقیح شود. به‌طوریکه در ساعت ۹۶ میزان رونوشت ژن به حداکثر رسید.



نمودار ۳: تاثیر BABA روی گیاه گوجه‌فرنگی در القا مقاومت ISR در نتیجه‌ی حضور و عدم حضور بیمارگر. ژن NCED به‌عنوان مارکر انتخابی این مقاومت در نظر گرفته شده است. A : گیاه شاهد، B: اثر باکتری بدون هیچ پیش‌تیمار BABA، E: پیش‌تیمار گیاه با BABA بدون اثر باکتری ،F : پیش‌تیمار گیاه با BABA و پس از آن تلقیح با باکتری بارها نمایانگر میانگین ± انحراف از استاندارد می‌باشد و بارها براساس میانگین بیان ۳ تکرار±استاندارد ترسیم شده‌اند.

بحث

رشد گیاه و بهره‌وری از آن به‌طورموثری تحت تاثیر شکل‌های مختلف عوامل تنش‌زای زیستی و غیر زیستی قرار می‌گیرید. امروزه حفاظت از گیاهان در برابر پاتوژن‌ها و عوامل تنش‌زا توسط سموم شیمیایی مضر صورت می‌گیرد. استفاده از مواد شیمیایی سمی مضر، برای محیط زیست و سلامت انسان خطرناک می‌باشد (۱۲). در کشاورزی پیشرفته سعی بر این است که عملکرد را در واحد سطح بالا برده و تا حد امکان ضایعات و خسارات ناشی از عوامل نامساعد را به حداقل برسانند. یکی از ره‌یافت‌های نوین در بهبود کمی و کیفی محصولات کشاورزی، استفاده از القاگر مقاومت در گیاهان می‌باشد. این مواد در غلظت‌های بسیار کم، تاثیرات شگرفی بر فرآیندهای مختلف گیاهی دارند (۱۳). محصولات مصنوعی از جمله بتا آمینو بوتیریک اسید (BABA)، می‌توانند باعث مقاومت طبیعی و بیان ژنتیکی ژن‌هایی که در مقاومت، فعال هستند، شوند. این ژن‌ها توسط تغییرات ژنوم (جهش، داخل شدن ژنتیکی مواد خارجی)، باعث افزایش ایمنی بیولوژیکی در گیاه می‌شوند. بیان ژن‌های دخیل در مقاومت SAR و ISR، از جمله مواردی است که تحت تاثیر این القاگر قرا می‌گیرند و باعث افزایش یا کاهش مقاومت می‌شوند (۱۳).

در این مقاله به بررسی مکانیسم مقاومت‌های القایی SARو ISR در برابر بیماری باکتریایی *Pseudomonas syringae pv. Syringa* با استفاده از پیش‌تیماربا ماده‌ی BABA پرداخته شده است. نتایج حاصل از بررسی بیان، به‌صورت نسبت بیان ژن‌ها در گیاهان تنش یافته به بیان ژن‌ها در گیاهان شاهد ارائه شد، درنتیجه مقدار بیان نمونه-های شاهد در نمودارها صفرمی‌باشد.

در این پژوهش، ژن PR1 به‌عنوان یک مارکر مقاومت SAR در نظر گرفته شد. یک مسئله بسیار مهم در ارزیابی اثر بخشی SAR، انتخاب صحیح مارکر اطلاعاتی مناسب برای بررسی صفات در گیاه مرتبط می‌شود، که به‌طور بالقوه افزایش یا به ارث برده می‌شود. به‌طور کلی مشخص شده است که SAR در ارتباط با فعال شدن سیستمیک ژن‌های مرتبط با PR های گیاهی است (۱۴). شواهد فراوانی وجود دارد که در میان ژن‌های مختلف PR، ژن PR1 بیشترین پاسخ را به القاگر در یک گیاه القا شده نشان می‌دهد (۱۵). در اصل برای دفاع، مسئله کلیدی این است که بیان ژن PR1 به‌عنوان یک اثر انگشت خوب از تاثیر BABA است و عمدتا پس از تلقیح شدن باکتری، فعال می‌شود (۱۵). همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است میزان بیان این ژن در نتیجه‌ی پیش‌تیمار با BABA (نمودار ۱ منحنی E)، حمله‌ی باکتری (نمودار ۱ منحنیB) و در منحنی F(نمودار۱) (پیش‌تیمار با BABA و پس از آن تلقیح با باکتری) افزایش می‌یابد. در منحنی E (نمودار ۱)، BABA حتی اگر هیچ‌گونه تهدیدی برای گیاه (مورد حمله‌ی باکتری قرار نگیرد) وجود نداشته باشد بر روی سیستم‌های مقاومت گیاهی تاثیرگذار است و باعث افزایش ژن PR1 و حساس‌سازی سیستم‌های دفاعی گیاه می‌شود (۱). همچنین طبق منحنی B بیان این ژن درنتیجه‌ی حمله‌ی باکتری نیز افزایش می‌یابد. افزایش این ژن تنها منحصر به باکتری *Pseudomonas syringae pv. Syringa* در گوجه‌فرنگی نمی‌باشد بلکه در گوجه‌فرنگی، این ژن سبب ایجاد مقاومت به قارچ Phytophtera گردیده است (۱۶). در منحنی F، پیش‌تیمار با BABA و پس از آن تلقیح با باکتری میزان رونوشت برداری را به‌طور معنی-داری افزایش داده است. به‌نظر می‌رسد که پیش‌تیمار با BABA، مستعد سازی (priming) را در گیاه ایجاد کرده است و باعث القای مقاومت در گیاه شده، و به نوعی ایمن سازی یا واکسیناسیون را در گیاه بوجود آورده است. اگرچه برای القای مقاومت اصطلاح ایمن‌سازی استفاده شده است اما در گیاهان این القا موجب افزایش ظرفیت دفاعی گیاه می‌شود (۵). در مطالعات مختلف مشخص شده که، BABA در گیاهان آلوده به Botrytis cinerea و Pseudomonas syringae از طریق پرایمینگ پاسخ‌های دفاعی وابسته به SA، مقاومت ایجاد می‌کند و باعث افزایش ژن PR1 می‌شوند (۱۷). نکته ی قابل توجه کاهش

این ژن پس از ۴۸ ساعت می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که دلیل این امر، رابطه‌ی آنتاگونیستی این ژن با جاسمونیک اسید است. جاسمونیک اسید یک رابطه متضاد وپیچیده با SA دارد (۱۶). متیل جاسمونیک از جمله هورمون‌هایی به‌حساب می‌آید که در زمان زخمی شدن گیاه، یا وقتی‌که مورد حمله‌ی حشرات قرار می‌گیرید، در گیاه فعال می‌شود و باعث مقاومت گیاه در برابر عوامل تنش‌زا می‌شود. این هورمون در ایجاد مقاومت القایی ISR نقش دارد (۱۷). SPR2 به‌عنوان مارکری از مسیر جاسمونیک اسید در نظر گرفته شده است. در نمودار ۲ افزایش بیان ژن SPR2 نشان داده شده است. در هر سه منحنی (E وB وF) در روز دوم گیاه یک حد آستانه‌ی را از جاسمونیک درک خواهد کرد. این حد آستانه از SPR2 باعث اثر گذاری منفی بر روی PR1 می‌شود (نمودار ۱ منحنی E وB وF). این تاثیر، در نهایت کاهش ژنPR1 را در روزهای سوم به بعد در نمودار ۱ را سبب می‌شود. در مطالعات پیشین ثابت شده است که، افزایش جاسمونیک اسید باعث کاهش SA و به‌دنبال آن کاهش بیان ژن PR1 پس از ۲ روز می‌شود (۱۸) و این با نتایج به‌دست آمده مطابقت داشت. در این پژوهش نشان داده شد که، PR1 رفتاری متفاوت از دو ژن دیگر (SPR2 & NCED) از خود نشان می‌دهد. تجزیه و آنالیز داده‌های نمودار ۲ حاکی از آن است که، باکتری نیز، میزان بیان ژن SPR2 را افزایش می‌دهد (منحنی B) و در نتیجه‌ی آن، مقدار جاسمونات درگیاه افزایش می‌یابد. افزایش جاسمونات درگیاه باعث کاهش حساسیت گیاه در برابر باکتری می‌شود (۱۷).

افزایش بیان ژن SPR2 در نمودار ۲ در منحنی F محسوس‌تر است. کاربرد BABA پیش از ایجاد تنش در گیاه، باعث فعال شدن مسیرهای سیگنالی وابسته به مقاومت القایی می‌شود (طبق منحنی E) (۱۹). این مسیرهای القایی باعث افزایش معنی‌دار ژن SPR2 در منحنی F پس از تلقیح باکتری می‌شوند. نتایج نمودار ۲ باتمام نتایج ذکر شده در مطالعات گذشته (۱۹ و ۲۰ و ۲۱) مطابقت داشت و استفاده از BABA بعنوان پیش‌تیمار گوجه‌فرنگی قبل از حمله‌ی باکتر ی باعث افزایش مقاومت در گیاه و افزایش ژن SPR2 به‌طور معنی‌داری شد.

نمودار ۳ بررسی بیان ژن NCED را نشان می‌دهد. این ژن از جمله ژن‌های درگیر در مسیر اسید آبسیریک می‌باشد. افزایش بیان این ژن نشان دهنده‌ی افزایش ABA در گیاه در نظر گرفته می‌شود. بررسی‌ها نشان داده است که افزایش اسید آبسیزیک عفونت را تحت تاثیر قرار می‌دهد و ممکن است مکانیسم ABA، بر روی سیگنال‌های مقاومت در برابر بیماری تاثیرگذار باشد (۱۸ و ۱۹). براساس این پژوهش و طبق نمودار ۳، حمله‌ی باکتری و پیش‌تیمار با BABA (بدون هیچ‌گونه تلقیح باکتری) باعث افزایش ژن NCED می‌شود (منحنی E و B). میزان بیان این ژن در دو منحنی تقریبا به یک میزان می‌باشد. این دو منحنی (منحنی E و B) اثر تیمارها (باکتری و تیمار با BABA (بدون هیچ‌گونه تلقیح باکتری) را بر مسیرهای مقاومت نشان می‌دهند. همان‌طور که مشاهده می‌شود اگر گیاه را با BABA پیش‌تیمار کنیم و پس از آن با باکتری تلقیح شود، افزایش بیان ژن NCED معنی‌دار خواهد بود (منحنیF). موتانت‌های دارای نقص در مسیر بیوسنتز ABA به‌وسیله‌ی کاربرد BABA حفاظت نمی‌شوند (۲۳ و ۲۲). که این نتایج با تحقیقات پیشین که نشان دادند ABA به‌عنوان تنظیم کننده‌ی مثبت در پاسخ‌های دفاعی عمل می‌کند (۲۴)، مطابقت دارد. افزایش بیان ژن NCED به‌عنوان مارکر دخیل در سیگنالینگ اسید آبسیزیک در مقایسه با دو ژن دیگر که در مسیرهای اسید سالسیلیک (PR1)و اسید جاسمونیک (SPR2) دخیل هستند، چندین برابر بیشتر بود. این موضوع تاثیر زیاد اسید آبسیزیک را در ایجاد مقاومت در گیاه را نشان می‌دهد. به‌نظر می‌رسد القا مقاومت در گوجه‌فرنگی توسط BABA از سرکوب تجمع اسید آبسیزیک به‌وسیله‌ی پاتوژن در گیاه جلوگیری کرده باعث افزایش اسید آبسیزیک در گیاه می‌شود (۱۸ و ۱۹).

مقاومت از طریق مسیرهای سیگنالی ABA در اثر تیمار با BABA باعث افزایش میزان کالوز در گیاه شده که نهایتا باعث افزایش مقاومت علیه بیمارگرها می‌شود (۲۴). همچنین القا BABA علیه تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری نیز از طریق مستعدسازی، سازوکارهای دفاعی وابسته به ABA عمل نموده و باعث افزایش تجمع ABA در گیاه شده، که به‌دنبال آن بسته شدن روزنه‌ها و افزایش تحمل گیاه در مقابل این استرس‌ها اتفاق می‌افتد. الگوی بیان ژن مسیرهای SA و ABA در ارتباط با سایر بیمارگرها نشان می‌دهد که هر دو مسیر همیشه در نتیجه تیمار BABA فعال می‌شوند (۲۵).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش بررسی بیان ژن‌های دخیل در سیگنالینگ اسید آبسیزیک، جاسمونیک اسید و سالسیلیک اسید نشان داد که، BABA باعث القای مقاومت طبیعی و بیان ژنتیکی ژن‌های فعال در ایجاد مقاومت می‌شود. کشف مسیر سیگنالینگ و شناخت ژن‌های دخیل در آن اجازه‌ی تولید محصولات مقاوم و متحمل به تنش را از طریق دست‌کاری یا کنترل ژن‌های موجود در این مسیرها مهیا می‌کند. استفاده از القای مقاومت باعث کاهش میزان مصرف سموم شیمیایی خطرناک می‌شود، بنابراین در دنیای امروز که بشر به‌دنبال راهکارهای جدید کنترل بیماری‌ها و تنش‌های غیر زیستی می‌باشد استفاده از این مواد، نوید بخش آینده‌ای روشن در کنترل بیماری‌ها محسوب می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه شیراز به خاطر فراهم‌سازی اعتبارات مالی و تامین امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی‌می‌شود.

منابع

1. Wilkinson SW, Pastor V, Paplauskas S, Pétriacq P, et al. Long-lasting β-aminobutyric acid-inducedresistance protects tomato fruit against Botrytis cinerea. Plant Pathology. 2018; 67(1): 30-4.
2. Heath MC. Nonhost Resistance in plant to Microbial Pathogense. In Ezekowitz RAB, Hoffmanna JA (eds) Infectious Disease: Innate Immunity, Humana Press, Totowa; 2002; NJ. pp 47-57.
3. Heil M. Bostock, RM. 2002. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogene in the Contex of Induced Plant Defences. Annals of Botany. 2002; 89: 503-512.
4. Ton J, Johan A, Van Pelt V, Loon C, et al. 2007 Differential Effectiveness of Salicylate-Dependent and Jasmonate/Ethylene-Dependent Induced Resistance in Arabidopsis., MPMI. 2007; 15(1): 27–34.
5. Edreva A, Velikova V, Tsonev T, Dagnon S, et al. Stress-protective Role of Secondary Metabolites:Diversity of Function and Mechanisms. Plant Physiology. 2004; 34 (1-2): 67-78.
6. Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, et al. Coordinate Gene Activity in Response to Agents that Induce Systemic Acquired Resistance. Plant Cell.1992. 3(10): 1085-1094.
7. Ivan B, Brigitte MM. When the story proceeds backward The discovery of endogenous β-aminobutyric acid as the missing link for a potential new plant hormone. Communicative & Integrative Biology. 2017; ISSU 2.
8. Van W, Pieterse S, Van C, Pelt J, et al. A novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. Plant Cell. 1999; 10: 1571-1580.
9. Kuc J. Concepts and Direction of Induced Systemic Resistance in Plant and its Application. Jurnal Plant Pathology. 2001. 107(1): 7-12.
10. Van Loon LC. Induced Resistance in Plants and the Role of Pathogenesis-Related Proteins. Journal Plant Pathol. 1997; 103: 753-765.
11. Gullino ML, Gilardi G, Sanna M, Garibaldi A. Epidemiology of Pseudomonas syringae pv. syringae on tomato. Phytoparasitica. 2009 Nov 1; 37 (5) :461.

12. Fan J, Yuan T, Comstock J, Ghan S, et al. 2009. Dominant role by vertical wind shear in Regulating Aerosol Effects on Deep Convective Clouds. Journal of Adolescence. 2004; 27: 113–122.
13. Ton J, Mauch-Mani B. β-amino-butyric Acid-Induced Resistance Against Necrotrophic Pathogens is Based on ABA-Dependent Priming for Callose. The Plant Journal. 2007; 38(1): 119-130.

14. Luna E, Bruce TJA, Roberts MR., Flors V, et al. Next-generation systemic acquired resistance. Plant Physiol. 2012; 158: 844–853.
15. Luna E, van Hulten M, Zhang Y, Berkowitz O, et al. Plant perception of β-aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNAsynthetase. Nat. Chem. Biol. 2014; 10: 450–456.
16. Uknesc S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter , et al. Acquired Resistance in Arabidopsis. Plant Cell. 1992; 4: 645-656.
17. Cohen Y, Niderman T, Mosinger E, Fluhr R. Beta-Aminobutyric Acid lnduces the Accumulation of Pathogenesis-Related Proteins in Tomato (Lycopersicon esculentum L) Plants and Resistance to late Blight lnfection Caused by phytophthora infestam. Plant Physiology. 2002; 104: 59-66.
18. Fan J, Yuan T, Comstock J, Ghan S, et al. 2009. Dominant role by vertical wind shear in Regulating Aerosol Effects on Deep Convective Clouds. Journal of Adolescence. 2004; 27: 113–122.
19. Flors V, Ton J, Mauch-Mani B. The Multifaceted Role of ABA in Disease Resistanced. Trends in Plant Science. 2008; 14(6): 310-317.
20. Fan J, Yuan T, Comstock J, Ghan S, et al. 2009. Dominant role by vertical wind shear in Regulating Aerosol Effects on Deep Convective Clouds. Journal of Adolescence. 2007; 27: 113–122.
21. Thaler J, Owen B, Higgins, V. The Role of the Jasmonate Response in Plant Susceptibility to Diverse Pathogens with a Range of Lifestyles. Department of Botany, University of Toronto. 2002; 104: 041566.
22. Agrios, GN. Plant Pathology , 5thEd, Elsevier Academic Press, San Diego, USA; 2005.
23. Turner J, Ellis C, Devoto A. The Jasmonat Signal Pathway.Socity of Plant Biologists. Society of Plant Biologists. 2002; 153-s164.
24. Ton J, Mauch-Mani B. β-amino-butyric Acid-Induced Resistance Against Necrotrophic Pathogens is Based on ABA-Dependent Priming for Callose. The Plant Journal. 2007; 38(1): 119 - 130.
25. Charegani H, Majzoob S, Hamzehzarghani H, Karegar-Bide A. Comparision of DL-B-Amino-n-Butyric Acid, Salicylic Acid And Abscisic Acide in Induction Of Resistance in Tomato Infected by Meloidogyne Incognita .Iranian Journal of Plant Patology. 2015; 5: 50.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2018; 9(3) *Original Article*

Beta-Aminobutyric Acid (BABA) Effect on Induced Resistance in Tomato-Infected Bacteria Pseudomonas *syringae pv. Syringa*

Pourabtahi H, M.Sc., Moghadam A, Ph.D., Heydarian Z, Ph.D.

- Departeman of Biotechnology, College of Agriculture, university of Shiraz, Shiraz, Iran

* Email corresponding author: hajar.pourabtahi@gmail.com

Received: 18 Jun. 2017 Accepted: 13 Jan. 2019

Abstract

Aim: In this study, the pattern of gene expression (PR1, NCED and SPR2) was considered as informative markers of systemic resistance, and positive beta-amino-butyric acid (BABA) effects was investigated on induction of resistance in *Lycopersicon esclentum* Mill.

Material and Methods: *L. esclentum* (Tomato) cv. Hungarian was selected in the four-leaved stage. For each pot, 70 ml of a 250 mM BABA solution was prepared and sprayed on plant leaves. The treated pots were kept under controlled conditions (16 h light at 30 ° C and 8 h darkness at 25 ° C) for 2 days, before the bacteria were induced. After two days, the bacteria were inoculated. The total RNA from leaves was extracted at 0, 24, 72, and 96 h after inoculation. The cDNA was synthesized and the gene expression pattern was determined by RT-PCR method.

Results: The level of expression of three defense-related genes (PR1, NCED and SPR2) increases as a result of bacterial contamination. However, pre-treatment with BABA resulted in a significant increase of resistance gene expression in response to the challenge of pathogen relative to the control plant and the apparent symptoms of the disease (As roundish and irregular spots up to brown and black with chlorosis) causing damage to tomatoes.

Conclusion: Pre-treatment of the plant with BABA has enhanced the plant's defense system, and has shown the extreme effect of BABA on plant resistance. As a result, this indictor can be used to control a *P. syringae* pv. *syring* in tomatoes

Key words: Beta-amino-butyric acid, *Pseudomonas syringae* pv. *syringe*, inductive resistance, PR1, NCED, SPR2