

## نقش سورفکتین در القا مقاومت گیاه توتون علیه آگروباکتریوم

فهیمة نظری<sup>۱</sup>، ناصر صفايي<sup>۲\*</sup>، بهرام محمد سلطانی<sup>۳</sup>، مسعود شمس بخش<sup>۲</sup> و محسن شریفی<sup>۴</sup>  
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس  
۳. دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس  
۴. دانشیار، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۰)

### چکیده

بیماری گال طوقه یکی از خسارت‌زاترین بیماری‌های باکتریایی است. کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی به لحاظ خطرهای ناشی از کاربرد آفت‌کش‌ها امروزه جایگاه ویژه‌ای دارد. این پژوهش برای درک دقیق‌تر سازوکار مولکولی سورفکتین روی آگروباکتریوم مولد گال طوقه به‌عنوان پیش‌نیاز امکان استفاده از عامل کنترل زیستی باسیلوس تولیدکننده سورفکتین علیه این بیماری انجام شد. بدین منظور از گیاه توتون، سویه آگروباکتریوم IBRC-M10701 و سورفکتین خالص تجاری (۲۵ میکرومولار) استفاده شد. به دلیل اهمیت اثر miRNAها در مسیر سیگنال‌دهی اکسین و ژن *lox* در مسیر القای مقاومت، سطح بیان *ntamiRNA167* و ژن *lox* در برهمکنش باکتریایی IBRC-M10701 و سورفکتین در روزهای اول، سوم و ششم بعد از تیمار با روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح بیان ژن *lox* پس از تیمار با آگروباکتریوم در زمان‌های فوق به ترتیب افزایش بیانی ۰/۴۷، ۲۲/۹ و ۶۱/۸ برابری، در تیمار با سورفکتین افزایش بیانی ۴/۶، ۳/۶ و ۱۱/۶ برابری و در تیمار تلفیقی سورفکتین-آگروباکتریوم افزایش بیانی ۴/۲، ۳۸/۸ و ۲۰/۳ برابری داشت. همچنین سطح بیان *nta-miR167* در تیمار آگروباکتریوم بیانگر روند افزایشی ۳/۴، ۲۱۴/۴ برابری (روز اول و سوم) سپس روند کاهش ۲/۵ برابری (روز ششم)، در تیمار با سورفکتین افزایش بیانی ۳/۱۲، ۱۳/۲ برابری (روز اول و سوم) و کاهش بیانی ۴/۵ برابری (روز ششم) و همچنین در تیمار تلفیقی سورفکتین-آگروباکتریوم بیانگر افزایش بیانی ۱/۶، ۲/۲ و ۹/۶ برابری نسبت به شاهد بود. به‌طور کلی مقایسه الگوی تغییرهای بیانی در ژن *lox* و *nta-miR167* بیانگر اثر مثبت بیوکنترلی سورفکتین علیه آگروباکتریوم به‌واسطه کاهش اثر تهاجمی آن بود. این مطلب بیانگر ارزشمندی این ترکیب و سویه‌های باکتریایی باسیلوس تولیدکننده سورفکتین به‌عنوان عوامل کنترل زیستی است.

واژه‌های کلیدی: ژن *lox*، سورفکتین، miRNA.

## Effect of Surfactin on inducing tobacco resistance against *Agrobacterium*

Fahimeh Nazari<sup>1</sup>, Naser Safaie<sup>2\*</sup>, Bahram Mohammad Soltani<sup>3</sup>, Masoud Shams-Bakhsh<sup>2</sup> and Mohsen Sharifi<sup>4</sup>

1, 2. Ph. D. Candidate and Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3. Associate Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4. Associate Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: Aug. 21, 2017 - Accepted: Nov. 1, 2018)

### ABSTRACT

Crown gall is one of the most destructive bacterial diseases of plants. Nowadays, special attention has been focused on the biological control of plant diseases as an alternative to chemical control. This study was conducted to better understanding the molecular mechanism of Surfactin on *Agrobacterium tumefaciens* as a prerequisite for the use of *Bacillus* as a biocontrol agent of this pathogen. In this study, Tobacco plants (*Nicotiana tabacum*), IBRC-M10701 strains of *A. tumefaciens*, and pure commercial Surfactin (25  $\mu$ m) were used. miRNAs and *lox* genes have an important effect in the auxin signalling pathway. Using Real-time PCR, the expression level of miR167 and *lox* gene measured 1, 3, and 6 days after inoculations in the interaction of *A. tumefaciens* IBRC-M10701 and Surfactin. The expression level of *lox* gene in *Agrobacterium* treatment showed 0.47, 22.9, and 61.8 increased. In Surfactin treatment it was 4.6, 3.6 and, 11.6 fold and in Surfactin-*Agrobacterium* treatment this amount was 4.2, 38.8, and 20.3 fold. In addition, the expression level of *nta-miRNA167* in *Agrobacterium* treatment indicated an increase of 3.4 and 214.4 fold (in the first and third day after inoculation), then decreased to 2.5 fold (in the sixth day), in treatment with Surfactin the amount of expression level was detected as 3.2, 13.2 and 4.5 fold and in Surfactin-*Agrobacterium* treatment this amount was 1.6, 2.2 and 9.6 fold compared with the control. All of the results indicated the positive effect of Surfactin in suppression the strain IBRC-M10701 of *Agrobacterium*. The results indicated the key role of Surfactin in biocontrol which reflected the possible use of *Bacillus* strains producing Surfactin in biological control.

**Keywords:** *lox*, miRNA, Surfactin.

\* Corresponding author E-mail: nsafaie@modares.ac.ir

### مقدمه

بیماری گال طوقه پراکنش جهانی دارد. این بیماری از دهه ۱۸۸۰ در ایالات متحده و اروپا شناخته شده بود (Smith & Townsend 1907). خسارت اقتصادی این بیماری به چند میلیون دلار در سال می‌رسد و تنها در سال ۱۹۷۶، ۲۳ میلیون دلار به گیاهان کالیفرنیا خسارت وارد آورد و به‌عنوان خسارت‌زاترین بیماری باکتریایی ایالات متحده در سال‌های ۷۷-۱۹۷۵ شناخته شد (Kennedy & Alcorn, 1980). در ایران، قدیمی‌ترین نمونه گال طوقه مربوط به سال ۱۳۳۷ از درختان آلوده مو در ارومیه و سپس سال ۱۳۴۳ در تاکستان‌های قزوین است (Amani, 1966). کاربرد بی‌رویه آفت‌کش‌های شیمیایی و ناکامی آن‌ها در کنترل این بیماری ضرورت کنترل یا پیشگیری از این بیماری را به روش کنترل بیولوژیک نشان می‌دهد. تاکنون هیچ پژوهشی در مورد اثر بیوکنترلی سورفکتین روی پاتوسیستم مهم گال طوقه که از جمله مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی است انجام نگرفته است.

اولین بار Arima *et al.* (1968) آنتی‌بیوتیک سورفکتین را از باکتری *Bacillus subtilis* جداسازی کردند که نام‌گذاری این ترکیب نیز به خاطر اثر سورفکتانتی استثنایی این ترکیب بوده است (Peypoux *et al.*, 1999). این ترکیب‌ها دارای اثر ضد باکتری، ضد ویروسی و ضد میکروبی هستند علاوه بر این نقش مهمی در تولید بیوفیلم، کلونیزه کردن و مصون‌سازی میزبان دارند. شکل‌های همپاری C14 و C15 سورفکتین ویژگی ضد ویروسی بیشتری نسبت به C13 نشان می‌دهند (Kracht *et al.*, 1999). این ترکیب‌ها یکپارچگی غشای پلاسمایی را به‌واسطه دارا بودن ویژگی آبدوستی خود تحت تأثیر قرار داده و منجر به ایجاد کانال یا منفذهایی در غشای سلولی می‌شوند که در نهایت منجر به نشت الکترولیت‌ها و از دست رفتن محتویات سلول و شروع مرگ سلول می‌شوند (Sheppard *et al.*, 1991). انفجار اکسیداتیو به‌واسطه وجود سورفکتین به‌عنوان نشان‌گری در حالت دفاعی القا شده به حساب می‌آید. در پژوهش‌های Henry *et al.* (2011) اثبات شده است که انفجار

اکسیداتیو می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر دفاعی عمل کند. سویه‌های متعددی از گونه‌های باسیلوس موجب پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شوند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که سورفکتین‌های لیپوپپتیدی و فنجایسین‌ها ممکن است در این فرآیند القایی نقش داشته باشند (Ongena *et al.*, 2007). افزون بر آن آزمایش‌های صورت گرفته روی گیاهان لوبیا و گوجه‌فرنگی نشان داد که بیان بیش‌ازحد ژن‌های بیوسنتزکننده سورفکتین و فنجایسین در باکتری *B. subtilis* 168 منجر به افزایش توانایی ساخت مشتقات سورفکتین و فنجایسین و سرانجام افزایش القای مقاومت بوده است (Ongena *et al.*, 2007).

امروزه جهت درک دقیق‌تر وقایع مولکولی منجر به مقاومت گیاهان نسبت به بیمارگرها، miRNAها مورد توجه قرار گرفته‌اند (Bartel, 2004). miRNAs مولکول‌هایی درون‌زاد و غیر کدکننده عملکردی هستند که توالی آن‌ها نزدیک به ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتید بوده و در سال‌های اخیر به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم بیان ژن‌های کدکننده پروتیین مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ریز RNAها از طریق خاموش کردن ژن‌های هدف در سطح رونویسی (TGS transcriptional gene silencing) و هم در سطح بعد از رونویسی ژن‌ها (PTGS posttranscriptional gene silencing) عمل می‌کنند و به‌این ترتیب بسیاری از فرآیندهای سلولی را با تداخل در ترجمه و یا تخریب mRNAها تنظیم می‌نمایند (Baulcombe, 2004; Ding, 1999). miR167 یکی از اولین miRNAهای گزارش شده از گیاهان است که مسیر پیام‌رسانی اکسین را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد (Khraiwesha, *et al.*, 2012). پژوهش‌های متعدد نشان می‌دهند که miR167 بر مسیر پیام‌دهی اکسین (Abel *et al.*, 2002; Hagen & Guilfoyle, 1996) و اسید آسزیک در زمان تنش‌های زنده و غیرزنده (شوری، حرارتی، سرما) تأثیر دارد (Liu, *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008). افزون بر این، پژوهش‌ها حاکی از نقش مهم و کلیدی miR167 در پاسخ به تنش خشکی هستند (Phookaew *et al.*, 2014). miR167ها از جمله miRNAهای کلیدی مسیر سیگنال‌دهی اکسین

مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سوسپانسیون‌های باکتری پس از شستشو با آب استریل (۵۰۰۰ rpm، ۱۰ دقیقه در دمای اتاق) با OD<sub>۶۰۰</sub> برابر ۰/۵ ( $10^8 \times \sim$ ) برای مایه‌زنی استفاده شدند.

#### کشت گیاهان، اعمال تیمار و نمونه‌برداری

برای کشت توتون (*Nicotiana tabacum*) ابتدا بذرها در خاک استریل کاشته و در شرایط گلخانه با دمای  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  رشد داده شدند. این پژوهش در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. چهار هفته پس از رشد گیاهچه‌های توتون، تیمار گیاهچه‌ها با ایجاد خراش روی رگبرگ اصلی برگ توتون و تیمار با ۲۰ میکرولیتر از سورفکتین (۲۵ میکرومولار) صورت گرفت. سه روز پس از تیمار، مایه‌زنی گیاهچه‌ها با استفاده از باکتری آگروباکتریوم (۲۰ میکرولیتر) انجام شد. تیمارها عبارت بودند از: شاهد (تیمار با آب)، تیمار با آگروباکتریوم، تیمار با سورفکتین و تیمار با سورفکتین-آگروباکتریوم. گیاهچه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط رطوبتی ۷۰-۷۵ درصد و در دمای  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس نگهداری شدند و سپس دما به  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس تغییر یافت. نمونه‌برداری قبل از انجام آلودگی با آگروباکتریوم فقط مایه‌زنی شده با سورفکتین (زمان صفر) و همچنین بعد از آلودگی با آگروباکتریوم در زمان‌های ۱، ۳ و ۶ روز پس از مایه‌زنی به‌عنوان زمان ابتدایی آلودگی برای بیماری انجام گرفت. پس از نمونه‌برداری برگ‌ها بلافاصله در ازت مایع منجمد شده و در فریزر -۸۰ تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

#### طراحی و آماده‌سازی پرایمرها

به‌کمک نرم‌افزارهای Primer3 و IDT Oligo Analyzer پرایمرهای موردنظر طراحی شد (جدول ۱).

(Sunkar et al., 2012) است. از طرفی ژن *lox* به‌عنوان نشان‌گر مسیر ISR به‌شمار می‌رود که در بروز و القا مقاومت نقش بسزایی دارد (Alami et al., 1999; Lin & Ishii, 2009; Adam et al., 2005). آشنایی با سازوکارهای مولکولی مؤثر در مسیر بیوسنتز اکسین که miRNAها و ژن‌ها در آن تأثیر بسزایی دارند، ما را در شناخت هر چه بیشتر سازوکارهای درگیر در این پاتوسیستم و درنهایت کنترل این بیماری یاری می‌رساند.

در این پژوهش، تغییرهای الگوهای بیانی nta-miR167 و ژن *lox* به‌منظور بررسی اثر بیوکنترلی سورفکتین در کنترل آگروباکتریوم پس از اعمال تیمارهای آگروباکتریوم، سورفکتین و سورفکتین-آگروباکتریوم روی گیاه توتون با استفاده از روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

**مواد شیمیایی، سویه باکتریایی و نمونه گیاهی مورد استفاده**  
تهیه سورفکتین تجاری  
در این پژوهش، سورفکتین تجاری ۹۸ درصد خلوص (Sigma) استفاده شد.

#### سویه باکتریایی

در پژوهش حاضر، سویه IBRC-M10701 *Agrobacterium tumefaciens* عامل بیماری باکتریایی گال طوقه، خریداری شده از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران برای آلودگی گیاهچه‌های توتون استفاده شد. برای تهیه زادمایه، سویه IBRC-M10701 در ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB مایه‌زنی شد و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس روی شیکر rpm ۱۸۰ به

جدول ۱. ویژگی‌ها آغازگرهای استفاده‌شده در این پژوهش

Table 1. Primer sequences used in this research

Primer name	Primer Sequence
nta-miR167-F	5'-TGAAGCTGCCAGCATGATCT-3'
U6-F	5'-GGGACATCCGATAAAAATT-3'
<i>lox</i> gene	F: 5'-TCACAGGGAAAGATGATGGAAA-3'
	R: 5'-CCGACCAAGGAACTCAAGAA-3'
<i>EF1a</i>	F: 5'-TGAGATGCACCACGAAGCTC-3'
	R: 5'-CCAACATTGTCACCAGGAAGTG-3'

و تأیید توسط Colony PCR با آغازگر برگشت موجود در بدنه وکتور مورد استفاده تعیین توالی شد. نتیجه تعیین توالی با توجه به جهت الحاق قطعه مورد نظر در شکل ۱ نشان داده شده است.

#### بررسی الگوی بیانی (*nta-miR167*) و ژن *lox*

بیان *nta-miR167* در نمونه‌های شاهد و آلوده به عامل بیماری

به کمک واکنش PCR در زمان واقعی (qRT-PCR) بیان *nta-miR167* در نمونه‌های مختلف شاهد و آلوده به عامل بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان دادند که سطح بیانی *nta-miR167* یکی از *miRNA*های مهم مسیر سیگنال‌دهی اکسین پس از تیمار با آگروباکتریوم در روزهای اول، سوم و ششم بعد از تیمار گیاه توتون، بیانگر افزایش ۳/۴، ۲۱۴/۴ و ۲/۵ برابری نسبت به شاهد که بیانگر روند افزایشی بیان *nta-miR167* تا روز سوم و کاهش شدید بیان تا روز ششم بود ( $p \leq 0.05$ ). بررسی سطح بیانی *miRNA* فوق در تیمار با سورفکتین (۲۵ میکرومولار) افزایش ۳/۲، ۱۳/۲ و ۴/۵ برابری را نشان داد که این میزان افزایش سطح بیان در تیمار تلفیقی سورفکتین - آگروباکتریوم بیانگر افزایش ۱/۶، ۲/۲ و ۹/۶ برابری نسبت به شاهد بود (شکل ۲). بررسی روند بیانی تغییرهای بیانگر الگوی متفاوت بیانی تیمار منفرد سورفکتین که یک روند افزایشی تا روز سوم و کاهشی در روز ششم را نشان می‌داد در حالی که تیمار تلفیقی بیانگر روند افزایشی تا روز ششم بود (شکل ۲).

بیان ژن *lox* در نمونه‌های شاهد و آلوده به عامل بیماری

به کمک واکنش PCR در زمان واقعی (qRT-PCR) بیان ژن *lox* در نمونه‌های مختلف شاهد و آلوده به عامل بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح بیان ژن *lox* پس از تیمار با آگروباکتریوم نسبت به شاهد در روزهای اول، سوم و ششم بعد از تیمار به ترتیب افزایش بیانی ۰/۴۷، ۲۲/۹ و ۶۱/۸ برابری را نشان داد که بیانگر یک روند افزایشی در الگوی بیانی ژن *lox* بود ( $p \leq 0.05$ ). بررسی سطح بیانی ژن *lox* در تیمار با

#### استخراج *RNA*، سنتز *cdNA* و انجام واکنش *Real-Time PCR*

*RNA*های نمونه‌های مختلف شاهد و آلوده به عامل بیماری به کمک ترايزول (شرکت Invitrogen) و طبق دستورکار شرکت استخراج شد. پس از بررسی کمی و کیفی آن، با آنزیم Dnase I (شرکت فرمنتاز) تیمار و به کمک آغازگر الیگو dT و رندوم هگزامر و آنزیم نسخه‌برداری معکوس از روی آن *cdNA* سنتز شد. به کمک آنزیم پلی A پلیمرز و در حضور ATP (فرمنتاز) به انتهای ۳' مجموعه *miRNA*ها یک توالی پلی A افزوده شد، این مرحله برای مجموعه *mRNA*ها انجام نشد. سپس به کمک آغازگر الگو dT دنباله‌دار و در حضور آنزیم نسخه‌بردار معکوس (فرمنتاز) واکنش سنتز *cdNA* انجام شد. برای سنجش کیفیت *cdNA* سنتز شده، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *snoRNA-U6* برای *cdNA* مخصوص *miRNA*ها و ژن *EF1 $\alpha$*  برای *cdNA* مخصوص *mRNA*ها انجام شد. به کمک آغازگرهای طراحی شده و در حضور شناساگر Eva-green واکنش qRT-PCR انجام شد. برنامه دستگاه برای انجام ۴۰ چرخه به ترتیب زیر انجام شد: ۹۵ درجه سلسیوس ۱۵ ثانیه، ۵۳ درجه سلسیوس ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه. داده‌های واکنش qRT-PCR به کمک روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و به کمک نرم‌افزار GraphPad تجزیه آماری شدند.

تأیید نهایی قطعه‌های تکثیرشده در واکنش PCR جهت تأیید نهایی توالی تکثیرشده در واکنش PCR، قطعات محصولات *Real-Time PCR* در حامل (وکتور) pTG19-T کلون و به منظور اثبات عدم وجود جهش نوکلئوتیدی به واسطه شرکت پیشگام به کمپانی Macro Gen کره جنوبی ارسال شدند. نرم‌افزار Sequence Scanner برای تجزیه و تحلیل داده‌های خام تعیین توالی استفاده شد.

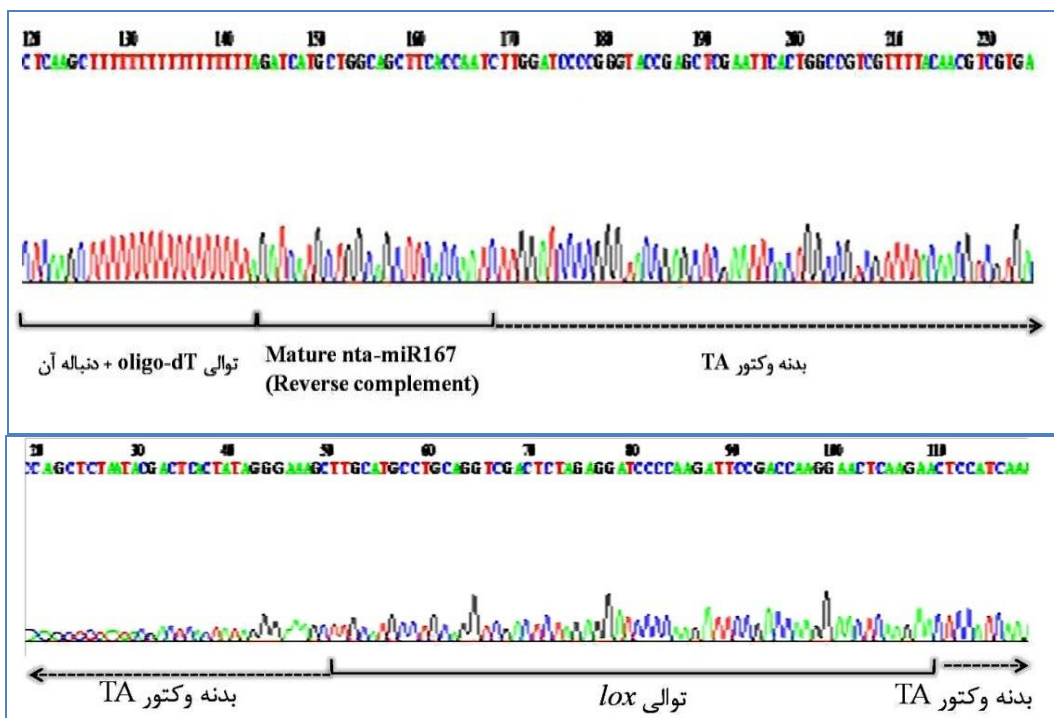
#### نتایج

##### نتایج تعیین توالی

قطعه‌های تکثیرشده حاصل از هر کدام از واکنش‌های مربوط به *miRNA*ها و *mRNA*ها، پس از کلون شدن

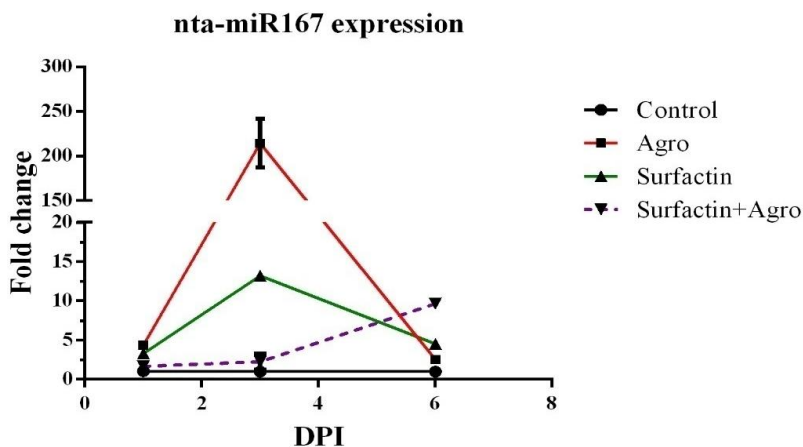
الگوی متفاوت بیانی نسبت به تیمار منفرد سورفکتین (روند افزایشی) در بیان ژن *lox* بود. درحالی که تیمار تلفیقی بیانگر روند افزایشی تا روز سوم و کاهش تا روز ششم بود (شکل ۳).

سورفکتین تجاری (۲۵ میکرومولار) بیانگر افزایش بیانی ۴/۶، ۳/۶ و ۱۱/۶ برابری در روزهای فوق بود. این افزایش بیانی در تیمار تلفیقی سورفکتین- آگروباکتریوم برابر ۴/۲، ۳۸/۸ و ۲۰/۳ بود که بیانگر



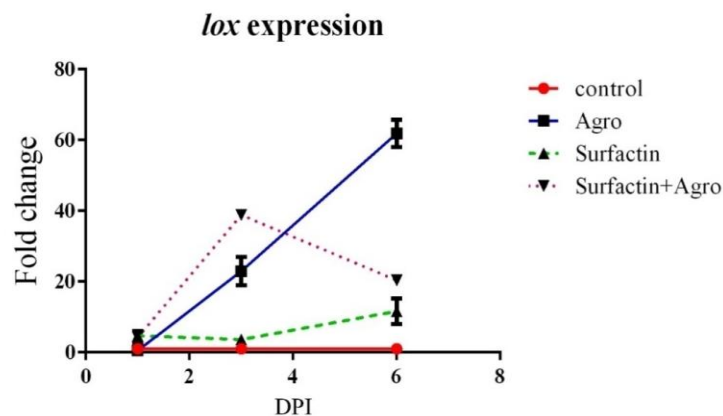
شکل ۱. نتیجه‌های تکثیر، کلونینگ و تعیین توالی محصولات PCR Real-Time. پس از انجام Real-Time PCR، برای اطمینان از صحت تکثیر و اختصاصی محصول، هرکدام از محصولات در TA-vektor کلون و با استفاده از آغازگر برگشت روی بدنه وکتور تعیین توالی شد. نتیجه‌ها مؤید درستی تکثیر ژن *lox* و *nta-miR167* توسط دستگاه Real-Time PCR بود.

Figure 1. Results of amplified, cloning and sequencing of Real-Time PCR Products. The reality and specificity of the amplified products were tested by cloning them in TA-vector and sequencing by the reverse primer of the vector. Results verified the reality of the Real-Time PCR products of *nta-miRNA167* and *lox* gene.



شکل ۲. مقایسه الگوی تغییرهای بیانی *nta-miR167* در طول تیمارهای آگروباکتریوم، سورفکتین و سورفکتین- آگروباکتریوم و شاهد (آب)

Figure 2. Comparing the expression patterns of *nta-miRNA* after treatments of *Agrobacterium*, Surfactin, Surfactin-*Agrobacterium* and control (water)



شکل ۳. مقایسه الگوی تغییرهای بیانی ژن *lox* در طول تیمارهای آگروباکتریوم، سورفکتین و سورفکتین-آگروباکتریوم. شاهد (آب)  
Figure 3. Comparing the expression patterns of *lox* gene after treatments of *Agrobacterium*, Surfactin, Surfactin-*Agrobacterium* and control (water)

نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. برای تأمین هورمون اکسین مورد نیاز گیاه در شرایط بدون تنش، سطح بیان *miR167*، *miR160* و همچنین *miR393* در حداقل است، ولی در هنگام تنش، با افزایش سطح بیان *miR393* باعث کاهش سطح بیان گیرنده‌های TIR1 و اعضای خانواده AFBs و افزایش سطح بیان *miR167* و *miR160* نیز باعث کاهش سطح بیان اعضای خانواده ARFs به وسیله برش و خرد کردن رونوشت‌های آن می‌شوند و از این طریق باعث تضعیف رشد و نمو و القای مقاومت در گیاه می‌شود (Sunkar *et al.*, 2012).

سطح بیان ژن *lox* پس از تیمار با آگروباکتریوم نسبت به شاهد در روزهای اول، سوم و ششم بعد از تیمار بیانگر یک روند افزایشی بود. سطح بیانی این ژن در تیمار انفرادی سورفکتین نیز نشان‌دهنده یک روند افزایشی بیانی بود (Ongena *et al.*, 2007). در تیمار تلفیقی سورفکتین-آگروباکتریوم بر اساس نتایج الگوی بیانی میزان بیان ژن *lox* نسبت به تیمار آگروباکتریوم کاهش بیانی را در زمان‌های مورد بررسی نشان داد. این امر می‌تواند احتمالاً به واسطه تأثیر مثبت کنترلی سورفکتین روی آگروباکتریوم و در نتیجه کاهش میزان اثر تهاجمی آگروباکتریوم تلقی شود، که نتیجه آن کاهش بیانی این ژن بوده است. از آنجایی که سامانه القای مقاومت در گیاه، جزو سامانه‌های دفاعی گیاه علیه میکروارگانیسم‌های مهاجم محسوب می‌شود که خود برای گیاه هزینه دارد. به واسطه تأثیر مثبت کنترلی سورفکتین روی آگروباکتریوم کاهش بیانی این

### بحث

تفاوت در سطح بیان *nta-miR167* در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد مشاهده می‌شود، و این نشان می‌دهد که گیاه با حمله بیمارگر، *nta-miR167* را درگیر به پاسخ نموده است. به طوری که این *miRNA* در تیمار انفرادی گیاه توتون با آگروباکتریوم روند افزایشی تا روز سوم و کاهش شدید بیان تا روز ششم را در الگوی بیانی خود نشان داد (Dunoyer *et al.*, 2006). در حالی که الگوی بیانی در تیمار انفرادی گیاه توتون با سورفکتین (۲۵ میکرومولار) یک روند افزایشی تا روز سوم و کاهشی در روز ششم را نشان داد. در تیمار تلفیقی سورفکتین-آگروباکتریوم نیز بر اساس نتیجه‌های تغییرهای الگوی بیانی *miR167* نسبت به تیمار آگروباکتریوم کاهش بیانی را در زمان‌های مورد بررسی نشان داد که این امر می‌تواند بیانگر تأثیر مثبت کنترلی سورفکتین علیه آگروباکتریوم از طریق کاهش در میزان اثر تهاجمی آگروباکتریوم بود. این روند بیانی با پژوهش‌های Dunoyer *et al.* (2006) هم‌خوانی دارد. ایشان نشان دادند که تجمع *miR167* در نمونه‌های توده‌ای تیمار شده با آگروباکتریوم کاهش شدید بیانی را نشان می‌دهد. فاکتورهای رونویسی ARFs (Auxin Response Factor) ژن‌های هدف شناخته شده *miR167* هستند (Yang *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2003; Kasschau *et al.*, 2005). پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد که *miR167* به همراه *miR393* و *miR160* در تنظیم دقیق درک و احساس اکسین و پیام‌رسانی آن

به تنش‌ها شناخته شده بود، ولی تاکنون پژوهشی در رابطه با تغییرهای بیانی آن‌ها در ارتباط با ترکیب سورفکتین انجام نشده بود. از این‌رو برای اولین بار اقدام به سنجش سطح بیان آن‌ها تحت تیمار سورفکتین نمودیم. به‌طور کلی مقایسه الگوی تغییرهای بیانی در ژن *lox* و *nta-miR167* بیانگر اثر مثبت بیوکنترلی سورفکتین (۲۵ میکرومولار) علیه آگروباکتریوم بود. این مطلب بیانگر اهمیت این ترکیب در امر بیوکنترل است. از این‌رو پژوهش بر روی بررسی اثر بیوکنترلی سویه‌های باسیلوس تولیدکننده سورفکتین که برتری زیست‌کنترلی بیشتری نسبت به سورفکتین تجاری خالص‌سازی شده دارند، ادامه دارد.

ژن بیانگر کاهش در میزان اثر تهاجمی آگروباکتریوم تلقی می‌شود که منجر به کاهش بیانی این ژن شده است، از این‌رو کاهش در بیان این ژن تحت تیمار با سورفکتین مثبت تلقی می‌شود.

#### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش سطح بیان *nta-miR167* و ژن *lox* در برهمکنش باکتریایی *Agrobacterium tumefaciens* و سورفکتین با روش qRT-PCR مورد سنجش قرار گرفت. این miRNA قبلاً در پاتوسیستم‌های باکتریایی (Dunoyer et al., 2006; Pruss et al., 2008; Nazari et al., 2017) به‌عنوان miRNAهای درگیر و پاسخگو

#### REFERENCES

1. Abel, S. & Theologis, A. (1996). Early genes and auxin action. *Plant Physiology*, 111, 9-17.
2. Adam, A., Jourdan, E., Ongena, M., Duby, F., Dommès, J. & Thonart, P. (2005). Resistance induced in cucumber and tomato by a non-pathogenic *Pseudomonas putida* strain. *Parasitica*, 61, 13-22.
3. Alami, I., Jouy, N. & Clerivet, A. (1999). The lipoxygenase pathway is involved in elicitor-induced phytoalexin accumulation in plane tree (*Platanus acerifolia*) cell-suspension cultures. *Journal of Phytopathology*, 147, 515-519.
4. Allen, O. N. & Holding, A. J. (1974). Genus II. *Agrobacterium* Conn 1942, 359. In R.E. Buchanan & N. E. Gibbons (Eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins Co. 8<sup>th</sup> ed., pp. 264-267.
5. Amani, B. (1966). Stem and root gall of grapevine. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 3, 12-18.
6. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-297.
7. Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431, 356-363.
8. Ding, S. T., McNeel, R. L. & Mersmann, H. J. (1999). Expression of porcine adipocyte transcripts: Tissue distribution and differentiation in vitro and in vivo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 123, 307-318.
9. Dunoyer, P., Himber, C. & Voinnet, O. (2006). Induction, Suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nature genetics*, 38, 258-263.
10. Hagen, G. & Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular and Biology*, 49, 373-385.
11. Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P. & Ongena, M. (2011). The bacterial lipopeptidesurfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cell Microbiology*, 13(11), 1824-1837.
12. Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E. et al. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Developmental Cell*, 4, 205-217.
13. Kennedy, B. W. & Alcorn, S. M. (1980). Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease*, 64, 674-676.
14. Khraiwesha, B., Zhua, J. K. & Zhuc, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2), 137-148.
15. Kracht, M., Rokos, H., Ozel, M., Kowall, M., Pauli, G. & Vater, J. (1999). Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *The Journal of Antibiotics*, 52(7), 613-619.
16. Lin, T. C. & Ishii, H. (2009). Accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in xylem fluids of cucumber stems during ASM-induced systemic acquired resistance (SAR) involves increased LOX activity and transient accumulation of shikimic acid. *European Journal of Plant Pathology*, 125, 119-130.
17. Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A. & Zheng, C. C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated micro RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14, 836-843.
18. Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. & Jones, J. D. G. (2006). A Plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312, 436.

19. Nazari, F., Safaie, N., Soltani, BM., Shams-Bakhsh, M. & Sharifi, M. (2017). *Bacillus subtilis* affects miRNAs and flavanoids production in Agrobacterium-Tobacco interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 98-106.
20. Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B. *et al.* (2007). Surfactin and fengycinlipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9, 1084-1090.
21. Peypoux, Á. F., Bonmatin, Á. J. M. & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 553-563.
22. Phookaew, P., Netrphan, S., Sojikul, P. & Narangajavana, J. (2014). Involvement of miR164- and miR167-mediated target gene expressions in responses to water deficit in cassava. *Biologia Plantarum*, 58(3), 469-478.
23. Pruss, G. J., Nester, E. W. & Vance, V. (2008). Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* Induces host defense and development-dependent responses in the infiltrated zone. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), 1528-1538.
24. Sheppard, J., Jumarie, C., Coopre, D. & Laprade, R. (1991). Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membrane. *Biochimica etBiophysicaActa*, 1064, 13-23.
25. Smith, E. F. & Townsend, C. O. (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 25, 671-673.
26. Sunkar, R., Li, Y. F. & Jagadeeswaran, G. (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 17(4), 196-203.
27. Yang, J. H., Han, S. J., Yoon, E. K. & Lee, W. S. (2006). Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells. *Nucluc Acids and Research*, 34(6), 1892-1899.