ارزیابی تعامل بین *Glomus intraradices* و باکتری‌های آنتاگونیست *Pseudomonas* و *Bacillus* و تأثیر آنها در القای سیستمیک ژن‌های دفاعی در برگ‌های برنج بر علیه *Magnaporthe oryzae*[*]

INTERACTIONS BETWEEN *Glomus intraradices* and ANTAGONISTIC BACTERIA (*Pseudomonas* and *Bacillus*) and THEIR EFFECTS ON THE SYSTEMIC INDUCTION OF DEFENCE-RELATED GENES IN RICE LEAVES AGAINST *Magnaporthe oryzae*

سمیرا پیغامی آشنایی، کیوان بهبودی[**] و مسعود احمدزاده[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۸)

چکیده

کلونیزاسیون ریشه گیاهان به وسیله قارچ‌های میکوریز، منجر به تغییرات کمی و کیفی در جمعیت میکروبی مستقر در منطقه ریزوسفر می‌گردد. مکانیزم‌های کنترل‌کننده ارتباطات موجود بین قارچ‌های میکوریز و باکتری‌ها در ریشه گیاهان میزبان می‌تواند از نوع سینرژیستی، رقابتی و یا آنتاگونیستی باشند. در این بررسی، مطالعات بیولوژیکی و مولکولی بیان کننده یک ارتباط رقابتی و آنتاگونیستی بین قارچ میکوریز *G. intraradices* و دو باکتری *P. fluorescens* و *B. subtilis* بود. به دنبال تلقیح عوامل میکروبی مفید، سیستم ایمنی گیاه در حالت آماده باش قرار گرفته و با حمله بیمارگر، مسیرهای مقاومتی در گیاه برنج به صورت سیستمیک و به طور مؤثرتری فعال گردید. شدت بیماری در تیمارهای حاوی *B. subtilis* و *P. fluorescens+B. subtilis* کمتر از ۱/۵ بود و منجر به القای یک مقاومت قابل توجه بر علیه *M. oryzae* گردید. به طور کلی، دو مسیر مقاومتی ISR ناشی از ریزوباکترها و MIR ناشی از قارچ‌های میکوریز، به موازات یکدیگر و وابسته به JA بوده و بر علیه عوامل بیماریزای نکروتروف فعال می‌گردند. با توجه به این نکته که این اولین مطالعه روی تعاملات بین قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های آنتاگونیست در گیاه برنج می‌باشد، به نظر می‌رسد که برنج به عنوان یک گیاه تک لپه، میزبانی مناسب برای بررسی مکانیزم‌ها و ارتباطات موجود در این زمینه است.

واژه‌های کلیدی: *G. intraradices*، *B. subtilis*، *P. fluorescens*، القای سیستمیک، *Magnaporthe oryzae*

---

[*]: بخشی از پایان‌نامه دکتری نویسنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

[**]: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی saharpeighamy@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

مقدمه

گونه‌های قارچ های میکوریز در میان گیاهان میزبان اختصاصی نبوده و بیش از ۸۰٪ گیاهان خشکی را کلونیزه می‌نمایند (Paszkowski *et al*. 2002). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که قارچ های میکوریز منجر به افزایش دسترسی گیاه به منابع غذایی به ویژه فسفر غیر آلی (Yang *et al*. 2012)، افزایش مکانیزم‌های دفاعی گیاه (Pozo & Azcon-Aguilar 2007) و تغییر در ساختمان ریشه گیاه میزبان (Gutjahr *et al*. 2009) می گردند. در مقابل، میکوریزها به عنوان قارچ های بیوتروف اجباری شناخته شده‌اند و تنها منبع کسب کربن برای آنها گیاهان می‌باشند (Bonfante & Genre 2010).

بسیاری از عوامل باکتریایی مفید همچون *Bacillus* و *Pseudomonas*، تحت عنوان ریزوباکترهای افزایش‌دهنده رشد گیاه (PGPR)، دارای توانایی افزایش رشد گیاهان و ممانعت از فعالیت عوامل بیمارگر را دارند (Kloepper 1997).

کلونیزاسیون ریشه گیاهان بوسیله میکوریزها، منجر به تغییرات کمی و کیفی در جمعیت میکروبی مستقر در منطقه ریزوسفر (Finlay 2008) و هم‌چنین تغییر در نوع ارتباط گیاه با میکروارگانیسم‌های خاک می‌گردد (Sharma *et al*. 2010). به طور کلی، تأثیر قارچ‌های میکوریز روی باکتری‌های هوازی ریزوسفر شامل، یک اثر افزایشی یا سینرژیستی (Krishnaraj & Sreenvisa 1992)، بدون تأثیر (Waschkies *et al*. 1994) و یک اثر کاهشی یا آنتاگونیستی می‌باشد (Amees *et al*. 1984). هم‌چنین مطالعات نشان داده اند که باکتری‌ها نیز می‌توانند یک تأثیر فعال در کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ‌های میکوریز داشته باشند (Frey-Klett *et al*. 2007). مقاومت‌های القایی نه تنها به صورت موضعی بلکه به صورت سیستمیک نیز منجر به حفاظت گیاهان در برابر بیمارگرها می گردند (Spoel *et al*. 2003). سه هورمون گیاهی مهم و مولد سیگنال‌های مولکولی در مسیرهای مقاومت القایی، سالیسیلیک اسید (SA)، جاسمونیک اسید (JA) و اتیلن (ET) بوده (Kunkel & Brooks 2002)، که دارای یک نقش کلیدی در بیان ژن های دفاعی مرتبط می باشند (Xie *et al*. 2011). مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR: Systemic Acquired Resistance) یکی از مهم ترین پاسخ‌های دفاعی در گیاهان محسوب شده، که پس از حمله بیمارگر به گیاه میزبان فعال می‌گردد و بر علیه طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی مؤثر است (Ryals *et al*. 1996). بیان ژن‌های دفاعی در این مسیر وابسته به افزایش هورمون سالیسیلیک اسید (SA) می باشد (Malamy *et al*. 1990). از سویی دیگر، فرآیند همزیستی منجر به تغییراتی در سطوح بیان هورمون‌های مختلف گیاهی می‌گردد (Bonfante & Genre 2010). اگرچه، هورمون جاسمونیک اسید مسئول بیان ژن‌های دفاعی وابسته به مسیر مقاومتی القای شده توسط قارچ‌های میکوریز (MIR: Mycorrhiza Induced Resistance) می‌باشد، اما هورمون اتیلن یک تنظیم کننده منفی برای این پاسخ‌های دفاعی وابسته به JA محسوب می‌شود، در حالی‌که در مسیر مقاومت القای شده توسط باکتری های مفید (ISR: Induced Systemic Resistance) دو هورمون جاسمونیک اسید (JA) و اتیلن (ET) به صورت سینرژیستی منجر به بیان ژن‌های دفاعی می‌گردند (Zhao & Qi 2008). به عبارتی دیگر به دنبال کلونیزاسیون قارچ‌های میکوریز و استقرار باکتری‌های مفید سیستم ایمنی گیاه به صورت موضعی و سیستمیک در حالت آماده باش قرار گرفته و نهایتاً با حمله بیمارگر، سیستم دفاعی گیاه به طور مؤثرتری فعال می‌گردد(Pozo *et al*. 2009).

تأثیر این مسیرهای مقاومتی در کنترل بیماری با توجه به طبیعت بیمارگر متفاوت است. عمدتاً دفاع بر علیه عوامل بیماری‌زای بیوتروف از طریق مسیر وابسته به SA صورت گرفته(McDowell *et al*. 2005; Flors *et al*. 2008)، در حالی‌که مسیر وابسته به JA/ET نقش مهمی در کنترل عوامل بیماری‌زای نکروتروف ایفا می‌نماید (Delaney *et al*., 1994; Glazebrook, 2001). بیماری بلاست با عامل *Magnaporthe oryzae* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های هوازاد در روی محصول برنج محسوب می‌گردد (Talbot & Foster 2001). عامل بیماری یک قارچ همی بیوتروف بوده، که مراحل اولیه، رشد و تکثیر آن در سلول‌های زنده صورت گرفته (فاز بیوتروف) و سپس منجر به مرگ سلول‌های گیاه میزبان (فاز نکروتروف) می‌شود.

هدف از این مطالعه، ارزیابی ارتباطات بیولوژیکی و مولکولی موجود بین قارچ میکوریز *Glomus intraradices* و دو باکتری *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* در گیاه برنج می‌باشد. هم‌چنین، در ارتباط با مسیرهای مقاومتی القا شده در گیاه برنج اهداف مورد بررسی شامل، ۱) القای مقاومت سیستمیک در میزبان توسط عوامل بیولوژیکی بر علیه *Magnaporthe oryzae*. ۲) ارتباط بین هورمون های گیاهی و سیگنال‌های دفاعی ناشی از آنها در گیاه برنج، با مقایسه دو مسیر مهم مقاومتی وابسته به سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید/اتیلن با استفاده از نشانگرهای ژنی، هستند.

روش بررسی

شرایط رشد گیاه و طراحی آزمایش

بذور *Oryza sativa* cv. Nipponbare در محلول هیپوکلرید سدیم ۲٪ به صورت سطحی ضد عفونی شده و به مدت ۵-۶ روز در محیط آب آگار جهت جوانه‌زنی کشت شدند. سپس بذور جوانه زده در مخلوطی از خاک لومی (حاوی $52/9\ mg\ l^{-1}$ پتاسیم، $9/2\ mg\ l^{-1}$ فسفر و $4/7\ mg\ l^{-1}$ نیتروژن با pH=7/4) و شن (در حجم مساوی) استریل کشت شدند. شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، چرخه دمایی ۲۳/۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد برای رشد گیاهان در اتاق کشت فراهم گردید و آبیاری با محلول هوگلند (Hogland) (حاوی KH_2PO_4 به میزان ۵ میلی لیتر در ۱ لیتر محلول) هر دو روز یکبار صورت گرفت. جهت انجام آزمایش ۱۰ تکرار (هر گلدان حاوی یک گیاه برنج) برای هر یک از ۷ تیمار شامل: شاهد (بدون تلقیح)، *G. intraradices*، *P. fluorescens*، *B. subtilis*، *G. intraradices+P. fluorescens*، *G. intraradices+B. subtilis* و *P. fluorescens+B. subtilis*، در نظر گرفته شد.

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست

نمونه‌های ریشه برنج (*O. sativa* cv. Deylamani) از مزارع استان مازندران، تنکابن جمع‌آوری شدند. رقیق‌سازی و جداسازی باکتری‌ها به روش (Waksman 1992) انجام شد.

فعالیت ضد قارچی باکتری های جدا شده بر علیه *M. oryzae* در شرایط آزمایشگاه

فعالیت ضد قارچی ایزوله‌های باکتریایی بر علیه قارچ بیمارگر *M. oryzae* با انجام کشت متقابل و با سه تکرار انجام شد. وجود هاله بازدارندگی پس از گذشت ۴-۶ روز مورد بررسی قرار گرفت و نهایتاً دو جدایه باکتریایی به

ترتیب با تشکیل هاله‌های بازدارندگی ۱۰ و ۱۴ میلی‌متری برای شناسایی و مطالعات بعدی انتخاب شدند.

شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست

استخراج DNA (QlAqick PCR Purification Protocol) باکتری‌های دارای توانایی آنتاگونیستی بر علیه *M. oryzae* در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت و محصول حاصل از PCR به ناقل pGEM-T (Promega, Madison, WI) کلون گردید و نهایتاً فرآیند تعیین توالی با استفاده از BigDye-terminator cycle sequencing kit در مرکز تعیین توالی ساختمان بیوفور، دانشگاه لوزان، سوئیس انجام گرفت. داده‌های حاصل با مرکز NCBI برای مقایسه با توالی‌های همولوگ با سایر منابع DNA تطبیق داده شدند. از میان ۵ باکتری شناسایی شده، دو باکتری *B. subtilis* و *P. fluorescens* برای انجام آزمایشات بعدی انتخاب شدند.

تلقیح خاک با باکتری‌های آنتاگونیست *P. fluorescens* و *B. subtilis*

اینوکلوم جدایه‌های باکتریایی در محیط نوترینت براث و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور به مدت یک شبانه روز تهیه شدند. سلول‌های باکتریایی از طریق سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور 4000 rpm از محیط کشت مایع جداسازی شدند و سپس سوسپانسیون نهایی باکتری با غلظت 10^8 سلول باکتریایی در هر میلی‌لیتر با متیل سلولز ۲٪ (جهت بقا و دوام باکتری در خاک) تهیه گردید (Suslow & Schroth 1981). خاک هر گلدان (جهت اشباع)، با میزان تقریبی ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده آغشته شد.

تلقیح خاک با قارچ میکوریز *G. intraradices*

قارچ میکوریز *G. intraradices* (Yang *et al*. 2012) از بخش بیولوژی مولکولی گیاهی، دانشگاه لوزان، سوئیس تهیه گردید و رشد آن در شرایط استریل انجام شد (Becard and Fortin 1988).سپس یک حجم مساوی از آب مقطر حاوی ۵۰۰ اسپور در هر میلی‌لیتر (یا بدون اسپور قارچی در گیاه شاهد) به مخلوط شن و خاک در عمق ۱/۵ سانتی‌متری افزوده گردید (Paszkowski *et al*. 2002).

آلوده‌سازی خاک با قارچ بیمارگر *M. oryzae*

M. oryzae FR-13 (تهیه شده از بخش بیولوژی مولکولی گیاهی، دانشگاه لوزان، سوئیس) پس از گذشت ۶ هفته به صورت قطعات جامد محیط کشت حاوی میسلیوم‌های بیمارگر به ریشه گیاهان برنج اضافه گردید (Sesma and Osbourn 2004; Paszkowski *et al*. 2002).

تعیین وزن خشک گیاه برنج

پس از گذشت ۶ هفته، وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه‌ها در هر تیمار به طور جداگانه مورد محاسبه قرار گرفت. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد.

تعیین جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست *P. fluorescens* و *B. subtilis*

برای تعیین جمعیت سلولی باکتری های آنتاگونیست، نمونه‌های ریزوسفر پس از گذشت ۶ هفته جمع آوری شدند. شمارش جمعیت باکتری‌ها با استفاده از روش رقیق‌سازی و پس از گذشت ۲ روز در محیط کشت حاوی LBA انجام گرفت. برای هر تیمار ۳ تکرار در

نظر گرفته شد.

تعیین درصد کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ میکوریز *G. intraradices*

درصد کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ میکوریز، پس از گذشت ۶ هفته از تلقیح، از طریق مشاهده بصری قارچ‌ها پس از شستشو ریشه‌ها در KOH ۲٪ و رنگ‌آمیزی با تریپان بلو ۰/۰۵٪ بر اساس روش *سایتو و همکاران* (۲۰۰۷) انجام گرفت. نمونه‌های رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ زمینه روشن (Leitz DMRB; Leica) مورد بررسی قرار گرفتند و درجه میزان کلونیزاسیون برای هر تیمار تعیین گردید (Brundrett *et al*. 1984; Giovanetti and Mosse 1980). در این آزمایش برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

تعیین شدت بیماری

در حدود یک ماه پس از آلوده‌سازی خاک، شدت بیماری (DS) برای هر گیاه تعیین شد. میزان شدت بیماری با مقیاس ۰ تا ۵ (۰ شاخصی برای گیاه شاهد بدون علائم کلروتیک یا نکروتیک است) تعیین گردید. مقیاس عددی برای هر تیمار نشان‌دهنده درصد منطقه نکروز یا کلروز در برگ می باشد: ۱: ۱٪-۲۰٪، ۲: ۲۱٪-۴۰٪، ۳: ۴۱٪-۶۰٪، ۴: ۶۱٪-۸۰٪ و ۵: ۸۱٪-۱۰۰٪ (Park *et al*., 2009). جهت بررسی شدت بیماری ۴ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و روش Real -Time RT-PCR

RNA کل، از ۱ گرم بافت ریشه (جهت ارزیابی ژن‌های اختصاصی میکوریزها) پس از گذشت ۶ هفته از تلقیح قارچ *G. intraradices*، و از ۱ گرم بافت اندام‌های هوایی (جهت ارزیابی ژن های دفاعی) پس از گذشت ۴ هفته از تلقیح قارچ بیمارگر *M. oryzae* با استفاده از واکنش‌گر تریازول استخراج شد. جهت سنتز cDNA از آنزیم SuperScriptRIII استفاده شد. در این بررسی ژن‌های اختصاصی میکوریز *Oryza sativa phosphate transporter* (*OsPT11*) و *serin-threonine kinas like* (*OsAM14*) (Guimil *et al*. 2005) و هم‌چنین مارکرهای ژنی (مسیرهای مقاومتی) (*PR-1a*) و pathogenesis related (*PR-10b*) (Marcel *et al*. 2010) وابسته به مسیر مقاومتی SAR و plant defensin (*PDF1.2*) و chitinase (*ChiB*)ß– وابسته به مسیر مقاومتی JA/ET برای هر تیمار مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). برای هر تیمار ۳ تکرار بیولوژیکی (و ۳ تکرار فنی یا تکنیکی برای هر تکرار بیولوژیکی) و هم‌چنین آب مقطر به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. کمیت سنجی با استفاده از روش real-time RT-PCR (384-well plates)، با استفاده از SYBR green master mix و با برنامه: (۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه) صورت گرفت. داده‌های حاصل با software SDS 2.2 آنالیز شدند. نرمال کردن داده‌ها با استفاده از بیان ژن‌های متداول برنج شامل: *ACTIN* (The Institute for Genomic Research [TIGR] identifier, LOC_Os03g50890)، *CYCLOPHILIN* (TIGR identifier, LOC_Os02g02890) و *GAPDH* (TIGR identifier, LOC_Os08g03290) (Gutjahr *et al*., 2008) انجام گردید (Czechowski *et al*. 2004) و نهایتاً برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌های دفاعی از ژن *CYCLOPHILIN* (به عنوان ژن رفرانس) استفاده شد.

جدول ۱. عملکرد پروتئین‌ها و پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی جهت کمیت سنجی RNA حاصل از ریشه و اندام‌های هوایی با استفاده از روش real-time RT- PCR.

Table 1. Putative function of proteins and Primers used for quantification of root and shoot RNA and gene expression by real-time RT – PCR.

عملکرد پروتئین	ژن	کد شناسایی ژن	منبع	پرایمر ۱ (F)	پرایمر ۲ (R)
Phosphate transporter	*PT11*	LOC_Os01g46860	Gutjahr *et al*., 2008	GAGAAGTTCCCT GCTTCAAGCA	CATATCCCAGATG AGCGTATCATG
Serine-threonine kinase like	*AM14*	LOC_Os11g26140	Gutjahr *et al*., 2008	CCAACACCGTTG CAAGTACAATAC	GCACTTTGAAATTG GACTGTAAGAAA
Pathogenesis related	*PR-1a*	LOC_Os07g03710	Marcel *et al*., 2010	GCTACGTGTTTA TGCATGTATGG	TCGGATTTATTCTC ACCAGCA
Pathogenesis related	*PR-10b*	LOC_Os12g36830	Marcel *et al*., 2010	TCTCCGTATTGC TGCTTCCT	CACTCTCACAAAA TCAAACACCA
Defensin	*PDF1.2*	LOC_Os02g12060	در این بررسی	ATTTCAAGGGGT TGTGCTTG	ATGCAGCGTCGAG TCAAGT
ß-chitinase	*ChiB*	LOC_Os05g33130	در این بررسی	GTACGGCGTGAT CACCAAC	TGAACGGCCTCTG GTTGTAG

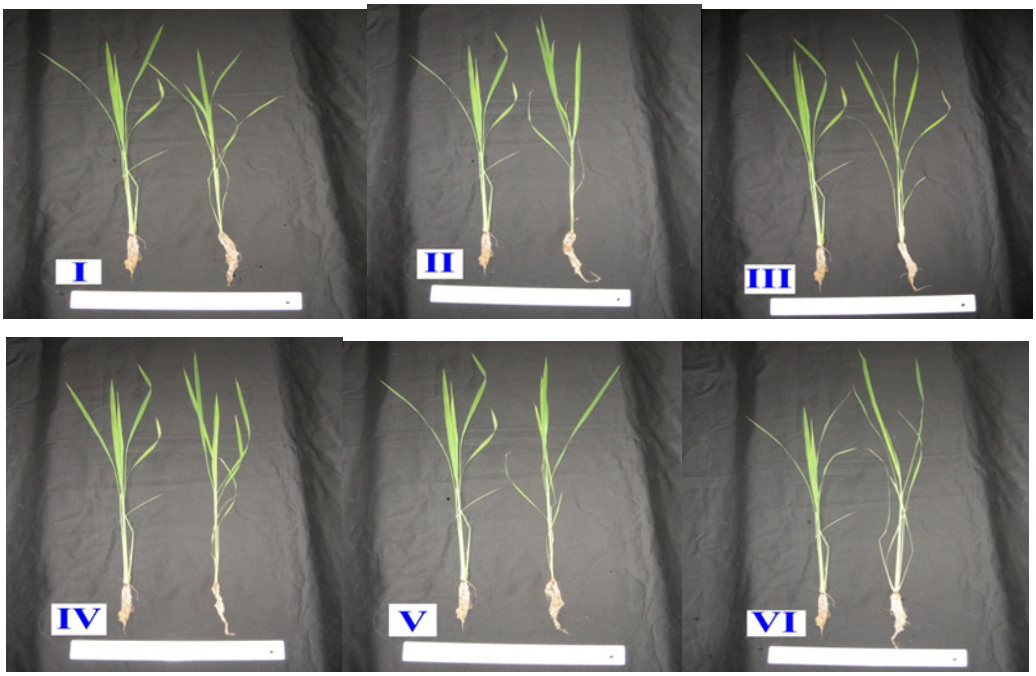
آنالیز آماری داده‌ها

داده‌ها به وسیله برنامه آماری ANOVA Genstat 5 release 4.1 (2.15.0 version)، با کمترین تفاوت معنی‌دار (LSD: Least Significant Difference) در سطح P<0/05 مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

رشد گیاه برنج

فنوتیپ رشد گیاهان برنج در تیمارهای مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. به نظر می‌رسد که هیچ یک از میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در این آزمایش شامل *G. intraradices*، *P. fluorescens* و *B. subtilis* تأثیر منفی بر روی رشد گیاه نداشتند. پس از گذشت ۶ هفته، باکتری *P. fluorescens* منجر به یک تأثیر مثبت و معنی‌دار در رشد گیاه برنج گردید (شکل 2A). بدین ترتیب که میزان وزن خشک اندام‌های هوایی در حضور باکتری *P. fluorescens* در حدود ۰/۶ گرم بوده، در حالی در گیاه شاهد میزان رشد اندام‌های هوایی در حدود ۰/۴۴ گرم بوده است (شکل A۲). هم‌چنین رشد ریشه و اندام‌های هوایی در ترکیب دو باکتری *P. fluorescens* و *B. subtilis* به طور قابل توجهی افزایش یافت و به ترتیب ۰/۶۷ و ۰/۱۳ گرم بودند (شکل 2A و B)، اما این تأثیر در نسبت ریشه/ اندام‌های هوایی معنی‌دار نبود (شکل 2C). تلقیح گیاهان با قارچ میکوریز *G. intraradices* تأثیر معنی‌داری در روی رشد ریشه و اندام‌های هوایی نداشته و متعاقباً تفاوت معنی‌داری با گیاه شاهد نشان نداد (شکل 2A و B). کاربرد توام باکتری *P. fluorescens* و قارچ *G. intraradices* در مقایسه با کاربرد تنهای *P. fluorescens* یک تأثیر منفی در روی رشد اندام‌های هوایی داشته، اگرچه تفاوت معنی‌داری با گیاه شاهد نداشت (شکل 2A). هم‌چنین، باکتری *B. subtilis* نیز تأثیر معنی‌داری در روی رشد ریشه و اندام‌های هوایی در مقایسه با گیاه شاهد نشان نداد (شکل 2A، B و C).



شکل ۱. فنوتیپ تیمارهای مختلف پس از گذشت ۶ هفته. I) شاهد / *G. intraradices* ، II) شاهد/ *P. fluorescens*، III) شاهد/ *B. subtilis* ، IV) شاهد / *G. intraradices+P. fluorescens*، V) شاهد/ *G. intraradices+B. subtilis* و VI) شاهد/ *P. fluorescens+B. subtilis*.

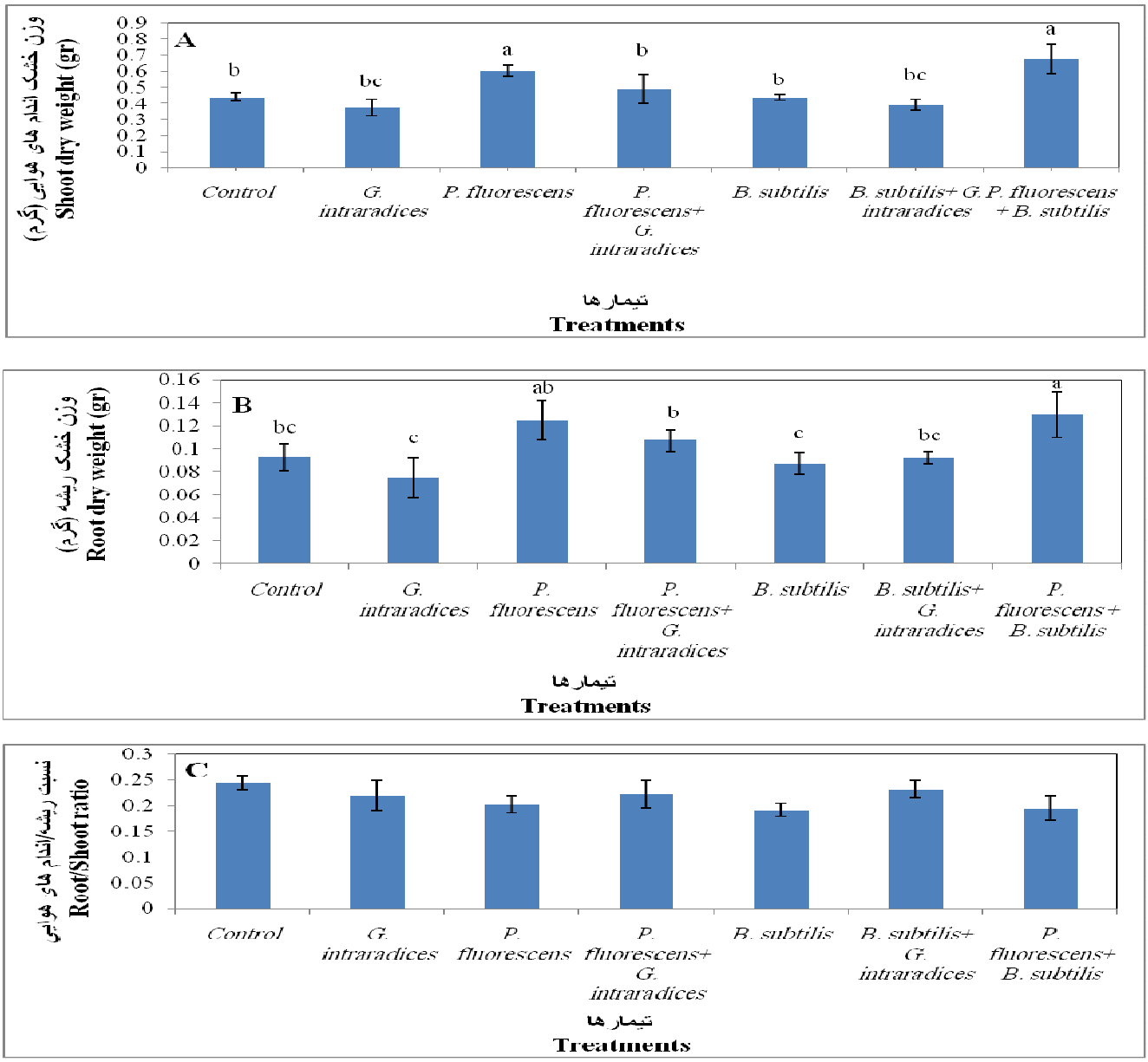
Fig. 1. Phenotype of different treatments, after 6 weeks. I) Control/*G. intraradices*; II) Control/*P. fluorescens*; III) Control/*B. subtilis*; IV) Control/*G. intraradices+P. fluorescens*; V) Control/*G. intraradices+B. subtilis*; VI) Control/*P. fluorescens+B. subtilis*.

جمعیت باکتری‌های *P. fluorescens* و *B. subtilis* در منطقه ریزوسفر

جمعیت باکتری *P. fluorescens* در حضور باکتری *B. subtilis* افزایش یافت (شکل 3A). بدین ترتیب که جمعیت باکتری *P. fluorescens* به تنهایی و در حضور باکتری *B. subtilis* به ترتیب $۱/۵۷\times۱۰^{۷}$ CFU/g و $۵/۳۳\times۱۰^{۷}$ CFU/g ارزیابی شد. هم‌چنین جمعیت *B. subtilis* نیز به طور معنی‌داری در حضور *P. fluorescens* افزایش یافت و جمعیت آن به تنهایی و در حضور باکتری *P. fluorescens* به ترتیب ۱×۱۰^{۷} CFU/g و $۴/۶۷\times۱۰^{۷}$ CFU/g برآورد گردید (شکل 3B). در حقیقت، کاربرد *G. intraradices* تأثیری در جمعیت دو باکتری *P. fluorescens* و *B. subtilis* نداشت. در مقابل، این دو باکتری یک تأثیر مثبت در روی جمعیت یکدیگر نشان دادند (شکل 3A و B).

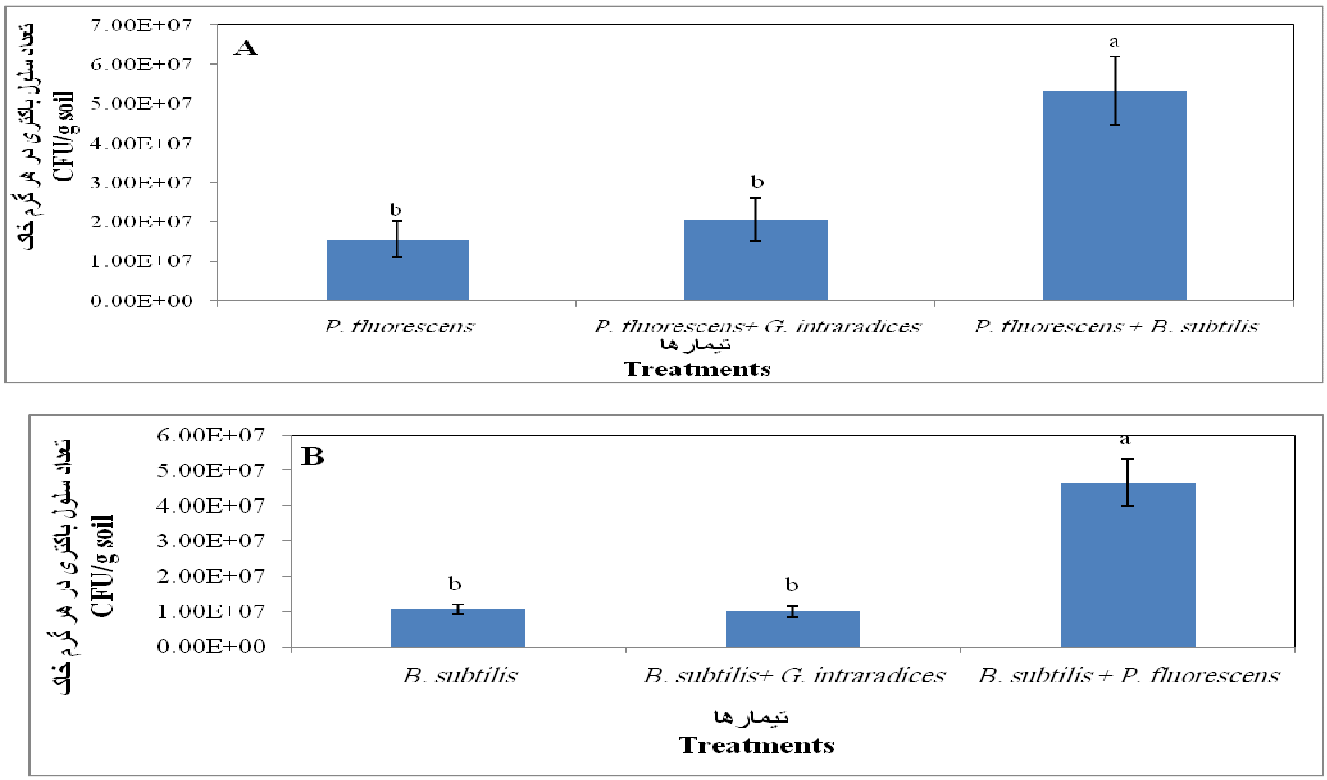
ارزیابی کلونیزاسیون توسط قارچ *G. intraradices*

پس از گذشت ۶ هفته، کلونیزاسیون ریشه برنج توسط قارچ *G. intraradices* صورت گرفته و تمامی ساختارهای معمول قارچ میکوریز مانند هیف خارج سلولی، آربسکولار و اسپور تشکیل گردید (شکل ۴) (نتایج مربوط به تعداد اندام‌های تشکیل شده در تیمارهای مختلف نشان داده نشده‌اند)، و میزان کلونیزاسیون تا ۳۵٪ رسید. اما هر دو باکتری مورد استفاده در این آزمایش یک تأثیر ممانعت کننده بر روی کلونیزاسیون حاصل از قارچ *G. intraradices* نشان دادند (شکل ۵). در حضور



شکل ۲. تأثیر *G. intraradices*، *P. fluorescens* و *B. subtilis* و ترکیب آنها در روی رشد گیاه برنج (*O. sativa* cv. Nipponbare). A) تأثیر در روی وزن خشک اندام‌های هوایی، B) تأثیر در روی وزن خشک ریشه و C) تأثیر در روی نسبت وزن خشک ریشه به اندام‌های هوایی. هر یک از ستون‌ها با حروف آماری متفاوت، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها (با ۴ تکرار) با روش LSD در سطح $P< 0.05$ است. عدم وجود حروف آماری در شکل C نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد.

Fig. 2. Effect of *G. intraradices*, *P. fluorescens*, *B. subtilis* and their combination on rice (*O. sativa* cv. Nipponbare) growth. A) Effect on shoot dry weight, B) Root dry weight and C) Effect on root/shoot ratio. Bars represent LSD (least significant differences, *P< 0.05*) for comparisons between treatments with 4 replications. There were no significant differences among treatments in picture C.



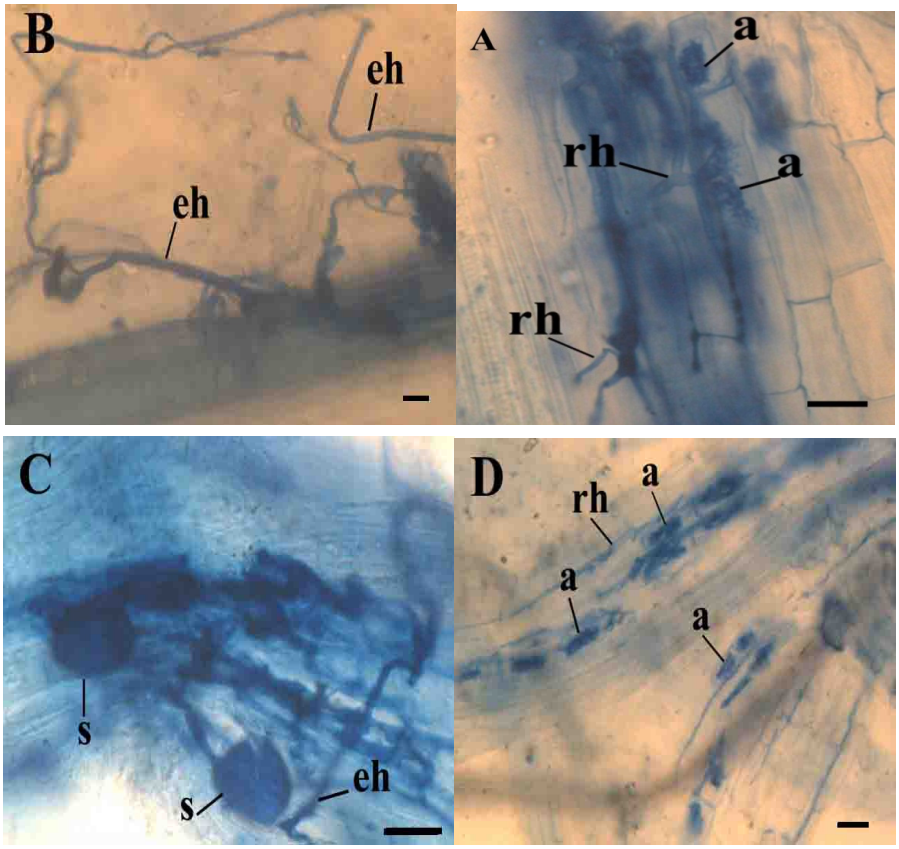
شکل ۳. A) تأثیر قارچ *G. intraradices* و باکتری *B. subtilis* در روی جمعیت، تعداد سلول باکتریایی در هر گرم خاک (CFU/g soil)، باکتری *P. fluorescens*. B) تأثیر قارچ *G. intraradices* و باکتری *P. fluorescens* در روی جمعیت، تعداد سلول باکتریایی در هر گرم خاک (CFU/g soil)، باکتری *B. subtilis*. هر یک از ستون‌ها با حروف آماری متفاوت، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها (با ۳ تکرار) با روش LSD در سطح P< 0.05 است.

Fig. 3. A) Effect of *G. intraradices* and *B. subtilis* on the population levels, colony forming unit or CFU/g soil, of *P. fluorescens*. B) Effect of *G. intraradices* and *P. fluorescens* on the population levels, colony forming unit or CFU/g soil, of *B. subtilis*. Bars represent LSD (least significant differences, *P< 0.05*) for comparisons between treatments with 3 replications.

باکتری‌های *P. fluorescens* و *B. subtilis* میزان کلونیزاسیون در مقایسه با تیمار *G. intraradices* (به تنهایی) تا ۱۰٪ کاهش یافته است (شکل ۵).

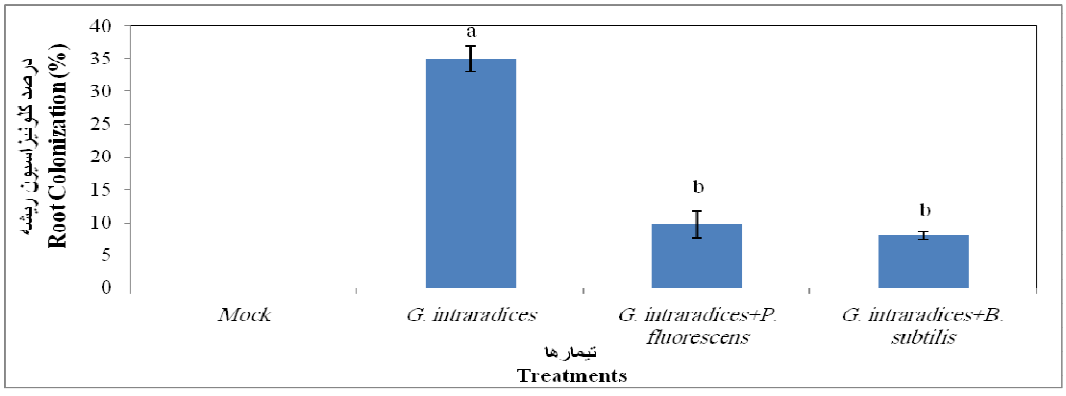
بیان ژن‌های اختصاصی قارچ میکوریز *G. intraradices* در برنج

بیان دو ژن اختصاصی برنج در رابطه همزیستی بین گیاه برنج و قارچ میکوریز *G. intraradices* شامل *OsPT11* و *OsAM14* پس از گذشت ۶ هفته مورد ارزیابی قرار گرفت. در طول رابطه همزیستی بین قارچ میکوریز *G. intraradices* و گیاه برنج بیان دو ژن *OsPT11* و *OsAM14* در گیاه برنج صورت گرفت در حالی‌که این دو ژن در گیاهان شاهد خاموش بودند. سطح بیان ژن *PT11* پس از گذشت ۶ هفته بالاتر از ژن *AM14* بود. هم‌چنین کاربرد دو باکتری *P. fluorescens* و *B. subtilis* منجر به کاهش سطوح بیان این ژن‌های اختصاصی در برنج در



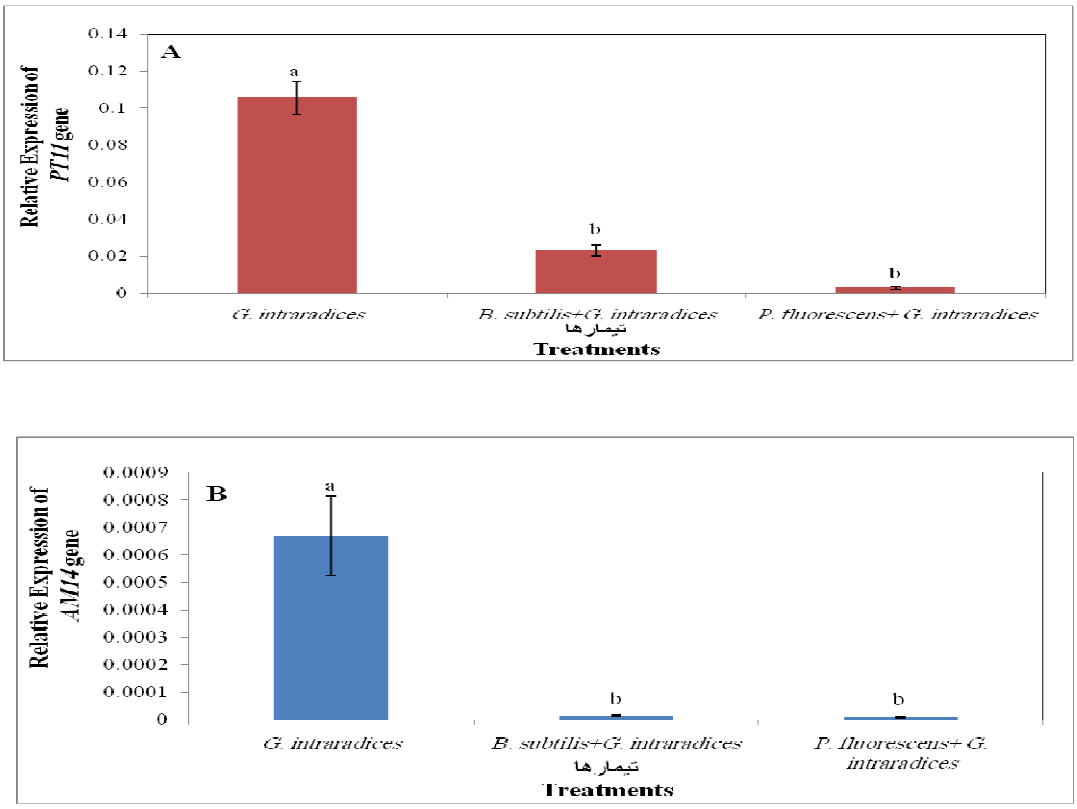
شکل ۴. فنوتیپ کلونیزاسیون ریشه‌های برنج توسط *G. intraradices*. پس از گذشت ۶ هفته، ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده با تریپوبان بلو توسط میکروسکوپ کونفوکال TCS SP2 AOBS نشان داده شدند. ساختارهای معمول قارچ میکوریز شامل: a= (arbuscule) اندام آربسکول، eh= (external hypha) هیف خارجی، rh= (running hypha) هیف رونده و s = (spore) اسپور. مقیاس میکروسکوپی برای A و C: 20 µm و برای B و D: 10 µm.

Fig. 4. AM symbiosis phenotype. Light micrographs of trypan blue-stained roots 6 wpi with *G. intraradices* are shown by Leica TCS SP2 AOBS confocal microscopy. AM structures are indicated by a, arbuscule; eh, external hypha; rh, running hypha and s, spore. Scale bars: A and C, 20 µm; B and D, 10 µm.



شکل ۵. درصد کلونیزاسیون ریشه توسط *G. intraradices*. هر یک از ستون‌ها با حروف آماری متفاوت، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها (با ۳ تکرار) با روش LSD در سطح P< 0.05 می‌باشد.

Fig. 5. The percentage of rice root system colonized by *G. intraradices*, determined by a modified grid-line intersect method. Bars represent LSD (least significant differences, *P< 0.05*) for comparisons between treatments with 3 replications.



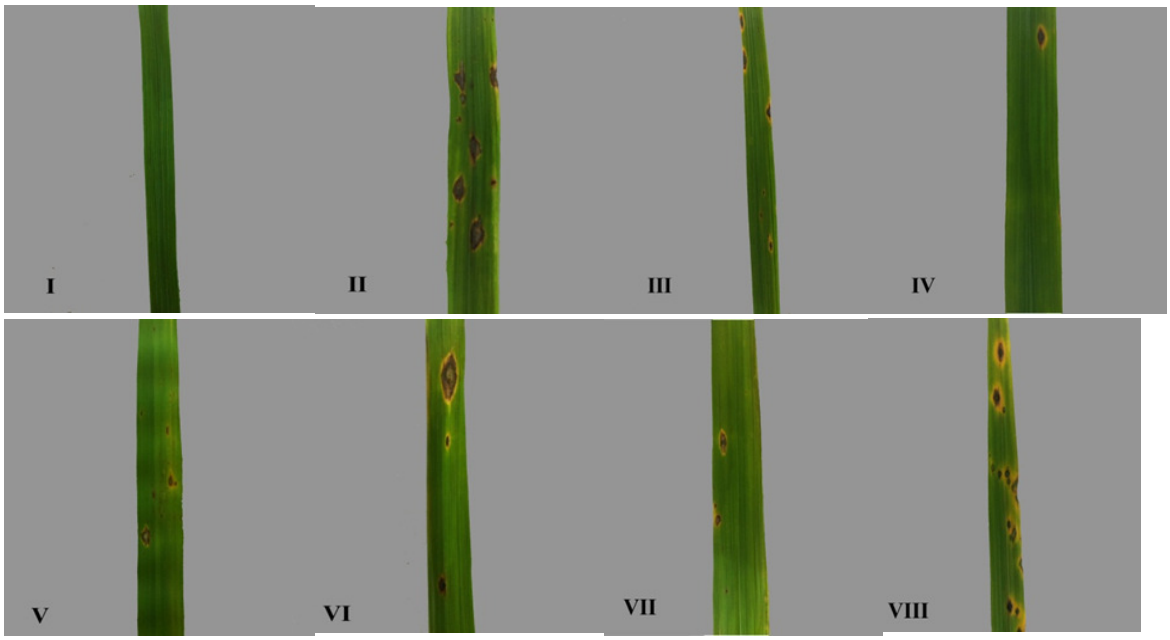
شکل ۶. بیان ژن‌های (A *PT11* و (B *AM14* در ریشه برنج کلونیزه شده با قارچ *G. intraradices* بر اساس روش SYBER green Real-time RT-PCR. سطوح بیان نسبی این ژن‌ها (با سه تکرار) با روش LSD (P< 0.05) با استفاده از بیان پیوسته ژن *CYCLOPHILIN* نشان داده شده است.

Fig. 6A and B. SYBER green Real-time RT-PCR–based expression analysis of (A) *PT11* and (B) *AM14* genes in rice roots inoculated with *G. intraradices*. Expression levels are shown relative to the constitutively expressed *CYCLOPHILIN* gene. Error bars indicate LSD from three replications (P< 0.05).

مقایسه با کاربرد *G. intraradices* (به تنهایی) شده است (شکل ۶).

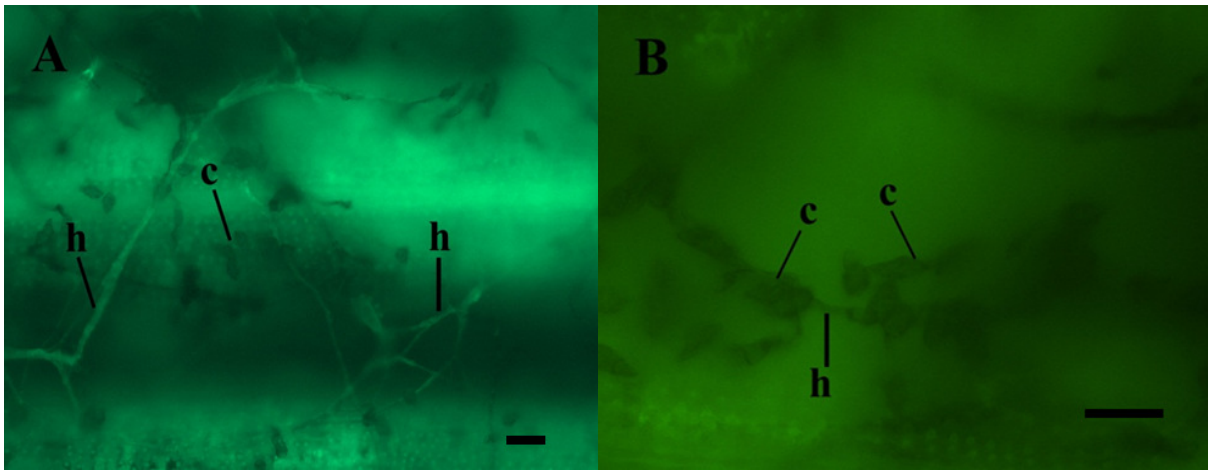
آلودگی تیمارهای مختلف ناشی از کاربرد قارچ بیمارگر *M. oryzae*

هفت تیمار مختلف در این بررسی با استرین FR-13 از قارچ *M. oryzae* تلقیح شدند (شکل ۷). جهت مشاهده اندام‌های قارچ بیمارگر از میکروسکوپ Leica TCS SP2 AOBS استفاده شد (شکل 8A و B). کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ بیمارگر *M. oryzae* منجر به آلودگی سیستمیک بیماری و ظهور علائم در اندام‌های هوایی گیاهان برنج گردید (Sesma & Osbourn 2004) و همه تیمارها تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با شاهد (بدون تلقیح قارچ بیمارگر) نشان دادند. شدت بیماری در گیاهان شاهد تلقیح شده با قارچ *M. oryzae* در حدود 4/2 بود. شدت بیماری در تیمارهای *B. subtilis* (به



شکل ۷. علائم بیماری ناشی از *M. oryzae* FR-13 در تیمارهای مختلف، پس از گذشت ۴ هفته از تلقیح. I) شاهد، II) *G. intraradices*، III) *P. fluorescens*، IV) *B. subtilis*، V) *G. intraradices+P. fluorescens*، VI) *G. intraradices+B. subtilis*، VII) *P. fluorescens+B. subtilis* و VIII) شاهد تلقیح شده با بیمارگر.

Fig. 7. Disease symptoms in different treatments caused by *M. oryzae* FR-13 at 4 wpi. I) Control; II) *G. intraradices*; III) *P. fluorescens*; IV) *B. subtilis*; V) *G. intraradices+P. fluorescens*; VI) *G. intraradices+B. subtilis*; VII) *P. fluorescens+B. subtilis*; VIII) Control infected by pathogen.



شکل ۸. موفولوژی و حضور بیمارگر در برگ‌های برنج کلونیزه شده با *M. oryzae*. ساختارهای قارچ شامل c= (conidia) کنیدی، h= (hypha) هیف. A) 10 µm و B) 20 µm.

Fig. 8. Morphology and dynamic of rice root colonization by *M. oryzae*. Fungus structures are indicated by c, conidia; h, hypha. A, 10 µm and B, 20 µm.

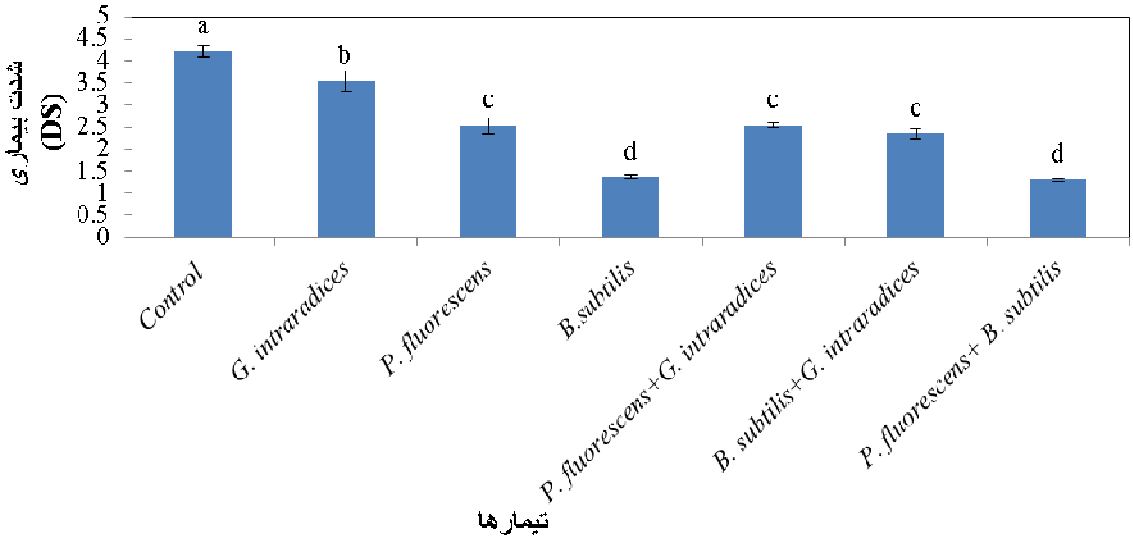
تنهایی) و *P. fluorescens+B. subtilis* کمتر از ۱/۵ بوده و منجر به القای یک مقاومت قابل توجه بر علیه *M. oryzae* شد. از سویی دیگر شدت بیماری در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز *G. intraradices* و هم‌چنین *P. fluorescens*، به ترتیب بیشتر از ۵/۳ و ۲/۵ بوده و در واقع این تیمارها در مقایسه با گیاهان تلقیح شده با باکتری *B. subtilis* تیمارهای حساس‌تری در برابر بیماری بلاست بودند (شکل ۹). علی‌رغم این نتایج به نظر می‌رسد که قارچ *G. intraradices* و باکتری *P. fluorescens* دارای توانایی القای مقاومت بر علیه *M. oryzae* به صورت سیستمیک را دارند. از سویی دیگر، اگرچه پاسخ‌های دفاعی ناشی از کاربرد باکتری *B. subtilis* در گیاهان با حضور قارچ *G. intraradices* کاهش یافته است، در مقابل تفاوت معنی‌داری با تیمار حاوی *B. subtilis* و *P. fluorescens* نشان نداد (شکل ۹).

بیان ژن‌های دفاعی در گیاهان برنج غیر آلوده و آلوده به قارچ بیمارگر *M. oryzae*

در این بررسی بیان ژن‌های نشانگر وابسته به مسیرهای مقاومتی SA و JA/ET در برنج مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش سطوح بیان ۴ ژن دفاعی در تیمارهای مختلف شامل *G. intraradices*، *P. fluorescens* و *B. subtilis* و هم‌چنین ترکیب آنها متفاوت بود. سطوح بیان دو ژن *PR-1a* و *PR-10b* در گیاهان تلقیح شده با *P. fluorescens*، *B. subtilis* و *G. intraradices*، و هم‌چنین ترکیب آنها به طور قابل توجهی پایین بوده، در حالی‌که بیان این ژن‌ها در گیاهان شاهد بالا بوده است (شکل 10A و B). اگرچه، تجمع دو ژن *PR-1a* و *PR-10b* در کاربرد *G. intraradices* (به تنهایی) مشاهده شد، اما تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با گیاهان شاهد نشان داد. به طور کلی، در بیان ژن‌های *PR-1a* و *PR-10b* در گیاهان غیر آلوده و آلوده به بیمارگر، به استثناء گیاهان شاهد، تفاوت معنی‌داری دیده نشد (شکل 10A و B). بیان ژن *PDF1.2* در تمامی تیمارها پس از تلقیح با *M. oryzae* افزایش یافته، اگرچه این افزایش در گیاهان آغشته به باکتری *B. subtilis* و ترکیب آن با *P. fluorescens* به صورت معنی‌داری قابل توجه بود (شکل 10C). هم‌چنین، بیان ژن *ChiB* در تیمارهای *B. subtilis* و ترکیب آن با *P. fluorescens* به‌طور قابل ملاحظه ای بالا بوده، اگرچه این ژن در سایر تیمارها (آلوده و غیر آلوده) خاموش بوده است (شکل 10D). نکته قابل توجه این است که بیان ژن‌های *PDF1.2* و *ChiB* در گیاهان آغشته با باکتری *B. subtilis* در حضور *P. fluorescens* افزایش یافته، اما در حضور *G. intraradices* کاهش یافت (شکل 10C و D).

بحث

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که قارچ میکوریز *G. intraradices* تأثیر معنی‌داری روی رشد گیاه برنج نداشته است. قارچ‌های میکوریز *G. mosseae* و *G. intraradices* منجر به کاهش رشد گیاه برنج (*O. sativa* cv. Shafagh) در شرایط غیر غرقاب گردیده‌اند (Hajiboland *et al*. 2009). با توجه به اینکه قارچ‌های میکوریز برای حفظ رابطه همزیستی با گیاه نیازمند به کسب کربن از گیاه میزبان می‌باشند، یک میزان قابل توجهی از تولیدات ناشی از فرآیند فتوسنتز به سمت ریشه منتقل می‌گردد. شرایط محیطی، مانند عدم وجود نور کافی، منجر به محدود شدن منابع حاصل از فتوسنتز شده است. بنابراین در شرایط اتاق کشت، در مقایسه با

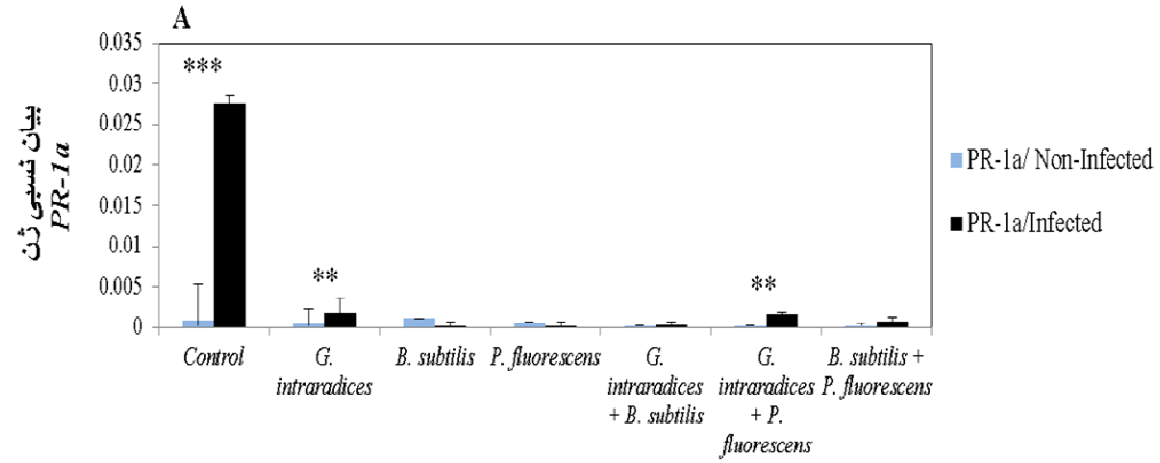


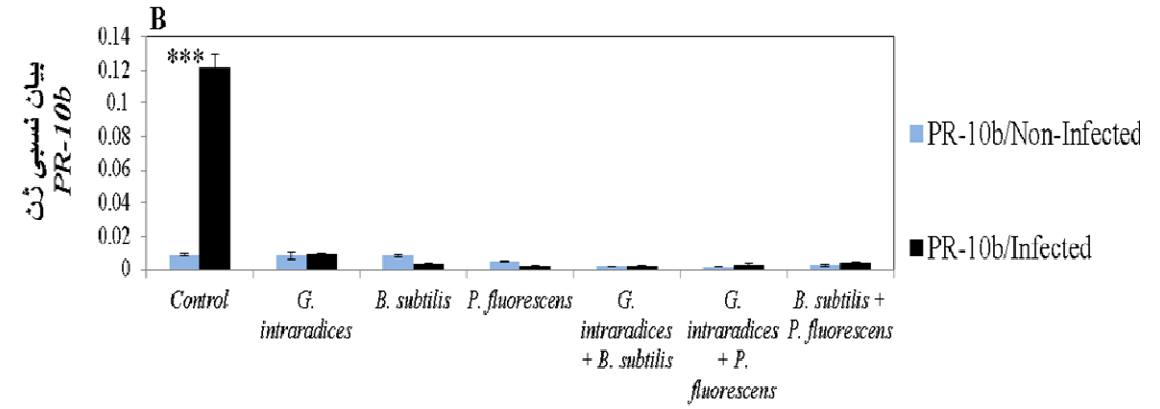
شکل ۹. شدت بیماری در گیاهان برنج آلوده به *M. oryzae* شدت بیماری پس از گذشت ۴ هفته از تلقیح با بیمارگر در هر تیمار بررسی شد. هر یک از ستون‌ها با حروف آماری متفاوت، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها (با ۴ تکرار) با روش LSD در سطح $P< 0.05$ می‌باشد.

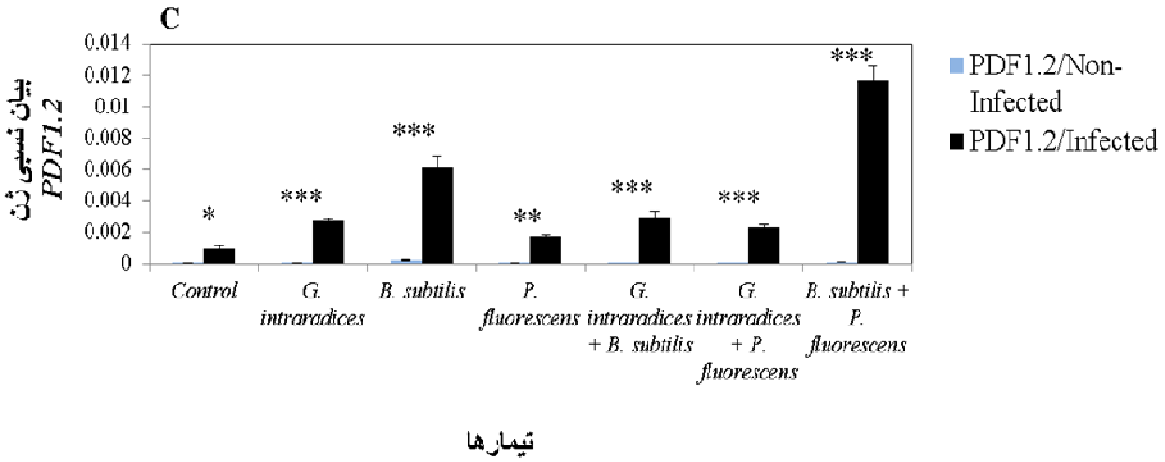
Fig. 9. Disease severity in Rice (*Oryzae sativa* cv. Nipponbare) infected with *M. oryzae*. Disease severity was measured at 4 wpi using a numerical scoring system as described in "Materials and Methods". Bars represent LSD (least significant differences, *P< 0.05*) for comparisons between treatments with 4 replications.

مزرعه، ممکن است یک رقابت بین قارچ میکوریز و گیاه میزبان برای کسب منابع ناشی از فتوسنتز ایجاد شود و نهایتاً رشد گیاهان کلونیزه شده توسط قارچ میکوریز محدود شود. از سوی دیگر، باید عنوان نمود که گونه‌های مختلف میکوریز می‌توانند تأثیرات متفاوتی را روی رشد گیاهان مختلف نشان دهند (Bongard 2012).

هم‌چنین، نتایج حاصل از کاربرد توام دو باکتری *P. fluorescens* و *B. subtilis* می‌تواند حاکی از یک ارتباط سازگار بین این دو عامل بیولوژیکی مفید باشد. بدین ترتیب که کاربرد این دو باکتری به طور همزمان نه تنها منجر به افزایش رشد گیاه برنج شد، بلکه شدت بیماری نیز به طور قابل توجه‌ای کاهش یافت. مطالعات نشان داده‌اند که ترکیب چندین PGPRs می‌تواند تأثیر قابل توجه‌ای در کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی و رشد گیاهانی مانند فلفل و گوجه فرنگی داشته باشد (Domenech *et al*. 2006). از سویی دیگر یک ارتباط ناسازگار بین قارچ میکوریز و دو باکتری مورد مطالعه در این بررسی مشاهده شد، که این نتایج می‌تواند ناشی از وجود یک عملکرد رقابتی و آنتاگونیستی بین این عوامل میکروبی در منطقه ریزوسفر باشد. در حقیقت نتایج حاصل از این بررسی، اولین ارزیابی تعامل بین قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های آنتاگونیست در گیاه برنج بود. کاهش در میزان کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ *G. intraradices* در حضور دو باکتری *Pseudomonas* و *Bacillus* نشان داد که در انتخاب و کاربرد توام عوامل بیولوژیکی باکتریایی با قارچ‌های میکوریز بایستی توجه

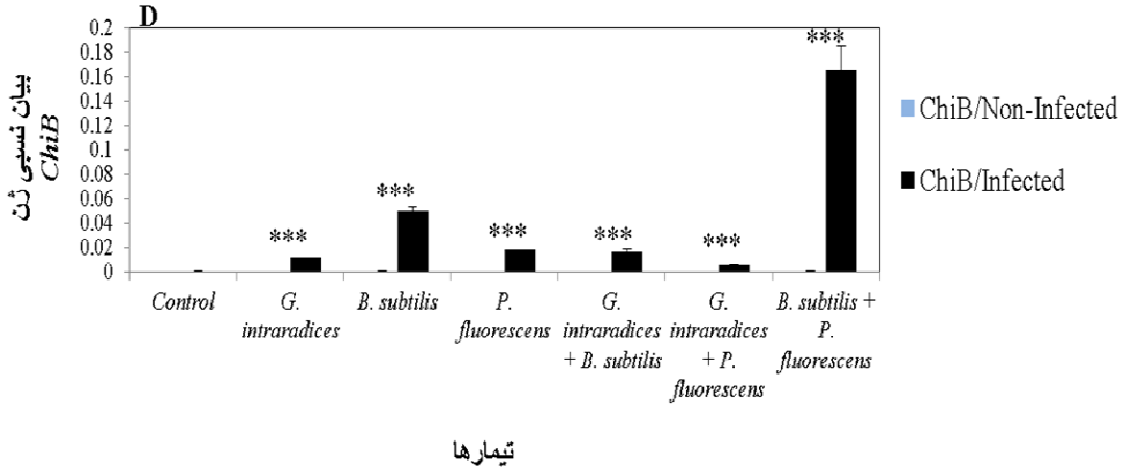

A
بیان نسبی ژن PR-1a
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
***
**
**
Control
G. intraradices
B. subtilis
P. fluorescens
G. intraradices + B. subtilis
G. intraradices + P. fluorescens
B. subtilis + P. fluorescens
PR-1a/ Non-Infected
PR-1a/Infected
تیمارها


B
بیان نسبی ژن PR-10b
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
***
Control
G. intraradices
B. subtilis
P. fluorescens
G. intraradices + B. subtilis
G. intraradices + P. fluorescens
B. subtilis + P. fluorescens
PR-10b/Non-Infected
PR-10b/Infected
تیمارها


C
بیان نسبی ژن PDF1.2
0.014
0.012
0.01
0.008
0.006
0.004
0.002
0
*
***
***
**
***
***
***
Control
G. intraradices
B. subtilis
P. fluorescens
G. intraradices + B. subtilis
G. intraradices + P. fluorescens
B. subtilis + P. fluorescens
PDF1.2/Non-Infected
PDF1.2/Infected
تیمارها

شکل ۱۰.

ادامه شکل ۱۰.



شکل ۱۰. تجمع mRNAs برای ۴ ژن دفاعی در گیاهان آلوده و غیر آلوده پس از گذشت ۴ هفته از تلقیح قارچ بیمارگر *M. oryzae* (A بیان نسبی ژن *PR-1a*، B) بیان نسبی ژن *PR-10b*، C) بیان نسبی ژن *PDF1.2* و D) بیان نسبی ژن *ChiB*. سطوح بیان نسبی این ژن‌ها (با سه تکرار) با روش LSD صورت گرفت (*: P <0.0005 ، **: *P <0.005* و *: *P <0.05*). نرمال شدن داده‌ها با استفاده از بیان پیوسته ژن *CYCLOPHILIN* نشان داده شده است.**

Fig. 10. Accumulation of mRNAs from four defense-related genes in non-infected and infected plants 4 weeks after inoculation by *M. oryzae*. A) Transcript accumulation of *PR-1a*, B) Transcript accumulation of *PR-10b*, C) Transcript accumulation of *PDF1.2* and D) Transcript accumulation of *ChiB*. Bars represent LSD (least significant differences, * : *P <0.0005* ،** : *P <0.005* و *: *P <0.05*) for comparisons between treatments with 3 replicatations. Expression levels are shown relative to the constitutively expressed rice *CYCLOPHILIN* gene.**

خاصی صورت گیرد، زیرا که امکان عملکرد آنتاگونیستی این باکتری‌ها نه تنها با بیمارگرهای گیاهی بلکه با قارچ‌های میکوریز نیز وجود دارد. هم‌چنین، عمده ارتباطات بین عوامل میکروبی خاک وابسته به ترکیبات مختلف آزاد شده از ریشه گیاهان میزبان می‌باشد (Hartmann *et al*. 2009) و ترشحات ریشه با تغییر در pH و منابع معدنی قابل دسترس در منطقه ریزوسفر، رشد و تعاملات میکروبی خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Rovira 1969). به علاوه برخی از بررسی‌ها ثابت کردند که یک درجه بالایی از اختصاصیت در بین باکتری‌ها مرتبط با قارچ‌های میکوریز وجود دارد (Andrade *et al*. 1997; Artursson *et al*. 2005). *فیلیون و همکاران* در سال ۱۹۹۹ ثابت کردند که ترشحات ناشی از میسلیوم قارچ *G. intraradices* می‌تواند تأثیر سینرژیستی و آنتاگونیستی روی عوامل باکتریایی موجود در منطقه ریزوسفر (بسته به نوع عامل میکروبی) داشته است.

مطالعه مولکولی کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ *G. intraradices* نشان داد که بیان ژن *PT11*، پس از گذشت ۶ هفته از تلقیح، به مراتب بالاتر از ژن *AM14* بوده است و در نتیجه بیان ژن *PT11* زودتر صورت گرفته است. *PT11* به عنوان یک ژن اختصاصی و

انتقال‌دهنده فسفر در جریان کلونیزاسیون ریشه برنج توسط قارچ‌های میکوریز بین هفته ۷ تا ۹ مشاهده شده است، که زمان تشکیل اندام‌های آربسکول (به عنوان یک ساختار مرکزی در رابطه همزیستی) در ریشه برنج بوده است(Paszkowski *et al*. 2002; Nagy *et al*. 2005). مطالعات نشان داده‌اند که میزان بیان برخی از ژن‌ها مانند *AM14* وابسته به درجه کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ‌های میکوریز می‌باشد(Gutjahr *et al*. 2008).

بر اساس نتایج به‌دست آمده از شدت بیماری بلاست و بیان ژن‌های دفاعی مورد ارزیابی در اندام‌های هوایی (شامل ژن‌های *PDF1.2* و *ChiB*)، هر سه عامل بیولوژیک، شامل *G. intraradices*، *P. fluorescens* و *B. subtilis*، منجر به القای ژن‌های دفاعی یکسان به صورت سیستمیک (با توجه به تلقیح عوامل آنتاگونیستی در منطقه ریزوسفر) در گیاه برنج گردیدند. این نتایج، فرضیه وجود برخی برنامه‌های سلولی یکسان را در نتیجه کلونیزاسیون توسط قارچ‌های میکوریز و استقرار باکتری‌های آنتاگونیست در گیاه میزبان تأیید می‌نماید. *سانچز و همکاران* در سال ۲۰۰۴ نتایج مشابهی را با کاربرد توام باکتری *P. fluorescens* و قارچ میکوریز *G. mosseae* به‌دست آوردند. بیان ژن‌های *PDF1.2* و *ChiB* به عنوان ژن‌های دفاعی وابسته به مسیرهای مقاومتی JA/ET و JA به طور معنی‌داری در تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های آنتاگونیست و قارچ میکوریز، پس از تلقیح با بیمارگر، به طور قابل توجه‌ای افزایش یافتند. اگرچه تجمع بیان این ژن‌ها در تیمارهای تلقیح شده با قارچ‌های میکوریز بسته به گونه قارچی، مرحله و میزان کلونیزاسیون می‌باشد (Gao *et al*. 2004; Smith *et al*. 2003 and 2004). به علاوه، توانایی قارچ‌های میکوریز در کنترل بیماری‌های هوازاد وابسته به نوع زندگی و قدرت بیماری‌زایی بیمارگر دارد (Pozo and Azcon-Aguilar 2007). نکته قابل توجه این‌که شدت بیماری در تیمارهای حاوی قارچ میکوریز در ترکیب با باکتری‌های آنتاگونیست به مراتب کمتر از کاربرد قارچ میکوریز به تنهایی بود. اگرچه در القای مقاومت، میزان کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ میکوریز حائز اهمیت است، اما به نظر می‌رسد که ارتباط آنتاگونیستی و رقابتی موجود بین عوامل باکتریایی و قارچ میکوریز مورد بررسی، نه تنها در ارتباط بیولوژیکی این عوامل بلکه در تعاملات مولکولی آنها با گیاه میزبان نیز تأثیر گذار بوده است. در واقع حضور و فعالیت قارچ میکوریز در منطقه ریزوسفر و تأثیر منفی این قارچ در کاهش نسبی اثر آنتاگونیستی باکتری *B. subtilis* قابل توجه بود. در حقیقت، در مسیر مقاومتی القاشده توسط قارچ‌های میکوریز یک ارتباط آنتاگونیستی بین دو هورمون JA و ET وجود دارد، در حالی‌که در مسیر مقاومتی القا شده توسط باکتری‌های آنتاگونیست یک رابطه این دو هورمون از نوع سینرژیستی است (Pozo and Azcon-Aguilar, 2007). بنابراین این تداخل هورمون‌ها می‌تواند دلیلی در افزایش نسبی شدت بیماری در ترکیب باکتری باسیلوس و قارچ میکوریز در مقایسه با کاربرد تنهای باکتری باشد. به طور کلی باید عنوان نمود که دو مسیر مقاومتی ISR و MIR به موازات یکدیگر هستند، بدین معنی که در هر دو مسیر هورمون JA دارای یک نقش کلیدی می‌باشد (Conrath *et al*. 2006). بنابراین مطالعات بیشتر در زمینه تعاملات مولکولی بین عوامل آنتاگونیستی باکتریایی و قارچی، می‌تواند در پیشرفت علم کنترل بیولوژیک تأثیرگذار باشد.

سپاسگزاری

نگارنـدگان از دکتـر Uta Paszkowski و دانـشگاه لـوزان (کشور سوئیس) جهت فراهم نمـودن بخـشی از امکانـات این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نماید.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (20-17) متن انگلیسی مراجعـه شود.