

القای مقاومت در گیاه گوجه‌فرنگی با استفاده از بتا-آمینوبوتریک اسید علیه جدایه Ta18 باکتری *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* جداشده از ایران

مریم انصاری، سیدمحسن تقوی^{*}، حبیب‌اله حمزه زرقانی و علیرضا افشاری^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۷)

چکیده

بیماری شانکر باکتریایی ایجاد شده بوسیله *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* یکی از بیماری‌های اقتصادی مهم گوجه‌فرنگی است. در این مطالعه، پس از جدا سازی و تشخیص بیمارگر، اثرات پیش‌تیمار بتا-آمینوبوتریک اسید (BABA) علیه بیماری شانکر باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. BABA به عنوان یکی از مواد شیمیایی توانمند القا کننده مقاومت در گیاهان بر علیه عوامل بیماری‌زا شناخته می‌شود. در این مطالعه گیاهان گوجه‌فرنگی با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار BABA و آب مقطر سترون به عنوان شاهد تیمار شدند، سپس با جمعیت 1×10^8 سلول باکتری در هر میلی لیتر مایه‌زنی شدند. نتایج آزمایشات در فواصل زمانی مختلف نشان داد که پیش‌تیمار BABA، جمعیت باکتری و شدت بروز علائم در گیاهان مایه‌زنی شده را بطور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش داد، افزون بر این ظهور دیرتر علائم بیماری بیانگر دوره کمون طولانی‌تر در گیاهان تیمار شده توسط BABA است. همچنین افزایش قابل توجه بیان ژن‌های *PR1* و کاتالاز در گیاهان تیمار شده مشاهده شد. بر اساس نتایج ما و با توجه به عدم وجود راه‌حل مدیریتی مناسب علیه این بیماری، توصیه‌ی به کارگیری BABA به عنوان یک عامل سازگار با محیط زیست، سهم ارزشمندی در مدیریت این بیماری خواهد داشت.

کلیدواژه: بتا-آمینوبوتریک اسید، *PR1*، کاتالاز، *Clavibacter michiganensis*، گوجه‌فرنگی.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtaghavi@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار و استاد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

Induction of resistance in tomato by β -aminobutyric acid against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Ta18 strain isolated from Iran

M. Ansari, S.M. Taghavi*, H. Hamzehzarghani, A. Afsharifar¹

(Received: 15.2.2019; Accepted: 28.5.2019)

Abstract

Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is an economically important disease of tomato. In this study after isolation and characterization of the pathogen, effects of tomato pre-treatment with DL- β -aminobutyric acid (BABA) on bacterial canker was investigated under laboratory conditions. BABA is known as a powerful chemical resistance inducer in plants against diverse pathogens. In this study, tomato plants were treated with a 0.2 mM concentration of BABA and distilled water served as control. The plants were subsequently challenged with a 1×10^8 CFU ml⁻¹ bacterial suspension. The results of experiments in different time intervals showed that BABA pre-treatment resulted in a significant reduction of bacterial population and symptoms severity of inoculated plants as compared to their controls. Furthermore, late appearance of disease symptoms indicated longer incubation periods for BABA treated plants. Also, a significant increase was observed in the expression of *PR1* and catalase genes in treated plants. Based on our results and regarding the lack of proper management options against the disease, application of BABA as an environmentally safe agent is recommended as a valuable contribution to disease management.

Keywords: β -aminobutyric acid, Catalase, *Clavibacter michiganensis*, *PR1*, Tomato

*Corresponding author's E-mail: mtaghavi@shirazu.ac.ir

1. Ph.D. Student, Prof., Associate Prof. and Prof. of Plant Pathol., respectively, School of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

مقدمه

شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی با عامل (*Cmm*) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی گوجه‌فرنگی در بیشتر مناطق دنیا محسوب می‌شود (Gleason et al. 1993, Eichenlaub & Gartemann 2011) این بیماری اولین بار در ایالت میشیگان آمریکا توسط اسمیت مشاهده و گزارش شد (Smith 1910). در ایران، اولین نشانه‌های بیماری در سال ۱۳۶۷ از منطقه ارومیه در استان آذربایجان غربی مشاهده شد و این مشاهدات در سال ۱۳۷۳ توسط مزارعی به ثبت رسید (Mazarei et al. 1993). در سال‌های بعد این بیماری از استان گلستان و آذربایجان غربی گزارش شد (Nazari et al. 2007). سپس در سال ۲۰۱۸ مطالعات بیماری‌زایی و فیلوژنی توسط اسداغی و همکاران روی جدایه‌های *Cm* انجام شد (Osdaghi et al. 2018). این باکتری بعد از ورود به آوندها سبب علائم شانکر و پژمردگی می‌شود (Fatmi & Schaad 2002, Burokiene et al. 2005, De Leon et al. 2011, EFSA 2014, Sen et al. 2015). گیاهان نیز با پاسخ‌های دفاعی مختلف در مقابل حمله بیمارگرها از خود مقاومت نشان می‌دهند. تاکنون انواع مختلفی از مقاومت گیاهان علیه بیمارگرهای گیاهی شناخته شده است که می‌توان به مقاومت غیرمیزبانی، مقاومت وابسته به ژن‌های مقاومت (*R*-genes) و مقاومت ذاتی گیاه اشاره کرد. در مقاومت ذاتی، بعضی هورمون‌های گیاهی مانند اتیلن (*Ethylene*, *ET*)، جاسمونیک اسید (*Jasmonic acid*, *JA*)، سالیسیلیک اسید (*Salicylic acid*, *SA*) و آبسزیک اسید (*Abscisic acid*, *ABA*) نقش اساسی دارند (Glazebrook 2005, Ton et al. 2009, Baccelli & Mauch-Mani 2016, Lee et al. 2017). بخشی از مقاومت ذاتی که در گیاه سالم

فعال نیست، مقاومت القایی (*Induced resistance*, *IR*) است. مقاومت القایی به وسیله‌ی عوامل زنده یا غیرزنده در گیاه فعال می‌شود. از انواع مهم مقاومت القایی، مقاومت سیستمیک اکتسابی (*Systemic acquired resistance*, *SAR*)، مقاومت القایی سیستمیک (*Induced systemic resistance*, *ISR*) و مقاومت القایی در اثر β -BABA (*amino butyric acid-induced resistance*, *BABA IR*) می‌باشد (Walteres & Fountaine 2009, Buonauro et al. 2009). مقاومت سیستمیک اکتسابی به دنبال یک آلودگی قبلی موضعی با یک بیمارگر نکروزه‌کننده یا از طریق تیمار با عوامل شیمیایی مانند سالیسیلیک اسید و بعضی آنالوگ‌های مصنوعی آن مانند *Acibenzolar-S-methyl* (*ASM*) ایجاد می‌شود (Ryals et al. 1996, Walteres & Fountaine. 2009). القاء *SAR* با افزایش موضعی و سیستمیک *SA* همراه است. همچنین بیان گروهی از ژن‌های مرتبط با بیماریزایی (*-Pathogenesis related genes*, *PRs*) از جمله *PR1*، *PR2* و *PR5* همراه با پاسخ‌های دفاعی وابسته به *SA* دیده شده است (Lawton et al. 1996, Ryals et al. 1996, Van loon et al. 1997, Kuc. 2001, Mauch-Mani & Mauch 2005). باکتری‌ها یا قارچ‌های غیر بیمارگر افزایش دهنده‌ی رشد گیاهان در محیط ریشه، توانایی ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه را دارند و باعث ایجاد و انتقال سیگنالی در گیاه می‌شوند که منجر به ظهور مقاومتی به نام *ISR* می‌شود. در این نوع مقاومت سیگنال‌های اصلی *ET* و *JA* می‌باشند. (Pieterse & Van loon 1999, Wang et al. 2009). بتا آمینوبوتیریک اسید (β -amino butyric acid, *BABA*) یک آمینواسید غیرپروتئینی مصنوعی (*synthetic*) و فاقد سمیت مستقیم روی بیمارگر می‌باشد. در مطالعات زیادی تاثیر مثبت *BABA* علیه تنش‌های زنده و غیرزنده مشخص

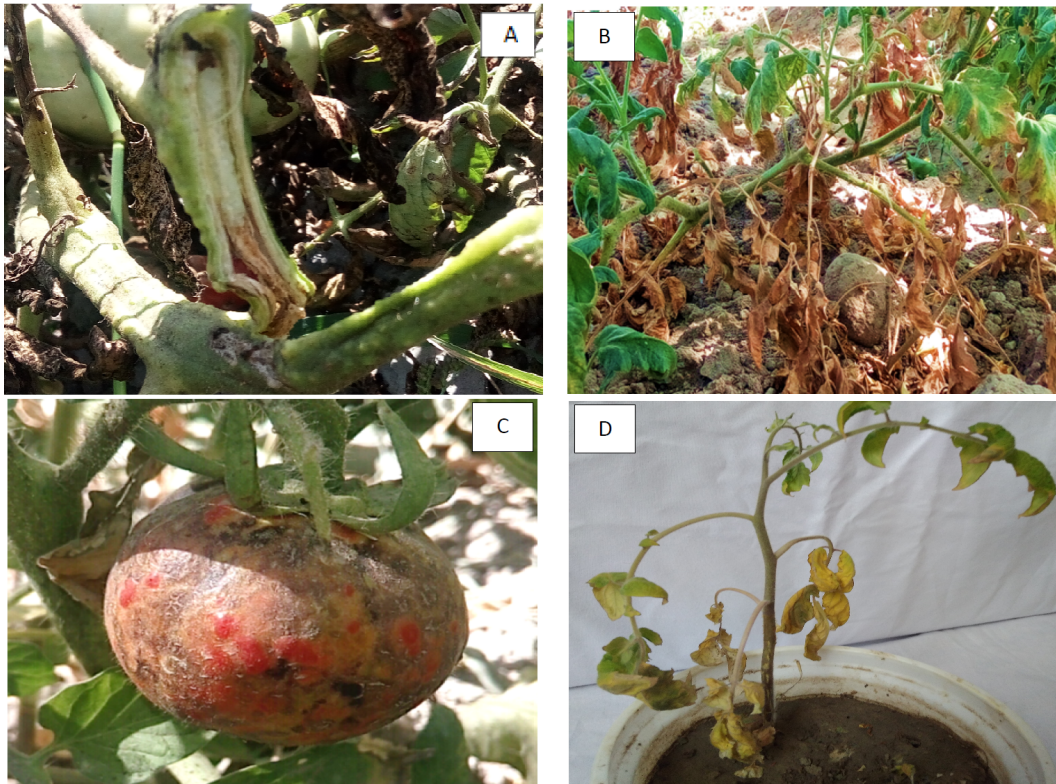
حفاظت از خود در برابر اثرات سمی و مخرب اتم‌های اکسیژن فعال تولید می‌نمایند (Mittler et al. 2004). افزایش تجمع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در پی بکارگیری BABA در برابر عوامل بیماریزا در تحقیقات پیشین به اثبات رسیده است (Sahebani & Hadavi 2009, Hossain et al. 2012). گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تیمار شده به وسیله BABA و (ASM) Acibenzolar-S-methyl پس از آلودگی با *Cmm* افزایش بیان آنزیم‌های دفاعی کیتیناز و پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) را نشان دادند (Baysal et al. 2003, 2005). تحقیقات زیادی در مورد کاربرد مؤثر BABA در افزایش مقاومت گیاهان علیه عوامل بیمارگر گیاهی انجام شده است و سازوکارهای ایجاد مقاومت بیشتر در سطح پروتئین (تغییرات آنزیم‌های دفاعی گیاه) بررسی شده است. بنابراین در این پژوهش اثرات محلول‌پاشی BABA بر فعالیت باکتری *Cmm* در گیاه گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت و واکاوی سطح بیان ژن‌های *PR1* و کاتالاز در فرآیند بیماری‌زایی و مقاومت بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه و شرایط کشت در گلخانه

بذرهای گوجه‌فرنگی رقم Sunseed 6189 پس از ضدعفونی با محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم به مدت یک دقیقه و شستشو با آب مقطر سترون در گلدان‌های پلاستیکی حاوی ترکیب پرلیت، خاک و ماسه به نسبت حجمی ۱:۱:۱ که از قبل، دو مرتبه و با فاصله‌ی یک روز اتوکلاو شده بود، کشت گردیدند و در شرایط گلخانه با دمای 28 ± 2 درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. Sigma BABA

شده است (Jakab et al. 2005, Ton et al. 2005, Slaughter et al. 2008, Zimmerli et al. 2000, 2001, 2008). BABA باعث افزایش استعداد (Priming) پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شود، بدین معنی که پاسخ‌های دفاعی در گیاهان القا شده، بعد از حمله‌ی بیمارگر یا تحت تنش به صورت سریعتر و به میزان زیادتر بیان می‌شوند در این فرآیند مسیرهای انتقال سیگنال وابسته به هورمون‌های ABA و SA نقش اصلی را ایفاء می‌کنند (Flors et al. 2008, Conrath et al. 2015, Baccelli & Mauch-Mani 2016). مطالعاتی در مورد سازوکار القاء مقاومت بواسطه BABA در گیاه آراییدوپسیس انجام شده است که نشان می‌دهد، محلول‌پاشی BABA موجب افزایش مقاومت گیاه علیه *Botryth cinerea* و *Pseudomonas syringae* pv *tomato* شده است و مقاومت به وجود آمده با افزایش ترانویسی ژن *PR1* (تحریک شده توسط SA) همبستگی دارد. بنابراین BABA از طریق پرایمینگ پاسخ‌های دفاعی وابسته به SA سبب ایجاد مقاومت علیه این دو بیمارگر می‌گردد. در حالیکه مقاومت القایی علیه سفیدک پودری (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) و لکه موی *Alternaria brassicicola* در آراییدوپسیس به شکل‌گیری سریعتر و قوی‌تر پاییل‌های مملو از کالوز در اطراف هیف در حال رشد بستگی دارد که مسیرهای سیگنالی ABA باعث افزایش ایجاد کالوز در گیاه می‌شوند (Zimmerli et al. 2001, Chavan and Kamble 2014, Luna et al. 2014). افزایش تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی مانند کیتیناز، پراکسیداز و کاتالاز، به دنبال حمله بیمارگر سبب افزایش بیشتر مقاومت گیاه خواهد شد (Tuzun et al. 1989). همچنین مشخص شده است که اتم‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species, ROS) در برابر حمله بیمارگر در گیاهان تولید می‌شوند. در مقابل گیاهان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نظیر کاتالاز (CAT) را برای



شکل ۱. علائم متداول بیماری شانکر باکتریایی در مزرعه (A, B, C) و در گلخانه (D). A: تغییر رنگ آوندها (شانکر ساقه)، B: نکروز برگ‌ها و مرگ گیاه گوجه‌فرنگی، C: لکه‌های تیره روی میوه، D: پژمردگی، کلروز و نکروز.

Fig 1. Common symptoms of bacterial canker disease, in the field (A,B, C) and greenhouse (D). A: Vessel discoloration (stem canker) B: leaf necrosis and dead tomato plant, C: dark lesions on fruit, D: Wilting, chlorosis and necrosis

subsp. *michiganensis* جدایه Ta18 استفاده گردید. برای جداسازی این باکتری در تابستان سال ۱۳۹۶ از مزارع گوجه‌فرنگی شهرستان تبریز (منطقه خسرو شهر) نمونه برداری بر اساس علائم پژمردگی، نکروز برگ‌ها، تغییر رنگ آوندها و لکه‌های روی میوه انجام شد (شکل ۱، A, B, C). نمونه‌های مشکوک پس از انتقال به آزمایشگاه توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی و بعد با آب مقطر سترون شسته شدند، بافت‌ها به قطعات کوچک تقسیم و در آب مقطر سترون گذاشته شد. سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت Yeast extract Peptone Glucose Agar (YPGA) کشت داده شد (EPPO, 2016)، تشک‌های کشت شده در دمای ۲۷-۲۹

Aldrich, 541-48-0) در غلظت ۲۰۰ میکرومولار روی برگ‌های گیاهان شش هفته‌ای محلول‌پاشی شد و از آب مقطر سترون هم به عنوان شاهد استفاده گردید (Safaie farahani & Taghavi 2017). ۲۴ ساعت پس از تیمار گیاهان به وسیله BABA، مایه‌زنی گیاهان با باکتری انجام شد هر تیمار دارای ۱۵ تکرار در هر بار انجام آزمایش بود و آزمایش دو مرتبه تکرار شد.

تهیه‌ی باکتری

نمونه برداری، جداسازی و شناسایی فنوتیپی و مولکولی باکتری مورد استفاده

نمونه برداری و جداسازی

در انجام آزمایشات از گونه‌ی *C. michiganensis*

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Primer sequences used in this study.

Target gene	Primer sequence 5'→3'	Size of amplicon(bp)	Reference
CMR16F1	GTGATGTCAGAGCTTCCTCTGGCGGAT	1425	Lee <i>et al.</i> 1997
CMR16R1	GTACGGCTACCTTGTTACGACTTAGT		
PSA-4	TCATTGGTCAATTCTGTCTCCC	271	Pastrik & Rainey, 1999
PSA-R	TACTGAGATGTTTCACTTCCCC		
2F	ACCGTCGAGTTCGACTACGA	550	Richert <i>et al.</i> 2005
4R	CCTCGGTGTTGCCSARCTT		
PR1-F	GGATCGGACAACGTCCTTAC	193	Molinari <i>et al.</i> 2014
PR1-R	GCAACATCAAAAGGGAAATAAT		
CAT-F	TGGAAGCCAACCTTGTTGGTGT	233	Zhang <i>et al.</i> 2015
CAT-R	ACTGGGATCAACGGCAAGAG		
β-tubulin	AACCTCCATTCAGGAGATGTTT	180	Aime <i>et al.</i> 2013
β-tubulin	TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT		

Zealand, <http://www.landcareresearch.co.nz/resources/collections/icmp> استفاده شد.

شناسایی مولکولی باکتری

برای تأیید نهایی، جدایه مورد نظر توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای عمومی جنس کلاوی باکتر (CMR16F1/CMR16R1) و اختصاصی زیرگونه *Cmm* (PSA-4/PSA-R) بررسی شد و نتایج PCR روی ژل آگاروز یک درصد در بافر TBE 1X ارزیابی شد. همچنین برای اطمینان از تشخیص، توالی یابی ژن *gyr B* در جدایه مورد نظر با جفت آغازگر 2F/4R انجام شد (ژن *gyr B* از مهم‌ترین ژن‌ها برای تفکیک و شناسایی زیرگونه‌های کلاوی باکتر می‌باشد) و قطعه تکثیر شده در واکنش PCR به شرکت Bioneer کشور کره جنوبی ارسال گردید و از یک جهت مستقیم با استفاده از آغازگر مربوطه (2F)، توالی یابی گردید. توالی مورد نظر پس از ارائه به بانک ژن، شماره دسترسی (Accession number) آن اخذ گردید. نام و توالی آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است. استخراج DNA به روش مالوی (Maloy, 1990) و واکنش PCR به روش

درجه سانتی‌گراد گذاشته شد، بعد از ۴۸ ساعت و ظهور پرگنه‌ها، پرگنه‌های تک انتخاب و دوباره روی محیط کشت YPGA کشت داده شد، تا از خلوص پرگنه‌ها اطمینان حاصل شود، سپس پرگنه‌های خالص به محیط کشت Yeast Dextrose Calcium carbonate (YDC) منتقل شد و پرگنه‌های زرد شفاف و لعابی (گرم مثبت) به عنوان پرگنه‌های مشکوک برای شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی انتخاب شدند (EPPO, 2016) و برای نگه داری، سوسپانسیون‌های باکتری در آب مقطر سترون داخل ویال سترون به یخچال بادمای ۴°C منتقل شدند.

شناسایی باکتری براساس آزمون‌های بیوشیمیایی

آزمون‌های بیوشیمیایی مانند آزمون گرم، رشد هوازی و بی‌هوازی (O/F)، اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز آسکولین و آزمون پروتئاز، به روش شاد و همکاران (Schaad *et al.* 2001) و آزمون سلولاز به روش ایم و همکاران (Yim *et al.* 2012) انجام شد. در تمام آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی از جدایه استاندارد (ICMP-2550) تهیه شده از کلکسیون بین‌المللی میکروارگانیسم‌های گیاهی از کشور نیوزیلند به عنوان کنترل مثبت (ICMP, Auckland, New

مطالعه قبلی توسط انصاری و همکاران انجام شد (Ansari et al. 2019).

اثبات بیماری زایی

اثبات بیماری‌زایی جدایه مورد نظر روی گیاهان گوجه‌فرنگی به روش اسداغی و همکاران انجام شد. (Osdaghi et al. 2018).

کشت باکتری، تهیه مایه تلقیح و روش مایه‌زنی

در انجام آزمایشات از گونه‌ی *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* جدایه Ta18 استفاده گردید جدایه مورد نظر روی محیط کشت YPGA کشت شد و تست‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند، ۴۸ ساعت پس از رشد باکتری روی محیط کشت YPGA، سوسپانسیون آبی با غلظت $(1 \times 10^8 \text{ CFU/ml})$ تهیه شد، مایه‌زنی با استفاده از یک سوزن تشریح حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری در قسمت ساقه (گره دو برگ اولیه) انجام شد.

بررسی میزان مقاومت القا شده علیه Cmm

۱- بررسی جمعیت باکتری

جمعیت باکتری در قسمت‌های هوایی گیاهان در تیمارهای BABA/Cmm و Cmm/آب در ۲، ۶، ۱۲ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. بدین صورت که سه نمونه از ناحیه مایه‌زنی شده و کمی بالاتر از آن از هر گیاه و در هر بازه‌ی زمانی جدا و کاملاً له شد و از عصاره‌ی یکنواخت آن سری رقت (ده مرتبه) تهیه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی محیط YPGA کشت شد. پرگنه‌های باکتری چهار روز بعد از کشت شمارش گردید. و جمعیت باکتری به ازای هر گرم بافت برگ (CFU/g)

مطابق روش توسینت تعیین گردید (Toussaint 2012).

۲- بررسی علائم

علائم بیماری و سطح مقاومت ایجاد شده در گیاهان پیش تیمار شده توسط BABA و آب (تیمارها BABA/Cmm و Cmm/آب) و مایه‌زنی شده با Cmm در ۲، ۶، ۱۲ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی (dpi) با استفاده از مقیاس عددی ۰-۵ ثبت گردید. در این مقیاس صفر برابر با عدم وجود علائم پژمردگی در برگ، ۱ شامل اندکی پژمردگی (۱-۱۰ درصد برگ‌ها داری پژمردگی)، ۲ شامل ۱۱-۲۵ درصد پژمردگی، ۳ شامل پژمردگی ناحیه‌ای که در آن ۲۶-۴۹ درصد برگ‌ها پژمردگی همراه با کلروز داشتند، ۴ شامل واژگونی قابل توجه برگ‌ها و در آن ۵۰-۷۴ درصد از برگ‌ها پژمردگی داشتند و مقیاس ۵ شامل پژمردگی کامل برگ‌ها بود. میانگین شاخص شدت بیماری (Shternshis et al. 2002) برای هر یک از تیمارها مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{شاخص بیماری} = \frac{\sum_{i=1}^r S_i n_i}{NK}$$

در این فرمول n_i برابر با تعداد برگ‌های با درجه بیماری مشخص است، S_i برابر با درجه بیماری برگ‌هاست (تفاوت‌ها در مقیاس بین صفر تا پنج می‌باشد)، r شماره برگ گیاه ارزیابی شده در هر گلدان، N تعداد کل برگ‌های شمرده شده در هر گیاه است و K برابر با بیشترین مقدار شدت بیماری (که در این آزمون برابر با ۵ می‌باشد) است. برای هر تیمار از پنج گیاه و از هر گیاه سه برگ مورد آزمایش قرار گرفت. و این آزمون ۳ مرتبه تکرار گردید. برداشت بافت برای بررسی بیان ژن‌های دفاعی در سه زمان صفر و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی انجام شد. نمونه‌های برداشت شده در ازت مایع قرار گرفتند و

واسرشت‌سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در دمای 95°C ، سپس 40°C چرخه دمایی، در مرحله واسرشت یک دقیقه در 95°C ، اتصال ۲ دقیقه در 58°C و مرحله گسترش، ۱ دقیقه در 72°C و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 72°C انجام گرفت.

ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده

برای اطمینان از تولید قطعه اختصاصی و عدم وجود باندهای غیراختصاصی و ساختارهای ثانویه در محصولات Real-time PCR منحنی ذوب (Melting Curve) رسم شد. ترسیم منحنی ذوب پس از اتمام واکنش با نرم افزار LineGene K (Bioneer) انجام شد.

بررسی کارایی Real-time PCR

ابتدا از یکی از نمونه‌ها به عنوان نمونه استاندارد سری رقت تهیه شد سپس با آغازگرهای ژن هدف (*PR1*) و ژن کنترل داخلی (بتاتوبولین) واکنش Real-time PCR انجام شد سپس C_t هر نمونه تکثیر شده با هر دو آغازگر محاسبه شد و با تفریق کردن C_t های ژن هدف از C_t های ژن کنترل داخلی، ΔC_t برای همه نمونه‌های استاندارد در هر رقت محاسبه شد. از آنجاییکه ΔC_t ها تقریباً با هم مساوی بوده بنابراین کارایی تکثیر در نمونه‌ها مشابه بوده و روند مشابهی از تکثیر رخ داده است یعنی این که راندمان هر دو آغازگر در PCR با هم مساوی است بنابراین برای محاسبه بیان نسبی ژن از فرمول دلتا دلتا سی تی ($\Delta\Delta C_t$) استفاده شد.

واکاوی داده‌های آزمون Real-Time PCR

واکاوی داده‌های حاصل از ۴ تکرار هر تیمار به روش کمی‌سنجی نسبی و بر اساس مقایسه چرخه آستانه (Cycle

در فریزر با دمای -80°C درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در نهایت سطح بیان سه ژن *PR1*، کاتالاز و بتاتوبولین مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج RNA، سنتز cDNA و Quantitative real-time PCR

استخراج RNA از بافت برگ با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت دنازیست و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (DENAzist, Iran). پس از آن برای حذف DNA ژنومی، نمونه‌های RNA استخراج شده، با DNase I تیمار شدند، واکنش تیمار DNase I با کیت شرکت فرمتار و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و کمیت RNA در هر نمونه به وسیله‌ی نانودراپ (Nanodrop, Wilmington, DE, U.S.A.) مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت نمونه‌های RNA نیز در ژل آگاروز یک درصد بررسی شد. سپس سنتز رشته cDNA از طریق کیت تجاری (Fermentas Lithuania) و دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. آزمون Real-time PCR با استفاده از دستگاه Bioneer مدل ExicyclerTM ساخت کشور کره جنوبی و با استفاده از کیت RealQ PCR 2× Master Mix (Ampliqon, Denmark) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. مخلوط واکنش Real-time PCR شامل ۲۰ میکرولیتر و حاوی ۵ میکرولیتر از cDNA (۱۰۰ نانوگرم)، ۴ میکرولیتر آب مقطر تزریقی، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس SYBR Green (Ampliqon, Denmark)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر روبه جلو (۱۰ میکرومولار)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشتی (۱۰ میکرومولار) بود. توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *PR1*، کاتالاز و بتا توبولین (ژن کنترل داخلی) در جدول ۱ آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله

اطلاعات موجود در مورد این بیماری در کشور این اولین گزارش از وجود بیماری در منطقه خسرو شهر است. علائم شاخص بیماری شامل نکروز بین رگبرگ‌ها، پژمردگی، تغییر رنگ آوندها، مرگ گیاه و لکه های بافت مرده روی میوه در منطقه مشاهده شد (شکل ۱. A, B, C).

نتایج آزمون های فنوتیپی

جدایه مورد نظر گرم مثبت، اکسیداز و توین منفی، هوازی اجباری و قادر به هیدرولیز آسکولین بود و برای آزمون‌های کاتالاز، سلولاز و پروتئاز واکنش مثبت نشان داد. پرگنه‌های باکتری روی محیط YDC رنگ زرد و حالت لعابی نشان دادند. بر اساس آزمون‌های فنوتیپی باکتری مورد نظر به عنوان *Cmm* تشخیص داده شد.

شناسایی مولکولی باکتری

تکثیر قطعات 1425 bp (توسط جفت آغازگر CMR16F1/CMR16R1 و 271 bp (توسط جفت آغازگر PSA-4/PSA-R) و قطعه 550bp ژن *gyrB* (توسط جفت آغازگر 2F/4R) به صورت اختصاصی در جدایه مورد مطالعه (Ta18) و جدایه استاندارد (ICMP2550) به عنوان کنترل مثبت) تایید کرد که جدایه مورد مطالعه *Cmm* می‌باشد (شکل ۲) و برای صحت تشخیص، ژن *gyrB* آن توالی یابی شد جستجو با برنامه بلاست با استفاده از قطعه توالی یابی شده از ناحیه ژنی *gyrB* نشان داد که جدایه مورد مطالعه در این تحقیق با جدایه‌های *Cmm* موجود در بانک ژن تشابه ۹۹-۱۰۰ درصد دارد. جدایه مورد مطالعه در بانک ژن وارد و شماره دسترسی آن با شماره MK451959 اخذ گردید. بنابراین بر اساس روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی باکتری مورد استفاده برای مایه تلقیح همان باکتری *Cmm* می‌باشد.

Threshold, CT) انجام شد. بدین‌صورت که ابتدا CT هر نمونه برای ژن اصلی و کنترل داخلی با استفاده از نرم افزار Line Gene K (Bioneer) محاسبه شد. سپس سطح بیان نسبی ژن هدف نسبت به ژن کنترل داخلی، توسط معادله $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen 2001) محاسبه شد. برای بدست آوردن مقدار ΔCT هر نمونه، مقدار CT ژن هدف از مقدار CT ژن کنترل داخلی آن نمونه تفریق شد (ژن کنترل داخلی $CT - \text{ژن هدف} = \Delta CT$) و برای بدست آوردن $\Delta\Delta CT$ هر نمونه، مقدار ΔCT تیمار از مقدار ΔCT کنترل منفی تفریق شد (کنترل منفی $\Delta CT - \text{تیمار} = \Delta\Delta CT$). مقادیر حاصل از $2^{-\Delta\Delta CT}$ بیانگر fold change (چند برابری) برای هر نمونه می‌باشد. آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) برای تشخیص اختلاف آماری معنی‌دار مابین میانگین‌ها استفاده شد.

محاسبات آماری

آنالیز تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SAS انجام پذیرفت و میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2017 استفاده گردید.

نتایج

تهیه باکتری

برای تهیه باکتری ابتدا نمونه برداری از گیاهان آلوده به شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی از شهرستان تبریز منطقه خسرو شهر انجام شد. این بیماری قبلاً از استان آذربایجان غربی شهرستان مرند توسط اسداغی و همکاران شناسایی شده (Osdaghi et al. 2018) ولی بر اساس

CMR16F1/CMR16R1 استفاده شد که نتیجه مثبت واکنش وجود این باکتری را برای ایجاد علائم تایید کرد.

ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده در

واکنش Real-time PCR

تمام منحنی‌های ذوب رسم شده یک قله داشتند که نشان از عدم آلودگی و عدم وجود باندهای اضافی بود.

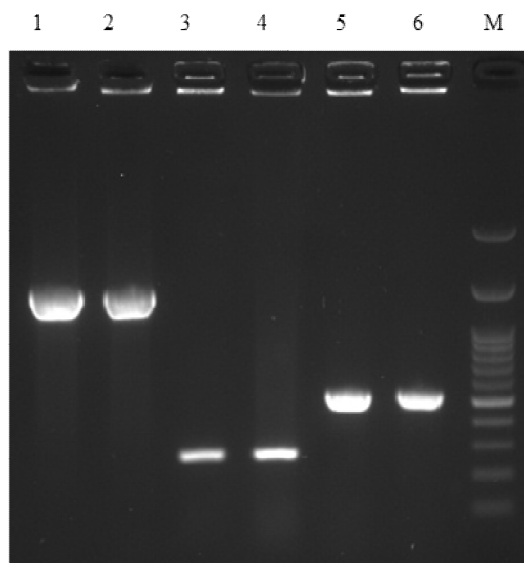
سطح بیان ژن‌های *PR1* و کاتالاز

نتایج Real-time PCR نشان داد که بیان هر دو ژن در گیاهان پیش تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارد. پیش تیمار گیاهان توسط BABA سبب افزایش بیان *PR1* در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی نسبت به گیاهان شاهد گردید (اعداد روی نمودار بیانگر بیان نسبی ژن‌ها (fold change) (چند برابری)) در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد می‌باشد). بیشترین سطح بیان *PR1* در ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی مشاهده شد و با گذشت زمان (۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی) میزان آن کاهش یافت (شکل ۳). همچنین بررسی سطح بیان ژن CAT در گیاهان تیمار شده توسط BABA در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی نسبت به سطح بیان این ژن در گیاهان شاهد افزایش نشان داد که بیشترین سطح بیان ژن CAT در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی مشاهده می‌گردد (شکل ۳).

تاثیر پیش‌تیمار BABA در کاهش شدت بیماری علیه

Cmm

شاخص شدت بیماری در چهار بازه‌ی زمانی در دو حالت پیش تیمار با BABA و شاهد بررسی گردید. علایم بیماری در هر دو حالت (شاهد و پیش تیمار) و در بازه‌ی های زمانی مختلف مورد بررسی قرار گرفت و امتیازدهی با

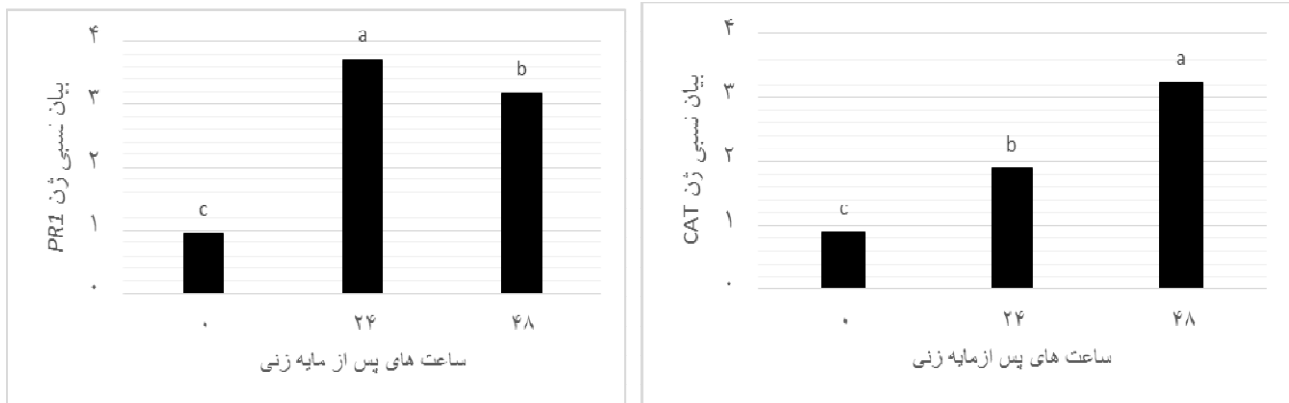


شکل ۲. نقوش الکتروفورزی محصول PCR در جدایه *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Ta18 باکتری جدا شده از ایران و جدایه کنترل مثبت *michiganensis* (ICMP2550) با جفت آغازگرهای: CMR16F1/CMR16R1 (راهک ۱: Ta18، راهک ۲: ICMP2550)، PSA-4/PSA-R (راهک ۳: Ta18، راهک ۴: ICMP2550)، 2F/4R (راهک ۵: Ta18، راهک ۶: ICMP2550)، M (مارکر، ۱۰۰bp).

Fig 2. Gel electrophoresis patterns of PCR products in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Ta18 strain isolated from Iran and positive control strain (ICMP2550) with primer pairs: CMR16F1/CMR16R1 (lane 1: Ta18, lane 2: ICMP2550), PSA-4/PSA-R (lane 3: Ta18, lane 4: ICMP2550), 2F/4R (lane 5: Ta18, lane 6: ICMP2550), M (Marker, 100 bp)

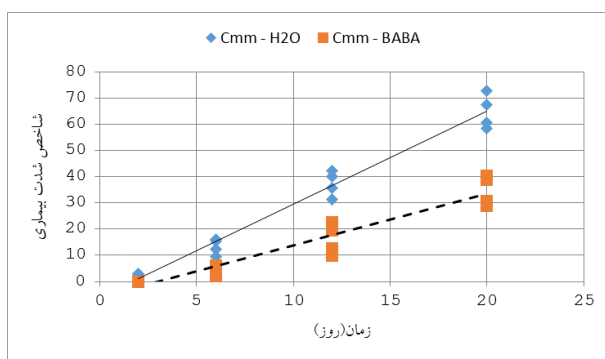
آزمون بیماری‌زایی

گیاهان گوجه‌فرنگی مایه زنی شده با سوسپانسیون باکتری در شرایط گلخانه در ابتدا علائم پژمردگی نشان دادند، با گذشت زمان و پیشرفت بیماری علائم کلروز و نکروز برگ‌ی مشاهده شد که در انتها به مرگ گیاه منتهی شد (شکل 1، D). به منظور اجرای اصول کخ، از گیاهان مایه‌زنی شده نمونه‌برداری شد و برگ‌های زرد و لعابی باکتری *Cmm* روی محیط YDC جداسازی شد و برای تایید نهایی پرگنه‌ی جدا شده از روش PCR با آغازگر



شکل ۳. بیان ژن‌های *PR1* و *CAT* در گیاهان گوجه‌فرنگی پیش تیمار شده توسط BABA در مقایسه با گیاهان شاهد تیمار شده با آب پس از آلودگی با جدایه Ta18 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. اختلاف معنی‌دار در سطح بیان *PR1* و *CAT* در گیاهان تیمار شده توسط BABA در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی دیده شد. میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک بر اساس مقایسه میانگین به روش چند دامنه‌ای دانکن هستند تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد ندارند.

Fig 3. Expression of *PR1* and *CAT* genes in tomato plants pretreated with BABA compared to the control after infection with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Ta18 strain. Significant difference was found in expression of *PR1* and *CAT* in BABA treated plants at 24 and 48 hour post inoculation (hpi). Means with the same letter are not significantly different at 1% level based on Duncan Multiple Range Test.



شکل ۴. پیشرفت شاخص شدت بیماری در گیاهان گوجه‌فرنگی القاء شده توسط BABA نسبت به گیاهان کنترل در ۲، ۶، ۱۲ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی با جدایه Ta18 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Fig 4. Progress of the disease severity on tomato plants induced by BABA compared to control plants at 2, 6, 12 and 20 days after inoculation with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Ta18 strain.

دیده نشد. علائم در گیاهان شاهد در روز دوم با پژمردگی خیلی پایین، روز ششم با شاخص عددی یک و دو، در

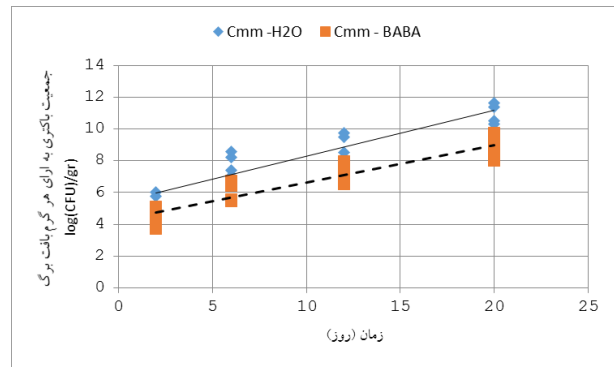
شاخص عددی انجام شد. محاسبه شاخص شدت بیماری نشان داد که پیش تیمار و محلول‌پاشی BABA روی گیاهان گوجه‌فرنگی در مقایسه با حالت کنترل تفاوت معنی‌داری داشته است و موجب کاهش چشمگیر شدت بیماری و ظهور علائم گردیده است (شکل ۴). شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با BABA در مقایسه با حالت کنترل، کاهش ۹، ۲۱ و ۳۰ درصدی را به ترتیب در ۶، ۱۲ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. (شکل ۴) روی گیاهان تیمار شده با BABA شدت اولیه بیماری ($p=0.0001$) و سرعت پیشرفت بیماری ($p=0.0000$) بطور معنی‌داری کمتر از مقادیر آن روی گیاهان تیمار شده با آب بود. همچنین پیش تیمار گیاهان گوجه‌فرنگی با BABA سبب به تعویق افتادن علائم بیماری گردید، در گیاهان تیمار شده با آب، علائم دو روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد در صورتی که در گیاهان پیش تیمار شده با BABA در این زمان علائمی

تأثیر محلول‌پاشی BABA در کاهش جمعیت باکتری

بررسی میزان رشد باکتری در گیاهان پیش تیمار شده توسط BABA نشان می‌دهد که میزان رشد باکتری در تمامی زمان‌ها، نسبت به گیاهان شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است (شکل ۵). نتایج مربوط به این آزمایش، با نتایج مربوط به تعیین شاخص شدت بیماری همبستگی دارد. دو روز پس از مایه‌زنی همزمان با افزایش سطح بیان ژن *PR1* و *CAT*، جمعیت بسیار کمتری از باکتری در گیاهان پیش تیمار شده توسط BABA نسبت به شاهد مشاهده شد. تجمع باکتری در بافت مایه‌زنی شده گیاهان پیش تیمار شده با BABA در دو روز پس از مایه‌زنی کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت و در نتیجه آن ظهور علائم در گیاهان تیمار شده با BABA به تعویق افتاد. جمعیت اولیه باکتری روی گیاهان تیمار شده با BABA (p=0.0001) بطور معنی‌داری کمتر از گیاهان تیمار شده با آب بود ولی سرعت پیشرفت جمعیت باکتری روی گیاهان تیمار شده با BABA و آب تفاوت معنی‌داری نداشت (p=0.0873). چون در گیاهان تیمار شده توسط BABA باکتری از بین نمی‌رود و با جمعیت کمتری در گیاه تکثیر می‌شود که این جمعیت پایین‌تر سبب کاهش شدت بیماری نسبت به گیاهان تیمار شده با آب می‌شود.

بحث

بیماری شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی با ماهیت بذرزاد خود قابلیت ورود و پراکنش به قسمت‌های مختلف کشور را دارا می‌باشد. مطالعات نظری و همکاران پراکنش این بیماری را در دو استان کشور مشخص کرد اما اسداغی و همکاران با نمونه‌برداری بیشتر و مطالعات مولکولی علاوه بر استان آذربایجان غربی و گلستان این بیماری را در



شکل ۵. تأثیر پیش تیمار BABA در میزان رشد جدایه Ta18 باکتری *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* در ۲، ۶، ۱۲ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی. جمعیت اولیه باکتری در گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با این ترکیب شیمیایی نسبت به گیاهان شاهد به‌طور معنی‌دار کاهش نشان می‌دهد.

Fig 5. Effect of BABA pretreatment on growth of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Ta18 strain at 2, 6, 12 and 20 days after inoculation. The initial bacterial population decreased significantly in tomato plants treated with this chemical compound compared to control plants.

روز دوازده با شاخص عددی دو و سه، و در روز بیستم با بالاترین شاخص عددی بیماری‌زایی (۴ و ۵) مشاهده گردید. علائم در گیاهان تیمار شده با BABA نیز در شش روز پس از مایه‌زنی، با شاخص عددی صفر و یک، روز دوازدهم با شاخص یک و دو و در روز بیستم با شاخص عددی ۱ تا ۳ مشاهده شد. بنابراین ۲۰ روز پس از مایه‌زنی گیاهان گوجه‌فرنگی پیش تیمار شده با BABA، تنها در کمتر از نیمی از گیاهان مایه‌زنی شده، پژمردگی ناحیه‌ای (۴۹٪-۱۱٪) مشاهده شد. این در حالی است که، ۲۰ روز پس از مایه‌زنی باکتری روی گیاهان کنترل، ۶۵ درصد بروز علائم در برگ‌های گیاهان گوجه‌فرنگی مشاهده شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که، سرعت پیشرفت بیماری در حالت کنترل تفاوت معنی‌داری با گیاهان تیمار شده با BABA داشته است.

BABA در هنگام حمله بیمارگرهای قارچی، باکتریایی و نماتدی در گذشته به اثبات رسیده است (Justyna & Ewa 2016, Baccelli & Mauch-Mani 2013). برای مثال در مطالعه‌ای ایجاد مقاومت به واسطه‌ی BABA سبب افزایش مقاومت آرابیدوپسیس نسبت به *P. syringae* pv. *tomato* از طریق افزایش سطح بیان *PR1* گردید (Zimmerli et al. 2000). همچنین در بررسی دیگری محلول‌پاشی BABA سبب ایجاد مقاومت علیه *Xanthomonas euvesicatoria* در گیاه فلفل به واسطه‌ی افزایش بیان ژن *PR1* شد (Safaie farahani & Taghavi 2017). در تحقیق دیگری که توسط کابل و بارگاوا انجام گرفت توانایی BABA را در ایجاد مقاومت خردل قهوه‌ای علیه *Alternaria brassicae* نشان داد، که این واکنش نیز در نتیجه‌ی افزایش بیان ژن *PR1* بود (Kamble & Bhargava 2007). در مطالعه‌ی دیگری زیمرلی و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که BABA سبب افزایش بیان ژن *PR1* طی مقاومت القایی در آرابیدوپسیس نسبت به *B. cinerea* می‌گردد. که در این مقاومت مسیرهای سیگنالی وابسته به SA نقش اصلی را ایفا می‌کنند به عبارت دیگر BABA علیه برخی بیمارگرها مسیرهای دفاعی مشابه SAR را در گیاه فعال می‌کند (Zimmerli et al. 2000, 2001). نقش مسیرهای دفاعی وابسته به SA در گیاهان سیب زمینی و تنباکو پس از تیمار به وسیله BABA برای ایجاد مقاومت نسبت به بادزدگی سیب زمینی و ویروس موزاییک تنباکو نیز ثابت شد (Baccelli & Mauch-Mani 2016) پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی، خانواده‌های بزرگ پروتئینی هستند که به طور معمول در گیاه بیان نمی‌شوند و یا میزان آن‌ها بسیار کم می‌باشد اما پس از تنش‌های زنده و غیر زنده و همچنین استفاده از القاگرهای شیمیایی از جمله SA، BABA، JA و ABA بیان می‌گردند (Buonaurio et al.

استان‌های آذربایجان شرقی، قزوین، زنجان و کهگیلویه و بویر احمد نیز گزارش کردند (Nazari et al. 2007, Osdaghi et al. 2018). در مطالعات بعدی توسط ما از منطقه خسرو شهر تبریز این بیماری ردیابی و با روش‌های فنوتیپی و مولکولی شناسایی شد با توجه به گسترش این بیماری در کشور، شناسایی و مبارزه با آن ضروری می‌باشد. امروزه بکارگیری سموم شیمیایی به عنوان متداول‌ترین شیوه کنترل بیماری‌های گیاهی مورد توجه است، اما با توجه به مضرات مختلف سموم شیمیایی، پژوهش در جهت یافتن ترکیبات جدید سازگار با محیط زیست که به آسانی قابل دسترسی باشند ضروری است. ترکیبات القاء کننده مقاومت مانند BABA که علاوه بر بی‌خطر بودن، سبب فعال کردن مکانیسم‌های دفاع طبیعی گیاه می‌شود علیه طیف وسیعی از بیمارگرها بکار گرفته شده‌اند. BABA به طور مستقیم پاسخ دفاعی گیاه را فعال نمی‌سازد بلکه گیاهان را مستعد می‌سازد تا پاسخ سریع‌تر و قوی‌تری به تنش‌های زنده و غیر زنده ایجاد کنند. این فرآیند تحت عنوان پرایمینگ شناخته می‌شود (Conrath et al. 2002, Conrath et al. 2006) در این مطالعه ما تأثیر پیش‌تیمار BABA علیه بیماری‌های شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی و فعال شدن ژن‌های *PR1* و *CAT* را مورد بررسی قرار دادیم. نتایج این پژوهش تأیید کرد که محلول‌پاشی BABA روی برگ‌های گوجه‌فرنگی سبب کاهش شاخص شدت بیماری نسبت به گیاهان شاهد (محلول‌پاشی با آب مقطر) گردید و با افزایش مقاومت در گیاهان تیمار شده به وسیله BABA اندازه جمعیت باکتری نسبت به شاهد در زمان‌های مختلف کاهش نشان داد. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که مقاومت ایجاد شده با افزایش بیان ژن‌های *PR1* و *CAT* همبستگی دارد. بیان برخی از ژن‌های مقاومت در گیاهان تیمار شده توسط

2009). تولید این پروتئین‌ها باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به بیمارگرها می‌شود. تحقیقات نشان داده که ژن‌های *PR* تنها مکانیسم ایجاد مقاومت بواسطه‌ی *BABA* نمی‌باشند. نتایج این تحقیق نشان داد که *BABA* سبب افزایش مقاومت گوجه‌فرنگی به *Cmm* می‌شود و در این فرآیند سطح بیان ژن‌های *PR1* و کاتالاز افزایش می‌یابد. در این مطالعه اوج بیان ژن *PR1* در ۲۴ ساعت و *CAT* در ۴۸ ساعت پس از مایه زنی مشاهده شد که افزایش و کاهش این ژن‌ها در بازه‌های زمانی متفاوت قابل بحث می‌باشد، چون پاسخ‌های دفاعی گیاه پیچیدگی‌های بسیار زیادی دارد و بدنال تنش در گیاه مسیرهای دفاعی مختلفی در گیاه فعال می‌شود که مقاومت و حساسیت نتیجه ارتباط (*Cross talk*) بین مسیرهای دفاعی گوناگون است (Glazebrook, 2005). در مراحل اولیه برهمکنش گیاه-بیمارگر بلافاصله پس از درک بیمارگر انفجار اکسیداتیو در گیاه ایجاد می‌شود با تولید اتم‌های فعال اکسیژن (*ROS*) مسیرهای گوناگون انتقال سیگنال دفاعی در گیاه فعال می‌شود که فعال شدن این مسیرها سبب تولید آنزیم‌هایی می‌شود، که در تقویت دیواره سلولی (تولید لیگنین و کالوز) و تولید متابولیت‌های ثانویه مانند فیتوالکسین‌ها نقش دارند (Flors et al. 2008, Buonauro et al, 2009, O'Brien et al. 2012). اتم‌های فعال اکسیژن سبب سنتز *SA* می‌شوند که بدنال افزایش *SA* در گیاه مسیرهای دفاعی وابسته به *SA* در گیاه فعال می‌شوند که بدنال آن گروهی از ژن‌های وابسته به بیماری زایی مانند *PR1* در گیاه فعال می‌شود. مطالعات مختلفی که در بالا ذکر شد نشان داده است که پیش تیمار گیاهان به وسیله *BABA* از طریق مسیرهای سیگنالی *SA* سبب افزایش بیان ژن *PR1* می‌شود که در مطالعه ما اوج بیان *PR1* در گیاهان تیمار شده ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی مشاهده شد. ولی در ۴۸ ساعت پس از مایه

زنی میزان بیان آن کمتر شد و در عوض افزایش بیان ژن کاتالاز مشاهده شد که افزایش بیان کاتالاز به دلیل فعال شدن سیستم آنتی اکسیدانی گیاه می‌باشد چون گیاهان برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو ایجاد شده و فرار از اثرات مخرب آن روی سلول‌های گیاه یک سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی با کارایی بالا دارند که مهم ترین آنزیم‌های آنتی اکسیدان شامل پراکسیداز، کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و پلی فنول اکسیدازها می باشند (Mittler 2002). که می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین برده یا خنثی نماید در مطالعه ما بیشترین میزان بیان *CAT* در گیاهان تیمار شده ۴۸ ساعت پس از مایه زنی مشاهده شده که افزایش بیان *CAT* نشان دهنده فعال شدن سیستم دفاع آنتی اکسیدانی برای مقابله با *ROS* می‌باشد. در مطالعات مختلف میزان بیان آنزیم کاتالاز در مقاومت القایی *BABA* علیه بیمارگرها و تنش‌های خشکی و شوری بررسی شده است برای مثال در مطالعه‌ای که توسط حسن و ابوالیاسر (۲۰۱۳) در گیاهان سیب زمینی تیمار شده به وسیله *BABA* انجام شد. کاهش بیان آنزیم کاتالاز پس از حمله رالستونیا مشاهده شد و دلیل آن را افزایش میزان *SA* آزاد بدنال تنش‌های اکسیداتیو در گیاه ذکر کردند که نتایج آن‌ها در تقابل با نتایج ما می‌باشد (Hassan. & Abo-Elyousr. 2013). افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و گوایکول پراکسیداز) در گوجه‌فرنگی طی مقاومت القاء شده توسط *BABA* علیه *Meloidogyne javanica* ایجاد می‌گردد (Sahebani & Hadavi 2009). همچنین افزایش فعالیت آنزیم *CAT* در گوجه‌فرنگی پیش تیمار شده توسط *BABA* به دنبال حمله‌ی *P. syringae* *pv. tomato* و تنش خشکی گزارش گردیده است (Baysal et al. 2007). افزایش سطح بیان ژن *CAT* در گیاهان گوجه‌فرنگی و فلفل پیش تیمار شده

با *Xanthomonas citri* subsp *citri* کاهش اندازه لکه را نشان دادند (Sharifi Sirchi *et al.* 2011). مطالعات مختلف نقش مسیرهای دفاعی گوناگون را در مقاومت القایی BABA مشخص کرده است (Jakab *et al.* 2005, Cohen *et al.* 2010). افزون بر این بیان ژن‌های دفاعی طی مقاومت القایی ایجاد شده توسط BABA بستگی به گونه گیاه، نوع بیمارگر و هم‌کنش بین این دو دارد (Slaughter *et al.* 2012). تحقیقات اسلوتر و همکاران (۲۰۱۲) در گیاهان آرابیدوپسیس مشخص کرد افزایش پاسخ‌های دفاعی در نتاج گیاهان تیمار شده همچنان مشاهده می‌شود (Slaughter *et al.* 2012) بر اساس تحقیقات مختلف نقش وراثت نسبی (Transgenerational inheritance) و سازوکارهای اپی‌ژنتیک برای پرایمینگ پاسخ‌های دفاعی ثابت شده است (Luna *et al.* 2014, 2016). در مجموع می‌توان گفت نقش BABA در افزایش مقاومت القایی علیه *Cmm* در گیاه گوجه‌فرنگی در این تحقیق تأیید می‌گردد و کاهش شدت بیماری می‌تواند مرتبط با فعال شدن برخی ژن‌های دفاعی نظیر *PR1* و *CAT* باشد. بنابراین در دنیای امروز که بشر به دنبال روش‌های جدید مدیریت بیماری‌ها بدون عوارض زیست محیطی می‌باشد استفاده از ترکیباتی مانند BABA نوید بخش آینده‌ای روشن است.

توسط BABA مشاهده شد (Safaie Farahani *et al.* 2016, Safaie Farahani and Taghavi 2017) که نتایج ما تاییدی برای نتایج صفایی فراهانی و همکاران می‌باشد. اتم‌های فعال اکسیژن برای بیمارگر سمی بوده بنابراین تولید آن‌ها در ساعات اولیه پس از نفوذ بیمارگر سبب کاهش جمعیت بیمارگر می‌شوند که پیش تیمار BABA نیز از طریق پرایمینگ پاسخ‌های دفاعی ذکر شده سبب کاهش جمعیت بیمارگر نسبت به شاهد می‌شود. در مطالعه ما نیز افزایش پاسخ‌های دفاعی (افزایش بیان ژن‌های *PR1* و *CAT*) سبب کاهش جمعیت باکتری در گیاه شد. در مطالعات مختلف تأثیر پیش تیمار BABA روی کاهش جمعیت بیمارگرهای باکتریایی و نماتدی به اثبات رسیده است پیش تیمار گیاهان با BABA سبب کاهش رشد *Ralstonia solanacearum* و *Cmm* شد که دلیل این کاهش جمعیت، افزایش میزان پراکسید هیدروژن و فعالیت ضد میکروبی آن ذکر شد (Baysal *et al.* 2005, Hassan. 2013, Abo-Elyousr. 2013). محلول پاشی برگ‌گی BABA به غلظت ۰/۵ میلی‌مولار روی گیاه گوجه‌فرنگی، سبب کاهش ۶۰ درصدی فاکتور تولید مثل نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* بعد از گذشت ۳۰ روز از مایه‌زنی نماتد گردید (Charehgani *et al.* 2014). برگ‌های تیمار شده بوسیله BAAB پس از آلودگی

منابع

- Aime S., Alabouvette C., Steinberg C. and Olivain, C. 2013. The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 26:918-926.
- Ansari M., Taghavi S. M., Zarei S., Miri K., Portier P. and Osdaghi E. 2019. Pathogenicity and molecular phylogenetic analysis reveal a distinct position of the banana fingertip rot pathogen among the *Burkholderia cenocepacia* genomovars. *Plant Pathology*. 68:804-815.
- Bacelli I. and Mauch-Mani B. 2016. Beta-aminobutyric acid priming of plant defense: the role of ABA and other hormones. *Plant Molecular Biology*. 91:703-711.
- Baysal O., Gursoy Y. Z., Ornek H., Cetinel B. and Da Silva J. 2007. Enhanced systemic resistance to bacterial speck disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by DL-b-aminobutyric acid under salt stress. *Plant*

- Physiology. 129:493–506.
- Baysal O., Gursay Y., Ornek H. and Duru A. 2005. Induction of oxidants in tomato leaves treated with DL-beta-amino butyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. European Journal of Plant Pathology. 112:361-369.
- Baysal O., Soylu M. E. and Soylu S. 2003. Induction of defense related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Plant Pathology. 52:747–753.
- Buonaurio R., Iriti M. and Romanazzi G. 2009. Induced resistance to plant diseases caused by Oomycetes and Fungi. *Petria*. 19:130-148.
- Burokiene D., Sobiczewski P. and Berczynski S. 2005. Phenotypic characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from Lithuania. *Phytopathologia*. 38:63–77.
- Charehgani H., Karegar A. and Djavaheeri M. 2014. Comparison of DL- B-amino-N-butyric acid, salicylic acid and abscisic acid in induction of resistance in tomato infected by *Meloidogyne Incognita*. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 504:161-163.
- Chavan V. and Kamble A. 2014. Induction of total phenolics and defence-related enzymes during β -aminobutyric acid-induced resistance in *Brassica carinata* against *Alternaria* blight. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 47:2200–2212.
- Cohen Y., Rubin A. E. and Kilfin G. 2010. Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL-b-aminobutyric acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology*. 126:553–573.
- Conrath U., Beckers G. J. M., Langenbach C. J. G., and Jaskiewicz M. R. 2015. Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology*. 53:97–119
- Conrath U., Beckers G. J. and Flors V. 2006: Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 19:1062-1071.
- Conrath U., Pieterse C. M. and Mauch-Mani B. 2002: Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Science*. 7:210-216.
- De León L., Siverio F., López M., and Rodríguez A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seed borne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Disease*. 95:1328–1338.
- Eichenlaub R. and Gartemann K. H. 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of Gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 49:445–464.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health). 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith). *EFSA Journal*. 47-77.
- EPPO. 2016. PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPPO Bulletin* 46:202–225.
- Fatmi M. and Schaad N. W. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology*. 51:149–154.
- Flors V., Ton J., Van Doorn R., Jakab G., García-Agustín P. and Mauch-Mani B. 2008. Interplay between JA, SA and ABA signaling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant Journal*. 54:81–92.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43:205–227.
- Gleason M., Gitaitis R. and Ricker M. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Disease*. 77:1069–1076.
- Hassan M. A. E. and Abo-Elyousr K. A. M. 2013. Activation of tomato plant defence responses against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* using DL-3-aminobutyric acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology*. 136:145–157.
- Hossain Z., Makino T. and Komatsu S. 2012. Proteomic study of β -aminobutyric acid-mediated cadmium stress alleviation in soybean *Journal of Proteome*. 75:4151–4164.
- Jakab G., Ton J., Flors V., Zimmerli L., Métraux J. P. and Mauch-Mani B. 2005. Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiology*. 139:264–174.
- Justyna P. G. and Ewa K. 2013. Induction of resistance against pathogens by β -aminobutyric acid. *Acta physiologiae plantarum*. 35:1735–1748.
- Kamble A. and Bhargava S. 2007. β -aminobutyric acid-induced resistance in *Brassica juncea* against the

- necrotrophic pathogen *Alternaria brassicae* Journal of Phytopathology. 155:152–158.
- Kuc J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European Journal of Plant Pathology. 107:7-12.
- Lawton K. A.; Friedrich L.; Hunt M.; Weymann K.; Delaney T.; Kessmann H.; Staub T. and Ryals J. 1996. Benzoethiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant journal. 10:71-82.
- Lee I. M., Bartoszyk I. M., Gundersen D. E., Mogen B. and Davis R. E. 1997. Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Applied and Environmental Microbiology. 63:2625–2630.
- Lee H. A., Lee H.Y., Seo E., Lee J., Kim S. B., Oh S., Choi E., Choi E., Lee S. E. and Choi D. 2017. Current Understandings of Plant Non-host Resistance. Molecular Plant Microbe Interaction. 30:5–15.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 25:402–408.
- Luna E., Beardon E., Ravnskov S., Scholes J. and Ton J. 2016. Optimizing chemically induced resistance in tomato against *Botrytis cinerea*. Plant Disease. 100:704–710.
- Luna E., Van Hulten M., Zhang Y. H., Berkowitz O., Lopez A., Petriacq P., Sellwood M. A., Chen B., Burrell M., Van de Meene A., Pieterse C. M., Flors V. and Ton J. 2014. Plant perception of β -aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase. Nature Chemical Biology. 10:450–456.
- Maloy S. 1990. Jones and Bartlet Publishers, pp. 180. Experimental Techniques in Bacterial Genetics. Boston, MA, USA.
- Mauch-Mani B. and Mauch F. 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. Current Opinion in Plant Biology. 8:409-14.
- Mazarei M., Orumchi S. and Lora C. 1993. Investigation of bacterial canker of tomato in West Azarbaijan, Iran. Proceedings of the 11th Plant Protection Congress of Iran. pp 160.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. and Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Science. 9:490–498.
- Molinari S., Fanelli E. and Leonetti P. 2014. Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in Mi-1-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. Molecular Plant Pathology. 15:255–264.
- Nazari F., Niknam G. R., Ghasemi A., Taghavi S. M., Momeni H. and Torabi S. 2007. An investigation on strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in North and NorthWest of Iran. Journal of Phytopathology. 155:563-569.
- O'Brien J. A., Daudi A., Finch P., Butt V. S., Whitelegge J. P., Souda P., Ausubel F. M. and Bolwell G. P. 2012. A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. Plant Physiology. 158:2013–2027.
- Osdaghi E., Ansari M., Taghavi S. M., Zarei S., Koebnik R. and Lamichhane J. R. 2018. Pathogenicity and phylogenetic analysis of *Clavibacter michiganensis* strains associated with tomato plants in Iran. Plant pathology. 674:957-970.
- Pastrik K. H. and Rainey F. A. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reactionbased techniques. Journal of Phytopathology. 147:687–693.
- Pieterse C. M. J. and Van Loon, L. C. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. Plant Science. 4:52-58.
- Richert K., Brambilla E. and Stackebrandt E. 2005. Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of gyrB genes from microbacteria, order Actinomycetales. Journal of Microbiological Methods. 60:115–123.
- Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H. Y. and Hunt M. D. 1996. Systemic acquired resistance. Plant Cell. 8:1809–1819.
- Safaie Farahani A. and Taghavi S. M. 2017. Induction of resistance in pepper against *Xanthomonas euvesicatoria* by β -aminobutyric acid. Australas. Plant Disease Notes. 12:1.
- Safaie Farahani A., Taghavi S. M., Afsharifar A. and Niazi A. 2016 Effect of β -aminobutyric acid on resistance of tomato against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Journal of Plant Diseases and Protection.

- 123:155–161
- Sahebani N. and Hadavi N. 2009. Induction of H₂O₂ and related enzymes in tomato roots infected with root knot nematode (*M. javanica*) by several chemical and microbial elicitors. *Biocontrol Science and Technology*. 19:301–313.
- Schaad N. W., Jones J. B. and Chun W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd edn. St Paul, MN, USA: APS.
- Sen Y., Van Der Wolf J., Visser R. G. F. and Van Heusden A. W. 2015. Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance and interactions. *Plant Disease*. 99:4–13.
- Sharifi-Sirchi G. R., Beheshti B., Hosseinipour A., and Mansouri M. 2011. Priming against Asiatic citrus canker and monitoring of PR genes expression during resistance induction. *African Journal of Biotechnology*. 10:3818–3823.
- Shternshis M. V., Beljaev A. A., Shpatova T. V., Bokova J. V. and Duzhak A. B. 2002: Field testing of bacticide, phytoverm and chitinase for control of the raspberry midge blight in Siberia. *Biocontrol*. 47:697-706.
- Slaughter A., Daniel X., Flors V., Luna E., Hohn B. and Mauch-Mani B. 2012. Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiology*. 158:835–843.
- Slaughter A. R., Hamiduzzaman M. M. D., Gindro K., Neuhaus J. M. and Mauch-Mani B. 2008. Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: Involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology*. 122:185-195.
- Smith E. F. 1910. A new tomato disease of economic importance (Abstr.). *Science (New series)* 31:794–796.
- Ton J., Flors V. and Mauch-Mani B. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Plant Science*. 14:310-317.
- Ton J., Jakab G., Toquin V., Flors V., Iavicoli A., Maeder M. N., Me' Traux J. P. and Mauch-Mani B. 2005. Dissecting the beta-amino-butyric acid induced priming pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 17:987-999.
- Toussaint V., Benoit D. L. and Carisse O. 2012. Potential of weed species to serve as a reservoir for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. *Crop Protection* 41:64-70.
- Tuzun S., Rao M. N., Vogeli U., Schardi C. L. and Kuc J. 1989. Induced systemic resistance to blue mold: early induction and accumulation of β -1,3-glucanases, chitinases, and other pathogenesis-related proteins (b-proteins) in immunized tobacco. *Phytopathology*. 79:979-983.
- Van Loon L. C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*. 103:753-765.
- Walteres D. R. and Fountaine J. M. 2009. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *Journal of Agricultural Science*. 147:523-535.
- Wang K., Jin P., Cao S., Shang H., Yang Z. and Zheng. Y. 2009. Methyl Jasmonate Reduces Decay and Enhances Antioxidant Capacity in Chinese Bayberries *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:5809–5815.
- Yim K. O., Lee H. I., Kim J. H., Lee S. D., Cho J. H. and Cha J. S. 2012. Characterization of phenotypic variants of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolated from *Capsicum annuum*. *European Journal of Plant Pathology*. 13:559-575.
- Zhang Z. P., Miao M. M. and Wang C. L. 2015. Effects of ALA on photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and gene expression, and regulation of proline accumulation in tomato seedlings under NaCl stress. *Journal of Plant Growth Regulation*. 34: 637–650
- Zimmerli L., Hou B. H., Tsai C. H., Jakab G., Mauch-Mani B. and Somerville S. 2008. The xenobiotic beta-aminobutyric acid enhances *Arabidopsis* thermotolerance. *Plant Journal*. 53:144-156.
- Zimmerli L., Métraux J. P. and Mauch-Mani B. 2001. β -aminobutyric acid induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*. 126:517–523.
- Zimmerli L., Jakab G., Métraux J. P. and Mauch-Mani B. 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by beta-aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12920-12925.