

## مقاله تحقیقی

## استفاده از مسیر سیگنال دهی اکسین به منظور بررسی تقابل دو سویه مختلف باسیلوس علیه آگروباکتریوم

فهیمه نظری<sup>۱</sup>، ناصر صفایی<sup>۲</sup>

۱- بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۲- گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: فهیمه نظری، پست الکترونیک: fahimehnazari236@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۲۸

۸(۱)-۹

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۱۷

## چکیده

بیماری گال باکتریایی طوقه از جمله علل ضررهای اقتصادی می‌باشد و عدم کارایی سموم شیمیایی در کنترل این بیماری ضرورت کنترل یا پیشگیری از این بیماری را به روش بیولوژیک ایجاب می‌کند. تاکنون هیچ تحقیقی روی اثر بیوکنترلی استرین‌های باسیلوس روی پاتوسیستم مهم گال طوقه انجام نگرفته است. هدف این تحقیق، درک دقیق‌تر مکانیسم مولکولی سویه‌های مختلف باسیلوس روی آگروباکتریوم مولد بیماری گال باکتریایی طوقه بود، که با شناخت دقیق‌تر این مکانیسم‌ها امکان استفاده بهتر از عامل کنترل زیستی باسیلوس علیه این بیماری فراهم می‌گردد. لذا از گیاه توتون، آگرواسترین *Agrobacterium tumefaciens* IBRC-M10701 و دو استرین ATCC21332 و FKR3 از *Bacillus subtilis* استفاده شد. به دلیل اهمیت اثر میکرو آر ان ای‌ها در مسیر سیگنال دهی اکسین و القا مقاومت، سطح بیان دو میکرو آر ان ای ntamiRNA167- و miRNA393- در برهمکنش باکتریایی آگرواسترین IBRC-M10701 و باسیلوس در روزهای اول، سوم و ششم بعد از تیمار گیاه توتون با روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بیان میکرو آر ان ای‌های فوق در مقایسه با گیاه شاهد متفاوت بود. به طور کلی مقایسه الگوی تغییرات بیانی در میکرو آر ان ای‌ها بیانگر اثر مثبت بیوکنترلی باسیلوس علیه آگروباکتریوم بود. مقایسه الگوهای بیانی دو استرین مختلف باسیلوس بیانگر اثر بیوکنترلی بهتر استرین FKR3 نسبت به استرین ATCC21332 باسیلوس بود (افزایش حدود سه برابری بیان در روزهای اول و ششم). نتایج، اهمیت بکارگیری سویه‌های مختلف باکتریایی باسیلوس به عنوان عوامل مهم کنترل زیستی آگروباکتریوم را بیشتر نمایان می‌سازد.

**واژه‌های کلیدی:** باسیلوس، آگروباکتریوم، میکرو آر ان ای، بیوکنترل، توتون

## مقدمه

۴۰ گونه گیاهی از گیاهان رز، تبریزی، میخک، درختان میوه هسته‌دار، دانه‌دار، دانه‌ریز (انگور و انجیر) و خشکباری اهمیت اقتصادی دارد (Garrett, 1973; Kennedy & Alcorn, 1980; Sobiczewski et al., 1991). در ایران، قدیمی‌ترین نمونه گال طوقه مربوط به سال ۱۳۳۷ از درختان آلوده انگور در ارومیه و سپس سال ۱۳۴۳ در تاکستان‌های قزوین است (Amani, 1966) و تاکنون در انگور، چغندر قند و نهال‌های میوه گزارش شده ولی بیشترین خسارت اقتصادی آن روی انگور است. در گردو وجود گال در نهالستانی در گرگان با عامل

بیماری گال طوقه به عنوان زیان‌بارترین بیماری باکتریایی قرن بیستم شناخته شده است (Kennedy & Alcorn, 1980). عامل بیماری باکتری *Agrobacterium tumefaciens* است که در میان باکتری‌ها، بیشترین تعداد میزبان گیاهی را به خود اختصاص داده و به ۶۳۴ گونه از ۳۳۱ جنس و ۹۳ خانواده گیاهی، اعم از چوبی (مثمر یا غیر مثمر) تا زراعی مانند چغندر قند حمله می‌کند. میزبان اصلی این باکتری گیاهان دولپه‌ای‌اند و فقط ۳٪ گیاهان تک لپه به آن حساس هستند. این باکتری در حداقل

آراییدوپسیس گزارش شد. miR393 از طریق تحت تاثیر قراردادن مسیر پیام‌رسانی اکسین نقش مهمی را در ایجاد مصونیت به بیماری‌های باکتریایی ایجاد نمود. miR167 یکی از اولین miRNAهای گزارش شده از گیاهان است که مسیر پیام‌رسانی اکسین را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد (Khraiwesha et al., 2012).

درک دقیق وقایع ملکولی مسیر سیگنال‌دهی اکسین از جمله دخالت میکروآران‌ای‌ها می‌تواند ما را در شناخت هر چه بیشتر مکانیسم‌های درگیر در این پاتوسیستم و در نهایت کنترل این بیماری یاری نماید.

بیماری گال باکتریایی طوقه از جمله علل زیان اقتصادی تلقی می‌شود که استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی و عدم موفقیت آنها در کنترل این بیماری ضرورت کنترل یا پیشگیری از این بیماری را به روش کنترل بیولوژیک نشان می‌دهد. نتایج بدست آمده توسط Nazari و همکاران در سال ۲۰۱۷ که بیانگر امکان استفاده از مارکرهای زیستی میکروآران‌ای‌ها به عنوان ابزارهای مولکولی دقیقتر در شناسایی عوامل موثر بیوکنترلی در کنترل بیمارگرهای گیاهی بود. لذا در ادامه این تحقیق، تغییرات الگوهای بیانی nta-miR393 و nta-miR167 به منظور بررسی اثر بیوکنترلی دو استرین مختلف باسیلوس در کنترل هر چه بهتر و موثرتر آگروباکتریوم پس از اعمال تیمارهای آگروباکتریوم، باسیلوس و باسیلوس-آگروباکتریوم روی گیاه توتون با استفاده از روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

در این پژوهش، استرین IBRC-M10701 عامل بیماری باکتریایی گال طوقه که از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شده بود، برای آلودگی گیاهچه‌های توتون استفاده شد. همچنین باکتریهای بیوکنترلی *B. subtilis* strain ATCC21332 و *B. subtilis* OKB105 strain FKR3 اهدایی پروفیسور ماراهیل (بخش بیوشیمی دانشگاه فیلیس، ماربورگ، آلمان) برای بررسی اثر بیوکنترلی روی آگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفت.

*Rhizobium radiobacter* در سال ۱۳۸۹ گزارش گردید (Rohrazi & Rahimian, 2010).

یکی از معمولترین و شناخته‌شده‌ترین میکروارگانیسیمها، *Bacillus subtilis* می‌باشد که به طور متوسط ۵-۷ درصد ژنوم آن برای سنتز آنتی‌بیوتیک اختصاص داشته و توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی متعدد با ساختارهای متفاوت را دارا است (Stein et al., 2005). از میان این ترکیبات ضد میکروبی، پتانسیل لیپوپتیدهای حلقوی خانواده‌های سورفکتین، ایتورین و فنجاسین جهت کاربردهای بیوتکنولوژی و داروسازی به خاطر خاصیت سورفکتانتی آنها به خوبی شناخته شده است (Peypoux et al., 1999). استرین‌های متعددی از گونه‌های باسیلوس موجب پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شوند. مطالعات نشان داده‌است که سورفکتین‌های لیپوپتیدی و فنجاسین‌ها ممکن است در این پروسه القایی نقش داشته باشند (Ongena et al., 2007). علاوه بر آن آزمایش‌ها صورت گرفته روی گیاهان لوبیا و گوجه‌فرنگی نشان داد که *B. subtilis* 168 منجر به افزایش القای مقاومت شده است (Ongena et al., 2007). لیست استرین‌های باسیلوس که به عنوان القاکننده‌های ISR گزارش شده‌است، بسرعت طی دهه گذشته رشد داشته و شامل اجزا *B. mycooides*، *B. subtilis*، *B. pumilus*، *B. thuringiensis*، *B. pasteurii*، *amyloliquefaciens* و *cereus* می‌باشند (Kloepper et al., 2004). برخی پاسخ‌های دفاعی گیاهی همراه با اثرات مفید بوسیله این استرین‌ها ایجاد شده‌اند ولی موارد زیادی باید در ارتباط با جنبه‌های مولکولی ISR ایجاد شده با باسیلوس بایستی کشف شود (Ryu et al., 2004).

امروزه جهت درک دقیق‌تر وقایع ملکولی منجر به مقاومت گیاهان نسبت به بیمارگرها، miRNAها مورد توجه قرار گرفته‌اند (Bartel, 2004). miRNAs مولکول‌هایی درون‌زاد و غیر کدکننده عملکردی می‌باشند که توالی آن‌ها حدود ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتید بوده، و در سال‌های اخیر به عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم بیان ژن‌های کدکننده پروتئین مورد تحقیق قرار گرفته‌اند. برای اولین بار نقش miRNAهای گیاهی در تنظیم پاسخ گیاه به پاتوژن، از miR393 در

آزمایش‌ها با سه تکرار به عنوان تکرارهای بیولوژیکی انجام گرفت و پس از نمونه برداری برگ‌ها در ازلت مایع منجمد شده و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

طراحی و آماده‌سازی آغازگرها: از نرم افزارهای IDT Primer3Plus و OligoAnalyzer نیز در طراحی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق استفاده شد (جدول ۱).

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

RNA نمونه‌های مختلف مورد نظر اعم از نمونه‌های شاهد و آلوده به عامل بیماری با استفاده از ترايزول (شرکت Invitrogen) و طبق دستورالعمل شرکت مربوطه استخراج شد. به کمک آنزیم پلی A پلیمراز یک توالی پلی A به انتهای ۳ میکروآران ای‌ها اضافه شد، سپس سنتز cDNA، با استفاده از تیمار RNAها با آنزیم DnaseI (شرکت فرمتاز)، آغازگر الیگو dT، رندوم هگزامر و آنزیم نسخه برداری معکوس طبق دستورالعمل انجام شد. از آغازگرهای ژن snoRNA-U6 برای سنجش کیفیت cDNA سنتز شده استفاده شد (جدول ۱). از شناساگر Evagreen در انجام واکنش qRT-PCR استفاده شد. برنامه دستگاه به ترتیب زیر انجام شد (۴۰ دوره): ۹۵ درجه سلسیوس ۱۵ ثانیه، ۵۳ درجه سلسیوس ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه. داده‌های واکنش qRT-PCR به کمک نرم افزار GraphPad و روش  $2^{-Ct}$  تجزیه و تحلیل آماری شد.

### تهیه زادمایه باکتریایی، مایه‌زنی و نمونه برداری:

برای تهیه زادمایه باکتریایی، سویه‌های IBRC-M10701، ATCC21332 و FKR3 جداگانه در ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع به ترتیب (Luria Bertani Broth) و LB و NB (Nutrient Broth) مایه‌زنی شدند و در شرایط رشدی ۲۸ درجه سلسیوس (چرخش ۱۸۰ دور در دقیقه) به مدت ۲۴ ساعت کشت شدند. سوسپانسیون‌های باکتری پس از شستشو با آب مقطر سترون (سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق) با OD<sub>۶۰۰</sub> برابر ۰/۵ برای مایه‌زنی استفاده شدند. مایه‌زنی گیاهچه‌های توتون (*Nicotiana tabacum*) چهار هفته‌ای با ایجاد خراش روی رگبرگ اصلی برگ و مایه‌زنی با ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی باسیلوس صورت گرفت. سه روز پس از تیمار باسیلوس، مایه‌زنی مجدد گیاهچه‌ها با استفاده از باکتری آگروباکتریوم (۲۰ میکرولیتر) انجام شد. پس از مایه‌زنی با آگروباکتریوم، گیاهچه‌ها به مدت ۷۲ ساعت تحت شرایط رطوبتی (نیمه اشباع) و در دمای ۲۴±۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس دما به ۲۶±۲ درجه سلسیوس تغییر یافت (Severin *et al.*, 1994). در مایه‌زنی توتون‌های شاهد به جای سوسپانسیون باکتریایی، تنها از آب مقطر سترون استفاده شد. نمونه برداری قبل از انجام آلودگی با آگروباکتریوم (فقط مایه‌زنی شده با باسیلوس به عنوان زمان صفر) و همچنین بعد از آلودگی با آگروباکتریوم در زمان‌های یک، سه و شش روز پس از مایه‌زنی به عنوان زمان ابتدایی آلودگی برای بیماری انجام گرفت. تیمارها شامل: شاهد (تیمار با آب)، تیمار با آگروباکتریوم، تیمار با باسیلوس و تیمار با باسیلوس-آگروباکتریوم بودند.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Table1. Primer sequences used in this research

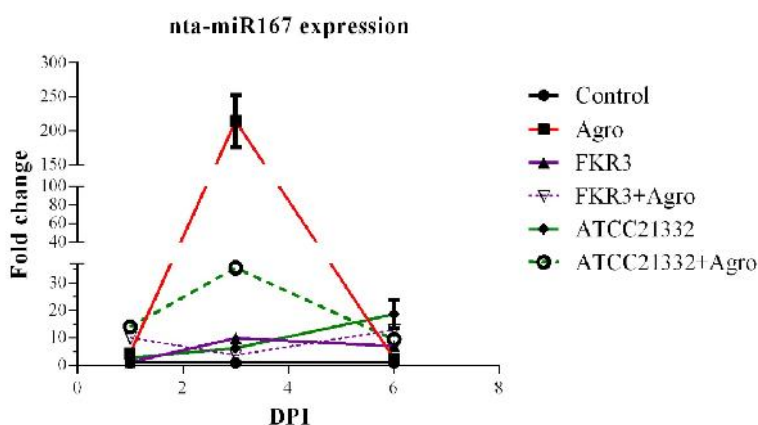
Primer name	Primer sequences, 5' 3'
nta-miR167-F	5'-TGAAGCTGCCAGCATGATCT-3'
snoRNA-U6-F	5'-GGGACATCCGATAAAATT-3'
nta-miR393-F	5'-TCCAAAGGGATCGCATTGATC-3'
Primer Outer -R	5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3'

## نتایج

افزایش ۱۰/۱، ۳/۸ و ۱۲/۹ برابری نسبت به کنترل بود (شکل ۱).

بیان nta-miR393 در نمونه‌های شاهد و آلوده به عامل بیماری: به کمک واکنش PCR در زمان واقعی (qRT-PCR=Real-Time PCR) بیان nta-miR393 در نمونه‌های مختلف شاهد و آلوده به عامل بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح بیانی miR393 یکی دیگر از میکروآران ای‌های مهم مسیر سیگنال‌دهی اکسین پس از تیمار با آگروباکتریوم در روزهای اول، سوم و ششم بعد از تیمار گیاه توتون، بیانگر افزایش ۲/۱، ۸۲۵ و ۴۱/۶ برابری نسبت به کنترل که بیانگر روند افزایشی بیان miR393 تا روز سوم و کاهش شدید بیان تا روز ششم بود (p 0.05). در تیمار باسیلوس (ATCC21332) سطح بیانی میکروآران‌ای فوق به ترتیب ۰/۴، ۲/۹ و ۲۱ برابر افزایش را نشان داد. بررسی الگوی بیانی بیانگر روند افزایشی بیان تا روز ششم بود (شکل ۲). اما سطح بیانی miR393 در تیمار تلفیقی باسیلوس (ATCC21332)-آگروباکتریوم بیانگر افزایش بیانی ۰/۳، ۹/۱ و ۴/۶ برابری نسبت به کنترل بود که بیانگر روند افزایشی بیان miR393 تا روز سوم و کاهش سطح بیان تا روز ششم بود.

بیان nta-miR167 در نمونه‌های شاهد و آلوده به عامل بیماری: به کمک واکنش qRT-PCR بیان nta-miR167 در نمونه‌های مختلف شاهد و آلوده به عامل بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح بیانی miR167 یکی از میکروآران ای‌های 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 کنترل که بیانگر روند افزایشی بیان miR167 تا روز سوم و کاهش شدید بیان تا روز ششم بود (P 0.05). در تیمار باسیلوس (ATCC21332) سطح بیانی میکروآران‌ای فوق به ترتیب ۲/۷، ۶/۳ و ۱۸/۶ برابر افزایش را نشان داد بررسی الگوی بیانی بیانگر روند افزایشی بیان تا روز ششم بود (شکل ۱). اما سطح بیانی miR167 در تیمار تلفیقی باسیلوس (ATCC21332)-آگروباکتریوم بیانگر افزایش بیانی ۱۴، ۳۵/۴ و ۹/۴ برابری نسبت به کنترل بود که بیانگر روند افزایشی بیان miR167 تا روز سوم و کاهش سطح بیان تا روز ششم بود (شکل ۱۵-۴). مطالعه سطح بیانی میکروآران‌ای فوق در تیمار باسیلوس (FKR3) افزایش ۱/۲، ۹/۹ و ۷ برابری را نشان داد که این میزان افزایش سطح بیان در تیمار تلفیقی باسیلوس (FKR3)-آگروباکتریوم بیانگر

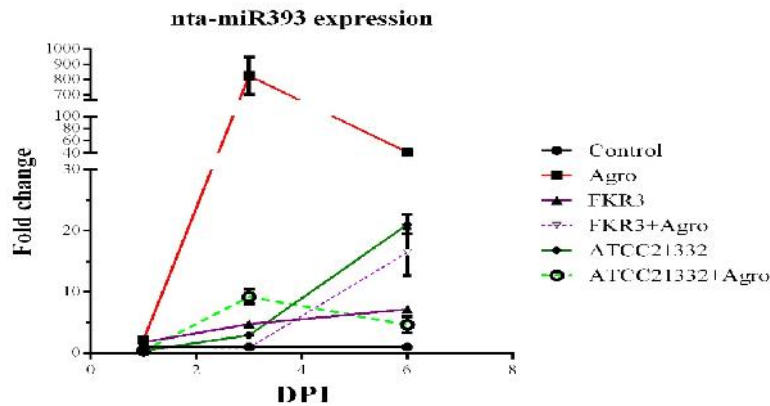


شکل ۱- مقایسه الگوی تغییرات بیانی nta-miR167 در تیمارهای آگروباکتریوم، استرین‌های ATCC21332 و FKR3 باسیلوس، تیمارهای تلفیقی دو استرین باسیلوس با آگروباکتریوم و کنترل (آب) در زمان‌های مختلف.

Fig. 1. Expression pattern of nta-miR167 after treatment with *A. tumefaciens* (Agro), *B. subtilis* strains ATCC21332 and FKR3, combination treatment of *A. tumefaciens* and *B. subtilis* strains, and control (water) in different times.

باسیلوس (FKR3)-آگروباکتریوم بیانگر افزایش ۰/۸ و ۰/۹ و ۱۶/۴ برابری نسبت به کنترل بود (شکل ۲).

مطالعه سطح بیانی میکروآران ای فوق در تیمار باسیلوس (FKR3) افزایش ۱/۷، ۴/۷ و ۷/۱ برابری را نشان داد که این میزان افزایش سطح بیان در تیمار تلفیقی



شکل ۲- مقایسه الگوی تغییرات بیانی nta-miR393 در تیمارهای آگروباکتریوم، استرین های ATCC21332 و FKR3 باسیلوس، تیمارهای تلفیقی دو استرین باسیلوس با آگروباکتریوم و کنترل (آب) در زمان های مختلف.

Fig. 2. Expression pattern of nta-miR393 after treatment with *A. tumefaciens* (Agro), *B. subtilis* strains ATCC21332 and FKR3, combination treatment of *A. tumefaciens* and *B. subtilis* strains, and control (water) in different times.

مشاهده می شود و این نشان می دهد که گیاه با حمله بیمارگر، nta-miR167 را درگیر به پاسخ نموده است. بطوری که این میکروآران ای 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 (شکل ۱) (Dunoyer et al., 2006). در تیمار انفرادی گیاه توتون با استرین های باسیلوس (ATCC21332) و (FKR3) روند افزایشی miR167 تا روز ششم مشاهده شد. در تیمارهای تلفیقی استرینهای باسیلوس-آگروباکتریوم نیز براساس نتایج تغییرات الگوی بیانی miR167 نسبت به تیمار آگروباکتریوم کاهش بیانی را در زمانهای مورد بررسی نشان داد که این امر qRT-PCR تاثیر مثبت بیوکنترلی باسیلوس علیه آگروباکتریوم را نشان می دهد که میزان اثر بیوکنترلی استرین FKR3 باسیلوس نسبت به استرین ATCC21332 باسیلوس بیشتر بود (افزایش حدود سه برابری بیان در روزهای اول و ششم) (شکل ۱). این روند بیانی با تحقیقات Dunoyer و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطابقت دارد (Dunoyer et al., 2006). این محققین نشان دادند که تجمع

## بحث و نتیجه گیری

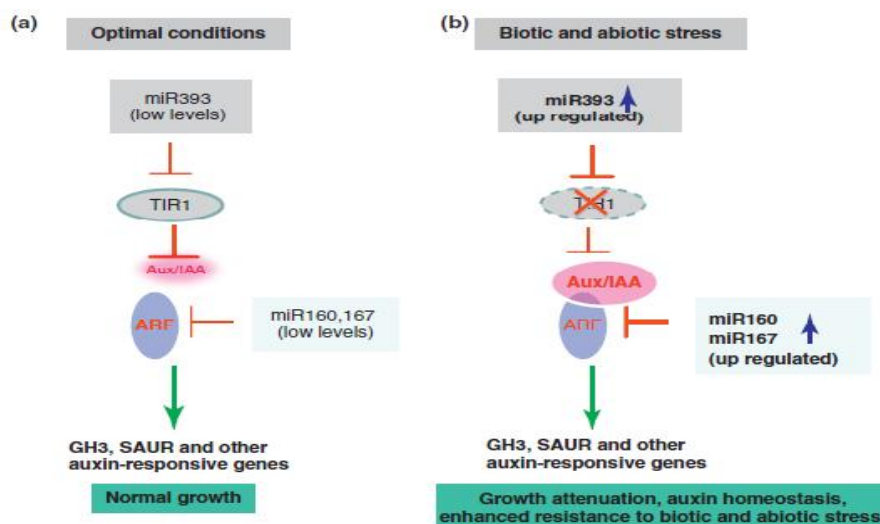
در این پژوهش سطح بیان دو nta-miRNA (nta-miR167 و nta-miR393) در برهمکنش باکتریایی *A. tumefaciens* و دو استرین باکتریایی *B. Subtilis* (ATCC21332 و FKR3) با روش Real-Time PCR مورد سنجش قرار گرفت. بیان nta-miR167، nta-miR393 در مقایسه با گیاه شاهد متفاوت بود. این میکروآران ای ها قبلاً در پاتوسیستم های باکتریایی (Dunoyer et al., 2006; Pruss et al., 2008) به عنوان میکروآران ای های درگیر و پاسخگو به تنش ها شناخته شده بودند، همچنین Nazari و همکاران در سال ۲۰۱۷ برای اولین بار امکان استفاده از میکرو آران ای ها به عنوان مارکرهای زیستی در شناسایی عوامل موثر بیوکنترلی در کنترل بیمارگرهای گیاهی را اثبات کردند (Nazari et al., 2017). لذا در ادامه این تحقیق، تغییرات الگوهای بیانی میکروآران ای ها به عنوان ابزارهایی برای بررسی اثر بیوکنترلی دو استرین مختلف باسیلوس در کنترل آگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفت. تفاوت سطح بیان nta-miR167 پس از آلودگی نسبت به شاهد

سطح بیان در تیمار آگروباکتریوم و باسیلوس مداخله احتمالی nta-miR393 در بروز تحمل یا مقاومت از طریق تاثیرگذاری بر مسیر پیام‌رسانی اکسین را نشان می‌دهد (شکل ۲). به طوری که این میکروآران ای 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 (Pruss *et al.*, 2008). در تیمارهای تلفیقی استرینهای باسیلوس-آگروباکتریوم براساس نتایج تغییرات الگوی بیانی miR393 نسبت به تیمار آگروباکتریوم کاهش بیانی را در زمانهای مورد بررسی داشتیم که این امر بیانگر تاثیر مثبت بیوکنترلی استرینهای باسیلوس علیه آگروباکتریوم بود. این روند بیانی با تحقیقات Pruss و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطابقت دارد (Pruss *et al.*, 2008). ایشان نشان دادند که تجمع miR393 در نمونه های تیمار شده با آگروباکتریوم منجر به افزایش بیانی در ابتدا ولی کاهش شدید بیانی در روزهای بعد می شود که این امر احتمال خاموشی این مکانیسم پاسخ را در نمونه های ترانسفورم شده بالا می‌برد. miR393 از طریق تاثیر بر گیرنده‌های هورمون اکسین یعنی TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) و اعضای خانواده AFB (Auxin signaling F-Box proteins) (AFB1, AFB2, AFB3) مسیر پیام‌دهی اکسین را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Gray *et al.*, 2001; Mallory *et al.*, 2005). این نتایج با مطالعات قبلی که نشان می‌داد هورمون اکسین در حساسیت گیاه به بیماری نقش دارد (Navarro *et al.*, 2006) مطابقت دارد. نهایتاً، کاهش بیان مسیر پیام رسانی اکسین و غیر فعال شدن ARFs و TIR1، جزئی از القاء پاسخ ایمنی گیاه به بیمارگر است که توسط دخالت میکروآران ای ها و بخصوص miR393 شکل می‌گیرد (Navarro *et al.*, 2006). این نتایج اهمیت بکارگیری سویه های مختلف باکتریایی باسیلوس به عنوان عوامل مهم کنترل زیستی در کنترل آگروباکتریوم را بیشتر نمایان می‌سازد.

miR167 در نمونه‌های توموری 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.*, 2005; Kasschau *et al.*, 2003). تحقیقات گذشته (شکل ۳) نشان می‌دهد که miR167 به همراه miR393 و miR160 در تنظیم دقیق درک و احساس اکسین و پیام‌رسانی آن نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. برای تامین هورمون اکسین مورد نیاز گیاه در شرایط بدون تنش، سطح بیان miR167، miR160 و همچنین miR393 در حداقل می‌باشد، ولی در موقع 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 بوسیله برش و خرد کردن رونوشت‌های آن می‌شوند و از این طریق باعث تضعیف رشد و نمو و القاء مقاومت در گیاه می‌شود (شکل ۳) (Sunkar *et al.*, 2012).

سطح بیانی miR393 یکی دیگر از میکروآران ای های مهم مسیر سیگنال‌دهی اکسین پس از تیمار با آگروباکتریوم در روزهای اول، سوم و ششم بعد از تیمار گیاه توتون، بیانگر روند افزایشی بیان miR393 تا روز سوم و کاهش شدید بیان تا روز ششم بود (p 0.05). در تیمار انفرادی گیاه توتون با استرین باسیلوس (ATCC21332) و (FKR3) باسیلوس بیانگر روند افزایشی بیان تا روز ششم بود (شکل ۲). اما سطح بیانی miR393 در تیمار تلفیقی استرین ATCC21332 باسیلوس-آگروباکتریوم شاهد روند افزایشی بیان miR393 تا روز سوم و کاهش سطح بیان آن تا روز ششم بودیم در حالیکه در تیمار تلفیقی استرین FKR3 باسیلوس-آگروباکتریوم نشان‌دهنده روند افزایشی بیان miR393 تا روز ششم بود (شکل ۲). تغییر الگوی سطح بیان nta-miR393 پس از آلودگی نشان دهنده پاسخگویی nta-miR393 در برهمکنش باکتری و توتون است. روند متضاد





شکل ۳- نقش تنظیمی miRNAها در درک و پیام رسانی سیگنال اکسین تحت شرایط تنش و نرمال در گیاه میزبان (Sunkar *et al.*, 2012)

Fig.3. Regulatory roles of miRNAs in auxin signaling, under the stress and optimal conditions of host plant

## References

- Allen, O.N., & Holding, A.J. 1974. In R.E. Buchanan & N.E. Gibbons (Eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 8: 264–267.
- Amani, B. 1966. Stem and root gall of grapevine. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 3: 12–18.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281–297.
- 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.
- Garrett, C.M.E. 1972. Crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*). Report of East Malling Research Station for, 134–135.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. & Estelle, M. 2001. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of Aux/ IAA proteins. *Nature*, 414: 271–276.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E. Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. & Carrington, J.C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Developmental Cell*, 4: 205–217.
- Kennedy, B.W. & Alcorn, S.M. 1980. Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease*, 64: 674–676.
- Khraiwasha, 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.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. & Zhang, S.A. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94: 1259–1266.
- Mallory, A.C., Bartel, D.P. & Bartel, B. 2005. MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell*, 17: 1360–1375.
- 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.
- Nazari, F., Safaie, N., Soltani, B.M., Shams-Bakhsh, M. & Sharifi, M. 2017. *Bacillus subtilis* affects miRNAs and flavanoids production in *Agrobacterium*-Tobacco interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118: 98–106.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J. & Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9: 1084–1090.
- Peypoux á, F., Bonmatin á, J.M. & Wallach, J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 553–563.

- Pruss, G.J., Nester, E.W. & Vance, V. 2008. Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* Induces Host Defense and Development-Dependent Responses in the Infiltrated Zone. *MPMI*, 21, 12: 1528–1538.
- Rohrazi, K. & Rahimian, H. 2010. Isolation and identification of *Rhizobium radiobacter* from walnut crown scab in Golestan province, 19th Plant Protection Congress, 426.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W. & Pare, P.W. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 134: 1017–1026.
- Severin, V. & Dejeu, L. 1994. Bolile úi d un torii vi ei de vie. Editura Ceres Bucuresti, 124.
- Sobiczewski, P., Karczewski, J. & Berczynski, S. 1991. Biological control of crown gall *Agrobacterium tumefaciens* in Poland. *Fruit Science Report*, 18: 125–132.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular and Microbiology*, 56(4): 845–857.
- Sunkar, R., Li, Y.F. & Jagadeeswaran, G. 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 17(4): 196–203.
- Yang, Y., Hammes, U.Z., Taylor, C.G., Schachtman, D.P. & Nielsen, E. 2006. Highaffinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology*, 16: 1123–1127.



---

**Using of auxin signaling pathway to investigate the contrast between two different strains of *Bacillus* against *Agrobacterium***

**Fahimeh Nazari<sup>1</sup>, Naser Safaei<sup>2</sup>**

1. Department of Plant Disease Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension

2. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Corresponding author: Fahimeh Nazari, Fahimehnazari236@gmail.com

---

Received: Jan., 07, 2020

8(1) 1–9

Accepted: May, 05, 2020

---

**Abstract**

Crown gall is one of the most damaging bacterial diseases caused economic damages. Nowadays special attention has been focused on biological control of plant diseases as an alternative to chemical control in terms of the dangers of pesticides. There was no special research focused on the interaction between *Bacillus* and *Agrobacterium* until now. The objective of this study was understanding molecular mechanisms between *B. subtilis* as a biocontrol agent and *A. tumefaciens*. This information would provide us the opportunity for better management of the disease. In this study tobacco plants (*Nicotiana tabacum*), IBRC–M10701 strains of *A. tumefaciens*, *B. subtilis* strain ATCC21332, and *Bacillus subtilis* OKB105 strain FKR3 were used. miRNAs have an important effect in the auxin signaling pathway and resistance induction. The expression level of two miRNAs, miR167 and miR393 was measured using Real–Time PCR; 1, 3 and 6 days after inoculations of *A. tumefaciens* and *B. subtilis* revealed significant differences with the control plants. The results of expression levels demonstrated FKR3 showed a better effect to ATCC21332 in controlling *A. tumefaciens*. Research showed a positive effect of *Bacillus* on *Agrobacterium*. This study indicates the possible use of biological controls such as *B. subtilis* in controlling of *A. tumefaciens*.

**Keywords:** *Bacillus* spp., *Agrobacterium* spp., miRNAs, biocontrol, tobacco

---