مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۰ (۳۲۳-۳۱۵)

بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در خیار آلوده به نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* به وسیله محرک بتا آمینو بوتیریک اسید (BABA)

فهیمه عمران‌زاده[۱]*، نوازاله صاحبانی[۲] و حشمت‌اله امینیان[۳]
۱، ۲، ۳، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۱۴ - تاریخ تصویب: ۹۰/۵/۵)

چکیده

بتا آمینو بوتیریک اسید به عنوان یک محرک القاء مقاومت در گیاهان علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی معرفی شده است. در این تحقیق القاء برخی ترکیبات دفاعی از جمله آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز توسط این ترکیب علیه نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* در گیاه خیار بررسی شده است. نتایج نشان داد که مایه‌زنی ریشه‌های خیار آلوده به نماتد مولد گره ریشه با ترکیب شیمیایی BABA، از روز اول بعد از مایه‌زنی با نماتد موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شده و در روز چهارم این فعالیت به حداکثر خود رسید. القاء فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نیز با اختلاف معنی‌دار نسبت به شاهد و گیاه سالم، افزایش تدریجی نشان داد و در روز چهارم به حداکثر میزان خود رسید. الکتروفورز آیزوزایم‌های پراکسیداز نشان داد که فرم‌های آیزوزایم پراکسیداز در ریشه‌های خیار که توسط BABA القاء می‌شود، نسبت به آیزوزایم‌های القاء شده توسط پاتوژن بسیار قوی‌تر می‌باشد. در گیاهان تیمار شده با نماتد به اضافه BABA دو آیزوزایم R_f =۰/۳۱ و R_f =۰/۳۴ بیان شده است که در مقایسه با شاهد (مایه‌زنی شده با نماتد) قوی‌تر می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: القاء مقاومت، نماتد مولد گره ریشه، بتا آمینو بوتیریک اسید، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز

مقدمه

نماتدهای مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) از نماتدهای انگل اجباری و از مهمترین و اقتصادی‌ترین گروه نماتدهای پارازیت گیاهی در سرتاسر جهان می‌باشند (Abad *et al*., 2003; Xu *et al*., 2001). این نماتدها دارای گسترش جهانی بوده و نسبت به دیگر بیمارگرهای گیاهی دارای رابطه متقابل بسیار پیچیده‌ای با میزبان می‌باشند (Sasser, 1980).

نماتدکش‌های مختلف از جمله کلروپیکرین، اتیلن دی بروماید، ترکیب D–D (۱و۳- دی کلرو پروپن: ۱و۲- دی کلرو پروپان) و متیل بروماید، برای کنترل این نماتدها معرفی شده‌اند. ولی علاوه بر هزینه‌های زیادی که استفاده از این مواد شیمیایی به همراه دارد، خطرات و مشکلات مختلف زیست محیطی، کاربرد آنها را محدود یا ممنوع ساخته است (Whitehead, 1997).

مقاومت القایی یک روش محافظت بیولوژیکی محسوب می‌شود که هدف آن فعال کردن سیستم دفاعی گیاه و در نتیجه محدود کردن فعالیت بیمارگر است، مقاومت ایجاد شده اختصاصی نیست و در برابر طیف وسیعی از بیمارگرها مؤثر می‌باشد و از این نظر که واکنش فعال در گیاه در این مقاومت دخالت دارد با آنتاگونیسم تفاوت دارد، همچنین با توجه به سمی نبودن عوامل القاءکننده برای بیمارگر از روش‌های شیمیایی متمایز می‌گردد (Gorlach *et al*., 2000;

* نویسنده مسئول: فهیمه عمران‌زاده تلفن: ۰۹۳۶-۵۴۴۶۲۷۵ E-mail: f_omranzade1385@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

Siegrist *et al*., 2000).

گروهی از عوامل از قبیل بیمارگرها (قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و نماتدها) که باعث ایجاد پدیده فوق حساسیت می‌شوند، استرین‌های با بیماری‌زایی ضعیف و یا غیر بیماری‌زا، محرک‌هایی با منشأ پاتوژنی (کیتین، گلوکان، پروتئین‌ها، چربی‌ها)، محرک‌های غیرزنده شامل ترکیبات شیمیایی سنتزی بی‌خطر مثل ۲ و ۶- دی‌کلرو ایزو نیکوتینیک اسید (INA)، بتا آمینو بوتیریک اسید (BABA)، بنزو ۱ و ۲ و ۳- تیادیازول ۷- کربوتیونیک اسید-اس- متیل استر (BTH)، سالیسیلیک اسید (SA)، نمک‌های معدنی، فسفات پتاسیم و ترکیبات با منشأ موجودات زنده مقاومت را در گیاهان القاء می‌کنند (Benhamou & Picard, 1999; Cohen, 2001; Kessman *et al*., 1994; Kuc, 2001).

ترکیب شیمیایی BABA یک آمینو اسید غیرپروتئینی سنتتیک می‌باشد که در بسیاری از گونه‌های گیاهی مقاومت را در برابر بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدها القاء می‌کند (Jakab *et al*., 2001; Oka *et al*., 1999). برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ اورت و وان آندل مقاومت القاء شده در گوجه‌فرنگی در مقابل بیماری سوختگی دیرهنگام را در گیاهان تیمار شده با BABA نشان دادند (Oort & Van Andel, 1960). BABA از طریق تحریک گیاه در جهت ساخت سدهای فیزیکی، تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR-Proteins)، فیتواکسین‌ها، واکنش فوق حساسیت و تولید سریع اکسیژن‌های فعال در تحریک مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر بیماری‌ها مؤثر است (Cohen, 2002).

محرک‌های مختلف از طریق مسیر سیگنال‌دهی مشابهی سیستم دفاعی گیاه را تحریک می‌کنند. BABA نیز در مسیرهای مختلف سیگنال‌دهی از جمله مسیرهای سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن عمل می‌کند. با این وجود مکانیزم کامل عمل BABA در القاء مقاومت به درستی مشخص نیست (Cohen, 2002). Zimmerli *et al*. (2000) نشان دادند که BABA مقاومت را در موتانت‌هایی از گیاه آرابیدوپسیس که مسیرهای سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن در آنها آسیب دیده‌اند القاء می‌کند. بنابراین علاوه بر مسیرهای ذکر شده وجود مسیرهای سیگنال‌دهی دیگری نیز برای BABA امکان‌پذیر است.

گیاهان همواره از طریق طیف وسیعی از ترکیبات دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی و آفات مقاومت می‌کنند. پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز از جمله آنزیم‌های مرتبط با دفاع گیاه در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشند. این آنزیم‌ها اکسیداتیو هستند و در ساخت و استفاده از اکسیژن‌های فعال، تشکیل لیگنین و دیگر فنل‌های اکسید شده به عنوان سدهای دفاعی برای استحکام ساختار سلولی دخیل هستند (Chen *et al*., 2000).

Siegrist *et al*. (2000) نشان دادند که PR-1 در گیاهان توتون تیمار شده با BABA تجمع می‌یابد. Jakab *et al*. (2001) گزارش کردند که در گیاهان آرابیدوپسیس، کاربرد BABA به شکل اسپری برگی حتی در غلظت‌های پائین، موجب تجمع PR پروتئین‌ها (PR–1، PR–2 و PR–5) می‌شود.

ترکیب شیمیایی BABA مقاومت سیستمیک را در مقابل بیماری لکه برگی بادام زمینی *Cercosporidium personatum* ایجاد می‌کند. Zhang *et al*. (2001) نشان دادند که در شرایط گلخانه‌ای، BABA تنها القاءکننده‌ای است که به طور معنی‌داری شیوع این بیماری را کاهش می‌دهد.

کاربرد دی ال آمینو بوتیریک اسید به خاک تعداد گال‌های ایجاد شده توسط *Nocobbus serendipiticus* را بدون آسیب به گیاهان گوجه‌فرنگی کاهش داده است (Prasad *et al*., 1967). Oka *et al*. (1999) القاء مقاومت در گیاه گوجه‌فرنگی علیه نماتد مولد گره ریشه را با استفاده از BABA، با نشان دادن اثر آن در کاهش بیماری (ارزیابی تعداد گال، تعداد تخم‌های نماتد و وزن تر ریشه و ساقه)، اثبات کردند.

با توجه به نتایج قابل توجه استفاده از BABA علیه نماتد مولد گره ریشه توسط Oka *et al*. (1999)، تأثیر بتا آمینو بوتیریک اسید به عنوان محرک سیستم دفاعی گیاه برای القاء مقاومت در خیار در برابر نماتد مولد گره ریشه به عنوان هدف این تحقیق قرار گرفت. در این تحقیق همچنین امکان القاء و میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز ارزیابی شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

تهیه جمعیت نماتد *M. javanica*

پس از تهیه نمونه گیاهی آلوده به نماتد، با استفاده از روش توده تخم منفرد (single eggmass) و تکثیر متوالی آن روی ریشه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم Rutgers، خالص سازی و تکثیر آن انجام شد. در اغلب تحقیقات نماتد شناسی از تخم و لاروسن دو نماتد جهت ایجاد آلودگی استفاده می‌شود ولی معمولا به دلیل غیر زنده بودن درصدی از تخم‌ها، استفاده از لارو سن دوم نماتد بیشتر معمول می‌باشد. استخراج تخم و تهیه لاروسن دوم با روش Hussey & Barker (1973) انجام گرفت.

تهیه محرک بتا آمینو بوتیریک اسید

ماده شیمیایی بتا آمینو بوتیریک اسید (BABA) از شرکت سیگما تهیه شده و غلظت ۲۰ میلی‌مول آن برای انجام آزمایشات استفاده شد (Oka *et al*., 1999).

بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در گیاه خیار آلوده به نماتد مولد گره ریشه مایه‌زنی شده با BABA

بذور خیار ضدعفونی شده در گلدان‌های $۱۳۰\ cm^3$ حاوی خاک (شامل ماسه، خاک برگ، خاک مزرعه به نسبت ۱:۱:۱) استریل کشت گردید. در مرحله ۶-۴ برگی، گیاهچه‌های خیار به روش خیساندن خاک (soil-drench) با محلول ۲۰ میلی‌مول بتا آمینو بوتیریک اسید تیمار شدند. به هر گیاهچه ۱۰ میلی‌لیتر از محلول مذکور اضافه شد (Oka *et al*., 1999). یک روز بعد از تیمار گیاهچه‌های خیار با آمینو بوتیریک اسید، جمعیت ۲۰۰۰ لارو سن دوم به ازاء هرگیاه مایه‌زنی شدند. جهت ثابت نگه داشتن حرارت اطراف ریشه گیاه، گلدان‌ها در تشت بزرگی حاوی آب قرار گرفتند. دمای آب داخل تشت ۲۷ درجه سلسیوس و درجه حرارت محیط ۲±۲۷ تنظیم گردید.

در این آزمایش مایه‌زنی گیاهچه‌های خیار با نماتد به تنهایی (شاهد)، BABA به تنهایی، نماتد به اضافه BABA و آب مقطراستریل به عنوان تیمارهای آزمایش در نظر گرفته شدند. در گیاهان شاهد به جای BABA از آب مقطر استریل استفاده شد پس از مایه‌زنی گیاهچه با نماتد نمونه برداری از ریشه گیاهان در روزهای اول، سوم، چهارم، پنجم و هفتم بعد از مایه‌زنی گیاهان با نماتد انجام گرفت. این آزمایش با سه تکرار در قالب آزمایش فاکتوریل در پایه طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت.

استخراج پروتئین از بافت گیاه

نیم گرم از بافت ریشه گیاه در هاون چینی که قبلاً در یخچال سرد شده بود با استفاده از ازت مایع به خوبی سائیده و نرم گردید. سپس یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مول (pH ۶) به آن اضافه و کاملاً هموژن شد. در تمام مدت انجام کار هاون در داخل تشت حاوی یخ قرار داشت. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل و توسط میکروسانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس (داخل یخچال) سانتریفیوژ شد. عصاره روئی حاصل برای انجام آزمایش‌ها جدا و تا قبل از انجام آزمایش در ۴۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Reuveni, 1995).

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره شامل تهیه منحنی استاندارد با استفاده از پروتئین استاندارد (آلبومین سرم گاوی فراکسیون ۵) مطابق با روش Bradford (1976) انجام شد، به این منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر عصاره هر نمونه با سه میلی‌لیتر معرف برادفورد در یک لوله آزمایش کوچک مخلوط و سپس میزان جذب نور در طول موج λ_{max}=۵۹۵ nm با استفاده از اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. میزان کل پروتئین هر عصاره با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش Mohammadi & Kazemi (2002) انجام شد. دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره دارای ۴۰ میلی‌گرم پروتئین، ۲۰ میکرولیتر گوئیکول و مقدار کافی بافر سیترات فسفات ۲۵ میلی‌مول (pH ۵/۴) طوری که حجم نهایی دو میلی‌لیتر باشد، در یک لوله آزمایش مخلوط گردید و دستگاه اسپکتروفوتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج λ_{max} =۴۷۵nm صفر گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰

Archive of SID

www.SID.ir

درصد به مخلوط اضافه کرده و سریعاً مخلوط و تغییرات جذب نور با فواصل ۱۰ ثانیه و به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره نمونه که دارای ۴۰ میکروگرم پروتئین باشد، ۲۰ میکرولیتر محلول پرولین و مقدار کافی بافر سیترات فسفات ۲۵ میلی‌مول (pH ۶/۴) طوری که حجم نهایی دو میلی‌لیتر باشد در یک لوله آزمایش کوچک کاملاً مخلوط و این مخلوط به مدت دو دقیقه به وسیله ورتکس هوادهی شد. سپس دستگاه اسپکتروفوتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج λ_{max} = ۵۱۵nm صفر گردید. سپس ۴۰ میکرولیتر محلول پیرو کتکول ۱۰۰ میلی‌مول به مخلوط فوق اضافه کرده و سریعا مخلوط نموده و بلافاصله تغییرات جذب نور با فواصل ۱۰ ثانیه و به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Mohammadi & Kazemi, 2002).

الکتروفورز بومی (Native PAGE) آیزوزایم‌های پراکسیداز

الکتروفورز بومی با استفاده از ژل جداکننده ۱۲٪ و متراکم کننده ۶٪ انجام شد. در هر چاهک مقداری از عصاره که حاوی ۳۰ میکرو گرم پروتئین بود ریخته شده و حجم نهایی هر چاهک با استفاده از بافر نمونه به ۳۵ میکرولیتر رسانده شد. ولتاژ در مرحله ژل متراکم‌کننده ۷۵ ولت و در مرحله ژل جدا کننده ۱۰۰ ولت در نظر گرفته شد. سپس ژل Run شده از بین صفحات شیشه‌ای خارج و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس در بافر سیترات- فسفات ۲۵ میلی‌مول حاوی گوئیکول با غلظت نهایی پنج میلی‌مول و pH، ۵/۴ به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. سپس مقدار یک درصد پراکسید هیدروژن قطره قطره به آن اضافه شد. پس از چند لحظه باندهای قهوه‌ای که نشان‌دهنده آیزوزایم‌های پراکسیداز بودند ظاهر شد (Laemmli, 1970).

نتایج

بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

همانطور که در شکل ۱ قابل مشاهده است در دو تیمار مایه‌زنی گیاهچه‌ها با BABA به تنهایی و با BABA به اضافه نماتد، میزان فعالیت آنزیم در روز اول و سوم با شاهد (مایه‌زنی شده فقط با نماتد) اختلاف معنی‌داری نداشتند، ولی از روز چهارم این دو تیمار با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند. در گیاهان مربوط به این دو تیمار و شاهد حداکثر فعالیت آنزیم در روز چهارم بعد از مایه‌زنی با نماتد مشاهده شد. تیمار گیاه سالم در روز اول، پنجم و هفتم اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت ولی در روزهای سوم و چهارم با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. علاوه بر این فعالیت آنزیم پراکسیداز درتیمار گیاه خیار مایه‌زنی شده با BABA به اضافه نماتد در روزهای متوالی با اختلاف معنی‌داری نسبت به یکدیگر افزایش یافت ولی بین روزهای پنجم و هفتم این تیمار اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز

دو تیمار مایه‌زنی گیاهچه‌ها با BABA به اضافه نماتد و BABA به تنهایی و تیمار گیاه سالم در روز اول با شاهد (مایه‌زنی شده با نماتد) اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی در روزهای سوم و چهارم با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند، فعالیت آنزیم در تیمار BABA به اضافه نماتد در روزهای سوم و چهارم اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و حداکثر فعالیت آنزیم در روز چهارم بود (شکل ۲).

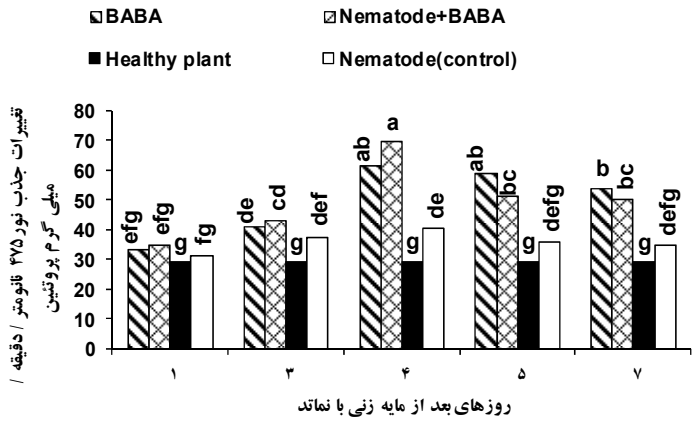
الکتروفورز آیزوزایم‌های پراکسیداز

همانطور که در شکل ۳ قابل مشاهده است باندهای آیزوزایم‌های پراکسیداز به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای با حرکت نسبی R_f = ۰/۳۱ و R_f = ۰/۳۴ می‌باشد.

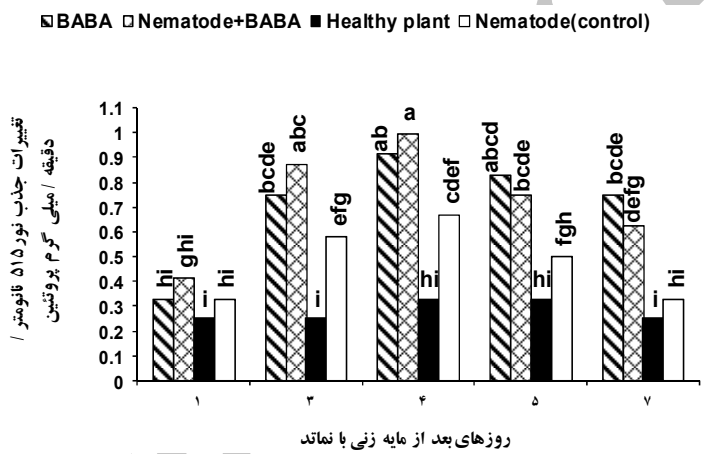
A: باندهای آیزوزایم‌های پراکسیداز مربوط به تیمار گیاهچه‌های خیار مایه‌زنی شده با نماتد به اضافه BABA می‌باشد. در این تیمار، دو آیزوزایم با R_f =۰/۳۴ و R_f =۰/۳۱ بیان شده است که در مقایسه با شاهد (مایه‌زنی شده با نماتد به تنهایی) گیاه سالم (D) باندها قوی‌تر بیان شده‌اند. آیزوزایم با R_f =۰/۳۴ در گیاه سالم در مقایسه با این تیمار از نظر تراکم بسیار ضعیف بود.

Archive of SID

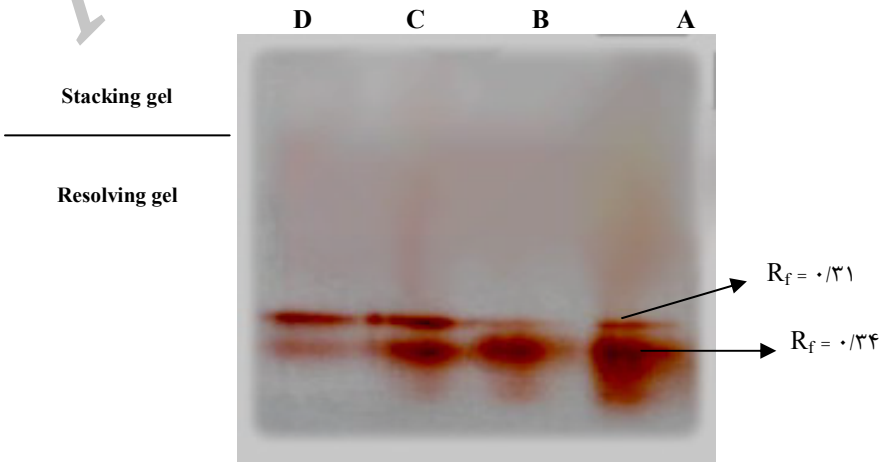
www.SID.ir



شکل ۱- تأثیر بتا آمینوبوتیریک اسید (BABA) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه خیار آلوده به نماتد مولد گره ریشه. اعداد این جدول میانگین سه تکرار می‌باشند. اعدادی دارای حروف یکسان، بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند. فعالیت آنزیم پراکسیداز به صورت تغییرات جذب نور در ۴۷۵ نانومتر در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین نشان داده شده است.



شکل ۲- تأثیر بتا آمینو بوتیریک اسید (BABA) بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در ریشه گیاهچه‌های خیار آلوده به نماتد مولد گره ریشه. اعداد این جدول میانگین سه تکرار می‌باشند. اعدادی دارای حروف یکسان، براساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند. فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز به صورت تغییرات جذب نور در ۵۱۵ نانومتر در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین نشان داده شده است.



شکل ۳- الکتروفورز بومی آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های خیار آلوده به نماتد مولد گره ریشه مایه‌زنی شده با BABA و مقایسه آن با گیاه سالم که به ترتیب A: نماتد به اضافه BABA، B: BABA، C: نماتد، D: گیاه سالم.

www.SID.ir

B: باندهای آیزوزایم‌های پراکسیداز مربوط به تیمار گیاهچه‌های خیار مایه‌زنی شده با BABA می‌باشد که در این تیمار دو آیزوزایم با R_f =۰/۳۴ و R_f =۰/۳۱ بیان شده است که در مقایسه با گیاه سالم، آیزوزایم با R_f =۰/۳۴ در گیاه سالم بسیار ضعیف است در حالیکه در این تیمار با تراکم قابل توجه مشاهده شد. پس می‌توان نتیجه گرفت که این آیزوزایم در مکانیسم‌های دفاعی گیاه اهمیت بیشتری دارند.

C: باندهای آیزوزایمی مربوط به تیمار گیاهچه‌های خیار مایه‌زنی شده با نماتد (شاهد) می‌باشد که در مقایسه با تیمار نماتد به اضافه BABA، آیزوزایم‌ها از نظر تراکم ضعیفتر هستند.

D: باندهای آیزوزایمی مربوط به گیاه سالم می‌باشد. دراین تیمار دو آیزوزایم با R_f =۰/۳۱ و R_f =۰/۳۴ بسیار ضعیف بیان شدند.

بحث

گیاهان در مواجهه با میکروارگانیسم‌ها و توسط آسیب‌های مکانیکی، تغییرات فیزیولوژیکی مهمی در آنها القاء شده و به طور کلی آنزیم‌ها و ترکیبات دفاعی گیاه فعال می‌شوند. القاء مقاومت با افزایش و سنتز یکسری از مواد شیمیایی که طی یکسری از واکنش‌های پیچیده در گیاه میزبان صورت می‌گیرد و باعث تحریک سیستم دفاعی گیاه می‌گردد. بسیاری از مواد که ماهیت پروتئینی دارند از جمله آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز در فرایند لیگنینی شدن، تولید سوبرین و تانن (سدهای فیزیکی و شیمیایی) که در نفوذپذیر شدن بافت گیاه علیه نماتد مولد گره ریشه دخالت دارند. علی‌رغم پیشرفت‌های مهمی که در ارتباط با محرک‌های مختلف و پاسخ‌های دفاعی گیاهان میسر شده است هنوز اطلاعات کمی راجع به آنزیم‌های القاء شده توسط BABA در دسترس است. در مطالعه اخیر از بین سه ایزومر آمینو بوتیریک اسید (α, β, γ)، از ایزومر β استفاده شد.

مشخص شده است که BABA به طور سیستمیک در گیاهان حرکت می‌کند و بخشی از این حفاظت سیستمیک که توسط BABA در مقابل بیماری‌های گیاهی ایجاد می‌شود را توجیه می‌کند. علاوه بر آن القاء انتقال‌دهنده‌های سیگنال ازجمله سالیسیلیک اسید وجاسمونیک اسید نیز تکمیل‌کننده القاء سیستمیک درگیاه می‌باشد (Cohen, 2002).

در این تحقیق از مارکرهای مقاومت القائی چون آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز برای بررسی استفاده شد. آنزیم پراکسیداز POX به عنوان یک القاء شونده سیستمیکی و به عنوان مارکری برای القاء مقاومت در گیاه برای ایجاد cross-link و محکم کردن دیواره سلولی ضروری می‌باشد (Kuc, 2001). این آنزیم با دخالت در مرحله نهایی تولید لیگنین باعث افزایش مقاومت به بیماری می گردد (Lagrimini *et al*., 1987). که برای این عمل پراکسیداز دیواره سلولی نیاز به H_2O_2 و رادیکال‌های منولیگنال دارد (Van Huistee, 1987). فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه خیار با چهار تیمار مختلف شامل نماتد تنها، BABA به اضافه نماتد، BABA به تنهایی و شاهد سالم مورد سنجش قرار گرفت. از نتایج آزمایش بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز چنین استنباط می‌شود که BABA در آزمایش موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شده است. فعالیت آنزیم پراکسیداز از روز اول بعد از مایه‌زنی نماتد شروع شده و در روز چهارم به حداکثر فعالیت خود رسیده و سپس در روزهای بعد به تدریج کاهش یافت. این کاهش که در شاهد به شدت و در تیمارهای دیگر خیلی به کندی صورت گرفت دلیلی بر پایداری اثر القاء مقاومت توسط BABA می‌باشد.

مشابه این نتایج، افزایش آنزیم پراکسیداز در ریشه‌های خیار که بوسیله باکتری *P.corrugata* تیمار شده بودند، در مقابل قارچ *Pythium aphanidermatum* مشاهده شد (Chen *et al*., 2000). Nandakumar *et al*. (2001) نشان دادند که تیمار گیاهان برنج با باکتری *Pseudomonas fluorescens*، منجر به القاء مقاومت سیستمیک علیه *Rhizoctonia solani* می‌شود و نتیجه این مقاومت، افزایش فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و پراکسیداز می‌باشد.

Premachandran & Dasgupta (1983) گزارش کردند که آنزیم پراکسیداز در پدیده مقاومت به نماتد *Meloidogyne* spp. دخالت دارد.

همچنین نشان داده شده است که تغییرات فعالیت

Archive of SID

www.SID.ir

آنزیم پراکسیداز نشان‌دهنده تغییرات بیوشیمیایی گیاه بوده و بخشی از واکنش‌های مقاومت می‌باشد (Reuveni & Bothma, 1985).

Baysal *et al.* (2003) نشان دادند که افزایش مقاومت گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با acibenzolar-S-methyl علیه شانکر باکتریایی *Clavibacter michiganensis* ssp. michiganensis به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز و کیتیناز مربوط می‌باشد.

در این تحقیق همچنین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در گیاه خیار با تیمارهی فوق‌الذکر مورد سنجش قرار گرفت. BABA موجب افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به گیاه سالم شد و فعالیت آن با شاهد (مایه‌زنی شده فقط با نماتد) اختلاف معنی‌دار داشت. بنابراین BABA موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در ریشه‌های خیار علیه نماتد *M. javanica* می‌شود.

Zacheo *et al.* (1993) نشان دادند که آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در ریشه‌های گوجه‌فرنگی در دمای کمتر از ۳۰ درجه سلسیوس در مقابل نماتد مولد گره ریشه افزایش می‌یابد. همچنین مشخص شده است که آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در گیاهان گوجه‌فرنگی به مقدار بسیار زیادی بیان می‌شود و بیان زیاد این آنزیم با افزایش مقاومت به پاتوژن‌ها همراه است (Li & Steffens, 2002).

Williamson & Hussay (1996) در ریشه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne* spp.، ژن‌هایی را در مکانیسم‌های دفاعی گیاه شناسایی کردند که باعث القاء آنزیم‌هایی مانند پلی‌فنل‌اکسیداز، کاتالاز، لیپوکسی‌ژناز و پراکسیداز می‌شوند. نقش آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در ایجاد مقاومت در گیاه ارزن دری (*Penisetum glaucum*) به سفیدک دروغی (*Sclerospora graminicola*) نیز توسط Raj *et al.* (2006) اثبات شد.

با توجه به نتایج بدست آمده از تغییرات فعالیت دو آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در این آزمایش می‌توان گفت که نماتد بعد از رسیدن به ریشه و نفوذ به داخل بافت ریشه، طبیعتاً باعث زخمی شدن ریشه می‌گردد و با حرکت بین سلولی زیادی در بافت ریشه خود را به مکان تغذیه می‌رساند. این نفوذ و حرکت بیمارگر به دلیل اینکه بین سلولی بوده و باعث از بین بردن سلول‌ها در مسیر خود نمی‌شود باعث القاء متابولیت‌های دفاعی در میزان کمی می‌گردد. با ورود نماتد به داخل گیاه ترشحاتی توسط نماتد تولید می‌شود که روی واکنش‌های بیوشیمیایی اثر گذاشته و خاموش شدن بعضی واکنش‌های بیوشیمیایی و بالطبع کاهش سنتز ترکیبات‌و آنزیم‌های دفاعی را به همراه دارد (Windham *et al.*, 1989). بنابراین در تیمار نماتد تنها میزان القاء آنزیم‌های دفاعی POX و PPO نسبت به تیمارهای مایه‌زنی شده با BABA به طور معنی‌داری کمتر می‌باشد. در حالی که BABA باعث افزایش القاء و سنتز پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز به میزان زیادی می‌شود.

تحقیقات بیشتری در مورد اثر BABA روی دیگر گیاهان میزبان نماتد مولد گره ریشه و دیگر گونه‌های نماتد، همچنین روی مکانیزم‌های عمل BABA در ایجاد مقاومت به نماتد مولد گره در گیاه خیار لازم است.

REFERENCES

1. Abad, P., Favery, B., Rosso, M. N. & Castagnone-Sereno, P. (2003). Root – knot nematode parasitism and host responses: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 217-224.
2. Baysal, O., Soyla, E. M. & Soylu, S. (2003). Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar- S-methy1 in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis*. *Plant Pathology*, 52, 747-753.
3. Benhamou, N. & Picard, K. (1999). Induced resistance: a novel strategy for defense plants against pathogen. *Phytoprotection*, 80, 137-168.
4. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization the principle of protein–dye binding. *Analyticaj Biochemistry*, 72, 248-254.
5. Chen, C., Belanger, R. R., Benhamou, N. & Paulitz, T. C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth- promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium*

Archive of SID

www.SID.ir

aphanidermatum. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 56, 13-23.
6. Cohen, Y. (2001). The BABA story of induced resistance. *Phytoparasitica*, 29, 375-378.
7. Cohen, Y. R. (2002). β-amino butyric acid induced resistance against plant pathogens. *Plant Disease*, 86: 448 - 457.
8. Gorlach, Y., Volrath, S., Knauf B eiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E. & Kessmann, H. (1996). Benzothiadiazole a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant and Cell*, 8, 629-643.
9. Hussey, R. S. & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57, 1025-1028.
10. Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Metraux, J. P. & Mauchmani, B. (2001). β-aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 29-37.
11. Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T. & Herzog, J. (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in Plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 439-459.
12. Kogel, K. H., Beckhove, U., Dreschers, J., Munchs, J. & Romme, Y. (1994). Acquired resistance in barley–the resistance mechanism induced by 2, 6-dichloveison. cotionic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race–specific powdery mildew resistance. *Plant Physiology*, 106, 1269-1277.
13. Kuc, J. (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 7-12.
14. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
15. Lagrimini, L. M., Bukhart, W., Moyer, M. & Rothstein, S. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue specific expression. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences*, 84, 7542-7546.
16. Li, L. & Steffens, J. C. (2002). Over expression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215, 239-247.
17. Mohammadi, M. & Kazemi, H. (2002). Changes in Peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162, 491-498.
18. Nandakumar, R., Babu, S., Wiswanathan, R., Raguchander, T. & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 603-612.
19. Oka, Y., Cohen, Y. & Spiegel, Y. (1999). Local and systemic induced resistance to the root-knot nematode in tomato by DL- β- amino- n- butyric acid. *Phytopathology*, 89, 1138-1143.
20. Oort, A. J. P. & Van Andel, O. M. (1960). Aspects in chemotherapy. *Mededel. Opz.*, 25, 961-992.
21. Prasad, S. K. & Webster, J. M. (1967). The effect of amino acid antimetabolites on four nematode species and their host plants. *Nematologica*, 13, 318-323.
22. Premachandran, D. & Dasgupta, D. R. (1983). A Theorical model for plant-nematode interaction. *Revuede Nematology*, 6(2), 311-315.
23. Raj, S. N., Sarosh, B. R. & Shetty, H. S. (2006). Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. *Functional Plant Biology*, 33, 563-571.
24. Reuveni, R. & Bothma, G. C. (1985). The relationship between peroxidase activity and resistance of *Sphaerotheca fuligenea* in melons. *Phytopathologische Zeitschrift*, 114, 260-267
25. Reuveni, R. (1995). Biochemical marker for disease resistance. In: R. P. Singh and U. S. Singh, (Eds.), *Molecular methods in plant pathology*, CRC Press, Boca Raton.
26. Sasser, J. N. (1980). Root- knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease*, 64, 36-41.
27. Shailasree, S., Sarosh, B. R., Vasanthi, N. S. & Shetty, H. S. (2001). Seed treatment with β-aminobutyric acid protects *Pennisetum glaucum* systemically from *Sclerospora graminicola*. *Pest Management Science*, 57, 721-728.
28. Siegrist, J., Orober, M. & Buchenauer, H. (2000). Beta-aminobutyric acid- mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological & Molecular Plant Pathology*, 56, 95-106.
29. Steiner, U. & Schonbeck, F. (1995). Induced disease resistance in monocots. In: R. Hammerschmidt & J. Kuc, (Eds.). *Induced resistance to disease in plants*. (pp 86-109). Kluwer Academic Publishers.
30. Van Huistee, R. B. (1987). Some molecular aspects of plant peroxidases: Biosynthetic studies. *Annual Review Plant Physiology*, 38, 205-219.

Archive of SID

www.SID.ir

31. Whitehead, A. G. (1997). *Plant nematode control*. CAB International.
32. Williamson, V. M. & Hussay, R. S. (1996). Nematode pathogensis and resistance in plants. *Plant and Cell*, 8, 1735-1745.
33. Windham, G. I., Windham, M. T. & Williams, W. P. (1989). Effect of *Trichoderma* spp. on maize grows and *Meloidogyne arenaria* reproduction. *Plant Disease*, 73, 493- 494.
34. Xu, J., Narabu, T., Mizukubo, T. & Hibi, T. (2001). A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Phytopathology*, 91, 377-382.
35. Zacheo, G., Orlando, C. & Bleve-Zacheo, T. (1993). Characterization of anionic peroxidase in tomatos isolines infected by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 25(2), 249-256.
36. Zhang, S., Reddy, M. S., Kokalis-Burelle, N., Wells, L. W., Nightengale, S. P. & Kloepper, J. W. (2001). Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth-promoting rhizobacteria and chemical elicitors. *Plant Disease*, 85, 879-884.
37. Zimmerli, L., Jakab, C., Metraux, J. P. & Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanism in *Arabidopsis* by β-aminobutyric acid. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences*. USA, 97, 12920-12925.

Archive of SID

www.SID.ir