Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷

بررسی فعالیت آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز و میزان بیان ژن‌های رمزکننده آن در میوه سیب تحت تنش بیمارگر *Penicillium expansum* و عصاره پوست سبز گردو

اسماعیل زنگویی .Ph.D. student[۱]، عیدی بازگیر .Ph.D[۲]*، جلال غلام‌نژاد.Ph.D[۳]، مصطفی درویش‌نیا .Ph.D[۲]

۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، خرم آباد، ایران
۲- دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی،گروه گیاه‌پزشکی، خرم آباد، ایران
۳- دانشگاه اردکان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، اردکان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: bazgir.ei@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۳

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عصاره پوست سبزگردو بر روی کاهش علایم بیماری کپک آبی سیب، تغییرات میزان فعالیت آنزیمهای دفاعی شامل پراکسیداز و کاتالاز و همچنین تغییرات میزان بیان ژن این دو آنزیم در میوه سیب بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ابتدا از پوست سبزگردو عصاره‌گیری شد، سپس این عصاره‌های گیاهی جهت کنترل بیماری کپک آبی سیب با عامل *Penicillium expansum*، در آزمایشگاه و در انبار ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شدند. تاثیر عصاره آبی پوست سبز گردو بر میزان فعالیت و همچنین بیان ژن‌های دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز در میوه سیب، نیزمورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج:بر اساس نتایج، در مورد آزمون اختلاط عصاره با محیط کشت و نیز عصاره‌های آبی و متانولی پوست سبز گردو در غلظت ۶×۱۰۰۰ با میزان ۸۶/۴۱ و ۷۵/۸۴ درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر بهترتیب، نسبت به شاهد، بهترینکنترل‌کنندگی را نشان داد. در آزمون انبار ۴ درجه سانتی‌گراد سطح لکه ایجاد شده در تیمار عصارههای آبی و متانولی با غلظت ۶×۱۰۰۰ بهمیزان ۹۴/۵۰ و ۸۱/۶۹ درصد، بهترتیب، نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. فعالیت آنزیمهای پراکسیداز و کاتالاز در روز نهم به بیشترین مقدار خود در بین روزهای نمونه‌برداری رسید. بررسی بیان ژنهای پراکسیداز و کاتالاز بهروش Real-time PCR نشان داد که بهترتیب ۲۲۷/۶۰ و ۳۱۴/۰۸ برابر میزان بیان دو ژن و در تیمار عصاره پوست گردو بههمراه بیمارگر، نسبتبهشاهد و در روز نهم،افزایش نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این تحقیق مشخص شد که عصاره پوست سبز گردو علاوه بر اثر مستقیم قارچکشی قادر به القا بیان ژن‌های دفاعی و بهدنبال آن افزایش فعالیت آنزیمهای دفاعی در میوه سیب است.

واژگان کلیدی: بیان ژن، پوست گردو، پراکسیداز، سیب، کاتالاز، کپک آبی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سیب یکی از مهم‌ترین محصولات باغی در ایران و جهان محسوب می‌شود. نظر به تولید زیاد این محصول در یک فصل بخصوص از سال، نیاز این محصول به انبارداری امری اجتناب ناپذیر است. از طرف دیگر بهعلت کمبود انبارهای مجهز به تکنولوژی مناسب، این محصول همواره در معرض خسارات زیادی از جمله بیماریی‌های قارچی است (۱). میزان خسارت وارده به میوه‌جات از مزرعه، انبار تا مصرف، بهدلیل فقدان امکانات انبارداری مناسب در کشورها توسعه یافته تا ۲۵ درصد و در کشورهای در حال توسعه تا ۵۰ درصد نیز می‌رسد. یکی از مهم‌ترین بیماریهایی که به این محصول در انبار خسارت وارد میکند بیماری کپک آبی سیب با عامل گونه‌های مختلف جنس Penicillium است. در طول دهه ۱۹۵۰ میلادی بیماری‌های بعداز برداشت سیب بیش از ۸۰ تا ۹۰ درصد خسارت به این محصول وارد کردند (۲). Rosenberger تخمین زد که در آمریکا سیب‌های برداشت شده در حدود ۴/۴ میلیون دلار در اثر بیماریهای بعد از برداشت خسارت دیدند. گزارشی که در سال ۲۰۰۴ منتشر شد نشان داد که خسارت انباری در کلیه محصولاتی که بعد از برداشت در سردخانه یا انبار قرار می گیرند عددی بین ۵ تا ۲۵ درصد است (۳). قارچ عامل کپک آبی سیب (*P. expansum*)، علاوه بر خسارت مستقیم و از بین بردن بافت میوه یکی از مهم‌ترین منابع تولید پاتولین می‌باشد، پاتولین مایکوتوکسینی است که اثرات سرطانزایی، سمی بودن و جهش زایی بالایی دارد و در میوه‌های سیب و هلوآلوده به این بیمارگر وجود دارد (۴). این بیماری یکی از بیماری‌های مهم و کلیدی بر روی سیب در داخل انبار است (۲). استفاده از قارچکش‌های شیمیایی یکی از سریع‌ترین راه‌های مبارزه با بیمارهای گیاهی است، اما آسیب به محیط زیست و سلامت انسان از یکطرف و مقامت عوامل بیماری‌زا به ترکیبات شیمیایی از طرف دیگر محققان را بر آن داشت که بهدنبال روشهای جایگزین جهت جلوگیری از آثار مخرب این ترکیبات باشند (۵).

عصاره‌های گیاهی ترکیباتی با منشا طبیعی هستند که آثار مخربی بر سلامت انسان ندارند، سریع تجزیه می‌شوند و تا حالا گزارشی مبنی بر مقاومت بیمارگرها نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی گزارش نشده است (۶). عصاره‌های گیاهی علاوه بر اینکه خاصیت ضدمیکروبی دارند قادرند بعضی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه را در برابر عوامل میکروبی از جمله قارچی فعال کنند. یکی از این مکانیسم‌های دفاعی افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند پراکسیداز، کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و ترکیبات فنلی است (۷). القای ساخته شدن آنزیم‌های دفاعی با افزایش بیان این ژن‌ها صورت می‌گیرد.

نظر به اینکه بیماری کپک آبی سیب یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پس از برداشت سیب می‌باشد و از طرفی تیمار سیب‌ها در انبار با سموم قارچکش باعث تهدید سلامت انسان و محیط زیست می‌شود، در نتیجه در این پژوهش تاثیر عصاره گیاهی گردو بر میزان علایم بیماری، القای تعدادی از آنزیمهای دفاعی گیاهی و همچنین ژن-های بیان‌کننده این آنزیم‌ها در سیب آلوده شده به این بیمارگر مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

رقم سیب: در این تحقیق از رقم سیب زرد (*Golden delicious*) استفاده شد. این رقم از باغهای سیب شهرستان سمیرم استان اصفهان که بهصورت ارگانیک و بدون مصرف آفتکش شیمیایی بودند تهیه شد.

تهیه زادمایه: ایزوله بیماریزای P1 قارچ *P. expansum* از آزمایشگاه گروه گیاه‌پزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت شدند. در شرایط سترون زیر هود لامینار مقداری از اسپور قارچ توسط یک اسکالپل استریل جمعآوری شده و در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و سپس با استفاده از دستگاه شیکر لوله (ورتکس) سوسپانسیون اسپوری تهیه شد. جهت بهتر پخش شدن اسپورها در آب مقطر به مقدار ۰/۵ درصد، Tween 20 به آب مقطر قبل از اتوکلاو شدن اضافه شد.

مواد گیاهی: در این تحقیق، از عصاره پوست سبز گردو استفاده شد، این قسمت از گیاه گردو ابتدا شستشوی سطحی شده و سپس بهوسیله هیپوکلریت سدیم ۲ درصد بهمدت ۵ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر سترون سه مرتبه شسته شدند (۸). نمونه‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش مستقیم نور آفتاب خشک شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

سپس پوست سبز گردوکه خشک شده بود، بهوسیله خردکن پودر شده و از الک یک مش عبور داده شدند (۹).

تهیه عصاره‌های گیاهی به دو روش استفاده از متانول (۱۰) و آب (۱۱) انجام شد.در روش استفاده ازمتانول، پنج گرم از ماده خشک گیاهی در ۱۰۰ میلیلیتر متانول خالص (شرکت Merck) خیسانده شد و بعد از ۲۴ ساعت ماده گیاهی همراه متانول در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل توسط پارچه ململ صاف شده و در rpm ۵۰۰۰ بهمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد،۷۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به یک استوانه مدرج منتقل شده، ۲۵ میلیلیتر آب‌مقطر سترون به آن اضافه شد تا حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسد، سپس هم حجم با آن هگزان اضافه شد. این مخلوط دو ساعت روی شیکر قرار داده شد، پس از این مرحله، بخش های مختلف به کمک دکانتور جدا شده و بخش متانولی جهت تبخیر متانول و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد.

در روش دوم بعد ازضدعفونی سطحی نمونههای گیاهی پنج گرم از ماده خشک گیاهی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون خیساندهشد وپس از ۲۴ ساعت از پارچهململ عبور داده شد و سانتریفوژ شد. در این مرحله بهمنظور سترون کردن عصاره آبی از صافی میکروبیولوژیک دو میکرونی استفاده شد.

تاثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت: در هر ظرف پتری که حاوی ۲۰میلیلیتر محیط‌کشت PDA بود، عصاره پوست گردو در غلظت‌های ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام (در حلال‌های آبیو متانولی) به محیطکشت اضافه شد. پلاکی از حاشیهکشت هفت روزه قارچ بیمارگر در مرکز ظروف پتری قرار داده شد و تا روز پنجم قطر میسلیومی آن اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل در شرایط سترون و در سه تکرارصورت گرفت و همه آزمایشها دو بار انجام شد (۴). درصد بازدارندگی رشد میسلیومی هر تیمار از فرمول زیر (۱) محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی رشد قارچ} = \frac{(A-B)}{A} \qquad \text{فرمول (۱)}$$

A: قطر کلنی در شاهد

B: قطر کلنی در تیمار

بررسی اثر عصاره ها در کنترل بیماری کپک آبی سیب در انبار ۴ درجه سانتی‌گراد: برای ضدعفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت‌سدیم ۲ درصد غوطه‌ور و سپس دوبار با آب سترون شستشو داده شدند و در نهایت بهمدت ۲۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند، سپس توسط یک میخ استریل سه سوراخ به قطرهای۱/۵ میلیمترو عمق ۳ میلیمتردر هر سیب ایجاد شد. ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچ بیمارگر با غلظت ۱۰۶ کنیدی در هر میلی لیتر آب مقطر سترون به محل زخم مایه‌زنی شد. پس از خشک شدن زخم‌ها میوه‌ها بهوسیله محلول‌های تهیه شده از عصاره‌ها با غلظت‌های یک، دو، چهار و شش در هزار (حلال‌های آبی و متانولی) محلول پاشی و در ظروف یکبار مصرف بسته بندی شده و تا پایان آزمایش در انباربا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی معمول در شرایط سترون نگهداری شد. بعد از طی دوره نگهداری زخم‌ها از نظر ایجاد پوسیدگی هر هفت روز یکبار، بررسی شده و قطر لکه‌ها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد. در این آزمایش برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد که هر تکرار شامل سه میوه بود. سیبهای محلول‌پاشی شده با توبین ۸۰ بدون اسپور قارچ به‌عنوان شاهد سالم در نظر گرفته شد (۵).

این آزمایش بهصورت آزمون فاکتوریل با دو فاکتور A و Bدر قالب طرح کاملا تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. فاکتور A شامل عصاره های مختلف و فاکتور B نیز شامل غلظت‌های مختلف عصاره است، که در آزمون-های مختلف دارای تعداد سطوح مختلف است.

بررسی برخی مکانیسم‌های دفاعی بیوشیمیایی گیاه: به‌منظور بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز و کاتالاز میوه‌های سیب تهیه شد و تیمارها و تمام مراحل دیگر این آزمایش مانند مایه زنی با عصاره آبی پوست سبز گردو و مایه‌زنی قارچ، همانند آزمایشات مربوط به انبار انجام شد بر روی میوه ها اعمال شدند، دمای انبار در مورد بررسی فعالیت آنزیمی و همچنین بررسی میزان بیان ژن های دفاعی ۱۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش در مورد عصاره های گیاهی بهصورت آزمون فاکتوریل با دو فاکتور A و B بر پایه طرح کاملا تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. هرکدام از این آزمایشات با تیمارهای مختلف یعنی تیمار عصاره‌های گیاهی تنها، عصارۀ گیاهی و قارچ بیمارگر، بیمارگر تنها و سیب سالم (فاکتورA)و در پنج روز (فاکتورB)که روزهای نمونه برداری شامل روزهای ۳، ۶، ۹ ،۱۲ و۱۵ انجام شد. در ضمن نمونه برداری قطر لکه‌های ایجاد شده روی میوه سیب در روزهای مختلف اندازهگیری شد و نیز میزان تغییرات آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و نیز تغییرات میزان بیان ژن‌های این دوآنزیم در روزهای نمونه‌برداری به صورت مجزا بررسی شد.

ارزیابی میزان پروتئین کل قابل حل در عصاره (روش برادفورد): برای محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیمهای مورد آزمون و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در بافت؛ میزان پروتئین تام موجود در نمونه‌ها به روش برادفورد تعیین شد (۱۲). این روش بر مبنای اتصال رنگ کوماسی بریلیانت‌بلو موجود در معرف بردفورد به مولکول پروتئین استوار است.

تهیه محلول پایه پروتئین استاندارد: برایتهیه منحنی استاندارد ابتدا محلول پایه پروتئین تهیه شد. پنج میلی-گرم از پروتئین استاندارد (ساخت کارخانه Fluka)در پنج میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH ۷ حل کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. پروتئین استاندارد مورد استفاده آلبومین سرم گاوی BSAفراکسیون پنج بود.

تهیه منحنی پروتئین استاندارد

مقادیر ۵، ۱۰، ۲۵ ،۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم از محلول BSA در آب مقطر سترون بهطور جدا گانه به سه میلیلیتر معرف بردفورد در لوله آزمایش (۵ میلیلیتری) اضافه و پس از مخلوط کردن کامل اجزای آزمایش، بلافاصله میزان جذب نور در طول موج λ =595nm max با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CECIL 9500، ساخت انگلیس) اندازه‌گیری شد. لوله-های حاوی صفرمیکرولیتر پروتئین استاندارد جهت صفر کردن دستگاه استفاده و هر کدام از تیمار ها در سه تکرار انجام گرفت و میانگین آن‌ها جهت تهیه منحنی استاندارد استفاده شد (۱۳). منحنی استاندارد و معادله رگرسیون بر اساس جذب نور هر کدام از غلظت‌ها محاسبه و ترسیم شد. برای تعیین میزان پروتئین کل عصاره مورد آزمایش، مقدار پنج میکرولیتر از عصاره هر نمونه با سه میلی‌لیتر محلول برادفورد کاملا مخلوط شد و تغییرات جذب نور در طول موج λ۵۱۵ =max توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد (۱۲). استخراج پروتئین از بافت گیاهی بهروش ریونی و همکاران انجام شد (۱۴).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (روش گنگ و همکاران): فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش ارائه شده توسط گنگ و همکاران (۱۳) اقتباس شده از دو و برام لاگ (۱۵) بهشرح زیر ارزیابی شد.

مقداری از عصاره که دارای ۴۰ میکروگرم پروتئین بود (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، با مقداری از بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH= ۷ به حجم دو میلی‌لیتر رسانده و سپس در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و دستگاه با آن کالیبره شد. سپس بهمیزان ۱۰۰ میکرولیتر از$H_2O_2$۳ درصدبه مخلوط واکنش اضافه و میزان جذب نور بهمدت ۲ دقیقه اندازهگیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس مقدار تجزیه شدنH_2O_2 اندازه گیری شد. جذب محلول ها در ۲۴۰ نانومتر نسبت به آب با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت شد.

فعالیت کاتالاز بر اساس میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی گرم پروتئین (ΔOD /Min./mg protein)در چهار تکرار اندازه گیری شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (روش ریونی و همکاران): دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای ۵۰ میلی‌گرم پروتئین باشد (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، ۵ میلی‌مولار گوئیکول و مقدار کافی بافر فسفات ۲۵ میلیمول pH= ۷ تا به حجم نهایی دو میلی لیتر برسد، در یک لوله آزمایش ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج ۴۷۰ نانومتر صفر شد. سپس ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۳۰ درصد به این مخلوط

www.SID.ir

Archive of SID

اضافه شد و سریعا تغییرات جذب نور بهفواصل ۱۰ ثانیه، بهمدت یک دقیقه اندازه گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (ΔOD /Min./mg. protein) (۱۴).

بررسی بیان ژنها: تیمارها مانند قسمت بررسی اثر عصاره ها در کنترل بیماری کپک آبی سیب در انبار ۱۵ درجه سانتی‌گراد) اعمال شدند. در این آزمون فقط از غلظت ۶×۱۰۰۰ عصاره پوست گردو استفاده شد.

در این تحقیق میزان بیان ژن دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز و ژن خانه‌دار فاکتور طویل ترجمه ۱ آلفا(Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha) استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱: توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های منتخب، مورد استفاده برای آزمون Real-time RT-PCR

نام ژن	توالی	دمای ذوب	اندازهٔ نوار
کاتالاز	5' TGGAGAGCATAAGTTAATAGA 3'-F	۵۵	۱۷۱
	5' AGTCGTGATGATGACTCTACT 3' -R	۵۶	
پراکسیداز	5' AGCTCAGAGGCCTCATCGCTGA 3'-F	۶۰	۱۷۰
	5' TACCGGCAGAGTGCCATGCG -R	۶۱	
گلوتاتیون S ترانسفراز	5' GGGATCTCAAAGGCAAAACA 3'-F	۵۹	۱۶۵
	5' AAAAGGGCTTGCGGAGTAAT -R	۵۸	

استخراج RNA : استخراج RNA از بافت میوه که در قسمت شرایط رشد و نمونه‌برداری آن‌ها توضیح داده شد، انجام گرفت. در این آزمون فقط از غلظت ۶×۱۰۰۰ عصاره پوست سبز گردو استفاده شد. این غلظت در آزمون‌های آزمایشگاهی و آزمون انبار بهترین نتایج را در برداشت. نمونه‌های بافتی از فریزر۷۰- سانتی‌گراد خارج شدند و بلافاصله در داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع قرار گرفتند و سپس در داخل هاون و نیتروژن مایع بهخوبی کوبیده شدند. استخراج RNA کل توسط کیت (RNXplus سیناژن، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و RNA های استخراج شده در دمای۲۰- سانتی-گرادنگهداری شدند.

برای ساخت cDNA از RNA استخراج شده از آنزیم رونویسی معکوس استفاده می‌شود. برای این منظور با استفاده از کیت RevertAid Reverse Transcriptase شرکتThermo Scientific استفاده و با استفاده از دستورالعمل شرکت اقدام به ساخت cDNA می‌شود.

بررسی الگوی بیان ژن های منتخب با روش Real time PCR: الگوی بیان دو ژن شامل ژن‌های پراکسیداز و کاتالاز با استفاده از روشReal time -PCR بررسی شدند. ژن TeF1α بهعنوان ژن خانه دار (House keeping gene)انتخاب شد. از RNA کل استخراج شد و بهعنوان الگو برای ساخت cDNA استفاده شد. پس از یکسان‌سازی غلظت RNA های مختلف، واکنش ساختcDNA بر طبق دستورالعمل کیت YTA SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (یکتاتجهیزآزما، ایران) انجام گرفت. الگوی بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر زمان واقعی(Corbett RG-6000)بررسی شد. برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها در طی نقاط زمانی از روش Livak استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰ درصد است و از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$بهمنظور بررسی تغییر بیان ژن استفاده شد (۱۶). میزان بیان ژن‌های دفاعی منتخب بر اساس (ژن-TEF 1αژن خانه دار) با بیان ثابت نرمال شده، سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه تیمارها نسبت به شاهد سنجیده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز آماری

نتایج بهدست آمده از Real time RT -PCR با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح خطای ۰/۰۵و با استفاده از نرمافزار SAS انجام گرفت.

نتایج

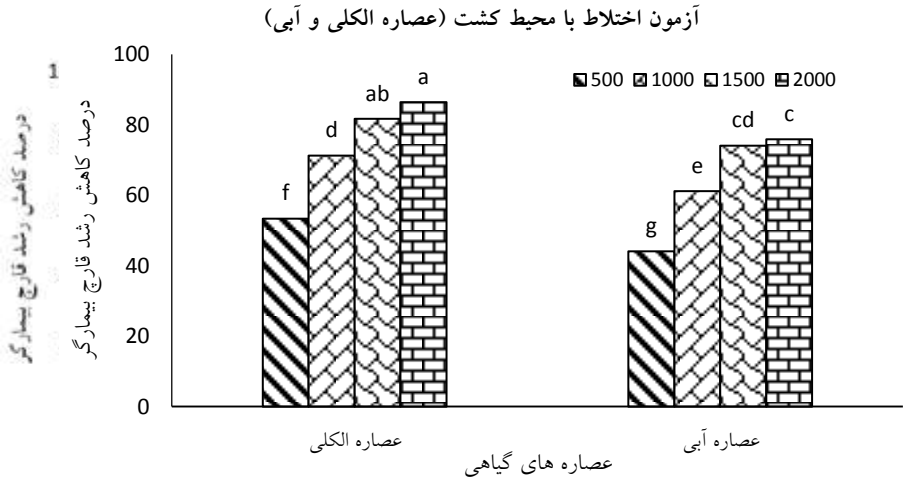
تاثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت

نتایج جدول۲تجزیه واریانس را نشان می‌دهد که به احتمال ۹۹ درصد بین دو حلال مورد استفاده و غلظتهای مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر کاهش میزان رشد هاله قارچ، به روش آزمون اختلاط با محیط کشت اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در این آزمون، عصاره متانولی پوست گردو با غلظت‌های ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام و با ۸۶/۴۱ و ۸۱/۶۵ درصد و عصاره آبی پوست گردو با غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام و ۷۲/۸۴ درصد، ممانعت از قارچ بیمارگر نسبت به شاهد به ترتیب بهترین غلظت‌ها بودند. کمترین درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر نسبت به شاهد، مربوط به غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام عصارهٔ آبی بود که میزان ۴۴/۱۲ درصد ممانعت از رشد نسبت به شاهد بود. د (نمودار ۱).

جدول ۲: تجزیه واریانس مربوط به آزمون تأثیر عصاره‌های آبی و متانولی پوست گردو بر میزان رشد قارچ بیمارگر P.expansum به روش استفاده از اختلاط با محیط کشت

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات	F
		آبی	متانولی
نوع عصاره (فاکتور A)	۱	۱۶۷/۱۰	۱۹۰/۲۰**
غلظت (فاکتورB)	۳	۴۸۰/۷۹	۴۹۷/۷۱**
نوع عصاره× غلظت(فاکتورA×فاکتورB)	۳	۲۵/۱۲	۵۶/۲۶**
خطای آزمایش	۱۶	۰/۴۱	
کل	۲۳		

** به احتمال ۹۹/۹۹ درصد ($p\leq0.01$) اختلاف معنیدار است.۵/۲۲ درصد=C.V، داده‌ها نرمال بودند.



نمودار ۱: تاثیر عصاره‌های آبی و متانولی پوست گرو بر میزان ممانعت از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر P. expansum به صورت درصد بازدارندگی در مقایسه با شاهد به روش اختلاط با محیط کشت. اعداد میانگین چهار تکرار است. عصاره‌های مختلف در غلظت‌های ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شدند.

www.SID.ir

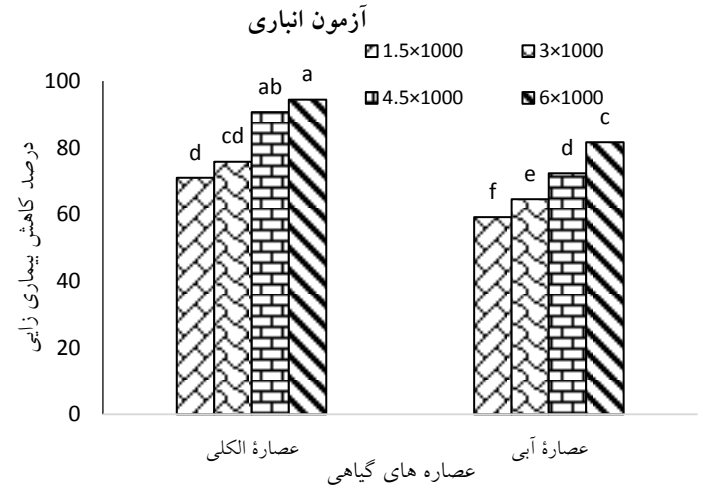
Archive of SID

بررسی اثر عصاره پوست گردو در کنترل بیماری کپک آبی سیب در انبار

نتایج جدول ۳تجزیه واریانسنشان می‌دهد که به احتمال ۹۹ درصد بین دو حلال آبی و متانولی مورد بررسی و غلظت‌های مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر میزان بیماری و کاهش درصد سطح لکه ایجاد شده بر روی سیب نسبت به شاهداختلاف معنی‌دار وجود دارد. در این آزمون، سطح لکه ایجاد شده در تیمار عصاره متانولی پوست گردو با غلظت شش در ۱۰۰۰ به میزان ۹۴/۵۰ درصد در مقایسه با شاهد کاهش نشان دادند، بهعبارت دیگر این غلظت از عصاره متانولی پوست گردو بیشترین کنترل کنندگی را در انبار از خود نشان دادند. کمترین درصد کنترل‌کنندگی سطح لکه نسبت به شاهد مربوط به تیمار ۱۰۰۰×۱/۵ عصاره آبی پوست گردو بهمیزان ۵۹/۶۸ درصد مربع در انبار بود. بیشترین میزان کنترل کنندگی سطح لکه سیب در بین غلظت‌های مختلف عصاره آبی پوست گردو از آن غلظت ۱۰۰۰×۶ با میزان عددی ۸۱/۶۹ درصد نسبت به شاهد بود که این مقدار نیز از غلظت ۴/۵ در هزار عصاره متانولی پوست گردو کمتر بود (نمودار ۲).

جدول ۳: تجزیه واریانس مربوط به آزمون تاثیر عصاره‌های آبی و متانولی پوست گردو بر میزان بیماری‌زایی قارچ بیمارگر *P. expansum* در انبار با دمای ٤ درجه سانتیگراد

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات	F
		آبی	الکلی
نوع عصاره (فاکتور A)	۱	۱۶۷/۱۰	۱۹۰/۲۰**
غلظت (فاکتورB)	۳	۴۸۰/۷۹	۴۹۷/۷۱**
نوع عصاره× غلظت(فاکتورA×فاکتورB)	۳	۲۵/۱۲	۵۶/۲۶**
خطای آزمایش	۱۶	۰/۴۱	
کل	۲۳		



نمودار ۲: تاثیر عصاره‌های آبی و متانولی پوست گردو بر کاهش میزان خسارت قارچ بیمارگر *P.expansum* به صورت کاهش میزان مساحت ناحیه آلودگی در انبار (سانتی‌متر مربع) ؛ اعداد میانگین چهار تکرار است. عصاره‌های مختلف در غلظت‌های ۱۰۰۰×۱/۵، ۱۰۰۰×۳، ۱۰۰۰×٤/۵ و ۱۰۰۰×۵ آب مقطر استفاده شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در سیب‌های تیمار شده در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد

با توجه به جدول ۴تجزیه واریانسمربوط به اثر غلظتهای مختلف عصاره پوست گردو بر روی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز طی روزهای مختلف نمونهبرداری نشان داد که بین پنج نقطه زمانی نمونهبرداری (فاکتورA)، سطوح مختلف غلظت‌های عصاره پوست گردو (فاکتورB)و اثرات متقابل زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و غلظت‌های مختلف عصاره پوست گردو (فاکتورA×فاکتورB) در مورد هر دو آنزیمپراکسیداز وکاتالازتفاوت معنی‌دار وجود دارد. مقایسه میانگین تیمارها بهصورت زیر است:

بر اساس اطلاعات نمودار ۳ بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به تیمار سیب آلودهٔ تیمار شده با غلظت ۶ در هزار عصاره گیاه پوست گردو بوده که در نهمین روز بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر این میزان فعالیت با میزان عددی ۲/۷۰ مشاهده شد، روند فعالیت این آنزیم تا روز نهم افزایشی و سپس کاهشی بود به این صورت که در روز پانزدهم بعد از آلوده سازی سیب ها با قارچ بیمارگر، میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۶ در هزار عصاره به کمترین میزان خود در بین روزهای نمونه برداری با میزان ۱/۹۰ رسید. تیمار غلظت ۶ در هزار همراه در تمام روزهای نمونه برداری (بهجز روز پانزدهم بعد از نمونه برداری) نسبت به همه تیمارهای دیگر دارای اختلاف معنی‌دار از نظر سطح فعالیت آنزیم بود. در کلیه روزهای نمونه‌برداری، فعالیت آنزیم در تیمار بیمارگر تنها بهصورت معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. بهغیر از روز دوازدهم در بقیه روزها میزان فعالیت آنزیم در تیمار بیمارگر تنها بیشتر از تیمار غلظت ۱/۵ در هزار عصاره پوست گردوبود و این اختلاف بهصورت معنی‌دار بروز پیدا کرد این مطلب نشان‌دهنده این موضوع است که تیمار ۱۰۰۰×۱/۵ قادر به افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با بیمارگر تنها نیست (نمودار ۴).

با توجه به نمودار ۴ میزان فعالیت آنزیم کاتالاز روندی مشابه با فعالیت آنزیم پراکسیداز را طی نمود. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به تیمار سیب آلوده تیمار شده با غلظت ۶ در هزار عصاره گیاه پوست گردو بوده که در نهمین روز بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر این میزان فعالیت با میزان عددی ۴/۵۶ مشاهده شد، روند فعالیت این آنزیم نیز افزایشی و کاهشی بود به این صورت که تا روز نهم میزان فعالیت آنزیم افزایش یافت و در روزهای دوازدهم و پانزدهم بعد از آلوده سازی سیب ها با قارچ بیمارگر، میزان فعالیت آنزیم ها در کلیه تیمارها کاهش پیدا کرد. تیمار غلظت ۶ در هزار همواره در تمام روزهای نمونه برداری نسبت به همه تیمارهای دیگر دارای اختلاف معنی‌دار از نظر سطح فعالیت آنزیم بود. در کلیه روزهای نمونه‌برداری، فعالیت آنزیم در تیمار بیمارگر تنها بهصورت معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. به غیر از روز نهم و دوازدهم اختلاف معنیداری بین غلظت ۱/۵ در هزار عصاره پوست گردو و تیمار بیمارگر تنها از نظر فعالیت آنزیم وجود نداشت،که نشان می‌دهد تیمار ۱۰۰۰×۱/۵ قادر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با بیمارگر تنها به صورت معنی‌دار نیست (نمودار ۴).

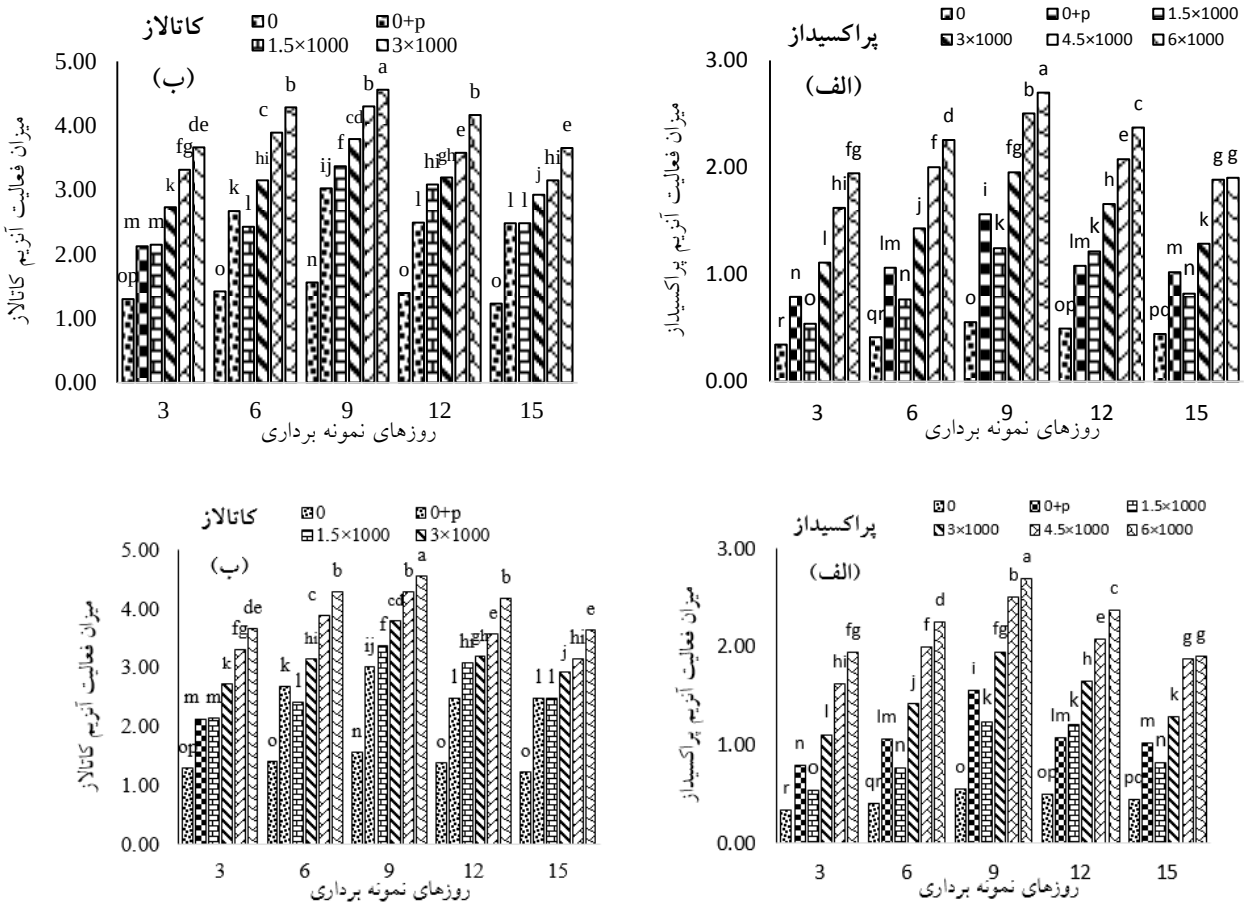
جدول ٤: تجزیه واریانس مربوط بهمیزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز (تغییرات جذب در دقیقه در میلیگرم پروتئین) در میوه سیب، مایه کوبی شده با غلظتهای مختلف عصاره گیاه پوست گردو و قارچ عامل بیماری P.expansum

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	کاتالاز	پراکسیداز
		F	
روزهای نمونه برداری (فاکتور A)	۴	۳۲۶/۷۶**	۶۵۷/۹**
غلظت‌های مختلف (فاکتور B)	۵	۱۹۷۷/۵۵**	۳۱۱۸/۷۱**
غلظت‌های مختلف × روز های نمونه برداری(فاکتورA×B)	۲۰	۱۶/۶۴**	۲۴/۶۵**
خطای آزمایش	۶۰		
کل	۸۹		

** به احتمال ۹۹/۹۹ درصد ($p\leq0.01$) اختلاف معنیدار است. ۳/۱۹ درصد=C.V، دادهها نرمال بودند.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (الف) و کاتالاز (ب) در تیمارهای مختلف (غلظت‌های مختلف عصاره پوست گردو ۱۰۰۰×۱/۵، ۱۰۰۰×۳، ۱۰۰۰×٤/٥ و ۱۰۰۰×٦) ، در میوه سیب، اعداد (تغییرات جذب در دقیقه در میلیگرم پروتئین) میانگین چهار تکرار هستند، و حروف مختلف نشان دهنده سطوح مختلف معنی‌داری هستند.

بررسی بیان ژن‌ها در برهمکنش میوه های سیب با عصاره پوست گردو و بیمارگر P. expansum

الگوی بیانی دو ژن کاتالاز و پراکسیداز با استفاده از روش کمی PCR زمان واقعی بررسی شد. میزان بیان ژن‌ها در این تحقیق با استفاده از روش کمیت سنجی نسبی و با کمک پرایمرها انجام شد (جدول ۱). در محاسبات، ژن خانه‌دار (House keeping)، (Translation Elongation factor (Tef1α بهعنوان مرجع در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از بررسی بیان این دو ژن در نقاط زمانی مختلف نشان داد که این ژن‌ها در زمان‌های مختلف و همچنین تحت تیمارهای مختلف تغییرات بیان نشان دادند.

برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها در طی نقاط زمانی از روش Livak استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰ درصد است و از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ بهمنظور بررسی تغییر بیان ژن استفاده شد (۱۶).

میزان بیان دو ژن بهصورت مقایسه سه تیمار عصاره تنها، بیمارگر تنها و ترکیب قارچ بیمارگر با عصاره گیاهی با با تیمار سیب‌های سالم تلقیح شده با آب مقطر بهتنهایی بیان شدند. به بیان دیگر میزان بیان ژن در این سه تیمار مذکور با سیب‌های سالم به تنهایی مقایسه شد. خلاصه داده‌ها (میانگین مربعات) مربوط به تجزیه واریانس میزان بیان ژن‌ها در جدول ۵ نشان داده شده است. پس از تجزیه واریانس برای هر ژن، میانگین مربوط بههر ژن با استفاده از روش دانکن مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها بهصورت نمودار بیان شده است.

بر اساس نتایج بهدست آمده از آزمون ارزیابی بیماری در تقابل با عصاره پوست گردو بر روی میوه سیب از غلظت ۴/۵ در هزار

www.SID.ir

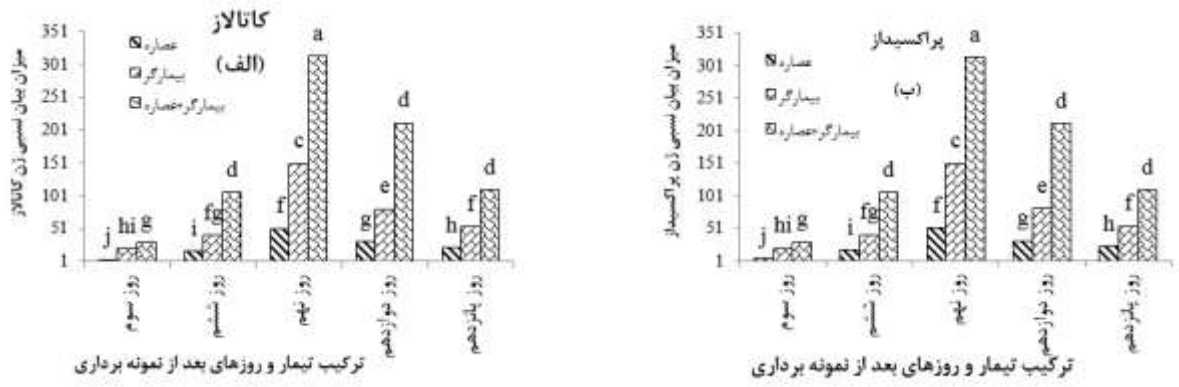
Archive of SID

عصاره پوست گردو در این آزمون استفاده شد.

جدول ۵: خلاصه تجزیه واریانس میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد بررسی درگیر در برهمکنش سیب، تحت تیمار های مختلف عصاره پوست گردو و بیمارگر *P. expansum*؛ میزان بیان ژن‌ها از تقسیم عدد تیرگی لکه‌ها مربوط به هر ژن بر عدد تیرگی ژن خانه‌دار بهدست آمده است.

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	کاتالاز	پراکسیداز
		F	
روزهای نمونه برداری (فاکتور A)	۴	۵۳۲/۱۰**	۴۶۹/۳۲**
تیمارها (فاکتور B)	۲	۲۲۶۳/۱۸**	۲۹۶۳/۱۸**
غلظت‌های مختلف × روز های نمونه برداری(فاکتور A×B)	۸	۱۷/۳۲**	۱۹/۹۸**
خطای آزمایش	۳۰		
کل	۴۴		

بر اساس نمودار ۵- الف میزان بیان ژن رمز کننده آنزیم کاتالاز در طول پانزده روز نمونه برداری، تا روز نهم افزایش در همه تیمارها نشان داد. بهعبارت دیگر روند تغییرات این آنزیم بهصورت افزایشی و کاهشی بود. بیشترین میزان بیان ژن آنزیم در تمام روزهای نمونهبرداری مربوط به تیمار ترکیب عصاره با بیمارگر بود و میزان این افزایش همواره در تمام روزهای نمونه برداری دارای اختلاف معنی‌دار با بقیه تیمارها بود. میزان بیان این ژن در تیمار بیمارگر تنها نیز همواره بیشتر از تیمار عصاره تنها بود و این اختلاف نیز در تمام روزهای نمونه‌برداری داشت. در مورد این آنزیم هم القا به‌وسیله عصاره بهتنهایی صورت گرفت ولی مانند ژن‌های بررسی شده قبلی باز این بیمارگر بود که در عمل القای ژن‌های دفاعی معنی‌دار بود. در مورد میزان بیان ژن این آنزیم‌ها مشاهده می‌شود که این آنزیم با بیمارگر بیشتر از عصاره گیاهی در میوه سیب القا شده است. بر اساس نمودار ۵ – ب میزان بیان ژن رمز کننده آنزیم پراکسیداز روندی مانند میزان بیان ژن کاتالاز داشت که در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفته بود. بیشترین میزان بیان ژن پراکسیداز را تیمار کاربرد توام بیمارگر و عصاره پوست گردو نشان داد و این تیمار همواره با بقیه تیمارها فاصله معنی‌داری داشت. بعد از این تیمار، تیمار کاربرد بیمارگر تنها قرار داشت و در رتبه سوم هم تیمار کاربرد عصاره تنها قرار موفق‌تر از عصاره عمل نمود. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نیز موید همین مطالب است.



نمودار ۵: الگوی بیان ژن رمزکننده آنزیم ژن کاتالاز (الف) و پراکسیداز (ب) در میوه سیب تحت غلظت‌های متفاوت عصاره پوست گردو روزهای مختلف پس از مایه‌زنی با بیمارگر. در حضور قارچ بیمارگر، در حضور عصاره گیاهی، و در حضور عصاره گیاهی و قارچ بیمارگر توامااا.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

سموم شیمیایی خطرات انکارناپذیری را بر سلامت انسان و سایر موجودات زنده دارند. این ترکیبات به آسانی در محیط زیست تجزیه نمی‌شوند، و برای مدت طولانی موجودات زنده ای که در معرض این ترکیبات قرار می‌گیرند را تحت تاثیر خود قرار میدهند. محققان بهدلیل مخاطرات بالایی که این گونه ترکیبات دارند همواره بهدنبال ترکیبات کم خطری هستند که دارای دوام کمی نیز در محیط زیست باشند. خاصیت تجزیه‌پذیری عصاره‌های گیاهی در طبیعت و سمیت پایین آن‌ها برای انسان و سایر موجودات زنده و همچنین نداشتن اثرات مخرب کمتر آن‌ها بر محیط‌زیست، این ترکیبات را بهعنوان ترکیبات جایگزین سموم شیمیایی مطرح کرده است. عصاره‌های گیاهی با داشتن مواد و عناصر غذایی در افزایش رشد گیاه مفید بوده و برای انسان و محیط زیست بی‌خطر هستند (۱۷). با توجه به نتایج بهدست آمده از آزمون اختلاط عصاره‌ها با محیط کشت مشخص شد که به طورکلی با افزایش غلظت عصارهها، میزان فعالیت ضدقارچی افزایش پیدا میکند. بیشترین میزان فعالیت قارچ‌کشی در آزمون اختلاط با محیط کشت مربوط به غلظت ۲۰۰۰ پیپی‌ام عصاره متانولی است. هر چه بر میزان غلظت عصاره پوست گردو افزوده می‌شود، میزان فعالیت قارچکشی آن نیز افزوده می‌شد. در مورد عصاره‌های آبی نیز بیشترین میزان فعالیت ضد قارچی مربوط به غلظت ۲۰۰۰پی‌پی‌ام بود، که این موضوع را می‌توان با تغییر در نوع حلال مرتبط دانست. زمانیکه از عصاره متانولی استفاده می‌شود احتمالا مواد ضدقارچی بیشتری از پوست گردو قابل استحصال خواهد بود، البته بهعلت خاصیت آبگیری که الکل دارد، خود الکل بهتنهایی نیز خاصیت ضدمیکروبی و قارچکشی دارد. کمترین میزان فعالیت ضد قارچی در مورد هر دو آزمون و همچنین هر دو نوع عصاره آبی و الکلی مربوط به غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام بود. در مطالعه ای که بهوسیله غلام‌نژاد (۱۸) با عنوان بررسی تاثیر عصاره‌های گیاهی بر علیه قارچ بیماری کپک خاکستری سیب با عامل *Botrytis cinerea* انجام شد نتایج نشان داد که به طورکلی با افزایش غلظت عصاره‌ها، میزان فعالیت ضدقارچی افزایش پیدا میکند. بیشترین میزان فعالیت قارچکشی مربوط به عصاره گیاه اسطوخودوس بود. عصاره این گیاه همراه با گیاه رازیانه و اکالیپتوس بیشترین اثر قارچکشی را بر قارچ بیمارگر *B. cinerea* از خود نشان دادند و هر چه بر میزان غلظت این ترکیب افزوده می‌شد، میزان فعالیت قارچکشی در هر دو آزمون در آزمایشگاه، یعنی استفاده از دیسک‌های کاغذی و روش اختلاط عصاره با محیط کشت، افزوده می‌شد.

در مورد آزمون انباری هر دو نوع حلال تاثیر معنیداری در کاهش این بیماری در مقایسه با شاهد داشتند. عصاره متانولی در این آزمون نیز قادر به کنترل بیشتر بیماری نسبت به عصاره آبی بود، که این مورد را میتوان هم به حلالیت بیشتر ترکیبات قارچکش در الکل مرتبط دانست و هم به خاصیت قارچکشی خود الکل به تنهایی. در مطالعه‌ای تاثیر اسانس سه گیاه دارویی ریحان، مرزه و آویشن شیرازی در مهار پوسیدگی بعد از برداشت سیب ناشی از قارچ *P. expansum* مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول با مخلوط کردن غلظت‌های مختلف اسانس با محیط کشتPDA ، تاثیر آنها بر رشد قارچ بررسی شد. در این آزمایش هر سه اسانس بیشترین و کمترین بازدارندگی از رشد را بهترتیب در غلظتهای ۲۰۰ و ۲۵ پی پی ام نشان داده و حداقل در غلظت ۲۰۰ پی پی ام نسبت به نمونه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بودند. در آزمایش دوم تاثیر آغشته کردن سطح میوه سیب با اسانس ها بر کاهش بیماری بررسی شد. نتایج نشان داد که تمامی غلظت‌ها باعث جلوگیری ازگسترش آلودگی در مقایسه با شاهد شدند و اسانس ریحان با غلظت ۲۰۰ پی پی ام و بهدنبال آن بقیه اسانس‌ها در همین غلظت، بیشترین

www.SID.ir

Archive of SID

نقش را داشتند. در نهایت تاثیر بخار حاصل از اسانس روی گسترش آلودگی در میوه سیب بررسی شد و نتایجی همانند روش آغشته سازی حاصل شد (۱۹).
با توجه به مطالعات انجام شده قبلی (۲۰، ۲۱) و بررسی اجزا و ترکیبات شرکت کننده در عصاره‌های گیاهی، نشان داده شد که فعالیت ضد قارچی عصارههای گیاهی به اجزای تشکیل دهنده آن‌ها بستگی دارد، بهطوری‌که یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا بهصورت هم‌افزایی با سایر ترکیبات فعالیت ضدقارچی عصاره را باعث شود تا در غلظت معینی تاثیر قابل قبولی داشته باشد و از طرفی دیگر نوع عصاره و غلظت‌های مختلف آن در میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ و خاصیت قارچکشی آن نقشی کلیدی دارد (۲۲). در مطالعه فرزانه وهمکاران (۲۰) با عنوان فعالیت ترکیبات شیمیایی ضد قارچی اسانس سه گونه از گیاه Artemisia بر روی عوامل بیماری زای خاکزاد نشان داد شد که گونههای *A. aucheri* و *A. sieberi* اثر قارچکشی قویتری دارند. در مطالعه‌ای تاثیر فعالیت قارچکشی ۱۲ عصاره گیاهی را در برابر قارچهای *Penecillium digitatum* ، *P. italicum* و *B. cinerea* بررسی شد. میوه های پرتقال با اسپور *P. digitatum* مایه زنی و با محلول ۰، ۷۵، ۱۵۰ و۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر روغن آوبشن اسپری شدند. نتایج نشان داد هیچ تفاوت معنی‌داری بین این تیمار و میوه‌ها با قارچ‌کش تیابندازول با غلظت ۲۰۰۰ میلیگرم بر لیترنداشت (۲۳).
بر اساس نتایج مطالعه سجادی و همکاران (۲۴) در عصاره کرفس کوهی(*kelussiaodoratissima*) ترکیباتی مانند تیمول، آنتولترانس، آنیسول نوننال و کارواکرول وجود دارد. کارواکرول موجب از بین رفتن غشا سلول میشود. بنابراین احتمالا اثر ضدمیکروبی این عصاره را میتوان به این خصوصیت نسبت داد. دامنه وسیعی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در انواع ترکیبات سلولی مربوط به گیاهان مختلف شناسایی شده است (۲۵). فعالیتهمزمان آنزیمهای کاتالاز (CAT) آسکوربات پراکسیداز (APX) مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR)، دهیدرو آسکوربات ردوکتاز (DHAR) و گلوتاتیون S ترانسفراز (GR) بهعنوان قسمتی از سامانه آنتیاکسیدانتی میتواند سلول را در مقابل گونههای فعال اکسیژن (ROS)حفاظت کند. (۲۶).

دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز از مهم‌ترین آنتی اکسیدانت‌ها هستند که باعث شکسته شدن پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به آب و مولکول اکسیژن میشوند (۲۷). در کلروپلاست آسکوربات پراکسیداز H_2O_2 تولید شده را از طریق چرخه آسکوربات گلوتاتیون سم‌زدایی می کند. در حقیقت APX با قدرت چسبندگی زیادی که با H_2O_2 دارد می‌تواند در رفع مسمومی به گیاه کمک کند (۲۸). با توجه به پیشرفت‌های گذشته متاسفانه هنوز سازوکارهای مولکولی و بیوشیمیایی درگیر در تحمل به شوری اغلب مورد شناسایی قرار نگرفته است. بنابراین نیاز به دستیابی اطلاعات کافی در زمینه اساس مولکولی و ژنتیکی مقاومت به تنش احساس می‌شود. این اطلاعات استراتژی‌های مناسبی را جهت دستکاری گیاهان و اصلاح آنها با استفاده از روش‌های مولکولی و اصلاح نباتات سنتی ایجاد خواهد کرد (۲۹).

از نتایج آزمایش مربوط به میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در میوه سیب چنین استنباط می‌شود که عصاره‌های گیاهی فعالیت آنزیم کاتالاز را در میوه سیب هم در حضور و هم در عدم حضور بیمارگر افزایش می‌دهد. حضور قارچ بیمارگر در کنار عصاره‌های گیاهی باعث افزایش بیشتر فعالیت آنزیم در مقایسه با کاربرد عصاره گیاهی بهتنهایی است. بهعبارت دیگر، قارچ بیمارگر باعث افزایش فعالیت آنزیم در سیب میشود و میزان این افزایش فعالیت آنزیم در مقایسه با عصاره

www.SID.ir

Archive of SID

تنها بیشتر است. نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار میوههای سیب با عصاره پوست گردو بر متابولیسم H_2O_2 تاثیر گذاشت و مقاومت را در گیاه میوه سیب القا کرد(۳۰). مخصوصا در شروع پیری فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت مانند کاتالاز کاهش می‌یابد و سوپراکسید یا پراکسید هیدروژن تا سطح سمیت افزایش مییابند (۳۱). کاتالاز همچنین الکترون‌هایی که می‌توانند منجر به تولید رادیکال آزاد سوپر اکسید آنیون شوند را از بین می‌برد (۳۲). در پژوهشی، تاثیر اسانس‌های گیاهان آویشن باغی، مورد و مرزه خوزستانی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره برخی میوهها مورد مطالعه قرار گرفت. عصاره میوههای موز، شلیل، گلابی، انگور، آلو، هلو، سیب لبنانی زرد و سیب لبنانی قرمز بهعنوان منبع آنزیم پراکسیداز بهکار برده شدند. نتایج نشان داد که اختلاف معنیداری در فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوههای مورد مطالعه در هر دو مرحله وجود دارد. در پژوهش حاضر، به‌طور کلی غلظت‌های بالاتر اسانس مرزه خوزستانی نسبت به اسانس آویشن باغی و مورد، فعالیت ضد اکسایشی بالاتری را در مراحل قبل و بعد از عصاره‌گیری نشان داد که احتمالا بهدلیل وجود کارواکرول بهعنوان مهم ترین ترکیب فعال بیولوژیکی موجود در اسانس مرزه خوزستانی است که دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی قابل توجهی است (۳۳). در پژوهشی القا مقاومت به باکتری سوختگی برنج پس از تیمار این گیاه با عصارههای مختلف گیاهی، از طریق اندازهگیری فعالیت های پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز، 1-3،β-گلوکاناز و پروتئین مرتبط با پاتوژن (PR) مورد بررسی قرار گرفت. عصارههای چهار گیاه *Azardirachta indica*، *Ages mermelos*، *Cassiaauriculata* و *Vitex negundo* علیه این باکتری در این بررسی استفاده شدند. بیماری سوختگی باکتریایی زمانی که در معرض عصاره گیاه قرار می گیرد، در مقایسه با عصاره گیاهان دیگر بیشترکنترل می‌شود. عصارهها آنزیمهای مربوط به دفاع مانند PPO، PO و 1-3،β-گلوکاناز را در قبل و بعد از تلقیح با *Xanthomonas oryzae* القا کردند. عصارهها باعث القای آنزیمهای مرتبط با سیستم دفاعی گیاه، مانند پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز در هر دو حالت قبل و بعد از مایه زنی با باکتری می‌شوند. بالا رفتن سطوح فعالیت آنزیم‌ها و پروتئین‌های وابسته به مرحله دوم اهمیت بستگی دارد. در این مطالعه عصاره آبی ومتانولی گیاه *V. negundo* بهترتیب ۷۶ درصد و ۷۳ درصد بیماری را کنترل کرد. به عبارت دیگر عصاره این گیاه هم تحت شرایط آزمایشگاهی و هم شرایط محیطی قادر به کنترل این بیماری می‌باشد (۳۴).

تولید گیاهان مقاوم بـه عوامـل بیمـاریزای گیاهی، از طریق انتقال ژنهـای رمزکننـده مواد ضد میکروبـی، روشی نویدبخش برای مبارزه بـا بیمـاری هـای گیـاهی اسـت (۳۵). با تولید گیاهان تراریخته که میزان بیان ژنهای کاتالاز، پراکسیداز، کیتیناز وگلوکاناز می‌توان ارقام مقاومی تولید کرد که نسبت به بیماری‌های گیاهی مقاوم هستند (۳۶). بیان همزمان دو یا چند ژن PR پروتئین اثر سینرژیستی بر روی یکدیگر داشته و باعث افزایش مقاومت گیاه و در نتیجه کنترل بهتر بیماری می‌شوند (۳۷). پیش نیاز تولید ارقام مقاوم شناسایی مکانیسم‌های گیاهی درگیر در واکنش به عوامل بیماری‌زا می باشد که منجر به ظهور مقاومت در ارقام مقاوم و حساسیت در ارقام حساس می‌شود. تحقیقات دیگر محققین نیز بر القاء سیستم دفاعی بهوسیله عصاره گیاهی و افزایش فعالیت آنزیمهای دفاعی از جمله پراکسیداز اشاره می کند (۳۸).

یک سری از پروتئینها و پپتیدها در گیاه بعد از تماس با بیمارگر بیان می‌شوند که تعداد بیشتری از این ترکیبات مستقیما خاصیت ضد میکروبی دارند. چنین پروتئین‌هایی با اثر بر روی غشای سلولی بیمارگرها، حفاظت بر علیه باکتریها، قارچها و ویروس‌ها را فراهم

www.SID.ir

Archive of SID

می‌کنند (۳۹). این پروتئین‌ها هم بهصورت سیستمیک و هم بهصورت موضعی در طی حمله عوامل بیماریزا در غلظت‌های بالاتری تولید می‌شوند و نقش مهمی در حفاظت گیاه بر عهده دارند (۴۰). چنین پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی، پروتئین‌های PR خوانده می‌شوند که شامل گروه مختلفی از پروتئینهای گیاهی‌اند. وجود پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی با مقاومت القایی ارتباط دارد (۴۱). در حال حاضر راه‌کار بیان‌پروتئین‌های ضد قارچی، مانند پروتئین شبه توماتین از طریق مهندسی ژنتیک که باعث اختلال در غشای سلولی بیمارگر می‌شود و همچنین پروتئین‌هایی که اثر سمی مستقیم روی عوامل بیماریزا یا کاهش رشد آنها دارند روز به روز در حال افزایش است (۴۲،۴۳).

عصارهٔ آبی گیاهی از تیرهٔ نعناعیان (*Ocimum gratissimum*)، در غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۴۰ و ۵۰ درصد باعث القای تولید فیتوآلکسین در کوتیلدونهای سویا و مزوکوتیل‌های سورگوم می‌شود. عصاره آبی همچنین باعث القای سیستمیک مقاومت در گیاه خیار نسبت به قارچ *Colletotrichum lagenarium* میشود، که این القا با کاهش ظهور بیماری و افزایش تولید کیتیناز همراه خواهد بود.

آنالیز و مقایسهٔ الگوی بیان ژن‌های پاسخ دهنده به عصاره گیاهی مانند پوست گردو بهعنوان ماده القاگر احتمالی سیستم دفاعی و تنش قارچ بیمارگر *P. expansum* هم در سطح (نسخه‌برداری) ترانسکریپتئومیکس و هم در سطح پروتئومیکس میتواند اطلاعات با ارزشی برای اصلاح گیاهان زراعی و باغی در اختیار اصلاح‌گران قرار بدهد. هدف از انجام این تحقیق بررسی تغییرات بیان ژن‌های درگیر در فرایند دفاعی در میوه سیب در برهمکنش با بیمارگر و عصاره پوست گردو است تا در مطالعات آینده با بررسی بیان ژن‌های القاشونده با تنش این بیمارگر و نیز عصاره گیاهی پایه‌های فیزیولوژیکی واکنش به این تنش بیشتر مورد شناسایی و ارزیابی قرار گیرد (۴۴).

با توجه به بالا رفتن بسیار زیاد بیان این ژن در میوهسیب بعد از اعمال تیمارهای موردنظر، این نکته تاکید می‌شود که اولا باید میزان اکسیژن‌های فعال در گیاه باید افزایش یابد تا میزان کاتالاز و پراکسیداز هم بالا رود و ثانیا میزان القا بسیار زیاد این ژنها نشان دهنده نقش موثر آن در مکانیسم‌های دفاعی بر علیه بیمارگرهاست.

نتیجه گیری

پدیده القای مقاومت در گیاهان با افزایش فعالیت آنزیمهای دفاعی گیاهی همراه خواهد بود که نمود بیرونی این برهمکنش کاهش شدت بیماری در گیاه می‌باشد. افزایش فعالیت پروتئینهای دفاعی به افزایش بیان ژن های متناظر این پروتئین‌ها صورت می‌گیرد. بهعبارت دیگر ژن های درگیر در واکنشهای دفاعی بهوسیله ترکیبات القاکننده، افزایش بیان پیدا می-کنند. محققان معتقدند هدف نهایی از کاربرد القاکنندههای سیستم دفاعی گیاهمهار کامل بیماری نیست وتنها کاهش خسارت ناشی از بیماریهای گیاهی با حداقل خسارت به منابع زیستی مورد نظر است. از اینرومیتوان ادعا نمود که القای مقاومت در گیاه یک فرایند امیدوارکننده در علم مدیریت بیماریهای گیاهی می‌باشد، به بیان دیگر القای مکانیسم های دفاعی در گیاهان، از طریق القاکنندهها، یک استراتژی جدید برای حفاظت از گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد. کاربرد عصارههای گیاهی بهعنوان القاکننده و یا قارچکش هنوز در مراحل ابتدایی پیشرفت خود میباشد، و باید تلاش محققان به سمت تجاری سازی و رساندن آن به‌دست زارعین به جای سموم شیمیایی باشد.

منابع

1.Janisiewicz, WJ, Korestent L. Biological control of postharvest disease of fruits. Annu. Rev. Phytophatol. 2002: 40(1): 411-441.

www.SID.ir

Archive of SID

2. Gholamnejad J, Etebarian HR, Sahebani NA, and Roustaee A. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Iran against blue mould of apple in order to reduce the environmental pollution. . Journal of International Environmental Application and Science. 2009; 4(1): 28-36.

3. Gholamnejad J, Etebarian HR, Sahebani N. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. African Journal of Food Science, 2010; 4: 001-007.

4. Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi goltapeh E, Safaei N,Razavi Kh. Effect of salicylic acid on enzyme activity in wheat in immediate early time after infection with *Mycosphaerella graminicola*. Scientia agriculturae bohemica, 2016; 47(1): 1-8.

5. Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi Goltapeh E, Safaei N, et al. The evaluation of salicylic acid effect on septorios disease by *Mycospharella graminicola*. Researches plant pathology. 2012; 2(2): 35-46. (in Persian).

6. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oilsA review. Food Chemistry Toxicology. 2008; 46(2): 446–475.

7. Daayf F, Platt HW, Mahuku G, Peters RD. Relationships between RAPDs, Gpiallozyme patterns, mating types, and resistance to metalaxyl of Phytophthora infestans in Canada in 1997. Am. J. PotatoRes. 1997; 78: 129–13.

8. Gholamnezhad J. 2018. Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. Journal of Integrative Agriculture.2018. 17(0): 1-10.

9. Abdulaziz A, Al-Askar Y, Rashad M. Efficacy of some plant extracts against Rhizoctonia solani on Pea. Journal of Plant Protection Research. 2010; 50(3): 239-243.

10. Bahraminejad S, Asenstorfer RE, Riley IT. Schultz CJ. Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots oats (Avena sativa L.). Journal of Phytopathology. 2008; 156: 1 - 7.

11. Azimi AA, Delnavaz HB, Mansour GA. Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of Sorghum bicoloragainst Fusarium solani, Fusarium poa in Persian. Journal of Medicinal Plants. 2006; 6(1): 26- 32.

12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72: 248-254.

13. Gong M, Li Y, Dai X, Tian M, et al. Involvment of calcium and calmodulin in the acquisition of HS inuced thermotolerance in maize seeding, Journal of Plant Physiology. 1997;150: 615-621.

14. Reuveni, R. Biochemical marker of disease resistance. In: Singh, R. P., and Singh, U. S.(Ed.) Molecular Methods in Plant Pathology. 1995: (pp. 99-114).

15. Du Z, Bramlage WJ. Peroxidative activity of apples peel in relation to development of poststorage disorders. HortScience. 1995; 30: 205-208.

16. Livak KL, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 -ΔΔCT T. METHODS. 2001; 25(4): 402–408.

www.SID.ir

Archive of SID

17. Wilkins KA, Bancroft J, Bosch M, Ings J, et al. Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self incompatibilityresponse of Papaver. Plant Physiology. 2011; 156(1): 404–416.

18. Gholamnezhad J. Effect of plant extracts against apple gray mold caused by Botrytis cinerea. Applied Microbiology in Food Industry. 2017; 3(4): 41-54.

19. Gholamnejad J, Etebarian HR, Roustaee, A. Sahebani N. Biological control of apple blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection research, 2009; 49:270-275.

20. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties, Clinical Microbiology Reviews. 2006; 19(1): 150-62.

21. Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Hadian J, Tehrani AS. 2010. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of Artemisia on some soilborne phytopathogens. Communication of Agriculture Appllied Biology Science. 2010:; 71(3b): 1327-1333.

22. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil Eugenia caryophyllata (Syzigium aromaticum L. Myrtaceae): a short review. Phytotherapy Research. 2012; 21(6): 501-506.

23. Arras G, Vsai M. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of thymus capitates oil and its effectin subatomospheric pressure condition. Journal of Food Protection. 2001; 64(7):1025-1029.

24. Sajjadi SE, Shokoohinia Y, Moayedi N. Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of kelussia odoratissima Mozaff. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2012; 7(4): 159-62.

25. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 2010; 48(12): 909–930.

26. Mirzaee M, Moieni A, Ghanati F. Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two Canola (*Brassica napus* L.) cultivars Tabacco. Agricultural Science Technology. 2013; 15(3): 593-602.

27. Yang T,PoovalahBW. Hydrogen Proxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium-calmodulin. PENAS. 2002; 99(6): 4097-4102.

28. Tewari RK, Hadacek F, Sassmann S, Lang I. Iron deprivation-induced reactive oxygen species generation leads to non-autolytic PCD in Brassica napus leaves. Environmental and Experimental Botany. 2013; 91(100):74–83.

29. Razavi, K, Mohsen-zadeh, S, Malbiibi, MA. molecular aspects of osmotic stresses. International Symposium on prospect of saline agriculture in the GCC countries, 18-20th of March, Dobai.Sairam RK, Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science. 2001; 86(3): pp. 407-421.

30. Kim YH, Khan AL, Waqas M, Shim JK, et al. Silicon application to rice root zone influenced the phytohormonal and antioxidant responses under salinity stress. Plant Growth Regul. 2014; 33: 137- 149.

31. Kiani SP, Maury P, Sarrafi A, Grieu P. QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (Helianthus annuus L.) under wellwatered and water-stressed conditions. Plant Sci. 2008; 175(4):565- 573.

www.SID.ir

32. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 2004: 9(10):490-498.

33. Ehteshamnia A, Rezaeinejhad AH, Musavizadeh SJ, Alikhani koopaei M. 2002. Investigation of Peroxidase Enzyme Activity in Some Fruits by Application of Thyme , Myrtle and Savoury Essential Oils. Plant production technology. 2002; 11(2): 33-42.

34. Nisha S, RevathiK,Chandrasekaran R, ArunachalamKirubakaran S,Michael S., Stout, M., Senthil-Nathan, S.Net al. Effect of plant compounds on induced activities of defense-related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. Physiological and Molecular Plant Pathology. 2012;80: 1-9.

35. Qin GZ, Tian SP, Chan, ZL, Li BQ. Crucial role of antioxidant proteins and hydrolytic enzymes in pathogenicity of Penicillium Expansum. Molecular and Cellular Proteomics. 2007; 6(3): 425–438.

36. Mackintosh CA, Lewis J, Radmer LE, Shin S, et al Overeexprssion of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium Head Blight. Plant Cell Report. 2007; 26:479–488.

37. Zhu Z. Molecular basis for jasmonate and ethylene signal interactions in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany, 2014: 65(20): 5743-5748.

38. Tian SP, Qin GZ, Xu Y. Survival of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. Postharvest Biology and Technology. 2004; 33: 327–331.

39. Butler JE, Hamilton WC, Sasser RG, Ruder CA, et al. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. Biol Reprod. 1982: 26(5):925–933.

40. Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Current Opinion in Plant Biology. 1999; 2: 280-286.

41. Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells:identification of a new member of pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. 2000: 42(3):479-488.

42.Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi goltapeh E, Safaei N. Razavi Kh. Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by Mycosphaerella graminicola, Iranian Journal of Plant Biology. 2016a; 8(30): 43-55.

43. Gholamnezhad, J. Transcriptomics and useful techniques of defense gene expression evalution of plant. Appllied biology. 2016b; 6(24): 21-42.

44. Colpas T. Freitas Schwan-Estrada,K.R., Stangarlin, J.R., Ferrarese, M.R., Scapim, C.R. Induction of plant defense responses by Ocimum gratissimum L. (Lamiaceae) leaf extracts Flávia. 2009; 35(3): 191-195.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2018; 9(2)

Original Article

Investigation of the peroxidase and catalase enzymes activity and expression level of it's encoding genes in pathogen stress (Penicillium expansum) and Walnut green skin extract condition in apple fruits

Zangoei E, Ph.D student[1], Bazgir E, Ph.D.[۲*], Gholamnezhad J, Ph.D.[۳], Darvishnia M, Ph.D.[۲]

1. Student of Plant Pathology, Department Of Plant Pathology, College of Agriculture, University of Lorestan, Lorestan, Iran
2. Department Of Medicinal plants, College of Agriculture, University of Lorestan, Lorestan, Iran
3. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Iran

* Email corresponding author: bazgir.ei@lu.ac.ir

Received: 6 Jul. 2018 Accepted: 25 Jul. 2018

Abstract

Aim: The aim of this study was to evaluate the effect of walnut green skin extract on blue mold apple, peroxidase activity and catalase activity, as well as the level of gene expression of these two enzymes.

Material and methods: In this study, extracts of green skin of walnut were used to control the apple blue mold caused by Penicillium expansum, in vitro and in vivo. Then, the effect of the aqueous extract of this plant on the activity and also expression of the genes of the two enzymes of peroxidase and catalase were evaluated .

Results: The results of the extract mixed with culture media tests showed the aqueous and methanolic extracts of green walnut skin inhibit with the rate of 86.41 and 75.84 percent of the fungal pathogen were respectively the best treatment in comparison with the control. In vivo test (the 4 ° C), the spot surface, in the treatment of aqueous and alcoholic extracts with a concentration of 6×1000, reduced 94.50 and 81.69%, respectively. In the test for the activity of peroxidase and catalase activity, the walnut skin extract increase the activity of these enzymes at 9th day. The results of enzymes genes expression showed that the expression of peroxidase and catalase genes was 227.66 and 314.08 fold on day 9, in the plant extract+ pathogen treatment, respectively .

Conclusion: The extract of walnut skin had direct fungal effects, and it can was induce the defense genes expression and subsequently increased activity of defense enzymes.

Keywords: Apple, Blue mold, Catalase, Gene expression, Peroxidase, Walnut skin

www.SID.ir