مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸، ص ۸۰-۶۸

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, p. 68-80

بررسی اثر ریبوفلاوین بعنوان فعال کننده مکانیسم‌های دفاعی گیاه برنج علیه بیماری‌های رایزوکتونیایی

پریسا طاهری* - سعید طریقی[۱]

تاریخ دریافت: ۸۶/۹/۲۷
تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۲۰

چکیده

در این مطالعه، نقش ریبوفلاوین (ویتامین B_2) بعنوان فعال کننده مکانیسم‌های دفاعی گیاه برنج علیه بیماری‌های رایزوکتونیایی مورد بررسی قرار گرفت. با کاربرد ریبوفلاوین، مقاومت سیستمیک در گیاه برنج علیه عامل بیماریزا و کاهش معنی داری در شدت پیشرفت بیماری در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده گردید. ریبوفلاوین فاقد اثر مستقیم بر رشد پاتوژن‌ها و فاقد خاصیت گیاه سوزی بود. لزوم وجود فاصله زمانی بین تیمار با ریبوفلاوین و مایه زنی گیاه برای کاهش پیشرفت بیماری نشانگر این است که ریبوفلاوین از طریق تحریک مکانیسمهای دفاعی گیاه و ایجاد مقاومت القایی قادر به حفاظت گیاه در برابر رایزوکتونیا می‌باشد. این مورد با بررسی بیان ژنهای دفاعی نظیر لیپوکسیژناز (*LOX*; lipoxygenase)، فنیل آلانین آمونیا لیاز (*PAL*; Phenylalanine ammonia-lyase)، و پراکسیداز (*PO-C1*; Cationic rice peroxidase) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده افزایش سطح بیان ژنهای *LOX* و *PO-C1* پس از تیمار با ریبوفلاوین و بویژه پس از مایه زنی با پاتوژن در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین بود. القاء مقاومت در گیاه حتی پس از گذشت ۲۰ روز از تیمار با ریبوفلاوین، نشانگر کارآیی این ویتامین در ایجاد مقاومت القایی بادوام تر نسبت به سایر عوامل محرک سیستم دفاعی گیاه می‌باشد. یافته‌های این تحقیق، نشان داد که استفاده از ریبوفلاوین بعنوان فعال کننده سیستم دفاعی گیاه، یک استراتژی نوین، ساده، و سازگار با محیط زیست است که امکان استفاده از آن در مدیریت مبارزه با بیماریهای رایزوکتونیایی برنج وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: رایزوکتونیا، برنج، ریبوفلاوین، مقاومت القایی، بیان ژنهای دفاعی

مقدمه

قارچهای رایزوکتونیا از عوامل بیماریزای مخرب بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌باشند. بیماری سوختگی غلاف ناشی از *Rhizoctonia solani* یکی از مهمترین بیماریهای برنج در دنیاست که موجب خسارت سالانه بیش از ۵۰ درصد می‌شود. سمیت واثرات محیطی زیانبار قارچکش‌ها و ظهور استرین‌هایی از عامل بیماری که به قارچکش‌ها مقاوم بوده اند، اهمیت بررسی سایر استراتژیهای موثر در کنترل این بیماری را بخوبی نمایان می‌کند. یکی از این استراتژیها، کاربرد مواد شیمیایی طبیعی یا مصنوعی بی خطر برای محیط زیست است. استفاده از ارقام برنج متراکم، پاکوتاه، حساس و کاربرد سطوح بالایی از کودهای نیتروژندار، خسارت ناشی از بیماریهای رایزوکتونیایی در نواحی برنج کاری دنیا را افزایش داده است. اگر چه مقاومت نسبی ژنتیکی علیه بیماری سوختگی غلاف در برنج گزارش شده، اما تاکنون هیچ ژنی بعنوان مسئول ایجاد مقاومت در برنج علیه این بیماری شناسایی نشده است (۱۴ و ۲۱). اکثر ارقام برنج کشت شده در بیش از ۹۰ درصد از نواحی برنج خیز دنیا حساس به این بیماری می‌باشند. بدلیل دامنه وسیع میزبانی عامل بیماریزا، تنوع ژنتیکی بالای آن، و سطح پایین مقاومت واریته‌های برنج به این بیماری و عدم وجود واریته‌های کاملا مقاوم، کنترل این بیماریها بسیار مشکل و نیازمند مبارزه تلفیقی است (۳۸). استفاده از مواد شیمیایی محافظت کننده و فعال کننده سیستم دفاعی گیاه بمنظور کاهش خسارت ناشی از این بیماریها از جمله روشهای مورد توجه محققین می‌باشد که در سالهای اخیر نتایج رضایت بخشی از کاربرد آنها در کنترل بیماریهای گیاهی مشاهده شده است.

گیاهان قادر به افزایش میزان مقاومت خود علیه عوامل بیماریزا می‌باشند. این پدیده بعنوان مقاومت القایی (Induced resistance) شناخته شده است که توسط برخی میکروارگانیسمها، مواد شیمیایی

۱- استادیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول : (Email: P-taheri@um.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

طبیعی و یا مصنوعی، و یا با ایجاد زخم در گیاه تحریک و فعال می‌گردد (۳۶). بر اساس مکانیسمهای مختلفی که در ایجاد این مقاومت دخیل اند، انواع متفاوتی از مقاومت القایی تعریف شده است (۳۹). سیگنال‌هایی همچون سالیسیلیک اسید (Salicylic acid; SA) ، جاسمونیک اسید (Jasmonic acid; JA) ، واتیلن (Ethylene; ET) ، همچنین مواد شیمیایی نظیر بنزو (۱، ۲و۳)- تیادیازول- N - کربوتیونیک اسید- S - متیل استر (BTH) ، و پروبنازول قادر به ایجاد مقاومت القایی سیستمیک موسوم به Systemic acquired resistance یا SAR در گیاهان مختلف علیه طیف وسیعی از پاتوژنها می‌باشند (۲۳ ، ۲۵ و ۳۷). پدیده SAR یک ایمنی فیزیولوژیکی با دامنه اثر وسیع است که ناشی از آلودگی موضعی به یک عامل بیولوژیکی ایجاد کننده نکروز، و یا کاربرد مواد شیمیایی تحریک کننده سیستم دفاعی گیاه می‌باشد (۲۰و ۳۰). این نوع از مقاومت القایی در ارتباط با مکانیسم‌های سیگنالی وابسته به افزایش تولید و تجمع سالیسیلیک اسید و پروتئین تنظیم کننده دفاع گیاه موسوم به Non pathogenesis related protein 1 (NPR 1) می‌باشد (۱۰) و در نتیجه موجب فعال سازی بیان ژنهای دفاعی گیاه که مسئول تولید پروتئین‌های دفاعی یا Pathogenesis related proteins (PR) هستند، می‌گردد و فعالیت ضد قارچی برای برخی از این پروتئین‌ها گزارش شده است (۴۴).

بررسی میزان بیان ژنهای دفاعی گیاه به‌عنوان یک فاکتور مهم در پاسخهای دفاعی SAR در برنج علیه پاتوژنهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۳۱ و ۳۴). نتایج این بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیان یک ژن لیپوکسیژناز موسوم به *RCI 1* (Rice chemically induced cDNA1) در برنج، در اثر کاربرد مواد شیمیایی فعال کننده سیستم دفاعی گیاه نظیر BTH و پروبنازول افزایش می‌یابد و باعث افزایش مقاومت گیاه برنج در برابر برخی عوامل بیماریزا می‌شود. همچنین بیان ژن دفاعی *RPR 1* (Rice probenazole responsive) در اثر تیمار گیاه برنج با پروبنازول گزارش شده است (۳۴).

نوع دیگر مقاومت در گیاهان موسوم به مقاومت سیستمیک القایی یا Induced systemic resistance (ISR) می‌باشد که توسط برخی استرین‌های غیر بیماریزای باکتریهای کلونیزه کننده ریشه و یا با کاربرد برخی مواد شیمیایی ایجاد می‌شود (۴ و ۲۸). در اکثر موارد، پدیده ISR مستقل از تولید و تجمع سالیسیلیک اسید و PR پروتئین‌ها می‌باشد و نیازمند پاسخهای دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید و اتیلن است (۲۶).

سیگنال‌های دفاعی نوینی در مکانیسم عملکرد برخی مواد شیمیایی فعال کننده پاسخهای دفاعی گیاه، دخیل شناخته شده اند. بعنوان مثال، مطالعات حمیدوزمان و همکاران (۱۸) نشان داد که مقاومت القایی ناشی از کاربرد بتا-آمینو بوتیریک اسید (β-amino buthyric acid; BABA) در انگور علیه *Plasmopara viticola* عامل بیماری سفیدک داخلی در ارتباط با سیگنالهای دفاعی مربوط به JA pathway و تولید سدهای دفاعی گیاه در برابر پاتوژن نظیر لیگنین و کالوز می‌باشد و ارتباطی با تولید و تجمع سالیسیلیک اسید ندارد.

مطالعات انجام شده در سالهای اخیر نشانگر این است که ویتامینها نه تنها بعنوان تنظیم کننده رشد در گیاه، بلکه بعنوان تحریک کننده مکانیسم‌های دفاعی گیاه علیه عوامل بیماریزا نقش مهمی ایفاء می‌کنند. بعنوان مثال، کاربرد منادیون سدیم بیسولفیت (Menadione sodium bisulphite; MSB) که یکی از مشتقات ویتامین K_3 می‌باشد، موجب تحریک و فعال شدن پاسخهای دفاعی گیاه تربچه بذر روغنی (Oilseed rape) علیه بیماری شانکر ساقه ناشی از قارچ *Leptosphaeria maculans* می‌شود (۹ و ۲۲) . همچنین کاربرد این ماده موجب ایجاد مقاومت القایی در موز علیه قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* عامل بیماری پژمردگی آوندی می‌گردد (۸).ویتامین دیگری که دارای اثرات حیاتی در انسانها، حیوانات، و گیاهان می‌باشد تیامین (ویتامین B_1) است. این ویتامین دارای نقش مهمی در تنظیم رشد و فعال سازی پاسخهای دفاعی گیاهان علیه عوامل بیماریزا می‌باشد. نتایج پژوهشهای اخیر نشانگر القاء مقاومت توسط این ویتامین درگیاه برنج علیه قارچ *Pyricularia oryzae* عامل بیماری بلاست و باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* عامل بیماری سوختگی برگ برنج ، و در گیاه آرابیدوپسیس علیه باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* عامل لکه برگی می‌باشد (۲ و۳). همچنین تیامین موجب افزایش مقاومت گیاه خیار علیه بیماری آنتراکنوز ناشی از *Colletotrichum lagenarium* وتحریک پاسخهای دفاعی و القاء مقاومت در تنباکو علیه بیماری ناشی از ویروس ابلقی ملایم فلفل (Pepper mild mottle virus; PMMoV) می‌گردد (۳).

ریبوفلاوین یک ویتامین محلول در آب است که در چرخه‌های تنفسی و تولید انرژی بعنوان کوآنزیم در واکنش‌های انتقال الکترون و تولید یا تخریب رادیکالهای اکسیژن در متابولیسم دخالت دارد. در آرابیدوپسیس و تنباکو با استفاده از ریبوفلاوین، مقاومت القایی و حفاظت نسبی علیه عوامل بیماریزای بیوتروف و نکروتروف قارچی، ویروسی و باکتریایی مشاهده شده است (۱۶). مقاومت ناشی از کاربرد این ویتامین در دولپه ایها در ارتباط با دخالت سیگنالهای مربوط به پروتئین کیناز و ژن *NPR 1* (که تنظیم کننده پاسخهای دفاعی گیاه در هر دو مورد SAR و ISR است) می‌باشد اما ارتباطی با تولید و تجمع سالیسیلیک اسید ندارد (۱۶). بعلاوه ، تیمار گیاهان برنج با این ویتامین و مشتقات آن موجب ایجاد مقاومت القایی سیستمیک علیه

Archive of SID

www.SID.ir

قارچ *Pyricularia grisea* عامل بیماری بلاست برنج شده است (۵).

در این مطالعه، اثر ریبوفلاوین در ایجاد مقاومت القایی علیه بیماریهای رایزوکتونیایی برنج در سطح سلولی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط آن با سیگنالهای دفاعی مختلف و بیان ژنهای دفاعی گیاه ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

رشد گیاه و تیمار با ریبوفلاوین

گیاه برنج از واریته IR-64 که یکی از واریته‌های حساس به بیماریهای رایزوکتونیایی می‌باشد در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. بذرهای این گیاه در پتری‌های حاوی کاغذ صافی استریل مرطوب با رطوبت نسبی ۹۵ درصد در انکوباتور با دمای $28C^{\circ}$ بمدت چهار روز خیسانده شدند. سپس ۳ بذر جوانه زده در هر گلدان پلاستیکی به قطر ۱۵ سانتی متر با خاک حاوی کمپوست (Klassman-Deilman, Geeste, Germany) و تحت شرایط گلخانه شامل دمای $30 \pm 4^{\circ}C$ و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در شبانه روز، کشت شدند. کوددهی گیاهان با استفاده از ۵ گرم سولفات آمونیم به ازاء هر متر مربع و در روزهای ۸، ۱۵ و ۲۲ پس از ظهور گیاهچه‌ها انجام شد. گیاهان چهار هفته‌ای (در مرحله چهار برگی از رشد) برای مایه زنی با رایزوکتونیا مورد استفاده قرار گرفتند. ریبوفلاوین از شرکت سیگما خریداری و در آب مقطر استریل حل شد. غلظتهای مختلف (۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و۱۰۰۰ میکرومولار) ریبوفلاوین در آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد Tween-20 بر روی بخشهای هوایی گیاه محلول پاشی شدند.

تهیه مایه تلقیح و مایه زنی غلافهای برنج

جدایه بیماریزای NL-84 از قارچ *R. solani* AG1-IA و جدایه بیماریزای KKD-1.33 از *R. oryzae-sativae* در محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار (Potato- dextrose- agar; PDA) در دمای $28C^{\circ}$ رشد داده شدند (۳۸) و در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت PDA در دمای $4C^{\circ}$ برای کوتاه مدت نگهداری شدند. نگهداری بلند مدت جدایه‌ها به روش فریز-درای کردن اسکلروتها انجام شد.

مایه تلقیح شامل قطعات دو سانتیمتری خلال دندان کلونیزه شده با میسلیوم قارچ بود (۳۸). هر قطعه خلال دندان در بین غلاف و ساقه ماشوره‌ای اولین برگ پایینی گیاه برنج در پنجه اصلی و درفاصله پنج سانتیمتری از سطح خاک قرار گرفت. برای هر تیمار، دوازده گیاه برنج با استفاده از طرح کاملا تصادفی مایه زنی شدند و آزمایش دو بار تکرار شد. یک قطعه خلال دندان کلونیزه نشده با پاتوژن، که بر روی محیط کشت PDA فاقد قارچ قرار داده شده بود، بعنوان کنترل منفی در تست‌های بیماریزایی مورد استفاده قرار گرفت. پس از مایه زنی، گیاهان فورا در گلخانه با رطوبت ۹۲ تا ۱۰۰ درصد قرار داده شدند. ارزیابی شدت بیماری با اندازه گیری طول علایم ایجاد شده در زمان‌های مختلف پس از مایه زنی گیاهان انجام شد (۳۵).

اثر ریبوفلاوین بر رشد عوامل بیماریزا

قارچهای *R. solani* و *R. oryzae-sativae* بر روی محیط کشت PDA حاوی غلظتهای مختلف ریبوفلاوین شامل ۱،۰ ،۱۰،۱۰۰ ،۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ میکرومولار کشت شدند. پس از ۶ روز رشد در انکوباتور با دمای $28C^{\circ}$ قطر کلونی قارچها اندازه گیری شد. در این آزمایش، برای هر قارچ در هر غلظت ریبوفلاوین، ۶ تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش دو بار تکرار گردید.

بررسی سیتولوژیکی مرگ سلولی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت

بمنظور ردیابی مرگ سلولی، گیاهان برنج با غلظتهای مختلف ریبوفلاوین (از۰ تا ۵۰۰۰ میکرومولار) اسپری شدند. سپس احتمال بروز مرگ سلولی ناشی از کاربرد ریبوفلاوین پس از گذشت پنج روز از تیمار، بطور میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان برنج تیمار نشده که با استفاده از قارچ نکروتروف *R. solani* ایجاد کننده مرگ سلولی، مایه زنی شده بودند بعنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند. برای ردیابی میکروسکوپی مرگ سلولی از روش رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شد (۱۰ و ۴۱). همه نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus U-MWB2) مشاهده شدند و تصاویر با استفاده از دوربین دیجیتال (Olympus Color View II Camera, Aartsellar, BA) گرفته شدند و پردازش تصاویر به کمک برنامه Olympus Analysis Cell F انجام شد.

بررسی طول مدت کنترل بیماری

بمنظور تعیین طول مدت محافظت از گیاهان بوسیله ریبوفلاوین، مایه زنی غلاف گیاهان برنج با قارچ *R. solani* در روزهای ۱،۳ ،۵ ،۱۰،۱۵ و ۲۰ پس از محلول پاشی گیاه با ریبوفلاوین به غلظت یک میکرومولار انجام شد و چهار روز پس از مایه زنی، میزان پیشرفت بیماری با اندازه گیری طول لکه‌ها ارزیابی شد. بیان ژنهای دفاعی برنج شامل *PO-C1*، *PAL*، و *LOX* در گیاهان مایه زنی شده (با نمونه برداری از پایین ترین برگ مربوط به پنجه مایه زنی شده گیاه) در زمانهای ۱ ، ۵ و ۲۰ بعد از تیمار، به روش RT-PCR بررسی گردید. نمونه‌ها بلافاصله پس از جدا شدن از گیاه در نیتروژن مایع قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا زمان استخراج RNA در فریزر با دمای ۸۰ − درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

(جدول ۱)- پرایمرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژنهای *PO-C1*، *PAL*، و *LOX*. ژن *actin* بعنوان کنترل در واکنش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت.

Primer	Gene	Accession number	Product size (bp)
5′-CGCTGACCAACATCGTCTGG-3′ (F)	*LOX*	D14000	404
5′-CACCTGTTCTTGAGCTTTC-3′ (R)	*LOX*	D14000	404
5′-CCGATGCGAGTTGTAACAGA-3′ (F)	*PAL*	X16099	168
5′-TGGTCAGAGACGACAGATCG-3′ (R)	*PAL*	X16099	168
5′-GACCAGGTGCTCTTCAACAA-3′ (F)	*PO-C1*	AF247700	342
5′-GGCAAATCTGCATGTACCAC-3′ (R)	*PO-C1*	AF247700	342
5′-CTGCGGGTATCCATGAGACT-3′ (F)	*actin*	X15865	154
5′-GGAGCAAGGCAGTGATCTTC-3′ (R)	*actin*	X15865	154

F= Forward, R=Reverse

انتقال سیستمیک پاسخهای دفاعی ناشی از ریبوفلاوین

بمنظور بررسی انتقال سیستمیک پاسخهای دفاعی ناشی ازکاربرد ریبوفلاوین، دو برگ پایینی هر گیاه با ریبوفلاوین یک میکرو مولار یا محلول ۰/۰۵٪ درصد از Tween ۲۰ در آب (کنترل یا Mock) اسپری شدند و در حین اسپری برگهای پایینی، قسمتهای بالاتر گیاه کاملا با پاکت پلاستیکی پوشانده شدند. پنج روز پس از تیمار، مایه زنی با *R. solani* در غلاف برگ تیمار شده و یا برگ تیمار نشده بالایی انجام شد. پیشرفت بیماری در روزهای اول، سوم، پنجم، و هفتم پس از مایه زنی با اندازه گیری طول لکه‌ها انجام گردید. میزان بیان ژنهای *PO-C1*، *PAL* و *LOX* در برگهای تیمار شده و تیمار نشده بالایی، یک روز پس از مایه زنی ارزیابی گردید.

استخراج RNA و بررسی بیان ژنها به روش RT-PCR

استخراج RNA از برگهای گیاهان برنج با استفاده از ماده شیمیایی TRIZOL (خریداری شده از شرکت Life Technologies, Rockville, MD, USA) انجام شد (۲۷). برای استخراج RNA از ۱۰۰ میلی گرم بافت گیاهی با افزودن یک میلی لیتر TRIZOL درهاون چینی عصاره گیری شد. سپس عصاره هر نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. به هر نمونه ۰/۲ میلی لیتر کلروفرم اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور x g ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. بخش مایع به لوله‌های جدید منتقل و به هر لوله ۰/۵ میلی لیتر ایزوپروپیل الکل افزوده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور g x ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. سپس شستشوی رسوب حاصل با افزودن یک میلی لیتر اتانل ۷۵٪ به هر نمونه انجام شد. در نهایت، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور g x ۷۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند و RNA در آب مقطر استریل فاقد RNase حل شد. پس از تیمار نمونه‌های RNA با RNase-free DNase (TURBO DNA-free kit) خریداری شده از شرکت Ambion (USA) بمنظور حذف DNA از نمونه‌های RNA، میزان RNA در هر نمونه بوسیله اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت نمونه‌های RNA در ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیم بروماید بررسی گردید. سپس DNA مکمل با استفاده از پرایمر oligo (dT) 18 و آنزیم SuperScript Reverse Transcriptase تهیه گردید. در مرحله بعد، پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای هر یک از ژنهای مورد بررسی که در جدول ۱ ذکر شده اند، مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

اختصاصی بودن هر یک از این پرایمرها برای بررسی بیان ژن مربوطه، بوسیله انجام آنالیز BLAST در NCBI مورد تایید قرار گرفت. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مراز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در دمای $94C^{\circ}$ ، سپس ۲۵ تا ۳۵ سیکل (شامل ۳۰ ثانیه در $94C^{\circ}$ ، ۳۰ ثانیه در $58C^{\circ}$ و یک دقیقه در $72C^{\circ}$) و در نهایت مرحله گسترش نهایی بمدت ۷ دقیقه در دمای $72C^{\circ}$ بود.

بمنظور تعیین تعداد سیکل مناسب برای بررسی بیان هر یک از ژنها، پس از ۲۰ ، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ سیکل، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز متوقف و محصول در ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز معکوس، نمونه‌های RNA که فقط با DNase تیمار شده بودند و فرآیند ساخته شدن DNA مکمل برای آنها انجام نشده بود (نمونه‌های RT–) نیز بعنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند تا احتمال آلودگی به DNA ژنومی در آنها بررسی گردد. RT-PCR دو بار تکرار شد. ارزیابی میزان بیان هر ژن با بررسی غلظت باندهای مربوط به بیان ژنها در نمونه‌های مختلف با استفاده از ژل آگارز یک درصد انجام گرفت و غلظت باند مربوط به بیان ژن در گیاه تیمار شده با ریبوفلاوین، با گیاه شاهد (که با محلول Mock تیمار شده بود) مقایسه گردید.

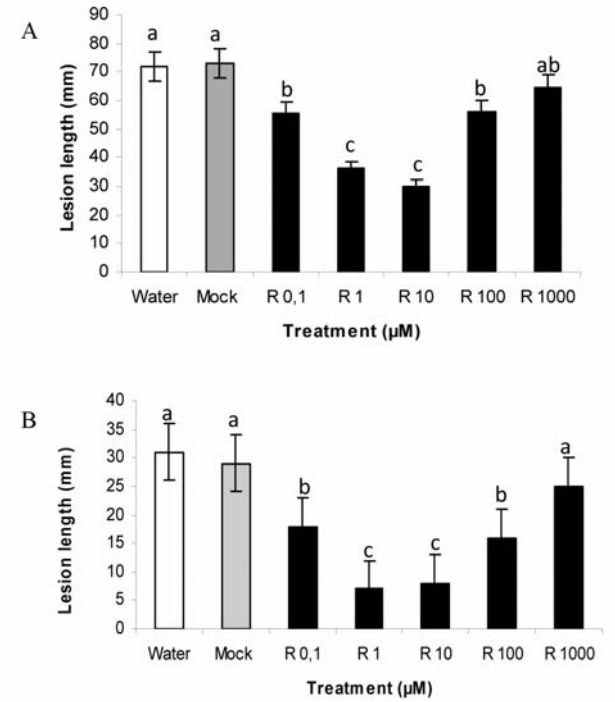
Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

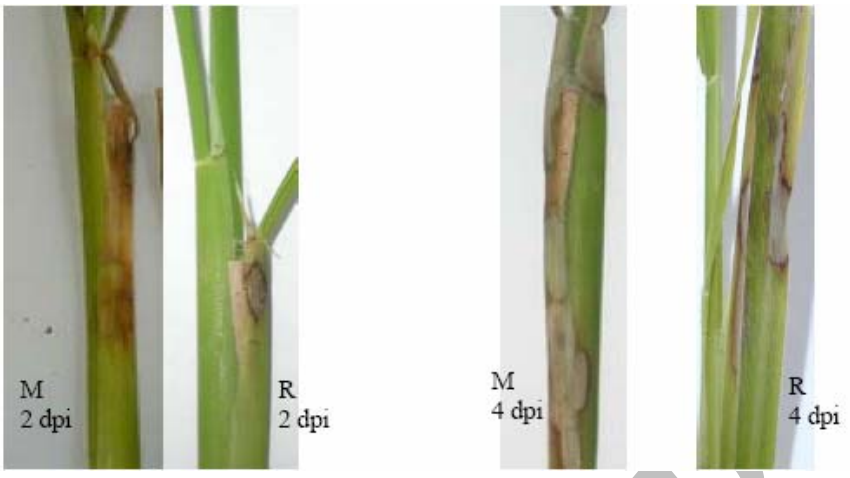
ایجاد مقاومت در گیاهان برنج علیه *R. solani* و *R. oryzae-sativae* با کاربرد ریبوفلاوین

کاهش معنی دار شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با کنترل در هر دو مورد مایه زنی با *R. solani* و یا *R. oryzae-sativae* قابل مشاهده بود (شکل ۱). تفاوت معنی داری بین طول لکه‌های ایجاد شده ناشی از هر یک از این عوامل بیماریزا بر روی گیاهان تیمار شده با محلول کنترل یا Mock در مقایسه با گیاهان تیمار شده با آب مشاهده نشد که نشانگر این است که تیمار با Mock هیچگونه تاثیری در آلودگی گیاه با این عوامل بیماریزا ندارد. بیشترین تاثیر ریبوفلاوین در حفاظت از گیاهان برنج علیه گونه‌های رایزوکتونیا در غلظتهای پایینی همچون ۱ و ۱۰ میکرومولار مشاهده گردید و میزان پیشرفت بیماری در گیاهان تیمار شده با این دو غلظت، تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشت. این نتایج نشانگر این است که غلظت ۱ میکرومولار، از موثرترین غلظتهای ریبوفلاوین برای ایجاد مقاومت در پاتوسیستم برنج–رایزوکتونیا می‌باشد و در آزمایشات بعدی برای ارزیابی بیشتر مکانیسم‌های سلولی و ملکولی دخیل در ایجاد مقاومت در این پاتوسیستم، می‌توان از این غلظت استفاده نمود. غلظت پایین تر مورد استفاده (۰/۱ میکرومولار)، سطح پایین تری از حفاظت گیاهان را در برابر این عوامل بیماریزا نشان داد. بالاترین غلظت ریبوفلاوین بکاررفته در این تحقیق (۱میلی مولار) اثر معنی داری در حفاظت از گیاهان برنج علیه گونه‌های رایزوکتونیا در مقایسه با کنترل نداشت (شکل ۱) که ممکن است بدلیل تحریک تولید رادیکالهای اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن درگیاهان تیمار شده با غلظتهای بالای ریبوفلاوین پس از مایه زنی پاتوژن باشد (مشاهدات اولیه نگارنده، داده‌ها ارائه نشده اند). تولید رادیکالهای اکسیژن منجر به ایجاد مرگ سلولی و در نتیجه تشدید فعالیت بیماریزایی قارچ نکروتروف رایزوکتونیا می‌شود و کاهش اثر ریبوفلاوین در حفاظت از گیاهان در برابر این بیمارگر را در پی خواهد داشت. این نتایج با مشاهدات اخیر سایر محققان در مورد نقش رادیکالهای آزاد اکسیژن در افزایش شدت بیماری ناشی از بیمارگرهای نکروتروف برنج نظیر *R. solani* عامل بیماری سوختگی غلاف و *Cochliobolus miyabeanus* عامل بیماری لکه قهوه‌ای مطابقت دارد (۳ و ۱۵).



(شکل۱)- تاثیر غلظتهای مختلف ریبوفلاوین بر روی پیشرفت بیماریهای رایزوکتو‌نیایی برنج واریته IR-64 در زمان چهار روز پس از مایه زنی. گیاهان برنج (۳٦ گیاه به ازاء هر تیمار، شامل ۱۲ گیاه برای هر تیمار در هر آزمایش و نهایتا با سه بار تکرار آزمایش). آزمایش در قالب طرح کاملا" تصادفی انجام شد. ریبوفلاوین در هر یک از غلظت‌های مورد بررسی (۰/۱ تا ۱۰۰۰ میکرومولار) بر روی گیاهان اسپری شد و سه روز پس از تیمار، مایه زنی با *R. solani* (A) و یا *R. oryzae-sativae* (B) انجام شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 12.0 بر اساس آنالیز Kruskal-Wallis و آزمون مقایسه‌ای Mann-Whitney در سطح P=0.05 انجام گردید. حروف مختلف نشان داده شده بر روی بارها نمایانگر اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف و یا غلظت‌های مختلف می‌باشند.

www.SID.ir



(شکل۲)- علایم بیماری سوختگی غلاف بر روی گیاهان برنج تیمار شده با ریبوفلاوین (R) با غلظت ۱ میکرومولار، یا کنترل (M) در ۲ یا ٤روز پس از مایه زنی (days post inoculation; dpi).

(جدول۲)- تاثیر ریبوفلاوین بر رشد قارچهای *R. solani* و*R. oryzae-sativae* در محیط کشت.

غلظت ریبوفلاوین (میکرومولار)	قطر کلنی *R. solani* (سانتی متر)		قطر کلنی *R. oryzae-sativae* (سانتی متر)	
0	8.2 ± 0.1	a[1]	4.9 ± 0.2	b[1]
0.1	8.2 ± 0.2	a	5.1 ± 0.1	b
1	8.1 ± 0.4	a	5.0 ± 0.1	b
10	8.3 ± 0.1	a	4.9 ± 0.3	b
100	8.0 ± 0.3	a	5.0 ± 0.2	b
1000	8.2 ± 0.1	a	4.8 ± 0.5	b
5000	8.0 ± 0.2	a	5.1 ± 0.1	b

هر عدد میانگین اعداد بدست آمده از ۱۸تکرار مربوط به ۳ آزمایش مستقل می‌باشد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 12.0 بر اساس آنالیز Kruskal-Wallis و آزمون مقایسه‌ای Mann-Whitney در سطح P=0.05 انجام گردید.

۱= حروف مختلف نشان داده شده نمایانگرمعنی دار بودن یا نبودن اختلاف بین اعداد بدست آمده می‌باشند.

درکاربرد غلظتهای مختلف ریبوفلاوین از طریق افزودن به خاک به همراه آب آبیاری نتایج مشابهی بدست آمد (داده‌ها ارائه نشده اند) اما میزان حفاظت گیاهان در برابر این عوامل بیماریزا در این روش در مقایسه با کاربرد ریبوفلاوین از طریق اسپری کردن گیاهان کمتر بود. پایین تر بودن سطح مقاومت در این روش می‌تواند بدلیل جذب و تجزیه مقادیری از ریبوفلاوین بوسیله ذرات خاک و میکروارگانیسم‌های موجود در خاک باشد که در نتیجه موجب جذب مقدار کمتری از این ویتامین توسط گیاه می‌شود.

ظهور سریعتر و پیش رونده تر علایم بیماری در گیاهان کنترل در مقایسه با گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین مشاهده شد (شکل ۲).

اکثر غلافهای برگ در تیمار کنترل، ابتدا علایمی شامل زخمهای تخم مرغی تا بیضی شکل به رنگ خاکستری مایل به سبز در اولین روز پس از مایه زنی نشان دادند. در مقایسه، حفاظت از گیاهان توسط ریبوفلاوین در گیاهان تیمار شده با این ویتامین کاملا مشهود بود. این گیاهان هیچگونه علایمی را در روز اول پس از مایه زنی نشان ندادند. علایم بیماری بر روی این گیاهان که شامل لکه‌های کوچک محاصره شده با حاشیه قهوه‌ای رنگ بود، در روز دوم و یا سوم پس از مایه زنی ظاهر گردیدند. این گیاهان در روز دهم پس از مایه زنی در گلخانه هنوز زنده و سرسبز بودند در حالیکه در همین زمان، گیاهان کنترل در اثر پیشرفت شدید بیماری سوختگی غلاف کاملا مرده بودند.

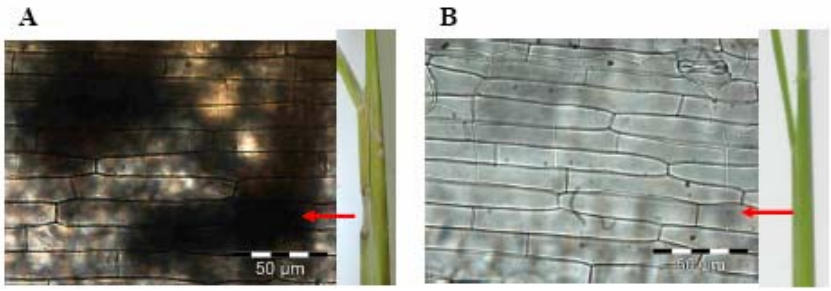
تاثیر ریبوفلاوین بر روی گونه‌های رایزوکتونیا و گیاهان برنج

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف ریبوفلاوین بر روی رشد گونه‌های رایزوکتونیای مورد استفاده در این مطالعه نشان داد که ریبوفلاوین در غلظت‌های۱۰، ۱۰۰،۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ میکرومولار افزوده شده به محیط کشت PDA هیچگونه اثر مستقیمی بر رشد قارچهای *R. solani* و *R. oryzae-sativae* نداشت (جدول ۲).

در ارزیابی اثرات احتمالی گیاه سوزی و مرگ سلولی ناشی از ریبوفلاوین در گیاهان برنج در غلظت‌های فوق، گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین فاقد هر گونه مرگ سلولی میکروسکوپی و ماکروسکوپی و یا هر گونه تغییر در رشد و وضعیت ظاهری بودند (شکل ۳).

Archive of SID

www.SID.ir



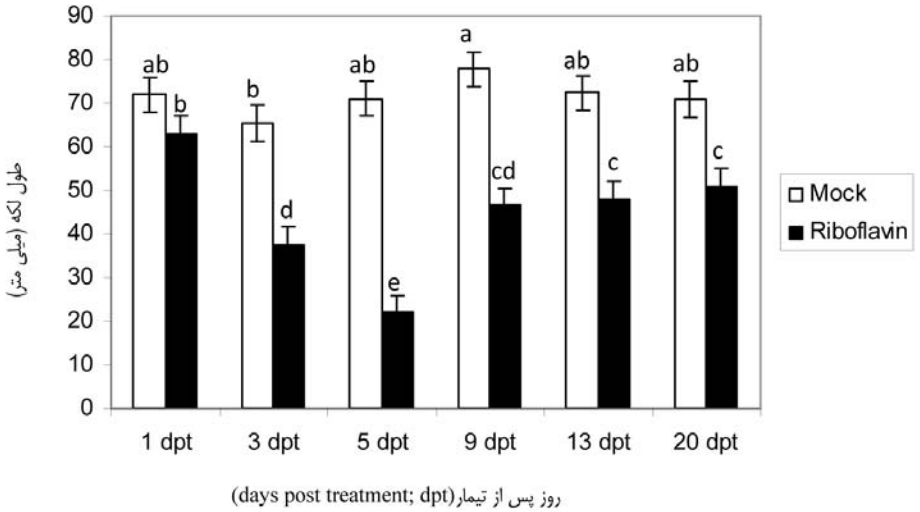
(شکل۳)- بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی گیاهان برنج مایه زنی شده با قارچ نکروتروف *R.solani* بعنوان کنترل مثبت برای ایجاد مرگ سلولی (A) در مقایسه با گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین (B). در رنگ آمیزی با تریپان بلو، سلولهای نکروزه شدیدا رنگ را جذب کرده و به رنگ تیره در تصویر A مشاهده می‌شوند.

عدم وجود اثر مستقیمی از ریبوفلاوین بر روی رشد قارچها در محیط کشت و عدم ایجاد گیاه سوزی بر روی برنج در غلظتهای مورد بررسی نشانگر این است که ریبوفلاوین دارای شرایط لازم برای یک ماده شیمیایی فعال کننده پاسخهای دفاعی گیاه می‌باشد (۲۰). این نتایج دارای تطابق با گزارش دانگ و بیر (۱۶) در مورد استفاده از ریبوفلاوین بعنوان فعال کننده سیستم دفاعی گیاهان دو لپه‌ای نظیر آرابیدوپسیس و تنباکو علیه عوامل بیماریزای مختلف (شامل *Peronospora parasitica* و *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* در آرابیدوپسیس، و *Alternaria alternate* و Tobacco mosaic virus در تنباکو) بدون تاثیر مستقیم به عوامل بیماریزا و یا اثر سوء بر روی گیاه می‌باشد.

ریبوفلاوین، گیاهان برنج در زمانهای مختلف پس از تیمار با ریبوفلاوین، با *R. solani* مایه زنی شدند. با توجه به شکل ۴، مقاومت القایی ناشی از ریبوفلاوین تا بیش از بیست روز دوام دارد. بهترین تاثیر ریبوفلاوین ، در گیاهان مایه زنی شده در روز پنجم پس از تیمار با ریبوفلاوین مشاهده گردید که نشان دهنده لزوم وجود فاصله زمانی بین تیمار با ریبوفلاوین و مایه زنی عامل بیماریزا برای تحریک و فعال سازی سیستم دفاعی گیاه توسط ریبوفلاوین می‌باشد. کاهش مقاومت القایی ناشی از ریبوفلاوین در گیاهان مایه زنی شده در روز دهم پس از تیمار با ریبوفلاوین مشاهده گردید، اما هنوز تیمار با ریبوفلاوین برای حفاظت از گیاه در برابر آلودگی به *R. solani* (تا بیش از بیست روز پس از تیمار) موثر بود.

ارتباط طول مدت دوام مقاومت القایی ایجاد شده توسط ریبوفلاوین با بیان ژنهای دفاعی گیاه

برای ارزیابی طول مدت دوام مقاومت القایی ناشی از کاربرد



(شکل ٤)- پیشرفت بیماری شیت بلایت بر روی گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین (R) یک میکرومولار و یا کنترل (M). مایه زنی در روزهای مختلف پس از تیمار انجام شد. تعداد تکرارها و روش آنالیز آماری داده‌های این آزمایش مطابق موارد ذکر شده برای شکل ۱ می‌باشد.

www.SID.ir

بنابراین، بررسی تاثیر ریبوفلاوین بر روی بیان ژنهای دفاعی عمده گیاه برنج در زمانهای مختلف پس از تیمار بمنظور ارزیابی مکانیسم‌های دخیل در ایجاد مقاومت القایی توسط ریبوفلاوین در تعامل بین برنج و رایزوکتونیا مهم و ضروری می‌باشد. بیان ژنهای لیپوکسیژناز(*LOX*) و فنیل آلانین آمونیا لیاز(*PAL*) که بترتیب مارکرهای اصلی مربوط به Octadecanoid pathway و Phenylpropanoid pathway می‌باشند مورد بررسی قرار گرفت تا دخالت آنها در مقاومت القایی ناشی از ریبوفلاوین در برنج ارزیابی گردد. همچنین بیان ژن پراکسیداز کاتیونی در برنج (*PO-C1*) که می‌تواند در تولید سدهای دفاعی گیاه در برابر عوامل بیماریزا و یا در ایجاد رادیکالهای اکسیژن و ایجاد واکنش فوق حساسیت دخیل باشد، بررسی گردید.

افزایش بیان هر سه ژن مورد بررسی در گیاهان برنج پس از مایه زنی با *R. solani* مشاهده شد که نشانگر دخالت هر سه ژن دفاعی مورد بررسی در مقاومت پایه گیاه برنج علیه این عامل بیماریزا میباشد. افزایش شدید بیان ژن *LOX* در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با گیاهان کنترل مشاهده گردید (شکل ۵). میزان بیان ژن *PO-C1* در گیاهان مایه زنی شده در روز پنجم پس از تیمار با ریبوفلاوین در مقایسه با گیاهان کنترل اندکی بیشتر بود. آنالیز ترانسکریپتوم تفاوتهای قابل توجهی را در بیان *PAL* در زمانهای مختلف پس از مایه زنی در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با کنترل نشان نداد.

ضرورت وجود فاصله زمانی بین تیمار با ریبوفلاوین و مایه زنی با بیمارگر ، برای کاهش شدت بیماری، بوضوح نشان دهنده این است که ریبوفلاوین با القاء مقاومت در گیاه برنج، این گیاه را در برابر قارچ *R. solani* محافظت می‌کند. این مورد با بررسی ژنهای دفاعی برنج تایید گردید. بطوریکه افزایش میزان بیان بویژه در مورد ژن *LOX* در زمانهای ۵ و ۲۰ روز پس از تیمار با ریبوفلاوین مشاهده شد. شدت بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با گیاهان کنترل بیشتر بود که این نتایج نشانگرتحریک بیان این ژن توسط ریبوفلاوین (و نه توسط قارچ بیمارگر) می‌باشد. بنابراین ، ژن *LOX* نقش عمده‌ای در القاء مقاومت گیاه برنج علیه قارچ نکروتروف *R. solani* ایفاء می‌کند. این نتایج تایید کننده نتایج بدست آمده توسط دانگ و بیر در سال ۲۰۰۰ می‌باشد. آنها نشان دادند که وجود فاصله زمانی بین کاربرد ریبوفلاوین و مایه زنی با بیمارگر برای افزایش بیان ژنهای دفاعی و در نهایت القاء مقاومت در گیاه ضروری می‌باشد (۱۶). بیشترین میزان بیان ژن *LOX* در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین که پس از گذشت ۵ روز از تیمار مایه زنی شده بودند، مشاهده گردید. این نتایج دارای ارتباط مستقیم با بیشترین میزان القاء مقاومت در گیاهان مایه زنی شده پس از گذشت ۵ روز از تیمار با ریبوفلاوین می‌باشد و نشانگر نقش عمده ژن *LOX* در بروز این مقاومت علیه *R. solani* است. نقش این ژن در مقاومت گیاهان علیه بیمارگرهای نکروتروف در پژوهشهای انجام شده توسط سایر محققان نیز مورد تایید قرار گرفته است. بعنوان مثال، در گیاه توتون برای بروز مقاومت علیه قارچ نکروتروف *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*، بیان این ژن ضروری می‌باشد (۲۷).

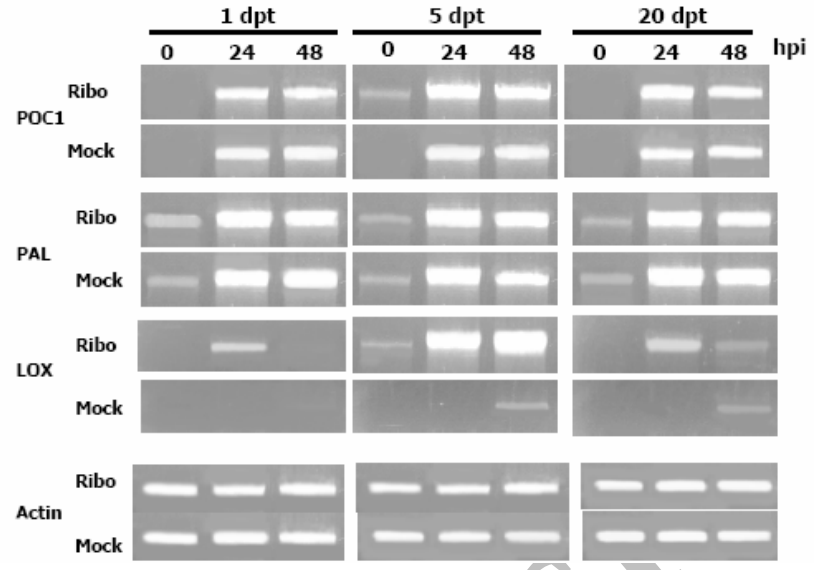
همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، افزایش موقتی در ژن *LOX* در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین و مایه زنی شده بعد از گذشت ۲۰ روز از تیمار، مشاهده شد. بطوریکه میزان بیان این ژن در زمان ۲۴ ساعت بعد از مایه زنی (24 hpi) افزایش یافته و سپس در 48 hpi شدیدا" کاهش یافته است. نتایج مشابه در مورد افزایش موقتی بیان ژنهای مختلف دفاعی گیاه در واکنشهای دفاعی گیاهان تک لپه‌ای و یا دو لپه ای، توسط محققان متعددی گزارش شده است (۲ ، ۳ ، ۱۸ و ۴۴). اما بطور کلی، بیان ژنهای دفاعی مختلف گیاهان در زمانهای مختلف پس از تیمار و مایه زنی یکسان نمی باشد.

در این پژوهش، سطح پایینی از بیان ژن *PAL* در تمام زمانهای مورد بررسی در گیاه کنترل و در گیاه تیمار شده با ریبوفلاوین مشاهده شد که این مورد دارای مطابقت با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان در مورد بیان این ژن در گیاه برنج می‌باشد (۴۲). بعد از مایه زنی گیاه با بیمارگر، افزایش شدید بیان این ژن هم در گیاه تیمار شده با ریبوفلاوین و هم در گیاه کنترل مشاهده شد. این نتایج نشانگر عدم وجود تفاوت بارز در بیان ژن *PAL* در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با گیاهان کنترل در زمانهای مختلف مورد بررسی می‌باشد و در اثر مایه زنی با بیمارگر بیان آن در گیاه افزایش می‌یابد. بنابراین، ژن *PAL* نقش عمده‌ای در مقاومت القایی ناشی از ریبوفلاوین در گیاه برنج ندارد. افزایش بیان این ژن در گیاه برنج پس از مایه زنی با *R. solani* در نتایج دیگر پژوهش‌های انجام شده در مورد مکانیسم‌های مقاومت طبیعی برنج علیه این قارچ بیمارگر گزارش شده است (۶) و پس از مایه زنی، شدت بیان این ژن بمدت چند روز افزایش و سپس به حد طبیعی کاهش می‌یابد.

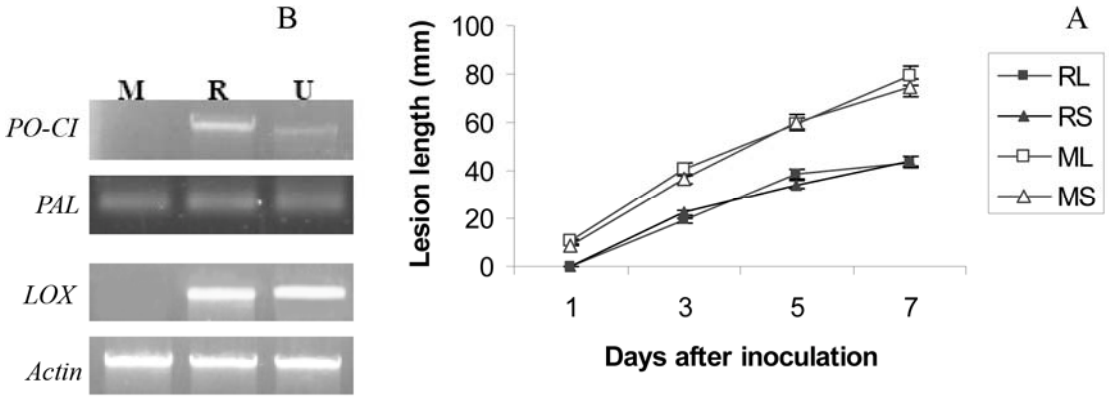
میزان بیان ژن *PO-C1* در زمانهای مختلف مورد بررسی در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین و گیاهان کنترل مشابه بود و تنها درگیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین که ۵ روز پس از تیمار، مایه زنی شده بودند، در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مایه زنی، افزایش در بیان این ژن در مقایسه با گیاهان کنترل مشاهده شد. این نتایج، که دارای ارتباط مستقیم با بیشترین میزان کنترل بیماری در گیاهان مایه زنی شده پس از گذشت ۵ روز از تیمار با ریبوفلاوین می‌باشند، نشانگر نقش این ژن در القاء مقاومت در برنج علیه *R. solani* است. همچنین نقش این ژن در مقاومت گیاه برنج علیه بیماری سوختگی باکتریایی ناشی از *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* و دخالت آن در تولید لیگنین در گیاه بعنوان یکی از مکانیسم‌های دفاع گیاه پس از حمله بیمارگر بخوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۹).

Archive of SID

www.SID.ir



(شکل ۵)- بررسی بیان ژنهای دفاعی *PO-C1*، *PAL* و *LOX* در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین ویا کنترل (Mock) و مایه زنی شده در روزهای اول، پنجم و بیستم پس از تیمار. ژن *Actin* بعنوان کنترل در واکنش‌های RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد.(days post treatment; dpt)



(شکل ٦)- اثرات سیستمیک ریبوفلاوین در القاء مقاومت در برنج علیه *R. solani* و تحریک بیان ژنهای دفاعی گیاه.

A. دو برگ پایینی گیاهان برنج با ریبوفلاوین(Riboflavin; R) به غلظت یک میکرومولار یا با محلول کنترل (Mock; M) محلول پاشی شدند. پنج روز پس از تیمار، مایه زنی عامل بیماریزا به صورت موضعی در محل غلاف برگهای پایینی تیمار شده (Locally; L) و یا در محل غلاف برگهای بالایی تیمار نشده (Systemically; S) انجام شد. طول لکه‌های ناشی از بیماری سوختگی غلاف برنج در روزهایاول، سوم، پنجم، و هفتم پس از مایه زنی اندازه گیری شد. هر طول لکه در هر روز (نشان داده شده در شکل ۶A) مربوط به میانگین طول لکه در ۳۶ گیاه (شامل ۱۲ تکراربرای هر آزمایش و نهایتا با سه بار تکرار آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی) است. بارها نشان دهنده انحراف معیار می‌باشند. B. اثر ریبوفلاوین بر روی بیان ژنهای دفاعی گیاه در برگهای پایینی تیمار شده با ریبوفلاوین (R) و برگهای بالایی تیمار نشده (U) در مقایسه با کنترل (M). آزمایش بررسی بیان ژنها دو بار با نتایج مشابه تکرار شد.

ارتباط اثرات سیستمیک ریبوفلاوین با افزایش بیان ژنهای دفاعی گیاه

بمنظور بررسی امکان سیستمیک بودن مقاومت القایی ناشی از کاربرد ریبوفلاوین، این ویتامین فقط بر روی برگهای پایینی گیاهان برنج محلول پاشی گردید. مایه زنی *R. solani* به برگهای تیمار شده و یا تیمار نشده بالایی نشان داد که مقاومت القایی ناشی از ریبوفلاوین بطور سیستمیک در سرتاسر گیاه پیشرفت می‌نماید، چراکه تفاوت معنی داری در طول لکه‌های ناشی از عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در برگهای تیمار شده در مقایسه با برگهای تیمار نشده در زمانهای مختلف پس از مایه زنی مشاهده نگردید (شکل A ۶).

Archive of SID

www.SID.ir

همانطور که در شکل B ۶ نشان داده شده، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در سطوح بیان ژن *PAL* در نمونه‌های مختلف تیمار شده با ریبوفلاوین و کنترل و یا در نمونه‌های مربوط به برگهای بالایی تیمار نشده گیاهانی که برگهای پایینی آنها تیمار شده بود، مشاهده نشد. عدم وجود تفاوت قابل ملاحظه در بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با گیاهان کنترل (تیمار شده با محلول Mock) دلالت بر عدم دخالت این ژن در مکانیسم‌های دفاعی فعال شده در اثر کاربرد ریبوفلاوین و مقاومت القایی ناشی از آن می‌کند.

در حالیکه افزایش قابل ملاحظه بیان ژنهای دفاعی *PO-C1* و *LOX* هم در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین (Riboflavin-treated; R) و هم در نمونه‌های مربوط به برگهای بالاتر تیمار نشده با ریبوفلاوین (Untreated; U) در زمان شش روز پس از مایه زنی مشاهده شد، اما این سطح از بیان ژنها برای نمونه‌های کنترل مشاهده نگردید (شکل B ۶). این نتایج نشانگر آن است که ریبوفلاوین در افزایش و تسریع و تقویت پاسخهای دفاعی گیاه که می‌توانند به بخشهای تیمار نشده گیاه نیز انتقال یابند موثر می‌باشد. همچنین افزایش شدید بیان ژن *LOX* در هر دوی گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین و نمونه‌های تیمار نشده نشانگر نقش عمده این ژن در مقاومت القایی ناشی از ریبوفلاوین در برنج علیه شیت بلایت می‌باشد. نقش مهم *LOX* در دفاع گیاهان علیه عوامل بیماریزا و آفات در مطالعات زیادی تشریح و گزارش شده است (۷، ۲۷ و ۲۸). فعالیت آنزیم *LOX*، حاصل از بیان ژن *LOX*، در ارتباط با مقاومت گیاه علیه عوامل بیماریزاست و فعالیت این آنزیم بوسیله مواد شیمیایی متنوعی که فعال کننده سیستم دفاعی گیاه می‌باشند از قبیل INA در برنج (۳۱ و ۳۳) و BABA در انگور (۱۸) افزایش می‌یابد. وظایف متعددی برای *LOX* در تعامل بین گیاه و عوامل بیماریزا شناخته و تشریح شده است. افزایش فعالیت *LOX* ممکن است منجر به تولید مولکولهایی نظیر هیدروپراکسیدها و رادیکالهای آزاد، مواد ضد میکروبی، و سیگنال‌هایی نظیر JA و مشتقات آن که موجب اثر بر بیان ژنهای دفاعی می‌شوند، گردد (۱۳).

جاسمونیک اسید بعنوان جزء اصلی Octadecanoid pathway، در پاسخهای دفاعی گیاه علیه حمله عوامل بیماریزا و یا تحریک ایجاد مقاومت دخیل است، که این فرآیند میتواند در ارتباط با تولید فیتوالکسین‌ها، تحریک و افزایش بیان ژنهای دفاعی گیاه، یا تشکیل سدهای دفاعی گیاه در نواحی آلودگی به عامل بیماریزا باشد (۱۷ و ۳۱). ژن *LOX* در هر گیاه دارای ایزوفرم‌های متعددی است و وظایف ذکر شده برای *LOX* ممکن است که توسط بیش از یک ایزوفرم *LOX* انجام شوند (۴۰).

بررسی‌های ما بر روی بیان ژن *13-LOX* در گیاهان برنج تیمار شده با ریبوفلاوین نشانگر سطوح بالای بیان این ژن پس از مایه زنی با *R. solani* در مقایسه با گیاهان کنترل می‌باشد که در ارتباط با ایجاد مقاومت القایی است. این نتایج تایید کننده یافته‌های محققین قبلی است که نشان داده اند که جاسمونات‌های تولید شده در اثر فعالیت *13-LOX*، سریعا پس از تیمار با مواد شیمیایی فعال کننده دفاع گیاه و یا مایه زنی گیاهان با عوامل بیماریزا تولید می‌شوند و موجب تحریک بیان ژنهای مختلف دفاعی و در نتیجه فعال سازی مکانیسم‌های دفاع در گیاهان می‌شوند (۱۱، ۱۲ و ۱۷). ایجاد مقاومت سیستمیک، همچنین افزایش سیستمیک بیان ژنهای دفاعی در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین نشانگر توانایی این ویتامین در فعال سازی سیگنال‌های دفاعی گیاه و در نتیجه تحریک ایجاد مقاومت در برنج علیه *R. solani* بود، همانطور که ایجاد مقاومت توسط ریبوفلاوین قبلا در دولپه ای‌ها گزارش شده است (۱۶).

بطور خلاصه، یافته‌های حاصل از این تحقیق نقش نوینی را برای ریبوفلاوین در فعال سازی سیستمیک پاسخهای دفاعی گیاه تشریح می‌نماید. کاربرد ریبوفلاوین موجب مقاوم شدن گیاهان برنج از طریق افزایش بیان ژنهای دفاعی نظیر *LOX* و *PO-C1* شد که بترتیب نشانگر نقش عمده Octadecanoid pathway و پراکسیداز در ایجاد مقاومت ناشی از ریبوفلاوین در این پاتوسیستم می‌باشد. کارآیی ریبوفلاوین در تحریک ایجاد مقاومت در گیاه برای بیش از بیست روز پس از تیمار، نشانگر این است که ریبوفلاوین یک فعال کننده موثر سیستم دفاعی گیاه است که در مقایسه با سایر عوامل محرک سیستم دفاعی گیاه، مقاومت القایی با دوام تری ایجاد می‌نماید. همراه با استراتژی‌های متداول برای کنترل بیماری‌های رایزوکتونیایی برنج نظیر استفاده از واریته‌های نسبتا مقاوم، کاربرد ریبوفلاوین می‌تواند یک روش نوین و بی خطر برای محیط زیست باشد که موجب تقویت مکانیسم‌های دفاعی گیاه و نهایتا کاهش شدت بیماری و خسارت حاصل از آن می‌شود.

منابع

1- Ahn I.P., Kim S., and Lee Y.H. 2005. Vitamin B_1 functions as an activator of plant disease resistance. Plant Physiol.. 138:1505-1515.

2- Ahn I.P., Kim S., Lee Y., and Suh S. 2007. Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and

Archive of SID

www.SID.ir

the NPR1 gene in Arabidopsis. Plant Physiol., 143:838-848.
3- Ahn P., Kim S., Kang S., Suh S.C., Lee Y.H. 2005. Rice Defense mechanisms against Cochliobolus miyabeanus and Magnaporthe grisea are distinct. Phytopathology, 95:1248-1255.
4- Audenaert K., Pattery T., Cornelis P., and Hofte M. 2002. Induction of systemic resistance to Botrytis cinerea in tomato by Pseudomonas aeruginosa 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. Mol. Plant-Microbe Interact., 15:1147-1156.
5- Aver'yanov A.A., Lapikova V.P., Nikolaev O.N., Stepanov A.I. 2000. Active oxygen-associated control of rice blast disease by riboflavin and roseoflavin. Biochem. Moscow, 65:1292-1298.
6- Bera S., and Purkayastha R.P. 1999. Multicomponent coordinated defence response of rice to Rhizoctonia solani causing sheath blight. Curr. Sci., 76:1376-1384.
7- Blee E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. Trends Plant Sci., 7:315-321.
8- Borges A.A., Borges-Perez A., and Fernandez-Falcon M. 2004. Induced resistance to Fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments. Crop Protec., 23:1245-1247.
9- Borges A.A., Cools H.J., and Lucas J.A. 2003. Menadione sodium bisuphite: a novel plant defence activator which enhances local and systemic resistance to infection by *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. Plant Pathol., 52:429–436.
10- Bowling S.A., Clarke J.D., Liu Y.D., Klessig D.F., Dong X.N. 1997. The cpr5 mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. Plant Cell, 9:1573-1584.
11- Creelman R.A., Mullet J.E. 1997 a. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:355-381.
12- Creelman R.A. And Mullet J. E. 1997b. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. Plant Cell, 9:1211-1223.
13- Croft K.P.C., Juttner F., and Slusarenko A. J. 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolical*. Plant Physiol., 101:13-24.
14- Dasgupta K. 1992. Rice sheath blight: the challenge continues, in: V.S. Singh, A. Mukhopadhyay, J. Kumar, A.S. Chambe (Eds.), Plant Diseases of International Importance, Diseases of Cereals and Pulses, vol. 1, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.
15- De Vleesschauwer D., Cornellis P., and Höfte M. 2006. Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 triggers syestemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. Mol Plant-Microbe Interact., 19:1406-1419.
16- Dong H., and Beer, S.V. 2000. Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. Phytopathology, 90:801-811.
17- Farmer E.E. 1994. Fatty acid signaling in plants and their associated microorganisms. Plant Mol. Biol., 26:1423-1437.
18- Hamiduzzaman M.M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J.M., and Mauch-Mani B. 2005. Beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. Mol. Plant-Microbe Interact., 18:819-829.
19- Hilaire E., Young S.A., Willard L.H., McGee J.D., Sweat T., Chittoor J.M., Guikema J.A., and Leach J.E. 2001. Vascular defense responses in rice: Peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. Mol. Plant-Microbe Interac., 14:1411-1419.
20- Kessmann H., Staub T., Hofmann C., Maetzke T., Herzog J., Ward E., Uknes S., and Ryals J. 1994. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. Ann. Rev. Plant Pathol., 32:439–459.
21- Kumar K.K., Poovannan K., Nandakumar R., Thamilarasi K., Geetha C., Jayashree N., Kokiladevi E., Raja J.A.J., Samiyappan R., Sudhakar D., and Balasubramanian P. 2003. A high throughput functional expression assay system for a defence gene conferring transgenic resistance on rice against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. Plant Sci., 165:969-976.
22- Liu S.Y., Liu Z., Fitt B.D.L., Evans N., Foster S.J., Huang Y.J., Latunde-Dada A.O., and Lucas J.A. 2006. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *Leptosphaeria biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. Plant Pathol., ,55:401-412.
23- Mondal A.H., Nehl D.B., and Allen S.J. 2005. Acibenzolar-S-methyl induces systemic resistance in cotton against black root rot caused by *Thielaviopsis basicola*. Aust. Plant Pathol., 34:499-507.
24- Nishioka M., Nakashita H., Yasuda M., Yoshida S., Yamaguchi I. 2005. Induction of Resistance against rice bacterial leaf blight by 3-chloro-1-methyl-1*H*-pyrazole-5-carboxylic acid. J. Pestic. Sci.30:47–49.
25- Oostendorp M., Kunz, W., Dietrich B., and Staub T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. Eur. J. plant Pathol., 107:19-28.
26- Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., van Pelt J.A., Knoester M., Laan R., Gerrits N., Weisbeek P.J., van Loon L.C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell, 10:1571-1580.

Archive of SID

www.SID.ir

27- Rance, I., Fournier, J. and EsquerreÂ-TugayeÂ, M.T. 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. Proc. Natl.
28- Raupach G.S., Liu L., Murphy J.F., Tuzun S., and Kloepper J.W. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Plant Dis., 80:891-894.
29- Royo J., LeÂon J., Vancanneyt G., Albar J.P., Rosahl S., Ortego, F., Castanera, P. and Sanchez-Serrano, J. J. 1999. Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. Proc. Natl Acad. Sci. USA ,96:1146-1151.
30- Ryals J.A. , Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y., and Hunt M.D. 1996. Systemic acquired resistance. Plant Cell, 8:1809-1819.
31- Schaffrath U., Zabbai F., Dudler R. 2000. Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. Eur. J. Biochem., 267:5935-5942.
32- Schaller F. 2001. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. J. Exp. Bot. 52:11–23.
33- Schweizer P., Buchala A., and Metraux, J.P. 1997. Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2, 6- dichloroisonicotinic acid. Plant Physiol., 115:61-70.
34- Shimono M., Yazaki J., Nakamura K., Kishimoto N., Kikuchi, S., Kubo, N., Kadowaki, K., Mochizuki, A., Yamamoto K., Sasaki T., and Nishiguchi, M. 2000. Analysis of gene expression in rice plants treated with an inducer of disease resistance, probenazole using DNA microarray. Ann. Phytopath. Soc. Jpn., 66:115–116.
35- Singh A., Rohilla R., Singh U.S., Savary, S., Willocquet, L., Duveiller, E. 2002. An improved inoculation technique for sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Can. J. Plant Pathol., 24:65-68.
36- Sticher L., MauchMani B., and Metraux, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. Ann. Rev. Phytopathol., 35: 235-270.
37- Suo Y., Leung D.W.N. 2001. Induction of resistance to *Diplocarpon rosae* and *Agrobacterium tumefaciens* by acibenzolar-S-methyl (BTH) in rose. J. Plant Dis. Protec., 108:382-391.
38- Taheri P., Gnanamanickam, S., and Höfte, M. 2007. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases. Phytopathology, 97:373-383.
39- Van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., and Ton, J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:5602-5607.
40- Veronesi C., Rickauer M., Fournier J., Pouenat, M.L., and EsquerreTugaye M.T. 1996. Lipoxygenase gene expression in the tobacco *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* interaction. Plant Physiol., 112: 997-1004.
41- Yin Z. C., Chen J., Zeng L. R., Goh, M. L., Leung, H., Khush, G. S., and Wang, G.L. 2000. Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broadspectrum resistance to rice blast and bacterial blight. Mol. Plant-Microbe Interact., 13:869-876.
42- Zhu Q., Dabi T., Beeche A., Yamamoto R., Lawton M.A., and Lamb, C. (1995). Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. Plant Mol. Biol., 29:535-550.
43- Zhu T., Song F., and Zheng Z. 2006. Molecular characterization of the rice pathogenesis-related protein, OsPR-4b, and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. J. Phytopath., 154:378-384.
44- Zimmerli L., Jakab, C., Metraux J.P., and Mauch-Mani B. 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by beta-aminobutyric acid. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:12920-12925.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, p. 68-80

مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸، ص ۸۰-۶۸

A study on the effect of riboflavin as a defense activator in rice against Rhizoctonia diseases

P. Taheri* - S. Tarighi[1]

Abstract

In this study, the role of riboflavin (vitamin B_2) as a defense activator in rice plant against Rhizoctonia diseases was investigated. Following application of riboflavin, rice plants developed systemic resistance to the pathogen and riboflavin did not have any direct effect on the growth pathogens and did not cause phytotoxicity on plants. The necessity of the time interval between riboflavin application and inoculation of pathogen for reduction of disease progress clearly indicates that riboflavin protects rice against *R. solani* by inducing plant defense responses and induction of resistance. This case was further confirmed by investigating the expression of defense genes, including cationic rice perroxidase (*PO-C1*), phenylalaninr ammonia-lyase (*PAL*), and lipoxygenase (*LOX*). Results revealed elevated levels of *LOX* and *PO-C1* expression in riboflavin-treated plants especially after inoculation with the pathogen. Induction of resistance in plant even after 20 days post-treatment with riboflavin reveales that the vitamin is effective for induction of more durable resistance compared to other activators of plant defense system. Our findings demonstrate that using riboflavin as a plant defense activator is a new, simple, and environmentally safe strategy that could be used to control Rhizoctonia sheath diseases of rice.

Key words: *Rhizoctonia* spp., Rice, Riboflavin, Induced Resistance, Expression of Defense-Related Genes

Archive of SID

(* - Corresponding author Email: P-taheri@um.ac.ir)
1- Assistant Professors, Department of Crop Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

www.SID.ir