Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 1، بهار 1392)

بررسی بیان ژن های مرتبط به بیمارگر و فعالیت آنزیم های موثر در القای مقاومت به سفیدک پودری کدو توسط اسید سالیسیلیک

رویا ضیغمی‌نژاد[1]، غلامرضا شریفی‌سیرچی[2*]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[2] استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

چکیده

گیاهان در فرآیند پرایمینگ با بروز سریع پاسخ‌های دفاعی باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنش‌های محیطی و غیرمحیطی می‌شوند. سفیدک پودری کدو با عامل *Podosphaera xanthii (Sphaerotheca fuliginea)* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کدوییان در گلخانه و مزرعه محسوب می‌گردد. به منظور بررسی بیان ژن *PR-1* و فعالیت آنزیمی، تحت تأثیر پرایمینگ در القای مقاومت به بیماری سفیدک پودری کدو، آزمایشی در قالب طرح کاملاًتصادفی در شش تکرار انجام شد. در این مطالعه از اسید سالیسیلیک در دو غلظت نیم و یک دهم میلی‌مولار و آب مقطر به عنوان کنترل استفاده گردید. گیاهان تیمار شده پس از 24 ساعت با 50 میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ (با غلظت 10^5کنیدیوم در میلی لیتر) به روش لکه‌گذاری مایه‌زنی گردیدند و تحت شرایط گلخانه‌ای نگهداری شدند. نتایج آزمایش فنوتیپی نشان داد که بین تیمارها، دو سطح SA (0/1 و 0/5 mM) و کنترل اختلاف معنی داری در سطح احتمال 0,01 وجود دارد و دو تیمار مذکور سبب ایجاد مقاومت القایی گردیده اند. نتایج آنالیز مولکولی نشان از افزایش بیان ژن *PR-1* در 24، 48 و 72 ساعت بعد از مایه زنی داشت. نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاهان تحت تنش نشان داد که غلظت‌های نیم و یک دهم میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به طور معناداری باعث افزایش فعالیت GPX، 48 و 72 ساعت پس از مایه‌زنی و فعالیت PAL 72، 168 و 240 ساعت بعد از مایه‌زنی می شوند.

واژه های کلیدی: *القای مقاومت، اسید سالیسیلیک، سفیدک پودری کدو ، PR-1، آنتی‌اکسیدانت‌ها .*

[*] نویسنده مسئول: غلامرضا شریفی سیرچی تلفن: 0341-3202638 Email: sharifi-sirchi@hormozgan.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پروتئین‌های مرتبط به بیمارگر[1] گروه متنوعی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در پاسخ به حمله‌ی بیمارگرها بیان می شوند (Redolfi, 1983; Van Loon, 1989). یکی از شناخته شده ترین پروتئین‌های PR، پروتئین PR-1 (ضد قارچی و ضد اامیستی) است که فراوان ترین گروه از پروتئین‌های PR می باشند که دو درصد از کل پروتئین های برگ را تشکیل می دهند (Agrios, 2005). این پروتئین‌ها به طور طبیعی در گیاهان وجود دارند و با حمله عوامل بیمارگر یا تنش های محیطی میزان تولید آنها افزایش می‌یابد. سفیدک پودری کدو که توسط قارچ *Podosphaera xanthii* (syn: *Sphaerotheca fuliginea*) ایجاد می شود یک بیماری جدی و فراگیر در کدوئیان می‌باشد (Jahn *et al.*,2002). امروزه استفاده از ترکیبات قارچ‌کش به دلیل عدم کارایی صد در صد، آلودگی محیط زیست و ایجاد مقاومت در بیمارگر چندان مورد توجه قرار نمی گیرند. مقاومت به قارچ کش ها در جمعیت سفیدک پودری کدو در استرالیا (O'Brien, 1994) و آمریکا (Paulus *et al.*, 1976) گزارش شده است. از این‌رو کاربرد ترکیبات طبیعی (عصاره های گیاهی) و شیمیایی نظیر اسید سالیسیلیک (SA) و بتاآمینوبوتیریک‌اسید (BABA) که می‌توانند مقاومت را به صورت سیستمیک درگیاهان القا نمایند، از اهمیت خاصی برخوردارند. مهم‌ترین سیستم های القای مقاومت در گیاهان مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) و مقاومت سیستمیک القایی (ISR) می‌باشند. القای SAR نیاز به تجمع مولکول های SA دارد که منجر به تحریک فعالیت ژن‌های پاسخ دهنده به بیمارگر خواهد شد (Hammerschmidt *et al.*, 2001). در پژوهشی نشان داده شده که کاربرد خارجی SA، از طریق افزایش بیان ژن های *PR* منجر به ایجاد مقاومت به سفیدک پودری در آرابیدوپسیس خواهد شد (Stein *et al.*, 2008). به طور کلی کاربرد خارجی SA در گیاهان، سبب القای مقاومت نسبت به انواع مختلف بیمارگرهایی که تاثیر خود را از طریق تولید گونه های اکسیژن فعال، تأثیر بر دیواره‌ی سلولی و کم و زیاد کردن بیان ژن های مقاومت اعمال می کنند، می شود (Oostendorp *et al.*, 2001). آنزیم های مرتبط به بیمارگر شامل پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز و دیگر پروتئین هایی است که پس از حمله ی بیمارگر افزایش بیان نشان می دهند. این آنزیم ها منجر به افزایش مقاومت گیاه به حملات بعدی بیمارگر می شوند. فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) اولین و مهم ترین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئید می باشد، که سنتز بنزوئیک اسید، اسید سالیسیلیک و دیگر فنل های وابسته به دفاع گیاه را منجر می شود. PAL تبدیل L- فنیل آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می کند. سینامیک اسید به‌عنوان یک پیش ماده برای فنولیک‌ها، لیگنین و فورانوکومارین، فیتوآلکسین‌ها

[1] Pathogenesis-related protein

www.SID.ir

Archive of SID

و دیگر متابولیت‌های پایین‌دست عمل می‌کند. فعالیت PAL در طی اثر متقابل گیاه – بیمارگر و عوامل غیر بیماری زا نظیر شرایط محیطی القاء می شود. گایاکول پراکسیداز (GPX) از اکسیداسیون ترکیبات فنلی مثل گایاکول برای سم زدایی و تجزیه آب اکسیژنه استفاده می کند. فعالیت PAL و POX به سرعت تحت تاثیر محرک ها و حمله ی بیمارگر افزایش می یابد. در پاسخ به *Rhizoctonia solani* در لوبیا چشم بلبلی تیمار شده با SA فعالیت PAL و POX افزایش نشان داد (Chandra *et al.*, 2007). از این رو در تحقیق حاضر به منظور کاهش اثرات مخرب قارچ کش ها بر سلامت موجودات زنده و محیط زیست، از تأثیر اسید سالیسیلیک به عنوان ماده ی القا کننده مقاومت در کدو نسبت به بیماری سفیدک پودری استفاده گردید. بدین منظور فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت PAL، GPX و CAT و همچنین بیان یکی از ژن های مقاومت (*PR-1*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه و کشت بذر

در این مطالعه از بذور کدو (توده بومی یزد[1]) که از شرکت خدمات کشاورزی به کود تهیه شده بود استفاده گردید در ابتدا بذور ضد عفونی شدند و سپس در گلدان هایی به قطر 30 سانتی‌متر وحاوی ماسه، رس و خاک برگ (1:1:2) کشت شدند. گلدان های کشت شده در گلخانه و تحت شرایط دمایی 2±25°C، شب/روز، دوره نوری 16/8 ساعت (تاریکی /نور) و رطوبت نسبی 80% قرارگرفتند و با دور آبی.چهار روزه آبیاری شدند.

تهیه اینوکولوم *Podosphaera xanthii*

برای مایه زنی گیاهان از سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت 10^5 اسپور در میلی لیتر استفاده گردید. برای تهیه اینوکولوم ابتدا به وسیله قلم مو و به آرامی توده ای از اسپورهای قارچ در لکه های جوان بر روی گیاه کدو برداشته شد و در 5ml آب مقطراستریل حاوی 0/05 درصد تریتون X-100 ریخته شدند.

نحوه‌ی اعمال و بررسی تیمارها

اعمال تیمار های مورد نظر بر روی گیاهان، در مرحله‌ی3 الی 4 برگی (تقریباً 4 هفته پس از کاشت) و در صبح زود انجام شد. تیمارها در 3 گروه مشخص و به قرار زیر در نظر گرفته شدند: گروه 1: آب مقطر، گروه 2: محلول 0/1 میلی مولار اسید سالیسیلیک، گروه 3: محلول 0/5 میلی مولار اسید سالیسیلیک. تیمار ها بر روی برگ گیاهان و به صورت محلول پاشی اعمال گردیدند. جهت حفظ رطوبت و عدم بسته شدن روزنه ها، گیاهان مایه زنی شده توسط روکش های نایلونی پوشانده شدند و پس از 24 ساعت با 50 میکرولیتر از

[1] Cucurbita pepo

www.SID.ir

Archive of SID

سوسپانسیون اسپور قارچ (با غلظت 10^5 اسپور در میلی لیتر) به روش لکه گذاری مایه زنی و تحت شرایط گلخانه ای نگهداری شدند. ظهور علائم بیماری هفت تا ده روز بعد از مایه زنی مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس شاخص بیماری‌زایی محاسبه گردید.

واکنش نسخه برداری معکوس و RT-PCR نیمه کمی

استخراج RNA در مرحله پیش از اعمال پرایمینگ، 24 ساعت بعد از پرایمینگ و دوره های زمانی12، 24، 48 و 72 ساعت بعد از مایه زنی قارچ انجام شد. RNA کل بافت برگ با استفاده از محلول استخراج RNA(RNX- Plus, CinnaGen) و بر اساس روش ذکر شده در دستور العمل شرکت سازنده کیت، استخراج گردید. جهت سنتز رشته اول cDNA از کیت (First Strand cDNA Synthesis Kit,Fermentas) استفاده گردید. جهت تأیید بیان ژن *PR-1* و همچنین ژن *18S rRNA* به عنوان کنترل داخلی، از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده با نرم افزار DNAMAN نسخه [1] 4.02 واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده گردید. آغازگرها به نحوی طراحی شدند که به ترتیب قطعاتی به اندازه 317 و 199 را تکثیر نمودند. از ترموسایکلر Xp Thermal cycler (مدل TC-Xp-G، شرکت BIOER، China) جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیمه‌کمی در 35 چرخه انجام شد. در صورتیکه مقدار مساوی از cDNAی کل نمونه های مختلف (از استوک هایی با غلظت یکسان) به واکنش مقایسه ای PCR برای تکثیر قطعه ای از cDNAی ژن مورد نظر وارد شود، می توان غلظت باند تکثیر شده در هر نمونه را به عنوان شاخص میزان بیان ژن مورد مطالعه در نظر گرفت. ژنی که باند تکثیر شده قوی تری را نشان می دهد ، سهم نسبی بیشتری در cDNA دارد که این تناسب را می توان به طور مستقیم به غلظت mRNA آن ژن نسبت داد.

عصاره آنزیمی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

نیم گرم از برگ منجمد شده در بافر فسفات پتاسیم 50 میلی مولار (pH=7) حاوی پلی وینیل پیرولیدون 1% و EDTA یک میلی مولار همگن گردیدند. همگنای حاصل در 20000×g به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ گردید و بخش رویی برای سنجش آنزیم های مورد نظر برداشته شد (Gapinska *et al.*, 2008).

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):

فعالیت کاتالاز با روش اسپکتروفتومتری و براساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در مدت 30 ثانیه در طول موج 240 نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم 50 میلی

[1] Version

www.SID.ir

Archive of SID

مولار (pH=7)، آب اکسیژنه 15 میلی مولار و 100 میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با اضافه کردن H_2O_2 آغاز شد و کاهش جذب در مدت 30 ثانیه اندازه گیری گردید (Dhindsa *et al.*, 1981).

اندازه گیری فعالیت گایاکول پراکسیداز

فعالیت گایالول پراکسیداز با استفاده از گایاکول به عنوان سوبسترا اندازه گیری شد. مخلوط واکنش حاوی 25 میکرولیتر عصاره آنزیمی، 2/77 میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم 50 میلی مولار (pH=7)، 100 میکرولیتر آب اکسیژنه 1% و 100 میکرولیتر گایاکول 4% بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج 470 نانومتر در مدت 3 دقیقه اندازه گیری شد. هر واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقداری از آنزیم تعریف می شود که باعث 0/01 تغییر در جذب می شود (Zhang*et al.*, 2005).

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

در این روش 1 میلی لیتر از بافر استخراج، 0/5 میلی لیتر فنیل آلانین 10 میلی مولار، 0/4 میلی لیتر آب دو بار تقطیر و 0/1 میلی لیتر عصاره آنزیمی مخلوط شدند و به مدت 1 ساعت در دمای 37°C انکوبه گردیدند. واکنش با اضافه کردن 0/5 میلی لیتر کلریدریک اسید 6 مولار متوقف شد و جذب نمونه در طول موج 290 نانومتر **اندازه گیری گردید. یک واحد فعالیت آنزیمی به عنوان 1 میکرومول سینامیک اسید تولید شده در مدت یک دقیقه به ازای هرمیلی گرم پروتئین تعریف شد.**

سنجش مقدار پروتئین کل

محتوای پروتئین کل با روش برادفورد و استفاده از آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه گیری شد (Bradford, 1976). جذب همه‌ی نمونه-ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل SPUV-26 (ساخت آلمان) خوانده شد.

آنالیز آماری

برای هر تیمار 6 تکرار در نظر گرفته شد. تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS Version 17.0 تحت آنالیز واریانس یکطرفه قرار گرفتند و میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند (Uchida *et al.*, 2009). $P<0.01$ بعنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. نمودارها توسط نرم‌افزار Excell رسم گردیدند. در کل آزمایش سه مرتبه تکرار گردید

نتایج و بحث

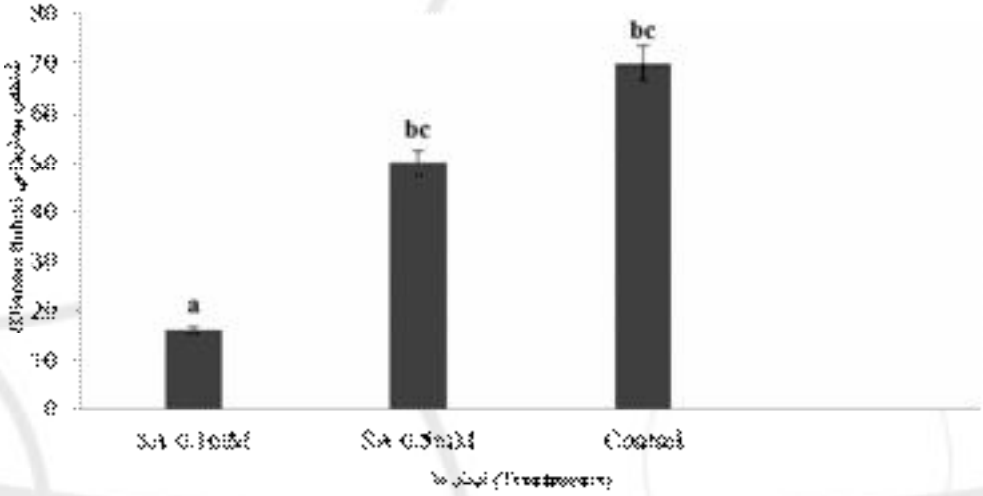
ارزیابی شاخص بیماری زایی

شاخص بیماری‌زایی سفیدک پودری روی هر گیاه هفت روز پس از مایه زنی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس آنالیز آماری صورت گرفته، بین تیمار ها اختلاف معنی داری در سطح احتمال

www.SID.ir

Archive of SID

1% وجود داشت. تیمار SA با غلظت یک دهم میلی مولار سبب حداکثر میزان القای مقاومت گردید به نحوی که شاخص بیماریزایی در گیاهان تیمار شده با این تیمار 16 بود این در حالی بود که این شاخص برای SA نیم میلی مولار و کنترل به ترتیب 50 و 70 ارزیابی گردید (شکل 1).



شکل 1- مقایسه میانگین تیمار های بکار رفته جهت القای مقاومت در کدو نسبت به بیماری سفیدک پودری براساس آزمون دانکن و در سطح یک درصد. حروف متفاوت، اختلاف معنی دار را نشان می دهند.

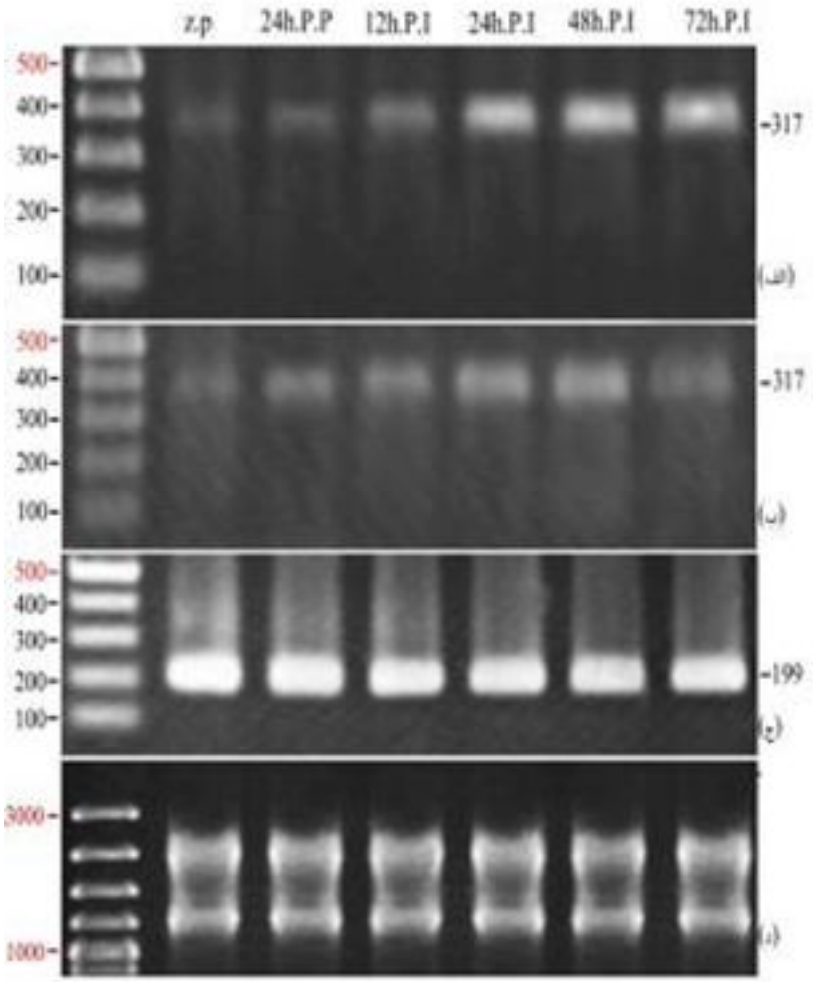
Figure 1- Mean comparison of used treatments in induced resistance to powdery mildew basis on Duncan test in P<1%. Different letters showed significant difference.

نتایج RT-PCR نیمه کمی

نتایج حاصل از این واکنش نشان داد که میزان بیان نسبی ژن *PR-1* در گیاهان تیمار شده با SA یک دهم میلی مولار نسبت به گیاه کنترل افزایش داشته است (شکل 2-الف). این افزایش بیان از 12 ساعت بعد از تلقیح شروع گردید و تا 72 ساعت بعد از مایه زنی (زمان اتمام آزمایش) تداوم داشت. لازم به ذکر است که حدکثر افزایش مربوط به زمان های نمونه برداری 24، 48 و 72 ساعت بعد از مایه زنی می باشد (شکل 2-الف). بعنوان شاهد بیان این ژن در گیاهان کنترل در تمام زمان های نمونه برداری مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که این ژن بطور یکنواخت برای تمامی زمان های نمونه برداری بیان داشته است (شکل 2-ب). باند های *18S rRNA* تکثیر یافته در واکنش PCR، مقادیر مساوی از غلظت نهایی cDNA کدو در ساعات مختلف را نشان داد (شکل 2-ج).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2- مقایسه بیان ژن *PR-1*. الف) افزایش بیان ژن *PR-1* بعد از تیمار گیاهان با SA 0/1 میلی‌مولار نشان می دهد. Z.P: زمان پرایمینگ (زمان صفر) را نشان می دهد. 24h p.p: 24ساعت پس ازپرایمینگ. 12h p I, 24h P I, 48h P I, 72h P I: 12، ۲۴، ۴۸ و 72 ساعت پس از تلقیح با بیمارگر. ب) بیان ژن *PR*-1 در گیاهان کنترل. ج) توازن باند تکثیر یافته *18S rRNA* پس از سی پنج چرخه PCR. د) RNA های استخراج شده.

Figure 2- *PR*-1 gene expression. A) increase of *PR*-1 gene expression after treatment with SA 0.1 mM. Z.P; time point 0; 24 P.P. 24 hours post priming; 12hpI, 24hpI, 48hpI and 72hpI show hours post inoculation. B) *PR*-1 gene expression in control plant. J) balanced *18SrRNA* expression after 35 cycle of PCR . D) Balanced total RNA.

www.SID.ir

Archive of SID

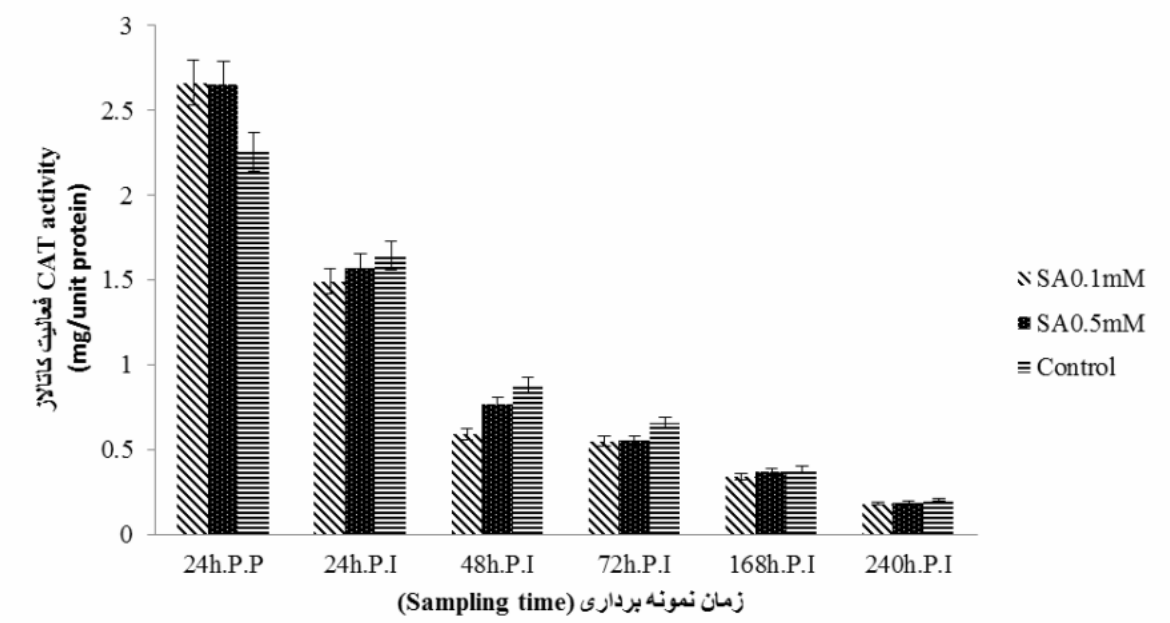
www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج حاصل از اندازه گیری میزان فعالیت کاتالاز نشان داد پیش تیمار گیاهان با SA یک دهم میلی‌مولار در 48 ساعت پس از مایه زنی باعث کاهش معنی‌دار فعالیت CAT در شرایط تنش گردید (شکل 3). نتایج حاصل از آنالیز آنزیم CAT نشان می‌دهد که تغییر فعالیت این آنزیم در بیشتر تیمارها در مقایسه با گیاه شاهد معنی‌دار نیست (شکل 3) بنابراین به‌نظر می‌رسد در این شرایط آنزیم CAT فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه نداشته است.



شکل 3- مقایسه میانگین تیمار ها بر فعالیت آنزیم CAT در برگهای گیاه کدو تحت شرایط پیش تیمـار و مایه کوبی در سطح احتمال 5%. هم پوشانی استاندارد بار نشان می دهد که تفاوت معنی دار وجود ندارد.

Figure 3- Mean comparison of used treatments on CAT activity in leaf of cucumber under pretreatment and inoculation basis on Duncan test in P<1%. Different letters showed significant difference.

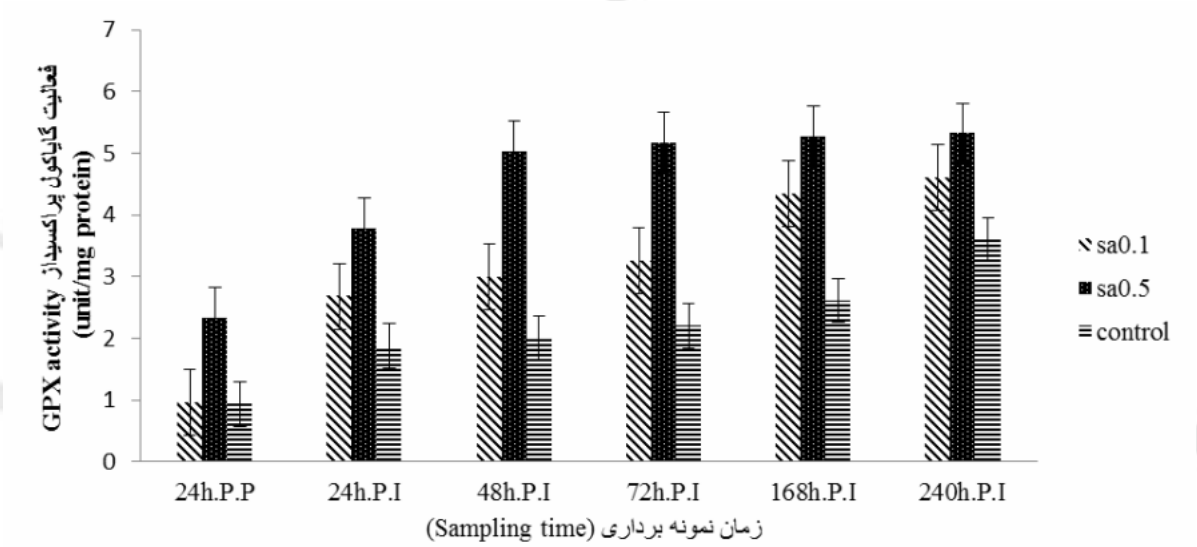
فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

داده های حاصل از اندازه گیری فعالیت گایاکول پراکسیداز در شکل 4 آورده شده است. نتایج نشان داد که پیش تیمار گیاهان با SA، فعالیت این آنزیم را افزایش داده است. اگر چه فعالیت GPX در گیاهان تیمار شده با غلظتهای نیم و یک دهم میلی مولار SA نسبت به شاهد افزایش داشت اما تنها تیمار نیم میلی مولار، در 48 و 72 ساعت پس از مایه زنی افزایش معنی داری را نشان داد (شکل 4). گایاکول پراکسیداز نیز از دیگر آنزیم‌هایی

www.SID.ir

Archive of SID

است که تحت شرایط تنش در پاکسازی سلول از پراکسیدهیدروژن، شرکت می کند . درمطالعه حاضر تنش بیماری در گیاه کدو باعث افزایش فعالیت آنزیم GPX گردیده است و بکار بردن پیش تیمار SA در گیاهان تحت تنش، باعث افزایش معنی دار در فعالیت این آنزیم گردید که نشان دهنده‌ی نقش این آنزیم در دفع رادیکال‌های آزاد اکسیژن تحت شرایط مذکور می‌باشد.



شکل 4- مقایسه میانگین تیمار ها بر فعالیت آنزیم GPX در برگهای گیاه کدو تحت شرایط پیش تیمـار و مایه کوبی در سطح احتمال 5%. هم پوشانی استاندارد بار نشان می دهد که تفاوت معنی دار وجود ندارد.

Figure 4- Mean comparison of used treatments on GPX activity in leaf of cucumber under pretreatment and inoculation basis on Duncan test in P<1%. Different letters showed significant difference.

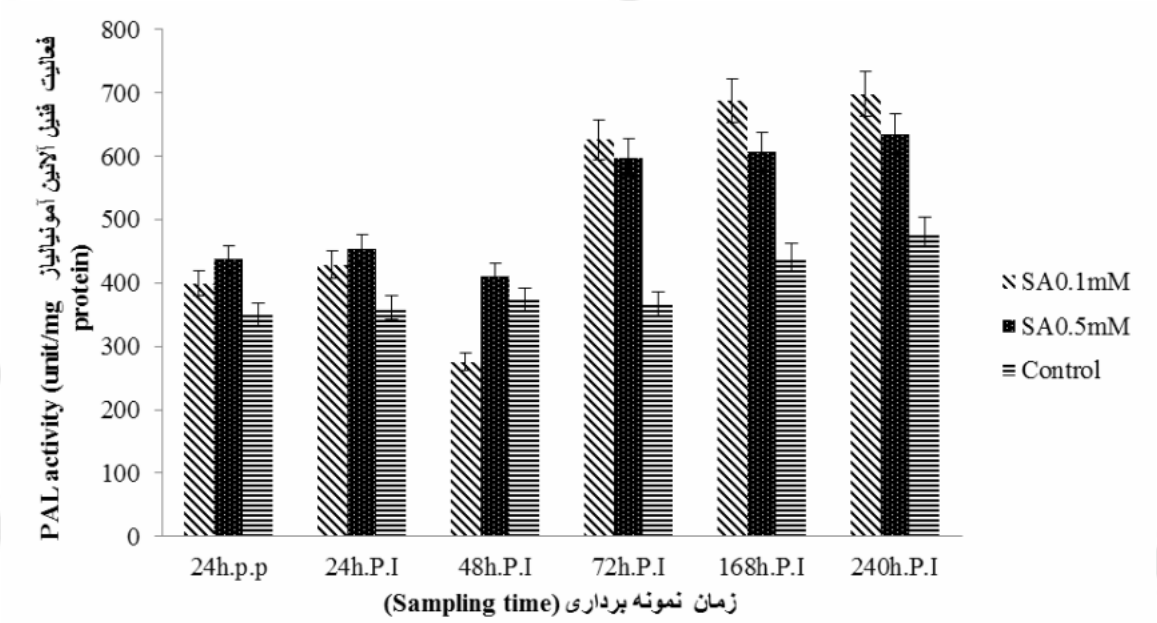
فعالیت آنزیم فنیل‌آلائین‌آمونیالیاز

شکل شماره 5 نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلائین‌آمونیالیاز را نشان می‌دهد. در گیاهانی که با SA پیش تیمار شده بودند نیز پس از گذشت 72 ساعت افزایش معنی داری نسبت به شاهد در فعالیت آنزیم PAL مشاهده شد (شکل 5). در 168و 240 ساعت پس از مایه‌کوبی در گیاهان تیمار شده افزایش فعالیت آنزیم PAL مشاهده شد اما این افزایش فقط در گیاهان تیمار شده با در SA یک دهم میلی مولار نسبت به شاهد معنی‌دار شد (شکل 5). در نتیجه‌ی فعالیت آنزیم PAL دو مسیر بیوسنتزی فعال می‌شود که یکی از این مسیرها مربوط به سنتز SA است. این هورمون در مراحل آغازین مسیر فنیل‌پروپانوئید ساخته می‌شود و باعث فعال‌شدن مسیر SAR و القای مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاه خواهد شد

www.SID.ir

Archive of SID

(Chen *et al.*, 2009). در این مطالعه، پیش‌تیمار گیاهان با SA باعث افزایش معنی‌دار فعالیت PAL گردیده است که نشان دهنده‌ی نقش این آنزیم در مکانیسم دفاعی گیاه در برابر تنش مذکور است.



شکل 5- مقایسه میانگین تیمار ها بر فعالیت آنزیم PAL در برگهای گیاه کدو تحت شرایط پیش تیمار و مایه کوبی در سطح احتمال 5%. هم پوشانی استاندارد بار نشان می دهد که تفاوت معنی دار وجود ندارد.

Figure 5- Mean comparison of used treatments on PAL activity in leaf of cucumber under pretreat ment and inoculation basis on Duncan test in P<1%. Different letters showed significant difference.

بحث

همانگونه که در قسمت نتایج فنوتیپی ذکر گردید تیمار SA با غلظت یک دهم میلی مولار سبب حداکثر میزان القای مقاومت گردید. نتایج سایر پژوهشگران نیز این مطلب را تأیید می‌نماید. مطالعات انجام شده نشان می دهد که اسید سالیسیلیک بر بیمارگرهایی مانند *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* نیز موثر است. بر این اساس، مقاومت القایی ایجاد شده درگیاهان لوبیای تیمار شده با غلظت شش‌دهم میلی‌مولار SA سبب کاهش رشد قارچ و توانایی غشا آن می شود (Hakimi *et al.*, 2007). کاربرد خارجی SA در کنترل بیماری پژمردگی گوجه فرنگی با عامل *Fusarium oxysporum f.* sp. *lycopersici*، نقش موثری داشته است. تحقیقات نشان می‌دهند که SA اثر ضد قارچی ندارد بلکه باعث فعال شدن مسیر SAR و القای PR ها می شود که مستقیماً رشد قارچ را تحت تاثیر قرار می‌دهند(Durrant &

www.SID.ir

Archive of SID

Dong, 2004). طبق نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ی حاضر و تحقیقات صورت گرفته می‌توان نتیجه گرفت که پیش‌تیمار گیاهان با SA سبب کنترل سفیدک پودری به طور مؤثری می‌شوند.

نتایج حاصل از آزمایش RT-PCR نیمه‌کمی نشان داد که میزان بیان نسبی ژن *PR-1* در گیاهان تیمار شده با SA یک دهم میلی مولار نسبت به گیاهان کنترل افزایش داشته است. نتایج مشابه‌ای در تحقیقات صورت گرفته نشان داده شده که گیاه تراریخته *N. tabacum* cv *xanthi* nc که دارای مقاومت بالایی به دو بیمارگر اوومیست بود، سطوح بالای *PR-1* را تولید می‌کند. مایه زنی گیاه فوق با دو عامل بیمارگر *Phytophthora parasitica* var.nicotianae و *Peronospora tabacina* باعث تاخیر معنی دار در آلودگی و کاهش قابل توجه نشانه های بیماری گردید(Alexander *et al.*, 1993). با توجه به ایجاد مقاومت القایی توسط SA به سفیدک پودری و افزایش بیان ژن *PR-1* می‌توان (تأیید شده به عنوان مارکر مسیر SAR) می‌توان پیشنهاد نمود که مقاومت القایی ایجاد شده ناشی از مسیر القایی SAR باشد. اما تأیید این مطلب نیاز به آزمایشات تکمیلی دارد.

در پژوهش حاضر فعالیت GPX و PAL در گیاهان تیمار شده با SA در مقایسه با کنترل، افزایش معنی داری نشان دادند (شکل 4 و 5) که خود باعث افزایش مقاومت گیاه به بیماری سفیدک پودری می شود. در گیاهان گوجه فرنگی آلوده به *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* نیز افزایش فعالیت POX و PAL گزارش شده است (He and Wolyn, 2005). مطالعات نشان داده است که در لوبیا چشم بلبلی تیمار شده با اسید سالیسیلیک فعالیت PAL و POX در پاسخ به *R. solani* افزایش می یابد (Chandra *et al.*, 2007). با توجه به نتایج حاصل آنالیزهای آنزیمی به‌نظر می‌رسد که مقاومت ایجاد شده توسط SA بیشتر مربوط به القای فعالیت آنزیم‌های PAL و GPX می باشد که در اثر فعالیت این آنزیم‌ها مقاومت به بیماری نیز افزایش می یابد و ظاهرا پیش‌تیمارهای مذکور نقش مهمی در تغییرات فعالیت CAT نداشته اند.

در پژوهش حاضر فعالیت GPX و PAL در گیاهان تیمار شده با SA در مقایسه با کنترل، افزایش معنی داری نشان دادند (شکل 4 و 5) که خود باعث افزایش مقاومت گیاه به بیماری سفیدک پودری می شود. در گیاهان گوجه فرنگی آلوده به *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* نیز افزایش فعالیت POX و PAL گزارش شده است (He and Wolyn, 2005). مطالعات نشان داده است که در لوبیا چشم بلبلی تیمار شده با اسید سالیسیلیک فعالیت PAL و POX در پاسخ به *R. solani* افزایش می یابد (Chandra *et al.*, 2007). با توجه به نتایج حاصل آنالیزهای آنزیمی به‌نظر می‌رسد که مقاومت ایجاد شده توسط SA بیشتر مربوط به القای فعالیت آنزیم‌های PAL و GPX می باشد که در اثر فعالیت این آنزیم‌ها مقاومت به بیماری نیز

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش می یابد و ظاهرا پیش‌تیمارهای مذکور نقش مهمی در تغییرات فعالیت CAT نداشته اند.

در پایان باید اشاره کرد که کلیه عوامل کنترل کننده بیماری‌های گیاهان، جنبه حفاظتی داشته و هیچ وسیله‌ای در دست نیست که بتوان با آن گیاهان آلوده و بیمار را به طور کامل درمان بخشید. به همین دلیل پس از سپری شدن سال ها از معرفی شدن روش های مختلف کنترل، دنیای گرسنه ما هنوز به دنبال روش‌های ایمن تر، موثرتر، آسان تر و کم هزینه تر مبارزه با بیماری‌های گیاهان می‌باشد. در این راستا، بیماری شناسان گیاهی در سرتاسر دنیا ضمن ارائه سیستم‌های مدیریت مبارزه تلفیقی بیماری‌های گیاهان، در این نظر متفق القول اند که هدف نهایی این روش‌ها، مهار کامل بیماری‌ها نیست و تنها کاهش اقتصادی خسارت ناشی از بیماری با حداقل خسارت به محیط زیست مدنظر می‌باشد. از این رو به جرات می توان گفت که القا مقاومت یک پدیده امید بخش بوده و نیاز به آن یک ضرورت تمام می‌باشد.

منابع

Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J (1993). Increased tolerance to 2 oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesisrelatedprotein-1a. Proc. National Academic Science U.S.A 90: 7327.

Agrios GN (2005). Introduction to plant pathology (5th Edn.). Elsevier Academic Press pp: 494-500.

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

Chandra A, Saxena R, Dubey A, Saxena P (2007). Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhanced resistance in cowpea against *Rhizoctonia Solani*. Acta Physiologiae Plantarum 29: 361–367.

Chen C, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. Plant Signaling & Behavior 4: 493-496.

Dhindsa RS, Dhindsa P, Thorpe AT (1981). Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decrease levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany 32: 93-101.

Durrant WE, Dong X (2004). Systemic acquired resistance. Annual Review Phytopathology 42: 185-209.

Gapinska M, Sklodowska M, Gabara B (2008). Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. Acta Physiologiae Plantarum 30:11-18.

Glazebrook J, Rogers EE, Ausubel FM (1996). Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. Genetics 143: 973-982.

Hakimi AL, Saeed AMA, Alghalibi MS (2007). Thiamin and salicylic acid as biological alternatives for controlling broad bean rot disease. Journal of Applied Sciences and Enviromental Managment 11: 125 -131.

www.SID.ir

Archive of SID

Hammerschmidt R, Metraux JP, Van Loon LC (2001). Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. Corfu May 2000. European Journal of Plant Pathology 107: 1-6.

He CY, Wolyn DJ (2005). Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f. sp. asparagi. Plant Pathology 54: 227–232.

Jahn M, Munger HM, McCreight JD (2002). Breeding Cucurbit Crops for Powdery Mildew Resistance. In Bélanger R, WR Bushnell, AJ Dik, TLW Carver, ed, The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota pp 239-248.

O'Brien RG (1994). Fungicide resistances in population of cucurbit powdery mildew (*Sphaerotheca fuligine*a). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 22: 145-149.

Oostendorp M, Kunz W, Dietrich B, Staub T (2001). Induced disease resistance in plants by chemicals. European Journal of Plant Pathology 107: 19–28.

Paulus AO, Brendler RA, Nelson J, Whitaker TW, Hall BJ (1976). Fungicides for control of cucurbit powdery mildew. California Agriculture. 30: 13.

Redolfi P (1983). Occurrence of pathogenesis-related (b) and similar proteins in different plant species. Netherland Journal of Plant Pathology 89: 245.

Stein E, Molitor A, Kogel KH, Waller F (2008). Systemic resistance in Arabidopsis conferred by the mycorrhizal fungus piriformosporaindica requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1.Plant Cell Physiology 49: 1747–1751.

Uchida K, Takamatsu S, Matsuda S, Kazuhiro S, Yukio S (2009). Morphological and molecular characterization of Oidium subgenus Reticuloidium (powdery mildew) newly occurred on cucumber in Japan. Journal of Gene Plant Pathology 75 :92–100.

Van Loon LC (1989). Stress proteins in infected plants, in Plant-Microbe Interactions, Molecular and Genetic Perspectives. Vol 3 Kosuge, T. and Nester, E. W., Eds., McGraw-Hill Book Co., New York 1989, 198.

Zhang Z, Pang X, Duan X, Ji ZL, Jiang Y (2005). Role of peroxidase in anthocyanine degradation in litchi fruit pericarp. Food Chemistry 90: 47-52.

www.SID.ir

Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 1، بهار 1392)

Study of *PR* gene expression and activity of effective enzymes in induced resistance to powdery mildew by salicylic acid

Zeighaminejad R.[1], Sharifi Sirchi Gh.R.[*2]

1- Graduated student of Agricultural Biotechnology Department, Agriculture College, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
2- Assistant professor of Agricultural Biotechnology Department, Agriculture College, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

Abstract

Powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii* is a common and serious foliar disease in Cucurbitaceae. In this study, salicylic acid was used in two concentrations (0.1 and o.5 mM) and distilled water as control. After 24 hours post treatment, plants inoculated with 50 µl fungi spore suspensions (at a concentration of 10^5 conidia ml^{-1}) with dotting procedure and then plants incubated in green house conditions. Molecular analysis showed increased expression of *PR-1* in 24, 48 and 72 hours after inoculation. The analyses of antioxidant enzyme activities in stressed plants showed that the concentrations of 0.1 and 0.5 mM salicylic acid significantly increased the activity of GPX, 48 and 72 hours and PAL, 72, 168 and 240 hours post inoculation.

Keywords: *induced resistance, salicylic acid, Powdery mildew squash, PR-1, antioxidant*

[*] Corresponding Author: Sharifi Sirchi Gh.R. Tel: 0341-3202638 Email: sharifisirchi@yahoo.com

www.SID.ir