

اثر کود نیتروکسین بر میزان بیان ژن *Chitinase* و *Cupi4* در گیاهچه‌های خیار آلوده به *Pythium aphanidermatum*

Effects of Nitroxin Fertilizers on Gene Expression of *Chitinase* and *Cupi4* Genes in Cucumber Seedlings Infected to *Pythium aphanidermatum*

شاهو ولی‌زاده^۱ و سید کاظم صباغ^{۲*}

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۲۳

چکیده

خیار میزبان بسیاری از عوامل بیماری‌زای خاکزاد می‌باشد. شبه‌قارچ *Pythium aphanidermatum* به‌عنوان یک عامل خاکزاد، سبب بیماری بوته‌میری در خیار می‌گردد. با توجه به توسعه کشاورزی پایدار، استفاده از کودهای بیولوژیک برای مدیریت بیماری‌های گیاهی امری ضروری خواهد بود. در این تحقیق اثر کود نیتروکسین در مقاومت گیاهچه‌های خیار (رقم ES-2862) مورد بررسی قرار گرفت. بعد از تیمار گیاهچه‌های آلوده با نیتروکسین، شدت بیماری در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری شد. از برگ گیاهچه‌ها برای استخراج RNA کل و بررسی بیان کمی دو ژن مسئول مقاومت در گیاه با PCR زمان واقعی استفاده شد. نتایج این ارزیابی نشان داد که شدت بیماری در اثر اعمال کود نیتروکسین کاهش یافت. همچنین بیان ژن‌های *Chitinase* و *Cupi4* در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح افزایش یافت. میزان بیان ژن *Cupi4* نسبت به ژن *Chitinase* تغییرات بیشتری داشت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که کاربرد نیتروکسین می‌تواند باعث افزایش مقاومت خیار علیه بیماری مرگ گیاهچه شود.

واژه‌های کلیدی: کود زیستی، نیتروکسین، بیان ژن، خیار، qRT-PCR

۱. دانش آموخته کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل

۲. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه یزد، یزد

Email: sksabbagh@yazd.ac.ir

*: نویسنده مسوول

مقدمه

بیماری در گیاه، عکس‌العمل مولکولی گیاه منجر به بیان ژن‌های مسئول مقاومت می‌شود که محصولات پروتئینی این ژن‌ها تحت عنوان پروتئین‌های خاص موسوم به پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن پدید می‌آیند که توان مقابله با بیماری را دارند *ساراولان* و همکاران (Saravanan et al., 2004). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی که اغلب پروتئین‌های PR خوانده می‌شوند، شامل گروه متنوع از پروتئین‌های گیاهی هستند. این پروتئین‌ها توزیع گسترده‌ای در گیاهان داشته ولی در مقدار بسیار پایینی وجود دارند. اما به دنبال حمله عوامل بیماری‌زا یا تنش‌های محیطی، در غلظت بسیار بالاتری تولید می‌شوند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری به‌صورت درون سلولی و برون سلولی، به‌ویژه در دیواره‌های سلولی بافت‌های مختلف گیاهی وجود دارند. انواع متفاوتی از پروتئین‌های مرتبط با بیماری از گیاهان مختلف جدا شده‌اند. اندام‌های مختلف گیاه مانند برگ‌ها، ریشه‌ها و بذرها ممکن است مجموعه‌های مختلفی از پروتئین‌های PR را تولید کنند. القاء پروتئین‌های مرتبط با دفاع در بسیاری از گونه‌های گیاهی در برابر آلودگی باکتری، قارچ، ویروس و یا حمله حشرات ثابت شده است. این نوع پروتئین‌ها در تک‌لیپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها، تکامل خود را حفظ نموده‌اند *وان لون* و همکاران (Van Loon et al., 1994). مشخص گردیده است که بیان هم زمان دو یا چند ژن *PR*، با اثر تشدیدکنندگی باعث افزایش مقاومت و در نتیجه کنترل مؤثرتر بیماری می‌گردد *زوو* و همکاران (Zhu et al., 1994). تلقیح خیار با پاتوژن‌های مختلفی نشان داده که مولکول‌های mRNA مربوط به ژن *Cupi4* به‌صورت سیستمیک در برابر پاتوژن‌ها در گیاه خیار تجمع یافته و با تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری موجب ایجاد مقاومت در برابر این پاتوژن‌ها می‌شود *فانتومارت* و همکاران (Phuntumart et al., 2006). کیتین پس از سلولز بزرگ‌ترین منبع توده زیستی تجدیدپذیر در طبیعت می‌باشد. این پلی‌مر در دیواره سلولی برخی قارچ‌ها وجود دارد. کیتیناز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های زیستی می‌باشد که در تجزیه مواد کیتینی نقش اساس و اولیه دارد در بنابراین اولین و مهم‌ترین مرحله در تجزیه طبیعی کیتین، ترشح آنزیم‌های کیتینازی می‌باشد. میزان این آنزیم در بسیاری از گیاهان در مواجهه با عوامل تنش‌زای زیستی و غیرزیستی افزایش می‌یابد *پانژا و زانگ* (Punja and Zhang, 1993). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی همچون کیتیناز که نقش ضدباکتریایی و ضدقارچی دارد در ارتباط با مقاومت سیستمیک القایی می‌باشد *استیکر* و همکاران (Sticher et al., 1997). در حالت مقاومت اکتسابی، مسیرهای دفاعی گیاه علیه عامل

خیار با نام علمی *Cucumis sativus* یکی از رایج‌ترین و گسترده‌ترین محصولات صیفی کشت داده شده در جهان می‌باشد. این گیاه میزبان بسیاری از عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد و هوازاد است *تولایی* (Tolaei, 2013). عوامل مختلفی روی رشد خیار نقش دارند که از آن جمله می‌توان به تغذیه متعادل با کودها اشاره نمود. رشد گیاه بستگی به فراهم بودن نیتروژن در خاک دارد، زیرا این عنصر در ساختار پروتئین‌ها، آمینواسیدها، اسیدهای نوکلئیک و سایر ترکیبات گیاهی حضور دارند *مانوئل روئیز و رومرو* (Manuel Ruiz and Romero, 1999). در میان بیماری‌ها، بوته‌میری جالیز ناشی از *P. aphanidermatum* به‌عنوان مهم‌ترین عامل پوسیدگی ریشه و طوقه در گلخانه‌ها، از جمله عوامل محدودکننده کشت محصول می‌باشد *اله‌نی‌یا؛ اسماعیلی شیرازی‌فرد و بنی‌هاشمی* (Elahinia, 2009; Esmaeili Shirazifard and Banihashemi, 2009). قارچ بیمارگر در تمام مراحل رشدی در صورت وجود شرایط مساعد می‌تواند بوته‌ها را مورد حمله قرار دهد. محل حمله عامل بیمارگر قارچی باریک و نرم گردیده و از بین می‌رود *روانلو و بنی‌هاشمی* (Ravanlou and Banihashemi, 2003). کودهای بیولوژیکی از دیرباز توسط انسان مورد استفاده قرار گرفته ولی در چند دهه اخیر که استفاده از کودهای شیمیایی رایج گردید، کودهای بیولوژیکی به فراموشی سپرده شدند. با این وجود، امروزه به‌دلیل استفاده بی‌رویه از کودهای شیمیایی و اثرات زیان‌بار آن بر سلامت انسان و خاک، بشر به استفاده از کودهای بیولوژیکی برای تأمین نیاز گیاهان روی آورده است *آسترایی و کوچکی* (Asteraei and Koucheiki, 1996). نخستین کود میکروبی با نام تجاری نیتراژین در سال ۱۸۹۵ میلادی برای فروش عرضه شد و پس از آن تعدادی کودهای دیگر، حاوی باکتری‌های ازتوباکتر و فسفوباکترها تولید شدند که به‌دلیل هم‌زمانی با تولید کودهای شیمیایی، موفقیت چندانی به‌دست نیاوردند *قلاوند و همکاران* (Ghalavand et al., 2006). نیتروکسین حاوی مجموعه‌ای از مؤثرترین سوش‌های باکتری‌های تثبیت‌کننده از جنس *Azotobacter/Azospirillum* و حل‌کننده فسفات از جنس *Pseudomonas* می‌باشد. باکتری‌های جنس ازتوباکتر و آزوسپیریلام از مهم‌ترین باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌باشند که علاوه بر تثبیت زیستی نیتروژن، با تولید مقادیر قابل ملاحظه‌ای از هورمون‌های تحریک‌کننده رشد به‌ویژه انواع اکسین، جیبرلین و سیتوکنین، رشد و نمو و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند *کریمی و صدیق* (Karimi and Siddique, 1991). در زمان وقوع

به منظور تهیه مایه تلقیح جهت آزمون بیماری زایی، قطعاتی از محیط کشت حاوی کلنی قارچ به پتری دیش حاوی محیط کشت جامد (CMA (Corn Meal Agar, Merck, Germany) منتقل و جهت رشد سریعتر قارچ عامل بیماری زا به رشد سریع، تعداد ۲۰ عدد بذر ضد عفونی شده شاهدانه به محیط اضافه گردید. سپس پتری دیشها به داخل گرمخانه در دمای $25 \pm 1^\circ\text{C}$ منتقل شدند. پس از بازبینی های مرتب با مشاهده کلنیزه شدن بذرها شاهدانه بوسیله پرگنه قارچ عامل بیماری زا، از آنها جهت تلقیح در هر گلدان مورد استفاده قرار گرفت. بدین وسیله جهت تلقیح گیاهچه ها، ابتدا، اطراف طوقه هر گیاهچه در مرحله ۲-۳ برگی در عمق یک سانتی متری از خاک، سه عدد بذر شاهدانه قرار داده شد و سپس به وسیله ماسه استریل پوشانده شد. پس از مایه زنی، به منظور افزایش رطوبت محیط، روی گیاهان و سطح گلدان با آب مقطر مه پاشی صورت گرفت و پوشش پلاستیکی سلوفان روی آنها کشیده شد. رطوبت نسبی در زیر پوشش پلاستیکی ۹۵ درصد حفظ شد. پس از ۷۲ ساعت پوشش پلاستیکی برداشته شده و گیاهچه ها در دما و رطوبت طبیعی نگهداری شدند. یادداشت برداری از نمونه ها دو هفته بعد از تلقیح به مدت ۳۰ روز انجام شد. برای ارزش گذاری شدت آلودگی و ارزیابی عکس العمل گیاهان در مقابل عامل بیماری و تعیین پیشرفت بیماری با شمارش لکه های نکرزه در تیمار آلوده با کود و مقایسه آن با شاهد آلوده بدون کود انجام گرفت /وزگونن و ارکیلیک (Ozgonen and Erkilic, 2007).

طراحی آغازگرهای مورد استفاده

از توالی ژن *Cupi4* (DQ482461.1) و ژن *Chitinase* (HM015248.1) برای طراحی آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن استفاده شد. جهت طراحی آغازگرها از نرم افزار (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) Primer 3 استفاده شد. مناسب ترین آغازگر با توجه به وضعیت بازهای آلی تشکیل دهند انتخاب و با آغازگرهای این ژنها در منابع علمی مورد ارزیابی قرار گرفت *فانتومارت* و همکاران (2006). از ژن *Actin* (AB010922) به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید (جدول ۱).

بیماری از طریق فعال شدن ژن های مرتبط فعال شده و پروتئین های حاصل با مسیرهای مختلف باعث جلوگیری از توسعه بیماری در کل گیاه می شود *ریالز* و همکاران (Ryals *et al.*, 1996). تولید گیاهان مقاوم به عوامل بیماری زای قارچی، باکتریایی و ویروسی از طریق انتقال ژن های کدکننده مواد ضد میکروبی، روش امیدوارکننده ای برای مبارزه با بیماری های گیاهی است *زاسلوف* (Zasloff, 2002). یکی از مشهورترین مثال ها، تولید گیاهان تراریخته ای است که از طریق افزایش بیان ژن های کیتیناز مقاومت زیادی نسبت به عوامل بیماری زا کسب کرده اند *سارینا* و همکاران (Sareena *et al.*, 2006). استفاده از تکنیک کمیت سنجی مقادیر یک ژن در زمان بیان واقعی (qRT-PCR)، روش مناسبی برای مطالعه تظاهر ژن ها با دقت و حساسیت زیاد و اطمینان بالا به شمار می رود. این روش بیشترین حساسیت را در بین روش های کمی دارد و می توان از آن برای مقایسه سطوح mRNA برای تعیین الگوی تظاهر ژن و تفاوت بین گونه های خویشاوندی و تجزیه ساختار RNA استفاده نمود *بوستین* (Bustin, 2000). بدین منظور در این پژوهش، اثر کود نیتروکسین در القاء مقاومت خیار به *P. aphanidermatum* و بیان ژن های *Chitinase* و *Cupi4* مسئول در مقاومت به بیماری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کاشت و آماده سازی گیاه

خیار رقم ES-2862 (بذر F1) جهت کشت و آماده سازی گیاه استفاده شد. کود نیتروکسین (Nitroxin) در بسته بندی های تجاری (شرکت آوای زمین) به صورت محلول تهیه گردید. مخلوط خاک شامل خاک بکر و ماسه شسته شده به نسبت ۱:۱، قبل از استفاده، با اتوکلاو در دمای 121°C و فشار ۱ اتمسفر به مدت یک ساعت سترون شد. کود نیتروکسین که به صورت مایع می باشد به صورت پوشش بذری قبل از کاشت (به مدت ۵ دقیقه در محلول نیتروکسین) استفاده شد. بذرها ی خیار در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلدان های ۱/۵ کیلویی با ۴ تکرار کشت گردید. گلدان ها در گلخانه در دمای 27°C - 25°C درجه سانتی گراد با رطوبت نسبی ۷۰ درصد قرار گرفت و به با آب مقطر استریل فاقد مواد مغذی آبیاری انجام شد.

تهیه اینوکولوم و تعیین پیشرفت بیماری زایی

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده در مطالعه بررسی تأثیر نیتروکسین در بیان ژن‌های دخیل در مقاومت القایی خیار

Table 1: The primers used in study of the effect of nitroxin on expression of involved genes in cucumber acquired resistance

| ژن Gene | آغازگر رفت Forward primer | آغازگر برگشت Reverse primer | طول قطعه Fragment length | دمای ذوب Annealing temperature |
|------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| <i>Chitinase</i> | CCGCAGTGTCCAATACCAGA | GCCGTCCACTGATTCCATGA | 149 | 60.5 |
| <i>Cupi4</i> | TCACTGTGGTGTGTGCTCTC | ACTCAAGCCATTGCCTTCCA | 180 | 59.5 |
| <i>Actin</i> | GAAGGAATAACCACGCTCAG | ACACAGTTCCTTCTACGAG | 117 | 60 |

جدول ۲: آنالیز بیان ژن‌های *Cupi4* و *Chitinase* با نرم‌افزار Rest ۲۴ ساعت بعد از تلقیح: نیتروکسین همراه با آلودگی (IN)، آلودگی بدون نیتروکسین (IWN) و شاهد (C)

Table 2: Gene expression analysis of *Cupi4* and *Chitinase* genes by Rest software 24 h post infection: Infected with nitoxin (IN), Infected without nitroxin (WN) and Control (C)

| تیمار Treatment | ژن Gene | نوع Type | کارایی واکنش Reaction efficiency | بیان Expression | خطای استاندارد Std. Error | نتایج Result |
|--------------------|------------------|-------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------|
| IWN | <i>Chitinase</i> | TRG | 1.01 | 0.642 | 0.538-0.766 | - |
| IWN | <i>Cupi4</i> | TRG | 1.04 | 5.868 | 4.63-7.05 | UP |
| IN | <i>Cupi4</i> | TRG | 1.04 | 15.529 | 10.010-18.684 | UP |
| IN | <i>Chitinase</i> | TRG | 1.01 | 2.235 | 1.464-3.621 | UP |
| C | <i>Cupi4</i> | TRG | 1.04 | 1.529 | 1.010-3.684 | UP |
| C | <i>Chitinase</i> | TRG | 1.01 | 0.235 | 0.464-1.62 | UP |

جدول ۳: آنالیز بیان ژن‌های *Cupi4* و *Chitinase* با نرم‌افزار Rest ۴۸ ساعت بعد از تلقیح: نیتروکسین همراه با آلودگی (IN)، آلودگی بدون نیتروکسین (IWN) و شاهد (C)

Table 3: Gene expression analysis of *Cupi4* and *Chitinase* genes by Rest software 48h post infection: Infected with nitoxin (IN), Infected without nitroxin (WN) and Control (C)

| تیمار Treatment | ژن Gene | نوع Type | کارایی واکنش Reaction efficiency | بیان Expression | خطای استاندارد Std. Error | نتایج Result |
|--------------------|------------------|-------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------|
| IWN | <i>Chitinase</i> | TRG | 1.01 | 0.750 | 0.418-0.666 | - |
| IWN | <i>Cupi4</i> | TRG | 1.04 | 7.868 | 9.633-12.941 | UP |
| IN | <i>Cupi4</i> | TRG | 1.04 | 18.529 | 16.212-22.645 | UP |
| IN | <i>Chitinase</i> | TRG | 1.01 | 3.150 | 2.446-4.512 | UP |
| C | <i>Cupi4</i> | TRG | 1.04 | 1.529 | 1.010-3.684 | UP |
| C | <i>Chitinase</i> | TRG | 1.01 | 0.845 | 1.464-3.621 | UP |

از کیت 2-Steps RT-PCR (Vivantis, Sinaclon, Iran) انجام گردید.

بررسی میزان بیان ژن

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در حالت القاء مقاومت در گیاه تحت تنش بیماری با استفاده از روش کمی‌سنجی با استفاده از دستگاه لایت سایکلر ساخت شرکت کوربت (Curbet3000, Australia) انجام شد. محلول واکنش با حجم ۲۰ میکرو لیتر در تیوب‌های مخصوص تهیه گردید. این محلول شامل ۲ میکرو لیتر (۵۰ نانوگرم) cDNA، ۱ میکرو لیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکو مولار)، ۱۰ میکرو لیتر Hot Tag EvaGreen qPCR premix [with Rox dye (Biotium, Inc., Hayward,

استخراج RNA و سنتز cDNA

از برگ‌های تهیه شده در مرحله ۳-۴ برگگی گیاه جهت استخراج RNA استفاده شد. بدین منظور ۵۰ گرم از برگ‌های مربوط به هر تیمار با استفاده از ازت مایع در داخل هاون چینی پودر و استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری Cinnapure RNA (Sinaclon, Iran) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت و کمی مولکول‌های mRNA به ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و روش طیف‌سنجی با دستگاه اسکن‌دراب (Scandrop, Analytika, Germany) انجام شد. سنتز رشته اول از مولکول‌های تک‌رشته‌ای mRNA با استفاده

خطی تکثیر با خط مربوط به سطح آستانه تکثیر (Ct) یک نمونه در مقابل کنترل (Δ CP control-sample) محاسبه می‌شود که در نهایت Ratio به دست می‌آید که بدون واحد می‌باشد که مقدار تغییرات بیان ژن در تیمارها نسبت به شاهد را نشان می‌دهد (پی فافل، 2001). آنالیز داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار REST 2009 که تخصصی داده‌های خروجی Real Time PCR می‌باشد انجام گرفت.

نتایج

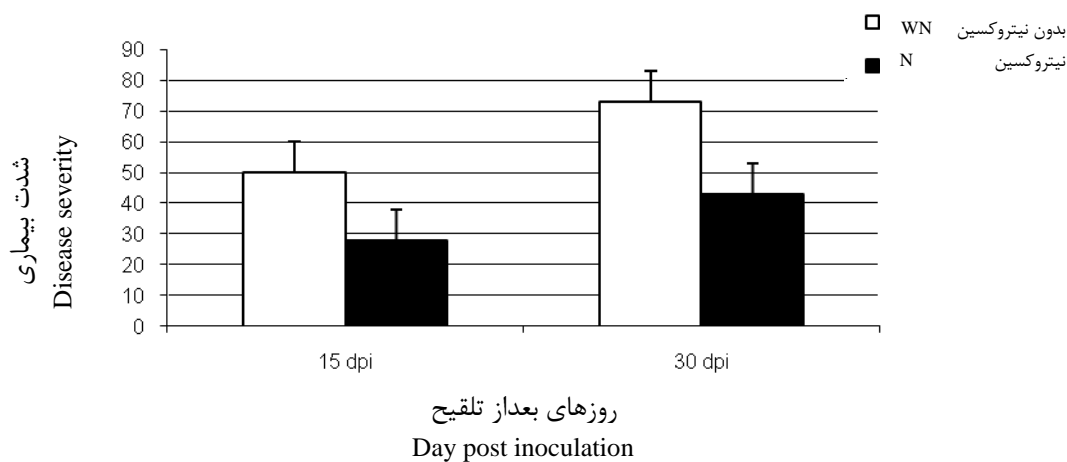
درصد پیشرفت بیماری

بررسی شدت بیماری در گیاهچه‌های تلقیح شده در حضور کود نیتروکسین و بدون آن در فاصله زمانی ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از آلودگی نشان داد که در تیمارهای کودی شدت بیماری نسبت به شاهد آلوده کمتر بود. آنالیز داده‌های حاصل نشان داد که ۱۵ روز بعد از آلودگی شدت بیماری در حضور کود ۲۸ درصد بوده است و در این زمان در گیاه آلوده بدون کود این مقدار ۵۵ درصد تعیین شد. برای زمان ۳۰ روز بعد از آلودگی شدت بیماری در حضور کود ۴۳ درصد (متحمل) و بدون کود ۷۳ درصد تعیین شد (شکل ۱). نتایج این بخش نشان می‌دهد که کود نیتروکسین توانسته است میزان توسعه بیماری در گیاه را کاهش دهد.

[CA, USA] (ساخت شرکت سیناژن) و حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر عاری از آنزیم RNase به ۲۰ میکرو لیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. به منظور به دست آوردن دمای مناسب اتصال آغازگرها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با شیب دمایی توسط دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان انجام گرفت. دماهای مورد استفاده از ۵۹ تا ۶۳ درجه در نظر گرفته شد. پس از آن جهت تأیید سنتز تمام cDNAها واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط آغازگرهای ژن‌های *Cup4* و *Chitinase* و ژن مرجع *Actin* انجام گرفت. چرخه‌های حرارتی واکنش شامل ۹۴°C به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه ۹۴°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه تنظیم گردید. هر آزمایش در چهار تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی انجام شد. داده‌های حاصل از سطح آستانه چرخه‌های هر واکنش با استفاده از روش پی فافل (Pfafli, 2001) و معادله زیر تجزیه و آنالیز شدند (پی فافل، 2001).

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Efficiency } GOI^{\Delta CP(\text{control-sample})}}{\text{Efficiency } GHK^{\Delta CP(\text{control-sample})}}$$

در این معادله نسبت سطح بیان ژن هدف براساس راندمان واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (E) برای ژن هدف (GOI) و مرجع (GHK) و تفاوت (Δ) نقطه تقاطع (CP) یا محل برخورد نمودار



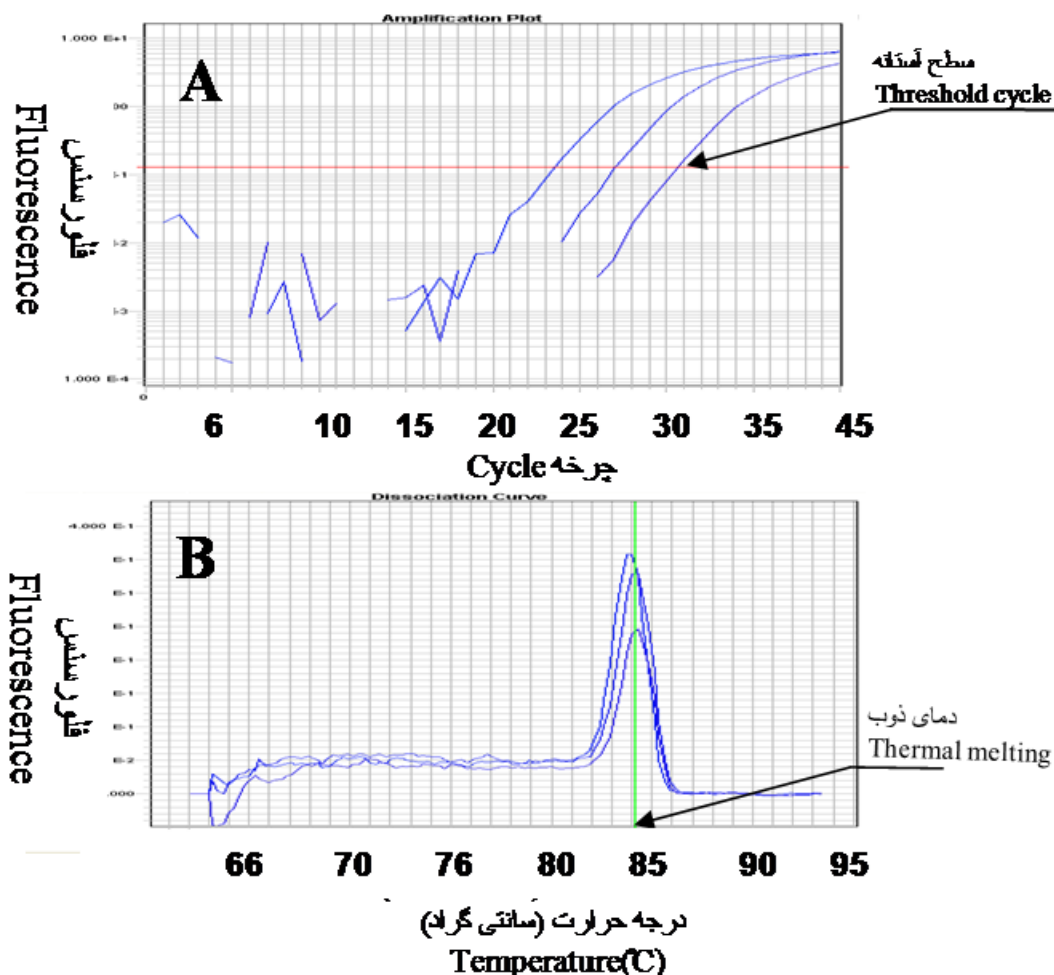
شکل ۱: تأثیر نیتروکسین بر پیشرفت بیماری در گیاهچه‌های خیار آلوده؛ تیمار با نیتروکسین (N) و بدون نیتروکسین (WN) دو تا چهار هفته بعد از تیمار (dpi)

Fig. 1: The effect of nitrokin on disease development in infected cucumber seedlings treated with nitrokin (N) and without nitrokin (WN) 15- 30 day pos infection (dpi)

آنالیز بیان ژن

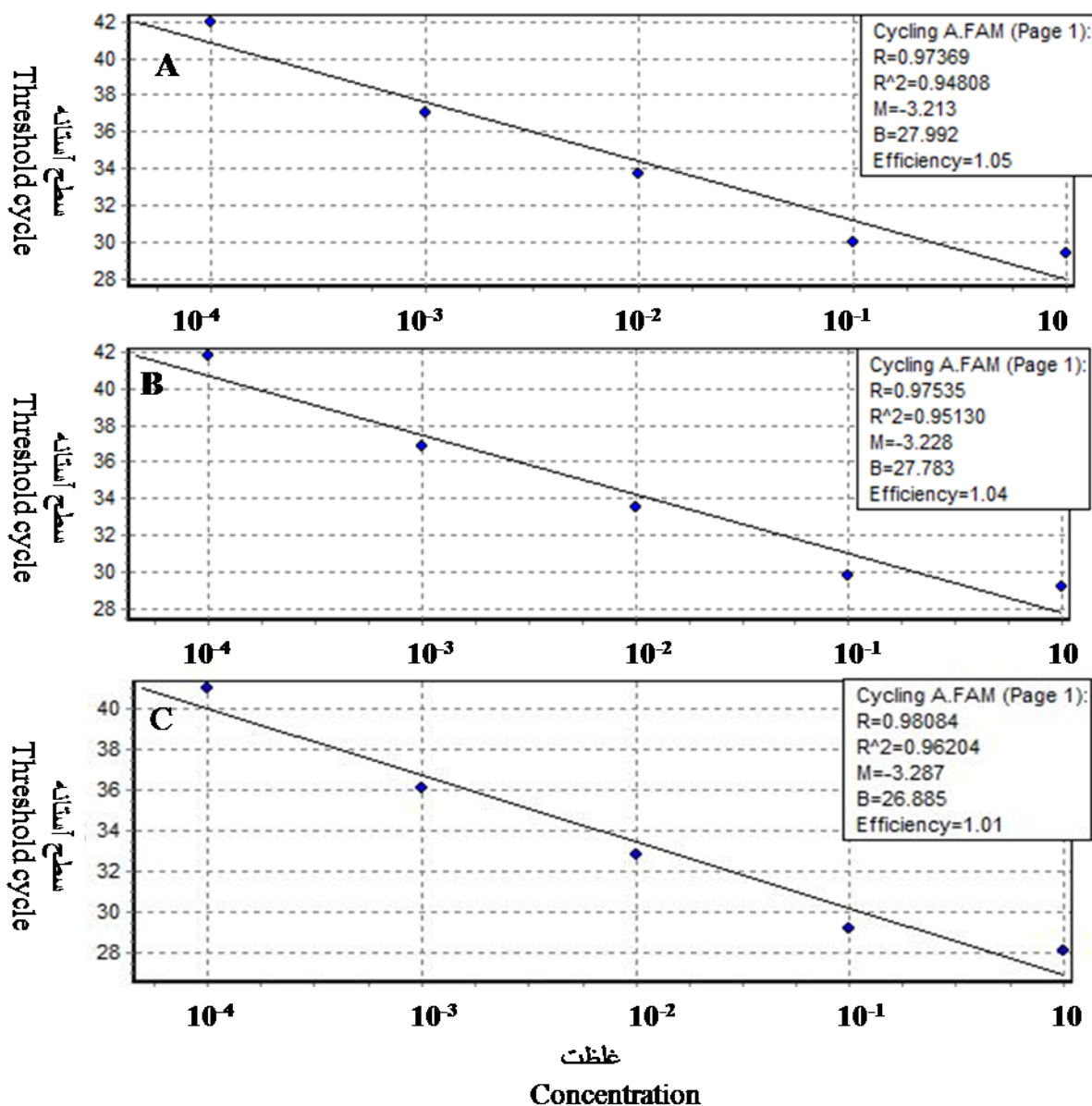
داده‌های حاصل از بررسی کمیت‌سنجی بیان ژن با نرم‌افزار Rest نشان داد که هر دو ژن مورد بررسی در واکنش زنجیره نوری پلی‌مرز به صورت پیوسته تکثیر و آغازگرهای انتخاب شده با بالاترین کیفیت و حساسیت قادر به تکثیر قطعات ژنی مربوطه می‌باشند (شکل ۲-۳). در این تحقیق میزان بیان ژن *Cupi4* و *Chitinase* در گیاهچه‌های خیار در سه تیمار مختلف شاهد بدون آلودگی، آلودگی بدون نیتروکسین و آلودگی با نیتروکسین نشان داد که هر دو ژن در حالت آلودگی به میزان‌های مختلفی با شاهد تفاوت در بیان را نشان می‌دهند. در زمان ۲۴ ساعت بعد از آلودگی میزان بیان ژن *Cupi4* به میزان قابل توجهی نسبت به شاهد افزایش نشان داد و این درحالی بود که این تغییر برای ژن *Chitinase* نسبت به شاهد قابل ملاحظه نبود (جدول ۲ و ۳). نتایج این بازه زمانی نشان می‌دهد که

علی‌رغم مشاهده افزایش میزان بیان ژن *Chitinase* این افزایش نسبت به ژن *Cupi4* بسیار کمتر و در حد ۱۵ درصد می‌باشد. نمودار میله‌ای این تغییرات نیز نشان می‌دهد در سه تیمار مورد آزمایش ژن *Cupi4* نسبت به تیمار آلوده بدون نیتروکسین افزایش قابل ملاحظه و معنی‌داری داشته است. آنالیز داده‌های واکنش توسط نرم‌افزار Rest همچنین نشان می‌دهد که نتایج حاصله در سطح نسبتاً خوب و بالا مورد تجزیه قرار گرفته و اعداد مربوط به انحرافات آزمایش نشان می‌دهد که خطای تکنیکی در تهیه محلول‌های واکنش بسیار ناچیز بوده است (جدول ۳ و ۴). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تیمار کودی نیتروکسین قادر به تقویت گیاه شده و همچنین تحریک گیاه آلوده به عامل مرگ گیاهچه را به افزایش بیان دو ژن مورد بررسی سبب می‌شود.



شکل ۲: A: میزان تغییرات فلورسانس به تعداد چرخه‌های تکثیری در سه غلظت مختلف از cDNA اولیه، B: منحنی دمای ذوب آغازگر ژن *Cupi4* از چرخه‌های تکثیری PCR در دمای واقعی

Fig. 2: A: Kinetic of fluorescence signal versus cycle number performed with three concentration of cDNA primary ($d: 10^{-1}$, 10^{-2} and 10^{-3}), B: Dissociation curves *Cupi4* gene of amplified cycles in qRT-PCR.



شکل ۳: منحنی استاندارد مربوط به ژن‌های *Actin* (A), *Cupi4* (B) و *Chitinase* (C)
 Fig. 3: Standard Curve related to *Actin* (A), *Cupi4* (B) and *Chitinase* (C) genes

بحث

بیماری‌های قارچی نظیر فوزاریوم، ورتیسیلیوم و رایزوکتونیا موجب افزایش مقاومت گیاهان بیمار به بیماری شده است (Lang et al., 2012; Zhu et al., 1994). در ارتباط با کنترل بیمارگرهای گروه قارچی *Oomycetes* به وسیله کودهای زیستی به‌ویژه نیتروکسین مطالعات بسیار اندکی صورت گرفته است و اطلاعات قابل استنادی در دسترس نمی‌باشد. با توجه به اهمیت گیاه خیار و حساسیت اغلب ارقام وارداتی پرمحصول و همچنین مقاومت در حال افزایش آنها به قارچ‌کش‌های رایج، در این تحقیق توانایی کنترل این بیمارگر به وسیله کود زیستی نیتروکسین مورد بررسی قرار گرفت. بلافاصله بعد از تلقیح گیاهچه‌ها توسط عامل بیماری روند توسعه و شدت بیماری مورد بررسی قرار گرفت و

بیماری مرگ گیاهچه خیار یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول به‌ویژه در شرایط گلخانه می‌باشد. استفاده از ارقام مقاوم یکی از مؤثرترین و کم هزینه‌ترین راه‌های کنترل بیماری‌های خاکزاد به‌شمار می‌رود. در این تحقیق از رقم خیار حساس به این بیماری مرگ گیاهچه (ES-2862) استفاده شد رستمی و همکاران (Rostami et al., 2011). مطالعات مختلفی نشان داده است که نیتروکسین در بهبود شرایط رشدی و افزایش اجزاء عملکرد گیاهان زراعی نقش مؤثری داشته است (Ortas and Akpınar, 2006; Wu et al., 2005). مطالعات مختلفی در ارتباط با تأثیر کودهای مختلف زیستی به تنهایی یا مخلوط در کنترل

فعالیت ضد پاتوژنی دارند و سرعت انباشته شدن ژن *Cupi4* نسبت به ژن *Chitinase* در برگ‌های گیاه خیار بیشتر می‌باشد. البته بیان هر دو ژن به صورت سیستمیک در گیاه در می‌آید که ژن *Cupi4* به میزان بیشتری در بافت‌ها دیده می‌شود (فانتومارت و همکاران، 2006). مطالعات نشان داده است استفاده از مواد تحریک‌کننده رشدی شامل Imidacloprid، Isonicotinic acid و Acibenzolar-s-methyl در بیماری شانکر مرکبات آلوده به باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* نشان داد که ژن β -PR-2 (1, 3 glucanase) بعد از ۲۴ هفته به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش داشت فرانسویس و همکاران (Francis et al., 2009). نتایج حاصل از آنالیز داده های بیان ژن نشان داد که ضریب کارایی واکنش برای تمام واکنش‌ها مثبت بوده که خود نشان‌دهنده کارایی نسبتاً بالای آغازگرها می‌باشد اگرچه کیتینازها بیشتر فعالیت ضدقارچی دارند و در برهمکنش‌های بین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی با گیاهان نقش عمده‌ای دارند ولی مطالعات نقش لیزوزیمی را نیز برای کیتینازها اثبات کرده و استنباط شده که از این طریق باعث تجزیه دیواره سلولی سایر عوامل بیماری‌زای دیگر می‌شوند فریتیج و همکاران؛ هیتز و همکاران (Fritig et al., 1994; Heitz et al., 1998). نتایج یک تحقیق نشان داد که تلقیح بوته‌های جوان خیار با پاتوژن‌های مختلف می‌تواند منجر به مقاومت سیستمیک گسترده در گیاه بر علیه ۱۳ بیماری به مدت ۴-۶ هفته گردد کوک و ریچموند (Kuc and Richmond, 1977). پیش‌نیاز تولید ارقام مقاوم، شناسایی مکانیسم‌های گیاهی درگیر در واکنش به عوامل بیماری‌زا است که منجر به ظهور مقاومت در ارقام مقاوم و حساسیت در ارقام حساس گیاهی می‌شود بیکر و همکاران (Baker et al., 1997). بررسی اجزاء عملکرد مربوط به تأثیر کودهای آلی و شیمیایی نشان داده شده است که اجزای عملکرد رویشی و بعضی از صفات زراعی به میزان قابل‌قبولی با کاربرد این کودها تغییر کرده است آرانکون و همکاران؛ اتیه و همکاران، Arancon et al., 2000; Atiyeh et al., 2002; Atiyeh et al., 2004). ولی گزارشات کمی در ارتباط با نقش کودها به‌ویژه در سطح ریزوسفر در افزایش مقاومت به بیماری‌های گیاهی وجود دارد از این‌رو با آگاهی از میزان بیان ژن‌های درگیر در مقاومت گیاهان می‌توان به تولید و معرفی ارقام مقاوم پرداخت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از کودهای زیستی می‌تواند در مقاوم‌سازی ارقام پر محصول حساس به بیماری‌های گیاهی به‌کار گرفته شود.

۱۵ روز بعد از تلقیح به مدت دو هفته آماربرداری از شدت علائم بیماری انجام گرفت. در طول زمان آزمایش مشاهدات عینی و داده‌های حاصل نشان داد که در تیمار کودی نیتروکسین شدت بیماری نسبت به شاهد آلوده کمتر می‌باشد. علت کاهش شدت بیماری در فاصله زمانی ۴۸ ساعت بعد از آلودگی نشان‌دهنده ایجاد مقاومت نسبی در گیاه در طول زمان می‌باشد. با توجه به بررسی مولکولی به‌عمل آمده در یک تا دو روز بعد از تلقیح می‌توان چنین استنباط نمود که بیان بیش از حد ژن‌های مسئول مقاومت بلافاصله بعد از تحریک توسط عامل بیماری شرایط ایجاد مقاومت القایی را در گیاه فراهم و به‌دنبال آن در روزهای بعد در شدت توسعه بیماری در گیاه تأثیر نسبتاً قابل‌قبولی برجای گذاشته است.

علاوه بر دلیل فوق در ایجاد مقاومت نسبی، کاهش شدت بیماری در اثر اعمال کود نیتروکسین احتمالاً در نتیجه در دسترس قرار دادن نیتروژن برای گیاه می‌باشد که با سرعت بخشیدن تولید ترکیبات اصلی گیاه و همچنین پروتئین‌های آنزیمی مسئول تقسیمات سلولی و تشکیل سلول‌های مرستمی موجب افزایش مقاومت گیاه به بیماری و می‌تواند در فرار گیاهچه از بیماری به ویژه در مراحل اولیه آلودگی کمک نماید سالاردینی و مجتهدی (Salardini and Mojtahedi, 1989). ژن *Cupi4* یکی از ژن‌های مؤثر در ایجاد مقاومت خیار به بیماری مرگ گیاهچه گزارش شده است که در حالت ایجاد مقاومت میزان بیان آن نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است می‌شود (فانتومارت و همکاران، 2006). نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار نیتروکسین می‌تواند بیان این ژن کاندیدا در ایجاد مقاومت را به میزان قابل‌توجهی در گیاهچه‌های آلوده افزایش دهد. ژن کیتیناز نیز یکی از ژن‌های مسئول مقاومت به بیماری‌های مختلف در اکثر خانواده‌های گیاهی می‌باشد که بیان آن در گیاهان تحریک شده قابل تغییر می‌باشد الحدرامی و همکاران؛ پانژ و زانگ (El Hadrami et al., 2010; Punja and Zhang, 1993). آنالیز بیان ژن‌های مقاومت در خیار در اثر تحریک با نیتروکسین نشان داد که بیان ژن *Cupi4* نسبت به ژن *Chitinase* افزایش بیشتری داشت که احتمالاً کاهش بیان ژن *Chitinase* نسبت به ژن *Cupi4* مربوط به ساختار دیواره شبه‌قارچ تلقیح شده باشد که در ساختار خود میزان کیتین بسیار کمی دارد. در این بررسی افزایش بیشتر بیان ژن *Cupi4* نشان از اهمیت این ژن در مقابل این بیماری دارد البته برای مشخص شدن تخصصی بودن ژن در مقابل استرس بیماری باید با سایر عوامل بیماری‌زا نیز بیان آن بررسی گردد. پروتئین‌های حاصل از *Cupi4* در تقویت ترکیب دیواره سلولی و

فناوری زیستی در کشاورزی / جلد چهاردهم / شماره دوم / پاییز و زمستان ۹۴

سیاسگزاری

تحقیق یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌شود. این تحقیق با مساعدت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد سیستان و بلوچستان در قالب بخشی از طرح مصوب پژوهشی اجراء گردید.

از سرکار خانم دکتر مهتا مظاهری به خاطر کمک در آنالیز داده‌های بیان ژن و همچنین از مسئول و کارشناسان محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل که ما را در اجرای این

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۸-۱۹ متن انگلیسی مراجعه شود.