متیل جاسمونات ومقاومت به بیماری بلایت خوشه‌ی گندم ایجاد شده به وسیله‌ی قارچ *Fusarium graminearum*

سیدکاظم صباغ[۱*]، مرجان پیکانی[۲] و مرضیه طاهری[۳]

۱- دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی،گروه زیست شناسی،دانشکده علوم، دانشگاه یزد.
۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشدبیماریشناسی گیاهی،گروه گیاهپزشکی،دانشکده کشاورزی،دانشگاه زابل.
۳- کارشناس آزمایشگاه، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد.
*مسئول مکاتبه sksabbagh@yazd.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۴/۴

چکیده

در این تحقیق تعاملات بین بیمارگر *Fusarium graminearum* و گندم شامل تغییر در میزان فعالیت چند آنزیم آنتی اکسیدانی و تغیر در سطح بیان ژن‌های PR2 (b,1-3gluconase), PR3 (chitinase) , و PR4 (wheatwin)مورد بررسی قرار گرفت. از رقم گندم تجن، آزمایش در شرایط کشت آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار استفاده شد. محلول پاشی اندام هوایی گیاه توسط متیل جاسمونات با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در میلی لیتر و یک، سه وپنج روز پس از مایه‌زنی با اسپور قارچ*Fusarium graminearum* (غلظت 10^5 اسپور در هر میلی لیتر) انجام گرفت. همچنین اثر بازدارندگی متیل جاسمونات روی رشد پرگنه‌ی قارچ در غلظت‌های مختلف بر روی محیط کشت PDA بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان تولید فنلکل و آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، گایاکول پراکسیداز سه روز بعد از الودگی در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به بالاترین مقدار خود رسیده ولی بعد از پنج روز کاهش معنی‌داری نشان داد. بررسی بیان ژن‌ها در بازه‌ی زمانی ۳ روز بعد از آلودگی نشان داد که ژن بتا ۱،۳ گلوکوناز و کیتیناز به ترتیب بالاترین و پایین ترین سطح میزان بیان را داشته اند. بررسی اثر بازدارندگی رشد قارچ بوسیله‌ی متیل جاسمونات نشان داد که این ماده در غلظت ۶۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین بازدارندگی را دارا می‌باشد. نتایج بدست آمده بیانگر این است که کاربرد خارجی متیل جاسمونات به عنوان القاگر شیمیایی در ایجاد مقاومت گیاه در برابر بیماری بلایت خوشه‌ی گندم می‌تواند در مدیریت مبارزه با بیماری مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: مقاومت القایی، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، بیان ژن در زمان واقعی، آنزیمهای آنتی اکسیدانی، فنل کل.

مقدمه

بلایت فوزاریومی خوشه‌ی گندم که بوسیله‌ی قارچ *Fusarium graminearim* Schwab ایجاد می‌شود یکی مخرب‌ترین بیماری‌های گندم و جو در سراسر دنیا می‌باشد که هر ساله میلیون‌ها دلار خسارت به غلات کشت شده در سراسر جهان وارد می‌کند (Wenda-Piesik et al., 2017). آلوگی خوشه‌ی گندم به این بیماری علاوه بر کاهش تولید محصول در مزرعه، کاهش کیفیت دانه و آرد نانوایی، منجر به تولید زهرابه‌های سرطان زا در دام و انسان می شود (Goswami and Kistler, 2004). فوزاریوم سنبله یا اسکب گندم در شمال ایران به صورت بومی وجود دارد و یکی از بیماری‌های مهم گندم در استان‌های گلستان و مازندران به شمار می‌رود (Abedi-Tizaki and Sabbagh, 2012)، هر چند گزارشاتی از نقاط دیگر کشور نیز مانند آذربایجان، هرمزگان، فارس و خوزستان مبنی بر مشاهده این بیماری در آن نقاط ارایه گردیده است (Mirabolfathy and Karami-Osboo, 2013; Moosawi-Jorf et al., 2007).

به علت کاهش ۵۰ تا ۶۰ درصدی محصول، فوزاریوز خوشه‌ی گندم یک تهدید عمده برای منابع غذایی جهان شده و مرکز تحقیقات بین المللی (CIMMYT) آن را به عنوان یکی از فاکتورهای محدودکننده ی تولید گندم در جهان مطرح کرده است (Nicholson, 2009). گیاهان می‌توانند از طریق تولید آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانتی (پارا اکسایشی) به طیف وسیعی از تنش‌های زیستی نظیر عوامل بیماری‌زا و تنش‌های غیر زیستی مانند دما، خشکی، شوری، ازن، اشعه UV پاسخ دهند (Gill and Tuteja, 2010). یکی از جنبه‌های مهم دفاعی گیاه میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده آن است. محققین متعددی ارتباط نقش ترکیبات فنلی و آنزیم‌های آنتی‌اکسدانتی نظیر پراکسیداز و فنل اکسیداز را با مقاومت در میزبان‌های مختلف در رابطه با عوامل بیماری‌زای قارچی ثابت کرده‌اند (Baxter et al., 2014; Gill and Tuteja, 2010). نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسدانتی در ایجاد مقاومت سیستمیک گیاهان در تنش‌های زیستی و غیر زیستی در بسیاری از گیاهان مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده است که در واکنش ناسازگار بین گیاه و عوامل بیمارگر، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی چند برابر واکنش سازگار می‌باشد (Bigeard et al., 2015; Vacheron et al., 2013).مقاومت در گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی همواره با بیان ژن های مقاومتی مختلفی در ارتباط می‌باشد که می‌توانند در محل آلودگی و یا بطور سیستمیک تولید شده و مقاومت القایی گیاه را موجب گردند (Schenk et al., 2003). بیان چنین ژن‌هایی شبکه‌ی پیچده‌ی علامت دهنده ی پاسخ‌های دفاعی گیاهان را درگیر واکنش مقاومتی می‌کند. مولکول‌های علامت دهنده‌ای شامل سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات، اتیلن و اسید آبسزیک در این زمینه شناسایی شده است (Anderson et al., 2004).متیل جاسمونات از طریق تحریک گیاهان به بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت‌های دفاعی باعث مقاومت به طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی می‌شود (Antico et al., 2012; Desmond et al., 2005).کاربرد خارجی متیل جاسمونات در افزایش مقاومت گیاه هلو به بیماری‌های بعد از برداشت در شرایط انبارداری نشان داده است که متیل جاسمونات در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، قادر به جلوگیری از توسعه‌یمیسیلوم قارچ*P expansum* بر سطح میوه و منجر به افزایش مقاومت به پوسیدگی‌های بعد از برداشت شده است (Yao and Tian, 2005). در یک تحقیق دیگر تاثیر متیل جاسمونات و متیل جاسمونیک بر روی رشد قارچ*Penicilliumdigitatum* نشان داد که این دو ترکیب اثر بازدارنده ی قابل ملاحظه‌ای نسبت به شاهد بر روی جوانه‌زنی اسپور قارچ ندارد ولی باعث جلوگیری از توسعه ی میسیلیومی قارچ در شرایط آزمایشگاه می‌شود (Ding et al., 2002). تیمار گیاهان با جاسمونات‌ها، باعث اقزایش مقاومت برنج به بیماری پوسیدگی ساقه ناشی از قارچ *Magnaporth* (Schweizer et al., 1998)،آرابیدوپ سیس آلوده به بیمارگرهای *Botrytiscinerea* ،*Alternaria brassicicola* و*Plectos phaerellacucumerina*) شده است (Thomma et al., 2000). نقش متیل جاسمونات در افزایش بیان تعدادی از ژن‌های مسئول مقاومت نشان داده است که کاربرد خارجی متیل جاسمونات باعث افزایش میزان ژن‌های مقاومتی در گیاه گندم حساس به بیماری پوسیدگی طوقه می‌شود (Desmond et al., 2005). آنالیز بیان ژن با استفاده از تکنیک ریزآرایه نشان داده است که در رقم گندم مقاوم به بیماری اسکب خوشه‌ی گندم (Saumi3) میزان بیان ژن های مسئول تولید جاسمونیک و سالیسیلیک اسید، ۲ برابر این میزان در رقم حساس می باشدو چنین نتیجه‌گیری شده است که اسید جاسمونیک و سالیسیلیک اسید در مسیرهای مقاومت گندم و ایجاد مقاومت سیستمیک نقش مهمی دارند (Li and Yen, 2008). در ارتباط با تاثیر متیل جاسمونات در القاء مقاومت گندم به بیماری‌های مختلف اطلاعات زیادی در دست نیست و اغلب مطالعات در ارتباط با تاثیر اسید جاسمونیک در تنش‌های غیر زیستی نظیر شوری و خشکی و بیان ژن‌های مرتبط می‌باشد (Harkamal et al., 2007). در این تحقیق تاثیر متیل جاسمونات در القاء

مقاومت گندم به بیماری اسکب خوشه از طریق آنالیز فیزیولوژیکی و همچنین بررسی نقش و کارآیی چند ژن مسئول مقاومت در گندم و همچنین نقش آن در بازدارندگی رشد میسیلومی قارچ عامل بیماری در شرایط درون شیشه در رقم نیمه حساس تجن به بیماری اسکب گندم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد

از رقم گندم تجن حساس به بیماری فوزاریوز گندم جهت بررسی القاء مقاومت استفاده شد. جهت کشت گلدانی در ابتدا، بذرها بوسیله کلرامین تی سه درصد (ChloraminT3%) ضد عفونی سطحی شده و سپس سه بار بوسیله ی آب مقطر سترون شستشو داده شدند. از گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۲۵ سانتی متر حاوی خاک مزرعه سترون جهت کشت استفاده شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با رطوبت ۷۵٪ ، دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و با دوره‌ی آبیاری منظم هر سه روز یکبار نگهداری شدند و سپس در مرحله‌ی پنجه‌دهی تعداد بوته در هر گلدان با تنک کردن به شش عدد رسید. این آزمایش در چهار تکرار انجام شد.

تهیه‌ی محلول و محلول‌پاشی متیل جاسمونات

برای تهیه‌ی غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلیگرم در میلی‌لیتراز متیل جاسمونات شرکت مرک استفاده گردید. مقادیر لازم از محلول متیل جاسمونات در اتانول ۷۰ درصد به عنوان حلال آن، حل گردید و سپس با همین حلال به حجم نهایی ۲۰۰ میلی لیتر رسانده شد. تیمار متیل جاسمونات با غلظت‌های مورد نظر با استفاده از یک افشانه دستی بر سطح خوشه‌ها و اندام‌های هوایی گیاه پاشیده شد به طوریکه تمام سطوح مورد پاشش از محلول پوشیده شدند. برای بوته‌های شاهد از اتانول ۷۰ درصد استفاده گردید.

تهیه و مایه‌زنی عامل بیماری بلایت خوشه

در این بررسی از جدایه‌ی استاندارد قارچ *Fusariumgraminearum* تهیه شده از گروه گیاه پزشکی دانشگاه اردبیل برای تهیه‌ی مایه تلقیح استفاده شد. بدین منظور برای تهیه‌ی پرگنهٔ تازه قارچ، یک دیسک به قطر یک سانتی متربه روی محیط کشت PDA (Poatato Dextrose Agar, Merck, Germany) کشت داده و به گرمخانه با دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سلسیوس انتقال داده شد. پس از رشد قارچ به مدت یک هفته، یک دیسک از حاشیه پرگنهٔ قارچ به ارلن‌های دوبار سترون شدهٔ حاوی ۵۰ گرم کاه خرد شده و ۱۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل گردید. ارلن‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس روی شیکر دورانی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت پنج تا شش روز نگهداری شدند. سپس محتویات ارلن‌ها از یک پارچهٔ ململ سترون عبور داده شد و درون یک لوله‌ی فالکون سترون ریخته شد، به منظور جدا کردن فاز میسلیومی و اسپور قارچ، لوله‌های فالکون با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز شفاف بالایی را که حاوی اسپور (ماکروکنیدیوم) قارچ بود، جهت تهیه‌ی مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. از سوسپانسیون اسپور حاوی 10^5 اسپور در میلی‌لیتر جهت مایه زنی استفاده شد. مایه‌زنی بوته‌ها با تزریق ۲۰ میکرولیتر اسپور قارچ توسط سرنگ در هر سنبله درون گلچه میانی انجام شد (Bernardo et al., 2007). نمونه‌برداری از بوته‌های گندم در بازه‌های زمانی یک، سه و پنج روز پس از مایه‌زنی عامل بیماری از برگ‌های جوان گیاه انجام گرفت و بلافاصله به فریزر ۸۰- درجه‌ی سلسیوس تا انجام آزمایشات بعدی انتقال یافت.

بررسی بازدارندگی‌از رشد

اثر بازدارندگی متیل جاسمونات بر رشد قارچ*F.graminearum* به روش اختلاط با محیط کشت PDA مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت متیل جاسمونات به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید و برای شاهد، محیط PDA به همراه ۱۰۰ میلیولیتر متانول ۷۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت. یک دیسک قارچ به قطر ۵ میلی‌متر از لبه‌ی پرگنه ۷ روزه قارچ عامل بیماری برداشته و در مرکز هر یک از ظروف پتری آماده شده گذاشته شد. ظروف در گرمخانه ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از

گذشت پنجروز، قطر رشد پرگنه‌ی قارچ هر پتری اندازه‌گیری شد. در این آزمایش برای هر غلظت (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلیوگرم در میلی‌لیتر) ۴ تکرار در نظر گرفته شد. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف با بهره‌گیری از فرمول زیر انجام گرفت (Yao and Tian, 2005).

$$\text{میزان بازدارندگی رشد قارچ} = \frac{\text{قطر پرگنه شاهد - قطر پرگنه تیمار}}{\text{قطر پرگنه شاهد - ۵ میلی متر}}$$

ارزیابی تغییر میزان فنل کل

برای اندازه‌گیری فنل کل از عصارهٔ برگی صاف شده با استفاده از معرف فولین به شرح زیر استفاده شد. در ابتدا مقدار یک گرم از بافت گیاهی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در هاون چینی مخلوط، و پس از له کردن برگ‌ها، عصاره ی حاصل از پارچه ململ دو لایه عبور و در ظرفی استریل ریخته شد. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصارهٔ به دست آمده، ۷ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و کاملا مخلوط و ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین اضافه و مجددا محتویات لوله با هم مخلوط شد. پس از ۳ دقیقه یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به لوله اضافه و حجم مخلوط با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد (Sabbagh et al., 2018). پس از یک ساعت، مقدار جذب نوری در طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف سنج (Unico UV-2100, USA) خوانده شد. از محلول استاندارد اسید کافئیک برای تعیین اندازه-ی مقدار فنل کل برحسب میکروگرم در یک گرم برگ تازه استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیمی

جهت سنجش میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های بیوشیمیایی، در ابتدا، مقدار ۰/۵ گرم بافت گیاهی در هاون چینی سرد با ازت مایع پودر شد و سپس با محلول عصاره‌گیری (۱۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم با (PH=6.8) ، ۲۰ میکرولیتر EDTA (0.1M) و ۳۸۰ میکرولیتر آب مقطر) یکسانه شد. سپس به مدت ۲۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه-ی سلسیوس سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ از فاز بالایی عصاره، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد. جهت تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز، به مخلوط واکنش ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار (PH=7)، ۴۰۰ میکرولیتر گایاکول ۱ میلی مولار، ۲۰ میکرولیتر عصاره ی آنزیمی و ۱۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ی ۳ میلی‌مولار اضافه شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع می‌شود. جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز به ۴۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۰/۲ مولار (PH=7)، پیروگالول۰/۰۲ مولار به میزان ۱ میلی‌لیتر، ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره ی آنزیمی اضافه شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن پیروگالول به مخلوط واکنش شروع شد. فعالیت آنزیم در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه پس از افزودن پیروگالول اندازه‌گیری شد (Gongh et al. 2001). جهت تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، به ۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۵ مولار (PH=6.8)، ۰/۲ میکرولیترEDTA (۰/۲ مولار) ، ۵۰ میکرولیتر گایاکول (۵ میلی‌مولار)، مقدار ۷۹۹/۸ میکرولیتر آب مقطر ،، ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی و ۳۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه اضافه شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و گایاکول پراکسیداز به ترتیب در طول موج‌های ۴۷۵ ، ۴۲۰ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج خوانده شد.

بررسی بیان ژن‌ها به روش بیان ژن در زمان واقعیدر این پژوهش جهت بررسی میزان بیان ژن‌های β-1,3-glucanase، PR4 (wheatwin) و ChitinaseI از برگ گیاهان تیمار شده و شاهد جهت استخراج مولکول mRNA استفاده گردید. بدین منظور، ۵۰ گرم ازبرگ‌های گیاه موردنظر جدا و در هاون چینی با استفاده از ازت مایع پودر گردید و جهت استخراجRNAبااستفاده از کیتک یا ژن (Qiagene, Germany) استفاده گردید. رشته‌ی اولDNA از ملکول‌های mRNA با استفاده از کیت جاری 2-Steps RT-PCR kit (Vivantis, Cinngene)ساخته شد. کمیت و کیفیت مولکول‌های cDNA به ترتیب با استفاده از

دستگاه اسکندر اپ(Analytika, Germany)و ژلآگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار ۵۰ نانوگرماز cDNA برای انجام آنالیز بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده برایqRT-PCR توسط نرم افزار آنلاین (deu/primer3/input.htm http://Fokker.wiPrimer3.mit.Primer3)طراحی و توسط شرکت سیناژن ساخته شد (جدول ۱). واکنش qRT-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA(50 ng/µl)، ۲ میکرولیتر از مخلوط دو آغازگر (20µM)، ۴ میکرولیتراز Mastermix (Hot Tag EvaGreen, Cinnagene, France) و با استفاده از دستگاه کوربت (RG3000, Curbet, Australia) با برنامه‌ی دمایی ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه وبه دنبال آن ۴۰ چرخه‌ی حرارتی شامل ۹۵ درجه‌ی سلسیوس برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی برای هر تیماردر نظر گرفته شد.

جدول ۱- مشخصات مربوط به ژنهای دفاعی مفروض و توالی آغازگرهای استفاده شده برای آنالیز بیان ژن با روش بررسی بیان ژن در زمان واقعی

Table 1: Related characters of proposed defenses genes and sequence of used primers for gene expression analysis by real time PCR method.

Gene ژن	Forward Primer 5'-3' آغاز گر رفت ´۳-´۵	Reverse Primer 5'-3' غاز گر برگشت ´۳-´۵	Accession number شماره دسترسی	Reference منبع
B–1,3-glucanase	CTCGACATCGGTAACGACCAG	GCGGCGATGTACTTGATGTTC	Y18212	(Bertini et al., 2003)
Chitinase I	AGAGATAAGCAAGGCCACGTC	GGTTGCTCACCAGGTCCTTC	AB029934	(Desmond et al., 2003)
Wheatwin 1–2	CGAGGATCGTGGACCAGTG	GTCGACGAACTGGTAGTTGACG	AJ006098	(Bertini et al., 2003)
β-Tubulin	GCCATGTTCAGGAGGAAGG	CTCGGTGAACTCCATCTCGT	U76895	

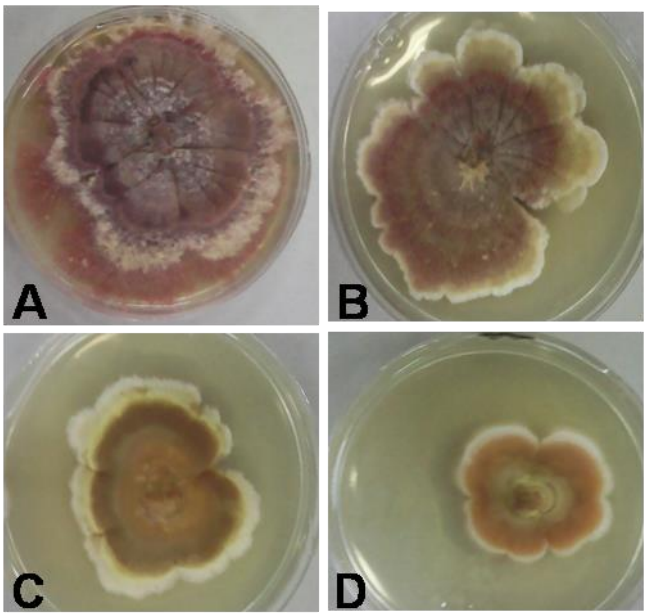
آنالیز آماری

در این پژوهش داده‌های کمی و کیفی جهت مرتب کردن و رسم نمودارها به نرم‌افزار Excel وارد شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت و میانگین داده ها به روش آزمون Duncan در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.آنالیز داده‌هایبدست آمده از بیان ژن با نرم افزار REST 2009 که تخصصی داده‌های خروجی Real time PCR می‌باشد انجام گرفت.. از ژن رفرانس بتا توبولین برای همسانه سازی داده‌ها استفاده شده و داده‌های مربوط به گیاه شاهد برای کالیبراسیون تغییرات سیکل آستانه مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

بررسی اثر متیل جاسمونات در جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ *F. graminearum*

با توجه به نتایج به‌دست آمده، با افزایش غلظت متیل جاسمونات اثر بازدارندگی آن بر رشد قارچ *F. graminearum* بیشتر شد، رشد میسیلیوم به طور معنی‌داری ($p<0.01$) در غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌ام و پایین‌تر از آن کاهش یافت و رابطه‌ی خطی بین غلظت متیل جاسمونات و اثر بازدارندگی آن وجود داشت. اما میزان بازدارندگی در غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌ام با میزان آن در تیمار با غلظت‌های کمتر از خود دارای اختلاف معنی‌دار بود، که این اختلاف به وضوح در تصویر نمایان است (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه‌ی رشد میسیلیومی قارچ ***F. graminearum*** در محیط کشت حاوی متیل جاسمونات با غلظت‌های مختلف
A : پرگنه‌ی قارچ بعد از مدت دو هفته (شاهد). **B** : تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، **C** : تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و **D** : تیمار ۶۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر.

Figure 1- comparison of mycelial growth of *F. graminearum* in culture medium containing of meyhylJasmonat with different concentration
A: Fungal colony after two weeks (control). B: Treatment with 200 mg/mL, C: 400 mg/mL and D: 600 mg/mL

نتایج ارزیابی اثر بازدارندگی متیل جاسمونات در محیط کشت نشان داد که بین اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ بیمارگر در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار وجود دارد و میانگین قطر رشد پرگنه‌ها با افزایش غلظت متیل جاسمونات کاهش نشان داد و اثر بازدارندگی هر سه غلظت ۲۰۰ ، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲- درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ ***F. graminearum*** توسط متیل جاسمونات

Table 2- Inhibition percentage of mycelium growth of *F. graminearum* by methyl jasmonat

Inhibition parentage درصد بازدارندگی	Growth mean (cm) میانگین رشد (cm)	Methyl Jasmonat concentration غلظت متیل جاسمونات
0%[d]	6.22	Control (0)
45%[c]	2.47	200 mg/L
68%[a]	2.03	400 mg/L
963%[a]	0.47	600 mg/L

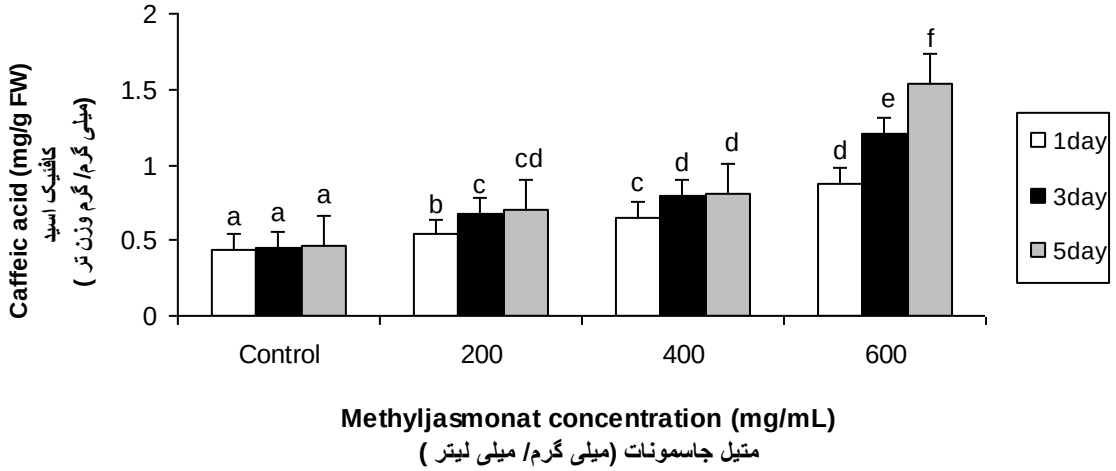
CV: 7.15

۱- اعداد با حروف مختلف در هر ستون، نشان دهنده ی اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد. این آزمایش توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P<0.01$) انجام گرفت.
۲- میانگین رشد قطری پرگنه ی بیمارگر در هفت روز پس از مایه‌زنی (سانتی متر)، نتایج مربوط به میانگین سه تکرار است.

1-The numbers with different letters in each column show a significant different between treatments. This experiment was done by Duncan's multiple range test at the 1% level.
2- Mean of growth diameter of fungal colony in 7 days after inoculation (cm)m, these results are related to mean of triplicate experiments

بررسی تغییرات کمی ترکیبات فنل کل

داده‌های حاصل از تجزیه‌ی واریانس نشان داد که به احتمال ۹۹ درصد بین مقادیر فنل کل در شاهد آلوده و گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به این معنی که مقدار فنل تولید شده در گیاهان بیمار تیمار شده با متیل جاسمونات نسبت به مقدار تولید شده‌ی آن در نمونه‌ی شاهد بدون تیمار بیشتر است و این مقادیر در این دو گروه با هم تفاوت دارد.



شکل۲. میزان تغییرات فنل کل گیاه گندم آلوده به بیماری اسکب خوشه تحت تاثیر غلظتهای مختلف متیل جاسمونات.

Figure 2: The change rate of total phenol infected wheat plant to head scab disease under effect of different concentration of metylJasmon

با توجه به نتایج حاصل از نمودار ارایه شده در شکل دو مشاهده می‌شود که تولید فنل کل در گیاهان تیمار شده بعد از آلودگی افزایش یافته است ولی در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر تقریباً در یک سطح مشابهی افزایش داشته، در حالیکه در غلظت ۶۰۰ میلی گرم در میلی لیتراین افزایش نسبت به بقیه ی تیمارها و شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. نتایج بررسی میزان محتوای فنل کل در بازه‌های زمانی مختلف بعد از آلودگی نشان داد که میزان افزایش بعد از شروع آلودگی در تمام غلظت‌ها افزایش معنی‌دار داشته و با گذشت زمان (۵ روز بعد از آلودگی) میزان محتوای فنل کاهش نشان نداد. همچنین بین اثر متقابل زمان و تیمار متیل جاسمونات اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش آنزیم پراکسیداز نشان داد که افزایش تولید این آنزیم در مقایسه با شاهد آلوده دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد (جدول ۳). در تمام ساعات بعد از آلودگی بیشترین میزان تولید آنزیم برای غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ثبت شد. میزان افزایش آنزیم برای تمام غلظت‌ها تا سه روز بعد از آلودگی ادامه داشت و این روند افزایش با گذشت زمان رو به کاهش یافت به طوریکه در ۵ روز بعد از آلودگی میزان آنزیم برای تمام غلظت‌ها در روز پنجم کاهش معنی‌داری یافته است (شکل ۳) .

بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در شکل ۴ نشان داده شده است. در گیاهانی که با متیل جاسمونات تیمار شده بودند، پس از گذشت سه روز بعد از آلودگی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد آلوده در فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز مشاهده شد. افزایش فعالیت این آنزیم فقط در گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات در غلظت ۶۰۰ میلیگرم در میلی‌لیتر نسبت به شاهد آلوده و سایر غلظت‌های متیل جاسمونات دارای اختلاف معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم پلی فنل

اکسیداز در بین روزهای مختلف نمونه برداری از اولین روز دوره‌ی مورد بررسی تا روز سوم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری روند افزایشی داشت، اما از روز پنجم به تدریج کاهش یافت.

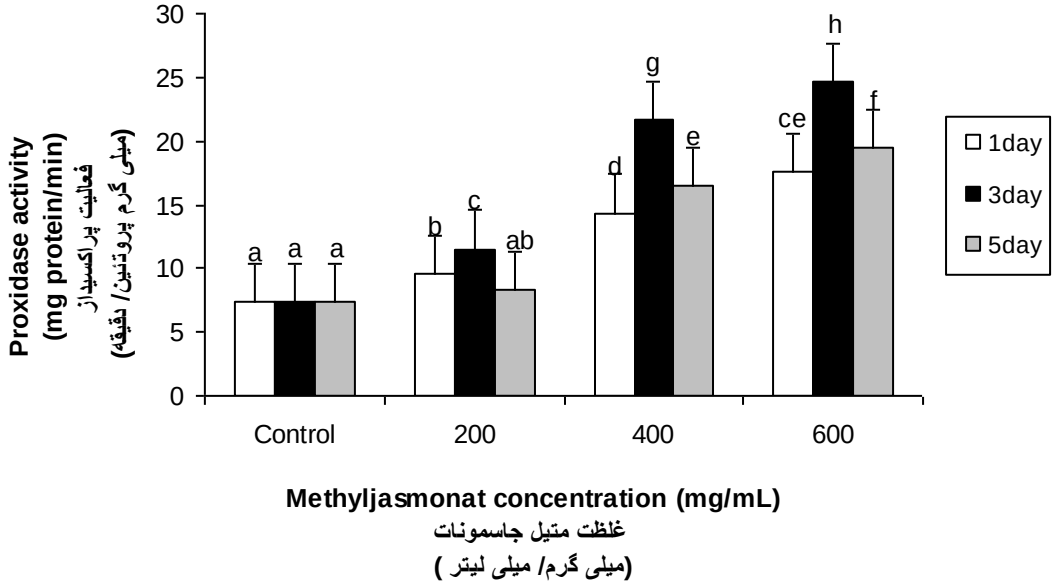
جدول۳- تجزیه واریانس فنل کل، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز در گندم های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات

Table 3- Analysis of variance of total phenol, Proxidase, Gayacol Peroxidase and Polyphenol oxidase in infected wheat treated with different concentration of methyl Jasmonat

Gayacol Peroxidase **گایاکول پراکسیداز**	Polypheno oxidase **پلی فنل اکسیداز**	Proxidase **پراکسیداز**	Total phenol **فنل کل**	Free down **درجه آزادی**	Source of variance **منابع تغییرات**
38.117**	189.680**	281.504**	0.155**	3	**متیل جاسمونات** MethyJasmonat
27.298**	70.356**	98.865**	0.142**	2	**روز جمع‌آوری نمونه** Day of sampling
2.851**	9.792**	4.614n.s	0.002n.s	6	**اثر متقابل** Interaction effect
0.363	1.165	3.827	0.004	24	**خطای آزمایش** Ttest error
12.882	10.172	13.633	10.360		**ضریب تغییرات** Coefficient of variation

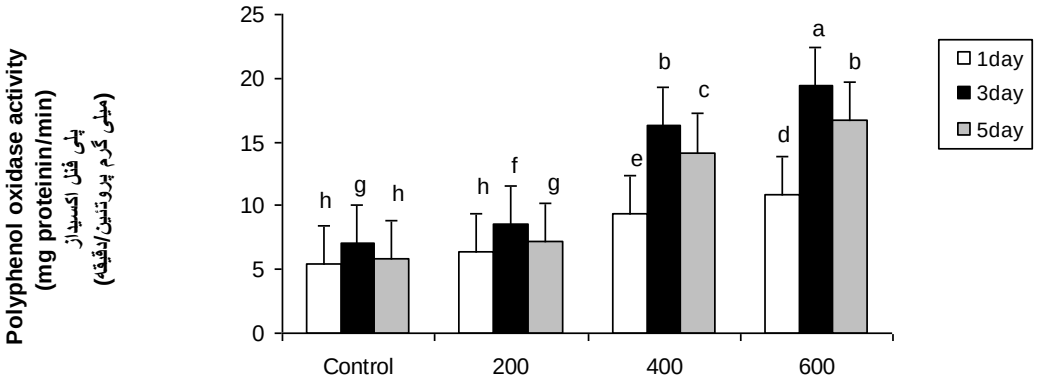
ns، **عدم وجود تفاوت معنی‌دار، * معنی‌دار در سطح ۵٪ و ** معنی‌دار در سطح ۱٪**

ns, non significant, * significant at 5% and ** significant at 1% probability level.



شکل ۳- بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در فواصل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی بیمارگر.

Figure 3: The rate of Peroxidase enzyme activity in treated plants with different concentration of metyl Jasmonat different time intervals after pathogen inoculation, (CO): Infected control.



شکل ۴- بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در فواصل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی بیمارگر، (Co): شاهد آلوده.

Figure4: The rate of enzyme activity of Polyphenol Oxydase in treated plants with different concentration of metylJasmonat in different time intervals after pathogen inoculation, (CO): Infected control

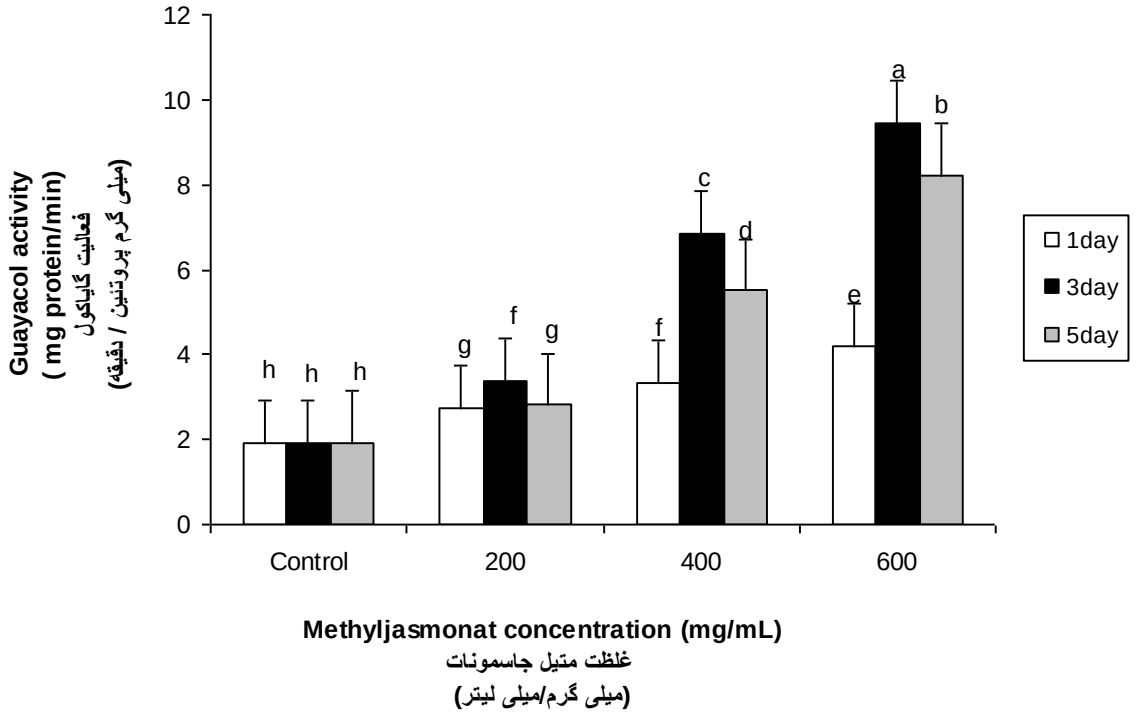
بررسی میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

بررسی تغییرات آنزیم آنتی اکسیدانتی گایاکول پراکسیداز و مقایسه ی آن با گیاه شاهد و زمان‌های مختلف بعد از آلودکی نشان داد که میزان این آنزیم نیز در برابر تنش زیستی بیماری با حضور القاءگر متیل جاسمونات افزایش یافته است. بیشترین میزان تغییرات این آنزیم نیز برای غلظت ۶۰۰ میلیوگرم در میلی لیتر مشاهده گردید. میزان کاهش این آنزیم با گذشت زمان نسبت به آنزیم‌های قبلی با شیب کندتری صورت گرفت و این میزان کاهش بین یک تا پنج درصد واحد اندازه گیری ثبت شد (شکل ۵).

آنالیز داده‌های حاصل از فعالیت آنزیمی و مقایسه ی میانگین آنها نشان داد که بیشترین میزان تغییر در بازه ی زمانی سه روز بعد از آلودگی و در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از متیل جاسمونات می‌باشد (جدول ۳).

استخراج مولکولهای RNA و سنتز cDNA

نتایج حاصل از استخراج نشان داد که مولکول‌های RNA فاقد هر گونه شکستگی بر روی ژل الکروفورز آگارز می‌باشد. جهت سنتز مولکو cDNA در ابتدا رشته-ی اول از مولکول‌های mRNA سنتز شد. در سنتز رشته‌ی اول از الیگونوکلئوتید اتفاقی (Random hexmer) استفاده شد. جهت اطمینان از سنتز مولکول cDNA نمونه‌های بدست آمده بر روی ژل الکتروفورز آگارز قرار داده شد و کیفیت آن بررسی و سپس کمیت آن تعیین گردید (شکلA ۶). برای اطمینان از حصول صحیح cDNAو همچنین کارایی آغازگرها و تعیین بهترین دمای ذوب برای تمام آغازگرها بوسیله‌ی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تعیین شد. که در هر دو مورد وجود باند با اندازه‌ی مورد نظر و بدون داشتن باندهای غیر اختصاصی نشان دهندهٔ موفقیت آمیز بودن سنتز cDNA و همچنین تعیین دمای مناسب برای انجام بیان ژن بود. (شکلB ۶). تعیین شیب دمایی جهت



شکل ۵- بررسی میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در فواصل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی بیمارگر، (Co): شاهد آلوده

Figure 5: The rate of enzyme activity of Gayacol Peroxidase in treated plants with different concentration of metylJasmonat in different time intervals after pathogen inoculation, (CO): Infected control

جدول ۴-مقایسه میانگین فنل کل، پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز تحت تاثیر متیل جاسمونات بر بیماری بلایت خوشه

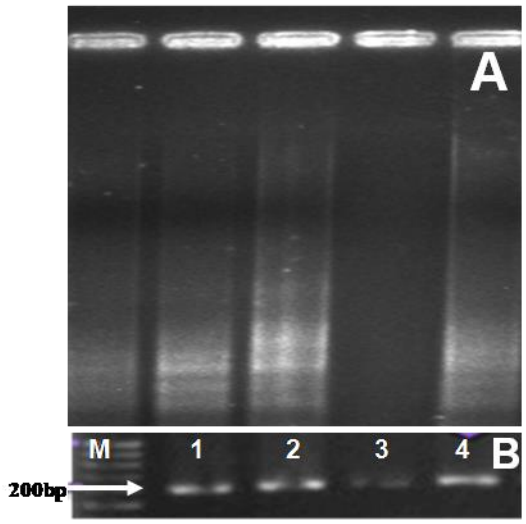
Table 4; Mean comparison of total phenol, Proxidase, Gayacol Peroxidase and Polyphenol oxidase under methyl Jasmonataffect on head blight disease

Trempent تیمار	Concentration (mg/mL) غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)	Total phenol فنل کل	Peroxidase پراکسیداز	Polyphenol oxidase پلی فنل اکسیداز	Gayacol Peroxidase گایاکول پراکسیداز
Methyl jasmonat متیل جاسمونات	۰	^{c}0.463	9.383^{c}	6.142^{d}	2.258^{d}
	200	0.483^{c}	9.811^{c}	7.351^{c}	3.044^{c}
	400	$^{0.627b}$	17.514^{b}	13.289^{b}	5.238^{b}
	600	0.743^{a}	20.561^{a}	15.657^{a}	7.301^{a}
Hours after inoculation ساعت بعد از آلوده سازی	24	0.470^{c}	12.233^{b}	8.026^{c}	3.057^{c}
	72	0.688^{a}	17.592^{a}	12.827^{a}	5.569^{a}
	120	0.580^{b}	13/130^{b}	10.977^{b}	4.757^{b}

اعداد با حروف مختلف در هر ستون، نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین تیمارها. در سطح احتمال (P<0.01) می‌باشد.

1-The numbers with different letters in each column show a significant different level of 0.01 (P<0.01) between treatments.

بدست‌آوردن دمای بهینه‌ی ذوب هر یک از آغازگرهای مربوط به ژن‌ها به وسیله ی PCR نشان داد که دمای ذوب هر آغازگر در محدوده دمایی ۶۱-۵۹ می‌باشد و دمای پایین‌تر از این طیف قادر به تکثیر ژن مورد نظر نبود (شکل ۳A).



شکل ۶- نتایج حاصل از سنتز cDNAو تعیین دمای ذوب آغازگرها برای آنالیز qRT-PCR.

A :دمای ذوب آغاز گر ژن ۱- توبولین (۵۹ °C) ،۲- b,1-3gluconase (۵۹ °C)، ۳- ChitinaseI(۵۹/۵ °C)و ۴- wheatwin (۶۰ °C).

Figure 6: The results of cDNA synthesis and thermal melting determination of primers for qRT-PCR analysis. A: Thermal melting of 1- Tubulin (59°C), 2-b,1-3gluconase (59°C) 3- Chitinase (59.5 °C) and 4- Wheatwin (60°C)

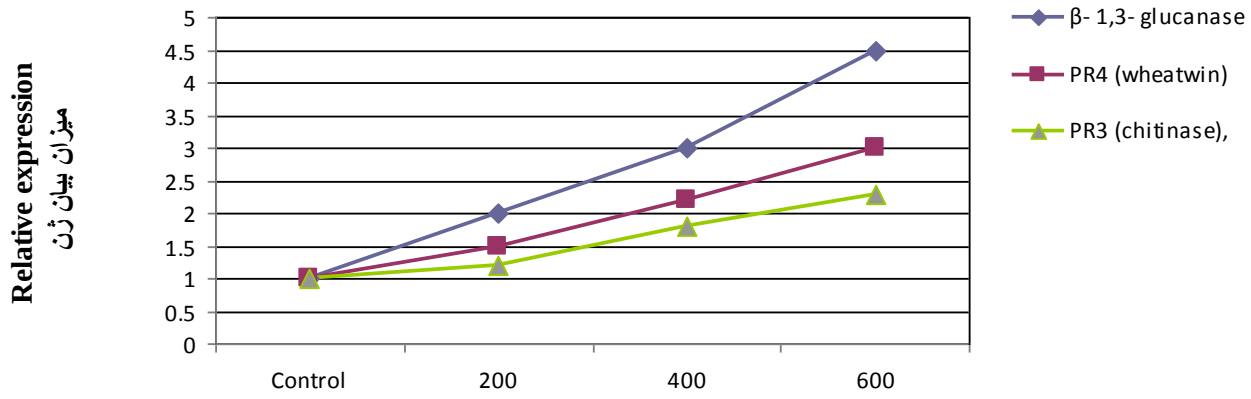
آنالیز بیان ژن با Real Time PCR

با توجه به داده‌های حاصل از آنالیز بیوشیمیایی و تعیین حداکثر فعالیت آنزیمی در بازه ی زمانی سه روز بعد از آلودگی، آنالیز بیان ژن در این بازه ی زمانی با آغازگرهای اختصاصی هر ژن انجام شد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نشان داد که بیان ژن β,1-3gluconase در این بازه ی زمانی بعد از تلقیح از دو ژن دیگر تغییر قابل ملاحظه‌ای داشته است ولی اثر غلظت در این تغییر قابل ملاحظه بود به‌طوریکه بیشترین افزایش معنی‌دار برای بیان این ژن (چهار و نیم برابر) در تیمار ۴۰۰ میلیوگرم در میلی‌لیتر اتفاق افتاد. این افزایش بیان در مقایسه با شاهد بیمار بدون تیمار انجام شد. میزان بیان ژن (wheatwin) PR4 در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات نیز نشان داد که بیشرین میزان بیان (سه برابر) متعلق به تیمار ۴۰۰ میلیوگرم در میلی‌لیتر می‌باشد ولی این افزایش بیان نسبت به ژن β,1-3gluconase در همین غلظت افزایش کمتری داشت. میزان بیان این ژن در گیاهان شاهد آلوده افزایش کمتری نسبت به ژن β,1-3gluconase از خود نشان داد. همچنین بیشترین میزان بیان ژن Chitinase در تیمار ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ۲/۳ برابر شاهد بود که اگر چه این افزایش نسبت به تیمار کنترل قابل توجه بود ولی نسبت به دو ژن دیگر در این بازه ی زمانی کاهش کمتری داشت ولی میزان بیان ژن با افزایش غلظت از ۴۰۰ به ۶۰۰ میلی گرم در میلی لیتر کاهش یافت (شکل ۷).

بحث

اطلاعات کمی در مورد پاسخ‌های دفاعی مولکولی فعال شده در پی تنش بیماریتوسط عامل بیمارگر آن *F. graminearum*در دسترس می باشد. با وجود اهمیت بیماری بلایت خوشه گندم، شناخت مکانیسم های دقاعی گیاه در برابر این بیماری می تواند پتانسیل بالقوه بالایی را برای دستیابی به ارقام مقاوم گندم از طریق غربالگری به بیماری فراهم نماید.

نقش متیل جاسمونات و هورمون‌های دیگر رشدی در القاء مقاومت گیاهان به تنش‌های مختلف زیستی مورد بررسی و به اثبات رسیده است(Gachomo et al., 2003; Thomma et al., 2000). در این تحقیق تاثیر اسید جاسمونیک در تحریک واکنش‌های دفاعی و تغییر در میزان تولید چند آنزیم آنتی اکسیدانتی و ارتباط این افزایش با چند ژن مرتبط با ایجاد مقاومت در گیاه جهت اثبات داده‌های بیوشیمیایی با استفاده از روش بررسی بیان ژن در زمان واقعی ارزیابی شد. بررسی نقش



،شکل ۷- میزان بیان سه ژن β- 1,3- glucanase ، PR4 (wheatwin) و Chitinase در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در بازه زمانی ۳ روزبعد از تلقیح با قارچ *F. graminearum* ، (Co): شاهد بیمار

Figure 7- Relative expression of three β- 1,3- glucanase , Chitinase and PR4 (wheatwin) genes in treated plants with different concentration of methyl jasmonat in 3 days time interval after inoculation with F. graminearum.

بازدارندگی جاسمونات اسید بر روی رشد میسیلیومی قارچ نشان داد که این ترکیب قادر به بازدارنگی رشد در محیط کشت و در شرایط آزمایشگاه می‌باشد. بیشترین میزان بازدارندگی در غلظت ۶۰۰ میلیوگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. میزان بازدارندگی بین غلظت‌های مختلف اختلاف معنی‌داری با همدیگر و شاهد داشت که با نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیقات مشابه مطابقت دارد (Sabbagh et al., 2017). اثر مستقیم بازدارندگی متیل جاسمونات ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد نظیر یون H2O2 در سلول‌های تیمار شده و نهایتاً مرگ سلولی آنها باشد (Orozco-Cárdenas et al., 2001). با توجه به تاثیر متیل جاسمونات در کاهش شدت بیماری و عدم تماس مستقیم متیل جاسمونات با سلول‌های قارچ، چنین نتیجه گیری می‌شود که متیل جاسمونات به طور غیر مستقیم با افزایش مقاومت اکتسابی گیاه باعث جلوگیری از توسعهٔ قارچ در گیاه و افزایش میزان آلودگی می‌شود (Derksen et al., 2013).طبق بررسی‌های ون لون (Van Loon, 1997) بین تیمار القاء کنندگان مقاومت گیاهان و فعال شدن واکنش‌های دفاعی گیاه، فاصله زمانی ۴۸-۲۴ ساعت بعد از آلودگی وجود دارد . در این مطالعه نمونه‌برداری‌ها از روز اول تا پنج روز پس از مایه‌زنی ادامه یافت. بررسی آنزیمی گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات نشان داد که با تیمار گیاهان آلوده در تمام بازه‌های زمانی، آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی به میزان قابل توجهی افزایش داشتند ولی میزان تغییرات برای غلظت‌ها و بازه‌های زمانی متفاوت بود. مؤثرترین غلظت در جهت افزایش فعالیت آنزیمی در غلظت ۶۰۰ میلیگرم در میلی‌لیتر و در بازه زمانی سه روزبعد از آلودگی ثبت شد. روند افزایش میزان تولید این آنزیم‌ها در تمام ساعات بعد از آلودگی نشان دهندهٔ القاء مقاومت بر اثر کاربرد خارجی متیل جاسمونات می‌باشد ولی این روند افزایش فقط تا سه روز بعد از آلودگی ادامه داشت و پس از این ۷۲ ساعت تا پنج روز بعد از آلودگی این میزان با یک شیب ملایم کاهش یافت که با توجه به این مشاهدات چنین نتیجه گیری می‌شود که القاء واکنش مقاومت سیستمیک توسط متیل جاسمونات در ساعات اولیه بیماری اتفاق می‌افتد و با روند افزایش زمان، انتظار افزایش این آنزیم‌ها نمی‌رود زیرا با گذشت زمان میزان تکثیر بیمارگر در اثر فعالیت بازدارندگی مکانیسم های دفاعی گیاه کاهش یافته است.متیل جاسمونات در غلظت‌های

بسیار پایین در مقابل استرس‌هایی نظیر بیماری و زخم باعث تحریک گیاه به تولید پروتئین‌های بازدارنده ی گروه پروتئیناز می‌شود (Gfeller et al., 2010). کاربرد متیل جاسمونات باعث تحریک فعالیت های واسطه ای اسید جاسمونیک در سیتوزول سلول شده که به دنبال آن مقاومت گیاه را در برابر پاتوژن بهمراه داشته است (Berrocal-Lobo et al., 2010). کاربرد خارجی متیل جاسمونات در دو رقم حساس (Neepawa) و مقاوم(BW552) گندم به بیماری پوسیدگی طوقه ایجاد شده به وسیله قارچ *Fusariumpseudograminearum* باعث افزایش میزان مقاومت گیاه به بیماری از طریق افزایش در بیان تعدادی از ژن های مسئول مقاومت شده است (Desmond et al., 2005) که با نتایج این تحقیق در افزایش مقاومت از طریق افزایش آنزیم‌ها و ژن‌های مقاومتی مورد آژمایش، مطابقت دارد.از طرف دیگر کاربرد متیل جاسمونات به‌همراه سالیسیلیک اسید در گیاه پنبه آلوده به قارچ Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum عامل بیماری پوسیدگی طوقه نشان داد که کاربرد خارجی محرک‌های رشدی باعث افزایش میزان بیان ژن‌های مسئول مقاومت در گیاه مقاوم به بیماری شده است در حالی‌که عدم کاربرد این محرک‌ها تاثیری در افزایش میزان بیان ژن‌های مورد آزمایش در گیاهان حساس نداشت (Zambounis et al., 2012). در این مطالعه، بررسی میزان بیان چند ژن مسئول مقاومت نشان داد که کاربرد خارجی متیل جاسمونات باعث افزایش بیان ژن‌ها شده و در نتیجه منجر به القاء مقاومت اکتسابی می‌شود.بررسی بیان هشت ژن مقاومتی در گندم آلوده به بیماری پوسیدگی طوقه در ارقام مقاوم و حساس نشان داد که میزان بیان ژن در هر دو رقم اتفاق می‌افتد ولی در رقم مقاوم میزان این بیان بیشتر و با سرعت بالاتری از رقم حساس اتفاق می‌افتد (Zambounis et al., 2012). در این مطالعه میزان افزایش تمام ژن‌ها در ساعات اولیه بیماری مشاهده شد و سپس با افزایش زمان بعد از آلودگی روند افزایش نسبت به زمان سه روز بعد از آلودگی کاهش یافت .بالاترین میزان افزایش برای تمام آنزیم‌های مورد مطالعه در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. این غلظت نسبت به بعضی از مطالعات مشابه غلظت نسبتا بالایی است. چنانچه در بررسی اثر کاربرد خارجی متیل جاسمونات بر روی قارچ‌های عامل پوسیدگی و لهیدگی بعد از برداشت هلو در شرایط نگهداری در انبار، غلظت ۲۰۰ میلیگرم در میلی‌لیتراز متیل جاسمونات قادر به بازدارندگی قابل قبولی از رشد قارچ گردید (Yao and Tian, 2005). اثر بخشی متیل جاسمونات در غلظت کم می‌تواند ناشی از تماس مستقیم این ماده با قارچ باشد که با توجه به اندوفیت بودن قارچ عامل اسکب گندم، و عدم تماس مستقیم با قارچ، غلظت بالای متیل جاسمونات قابل توجیه است. در شرایط درون شیشه، غلظت ۶۰۰ میلی گرم در میلی لیتراز متیل جاسمونات رشد قارچ را به میزان قابل توجهی متوقف نمود ولی غلظت بهینه متیل جاسمونات برای بازدارندگی کلنی قارچ، غلظت ۴۰۰ میلیگرم در میلی لیتر تعیین شد که به توجه قدرت زیستی و سریع‌الرشد بودن قارچ F. graminearumاین غلظت نسبتا بالا قابل پیش بینی می‌باشد. بدست آوردن غلظت متناسب از القاء کنندگان هورمونی با توجه به قیمت نسبتاً بالای آنها می‌تواند در کاهش هزینه‌های تولید و مدیریت مبارزه بیولوژیک با بیماری های گیاهی مهم باشد.در این مطالعه همچنین میزان بیان ژن‌های β- 1,3- glucanase (PR2) ، Chitinase (PR3)و wheatwin (PR4)در گندم آلوده به بیماری اسکب خوشه با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد. ژن‌های دفاعی گندم توسط *F. graminearum*در روابط متقابل گندم- بیمارگرالقا می‌شود و بخشی از پاسخ‌های دفاعی مربوط به بیمارگر می‌باشد. ژن‌های دفاعی رمز کننده پروتئین‌ها با عملکردهای بیولوژیک مختلف و در برخی موارد نقش آنها در مقاومت گندم به بیمارگرهای قارچی روشن است (Güldener et al., 2006).افزایش میزن بیان ژن‌های PR1، PR2، PR3،PR4 و PR5 در گندم آلوده به *F. pseudograminearum* (Desmond et al., 2005) و همچنین القای آن‌ها بوسیلهٔ گونه‌های دیگر فوزاریوم که باعث بیماری بلایت خوشه در گندم می‌شوند، گزارش شده است (Mackintosh et al., 2007).در پژوهش حاضر در گیاه پیش تیمار شده با متیل جاسمونات و مایه‌زنی شده با عامل بیماری بلایت خوشه گندم، بیان

در ژن‌هـای β- 1,3- glucanase و PR4 (wheatwin) نسـبت بـه گیـاه شـاهد آلـوده افـزایش یافـت، کـه ایـن نشان‌دهنده آن است که پیش تیمار بـا متیـل جاسـمونات سبب افزایش بیان این ژن‌ها و افزایش القـای مقاومـت در گندم نسبت به بیماری بلایت خوشه شده است. مایه‌زنـی خوشه‌های گندم با عامـل *F. graminearum* باعـث القـاء بیـان ژنهـای PR4 و PR5 در رقـم مقـاوم Sumai3 در مقایسـه بـا رقـم حسـاس Wheaton شـده اسـت (Mackintosh et al., 2007) و این در حالی است که بیان ژن chitinase (PR3) و β- 1,3- glucanase (PR2) پـس از مایه‌زنی بـا *F. graminearum* در رقـم Sumai3ازرقـم حساس سریع تر بوده است (Golkari et al., 2009). ولی در ایـن تحقیـق بیـان ژن wheatwin از بیـان ژن کیتینـاز بیشتر بود.

افزایش بیـان ژن PR4 در گنـدم تیمـار شـده بـا متیل جاسمونات بـدون حضـور عامـل بیمـارگر گـزارش شده است(Bertini et al., 2003). نتایج ما نشان مـی‌دهـد کـه افـزایش بیـان ژن‌هـای β- 1,3- glucanase و PR4 (wheatwin) پس از تیمار با متیل جاسـمونات علـی‌رغـم حضور عامل بیمارگر، می‌تواند منجر به مقاومت گیاه بـه بیماری بلایت خوشـه شـود. مطالعـات اخیـر نیـز نشـان داده‌اند که کاربرد خارجی اسید جاسـمونیک مقاومـت در گیاهان تک لپه بیمار به بیماری های لکـه برگـی ناشـی از Stagonosporanodorumدر گندم (Jayaraj et al., 2004)، آلودگی M. griseaدر برنج و آلودگی Bgraminis در جو را بهبـود بخشـد (Schweizer et al., 1998). مطالعـه دیگری در جـو دریافتنـد کـه حفاظـت سیسـتمیک توسـط متیل جاسمونات علیه عامل بیمـارگرB.graminis همـراه باافزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های مرتبط بـا دفـاع گیاه مانند فنیل آلانین آمونیالیـاز و پراکسـیداز را فـراهم می‌کند (Walters, 2009). بیشترین میزان تغییـر در بیـان ژن‌ها مربوط به غلظت ۴۰۰ میلیوگرم در میلـی‌لیتـر ثبـت شد و مقدار بیان با افزایش غلظـت بـه ۶۰۰ میلیـوگرم در میلی‌لیتر با یک شیب نسبتاً تند و معنی‌داری کاهش یافـت این امر می‌تواند ناشـی از ماهیـت هورمـون‌هـای گیـاهی باشد که آنها در غلظت‌های بسیار پایین حداکثر میزان اثر بخشی در نوع فعالیـت اختصاصـی خـود دارنـد.مطالعات نـشان داده اسـتکه با استفاده از یکسری مواد القـاکننـده که باعث افـزایش بیـان برخـی از ژن‌هـایPRدرگیاهـان می‌شـوند، افـزایش مقاومـت نسـبت بـهعوامل بیمـاری‌زا حاصل می‌شـود.بررسی میـزان بیـان ژن‌هـای کیتینـاز و گلوکاناز در درختان سیب آلـوده بـه بیمـاری باکتریـایی آتشک درختـان میـوه دانـه‌دار نشـان داد کـه اسـتفاده از مواد القا کننده توانسـته اسـت باعـث افـزایش بیـان ایـن ژن هـا گـردد. ایـن ژنهـا مـرتبط بـا ژن‌هـای مـرتبط بـا بیماریزایی مـی باشـند گـردد (Aćimović et al., 2015).. پروتئین‌هـای مـرتبط بـا بیمـاری‌زایی هم چـون کیتینـاز و گلوکانـاز کـه نقـش ضـدباکتریایی و ضدقارچی دارنـد در ارتبـاط بـامقاومـت اکتـسابی سیـستمیک مـی‌باشـند (Ryals et al., 1996). بنابراین می‌توانند بـه عنوان نشانگرهای مفیدی در جهت تعیین اثر القاءگرهـای مقاومتی در گیاهان مورد استفاده قرار گیرند. تیمار بذور قبل از کشت به وسیله القاءگرهـای هورمـونی عـلاوه بـر کاهش هزینه‌های تامین مواد اولیه مقاومت سیسـتمیک را افـزایش و گیـاه را از مراحـل اولیـه رشـدی در برابـر تنش‌های زیستی محافظت (Wang et al., 2014).

منابع مورد استفاده

Abedi-Tizaki M, Sabbagh S.K, 2012. Morphological and molecular identification of Fusarium head blight isolates from wheat in North of Iran. Australian Journal of Crop Science 6: 1356-1364.

Aćimović S, Zeng Q, McGhee G, Sundin G, Wise J, 2015. Control of fire blight Erwinia amylovora. on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. Frontiers in Plant Science 6: 16-28-33.

Anderson J, Badruzsaufari E, Schenk P, Manners J, Desmond O, Ehlert C, Ebert P, Kazan K, 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. The Plant Cell 16: 3460-3479.

Antico C, Colon C, Banks T, Ramonell K, 2012. Insights into the role of jasmonic acid-mediated defenses against necrotrophic and biotrophic fungal pathogens. Frontiers in Biology 7: 48-56.

Baxter A, Mittler R, Suzuki N, 2014. ROS as key players in plant stress signalling. Journal of Experimental Botany 65: 1229-1240.

Bernardo A, Bai G, Guo P, Xiao K, Guenzi A, Ayoubi P, 2007. Fusarium graminearum-induced changes in gene expression between Fusarium head blight-resistant and susceptible wheat cultivars. Functional & Integrative Genomics 7: 69-77.

Berrocal-Lobo M, Stone S, Yang X, Antico J, Callis J, Ramonell K, Somerville S, 2010. ATL9, a RING zinc finger protein with E3 ubiquitin ligase activity implicated in chitin-and NADPH oxidase-mediated defense responses. PloS one 5: e14426.

Bertini L, Leonardi L, Caporale C, Tucci M, Cascone N, Berardino I, 2003. Pathogen-responsive wheat PR4 genes are induced by activators of systemic acquired resistance and wounding. Plant Science 164: 1067-1078.

Bigeard J, Colcombet J, Hirt H, 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity PTI.. Molecular Plant Pathology 8: 521-539.

Derksen H, Rampitsch C, Daayf F, 2013. Signaling cross-talk in plant disease resistance. Plant Science 207: 79-87.

Desmond O.J, Edgar C.I, Manners J.M, Maclean D.J, Schenk P.M, Kazan K, 2005. Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen Fusarium pseudograminearum. Physiological and Molecular Plant Pathology 67: 171-179.

Ding C.-K, Wang C, Gross K, Smith D, 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. Journal of Planta 214: 895-901.

Gachomo E.W, Shonukan O.O, Kotchoni S.O, 2003. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. African Journal of Biotechnology 2: 26-32.

Gfeller A, Liechti R, Farmer E, 2010. Arabidopsis jasmonate signaling pathway. Science Signal 3: 190-199.

Gill S, Tuteja N, 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Golkari S, Gilbert J, Ban T, Procunier J, 2009. QTL-specific microarray gene expression analysis of wheat resistance to Fusarium head blight in Sumai-3 and two susceptible NILs. Genome 52: 409-418.

Goswami R, Kistler H, 2004. Heading for disaster: Fusarium graminearum on cereal crops. Molecular Plant Pathology 5 : 515-525.

Güldener U, Seong K.-Y, Boddu J, Cho S, Trail F, Xu J.-R, Adam G, Mewes H.-W, Muehlbauer G, Kistler H, 2006. evelopment of a Fusarium graminearum Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. Fungal Genetics and Biology 43 : 316-325.

Harkamal W, Clyde W, Pascal C, Xuan L, Abdelbaghi I, Timothy J, 2007. Large-scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress. Plant Cell and Environment 30 : 410-421.

Jayaraj J, Muthukrishnan S, Liang G.H, Velazhahan, 2004. Jasmonic acid and salicylic acid induce accumulation of B- 1,3- glucanase and thumatin-like proteins in wheat and induce resistance againts Stagonospora nudrum. Biologia Plantarum 48 : 425-430.

Li G, Yen Y, 2008. Jasmonate and ethylene signaling pathway may mediate Fusarium head blight resistance in wheat. Crop Science 48 : 1888-1896.

Mackintosh C, Lewis J, Radmer L, Shin S, Heinen S, Smith L, 2007. verexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium head blight. Plant Cell Reports 26: 479-488.

Mirabolfathy M, Karami-Osboo R, 2013. Deoxyivalenol and DON production Fusarium graminearum isolates in wheat and baerly crops in north and northwest area of Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 48: 197-210.

Moosawi-Jorf S.A, Farrokhi-Nejad R, Azimi S, Afarin S, 2007. Study of Fusarium Head Blight of wheat in Khuzestan Province in Iran and reporting of Fusarium Xylaroides as a new causal agents for disease. Journal of Agronomy 6 : 212-220.

Nicholson P, 2009. Fusarium and Fusarium-cereal interactions. In: Encyclopedia of Life Sciences ELS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Orozco-Cárdenas M.L, Narváez-Vásquez J, Ryan C.A, 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. The Plant Cell 13 : 179-191.

Ryals J.A, Neuenschwander U.H, Willits M.G, Molina A, Steiner H.-Y, Hunt M.D, 1996. Systemic acquired resistance. The Plant Cell 8 : 1809.

Sabbagh E, Sabbagh S.K, Panjehkeh N, Bolok-Yazdi H.R, 2018. Jasmonic Acid Induced Systemic Resistance in Infected Cucumber by Pythium aphanidermatum. Tarim Journal of Agricultural Sciences 24 : 143-152.

Sabbagh S.K, Paykani M, Esmaeilzadeh S, 2017. Salicylic acid Effect on Head Blight Disease of Wheat. Plant Protection 40 : 16-28.

Schenk P, Kazan K, Manners J, Anderson J, Simpson R, Wilson I, Somerville S, Maclean D, 2003. Systemic gene expression in Arabidopsis during an incompatible interaction with Alternariabrassicicola. Plant Physiology 132 : 999-1010.

Schweizer P, Buchala A, Dudler R, Métraux J, 1998. Induced systemic resistance in wounded rice plants. The Plant Journal 14 : 475-481.

Thomma B.P, Eggermont K, Broekaert W.F, Cammue B.P, 2000. Disease development of several fungi on Arabidopsis can be reduced by treatment with methyl jasmonate. Plant Physiology and Biochemistry 38 : 421-427.

Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M.-L, Touraine B, Moënne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C, 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Frontiers in Plant Science 4.

Van Loon L, 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal of Plant Pathology 103 : 753-765.

Walters D, 2009. Are plants in the field already induced? Implications for pracical disease control. Crop Protection 28 : 459-465.

Wang K, Jin P, Han L, Shang H, Tang S, Rui H, Duan Y, Kong F, Kai X, Zheng Y, 2014. Methyl jasmonate induces resistance against Penicillium citrinum in Chinese bayberry by priming of defense responses. Postharvest Biology and Technology 98 : 90-97.

Wenda-Piesik A, Lemańczyk G, Twarużek M, Błajet-Kosicka A, Kazek M, Grajewski J, 2017. Fusarium head blight incidence and detection of Fusarium toxins in wheat in relation to agronomic factors. European Journal of Plant Pathology 149 : 515-531.

Yao H, Tian S, 2005. Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. Journal of Applied Microbiology 98 : 941-950.

Zambounis A, Kalamaki M, Tani E, Paplomatas E, Tsaftaris A, 2012. Expression Analysis of Defense-Related Genes in Cotton Gossypium hirsutum. after Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum Infection and Following Chemical Elicitation using a Salicylic Acid Analog and Methyl Jasmonate. Plant Molecular Biology Reporter 30 : 225-234.

The Effect of Methyl Jasmonat and Resistance to Head Blight Disease on Wheat Caused by *Fusarium Graminearum*

S K Sabbagh[1*], M Peikani[2]and MTaheri[3]

[1]Associate Professor of Plant Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran.
[2]Former MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, University of Zabol, Iran.
[3]Laboratory experts, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran.
*Corresponding author: sksabbagh@yazd.ac.ir
Received: 28 May 2019 Accepted: 25 June 2019

Abstract

In this research, interaction between *Fusarium graminearum* and wheat including the change in rate of some anti-oxidant enzyme activity and expression level of PR2 (b,1-3gluconase), PR3 (chitinase) andPR4 (wheatwin) genes was studied. Tajan cultivar was used in greenhouse and experimental condition in a completely randomized blocks design with four repetitions. Spraying of aerial parts of plants by methyl-jasmonat at 200, 400 and 600 ppm concentration was done one, three and five days after inoculation with fungal spore of *Fusarium graminearum* (10^5 spore per milliliter).Also, inhibition effect of methyl jasmonat on growth of fungal colony was investigated on PDA culture medium.The results showed that the total phenol production and peroxidase, polyphenol oxidase and guaiacol peroxidase reached to highest level three days after inoculation at concentration of 600 ppm and reduced significantly 5 days after inoculation. Gene expression analysis at three days after inoculation time interval showed the highest and lowest expression level for b, one-three gluconase and chitnase respectively. Assay of growth inhibition effect by methyjasmonat showed that this material has the highest inhibition activity at concentration of 600 ppm. These results indicate that exogenous application of methyl jasmonat as chemical inducer to induce plant resistance against head scab disease could be considered in plant disease management.

Keywords: Inducted resistance, Pathogenesis related protein, Antioxidant enzymes, Total phenol, Real time PCR.