

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

توسط اسید سالیسیلیک

رویا ضیغمی نژاد<sup>1</sup>، غلامرضا شریفی سیرچی<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

<sup>2</sup> استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

چکیده

گیاهان در فرآیند پرایمینگ با بروز سریع پاسخ های دفاعی باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنش های محیطی و غیرمحیطی می شوند. سفیدک پودری کدو با عامل *Podosphaera xanthii* (*Sphaerotheca fuliginea*) یکی از مهم ترین بیماری های کدویان در گلخانه و مزرعه محسوب می گردد. 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 کاملاً تصادفی در شش تکرار انجام شد. در این مطالعه از اسید سالیسیلیک در دو غلظت نیم و یک دهم میلی مولار و آب مقطر به عنوان کنترل استفاده گردید. گیاهان تیمار شده پس از 24 ساعت با 50 میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ (با غلظت  $10^5$  کنیدیوم در میلی لیتر) به روش لکه گذاری مایه زنی گردیدند و تحت شرایط گلخانه ای 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 آنزیم های آنتی اکسیدانت در گیاهان تحت تنش نشان داد که غلظت های نیم و یک دهم میلی مولار اسید سالیسیلیک به طور معناداری باعث افزایش فعالیت GPX، 48 و 72 ساعت پس از مایه زنی و فعالیت PAL 72، 168 و 240 ساعت بعد از مایه زنی می شوند.

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

برخورداراند. 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 ژن های 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 دیواره ی 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 آمونیلایز 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 آمونیلایز (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 به عنوان یک پیش ماده برای فنولیک ها، لیگنین و فورانوکومارین، فیتوآلکسین ها

پروتئین های مرتبط به بیمارگر<sup>1</sup> گروه متنوعی از پروتئین های گیاهی هستند که در پاسخ به حمله ی بیمارگرها بیان می شوند (Redolfi, 1983; Van Loon, 1989). یکی از شناخته شده ترین پروتئین های PR، پروتئین PR-1 (ضد قارچی و ضد امیستی) است که فراوان ترین گروه از پروتئین های PR می باشند که دو درصد از کل پروتئین های برگ را تشکیل می دهند (Agrios, 2005). این پروتئین ها به طور طبیعی در گیاهان وجود دارند و با حمله عوامل بیمارگر یا تنش های محیطی میزان تولید آنها افزایش می یابد. سفیدک پودری کدو که توسط قارچ *Podospaera xanthii* (syn: *Sphaerotheca fuliginea*) ایجاد می شود یک بیماری جدی و فراگیر در کدوئیان می باشد (Jahn *et al.*, 2002). امروزه استفاده از ترکیبات قارچ کش 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 این رو کاربرد ترکیبات طبیعی (عصاره های گیاهی) و شیمیایی نظیر اسید سالیسیلیک (SA) و بتا آمینوبوتیریک اسید (BABA) که می توانند مقاومت را به صورت سیستمیک در گیاهان القا نمایند، از اهمیت خاصی

<sup>1</sup> Pathogenesis-related protein

و حاوی ماسه، رس و خاک برگ (1:1:2) کشت شدند. گلدان های کشت شده در گلخانه و تحت شرایط دمایی  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ، شب/روز، دوره نوری 16/8 ساعت (تاریکی/نور) و رطوبت نسبی 80% قرار گرفتند 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 مقطر استریل حاوی 0/05 درصد تریتون X-100 ریخته شدند.

#### نحوه ای اعمال و بررسی تیمارها

اعمال تیمارهای مورد نظر بر روی گیاهان، در مرحله ی 3 الی 4 برگگی (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. تیمارها 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

و دیگر متابولیت های پایین دست عمل می کند. 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 تاثیر 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<sup>1</sup>) 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 سانتی متر

<sup>1</sup>Cucurbita pepo

زنجیره ای پلیمرز استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نیمه‌کمی در 35 چرخه انجام شد. در صورتیکه مقدار مساوی از cDNA کل نمونه‌های مختلف (از استوک‌هایی با غلظت یکسان) به واکنش مقایسه‌ای PCR برای تکثیر قطعه‌ای از cDNA ژن مورد نظر وارد شود، می‌توان غلظت باند تکثیر شده در هر نمونه را به عنوان شاخص میزان بیان ژن مورد مطالعه در نظر گرفت. ژنی که باند تکثیر شده قوی‌تری را نشان می‌دهد، سهم نسبی بیشتری در cDNA دارد که این تناسب را می‌توان 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  $20000 \times g$  به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ گردید و بخش رویی برای سنجش آنزیم‌های مورد نظر برداشته شد (Gapinska et al., 2008).

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):

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

سوسپانسیون اسپور قارچ (با غلظت  $10^5$  اسپور در میلی لیتر) به روش لکه گذاری مایه زنی و تحت شرایط گلخانه‌ای 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 دوره‌های زمانی 12، 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 دستورالعمل 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 4.02<sup>1</sup> واکنش زنجیره ای پلیمرز 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

<sup>1</sup>Version

گردید. یک واحد فعالیت آنزیمی به عنوان 1 میکرومول سینامیک اسید تولید شده در مدت یک دقیقه به ازای هر میلی 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 نمونه‌ها 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 میانگین‌ها 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 تیمارها اختلاف معنی داری در سطح احتمال

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).

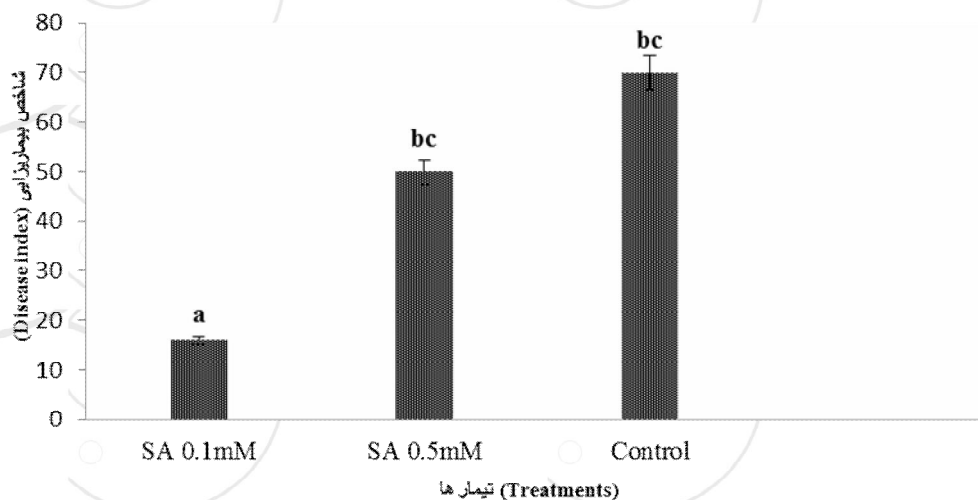
#### سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز (PAL)

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  $37^{\circ}C$  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

## ضیغمی و شریفی، 1392

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).

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



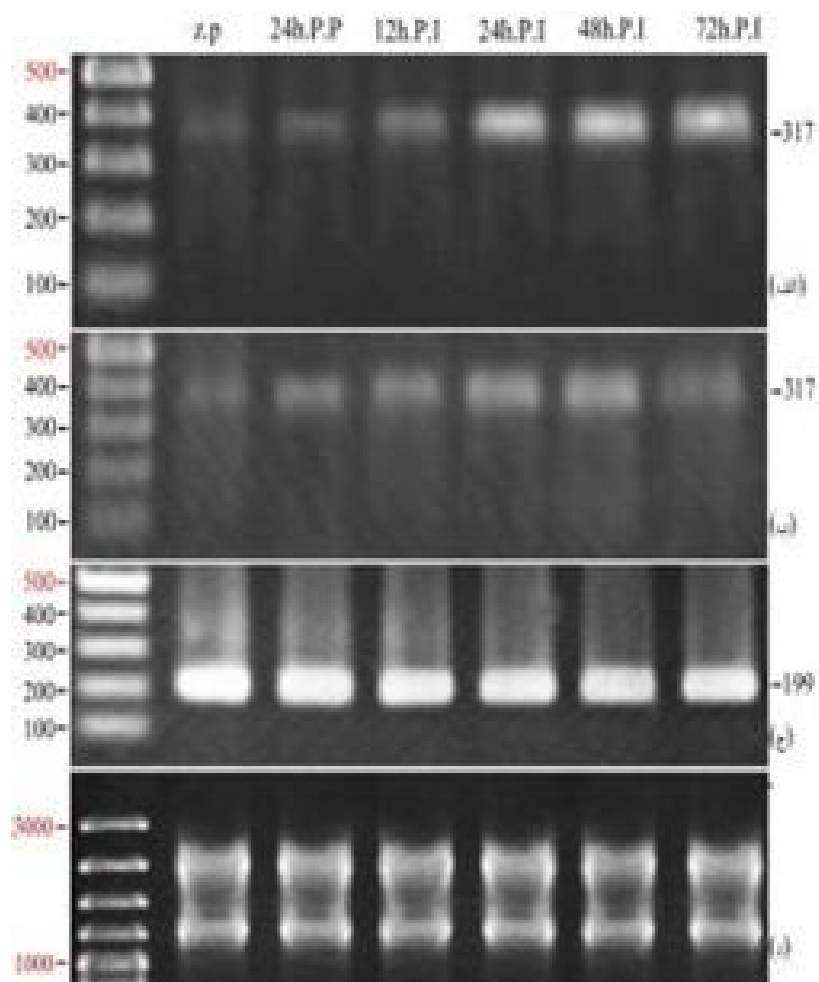
شکل 1- مقایسه میانگین تیمارهای بکار رفته جهت القای مقاومت در کدو نسبت به بیماری سفیدک پودری براساس آزمون دانکن و در سطح یک درصد. حروف متفاوت، اختلاف معنی دار را نشان می دهند.

**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.**

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).

### 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 حداکثر افزایش مربوط به زمان های نمونه برداری 24، 48 و 72



شکل 2- مقایسه بیان ژن *PR-1* (الف) افزایش بیان ژن *PR-1* بعد از تیمار گیاهان با SA 0/1 میلی مولار نشان می دهد. Z.P: زمان پرایمینگ (زمان صفر) را نشان می دهد. 24h p.p: 24 ساعت پس از پرایمینگ. 12h p I, 24h P I, 48h P I, 72h P I نشان می دهد. 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.

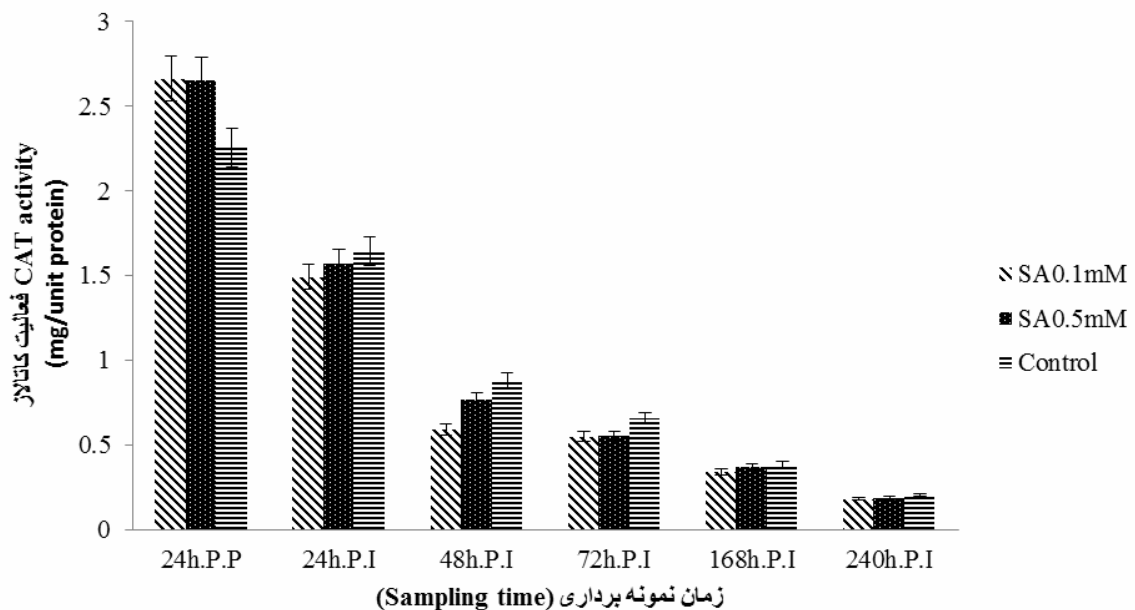
Figure 2- *PR-1* gene expression. A) increase of *PR-1* gene expression after treatment with SA 0.1 mM. Z.P; time point 0; 24 P.P. 24 hours post priming; 12hpI, 24hpI, 48hpI and 72hpI show hours post inoculation. B) *PR-1* gene expression in control plant. J) balanced *18SrRNA* expression after 35 cycle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

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج حاصل از اندازه‌گیری 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 تیمارها بر فعالیت آنزیم CAT در برگهای گیاه کدو تحت شرایط پیش تیمار و مایه کوبی در سطح احتمال 5% هم پوشانی استاندارد بار نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌دار 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

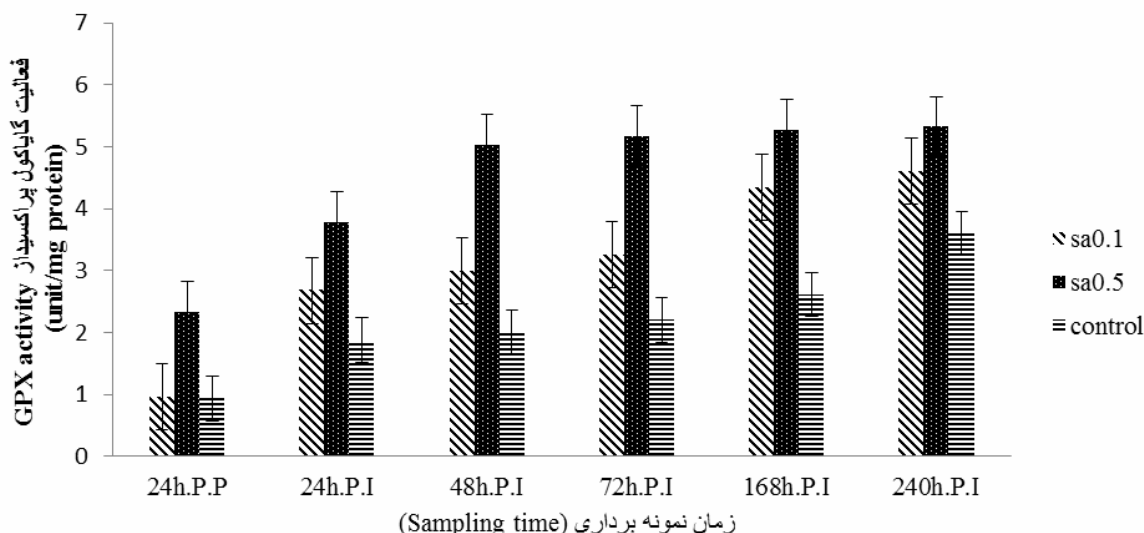
داده‌های حاصل از اندازه‌گیری فعالیت گایاکول پراکسیداز در شکل 4 آورده شده است. نتایج نشان داد که پیش تیمار گیاهان با SA، فعالیت این آنزیم را افزایش داده است. اگر چه فعالیت

GPX در گیاهان تیمار شده با غلظتهای نیم و یک دهم میلی‌مولار SA نسبت به شاهد افزایش داشت اما تنها تیمار نیم میلی‌مولار، در 48 و 72 ساعت پس از مایه زنی افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل 4). گایاکول پراکسیداز نیز از دیگر آنزیم‌هایی



SA در گیاهان تحت تنش، باعث افزایش معنی دار در فعالیت این آنزیم گردید که نشان دهنده نقش این آنزیم در دفع رادیکال‌های آزاد اکسیژن تحت شرایط مذکور می‌باشد.

است که تحت شرایط تنش در پاکسازی سلول از پراکسید هیدروژن، شرکت می‌کند. در مطالعه حاضر تنش بیماری در گیاه کدو باعث افزایش فعالیت آنزیم GPX گردیده است و بکار بردن پیش تیمار



شکل 4- مقایسه میانگین تیمارها بر فعالیت آنزیم GPX در برگهای گیاه کدو تحت شرایط پیش تیمار و مایه کوبی در سطح احتمال 5% هم پوشانی استاندارد بار نشان می‌دهد 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.**

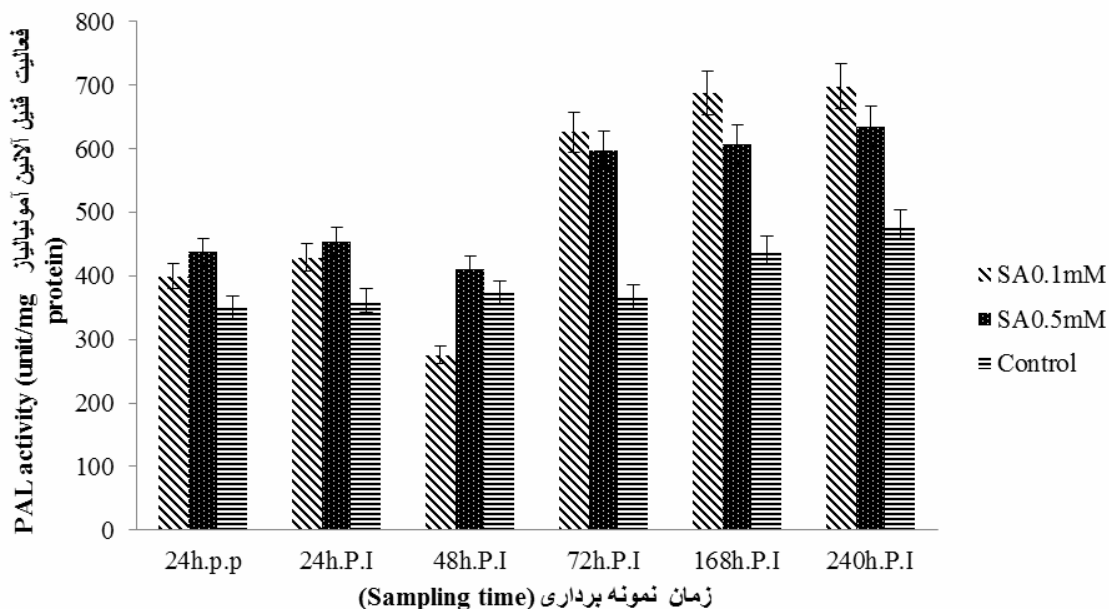
مشاهده شد اما این افزایش فقط در گیاهان تیمار شده با SA یک دهم میلی مولار نسبت به شاهد معنی دار شد (شکل 5). در نتیجه فعالیت آنزیم PAL دو مسیر بیوسنتزی فعال می‌شود که یکی از این مسیرها مربوط به سنتز SA است. این هورمون در مراحل آغازین مسیر فنیل پروپانوئید ساخته می‌شود و باعث فعال شدن مسیر SAR و القای مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاه خواهد شد

#### فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیااز

شکل شماره 5 نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیااز 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 168 و 240 ساعت پس از مایه کوبی در گیاهان تیمار شده افزایش فعالیت آنزیم PAL

گردیده است که نشان دهنده‌ی نقش این آنزیم در مکانیسم دفاعی گیاه در برابر تنش مذکور است.

(Chen *et al.*, 2009). در این مطالعه، پیش‌تیمار گیاهان با SA باعث افزایش معنی‌دار فعالیت PAL



شکل 5- مقایسه میانگین تیمارها بر فعالیت آنزیم PAL در برگهای گیاه کدو تحت شرایط پیش‌تیمار و مایه کوبی در سطح احتمال 5% هم‌پوشانی استاندارد بار نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌دار وجود ندارد.

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

تیمار شده با غلظت شش دهم میلی‌مولار SA سبب کاهش رشد قارچ و توانایی غشای آن می‌شود (Hakimi *et al.*, 2007). کاربرد خارجی SA در کنترل بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی 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 PRها می‌شود که مستقیماً رشد قارچ را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Durrant &

بحث

همانگونه که در قسمت نتایج فنوتیپی ذکر گردید تیمار SA با غلظت یک دهم میلی‌مولار سبب حداکثر میزان القای مقاومت گردید. نتایج سایر پژوهشگران نیز این مطلب را تأیید می‌نماید. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که اسید سالیسیلیک بر بیماری‌گره‌هایی مانند *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* نیز موثر است. بر این اساس، مقاومت القایی ایجاد شده در گیاهان لوبیای

افزایش *oxysporum f. sp. lycopersici* نیز 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 به نظر می رسد که مقاومت ایجاد شده توسط SA بیشتر مربوط به القای فعالیت آنزیم های PAL و GPX می باشد که در اثر فعالیت این آنزیم ها مقاومت به بیماری نیز افزایش می یابد و ظاهراً پیش تیمارهای 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 به نظر می رسد که مقاومت ایجاد شده توسط SA بیشتر مربوط به القای فعالیت آنزیم های PAL و GPX می باشد که در اثر فعالیت این آنزیم ها مقاومت به بیماری نیز

(Dong, 2004). طبق نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و تحقیقات صورت گرفته می توان نتیجه گرفت که پیش تیمار گیاهان با SA سبب کنترل سفیدک پودری به طور مؤثری می شوند.

نتایج حاصل از آزمایش RT-PCR نیمه کمی 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 مشابهی 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 می کند. 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* می توان (تأیید شده به عنوان مارکر مسیر SAR) می توان 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.*

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 می‌توان گفت که القا مقاومت یک پدیده امید بخش بوده و نیاز به آن یک ضرورت تمام می‌باشد.

افزایش می‌یابد و ظاهراً پیش‌تیمارهای مذکور نقش مهمی در تغییرات فعالیت CAT نداشته‌اند. در پایان باید اشاره کرد که کلیه عوامل کنترل‌کننده 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 سال‌ها از معرفی شدن روش‌های مختلف کنترل، دنیای گرسنه ما هنوز به دنبال روش‌های ایمن‌تر، موثرتر، آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر

#### 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 pathogenesis-related protein-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 Environmental Management 11: 125 -131.

- 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 fuliginea*). *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.

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

**Zeighaminejad R.<sup>1</sup>, Sharifi Sirchi Gh.R.<sup>\*2</sup>**

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 0.5 mM) and distilled water as control. After 24 hours post treatment, plants inoculated with 50  $\mu$ l 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