

کاربرد سیلیکون در القای مقاومت سیستمیک علیه بیماری بلایت فوزاریومی خوشه گندم

۱. وحید قاضی محسنی؛ ۲. سید کاظم صباغ*؛ ۳. صدیقه اسمعیل زاده بهابادی؛ ۴. مرتضی قربانی
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
 ۲. استادیار، بیوتکنولوژی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی و پژوهشکده زیست فناوری گیاهی، دانشگاه زابل
 ۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل
 ۴. استادیار، بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه زابل
- (تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۹ - تاریخ تصویب: ۹۳/۱۱/۱۸)

چکیده

در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف سیلیکون (صفر، ۲، ۴ و ۶ میلی‌مولار) بر بیان چند ژن مرتبط با بیماری‌زایی و فعالیت تعدادی آنزیم آنتی‌اکسیدان مطالعه شد. گیاهان در مرحله خوشه‌دهی از طریق محلول خاک تیمار شدند. سپس، گیاهان تیمار شده با ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ حاوی 10^6 ماکروکنیدی به روش تزریق در زیر محل خوشه، مایه‌زنی شدند و در بازه‌های زمانی صفر، ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح، برداشت نمونه برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و بیان ژن انجام شد. نتایج نشان داد که شدت بیماری در گیاهان تیمار شده در مقایسه با شاهد کاهش داشت. آنالیز بیوشیمیایی نشان داد که فعالیت دو آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در تمام غلظت‌ها افزایش یافت. نتایج آنالیز مولکولی نشان از افزایش سطح بیان ژن‌های بتا - ۱ و ۳ گلوکاناز و اگزالات اکسیداز در گیاهان تحریک شده با سیلیکون در غلظت ۶ میلی‌مولار در بازه زمانی ۱۲۰ ساعت بعد از مایه‌زنی داشت. به‌طور کلی، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که سیلیکون می‌تواند مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی را از طریق مقاومت اکتسابی سیستمیک افزایش دهد.

کلیدواژگان: بیان ژن، سیلیکون، فوزاریوز، qRT-PCR.

مقدمه

علائم بیماری با نقاط آبدار مایل به قهوه‌ای روی پوشینه‌ها و محور خوشه آغاز و در نهایت، به سفیدشدن قسمت‌هایی از آن منجر می‌شود (Siranidou et al. 2002). گیاه در مرحله گل‌دهی بیشترین حساسیت را به آلودگی فوزاریوم خوشه گندم دارد، زیرا در این مرحله سطوح بالایی از کولین و بتاین تولید می‌شود که آزادشدن این ترشحات از بساک موجب تحریک رشد قارچ *F. graminearum* و شیوع آن می‌شود (Strange et al. 1978). برنامه‌های متعدد هدف‌داری نظیر استفاده از قارچ‌کش‌ها، کنترل بیولوژیکی، عملیات زراعی و

گیاه گندم (*Triticum aestivum*) از نظر تولید و تغذیه اهمیت اقتصادی زیادی نسبت به محصولات زراعی دیگر دارد. بیماری بلایت خوشه یا اسکب یک بیماری مخرب در بسیاری از مناطق جهان و ایران است و بین ۵۰ تا ۷۰ درصد عملکرد گندم را کاهش می‌دهد (Windels 2000). این بیماری از طریق ۲۵ گونه فوزاریوم ایجاد می‌شود، ولی در بسیاری از کشورها *F. graminearum* با فرم جنسی *Gibberella zeae* به‌عنوان گونه غالب گزارش شده است (Bottalico and Perrone 2002).

بیماری‌های گیاهی ایجاد شده توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها مؤثر است. اثر مفید سیلیکات سدیم با افزایش مقاومت در خیلی از محصولات علیه بیمارگرهای قارچی در گیاهانی چون برنج، جو، خیار، ذرت، انگور و توت‌فرنگی گزارش شده است (Ma et al. 2007)، ولی نحوه عملکرد دقیق آن در کنترل بیماری‌های گیاهی مشخص نشده است (Fauteux et al. 2005). در این تحقیق اثر سیلیکون در القای مقاومت القایی در گندم آلوده به بیماری فوزاریوم گندم بررسی شد. بدین منظور میزان بیان دو ژن مسئول مقاومت در گندم و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در زمان‌های مختلف بعد از تیمار مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای

آزمون بیماری‌زایی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در یک گلخانه تحقیقاتی انجام شد. از بذر گندم رقم تجن برای تلقیح آلوده‌سازی استفاده شد. بذره‌های گندم با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی سطحی و سپس، سه دفعه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده و در گلدان‌های پلاستیکی ۳ کیلوگرم، حاوی خاک استریل کشت داده شد. با توجه به اینکه دوره آسیب‌پذیری گندم به بیماری فوزاریومی سنبله در طول مرحله گل‌دهی است، در اوایل این مرحله، گندم با سیلیکون به فرم محلول سیلیکات سدیم $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$ (Merk) (28.5% SiO_2) با غلظت‌های صفر، ۲، ۴ و ۶ میلی‌مولار در لیتر همراه آب آبیاری استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ

از جدایه استاندارد قارچ *F. graminearum* برای تهیه سوسپانسیون اسپور استفاده شد. ابتدا، قارچ مورد نظر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار^۱ (Merk PDA) کشت داده و درون گرم‌خانه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از یک هفته از رشد کامل قارچ، در شرایط کاملاً سترون، یک قطعه از بافت میسیلیومی قارچ به فلاسک حاوی ۲/۵ گرم پودر کاه

استفاده از ارقام مقاوم برای کنترل بیماری بلایت خوشه گندم در نظر گرفته شده است، با این حال، کاهش قابل توجه میزان بیماری مشاهده نشده است (Snouijer 2000). برخی از قارچ‌کش‌ها تأثیری بر بلایت فوزاریومی سنبله ندارند و با توجه به اینکه باقی‌مانده سموم در دانه‌های گندم و محصولات تولید شده از آن برای سلامت انسان و دام زیان‌بار است، استفاده از قارچ‌کش‌ها با محدودیت‌هایی مواجه شده است (Jones 2000). بنابراین، توسعه گیاهان با مقاومت اکتسابی تقویت شده یکی از روش‌های جایگزین در کنترل بیماری‌ها است که به آن توجه شده است و می‌توان در مدیریت تلفیقی کنترل بیماری‌ها از آن استفاده کرد (Diogo and Wydra 2007). سیلیکون عنصری فراوان در سطح زمین است که با این حال میزان در دسترس بودنش برای گیاهان به طور معمول کم است (Hattori et al. 2005). ۹۹ درصد از سیلیکون به شکل سیلیک و کمتر از ۱ درصد به شکل کلونیدی یا به صورت یونی است که شکل حلال‌پذیر آن است (Mitani and Ma 2005). سیلیکون تأثیرات مثبت چشمگیری در بهبود رشد و عملکرد گیاه، شامل افزایش مقاومت در برابر تنش‌های محیطی مثل سرما، شوری، سمیت فلزی، حملات حشرات و نفوذ عوامل بیماری‌زا را دارد (Datnoff et al. 1997). به طور کلی دو مکانیسم برای مقاومت ناشی از سیلیکون نسبت به عوامل مولد بیماری مطرح است که در اولی به دنبال جذب و انتقال سیلیکون، فرایند سیلیسی شدن شروع می‌شود که به موجب آن سیلیکون همراه با لیگنین باعث سخت شدن دیواره سلولی در برگ‌ها و آوند چوبی می‌شود و مکانیسم دیگر، این است که سیلیکون می‌تواند پاسخ‌های دفاعی گیاه را فعال کند (Chérif et al. 1994). تحقیقات نشان داده است که کاربرد سیلیکات سدیم به عنوان یک القاگر و فعال‌کننده بالقوه مقاومت القایی سیستمیک در حال توسعه است. سیلیکات سدیم نه تنها در مقاومت اکتسابی سیستمیک، بلکه در بیان مقاومت ژنتیکی نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند و تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی را تحریک می‌کند که به عنوان نشانگر در مقاومت القایی سیستمیک پذیرفته شده است (Vlot et al. 2008). مطالعات متعددی نشان داده است که سیلیکات سدیم در کنترل آفات و

1. Potato Dextrose Agar

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت پراکسیداز از سوبسترای پیروگالول استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر پیروگالال تهیه‌شده به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۰/۵ میلی‌لیتر هیدروژن پراکسیداز ۱ درصد مخلوط شد. تغییرات جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیمی در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Chen et al. 2000).

سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز محلول واکنش از عصاره گیاهی در حجم ۳ میلی‌لیتر تهیه شد (۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر پیروگالال ۰/۳ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی). تغییرات جذب نور با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیمی در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Chen et al. 2000).

بررسی تغییرات بیان ژن‌های بتا گلوکاناز و اگزالات اکسیداز

برای ارزیابی میزان ژن‌های بیان‌شده در تیمارهای مختلف، از تیماری استفاده شد که بیشترین میزان تغییرات آنزیمی را نشان داد. بدین منظور، ۵۰ گرم از برگ‌های گیاه مورد نظر جدا و برای استخراج RNA در مراحل بعدی استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از کیت کایژن (Qiagen, Germany) انجام شد. رشته اول DNA از مولکول‌های mRNA با استفاده از کیت تجاری 2-Steps RT-PCR kit (Vivantis, Cinnogene) ساخته شد. کمیت و کیفیت مولکول‌های cDNA به ترتیب با استفاده از دستگاه اسکن دراپ (Analytika, Germany) و ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. مقدار ۵۰ نانوگرم از cDNA برای انجام آنالیز بیان ژن استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده برای qRT-PCR با نرم‌افزار آنالیز <http://deu/primer3/input.htm.mit> طراحی و توسط شرکت

گندم، ۲/۵ گرم پودر کاه جو و ۱۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. درب فلاسک‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شد و به مدت ۹۶ ساعت روی دستگاه تکان‌دهنده با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در داخل گرم‌خانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۹۶ ساعت، محیط درون فلاسک‌ها در زیر هود لامینار با استفاده از پارچه مللم سترون صاف شد. از محیط صاف‌شده که به صورت یک سوسپانسیون به رنگ قهوه‌ای تیره بود، نمونه‌گیری شد و با استفاده از لام گلبول‌شمار، غلظت سوسپانسیون بر حسب تعداد ماکروکنیدی‌ها در هر میلی‌لیتر تعیین شد و از غلظت 1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر برای تلقیح در زیر محل خوشه استفاده شد (Bernardo et al. 2007). سنبله‌های مایه‌زنی‌شده با کیسه‌های پلاستیکی برای حفظ رطوبت و رخنه قارچ به مدت یک روز پوشانده شد. نمونه‌برداری از گیاه در مقاطع زمانی صفر، ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت بعد از تلقیح قارچ عامل بیماری انجام شد و در ادامه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی بررسی شد.

ارزیابی و تعیین شدت بیماری

سه هفته بعد از اولین مایه‌زنی عامل بیماری، شدت بیماری محاسبه شد. میزان شدت بیماری از طریق تقسیم تعداد سنبله‌های آلوده بر تعداد کل سنبله‌های هر سنبله محاسبه شد. استاندارد مورد استفاده برای ارزیابی شدت بیماری‌زایی شاخص هورسفال بود (Stack and McMullen 2010).

تهیه عصاره آنزیمی و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

برای تهیه عصاره گیاهی، ابتدا ۰/۲ گرم از بافت برگ گیاه به هاون چینی سرد منتقل و به آن ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج (محلول شامل ۱۶۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات و ۲۰ میکرولیتر EDTA) اضافه شد و سپس، کاملاً ساییده شد تا به صورت همگن درآمد. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی به عنوان عصاره پروتئین برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد (de Azevedo et al. 2006).

سیناژن ساخته شد (جدول ۱). درجه اختصاصی بودن آغازگرها با بلاست محصولات واکنش qRT-PCR ارزیابی شد. تمام قطعات تکثیرشده برای بررسی حضور ساختار ثانویه بر وب سایت <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/> بازبینی شدند. واکنش qRT-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA (50 ng/μl) ۲ میکرولیتر از مخلوط دو آغازگر (20mM) ۴ میکرولیتر از Mastermix

از دستگاه کوربت (RG3000, Curbet, Australia) با برنامه دمایی ۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه و به دنبال آن ۴۰ چرخه حرارتی شامل ۹۵°C برای ۱۵ ثانیه، ۶۰°C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی برای هر تیمار انجام شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

| Gene | Forward primer 5-3 | Reverse primer 5-3 | Accession number |
|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------|
| β-1,3-glucanase | AACGACCAGCTCTCCAACAT | GTATGGCCGGACATTGTTCT | AY437443.1 |
| Oxalat Oxidase | TGCAGTTCAACGTCGGTAAG | ATGGCACGAAGACGATAACC | AJ556991 |
| β-Tubolin | GGACAGGATTGACAGATTGATA | CTCGTTCGTTATCGGAATTAA | - |

نتایج

ارزیابی شدت بیماری‌زایی در شرایط گلخانه
در این تحقیق، شدت بیماری بر مبنای رتبه‌بندی و شاخص بیماری برای هر تیمار ارزیابی شد (جدول ۱). طبق نتایج به دست آمده در تمامی تیمارها به صورت معنی‌داری شدت بیماری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. غلظت ۶ میلی‌مولار سیلیکون باعث بیشترین کاهش معنی‌دار علائم بیماری شد. اما در تیمار ۲ میلی‌مولار درجات کمی از کاهش علائم بیماری نسبت به شاهد آلوده مشاهده شد (شکل ۱). با توجه به داده‌های جدول ۲ و معادله مربوطه، تجزیه واریانس و رابطه رگرسیونی مشخص شد که افزایش غلظت سیلیکون با ضریب رگرسیونی $-۷/۸۷۷$ موجب کاهش شدت بیماری شده است.

آنالیز داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌ها براساس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با نرم‌افزار SAS 9.1 تحت آنالیز واریانس یکطرفه قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شدند. داده‌های حاصل بررسی بیان ژن با استفاده از روش pffafI و معادله زیر تجزیه و آنالیز شدند (Pfaffl 2001). آنالیز داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار REST 2009 انجام شد که تخصصی داده‌های خروجی Real time PCR است.

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

جدول ۲. تجزیه واریانس رگرسیونی شدت بیماری

| منبع تغییرات | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | F | Pr>F |
|--------------|------------|--------------|----------------|--------|--------|
| رگرسیون | ۱ | ۴۹۷۷ | ۴۹۷۷ | ۲۸۰/۴۸ | <0/001 |
| خطا | ۱۴ | ۲۴۸/۴۲ | ۱۷/۷۴ | | |
| کل | ۱۵ | ۵۲۲۵/۴۳ | | | |

$$R^2 = 0/95 \quad (\text{سیلیکون}) \quad ۹۸/۹۷۵ - ۷/۸۷۷ = \text{شدت بیماری}$$

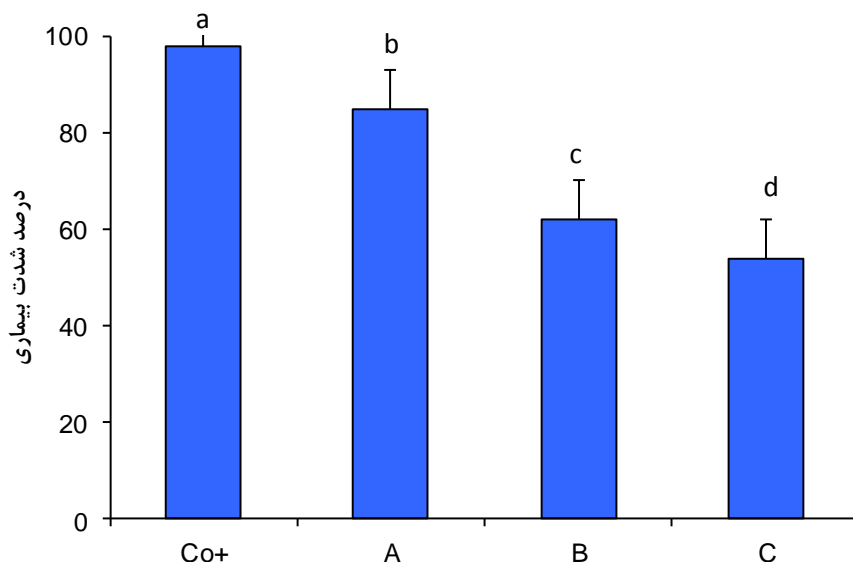
اکسیداز با غلظت سیلیکون همبستگی ۰/۵۸ دارد که رابطه آن بیشتر از همبستگی این آنزیم نسبت به زمان $r=0/55$ است که بیانگر این موضوع است که افزایش غلظت سیلیکون موجب افزایش فعالیت این آنزیم می‌شود.

ضریب همبستگی بین پارامترها

جدول ۳ ضریب همبستگی بین پارامترهای زمان و غلظت و همچنین، دو آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود آنزیم پلی‌فنل

همچنین، آنزیم پراکسیداز با پلی فنل اکسیداز دارای ضریب همبستگی بالای ۰/۹۹ است و از لحاظ همبستگی با سیلیکون و زمان رفتاری مشابه با پلی فنل اکسیداز دارد.

با استفاده از پارامتر زمان و غلظت سیلیکون با رگرسیون چندمتغیره برآورد فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز انجام شد (جدول ۴).



غلظت‌های مختلف سیلیکون (میلی مولار در لیتر)

شکل ۱. مقایسه شدت بیماری بلایت خوشه گندم ناشی از قارچ *F. graminearum* در آزمون گلخانه‌ای با کاربرد غلظت‌های مختلف سیلیکون: (Co+ شاهد آلوده) حروف A, B, C به ترتیب غلظت‌های سیلیکون (۲، ۴، ۶ میلی مولار)

جدول ۳. ضریب همبستگی بین پارامترها

| | زمان | غلظت سیلیکون | پراکسیداز | پلی فنل اکسیداز |
|-----------------|---------|--------------|-----------|-----------------|
| زمان | ۱ | | | |
| غلظت سیلیکون | .n.s | ۱ | | |
| پراکسیداز | ۰/۵۵۵** | ۰/۵۷۶** | ۱ | |
| پلی فنل اکسیداز | ۰/۵۵۲** | ۰/۵۸** | ۰/۹۰۹** | ۱ |

** معنی داری در سطح ۰/۰۱ و n.s عدم معنی داری.

جدول ۴. جدول تجزیه واریانس رگرسیون پراکسیداز

| منبع تغییرات | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | F | Pr>F |
|--------------|------------|--------------|----------------|-------|--------|
| رگرسیون | ۲ | ۱۰۵۹۳ | ۵۲۹۶ | ۴۰/۱۴ | <۰/۰۰۱ |
| خطا | ۴۵ | ۹۳۸ | ۱۳۱ | | |
| کل | ۴۷ | ۱۶۵۳۱ | | | |

$R^2 = ۰/۶۷$ (سیلیکون) $۹/۵۶۲ -$ (زمان) $۹/۲۲۵ + ۱۶/۸ =$ پراکسیداز

جدول ۵. جدول تجزیه واریانس رگرسیون پلی فنل اکسیداز

| منبع تغییرات | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | F | Pr>F |
|--------------|------------|--------------|----------------|----|--------|
| رگرسیون | ۲ | ۱۰۳۹۴ | ۵۱۹۵ | ۴۰ | <۰/۰۰۱ |
| خطا | ۴۵ | ۵۸۳۱ | ۱۲۹ | | |
| کل | ۴۷ | ۱۶۲۲۴ | | | |

$R^2 = ۷/۶۷$ (سیلیکون) $۹/۵۲۷ -$ (زمان) $۹/۰۷۹ + ۱۷/۲۸ =$ پلی فنل اکسیداز

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

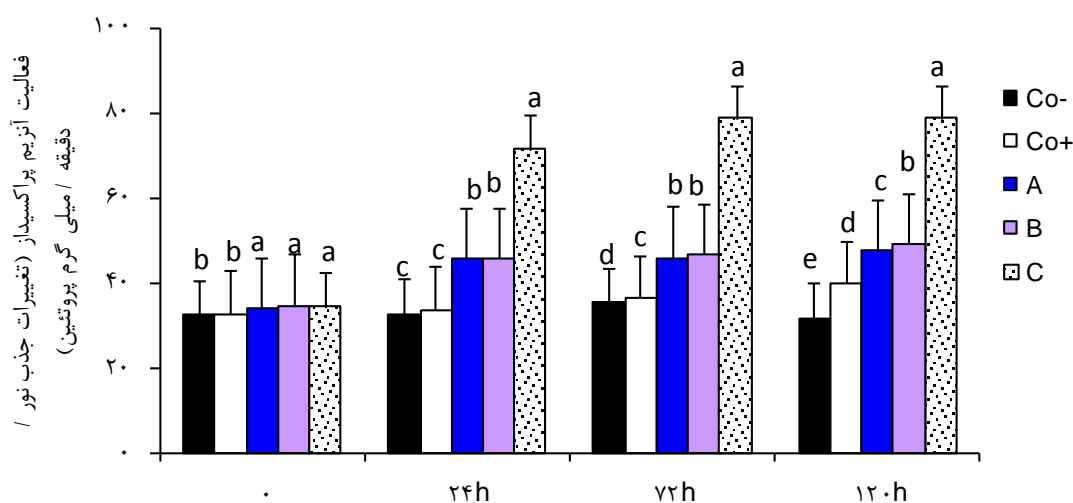
نتایج کاربرد غلظت‌های مختلف سیلیکون نشان داد میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در سطح ۰/۰۵ با شاهد سالم و آلوده اختلاف معنی‌دار دارد (شکل ۳). نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در تیمارهای شاهد مثبت و منفی در بازه‌های زمانی مورد بررسی اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. ۲۴ ساعت پس از تلقیح عامل بیماری بین تیمارهای مختلف سیلیکون و شاهد آلوده و سالم اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم مشاهده شد. بالاترین میزان فعالیت این آنزیم در ۷۲ ساعت پس از تلقیح عامل بیماری و در تیمار ۶ میلی‌مولار در لیتر مشاهده شد. به‌طور کلی نتایج بررسی فعالیت آنزیمی نشان داد که بیشترین میزان تغییرات برای غلظت ۶ میلی‌مولار سیلیکون و در بازه زمانی ۱۲۰ ساعت بعد از تلقیح است.

نتایج بررسی میزان بیان ژن بتاگلوکاناز در گیاهان بیمار تحریک‌شده با غلظت‌های مختلف سیلیکون نشان داد که بین میزان بیان این ژن در مقایسه با شاهد، تفاوت‌های معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ وجود داشت (شکل ۴). در بازه زمانی ۱۲۰ ساعت بعد از تلقیح بالاترین میزان بیان این ژن در تیمار ۶ میلی‌مولار سیلیکون تعیین شد. همچنین، در جدول ۶ تجزیه رگرسیونی بیان ژن بتا-۱ و ۳ گلوکاناز، $R^2=87$ بیانگر تأثیر بالای سیلیکون بر افزایش میزان بیان این ژن است.

همان‌طور که در جدول‌های ۴ و ۵ مشاهده می‌شود دو پارامتر زمان و غلظت سیلیکون در سطح ۰/۰۱ به‌طور معنی‌داری در برآورد این دو آنزیم نقش داشته است و با افزایش غلظت سیلیکون و گذشت زمان، فعالیت این دو آنزیم افزایش می‌یابد.

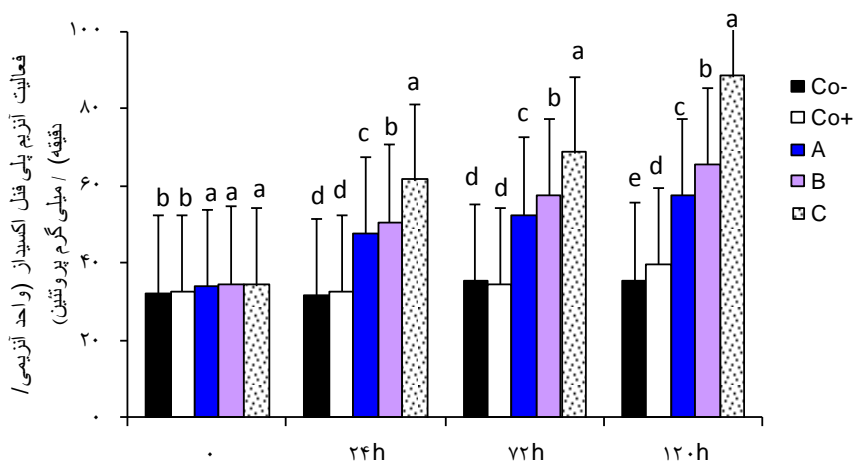
فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در گندم‌های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکون در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج کاربرد غلظت‌های مختلف سیلیکون نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به گیاه شاهد در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری دارد. همچنین، نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز بلافاصله پس از تلقیح قارچ عامل بیماری در تمام تیمارها در سطح پایینی قرار داشت، در حالی که، در فاصله زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح قارچ عامل بیماری، گیاه شاهد بیمار و گیاهان تحریک‌شده تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد سالم نشان دادند. بالاترین میزان فعالیت آنزیم در ۷۲ ساعت پس از تلقیح قارچ عامل بیماری و در تیمار ۶ میلی‌مولار مشاهده شد. در فاصله زمانی ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح، میزان فعالیت این آنزیم در همه تیمارها همچنان بالا بود.



فواصل زمانی نمونه برداری پس از تلقیح عامل بیماری بر حسب ساعت

شکل ۲. بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در فواصل زمانی مختلف پس از تلقیح بیمارگر در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکون، (Co-) شاهد سالم (Co+): شاهد آلوده: حروف A، B و C به ترتیب غلظت‌های سیلیکون (۶، ۴، ۲ میلی‌مولار)

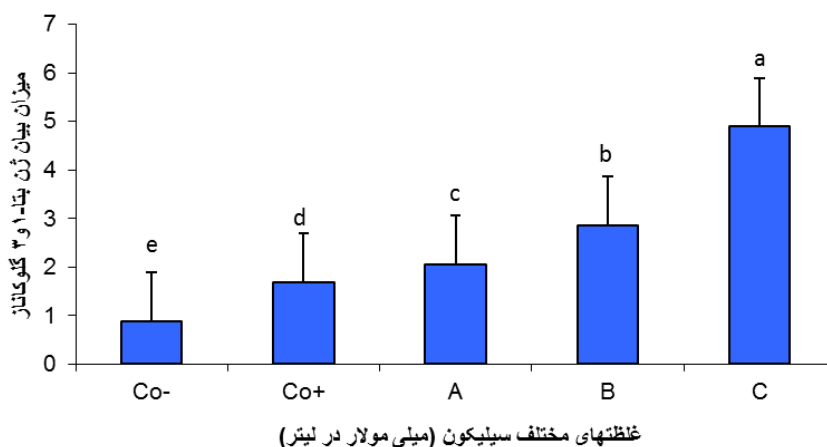


شکل ۳. بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در فواصل زمانی مختلف پس از تلقیح بیمارگر در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکون، (Co-): شاهد سالم (Co+): شاهد آلوده: حروف A، B و C به ترتیب غلظت‌های سیلیکون (۶، ۴، ۲ میلی مولار در لیتر) فواصل زمانی نمونه برداری پس از تلقیح عامل بیماری بر حسب ساعت

جدول ۶. جدول تجزیه رگرسیون بتا - ۱ و ۳ گلوکاناز

| منبع تغییرات | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | F | Pr>F |
|--------------|------------|--------------|----------------|-------|--------|
| رگرسیون | ۱ | ۲۱/۵۶ | ۲۱/۵۶ | ۹۵/۳۴ | <۰,۰۰۱ |
| خطا | ۱۴ | ۳/۱۶ | ۰/۲۲۶ | | |
| کل | ۱۵ | ۲۴/۷۳ | | | |

$R^2 = ۰/۸۷$ (سیلیکون) $۱/۳۱۹ - ۰/۵۱۹ =$ بتا - ۱ و ۳ گلوکاناز



شکل ۴. میزان بیان ژن B-1,3- glucanase در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکون، (Co-): شاهد سالم (Co+): شاهد آلوده: حروف A، B و C به ترتیب غلظت‌های سیلیکون (۶، ۴، ۲ میلی مولار در لیتر)

سالم و آلوده مشاهده شد. بالاترین میزان بیان این ژن در تیمار ۶ میلی مولار سیلیکون پس از تلقیح قارچ عامل بیماری به ثبت رسید. بالاترین میزان بیان این ژن در تیمار ۶ میلی مولار سیلیکون پس از تلقیح قارچ عامل بیماری به ثبت رسید. $R^2=۸۵$ نشان دهنده تأثیر بالای سیلیکون در بیان ژن اگزالات اکسیداز است (جدول ۷).

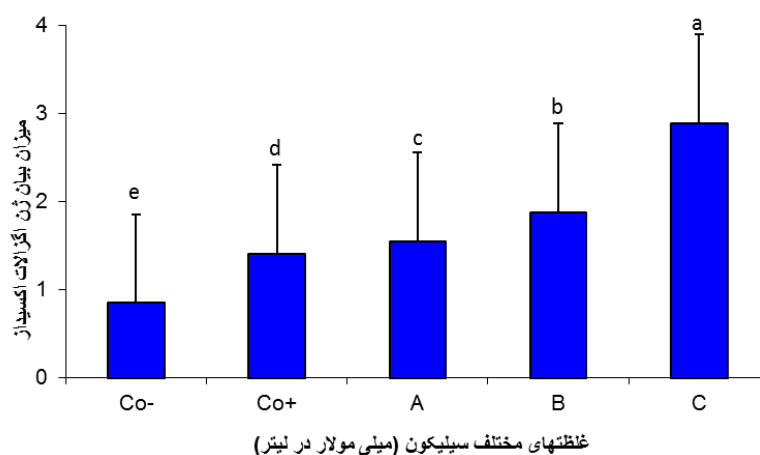
میزان بیان ژن اگزالات اکسیداز

نتایج بررسی میزان بیان ژن اگزالات اکسیداز در گندم‌های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکون در بازه زمانی ۱۲۰ ساعته در شکل ۵ نشان داده شده است. در این بازه زمانی اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارهای به کاررفته سیلیکون با شاهد

جدول ۷. جدول تجزیه رگرسیون اگزالات اکسیداز

| منبع تغییرات | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | F | Pr>F |
|--------------|------------|--------------|----------------|-------|--------|
| رگرسیون | ۱ | ۴/۵۵ | ۴/۵۵ | ۸۱/۷۸ | <۰/۰۰۱ |
| خطا | ۱۴ | ۰/۷۷۸ | ۰/۰۵۵ | | |
| کل | ۱۵ | ۵/۳۲ | | | |

$R^2 = ۰/۸۵$ (سیلیکون) $۰/۲۳۸ - ۱/۲۱۵ =$ اگزالات اکسیداز



شکل ۵. میزان بیان ژن *Oxalat oxidase* در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکون، (Co-): شاهد سالم (Co+): شاهد آلوده: حروف A، B و C به ترتیب غلظت‌های سیلیکون (۲، ۴، ۶ میلی مولار در لیتر)

بعد از آلودگی بررسی شد. کاربرد سیلیکون به‌عنوان یک القاکننده مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی از دیر زمانی است که به‌خوبی در بیماری بلاست برنج بررسی شده است (Onodera 1917). سیلیکون در شرایط رشدی مختلف باعث جلوگیری از تغییرات شدید بافت اپیدرم برگ و خوشه برنج شده است (Datnoff *et al.* 1997). نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق نشان داد که شدت وقوع بیماری و توسعه قارچ در خوشه آلوده به مراتب از شاهد آلوده کمتر بود که نقش سیلیکون را در القای مقاومت ساختاری برای جلوگیری از پیشرفت بیماری تأیید می‌کند، ولی تغییرات ساختاری و ظاهری در گیاهان تیمار شده مشاهده نشد. کاربرد سیلیکون با غلظت ۶ میلی مولار تأثیر معنی‌داری در کاهش علائم بیماری نسبت به شاهد آلوده از خود نشان داد، ولی غلظت ۲ میلی مولار تأثیر کمی در کنترل علائم بیماری داشت که این امر نشان‌دهنده نقش تجمعی سیلیکون در القای مقاومت است. پیش‌تیمار گیاهان با الیستورهای مختلف باعث تحریک پاسخ‌های دفاعی و در نتیجه کاهش علائم بیماری در سیستم‌های بیماری‌زای مختلف شده است، هرچند هنوز هم مکانیسم‌های آن برای

بحث

نقش سیلیکون در بهبود شرایط رشدی بسیاری از گیاهان زراعی و غیرزراعی بررسی شده است. تحقیقات متعددی نشان داده است که سیلیکون در کنترل بیماری‌های گیاهی ایجادشده توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها مؤثر بوده و در بافت‌های مجاور بیمار، سیلیکون تجمع یافته است (Diogo and Wydra 2007, Epstein 2001, Fauteux *et al.* 2005, Hattori *et al.* 2005). بیماری فوزاریوم گندم یکی از بیماری‌های مهم گندم است که علاوه بر کاهش کمیت و کیفیت محصول باعث تولید زهرابه‌های سرطانزا در انسان و دام می‌شود. روش‌های شیمیایی مبارزه با این بیماری علاوه بر خطرهای زیست‌محیطی، کنترل کامل بیماری را در بر نداشته است. در این تحقیق نقش سیلیکون به‌عنوان یک عامل تقویت‌کننده ساختار فیزیکی و بیوشیمیایی گیاه (Fauteux *et al.* 2005) در برابر بیماری بلاست خوشه گندم ارزیابی شد. با توجه به اینکه بهترین زمان تأثیر الیستورها در ابتدای زمان آلودگی است (Eder and Cosio 1994, Garcia-Brugger *et al.* 2006) در این تحقیق نقش القاکنندگی مقاومت سیلیکون تا ۷۲ ساعت

نظیر: پراکسیداز و گلوکاناز تولید می‌شوند و شدت بیماری و میزان خسارت کاهش می‌یابد (Cherif *et al.* 1994). نتایج این تحقیقات حاکی از آن است که سیلیکون باعث ایجاد تغییرات بیوشیمیایی از طریق افزایش میزان آنزیم‌های دخیل در مقاومت القایی می‌شود. بنابراین، این آنزیم‌ها به‌عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی مقاومت القایی سیستمیک در نظر گرفته می‌شوند و می‌توانند ملاک مناسبی از ایجاد این نوع مقاومت در گیاه در واکنش متقابل میزبان بیمارگر محسوب شوند. ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت، گروهی از پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی را رمز می‌کنند که موجب تخریب دیواره سلولی قارچی، ایجاد اختلال در غشاهای سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماری‌زایی و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می‌شوند. یک گروه از این ژن‌ها پروتئین‌هایی مانند بتا- ۱ و ۳ گلوکاناز و اگزالات اکسیداز را رمز می‌کنند (Mackintosh *et al.* 2007). آنزیم بتا- ۱ و ۳ گلوکاناز پیوند پلی ساکارید بین کربن‌های ۱ و ۳ در ساختمان گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ را تخریب می‌کند (Leah *et al.* 1991). آنزیم اگزالات اکسیداز از پروتئین‌های فاز حاد در گیاهان است که در حضور اکسیژن مولکولی، اگزالات را به آب اکسیژنه و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌کند (Dunwell *et al.* 2000). تأثیر سیلیکون در الگوی بیان ژن در برنج آلوده به بیماری بلاست برنج با استفاده از روش ریز آرایه نشان داده است که تعداد ۲۲۱ ژن در گیاهان تحریک‌شده با سیلیکون، افزایش بیان داشته است که در این میان اگسلات اکسیداز بیان چشمگیری از خود نشان داد (Brunings *et al.* 2009) در این مطالعه نیز میزان بیان ژن اگسلات اکسیداز در حضور سیلیکون افزایش داشت. در ارتباط با بیماری فوزاریوم و نقش سیلیکون مطالعه جامعی وجود ندارد.

گندم آلوده به سفیدک سطحی که با سیلیکون تحریک شده بود، الگوی متنوعی از بیان ژن نشان داد و ژن‌های مرتبط با استرس‌های زیستی و همچنین، ژن‌های درگیر در متابولیسم افزایش بیان داشتند؛ در حالی که، ژن‌های دخیل در فتوسنتز کاهش بیان داشتند (Chain *et al.* 2009). در این مطالعه نیز ژن‌های

کاهش بیماری کاملاً شناخته نشده است (Walters *et al.* 2012). در خیار آلوده به بیماری مرگ گیاهچه، تیمار سیلیکون (۱/۷ میلی‌مولار) باعث فعال‌شدن آنزیم‌های β گلوکوزیداز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز به مدت ۴ روز بعد از آلودگی شد و سپس، مقادیر اندازه‌گیری‌شده کاهش پیدا کرد (Cherif *et al.* 1994). نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که تا ۳ روز بعد از آلودگی مقادیر تمام شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده در این نسبت به شاهد افزایش داشت. یک مطالعه تحقیقاتی نشان داد که کاربرد ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سیلیکون در آب آبیاری باعث سرکوب لکه سیاه رز می‌شود (Gillman *et al.* 2003). اثر سیلیکون در کاهش شیوع پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی در سیستم کشت هیدروپونیک و بستر کود گیاهی گزارش شده است (Diogo and Wydra 2007). نتایج ما نیز در این تحقیق نشان داد که کاربرد سیلیکون شدت توسعه علائم بیماری را در بازه‌های زمانی کاهش داد. پراکسیدازها در مقاومت گیاه اثر مستقیم دارند و از طریق تولید رادیکال آزاد و پراکسید هیدروژن، که برای بعضی بیمارگرها سمی هستند، به مقاومت گیاه در برابر بیمارگر منجر می‌شوند (Van Loon and Van Strien 1999). پلی‌فنول اکسیدازها گروهی از آنزیم‌ها هستند که در اکسیداسیون فنول‌ها به کینون‌ها و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی نقش مهمی دارند. در ارتباط با امکان مؤثر بودن فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنول اکسیداز در واکنش‌های دفاعی گیاه، تحقیقات نشان داده است که این آنزیم‌ها در فعالیت دفاعی و واکنش فوق حساسیت در مقابل ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها دخالت دارند (Mayer 2006). بررسی تغییرات آنزیمی در این تحقیق نشان داد که آنزیم‌های مورد بررسی در اولین زمان‌های آلودگی حتی در شاهد منفی افزایش یافته و با تحریک سیلیکون این میزان به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. در گیاهان تیمار شده با سیلیکون به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان و تولید ترکیبات ضد میکروبی مانند تولید ترکیبات فنولی، فیتوآلکسین‌ها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و غیره افزایش می‌یابد (Cai *et al.* 2009). در خیار تیمار شده با سیلیکون که پیتوم به آن حمله کرده است، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی

نتایج این تحقیق مطابقت دارد (Diogo and Wydra 2007). هرچند مطالعات زیادی در سطوح فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در مورد مکانیسم احتمالی مقاومت ناشی از سیلیکون انجام شده است، جزئیات مکانیسم آن، که چگونه سیلیکون انتقال سیگنال در گیاه را راه‌اندازی می‌کند نیاز به آنالیز مولکولی و بیوشیمیایی دقیق‌تر دارد (Cai et al. 2009). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق چنین می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد سیلیکات سدیم می‌تواند به‌عنوان روش مؤثری در کنترل خسارت بیماری‌های گیاهی در سیستم مدیریت تلفیقی بیماری‌ها استفاده شود.

درگیر در استرس زیستی افزایش داشت. همچنین، مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی نشان می‌دهد که سیلیکون بیان ژن‌های مرتبط با سیستم دفاعی را فعال می‌کند و مانند اسید سالیسیلیک و اتیلن نقش مهمی در انتقال سیگنال دارد (Fauteux et al. 2005). در این پژوهش کاربرد سیلیکون باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی از جمله بتاگلوکان و اگزالات اکسیداز شد. کاربرد سیلیکون قبل از کاشت به‌صورت بذریاش میزان بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی ناشی از باکتری *Ralstonia solanaceum* را از طریق افزایش بیان ژن‌های مرتبط به دفاع در گیاه کاهش داده است که با

REFERENCES

- Bernardo A, Bai G, Guo P, Xiao K, Guenzi AC, Ayoubi P** (2007) *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between *Fusarium* head blight-resistant and susceptible wheat cultivars. *Functional and integrative genomics* 7: 69-77.
- Bottalico A, Perrone G** (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 8: 614-624
- Brunings AM, Datnoff LE, Ma JF, Mitani N, Nagamura Y, Rathinasabapathi B, Kirst M** (2009) Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Annals of Applied Biology* 155: 161-170.
- Cai K, Gao D, Chen J, Luo S** (2009) Probing the mechanisms of silicon-mediated pathogen resistance. *Plant Signal Behav* 4:1-3.
- Chain F, Côté-Beaulieu C, Belzile F, Menzies J, Bélanger R** (2009) A comprehensive transcriptomic analysis of the effect of silicon on wheat plants under control and pathogen stress conditions. *Molecular plant-microbe interactions* 22: 1323-1330.
- Chen C, Belanger RR, Benhamou N, Paulitz TC** (2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 13: 23-56.
- Chérif M, Asselin A, Bélanger R** (1994) Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology* 84: 236-342.
- Datnoff L, Deren C, Snyder G** (1997) Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. *Crop Protection* 16: 525-531.
- De Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, Abreu C, Gomes-Filho E** (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 56: 87-94.
- Diogo RV, Wydra K** (2007) Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polysaccharide structure. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70: 120-129.
- Dunwell JM, Khuri S, Gane PJ** (2000) Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Review* 64: 153-179.
- Eder J, Cosio EG** (1994). Elicitors of Plant Defense Responses. *In: Kwang WJ, Jonathan J* (eds), *International Review of cytology*. Academic Press, London. pp. 1-36.
- Epstein E** (2001) Silicon in plants: facts vs. concepts. *In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndöfer GH* (eds.). *Silicon in Agriculture*. 1th ed. Elsevier, Amsterdam. PP.1-16.
- Fauteux F, Rémus-Borel W, Menzies JG, Bélanger RR** (2005) Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letter* 1: 241-246.
- Gillman JH, Zlesak DC, Smith JA** (2003) Applications of potassium silicate decrease black spot infection in *rosa hybrida meipelta*'(Fuschia Meidiland™). *HortScience* 38: 147-1147.
- Hattori T, Inanaga S, Araki H, An P, Morita S, Luxová M, Lux A** (2005) Application of silicon enhanced drought tolerance in *Sorghum bicolor*. *Physiologia Plantarum* 123: 459-466.

- Ones R** (2000) Assessments of Fusarium head blight of wheat and barley in response to fungicide treatment. *Plant Disease* 84: 1021-1030.
- Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J** (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *Journal of Biological Chemistry* 226: 1564-1573.
- Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Tamai K, Konishi S, Fujiwara T, Katsuhara M, Yano M** (2007) An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 448: 209-212.
- Mackintosh CA, Lewis J, Radmer LE, Shin S, Heinen S. J, Smith L. A, Wyckoff MN, Dill-Macky R, Evans CK, Kravchenko S** (2007) Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium head blight. *Plant cell reports* 26: 479-488.
- Mayer AM** (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistr.* 67: 2231-2238.
- Mitani N, Ma JF** (2005) Uptake system of silicon in different plant species. *Journal of Experimental Botany* 56: 1255-1261.
- Siranidou E, Kang Z, Buchenauer H** (2002) Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to Fusarium head blight. *Journal of Phytopathology* 150: 200-208.
- Stack RW, McMullen MP** (2010) A visual scale to estimate severity of Fusarium head blight in wheat. 1th ed. North Dakota State University press. Dakota.
- Strange R, Deramo A, Smith H** (1987) Virulence enhancement of *Fusarium graminearum* by choline and betaine and of *Botrytis cinerea* by other constituents of wheat germ. *Transactions of the British Mycological Society* 70: 201-207.
- Van Loon L, Van Strien E** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Vlot AC, Klessig F, Park SW** (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal (s). *Current opinion in plant biology* 11: 422-436.
- Walters DR, Avrova A, Bingham IJ, Burnett FJ, Fountaine J, Havis ND, Hoad SP, Hughes G, Looseley M, Oxley SJ** (2012) Control of foliar diseases in barley: towards an integrated approach. *European Journal of Plant Pathology* 73: 133-137.
- Windels CE** (2000) Economic and social impacts of Fusarium head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology* 90: 17-21.