

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

سید کاظم صباغ^{۱*}، مرجان پیکانی^۲ و مرضیه طاهری^۳

۱- دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد.

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل.

۳- کارشناس آزمایشگاه، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد.

*مسئول مکاتبه: sksabbagh@yazd.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۸/۴/۴

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۷

چکیده

در این تحقیق تعاملات بین بیمارگر *Fusarium graminearum* و گندم شامل تغییر در میزان فعالیت چند آنزیم آنتی‌اکسیدانی و تغییر در سطح بیان ژن‌های PR2 (b,1-3glucanase), PR3 (chitinase), PR4 (wheatwin) مورد بررسی قرار گرفت. از رقم گندم تجن، آزمایش در شرایط کشت آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار استفاده شد. محلول پاشی اندام هوایی گیاه توسط متیل جاسمونات با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و یک، سه و پنج روز پس از مایه‌زنی با اسپور قارچ *Fusarium graminearum* (غلظت ۱۰^۵ اسپور در هر میلی‌لیتر) 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 فنلک و آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، گایاکول پراکسیداز سه روز بعد از آلودگی 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 پایین‌ترین سطح میزان بیان را داشته‌اند. بررسی اثر بازدارندگی رشد قارچ بوسیله‌ی متیل جاسمونات نشان داد که این ماده در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر 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 آنتی‌اکسیدانی، فنل کل.

مقدمه

(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).

بلایت فوزاریومی خوشه‌ی گندم که بوسیله‌ی قارچ *Fusarium graminearum* 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). آلودگی خوشه‌ی گندم به این بیماری علاوه بر کاهش تولید محصول در مزرعه، کاهش کیفیت دانه و آرد نانوائی، منجر به تولید زهرابه‌های سرطان‌زا در دام و انسان می‌شود

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 توسعه‌ی میسیلوم 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 *Penicillium digitatum* نشان داد که این دو ترکیب اثر بازدارنده‌ی قابل ملاحظه‌ای نسبت به شاهد بر روی جوانه‌زنی اسپور قارچ ندارد ولی باعث جلوگیری از توسعه‌ی میسیلومی قارچ در شرایط آزمایشگاه می‌شود (Ding et al., 2002). تیمار گیاهان با جاسمونات‌ها، باعث افزایش مقاومت برنج به بیماری پوسیدگی ساقه ناشی از قارچ *Magnaporthe oryzae* (Schweizer et al., 1998)، آرابیدوپ سیس آلوده به بیماری‌های *Botrytis cinerea* و *Alternaria brassicicola* 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 ژن‌های مسئول تولید جاسمونیک و سالیسیلیک اسید، ۲ برابر این میزان در رقم حساس می‌باشد و 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

به علت کاهش ۵۰ تا ۶۰ درصدی محصول، فوزاریوز خوشه‌ی گندم یک تهدید عمده برای منابع غذایی جهان شده و مرکز تحقیقات بین‌المللی (CIMMYT) آن را به عنوان یکی از فاکتورهای محدودکننده‌ی 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 آنتی‌اکسیدانتی 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 آنتی‌اکسیدانتی 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 آنتی‌اکسیدانتی 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 ژن‌های 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 دهنده‌ی 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 بیماری‌گرهای گیاهی می‌شود (Antico et al., 2005; Desmond et al., 2012). کاربرد خارجی متیل

شد. بدین منظور برای تهیه‌ی پرگنه‌ تازہ قارچ، یک دیسک به قطر یک سانتی متر به روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar, Merck, Germany) کشت داده و به گرمخانه با دمای 25 ± 2 درجه‌ی سلسیوس انتقال داده شد. پس از رشد قارچ به مدت یک هفته، یک دیسک از حاشیه پرگنه‌ قارچ به ارلن‌های دوبار سترون شده‌ی حاوی ۵۰ گرم کاه خرد شده و ۱۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل گردید. ارلن‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس روی شیکر دورانی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت پنج تا شش روز نگهداری شدند. سپس محتویات ارلن‌ها از یک پارچه‌ی ململ سترون عبور داده شد و درون یک لوله‌ی فالكون سترون ریخته شد، به منظور جدا کردن فاز میسلومی و اسپور قارچ، لوله‌های فالكون 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 -80 درجه‌ی سلسیوس تا انجام آزمایشات بعدی انتقال یافت.

بررسی بازداندگی از رشد

اثر بازداندگی 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 میلی‌لیتر 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

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 میسلومی 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 میلی‌لیتر از 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 میلی‌لیتر 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 طوری که 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 *Fusarium graminearum* تهیه شده از گروه گیاه پزشکی دانشگاه اردبیل برای تهیه‌ی مایه تلقیح استفاده

یسلسیوس 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 میلی مولار اضافه شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع می‌شود. جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز به ۴۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۰/۲ مولار (PH=7)، پیروگالول ۰/۰۲ مولار به میزان ۱ میلی لیتر، 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 میکرولیتر EDTA (۰/۲ مولار)، ۵۰ میکرولیتر گایاکول (۵ میلی مولار)، مقدار ۷۹۹/۸ میکرولیتر آب مقطر، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۳۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه اضافه شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز 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 -Chitinase I و PR4 (wheatwin)، 1,3-glucanase گیاهان تیمار شده و شاهد جهت استخراج مولکول mRNA استفاده گردید. بدین منظور، ۵۰ گرم از برگ‌های گیاه موردنظر جدا و در هاون چینی با استفاده از ازت مایع پودر گردید و جهت استفاده در استخراج RNA با استفاده از کیتک یا ژن (Qiagene, Germany) استفاده گردید. رشته‌ی اول DNA از ملکول‌های mRNA با استفاده از کیتک جاری 2-Steps RT-PCR kit (Vivantis, Cinngene) ساخته شد. کمیت و کیفیت مولکول‌های cDNA به ترتیب با استفاده از

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

قطر پرگنه شاهد - قطر پرگنه تیمار

میزان بازدارندگی رشد قارچ
 قطر پرگنه شاهد - ۵ میلی متر

ارزیابی تغییر میزان فنل کل

برای اندازه‌گیری فنل کل از عصاره برگی صاف شده با استفاده از معرف فولین به شرح زیر استفاده شد. در ابتدا مقدار یک گرم از بافت گیاهی همراه با ۱۰ میلی لیتر 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 میلی لیتر از عصاره به دست آمده، ۷ میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه و کاملاً مخلوط و ۰/۵ میلی لیتر از معرف فولین اضافه و مجدداً محتویات لوله با هم مخلوط شد. پس از ۳ دقیقه یک میلی لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به لوله اضافه و حجم مخلوط با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر 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 ۲۸۰ میکرولیتر آب مقطر) یکسانه شد. سپس به مدت ۲۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه-

دستگاه اسکندر اپ (Analytika, Germany) و ژلاگاز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار ۵۰ نانوگرم از cDNA برای انجام آنالیز بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده برای qRT-PCR توسط نرم افزار آنالیز (http://Fokker.wiPrimer3.mit.Primer3) توسط شرکت سیناژن ساخته شد (جدول ۱). واکنش qRT-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA (50 ng/μl)، ۴ میکرولیتر از Mastermix (Hot Tag 20μM)

دستگاه اسکندر اپ (Analytika, Germany) و ژلاگاز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار ۵۰ نانوگرم از cDNA برای انجام آنالیز بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده برای qRT-PCR توسط نرم افزار آنالیز (http://Fokker.wiPrimer3.mit.Primer3) توسط شرکت سیناژن ساخته شد (جدول ۱). واکنش qRT-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA (50 ng/μl)، ۴ میکرولیتر از Mastermix (Hot Tag 20μM)

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.

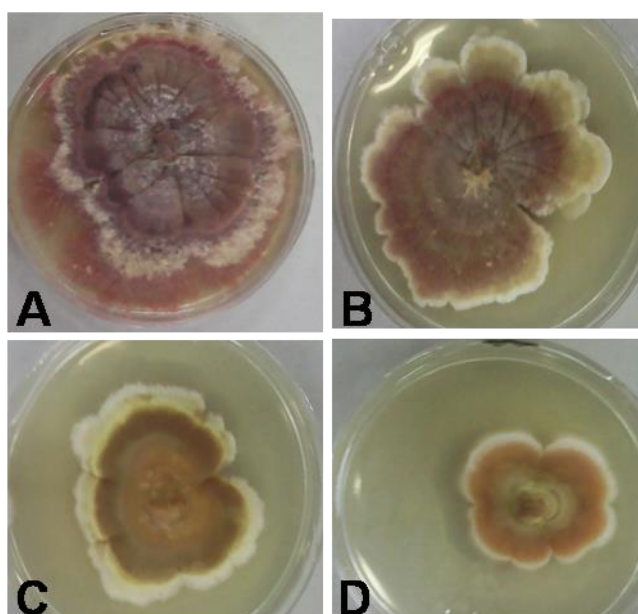
Gene ژن	Forward Primer 5'-3' آغاز گر رفت ۵'-۳'	Reverse Primer 5'-3' غاز گر برگشت ۵'-۳'	Accession number شماره دسترسی	Reference منبع
B-1,3-glucanase	CTCGACATCGGTAACGACCAG	GCGGCGATGTAAGTGTGTTTC	Y18212	(Bertini et al., 2003)
Chitinase I	AGAGATAAGCAAGGCCACGTC	GGTTGCTCACCAGGTCCTTC	AB029934	(Desmond et al.,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

نتایج

بررسی اثر متیل جاسمونات در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *F. graminearum* با توجه به نتایج به دست آمده، با افزایش غلظت متیل جاسمونات اثر بازدارندگی آن بر رشد قارچ *F. graminearum* بیشتر شد، رشد میسلیوم به طور معنی داری ($p < 0.01$) در غلظت ۶۰۰ پی پی ام و پایین تر از آن کاهش یافت و رابطه‌ی خطی بین غلظت متیل جاسمونات و اثر بازدارندگی آن وجود داشت. اما میزان بازدارندگی در غلظت ۶۰۰ پی پی ام با میزان آن در تیمار با غلظت‌های کمتر از خود دارای اختلاف معنی دار بود، که این اختلاف به وضوح در تصویر نمایان است (شکل ۱).

آنالیز آماری

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



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 methylJasmonat 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

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).

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

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 دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد. این آزمایش توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال (P<0.01) انجام گرفت.

۲- میانگین رشد قطری پرگنه‌ی 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.

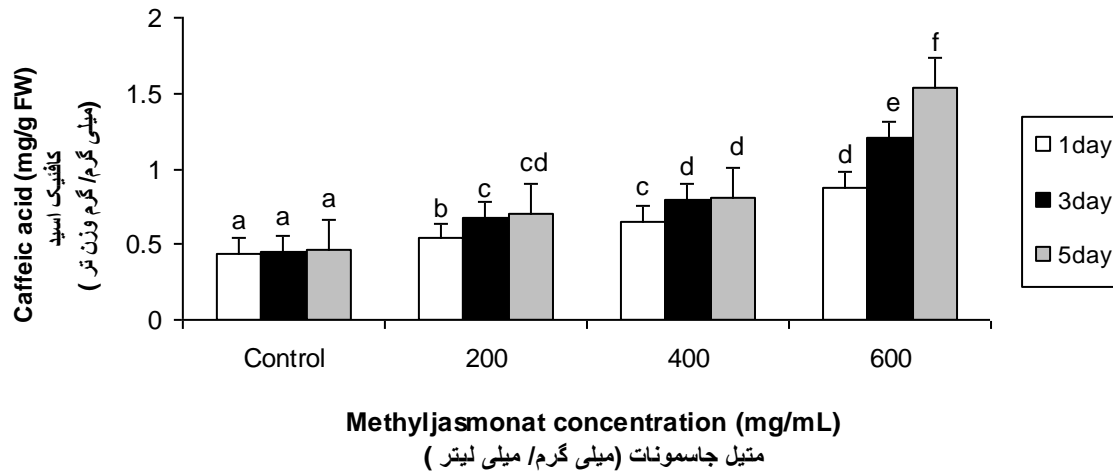
This experiment was done by Duncan's multiple range test at the 1% level.

2- Mean of growth diameter of fungal colony in 7 days after inoculation (cm)m, these results are related to mean of triplicate experiments

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.

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



شکل ۲. 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

(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 طوری که 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 پلی فنل 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 پلی فنل 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

با توجه به نتایج حاصل از نمودار ارائه 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر تقریباً در یک سطح مشابهی افزایش داشته، در حالیکه در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر این افزایش نسبت به بقیه 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

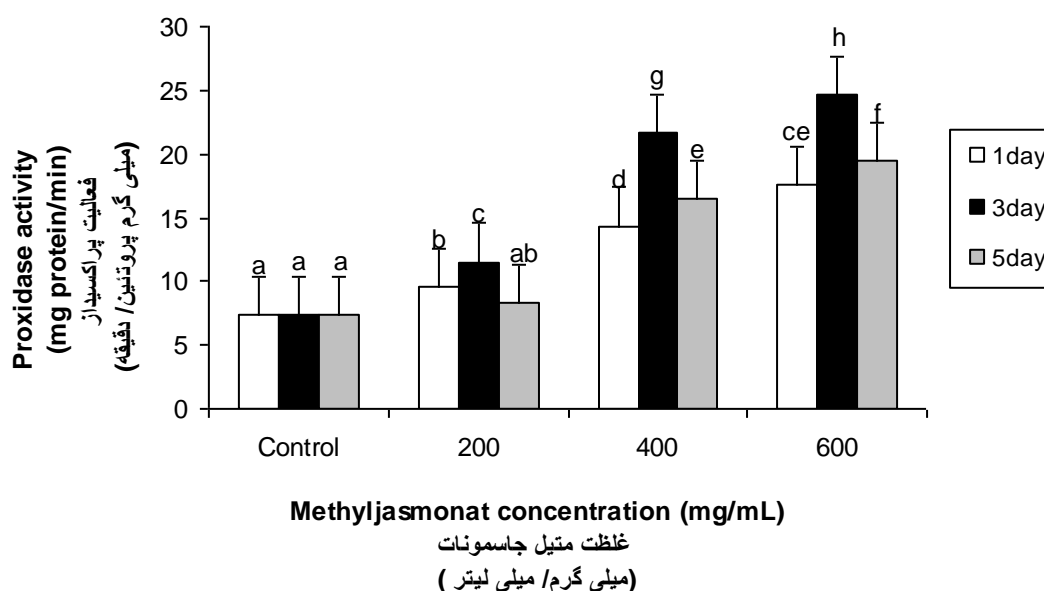
اکسیداز در بین روزهای مختلف نمونه برداری از اولین روز دوره‌ی مورد بررسی تا روز سوم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری روند افزایشی داشت، اما از روز پنجم به تدریج کاهش یافت.

جدول ۳- 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

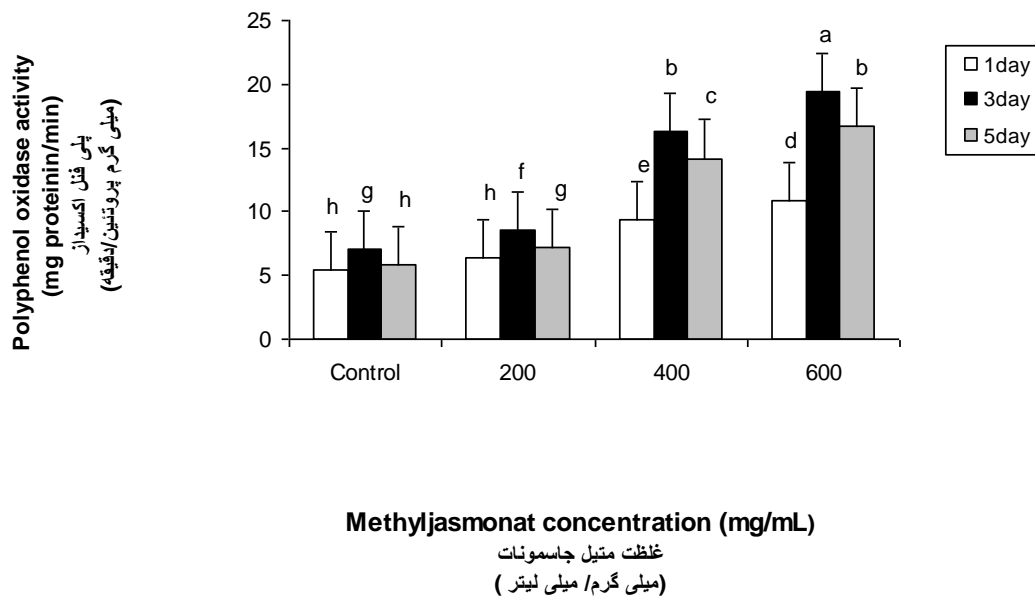
Gayacol Peroxidase گایاکول پراکسیداز	Polypheno oxidase پلی فنل اکسیداز	Proxidase پراکسیداز	Total phenol فنل کل	Free down درجه آزادی	Source of variance منابع تغییرات
38.117**	189.680**	281.504**	0.155**	3	متیل جاسمونات Methyljasmonat
27.298**	70.356**	98.865**	0.142**	2	روز جمع‌آوری نمونه Day of sampling
2.851**	9.792**	4.614 ^{n.s}	0.002 ^{n.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 methyl Jasmonat different time intervals after pathogen inoculation, (CO): Infected control.



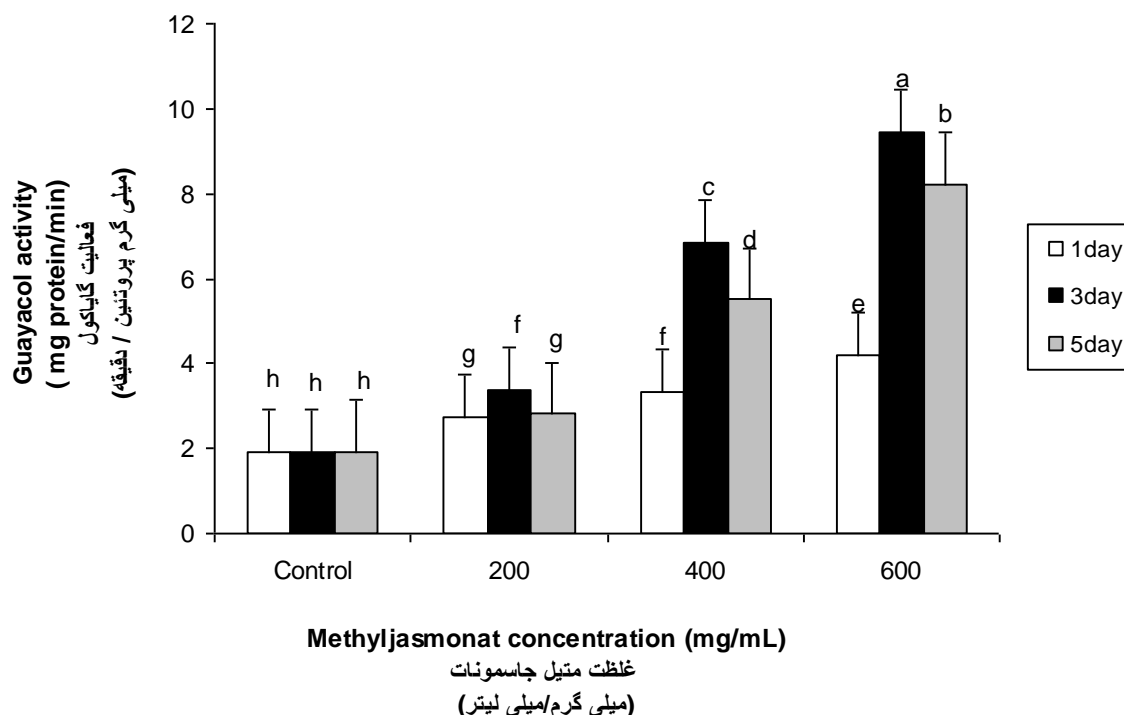
شکل ۴- بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در فواصل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی بیمارگر، (Co): شاهد آلوده.

Figure 4: The rate of enzyme activity of Polyphenol Oxidase in treated plants with different concentration of methyljasmonat in different time intervals after pathogen inoculation, (CO): Infected control

استخراج مولکول‌های RNA و سنتز cDNA نتایج حاصل از استخراج نشان داد که مولکول‌های RNA فاقد هر گونه شکستگی بر روی ژل الکتروفورز آگارز می‌باشد. جهت سنتز مولکو cDNA در ابتدا رشته‌ی اول از مولکول‌های mRNA سنتز شد. در سنتز رشته‌ی اول از الیگونوکلوئید 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 (شکل A ۶). برای اطمینان از حصول صحیح cDNA و همچنین کارایی آغازگرها و تعیین بهترین دمای ذوب برای تمام آغازگرها بوسیله‌ی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تعیین شد. که در هر دو مورد وجود باند با اندازه‌ی مورد نظر و بدون داشتن باندهای غیر اختصاصی نشان دهنده موفقیت آمیز بودن سنتز cDNA و همچنین تعیین دمای مناسب برای انجام بیان ژن بود. (شکل B ۶). تعیین شیب دمایی جهت

بررسی میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بررسی تغییرات آنزیم آنتی اکسیدانتی گایاکول پراکسیداز و مقایسه‌ی آن با گیاه شاهد و زمان‌های مختلف بعد از آلودگی 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 میلی‌لیتر 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 اندازه‌گیری ثبت شد (شکل ۵).

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



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 methyljasmonat 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, Peroxidase, Gayacol Peroxidase and Polyphenol oxidase under methyl Jasmonataffect on head blight disease

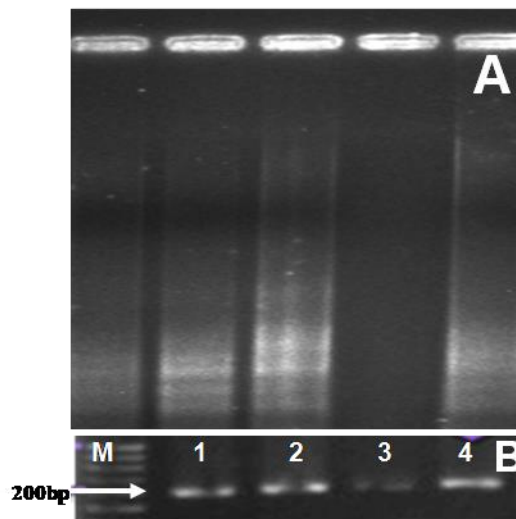
Treatment تیمار	Concentration (mg/mL) غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)	Total phenol فنل کل	Peroxidase پراکسیداز	Polyphenol oxidase پلی فنل اکسیداز	Gayacol Peroxidase گایاکول پراکسیداز
Methyl jasmonat متیل جاسمونات	0	0.463 ^c	9.383 ^c	6.142 ^d	2.258 ^d
	200	0.483 ^c	9.811 ^c	7.351 ^c	3.044 ^c
	400	0.627 ^b	17.514 ^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.

دمای پایین‌تر از این طیف قادر به تکثیر ژن مورد نظر نبود (شکل ۳A).

بدست‌آوردن دمای بهینه‌ی نوب هر یک از آغازگرهای مربوط به ژن‌ها به وسیله‌ی PCR نشان داد که دمای نوب هر آغازگر در محدوده‌ی دمایی ۶۱-۵۹ می‌باشد و



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

A: دمای ذوب آغاز گر ژن ۱- توبولین (۵۹ °C) ۲- 1-3gluconase (۵۹ °C) ۳- Chitinase (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)

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).

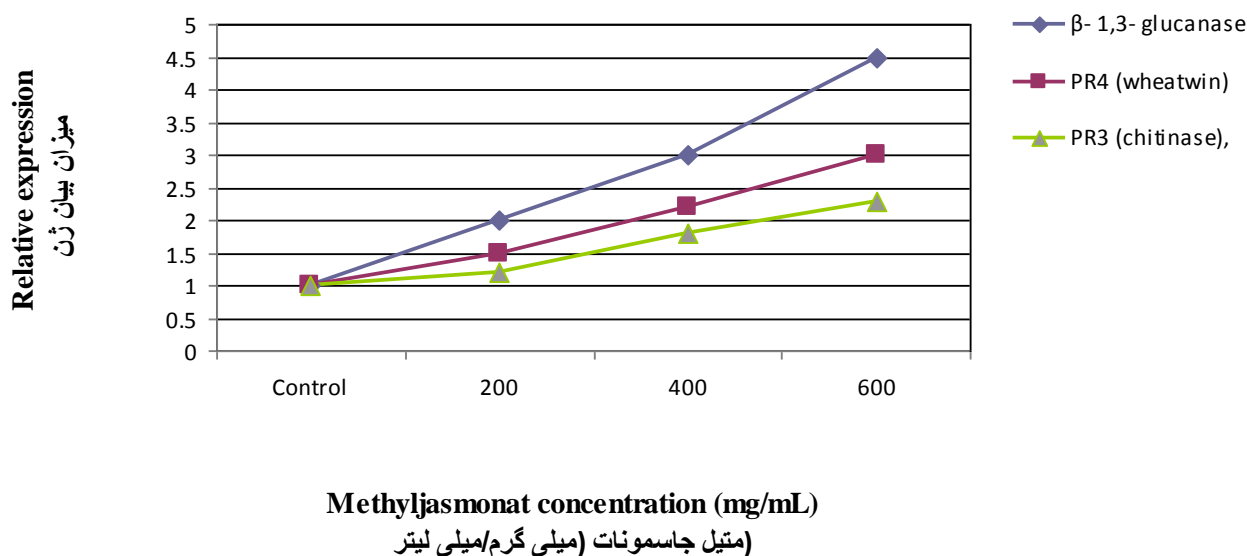
بحث

اطلاعات کمی در مورد پاسخ‌های دفاعی مولکولی فعال شده در پی تنش بیماری توسط عامل بیمارگر آن *F. graminearum* در دسترس می باشد. با وجود اهمیت بیماری بلایت خوشه گندم، شناخت مکانیسم های دفاعی 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 اکسیدانته 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

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 میلی‌گرم 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 بیشترین میزان بیان (سه برابر) متعلق به تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم 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



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 روز بعد 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*.

نمونه برداری‌ها 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 روز بعد 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 نتیجه‌گیری 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 مکانیسم‌های دفاعی گیاه کاهش یافته است. متیل جاسمونات در غلظت‌های

بازدارندگی جاسمونات اسید بر روی رشد میسیلیومی قارچ نشان داد که این ترکیب قادر به بازدارندگی رشد در محیط کشت و در شرایط آزمایشگاه می‌باشد. بیشترین میزان بازدارندگی در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم 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 H_2O_2 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 نتیجه‌گیری 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 ۲۴-۴۸ ساعت بعد از آلودگی وجود دارد. در این مطالعه

نسبت به بعضی از مطالعات مشابه غلظت نسبتاً 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 میلی‌لیتر از 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از متیل جاسمونات رشد قارچ را به میزان قابل توجهی متوقف نمود ولی غلظت بهینه متیل جاسمونات برای بازدارندگی کلنی قارچ، غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد که به توجه قدرت زیستی و سریع‌الرشد بودن قارچ *F. graminearum* این غلظت نسبتاً 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 بیماری‌های گیاهی مهم باشد. در این مطالعه همچنین میزان بیان ژن‌های β -chitinase (PR3)، 1,3-glucanase (PR2) 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-بیمارگر القا 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 میزان بیان ژن‌های PR1، PR2، PR3، PR4، PR5 در گندم آلوده به *F. pseudograminearum* (Desmond et al., 2005) و همچنین القای آنها بوسیله 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

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 فعالیت‌های واسطه‌ای 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 *Fusarium pseudograminearum* باعث افزایش میزان مقاومت گیاه به بیماری از طریق افزایش در بیان تعدادی از ژن‌های مسئول مقاومت شده است (Desmond et al., 2005) که با نتایج این تحقیق در افزایش مقاومت از طریق افزایش آنزیم‌ها و ژن‌های مقاومتی مورد آزمایش، 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 حالی که 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

بافزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های مرتبط با دفاع گیاه مانند فنیل آلانین آمونیاز و پراکسیداز را فراهم می‌کند (Walters, 2009). بیشترین میزان تغییر در بیان ژن‌ها مربوط به غلظت ۴۰۰ میلیوگرم در میلی‌لیتر ثبت شد و مقدار بیان با افزایش غلظت به ۶۰۰ میلیوگرم در میلی‌لیتر با یک شیب نسبتاً تند و معنی‌داری کاهش یافت این امر می‌تواند ناشی از ماهیت هورمون‌های گیاهی باشد که آنها در غلظت‌های بسیار پایین حداکثر میزان اثر بخشی در نوع فعالیت اختصاصی خود دارند. مطالعات نشان داده است که با استفاده از یکسری مواد القاکننده که باعث افزایش بیان برخی از ژن‌های PR در گیاهان می‌شوند، افزایش مقاومت نسبت به عوامل بیماری‌زا حاصل می‌شود. بررسی میزان بیان ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در درختان سیب آلوده به بیماری باکتریایی آتشک درختان میوه دانه‌دار نشان داد که استفاده از مواد القاکننده توانسته است باعث افزایش بیان این ژن‌ها گردد. این ژنها مرتبط با ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌باشند (Acimović et al., 2015). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی هم چون کیتیناز و گلوکاناز که نقش ضدباکتریایی و ضدقارچی دارند در ارتباط با مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌باشند (Ryals et al., 1996). بنابراین می‌توانند به عنوان نشانگرهای مفیدی در جهت تعیین اثر القاء‌گرهای مقاومتی در گیاهان مورد استفاده قرار گیرند. تیمار بذور قبل از کشت به وسیله القاء‌گرهای هورمونی علاوه بر کاهش هزینه‌های تامین مواد اولیه مقاومت سیستمیک را افزایش و گیاه را از مراحل اولیه رشدی در برابر تنش‌های زیستی محافظت (Wang et al., 2014).

در ژن‌های β -1,3-glucanase (wheatwin) PR4 نسبت به گیاه شاهد آلوده افزایش یافت، که این نشان‌دهنده آن است که پیش‌تیمار با متیل جاسمونات سبب افزایش بیان این ژن‌ها و افزایش القای مقاومت در گندم نسبت به بیماری بلایت خوشه شده است. مایه‌زنی خوشه‌های گندم با عامل *F. graminearum* باعث القاء بیان ژن‌های PR4 و PR5 در رقم مقاوم Sumai3 در مقایسه با رقم حساس Wheaton شده است (Mackintosh et al., 2007) و این در حالی است که بیان ژن chitinase (PR3) و β -1,3-glucanase (PR2) پس از مایه‌زنی با *F. graminearum* در رقم Sumai3 از رقم حساس سریع‌تر بوده است (Golkari et al., 2009). ولی در این تحقیق بیان ژن wheatwin از بیان ژن کیتیناز بیشتر بود.

افزایش بیان ژن PR4 در گندم تیمار شده با متیل جاسمونات بدون حضور عامل بیمارگر گزارش شده است (Bertini et al., 2003). نتایج ما نشان می‌دهد که افزایش بیان ژن‌های β -1,3-glucanase و PR4 (wheatwin) پس از تیمار با متیل جاسمونات علی‌رغم حضور عامل بیمارگر، می‌تواند منجر به مقاومت گیاه به بیماری بلایت خوشه شود. مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که کاربرد خارجی اسید جاسمونیک مقاومت در گیاهان تک‌لپه بیمار به بیماری‌های لکه‌برگی ناشی از *Stagonosporanodorum* در گندم (Jayaraj et al., 2004)، آلودگی *M. grisea* در برنج و آلودگی *Bgraminis* در جو را بهبود بخشد (Schweizer et al., 1998). مطالعه دیگری در جو دریافتند که حفاظت سیستمیک توسط متیل جاسمونات علیه عامل بیمارگر *B.graminis* همراه

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.
- Acimović 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, Procnier 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. development 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 against *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. overexpression 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. Deoxyvalenol and DON production Fusarium graminearum isolates in wheat and barley 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 *Alternaria brassicicola*. *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, Moëgne-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 practical 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 Peikani² and MTaheri³

¹Associate Professor of Plant Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran.

²Former MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, University of Zabol, Iran.

³Laboratory 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) and PR4 (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 chitinase respectively. Assay of growth inhibition effect by methyljasmonat 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.