

القای مقاومت توسط بتا آمینوبوتریک اسید (BABA) علیه بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه خیار

حمیدرضا علیزاده^{۱*} و خدیجه سالاری^۲

۱ و ۲. استادیار و مربی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۱۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۲)

چکیده

القای مقاومت در گیاهان یکی از روش‌های جدید در مدیریت بیماری‌های گیاهی است. بتا آمینوبوتریک اسید (BABA) از ترکیباتی است که قادر به القای مقاومت در گیاهان است. در این تحقیق القای مقاومت توسط این ترکیب علیه قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* F42 در گیاه خیار بررسی شده است. این ترکیب قادر به کاهش معناداری در شدت بیماری از طریق القای مقاومت گردید. بررسی کمی بیان ژن‌های *pr1* و *lox1* با روش QPCR بیانگر افزایش بیان ژن *pr1* بود که دلالت بر القای مسیر مقاومت وابسته به سالیسیلیک اسید دارد. بررسی بیان ژن‌های کیتیناز و بتا-۱ و ۳-گلوکاناز نشان داد که BABA باعث ایجاد حالت آماده‌باش در بیان این ژن‌ها می‌شود که پس از تلقیح بیمارگر بیان این ژن‌ها افزایش معناداری نسبت به شاهد نشان داد.

واژه‌های کلیدی: حالت آماده‌باش، سالیسیلیک اسید، کیتیناز، گلوکاناز، مقاومت سیستمیک.

مقدمه

جست‌وجو برای روش‌های جدید دوست‌دار طبیعت به‌ویژه در زمینه مقاومت گیاهان به استرس‌های زنده و غیرزنده از فاکتورهای کلیدی در کشاورزی پایدار است. القای سیستم دفاعی گیاهان به‌وسیله القاگرهای زنده و غیرزنده یک روش جایگزین مناسب برای محافظت از گیاهان در مقابل بیمارگرهای گیاهی است. مقاومت سیستمیک القایی^۱ (ISR) مقاومتی است که توسط میکروارگانسیم‌های مفید، یا القاگرهای طبیعی ساخته شده و در گیاه القا می‌شود. نوع دیگر مقاومت، مقاومت سیستمیک اکتسابی^۲ (SAR) است که غالباً توسط بیمارگرها در گیاه اطلاق می‌شود (Conrath et al., 2006; Justyna et al., 2013).

استفاده از القاکننده‌های شیمیایی که از یک سو سبب فعال‌سازی مکانسیم‌های دفاعی گیاه قبل از

رویارویی با بیمارگر شوند و از سوی دیگر خطرات زیست‌محیطی نداشته باشند، در سال‌های اخیر مورد توجه محققان قرار گرفته است. Papavizas (1963) اثر محافظتی BABA علیه پوسیدگی ریشه نخود ناشی از *Aphanomyces euteiches* گزارش نمود. این محافظت ناشی از اثر قارچ‌کشی این ترکیب نبود، بلکه فقط مانع بروز علائم بیماری می‌شد (Jakab et al., 2001). تحقیقات وسیعی روی ترکیبات القاکننده مقاومت در گیاهان در شرکت Ciba-Geigy انجام گرفت و مشخص شد که ترکیبات INA (2,6-dichloroisonicotinic acid) و BTH (benzothiadiazole) قادر به القای مقاومت در گیاهان همراه با تجمع پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی^۳ می‌شوند (Cohen, 2001). کوهن با مقایسه سه ایزومر AABA (DL-2 aminobutyric acid)، BABA (DL-3-aminobutyric acid) و GABA (4-aminobutyric acid) نشان داد که BABA مقاومت

1. Induced systemic resistance
2. Systemic acquired resistance

3. Pathogenesis related proteins
E-mail: hamidalizadeh@ujiroft.ac.ir

به حمله بیماری‌گرها از طریق تولید ترکیبات فنلی، فیتوالکسین و افزایش بیان ژن‌های دفاعی نشان می‌دهند. پژوهش‌ها نشان داده که BABA شیوه عمل متفاوتی از طریق فعال کردن مسیرهای پیام‌دهی دفاعی وابسته به هورمون‌های سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید، اتیلن و آبسسیک اسید نشان می‌دهد. مسیر مقاومت وابسته به SA توسط BABA در مقاومت به برخی بیماری‌ها گزارش شده است (Hwang et al., 1997; Siegrist et al., 2000). در مواردی هم مقاومت القاشده توسط BABA غیروابسته به SA گزارش شده است (Zimmerli et al., 2000). مقاومت وابسته به JA نیز توسط این ترکیب گزارش شده است (Hamiduzzaman et al., 2005). همچنین مقاومت غیروابسته به SA، JA و ET، و وابسته به آبسسیک اسید نیز توسط BABA گزارش شده است (Ton et al., 2005; Ton et al., 2004). به‌طور کلی، یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهد که مکانیسم مقاومت توسط BABA طبیعت پیچیده‌ای دارد و وابسته به سیستم‌های پیام‌رسانی متفاوت و بسته به گیاه و بیمارگر است (Justyna et al., 2013). مقاومت به سفیدک داخلی کاهو توسط BABA ناشی از تجمع H_2O_2 ، نشت کالوز و تجمع PR پروتئین‌ها گزارش شده است (Cohen et al., 2010). تغییر در فعالیت و ساختار آنزیمی PR پروتئین‌هایی مانند کیتیناز، پراکسیداز و بتا-۱-۳-گلوکاناز در کنگر فرنگی تیمار شده با BABA پس از تلقیح با *Sclerotinia sclerotiorum* گزارش شده است (Marcucci et al., 2010).

در این تحقیق اثر BABA بر القای مقاومت علیه بیماری پوسیدگی ساقه و ریشه خیار ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* F42 بررسی شده است. همچنین بیان ژن‌های وابسته به دفاع و مسیرهای پیام‌رسانی از زمان تلقیح با بیمارگر تا ۹۶ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر با روش Quantitative real time PCR به منظور تعیین مکانیسم القای مقاومت در این سیستم گیاه-بیمارگر ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نشاهای خیار، تلقیح با بیمارگر و BABA بذره‌های خیار پس از ضدعفونی سطحی در هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سه بار آبکشی با آب مقطر

بسیار خوبی علیه بیماری سفیدک داخلی توتون القا می‌کند و از اینجا نقش BABA در القای مقاومت مورد توجه قرار گرفت (Cohen, 1994). بتا-آمینوبوتیریک اسید [(DL)-3-aminobutyric acid, BABA] یکی از مشتقات کربوکسیلیک اسید و متعلق به آمینواسیدهای غیرپروتئینی است (Justyna et al., 2013). BABA یک ترکیب منحصربه‌فرد فعال‌کننده سیستم دفاعی است که وقتی روی اندام‌های هوایی گیاه پاشیده شود، یا در خاک به کار رود، جذب گیاه می‌شود و در گیاه سیستمیک می‌گردد و باعث القای مقاومت علیه طیف وسیعی از بیمارگرهای خاکزی و اندام‌های هوایی گیاه می‌شود (Justyna et al., 2013). بر اساس مطالعات انجام گرفته BABA باعث القای مکانیسم‌های دفاعی متنوعی در گیاه بر حسب نوع بیمارگر و نوع گیاه میزبان می‌شود. گیاه در اولین قدم تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی می‌دهد که منجر به نشت کالوز و لیگنینی شدن دیواره سلول‌ها در منطقه آلوده می‌شود (Baysal et al., 2005). علاوه بر این، پاسخ‌های بیوشیمیایی همچون تولید متابولیت‌های ثانویه و القای آنزیم‌های دفاعی نیز آغاز می‌شود (Hamiduzzaman et al., 2005). پژوهش‌های مختلفی افزایش بیان پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی که خاصیت ضد میکروبی دارند را در اثر کاربرد BABA در گیاهان مختلف همچون گوجه‌فرنگی، فلفل و سیب‌زمینی گزارش کرده‌اند (Altamiranda et al., 2008; Cohen et al., 1994; Hwang et al., 1997). گیاهان فلفل تلقیح شده با BABA با افزایش سنتز و تجمع بتا-۱ و ۳-گلوکاناز و کیتیناز نسبت به *Phytophthora capsici* مقاومت نشان دادند. همچنین میزان SA در گیاهان تلقیح شده به شدت افزایش نشان داد. این محققان نتیجه گرفتند که القای مقاومت وابسته به SA و بیان PR پروتئین‌ها است (Hwang et al., 1997). Hamiduzzaman et al. (2005) القای مقاومت در انگور علیه سفیدک داخلی از طریق افزایش تولید کالوز و سیستم پیام‌دهی جاسمونیک اسید را گزارش کردند. در برگ‌های انگور آلوده شده با *Plasmopara viticola* این ماده موجب القای نشت کالوز و افزایش بیان ژن‌های وابسته به مسیر پیام‌دهی جاسمونیک اسید همچون LOX-9 و PR-4 شده است. گیاهان تلقیح شده با BABA پاسخ سریع‌تر و قوی‌تری

به دست آمده با روش Cox-Box تبدیل و نرمال شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با آزمون تجزیه واریانس^۲ انجام گرفت و گروه‌بندی تیمارها با آزمون توکی با استفاده نرم‌افزار MINTAB 17 انجام گرفت.

استخراج RNA و ساخت cDNA

نمونه‌های نگهداری شده در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس با استفاده از هاون خنک در نیتروژن مایع خرد شدند و به صورت پودر درآمدند. پودر حاصل در لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری که با فرو بردن در نیتروژن مایع خنک شده بود، ریخته شد (در هر لوله حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه خرد شده) و تا مرحله بعدی در نیتروژن مایع نگهداری شدند. استخراج RNA با کیت (RNeasy Plant Mini Kit Qiagen) بر طبق دستور کارخانه سازنده انجام گرفت. کارایی استخراج RNA با روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین و غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. به منظور حذف DNA ژنومی، RNA استخراج شده با DNase تیمار شد. بدین منظور ۲/۵ میکروگرم از RNA به یک لوله منتقل و سه میکرولیتر از بافر ۱۰X (Ambion turbo DNase free buffer) و ۰/۷۵ میکرولیتر آنزیم (Ambion USA) DNase به آن اضافه شد. حجم نهایی با اضافه کردن آب مقطر میلی‌کیو (Milli-Q) عاری از RNases به ۳۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس ۰/۷۵ میکرولیتر دیگر آنزیم به هر لوله اضافه و لوله‌ها برای مدت ۴۵ دقیقه دیگر در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس شش میکرولیتر (۰/۲ حجم) از محلول متوقف‌کننده (Ambion) به هر لوله اضافه و به مدت دو دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به مدت ۱/۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ و در آخر RNA عاری از DNA بدون برداشتن محلول متوقف‌کننده به لوله جدید عاری از RNase منتقل شد (Ramirez et al., 2010).

برای کنترل عملکرد DNase و عاری بودن RNA نهایی از آلودگی به DNA ژنومی یک PCR با زوج آغازگر با توالی مستقیم 5'-GTCAAATACTGGGAAGATC-3' و

سترون، به مدت ۲۴ ساعت برای جوانه‌زنی بین کاغذ صافی مرطوب سترون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس بذره‌های جوانه‌دار شده در گلدان‌های پر شده با خاک مخصوص گلدان و شن (۵:۱۲) که دو بار سترون شده بودند، کشت گردیدند و در گلخانه با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۴ ساعت و رطوبت نسبی ۷۰ درصد رشد داده شدند. گلدان‌ها هر هفته دو بار آبیاری گردید (یک بار با آب شیر و یک بار با محلول یک‌دوم هوگلند). بعد از دو هفته که گیاهان به مرحله سه برگ حقیقی رسیدند، ریشه‌های آنها با BABA با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم خاک گلدان تلقیح شد (Jeun et al., 2004). یک روز بعد گیاهان با بیمارگر با روش تلقیح بیمارگر در ساقه طبق روش علیزاده و همکاران تلقیح شدند (Alizadeh et al., 2013). نمونه‌برداری در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر از ساقه گیاهان به منظور بررسی بیان ژن انجام گرفت. بدین منظور در هر مرحله زمانی سه گیاه از هر تیمار انتخاب نمونه‌برداری از محل ساقه انجام گرفت، سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع به سرعت منجمد و در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس تا مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند. این آزمایش با دو تیمار شامل BABA و شاهد با ۴۰ تکرار انجام گرفت. نمونه‌های شاهد با آب تیمار شدند.

در این تحقیق از قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* F42 که از مرکز تحقیقات کشاورزی جیرفت تهیه شد، استفاده گردید.

ارزیابی بیماری

به‌طور روزانه، از نظر بروز علائم بیماری به گیاهان رسیدگی شد. پس از ظهور علائم بیماری، شدت بیماری با دادن رتبه به گیاهان برآورد شد. این سیستم شامل چهار رتبه: صفر برای گیاهان سالم، یک برای گیاهان با علائم تغییر رنگ و پوسیدگی ملایم ساقه، دو برای گیاهان با پوسیدگی شدید ساقه و سه برای گیاهان پژمرده و مرده در نظر گرفته شد. رتبه‌های هر تکرار به درصد شدت بیماری^۱ تبدیل شد. سپس داده‌های

Netherlands) تهیه شدند. آغازگرهای تهیه شده با PCR از نظر تکثیر یک قطعه واحد با cDNA سنتز شده در مراحل قبل آزمایش شدند. آغازگرهای ژنهای *chit1*، بتا-۱ و ۳- گلوکاناز، *pr1* و *lox1* از منابع منتشر شده طبق توالی‌های ارائه شده در جدول ۱ انتخاب شدند (Alizadeh, 2005; Shores et al., 2013; *et al.*). ژنهای *EF1a* و *CACS* با آغازگرهایی با توالی ارائه شده در جدول ۱ به عنوان ژنهای مرجع برای خیار انتخاب شدند (Migocka, 2010; Wan et al., 2011; *et al.*). مخلوط واکنش PCR شامل: دو میکرولیتر نمونه cDNA (حدود ۰/۰۴ میکروگرم)، هشت میکرولیتر از مخلوط آغازگر مستقیم و معکوس (غلظت آغازگر یک پیکومول) و ۱۰ میکرولیتر از سایبرگرین میکس (AB Applied Biosystems, Foster, CA) مجموعاً ۲۰ میکرولیتر بود. بعد از اضافه کردن مخلوط فوق به پلیت ۹۶ خانه، با درپوش مخصوص حفره‌ها پوشیده و سپس به مدت یک دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتیفریوژ شد. عملیات Quantitative real time PCR در دستگاه GeneAmp 7900HT Sequence Detection System (AB Applied Biosystems) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه برای واسرشت اولیه و به دنبال آن چهل چرخه با ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشته شدن و ۶۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه برای چسبیدن آغازگرها و بسط رشته، انجام گردید. داده‌های حاصل از QPCR به نرم‌افزار مربوطه (Sequence Detection System Applied biosystems) منتقل و از نظر صحت انجام چرخه‌ها بررسی شدند و سپس برای تجزیه به نرم‌افزار EXCEL منتقل شدند. کمی‌یابی بیان ژن‌های تحت مطالعه نسبت به ژن رفرنس طبق روش پفافل و با استفاده از دو ژن رفرنس و در نظر گرفتن کارایی آغازگرها انجام گرفت (Pfaffl, 2001). میانگین سطوح عوامل مختلف پس از تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون توکی مقایسه شدند ($P < 0.05$).

معکوس 5'-TTTGAGGTAGGAAGTGTAGT-3' که یک اینترون را در ژن HSP70 خیار تکثیر می‌کند، انجام گرفت (Wan et al., 2010). محلول واکنش PCR شامل: یک میکرولیتر آغازگر مستقیم، یک میکرولیتر آغازگر معکوس (غلظت ۱۰ پیکومول)، دو میکرولیتر بافر، ۱۲ میکرولیتر آب مقطر Milli-Q، یک میکرولیتر از نمونه و یک واحد آنزیم تک‌پلیمرز و برنامه دمایی شامل: ۹۵ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه و سپس ۳۵ چرخه با ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشته‌سازی، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه برای چسبیدن آغازگرها، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه برای بسط رشته و در پایان شش دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس برای بسط نهایی چرخه‌ها انجام گرفت. در آخر محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد جهت مشاهده باندهای احتمالی در صورت آلودگی الکتروفورز گردید.

یک میکروگرم RNA عاری از DNA را به لوله عاری از RNases منتقل و به آن یک میکرولیتر آغازگر Oligo dT (Invitrogen, Breda, the Netherlands) صد پیکومول در میکرولیتر اضافه و به مدت پنج دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. نمونه‌ها بلافاصله در یخ گذاشته شدند. چهار میکرولیتر بافر (Fermentas, 5X RT buffer) دو میکرولیتر از dNTPs ده میلی‌مول و یک میکرولیتر آنزیم Reverse Transcriptase, Fermentas (EP0452/EP0451) اضافه و به ملایمت مخلوط شد. لوله‌ها سپس به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سلسیوس، ۱۵ دقیقه در ۵۰ درجه سلسیوس و آخر ۱۵ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. در پایان cDNA حاصل در منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد.

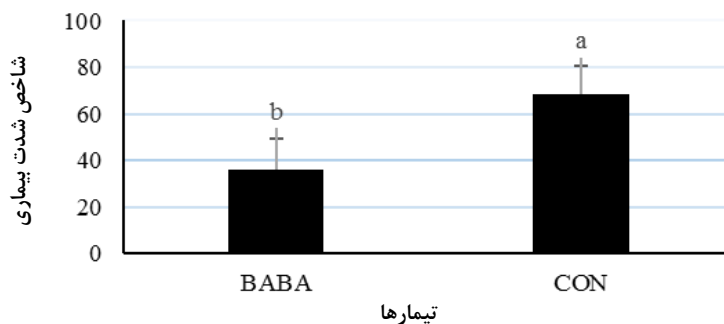
انجام Quantitative real time PCR

آغازگرهای مورد نیاز از شرکت (Biolegio, the

جدول ۱. آغازگرهای به کاررفته برای تعیین بیان کمی ژن‌های دفاعی در ساقه‌های خیار با روش Real Time PCR

ژن (Gene)	توالی مستقیم (Forward)	توالی معکوس (Reverse)
<i>EF1a</i>	5'-CTGTGCTGTCCTCATTATTG-3'	5'-AGGGTGAAAGCAAGAAGAGC-3'
<i>CACS</i>	5'-TGGGAAGATCTTATGAAGTGC-3'	5'-CTCGTCAAATTTACACATTGGT-3'
<i>pr1</i>	5'-TGCTCAAC AATATGCGAAC-3'	5'-TCATCCACCCACAAC-3'
<i>lox1</i>	5'-CTCTGGGTGGTGGTGTTC-3'	5'-TGTTGGGATTGAAGTTAGCC-3'
<i>β-1,3-glucanase</i>	5'-CAATTATCAAAACTGTTCGATGC-3'	5'-AACCGGTCTCGGATACAACAAC-3'
<i>chit1</i>	5'-TGGTCACTGCAACCCTGACA-3'	5'-AGTGGCCTGGAATCCGACT-3'

ناشی از اثر این ترکیب بر فیزیولوژی گیاه از طریق القای مقاومت است. برای بررسی تأثیر این ترکیب بر القای مقاومت بیان ژن‌های مسیر مقاومت در گیاه تحت بررسی قرار گرفت. نتایج کاهش بیماری از طریق القای مقاومت با نتایج به‌دست آمده توسط Chamsai *et al.* (2004) دربارهٔ پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی مطابقت دارد. این نتایج بیانگر پتانسیل زیاد BABA برای مدیریت بیماری پوسیدگی ریشه و ساقهٔ خیار بوده که از عوامل محدودکنندهٔ کشت خیار در گلخانه‌های مناطق مختلف ایران است و کنترل آن به محدودیت‌های مواجهه است.



شکل ۱. تأثیر BABA در کنترل بیماری ناشی از *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* F42 در گیاهان خیار. نشاهای خیار در خاک استریل رشد داده شد و پس از دو هفته ریشه‌ها با BABA تیمار شدند و یک روز بعد ساقهٔ نشاها با بیمارگر تلقیح شد. ارزیابی بیماری با رتبه دادن به تیمارها و سپس تبدیل رتبه‌ها به درصد انجام گرفت. میانگین درصد وقوع بیماری در تیمارهای مختلف پس از تجزیهٔ واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون توکی مقایسه شدند ($P < 0.05$). ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند از نظر آماری با هم اختلاف معنادار ندارند.

به‌ترتیب ۱، ۳/۵، ۱۶/۷۵ و ۲۰/۶۷ بود که بیانگر افزایش کمی در بیان این ژن در تیمار شاهد است. از نظر آماری در سطح پنج درصد زمان صفر و ۴۸ ساعت اختلاف معناداری نداشتند ولی زمان ۷۲ و ۹۶ ساعت در یک گروه قرار گرفته و با زمان صفر و ۴۸ ساعت اختلاف معنادار نشان دادند. در تیمار BABA بیان این ژن در زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌ترتیب برابر با ۰/۸۳، ۹/۵۷، ۳۲/۹۹ و ۴۹/۹۶ بود که بیانگر افزایش شدید بیان این ژن نسبت به شاهد است. از نظر آماری در سطح پنج درصد چهار زمان با هم اختلاف معنادار نشان دادند و در چهار گروه قرار گرفتند. بیان این ژن در زمان صفر در تیمار شاهد و BABA اختلاف معناداری نشان نداد که بیانگر این است که قبل از تلقیح با بیمارگر BABA تغییری در بیان این ژن ایجاد نمی‌کند

نتایج و بحث

کاهش بیماری ناشی از القای مقاومت

ارزیابی بیماری چهار هفته پس از تلقیح با بیمارگر انجام گرفت. شاخص شدت بیماری محاسبه شد. شاخص شدت بیماری برای تیمار کنترل ۶۸/۵۵ درصد و برای BABA برابر با ۳۵/۸۱ درصد محاسبه گردید. از نظر آماری طبق نتایج به‌دست آمده BABA به‌طور معناداری باعث کاهش بیماری نسبت به شاهد شد (شکل ۱). چون بیمارگر به ساقه و BABA به ریشه‌ها تلقیح شده بود، لذا کاهش بیماری ناشی از اثر مستقیم این ترکیب بر بیمارگر نیست و

تغییرات بیان ژن‌های دفاعی

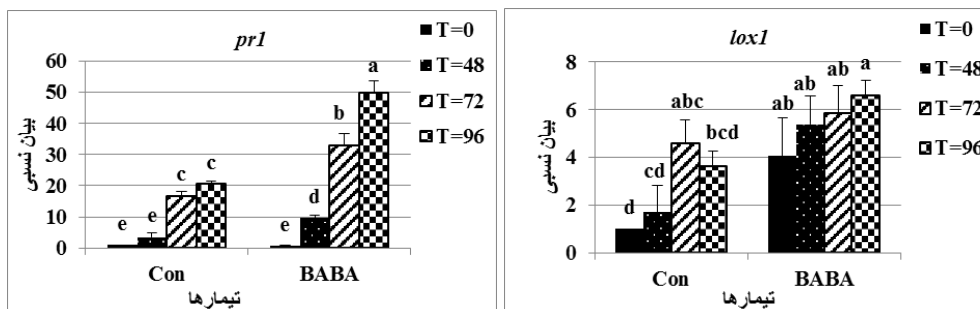
روند تغییر بیان ژن‌های دفاعی *pr1*، *lox1*، *3-β-1*، *glucanase* و *chit1* در زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر با روش QPCR برای بررسی تغییرات در سیستم ایمنی گیاه توسط BABA ارزیابی شد.

ژن *pr1* به‌عنوان نشانگر القای مسیر مقاومت وابسته به سالیسیلیک اسید است. با بررسی تغییرات بیان این ژن می‌توان نقش SA را در مقاومت القا شده به‌وسیلهٔ عوامل مختلف تفسیر کرد (Pape *et al.*, 2010; Ward *et al.*, 1991). به منظور تعیین نقش SA در مقاومت القا شده به‌وسیلهٔ BABA در این تحقیق بیان این ژن ارزیابی شد. بیان ژن *pr1* در تیمار شاهد در زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر

داشت. بیان ژن *lox1* در تیمار شاهد به ترتیب برای زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ برابر با ۱، ۱/۷، ۴/۶ و ۳/۶ بود که بیانگر افزایش بیان این ژن تا زمان ۷۲ و سپس کاهش بیان در زمان ۹۶ بود. از نظر آماری فقط زمان ۷۲ با زمان صفر اختلاف نشان داد. بیان این ژن در زمان‌های صفر، ۴۸ و ۹۶ ساعت اختلاف معناداری نداشت. بیان ژن *lox1* در تیمار BABA برای زمان‌های اندازه‌گیری شده به ترتیب ۴/۰۹، ۵/۳۹، ۵/۸۵ و ۶/۵۹ بود. از نظر آماری بیان این ژن اختلاف معناداری در زمان‌های مختلف نشان نداد (شکل ۲). این نتایج بیانگر القای مقاومت غیروابسته به جاسمونیک اسید در این ترکیب بیمارگر و گیاه به وسیله BABA است. با توجه به افزایش بیان *pr1* و اثبات مقاومت وابسته به SA و همچنین حالت آنتاگونیستی مسیر SA و JA انتظار می‌رفت که بیان *lox1* افزایشی از خود نشان ندهد (Van der Does, 2012).

اما بیان این ژن را به حالت آماده باش^۱ درمی‌آورد که به محض تلقیح بیمارگر افزایش سریعی نشان دهد (شکل ۲). افزایش بیان این ژن در تیمار BABA بیانگر القای مقاومت وابسته به سالیسیلیک اسید توسط این ترکیب در گیاه خیار علیه این بیمارگر است. این نتایج با نتایج محققانی که القای مقاومت ناشی از BABA را وابسته به SA دانستند، مطابقت دارد (Hwang et al., 1997; Siegrist et al., 2000).

اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز JA لیپوکسیژناز (LOX) است. لیپوکسیژناز باعث تبدیل لینولتیک و لینولتیک اسید به JA می‌شود. نقش LOX پاسخ‌دهی به بسیاری از استرس‌های زنده و غیرزنده در گیاهان گزارش شده است (Melan et al., 1993; Shores et al., 2005). بررسی تغییرات بیان این ژن می‌توان تفسیری از نقش JA در مقاومت القا شده در گیاهان در اثر تیمارهای مختلف

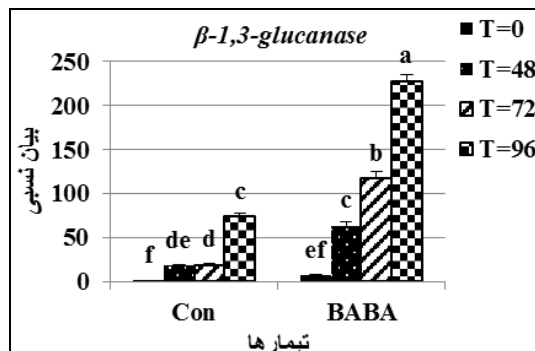
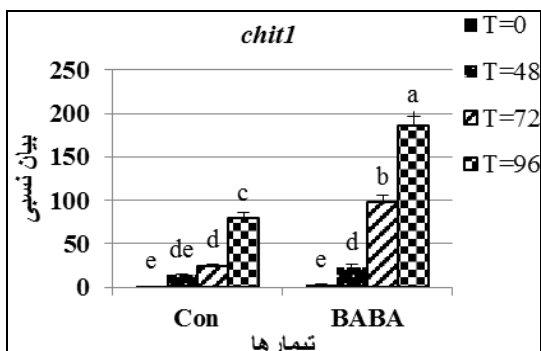


شکل ۲. تغییرات بیان ژن‌های *lox1* و *pr1* در ساقه‌های گیاهان خیار تیمار شده با BABA در زمان‌های مختلف صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* F42. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف انجام گرفت و میانگین بیان نسبی ژن در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون توکی مقایسه شدند ($P < 0.05$). ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند از نظر آماری با هم اختلاف معنادار ندارند.

ژن افزایش پیدا کرد. در تیمار BABA میزان بیان این ژن در زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ برابر با ۱، ۶/۹۲، ۶۳/۵۱، ۱۱۷/۰۴ و ۲۲۷/۸۰ اندازه‌گیری گردید که بیانگر افزایش شدید بیان این ژن در این تیمار است. از نظر آماری در زمان صفر اختلاف معناداری بیان این ژن با شاهد نشان نداد، که بیانگر نقش BABA در حالت آماده باش این ژن است. بیان این ژن در زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت باهم اختلاف معنادار داشتند و در چهار گروه مجزا قرار گرفتند (شکل ۳).

بتا-۱ و ۳ گلوکاناز (یکی از اعضای خانواده PR2) در تجزیه دیواره سلول قارچ‌ها نقش داشته و بعد از حمله بیمارگر در گیاه القا شده و باعث هیدرولیز کردن بتاگلوکان که یکی از اجزای اصلی دیواره سلول قارچی است، می‌شود. این ژن نقش مهمی را در دفاع از گیاه بازی می‌کند (Doxey et al., 2007). بیان ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز در تیمار شاهد در زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر برابر با ۱، ۱۸/۲۳، ۱۸/۸۶ و ۷۴/۰۹ بود. از نظر آماری اختلاف معناداری بین زمان‌های صفر، ۴۸ و ۷۲ ساعت دیده نشد. زمان ۹۶ ساعت با دیگر زمان‌ها اختلاف معنادار داشت و بیان این

۲۴/۸۸ و ۷۹/۶۵ بود. از نظر آماری اختلاف معناداری بین زمان‌های صفر، ۴۸ ساعت دیده نشد. زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت در یک گروه قرار گرفتند و زمان ۹۶ ساعت با دیگر زمان‌ها اختلاف معنادار داشت و بیان این ژن افزایش بیشتری پیدا کرد. در تیمار BABA میزان بیان این ژن در زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ برابر با ۲/۵۵، ۲۲/۹۲، ۹۸/۴۳ و ۱۸۵/۶۹ اندازه‌گیری گردید که بیانگر افزایش شدید بیان این ژن در این تیمار است. از نظر آماری در زمان صفر اختلاف معناداری بیان این ژن با شاهد نشان نداد، بیان این ژن در زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با هم اختلاف معنادار داشتند و در چهار گروه مجزا قرار گرفتند (شکل ۳).



شکل ۳. تغییرات بیان ژن‌های *chit1* و β -1,3- glucanase در ساقه‌های گیاهان خیار تیمار شده با BABA در زمان‌های مختلف صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* F42. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف انجام گرفت و میانگین بیان نسبی ژن در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون توکی مقایسه شدند ($P < 0.05$). ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند از نظر آماری با هم اختلاف معنادار ندارند.

BABA همانند ریزوباکتری‌ها از طریق ایجاد حالت آماده‌باش در گیاه القای مقاومت می‌کند که قبل از حمله بیمارگر به دلیل افزایش نداشتن بیان ژن‌های دفاعی هزینه‌ای برای گیاه ندارد. این یکی از مهم‌ترین ارجحیت‌های BABA بر دیگر ترکیبات شیمیایی القاکننده مقاومت است. نتایج برخی تحقیقات محققان دیگر هم ایجاد حالت آماده‌باش در گیاه را توسط این ترکیب نشان داده است (Altamiranda et al., 2008; Cohen et al., 2010; Marcucci et al., 2010; Ton et al., 2005).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که BABA قادر به القای مقاومت مؤثر علیه بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار

کیتین بعد از سلولز فراوان‌ترین پلیمر در طبیعت بوده، همچنین ترکیب ساختمانی اصلی در قارچ‌های رشته‌ای است. کیتین به عنوان ستون فقرات دیواره سلولی غالب قارچ‌های بیمارگر گیاهی است. در دیواره سلولی قارچ‌ها کیتین به صورت لایه‌هایی مرتب شده و بین این لایه‌ها بتا-۱ و ۳-گلوکان به عنوان مواد پرکننده به صورت الگوی بی‌شکلی وجود دارد (Seidl, 2008). کیتینازها از آنزیم‌های مهم گیاهی‌اند که در تجزیه کیتین دیواره سلولی قارچ‌های بیمارگر نقش مهمی دارند (Sahai et al., 1993) و متعلق به خانواده PR3 از پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی‌اند. بیان ژن *Chit1* در تیمار شاهد در زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر برابر با ۱، ۱۳/۸۶،

این نتایج با یافته‌های Hwang et al. (1997) که مقاومت علیه *Phytophthora capsici* و افزایش بیان این ژن‌ها را در گیاهان فلفل تیمار شده با BABA گزارش کردند. نتایج Cohen et al. (2010) درباره اثر BABA در کاهش بیماری سفید داخلی کاهو و تجمع PR پروتئین‌ها و نتایج تحقیقات مارکوکسی و همکاران درباره تیمار کنگر فرنگی با BABA و مقاومت حاصله و افزایش بیان کیتیناز، پراکسیداز و بتا-۱ و ۳-گلوکاناز علیه *Sclerotinia sclerotiorum* (Marcucci et al., 2010) مطابقت دارد.

در این پژوهش بیان ژن‌های بتا-۱ و ۳-گلوکاناز و کیتیناز در اثر تیمار با BABA به حالت آماده‌باش درآمد و پس از تلقیح با بیمارگر افزایش سریعی در بیان این ژن‌ها نسبت به شاهد مشاهده شد که بیانگر این مهم است که

الفاکنندگی مقاومت نیستند. بررسی بیان ژن‌های مسیره‌های پیام‌دهی و دفاعی گیاه نیز بیانگر القای مسیر مقاومت وابسته به سالیسیلیک اسید همراه با ایجاد حالت آماده‌باش در بیان ژن‌های دفاعی است. که این مسیر مقاومت مؤثر علیه طیف‌وسعی از بیمارگرها بوده و ایجاد حالت آماده‌باش در گیاه نیز منجر به کاهش هزینه‌های دفاعی گیاه خواهد شد.

ناشی از قارچ فوزاریوم است. لذا این ترکیب می‌تواند جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌هایی باشد که اثرات مخرب زیست‌محیطی دارند. از طرف دیگر، ارجحیت این ترکیبات بر ریزوباکتری‌ها پایداری اثر آنها در شرایط مختلف محیطی است، چرا که باکتری‌ها و دیگر عوامل زنده‌الفاکننده مقاومت در برخی شرایط قادر به بقا و اعمال اثر

REFERENCES

- Alizadeh, H., Behboudi, K., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Zamioudis, C., Pieterse, C.M.J. & Bakker, P.A.H.M. (2013). Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control*, 65, 14-23.
- Altamiranda, E.A.G., Andreu, A.B., Daleo, G.R. & Olivieri, F.P. (2008). Effect of β -aminobutyric acid (BABA) on protection against *Phytophthora infestans* throughout the potato crop cycle. *Australasian Plant Pathology*, 37, 421-427.
- Baysal, Ö., Gürsoy, Y.Z., Örnek, H. & Duru, A. (2005). Induction of oxidants in tomato leaves treated with DL- β -Amino butyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *European Journal of Plant Pathology*, 112, 361-369.
- Chamsai, J., Siegrist, J. & Buchenauer, H. (2004). Mode of action of the resistance-inducing 3-aminobutyric acid in tomato roots against Fusarium wilt. *Journal Plant Disease Protection* 111, 273-291.
- Cohen, Y. (1994). 3-Aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 4, 273-288.
- Cohen, Y. (2001). The BABA story of induced resistance. *Phytoparasitica* 29, 375-378.
- Cohen, Y., Niderman, T., Mosinger, E. & Fluhr, R. (1994). [β]-Aminobutyric Acid Induces the Accumulation of Pathogenesis-Related Proteins in Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Plants and Resistance to Late Blight Infection Caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*, 104, 59-66.
- Cohen, Y., Rubin, A. & Kilfin, G. (2010). Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL- β -amino-butyric acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology* 126, 553-573.
- Conrath, U., Beckers, G.J., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L. & Mauch-Mani, B. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 1062-1071.
- Doxey, A.C., Yaish, M.W., Moffatt, B.A., Griffith, M. & McConkey, B.J. (2007). Functional divergence in the *Arabidopsis* beta-1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1045-1055.
- Hamiduzzaman, M.M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J.M. & Mauch-Mani, B. (2005). beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 18, 819-829.
- Hwang, B.K., Sunwoo, J.Y., Kim, Y.J. & Kim, B.S. (1997). Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51, 305-322.
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J.P. & Mauch-Mani, B. (2001). β -Aminobutyric Acid-induced Resistance in Plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 29-37.
- Jeun, Y.C., Park, K.S., Kim, C.H., Fowler, W.D. & Kloepper, J.W. (2004). Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control*, 29, 34-42.
- Justyna, P.G. & Ewa, K. (2013). Induction of resistance against pathogens by β -aminobutyric acid. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1735-1748.
- Marcucci, E., Aleandri, M.P., Chilosi, G. & Magro, P. (2010). Induced Resistance by β -Aminobutyric Acid in Artichoke against White Mould Caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Phytopathology*, 158, 659-667.
- Melan, M.A., Dong, X., Endara, M.E., Davis, K.R., Ausubel, F.M. & Peterman, T.K. (1993). An *Arabidopsis thaliana* Lipoxygenase Gene Can Be Induced by Pathogens, Abscisic Acid, and Methyl Jasmonate. *Plant Physiology*, 101, 441-450.
- Migocka, M. & Papierniak, A. (2011). Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Molecular Breeding*, 28, 343-357.
- Pape, S., Thurow, C. & Gatz, C. (2010). The *Arabidopsis* PR-1 promoter contains multiple integration sites for the coactivator NPR1 and the repressor SNI1. *Plant Physiology*, 154, 1805-1818.

20. Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, e45.
21. Ramirez, V., Van der Ent, S., Garcia-Andrade, J., Coego, A., Pieterse C. M. & Vera, P. (2010). OCP3 is an important modulator of NPR1-mediated jasmonic acid-dependent induced defenses in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 10, 199.
22. Sahai, A.S. & Manocha, M.S. (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews*, 11, 317-338.
23. Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*, 22, 36-42.
24. Shores, M., Yedidia, I. & Chet, I. (2005). Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95, 76-84.
25. Siegrist, J., Orober, M. & Buchenauer, H. (2000). β -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56, 95-106.
26. Ton, J., Jakab, G., Toquin, V., Flors, V., Iavicoli, A., Maeder, M.N., Metraux, J.P. & Mauch-Mani, B. (2005). Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17, 987-999.
27. Ton, J. & Mauch-Mani, B. (2004). Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal*, 38, 119-130.
28. Van der Does, D. (2012). Hormonal crosstalk in plant immunity. Ph. D. dissertation. Utrecht University, the Netherlands.
29. Wan, H., Zhao, Z., Qian, C., Sui, Y., Malik, A.A. & Chen, J. (2010). Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Analytical Biochemistry*, 399, 257-261.
30. Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P. & Ryals, J.A. (1991). Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell Online*, 3, 1085-1094.
31. Zimmerli, L., Jakab, G., Metraux, J.P. & Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta -aminobutyric acid. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 97, 12920-12925.