Applied Entomology and Phytopathology
Vol. 88, No. 2, March 2021
DOI: 10.22092/jaep.2020.342199.1332

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۸، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

القأ مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی از طریق افزایش در تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی با استفاده از متیل جاسمونات

سید کاظم صباغ[۱]✉، مسعود گلستانی[۲]، بنیامین کاظم‌پور[۳]، محمدرضا سرافراز اردکانی[٤]، مرضیه طاهری[٥]

۱ ،٤و٥- به‌ترتیب دانشیار، استادیار و کارشناس آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه یزد، یزد، ایران؛ ۲- استادیار دانشگاه پیام نور یزد، یزد، ایران؛۳- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی دانشکده منابع طبیعی یزد، یزد، ایران

(تاریخ دریافت مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۹)

چکیده

در این تحقیق امکان القای مقاومت سیستمیک به بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersisi* با استفاده از متیل جاسمونات در دو رقم گوجه‌فرنگی ترمه و کاپیتان بررسی شد. نهال‌های گوجه فرنگی با سه غلظت ۰/۲، ۰/۱ و صفر در مرحله ۲-٤ برگی با روش اسپری دستی تیمار و در مرحله ٦ برگی با استفاده از عامل بیمارگر، بیماری‌زایی صورت گرفت. سطح بیان سه ژن *npr1*، *pds* و *eds1*، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و میزان فنل کل به‌ترتیب با استفاده از روش بررسی بیان ژن در زمان واقعی و طیف سنجی انجام گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم ها در ارقام و بازه‌های زمانی متغییر می‌باشد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم ها در رقم ترمه تحت تنش بیماری مشاهده شد. بیشترین و کمترین سطح بیان به‌ترتیب برای ژن‌های *npr1* و *pds* اتفاق افتاد. نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که متیل جاسمونات قادر به القا مقاومت در گوجه فرنگی بر علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی از طریق تغییر در فعالیت‌های بیوشیمیایی و مولکولی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، فاکتورهای نسخه برداری، متیل جاسمونات، مقاومت اکتسابی

Induced resistance againt Fusarium tomato wilting disease throught increase of antioxidant enzymes and pathogenesis–related genes using methyl jasmonat

S. K. SABBAGH[1]✉, M. GOLESTANI[2], B. KAZEMPOUR[3], M. R. SARAFRAZ[4], M. TAHERI[5]

1, 4 and 5. Associate, Assistance prof. and laboratory expert, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran; 2. Department of Agriculture, Peyam-Noor University of Yazd, Yazd, Iran; 3. Former MSc student, Department of Biotechnology, Faculty of Natural Resources, Yazd University, Yazd, Iran.

Abstract

In this research, possibility of induced systemic resistance in tow tomato cultivars Termeh and Capitan was assayed by exogenous application of methyl jasmonat (MeJA). Tomato plants were treated with methyl jasmonat at concentration of 0, 0.1 and 0.2 mM by spraying at 2-4 leaf stage and then were inoculated with pathogen agent at 6- leaf stages. Gene expression level of *npr1*, *pds* and eds1 genes and catalase, peroxidase, polyphenol oxidase activity and total phenol continent was investigated using qRT-PCR and spectrophotometery methods, repectively. The results of this research showed that enzyme activity was variable in tested cultivars and interval times after inoculation. The highest enzyme activity was observed in Termeh cultivar under disease stress. The highest and lowest expression level was occured in *npr1* and *pds* genes, respectively. These results indicated that methyl jasmonat is able to iduces resistance in tomato against wilting disease throught change on bio-chemical and molecular activities.

Keyword: Acquired resistance, gene expression, methyl jasmonat, transcription factors

✉ **sksabbagh@yazd.ac.ir**

مقدمه

گوجه‌فرنگی چهارمین سبزی از نظر محبوبیت در میان سبزیجات مورد استفاده در زنجیره غذایی با میزان بالای مصرف می‌باشد. با توجه به لزوم فراهم بودن شرایط رطوبتی نسبتاً بالا برای رشد این محصول بویژه در شرایط گلخانه، گوجه‌فرنگی همواره مورد هجوم بیماری‌های مختلفی قرار می‌گیرد که در این میان بیماری‌های قارچی یک از مهمترین عوامل مخرّب و محدودکننده تولید این محصول در ایران و دنیا به‌حساب می‌آیند. بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* یکی از عوامل بیماری‌زا و محدود کننده تولید این محصول می‌باشد. علائم بیماری شامل پژمردگی، رشد کم، زردی برگ‌های پایینی، قهوه‌ای شدن آوندها و در نهایت خشک شدن بوته می‌باشد. گسترش عامل بیماری در خاک‌های مرطوب و دمای مناسب رشد قارچ بیمارگر و همچنین در زمان کمبود عناصر نیتروژن، فسفر و کلسیم صورت می‌پذیرد (Walter *et al*, 2007). کنترل بیماری‌های خاکزاد اغلب از طریق ضد عفونی خاک با استفاده از سموم شیمیایی تدخینی و یا کاشت ارقام مقاوم کنترل می‌شود. پیدایش نژادهای جدید گونه قارچی از *F. oxysporum* باعث از بین رفتن مقاومت ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی به‌بیماری می‌شود (Lecomte *et al.*, 2016). با توجه به‌مشکلات ناشی از مصرف سموم برای انسان و محیط زیست و احتمال پیدایش نژادهای مقاوم قارچ عامل بیماری، کنترل بیولوژیک و یا حتی تلفیقی بیماری، مورد توجه قرار گرفته است. القاء مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) یک واکنش مقاومت ثانویه است که بعد از وقوع یک واکنش فوق حساسیت در برابر بیمارگرها، در گیاه القاء می‌شود (Jaiti *et al.*, 2009). استفاده از مواد شیمیایی القاء کننده مقاومت از جمله اسید سالیسیلیک و جاسمونات‌ها سبب فعال‌سازی مکانیزم‌های دفاع طبیعی گیاه می‌شوند. این مواد فاقد اثرات مخرب زیست محیطی بوده که از طریق مکانسیم‌های مختلفی مانند روش مستعد سازی (Priming) و غیره باعث افزایش مقاومت در گیاه می‌شوند (Smith *et al.*, 2009). بررسی نقش متیل جاسمونات در افزایش بیان تعدادی از ژن‌های مسئول مقاومت نشان داده است که کاربرد خارجی متیل جاسمونات به‌صورت برگ‌پاش باعث افزایش میزان ژن‌های مقاومتی در تعدادی از گیاهان می‌شود ولی نقش آن در بیان ژن‌های مسئول فاکتورهای نسخه برداری کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. ژن *npr1* (None-expresser pathogenesis resistance gene 1) در پایین دست مسیر سنتز اسید سالیسیلیک قرار گرفته که تجمع آن در موقع حمله بیمارگر باعث تحریک و افزایش تولید فاکتورهای نسخه برداری نظیر WRKY و TAGs می‌شود. مونومرهای آزاد شده *npr1* به‌سمت هسته حرکت می‌کنند و در آنجا به‌صورت مستقیم و یا غیر مستقیم با فاکتورهای رونویسی TGA واکنش می‌دهند و باعث تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌شوند. (Schluttenhofer, *et al.*, 2014). مشخص شده است که این فاکتور نسخه برداری WRKY باعث افزایش فعالیت ژن‌های مسئول مقاومت در گیاهان می‌شوند (Panday *et al.*,, 2009). در مسیر پیام رسانی مکانیسم‌های مقاومتی، ژن‌هایی مثل *eds1* و *pds* در پایین دست ژن‌های *R* ولی در بالادست مسیر علامتدهی قرار می‌گیرند (Wiermer, 2005). ژن *pds* در گوجه‌فرنگی باعث تولید آنزیم فیتون واسرشت ساز می‌شود که این آنزیم در مسیر سنتز کارتنوئیدها نقش اساسی بر عهده دارد (Lois *et al.*, 2000). خاموشی این ژن باعث کاهش میزان تولید کارتنوئیدها شده و منجر به زردی میوه می‌شود به‌طوری که افزایش این ترکیبات در میوه‌های در حال رسیدن به‌میزان ۱۰برابر افزایش یافته است (Orzaez *et al.*, 2006). با توجه به تحقیقات بسیار اندک در ارتباط با ارتباط مسیرهای مقاومتی بین متیل جاسمونات و ژن‌های مؤثر در فعال‌سازی فاکتورهای نسخه برداری نظیر *npr1*، *pds* و *eds1* که نقش غیر مستقیم در تولید پروتئین‌های مرتبط با مقاومت و در نتیجه ایجاد مقاومت القایی و اکتسابی در گیاهان دارند، در این تحقیق تأثیر متیل جاسمونات در تغییراتی مقاومتی در دو رقم گوجه‌فرنگی ترمه و کاپیتان به‌بیماری پژمردگی فوزاریومی

از طریق آنالیز بیان ژن‌های فوق و همچنین اندازه‌گیری تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در گلخانه از دو رقم پرمصرف ترمه (شرکت زرین دان جنوب) و رقم کاپیتان (شرکت یوکسل ترکیه) استفاده شد. در ابتدا بذرها به‌وسیله کلرامین T (۱ درصد) به‌مدت ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سه مرتبه با آب مقطرسترون شستشو داده شدند. تعداد ۱ عدد نشاء در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک پیت ماس و کوکوپیت سترون تهیه شد. آبیاری گلدان‌ها به‌صورت قطره‌ای انجام شد. در این تحقیق از فاکتورهای غلظت هورمون در سه سطح و دو رقم ترمه و کاپیتان با یک سطح بیماری استفاده شد.

تهیه محلول متیل جاسمونات و زاددمایه قارچ

در این تحقیق از هورمون متیل جاسمونات با سه غلظت صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی مولار (۲۵ و ۵۰ میلی گرم) با استفاده از اسپری وسیله افشانه دستی استفاده شد. اسپری هورمون در دو غلظت فوق، به‌صورت دو بار در هفته تا مرحله ٤ برگی و تا قبل از افزودن زادمایه در هنگام صبح انجام گردید (Talaat *et al.*, 2015). جدایه استاندارد قارچ *Fusarium oxeporium* fsp. *lycopersici* از بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان یزد تهیه شد. جهت تهیه زادمایه از بذر گندم خیسانده شده استفاده شد. آلوده سازی در مرحله ٤ برگی با ایجاد چند خراش در ناحیه اتصال ریشه به‌طوقه، با استفاده از سه عدد دانه گندم آغشته به پرگنه تازه قارچ انجام گردید. در بازه‌های زمانی ٤٨ و ٧٢ ساعت بعد از بیماری نمونه برداری از برگ گیاهان شاهد و تیمار جهت بررسی آنزیمی و بیان ژن انجام گردید. نمونه‌ها تا شروع آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

اندازه‌گیری فنل کل

جهت اندازه‌گیری فنل کل در ابتدا، یک گرم از بافت گیاهی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد درهاون چینی خرد و هموژنیزه شده و سپس عصاره حاصل، از پارچه ململ دو لایه عبور و در ظرف سترون ریخته شد. باقی‌مانده مواد در روی پارچه دو بار و هر بار با ۳ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد شسته و به‌عصاره داخل ظرف اضافه شد. عصاره صاف شده به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس رسوب حاصل حذف و از محلول رویی برای اندازه گیری فنل استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان فنل کل از محلول فولین استفاده شد. مقدار جذب تغییرات نوری با طول موج ۷۲۵ نانومتر و با استفاده از دستگاه طیف سنج (Analytica Jena 1500S, Germany) قرائت گردید و مقدار فنل کل برحسب میکروگرم در یک گرم برگ تازه محاسبه شد.

سنجش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در ابتدا مقدار دو گرم از بافت گیاهی در هاون چینی سرد با ازت مایع پودر شد و سپس با محلول عصاره‌گیری شامل۱٦۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH= ٦/٨)، ۲۰ میکرولیتر EDTA (۰/۱ مولار) و ۳۸۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط و هموژنیزه شده و به‌مدت ۲۵ دقیقه در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه در ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ از فاز بالایی عصاره، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد. (Gong *et al.*, 2001). فعالیت آنزیم کاتالاز در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه و بر حسب با طول مج ۲٤۰ نانومتر با معرف پراکسید هیدروژن اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه در واحد گرم وزن تر گیاه محاسبه شد (Soares *et al.*, 2010). جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، یک میلی‌لیتر معرف پیروگالول (۰/۰۲ مولار) استفاده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه طیف سنج در طول موج ٤۲۰ نانومتر در بازهای زمانی ٦۰ و ۱۲۰ ثانیه اندازه‌گیری شد (Taranto *et al.*, 2017). سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از کمپلکس واکنشی شامل بافرفسفات و ۲۵۰ میکرولیترآسکوربات به‌عنوان سوبسترا انجام و جذب واکنش آنزیمی در طول موج ۲۹۰ نانومتر

در زمان شروع و یک دقیقه پس از شروع واکنش قرائت شد. مقدار آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر حسب میکرو مول در دقیقه در میلی گرم از اسکوربات اکسید شده محاسبه شد (Bela *et al.*, 2015).

بررسی تغییرات بیان ژن

جهت ارزیابی میزان بیان ژن‌های مربوط به فاکتورهای نسخه برداری در تیمارهای مختلف و مقایسه آن‌ها با شاهد، از نمونه‌های مربوط به بازه زمانی۷۲ ساعت بعد از بیماری استفاده شد. بدین‌منظور، ۵۰ گرم از برگ‌های گیاه مورد نظر جدا و جهت استخراج RNA در مراحل بعدی استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از کیت کیاژن (Qiagene, Germany) انجام شد. رشته اول cDNA از ملکول‌های mRNA با استفاده از کیت تجاری 2-Steps RT-PCR kit (Vivantis, Cinngene) ساخته شد. آغازگرهای مورد استفاده برای qRT-PCR توسط نرم افزار آنلاین Primer3 (http://Fokker.wiPrimer3.mit.deu/primer3/input.htm) طراحی و توسط شرکت سیناژن ساخته شد (جدول ۱). واکنش qRT-PCR در حجم ۲۰ میکرو لیتر شامل ۲ میکرو لیتر cDNA(50 ng/µl)، ۲ میکرو لیتر از مخلوط دو آغازگر (20µM)، ٤ میکرو لیتر از Mastermix (Hot Tag EvaGreen, Cinnagene, Iran) و با استفاده از دستگاه کوربت (HRM3500, Curbet, Australia) با برنامه دمایی ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه و به‌دنبال آن ۳۵ چرخه حرارتی شامل ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی برای هر تیمار انجام شد.

آنالیز آماری

تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 و تحت آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام گرفت و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد و نمودارها توسط نرم افزار Excell رسم شد. آنالیز داده‌های به‌دست آمده برای بررسی بیان ژن به‌روش کمی با روش $\Delta\Delta Ct$ انجام گردید (Pffafi, 2001).

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری تغییرات فعالیت فنل کل و آنزیم‌های مورد بررسی نشان داد که تیمارهای رقم، تنش و هورمون هم به‌صورت انفرادی و هم به‌صورت برهمکنش جمعی هر سه فاکتور در سطح معنی‌داری ۱ و ۵ درصد بر تغییرات شاخص‌های اندازه‌گیری شده تأثیر معنی‌داری داشته است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس تأثیر هر سه فاکتور بر این عوامل فوق در بازه‌های زمانی ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی به‌ترتیب در جدول‌های شماره ۱ و ۲ آورده شده است.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

بررسی میزان فعالیت آنزیم آسکوربات نشان داد که بیشترین میزان آنزیم در رقم حساس کاپیتان با غلظت ۰/۲ مولار اتفاق افتاده است. در بازه زمانی ٤۸ ساعت بعد از آلودگی بیشترین میزان تغییرات افزایشی آنزیم در حالت بیماری و آن هم در رقم کاپیتان مشاهده گردید. در حالی که در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی، بیشترین میزان تغییرات آنزیمی در غلظت ۰/۱ مولار برای رقم کاپیتان ولی در حالت بیماری و غیر بیماری مشاهده شد. (شکل۱). کاربرد هم‌زمان متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و قارچ میکوریز در گیاه گوجه آلوده به‌بیماری پژمردگی نشان داده است که این عوامل با افزایش میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند آسکوربات پراکسیداز منجر به افزایش مقاومت گیاه به‌بیماری شده است (El-Khallal, 2007) که با نتایج این تحقیق در رقم ترمه مطابقت داشته است. همچنین کاربرد این فیتوهورمون می‌تواند با افزایش آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گوجه‌فرنگی آلوده به‌بیماری باکتریایی، باعث افزایش میزان مقاومت گیاه شده است (Vanitha and Umesha, 2008).

بررسی تغییرات آنزیم کاتالاز

باتوجه به‌داده‌های نشان داه شده در شکل۱ مشخص شد که با گذشت زمان بعد از آلودگی میزان انزیم کاتالاز در رقم

کاپیتان در دو حالت بیماری و غیر بیماری افزایش قابل ملاحظه ای داشته است. در غلظت ۰/۲ مولار هورمون بیشترین میزان انزیم مشاهده شد. در غلظت ۰/۱ هورمون تقریباً میزان آنزیم در دو حالت بیماری و غیر بیماری برابر بود. کاهش میزان افزایش این آنزیم می‌تواند ناشی از بازدارندگی فعالیت آن به‌وسیله اسید سالیسیلیک باشد که طی این عمل میزان مولکول‌های پراکسید هیدروژن افزایش و مقاومت گیاه را در برابر تنش بالا می‌برد (Zehra *et al.*, 2017) ولی در ارتباط با متیل جاسمونات چنین مکانیسمی به اثبات نرسیده است. افزایش میزان پراکسید هیدروژن در هنگام وقوع بیماری امری مسلم می‌باشد که افزایش میزان کاتالاز می‌تواند ناشی از بروز چنین حالتی باشد (Babu *et al.*, 2015; Murkowski, 2001; Sullivan, 2015) (شکل ۱).

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

بررسی میزان تغییرات آنزیم پلی فنول اکسیداز نشان می‌دهد که بیشترین میزان افزایش انزیم مربوط به تیمار ۰/۲ میلی مولار هورمون در حالت بیماری می‌باشد. در هر دو بازه زمانی با افزایش میزان غلظت آنزیم، افزایش قابل توجهی در میزان آنزیم مشاهده شد در هر دو رقم، میزان تغییرات تقریباً برابر بود و حضور بیماری باعث تغییر چندانی در روند افزایش آنزیم نشد (شکل ۲). افزایش بالای این آنزیم در رقم ترمه نشان از مقاومت ذاتی این رقم دارد که می‌تواند به‌عنوان یک رقم متحمل به بیماری استفاده شود. در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به *F. oxysporum* fsp. *lycopersic*i نیز افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز نسبت به گیاه شاهد گزارش شده است (He and Wolyn, 2005). مطالعات نشان داده است که در گوجه‌فرنگی آلوده به بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی تیمار شده با قارچ میکوریز، فعالیت پلی فنل اکسیداز در پاسخ دفاعی به قارچ بیمارگر در حضور میکوریز افزایش قابل توجهی نسبت به شاهد داشته است (Luo *et al.*, Ren *et al.*, 20102010). در این تحقیق میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تمام غلظت‌های مورد استفاده در مقایسه با شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت که با نتایج تحقیقات مشابه مطابقت دارد (Sabbagh *et al.*, Sabbagh *et al.*, 2016a; ; Sabbagh *et al.*, 2016b; 2017b 2017a; Sabbagh *et al.*, Sabbagh and Shahoo Valizadeh, 2016).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مربوط به آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و محتوای فنل کل ۴۸ ساعت بعد از آلودگی توسط قارچ *Fusarium Oxyesporum* fsp. *lycopercisi*.

Table 1. Analysis of variance of related traits to Polyphenol oxidase, Catalase, Ascorbat proxidase enzymes and total phenol component 48h after inoculation with *Fusarium oxyesporum* fsp. *lycopercisi*

Source of variation	Freedoom	Catalase	Ascorbat proxidase	Polyphenol oxidase	Total phenol content
Stress	1	262.015**	76260**	23853**	8.309**
Hormone	1	863.334**	76366.26**	3606**	28.752**
Cultivar	1	505.552**	57541.413**	10317٤**	24.396**
Stress×hormone	1	337.672**	3118.320**	9939.78**	9.418**
Stress×cultivar	1	276.001**	27594.566**	3597.23**	4.877*
Cultivar ×hormone	1	1203.584**	180344.528**	402.67**	3.610*
Cultivar ×stress× hormone	1	1236.698**	30375.552**	23075.23**	14.875**
Error	24	0.017	0.02	0.02	0.002

*, ** and ^{ns} are respectively significant level at 5%, 1% and no significant difference.

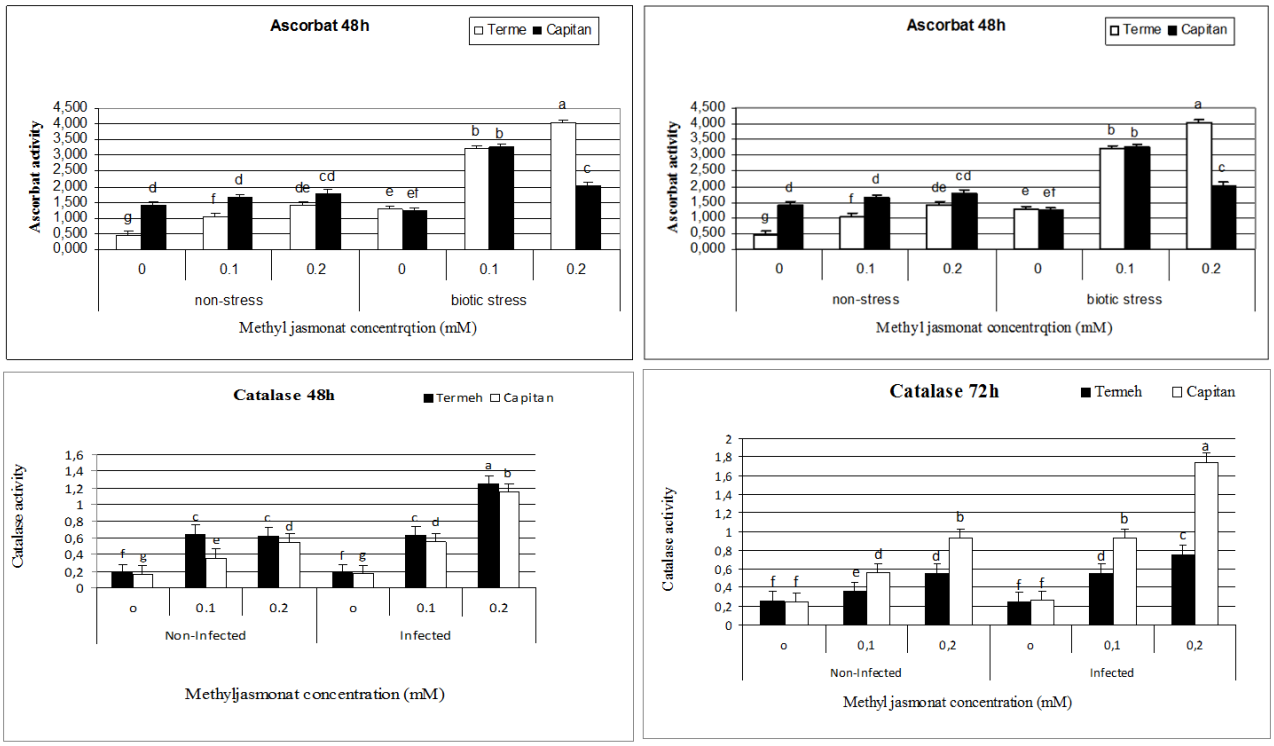
جدول۲- تجزیه واریانس صفات مربوط به فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و محتوای فنل کل ۷۲ ساعت بعد از آلودگی توسط قارچ *Fusarium oxyesporum* fsp. *lycopercisi*.

Table2. Analysis of variance of related traits to Polyphenol oxidase, Catalase, Ascorbat proxidase enzymes and total phenol component 72h after inoculation with *Fusarium oxyesporum* fsp. *lycopercisi*

Source of variation	Freedoom	Catalase	Ascorbat proxidase	Polyphenol oxidase	Total phenol content
Stress	1	778.545**	3333.448**	805.851**	0.52^{ns}
Hormone	1	343.128**	1168.943**	1580.081**	16.194**
Cultivar	1	162.912**	232.574**	59542.134**	20.786**
Stress×hormone	1	294.475**	182.555**	2160.874**	27.086**
Stress×cultivar	1	43.137 **	3029.669**	12045.77**	4.754*
Cultivar ×hormone	1	2243.892**	1248.278**	725.532**	7.674**
Cultivar ×stress× hormone	1	3462.766**	1326.302**	544.708**	117.919**
Error	24	0.013	0.077	0.052	0.003

*،**،ns به ترتیب در سطح ۱درصد، ۵ درصد معنی‌دار و معنی‌دار نمی‌باشد.

* , ** and ^{ns} are respectively significant level at 5%, 1% and no significant difference



شکل۱- تأثیر تیمار متیل جاسمونات بر آنزیم اسکوربات پراکسیداز (میکرومول/گرم/دقیقه) و کاتالاز (میکرو مول/گرم) در دو رقم گوجه‌فرنگی تحت تنش بیماری توسط قارچ *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici* در دو بازه زمانی ٤٨ و ٧٢ ساعت بعد از آلودگی.

حروف مشابه نمایانگر عدم اختلاف معنی¬دار در سطح احتمال پنج درصد از نظر آزمون دانکن می¬باشند.

Fig. 1. The effect of methyl jasmonat treatment on ascorbat peroxidase (µmol/g/min) and catalase (µmol/g) enzymes in two totato cultivars under disease stress with *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* at two interval times of 48 and 72 hours after inoculation.

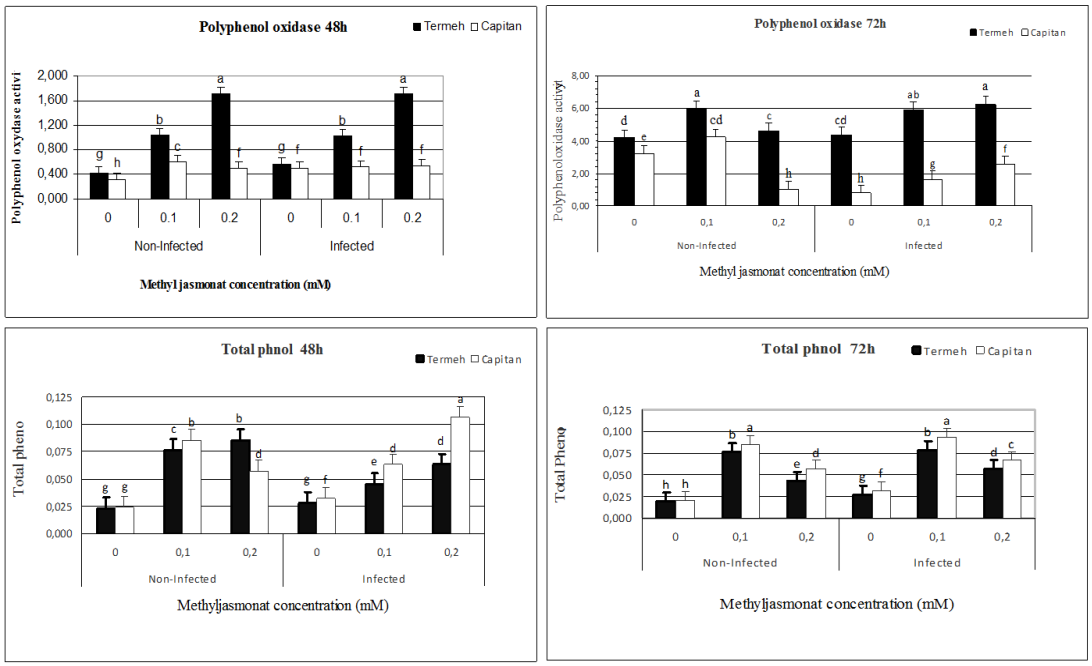
Same letters are not significantly different at the level of 5% by Duncan test at p<0.05

محتوای فنل کل

فنل کل به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم در ایجاد مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی استفاده می شود (Kumar and Goel, 2019). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در بازه زمانی ٤٨ ساعت بعد از بیماری در هر دو رقم ترمه و کاپیتان میزان افزایش فنل کل در رقم ترمه نسبت به کاپیتان بیشتر بوده است. در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از بیماری، روند تغییر در ترکیبات فنلی با بازه زمانی ٤٨ ساعت بعد از بیماری متفاوت به‌نظر رسید به‌طوری که بیشترین میزان ترکیبات فنله مربوط به‌غلظت ۰/۱ میلی مولار از هورمون و مربوط به رقم کاپیتان بود که نشان از فعال شدن مکانیسم‌های مقاومتی در این رقم نسبتاً حساس می‌باشد (شکل۲). مطالعات نشان داده است که ترکیبات فنله مانند تیمول و کارواکرول که در پلاستیدهای گیاهی تولید می‌شوند نقش بازدارنده‌ای در رشد و توسعه قارچ‌ها و بیماری‌های مرتبط با آنها داشته است (Wang *et al.*, 2019). کاربرد خارجی متیل جاسمونات در گیاهانی مانند کاهو (Kim *et al.*, 2007) و هویج نشان از تأثیر این ماده در افزایش میزان این ترکیبات دارد. علاوه بر بحث مقاومت گیاهی، ترکیبات فنلی می‌توانند در میوه و سبزیجات مانع از ایجاد بیماری‌هایی نظیر دیابت و سکته شوند (Dridi and Bordenave, 2020).

آنالیز بیان ژن

بررسی میزان بیان ژن‌ها در گیاهان فاقد بیماری نشان داد که در هر دو رقم مقاوم و حساس به‌بیماری هر سه ژن دارای میزان بیان تقریباً یکسانی می‌باشند ولی کاربرد خارجی متیل جاسمونات میزان بیان ژن‌ها را تغییر داد و بیشترین میزان برای هر دو رقم با اختلاف معنی دار در ژن *eds1* و کمترین آن مربوط به ژن *pds* مشاهده شد. افزایش غلظت متیل جاسمونات

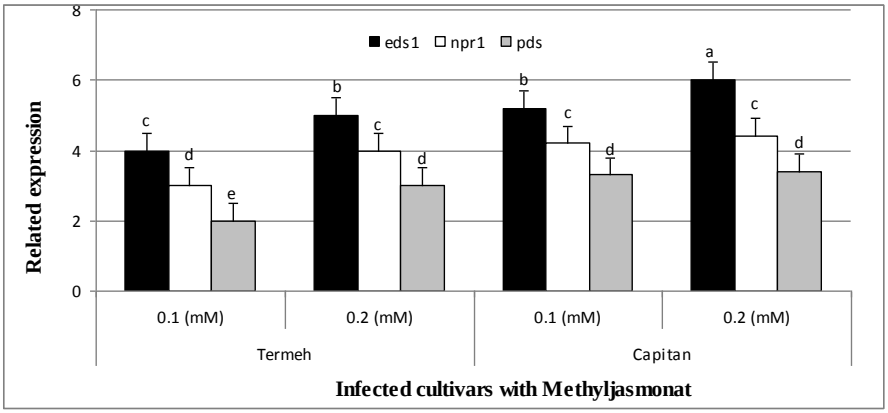


شکل۲- تأثیر تیمار متیل جاسمونات بر محتوای فنل کل (میکرومول/گرم برگ تازه) و آنزیم پلی فنل اکسیداز(میکرومول پیروگالول/گرم برگ تازه) در دو رقم گوجه فرنگی تحت تنش بیماری توسط قارچ *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici* در دو بازه زمانی ٤٨ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی.
حروف مشابه نمایانگر عدم اختلاف معنی¬دار در سطح احتمال پنج درصد از نظر آزمون دانکن می¬باشند.

Fig. 2. The effect of methyl jasmonat treatment on total phenol (µmol/gFW) and polyphenol oxidase (µmol pyrogaul/gFW) in two totato cultivars under disease stress with *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici* at tow interval times of 48 and 72 hours after inoculation.
Same letters are not significantly different at the level of 5% by Duncan test at p<0.05.

باعث افزایش بیان ژن‌ها در هر دو رقم شد. با توجه به این داده‌ها چنین نتیجه گیری می‌شود که کاربرد خارجی متیل جاسمونات باعث افزایش فعالیت ژن‌ها شده است که نشان از القا مقاومت اکتسابی در هر دو رقم دارد که این القا در رقم مقاوم ترمه بیشتر منعکس شده است. بیشترین و کمترین مقدار به‌ترتیب مربوط به ژن‌های *eds1* و *pds* ثبت شد (شکل ۳).

کاربرد خارجی متیل جاسمونات در دو رقم حساس (Neepawa) و مقاوم (BW552) گندم به بیماری پوسیدگی طوقه ایجاد شده به‌وسیله 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). در این تحقیق از ژن‌های بالا دستی مسیرهای مقاومتی که نقش غیر مستقیم در تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی دارند برای بررسی آنالیز بیان ژن استفاده گردید. تاکنون اطلاعات کاملی در ارتباط با بررسی مقاومت در اثر القا کنندگان مقاومت و تأثیر مستقیم آن‌ها براین ژن‌ها صورت نگرفته است. در یک مطالعه ژن خاموشی نشان دادیم که ژن‌های *npr1* و *eds1* هر دو نقش مستقیمی در القا مقاومت دارند و در گوجه‌فرنگی مبتلا به بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی ناشی از باکتری *Ralstonia solanacearum*، خاموش سازی این ژن‌ها باعث افزایش میزان بیماری در رقم مقاوم شد (Bolok Yazdi *et al.*, 2018) که با نتایج این تحقیق در افزایش مقاومت از طریق افزایش فعالیت چند آنزیم آنتی اکسیدانی و ژن‌های مرتبط با مقاومت، مطابقت دارد. بررسی میزان بیان تعدادی از ژن‌های مسئول مقاومت در پنبه آلوده به قارچ *Fusarium oxysporum* fsp. *vasinfectum* عامل بیماری پوسیدگی طوقه نشان داده است که کاربرد این محرک‌ها باعث افزایش بیان ژن‌های مورد بررسی شده است (Zambounis *et al.*, 2012). 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). نقش متیل جاسمونات در تحریک و بیان این ژن‌ها بخوبی مشخص نشده است. در این تحقیق نقش این محرک در القأ مقاومت در دو رقم گوجه‌فرنگی تا حدودی بررسی شد. با توجه به‌لزوم شناخت مکانیسم‌های مولکولی مقاومت در گیاهان، لازم است مطالعات پروتئومیکس روی محصولات پروتئینی حاصل از این ژن‌ها انجام گیرد. استفاده از محرک‌های زیستی نظیر قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های تقویت کننده رشد در گیاهان توصیه می‌شود. ولی در خاک‌های آلوده با منبع آلودگی بالا به‌هیچوجه مقاوم سازی کارآمد نخواهد بود و در ابتدا لازمست منشا آلودگی امحاء شود.



شکل۳ – آنالیز بیان ژن‌های *eds1*، *pds* و *npr1* در دو رقم گوجه فرنگی آلوده به قارچ *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* تحت تیمار متیل جاسمونات.

Fig. 9. Eexpression analyses of *eds1*، *pds* و *npr1* genes in tow infected tomato cultivars with *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* under methyl jasmonat treatement.

References

BABU, A. N., JOGAIAH, S., ITO, S.I., NAGARAJ, A. and TRAN, L. 2015. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. Plant Science, 231(1): 62-73.

BELA, K., HORVÁTH, E., GALLÉ, Á., SZABADOS, L., TARI, I. and CSISZÁR, J. 2015. Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. Journal of Plant Physiology, 176: 192-201.

BOLOK YAZDI, H.R., SABBAGH, S.K., MAZAHERI, M., SALARI, M. and MOSHTAGHIOUN, S.M. 2018. Virus-induced gene silencing for functional analysis of *eds1* gene in tomato infected with *Ralstonia solanacearum*. Zemdirbyste-Agriculture, 105(4): 357-362.

DESMOND, O.J., EDGAR, C.I., MANNERS, J., MACLEAN, D.J., SCHENK, P. M. and 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 (3-5): 171-179.

DRIDI, W. and BORDENAVE, N. 2020. Pine Bark Phenolic Extracts, Current Uses, and Potential Food Applications: A Review. Current Pharmaceutical Design, 26(4): 1866-1879.

EL-KHALLAL, S. M. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plants against Fusarium wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid & salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. Australia Journal of Basic Applied Science, 1: 717-732.

JAITI, F., VERDEIL, J. L. and HADRAMI, I. 2009. Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 74(1): 84-90.

KIM, H., FONSECA, J.M., CHOI, J.-H. and KUBOTA, C. 2007. Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 10366-10372.

KUMAR, N. and GOEL, N. 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. Biotechnology Reports, 24: e00370.

LECOMTE, C., ALABOUVETTE, C., EDEL-HERMANN, V., ROBERT, F. and STEINBERG, C. 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review. Biological Control, 101: 17-30.

LUO, J., RAN, W., HU, J., YANG, X., XU, Y. and SHEN, Q. 2010. Application of bio-organic fertilizer significantly affected fungal diversity of soils. Soil Science Society of America Journal, 74(6): 2039-2048.

MURKOWSKI, A. 2001. Heat stress and spermidine: effect on chlorophyll fluorescence in tomato plants. Biologia Plantarum, 44(3): 53-57.

OROZCO-CÁRDENAS, M., NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J. and 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(1): 179-191.

ORZAEZ, D., MIRABEL, S., WIELAND, W.H. and GRANELL, A. 2006. Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. Plant physiology, 140(1): 3-11.

REN, L., LOU, Y., SAKAMOTO, K., INUBUSHI, K., AMEMIYA, Y. and SHEN, Q. 2010. Effects of arbuscular mycorrhizal colonization on microbial community in rhizosphere soil and Fusarium wilt disease in tomato. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 41: 1399-1410.

SABBAGH, S., KERMANIZADEH, B., GHOLAMALIZADEH, A. and SIROUSMEHR, A. 2016. Effects of fertilizer treatments on components, performance components and induce resistance to wheat scab disease. Iranian Journal of Filed Crop Science, 47(1): 77-85. (In Persian with English summary).

SABBAGH, S., POORABDOLLAH, A., SIROUSMEHR, A. and GHOLAMALIZADE, A. 2017. Bio-fertilizers and Systemic Acquired Resistance in Fusarium Infected Wheat. Journal of Agricultural Science and Technology, 19: 453-464.

SABBAGH, S., ROUDINI, M. and PANJEHKEH, N. 2017. Systemic resistance induced by Trichoderma harzianum and Glomus mossea on cucumber damping-off disease caused by *Phytophthora melonis.* Archives of Phytopathology and Plant Protection, 50(7-8): 375-388.

SABBAGH, S., SABBAGH, E., ABKHOO, J. and ZINATI FAKHRABAD, F. 2016. The Effect of Salicylic Acid to Induce Systemic Resistance in Cucumber Plant to Damping- off Disease Caused by *Pythium aphanidermatum* Appled Researches in Plant Protection, 5(2): 27-43. (In Persian with English summary).

SABBAGH, S.K. and VALIZADEH, SH. 2016. Effect of bio-fertilizers on greenhouse cucumber resistant to damping-off disease caused by *Pythium aphanidermatum* and increase of yield component. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 5(1): 111-122. (In Persian with English summary).

SMITH, J.L., DE MORAES, C.M. and MESCHER, M.C. 2009. Jasmonate-and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 65(5): 497-503.

SOARES, A., SOUZA, T., JACINTO, T. and MACHADO, O. 2010. Effect of methyl jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H_2O_2 in *Ricinus communis* leaves. Brazilian Journal of Plant Physiology, 22(3): 151-158.

SULLIVAN, M.L. 2015. Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. Frontiers in Plant Science, 5(11): 783.

TALAAT, N., SHAWKY, B. and IBRAHIM, A. 2015. Alleviation of drought-induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants by dual application of 24-epibrassinolide and spermine. Environmental and Experimental Botany, 113(6): 47-58.

TARANTO, F., PASQUALONE, A., MANGINI, G., TRIPODI, P., MIAZZI, M. and PAVAN, S. 2017. Polyphenol oxidases in crops: biochemical, physiological and genetic aspects. International Journal of Molecular Sciences, 18(2): 377.

VANITHA, S. and UMESHA S. 2008. Variations in defense related enzyme activities in tomato during the infection with bacterial wilt pathogen. Journal of Plant Interactions 3 (1) : 245-253.

WANG, K., JIANG, S., PU, T., FAN, L., SU, F. and YE, M. 2019. Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi. Natural Product Research, 33: (12) 1423-1430.

WIERMER, M. 2005. Molecular and spatial characterisation of *Arabidopsis* EDS1 defence regulatory complexes. Universität zu Köln.

ZAMBOUNIS, A., KALAMAKI, M., TANI, E., PAPLOMATAS, E. and 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(3): 225-234.

ZEHRA, A., MEENA, M., DUBEY, M., AMIR, M. and UPADHYAY, R. 2017. Synergistic effects of plant defense elicitors and *Trichoderma harzianum* on enhanced induction of antioxidant defense system in tomato against Fusarium wilt disease. Botanical Studies, 58(1): 1-14.