

ارزیابی اثر اسید سالیسیلیک بر تغییر بیان برخی از ژن های مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی در گوجه فرنگی

Evaluation of the effect of salicylic acid on altering the expression of some resistance genes against Fusarium wilt in tomatoes

حامد دشتی^۱، سحر قلی طلوعی^۱، سیامک حنیفه^۲

Hamed Dashti¹, Sahar Gholi-Tolouie¹, Syamak Hanifeh²

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، مؤسسه آموزش عالی آفاق، ارومیه، ایران

۲- محقق مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، ارومیه، ایران

1. Department of Plant Protection, School of Agriculture, Afagh Higher Education Institute, Urmia, Iran

2. Researcher at the Center for Agriculture and Natural Resources Research and Education, West Azarbaijan Province, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *

tolouie.s@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۳)

چکیده

واژه های کلیدی

به منظور مقابله با *Fusarium oxysporum* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی در گوجه فرنگی، از اسید سالیسیلیک به عنوان القا کننده مقاومت استفاده شد. ریشه گوجه فرنگی با سوسپانسیون اسپور قارچ مایه زنی و با اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی مولار محلول پاشی شد. نمونه های برگي در فواصل صفر، ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۴ روز پس از محلول پاشی تهیه و برای بررسی تغییر بیان ژن های کد کننده آنزیم های کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پروتئین های مرتبط با بیماری زایی (PR1 و PR10) به روش RT-qPCR مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن های CAT و SOD به عنوان آنزیم های آنتی اکسیدانت و موثر در مقابله با آثار منفی بیماری در بوته های آلوده در مقایسه با شاهد به شدت افزایش داشت و روند صعودی بیان این ژن ها تا روز چهاردهم پس از محلول پاشی ادامه داشت. ژن POX تا روز پنجم بیان افزایشی و سپس، کاهشی داشت. این امر نشان می دهد که ژن کاتالاز نقش موثرتری در ایجاد مقاومت به بیماری نسبت به پراکسیداز دارد. ژن های PR در بوته های سالم و بیمار در واکنش به تیمار اسید سالیسیلیک طی ۱۴ روز روند افزایش داشتند که این افزایش برای بوته های بیمار بیشتر از بوته های سالم بود و بیانگر نقش القایی اسید سالیسیلیک در مقاومت به پژمردگی فوزاریومی است. بنابراین، تیمار اسید سالیسیلیک می تواند به عنوان یک گزینه مناسب برای ایجاد مقاومت و جلوگیری از خسارت به محصول گوجه فرنگی استفاده شود.

آنتی اکسیدان،
اسید سالیسیلیک،
بیان ژن،
بیماری،
فوزاریوم

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1, 2022

Abstract

In order to control *Fusarium oxysporum*, responsible for fusarium wilt disease, in tomatoes, salicylic acid was used as a resistance inducer. Tomato root was inoculated with pathogen suspension and sprayed with 0.1 mM salicylic acid. Leaf samples were prepared at 0, 1, 3, 5, 7 and 14 days after foliar application to evaluate the expression of genes encoding catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD) and pathogenesis related proteins (PR1 and PR10) using RT-qPCR. The results showed that the expression of CAT and SOD genes as antioxidant enzymes and effective against negative consequences of disease in infected plants increased sharply compared to the control and the upward trend of expression of these genes continued until the fourteenth day after foliar application, but the POX gene increased until the fifth day and then decreased. This indicates that the catalase gene has a more effective role in disease resistance than peroxidase. PR genes in both healthy and diseased plants increased over 14 days in response to salicylic acid treatment, which was greater for diseased plants than for healthy plants and indicates the induced role of salicylic acid in Fusarium wilt resistance. Therefore, salicylic acid treatment can be used as an ideal candidate to create resistance and prevent damage to the tomato crop.

Keywords: Antioxidant, Disease, Fusarium, Gene expression, Salicylic acid.

مقدمه

پژمردگی فوزاریومی با عامل *Fusarium oxysporum* یک بیماری قارچی شایع آوندی است که علایمی مشابه پژمردگی ورتیسیلیومی دارد (Snyder and Hansen, 1940). این گونه بر اساس نوع گیاه میزبان به فرم‌های خاص تقسیم می‌شود و بر طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها در هر مرحله رشدی تأثیر می‌گذارد. گوجه فرنگی، توتون، حبوبات، کدو، سیب زمینی شیرین و موز از حساس‌ترین گیاهان به این بیمارگر هستند، اما سایر گیاهان علفی نیز مبتلا می‌شوند (Anonymous, 2010). قارچ *F. oxysporum* علایمی مانند پژمردگی، کلروز، نکروز، ریزش زودرس برگ، قهوه‌ای شدن سیستم آوندی، کوتاهی ارتفاع و در نهایت مرگ گیاه را موجب می‌شود، ولی مهم‌ترین علامت آن انسداد آوندها و پژمردگی است (Agrios, 2004). پژمردگی فوزاریومی با رنگ پریدگی رگبرگ روی برگ‌های جوان‌تر و افتادن برگ‌های پایین‌تر شروع می‌شود و پس از آن کوتاه‌شدن، زرد شدن برگ‌های پایینی، برگ‌زدایی، نکروز حاشیه‌ای و مرگ گیاه رخ می‌دهد. در گیاهان مسن‌تر، علایم بین مراحل شکوفایی و بلوغ میوه متمایزتر است (Gonsalves and Ferreira, 1993).

اسید سالیسیلیک یک فیتوهورمون فنلی است و در رشد و نمو گیاهان، فتوسنتز، تعرق و جذب و انتقال یون نقش دارد (Vlot et

al. 2009). اسید سالیسیلیک در پیام‌رسانی درون‌زا نقش دارد و موجب مقاومت گیاه به عوامل بیمارگر می‌شود (Hayat and Ahmad, 2007). این امر با القای تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و سایر متابولیت‌های دفاعی (مقاومت اکتسابی سیستمیک) صورت می‌پذیرد (Hooft Van Huijsduijnen et al. 1986)، به طوری که گزارش‌ها نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لیاز در گوجه‌فرنگی با تیمار اسید سالیسیلیک افزایش یافته و موجب مقاومت در برابر آلودگی فوزاریومی شده است (Dashtipoor et al. 2017a,b).

مشخص شده است که حالت اکسیداتیو گیاهان در برابر بسیاری از تنش‌های زنده و غیر زنده نقش مهمی ایفا می‌کند (Maffei et al. 2007; War et al. 2011a,b). دفاع گیاه در برابر این تنش‌ها به واسطه مسیرهای پیام‌رسانی مختلف و از طریق تولید بسیاری از پروتئین‌های دفاعی و ترکیبات غیر پروتئینی انجام می‌شود (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). هورمون‌های گیاهی مانند اسید آسبیزیک، اسید جاسمونیک، اتیلن و اسید سالیسیلیک (SA) اجزای مهم مسیرهای پیام‌رسانی مختلف هستند که در دفاع گیاه نقش دارند (Hu et al. 2009; Lu, 2009). کاربرد خارجی SA و اسید جاسمونیک، فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی

(POD) و فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) درخت لاستیک (*Hevea brasiliensis*) را علیه *Phytophthora palmivora* مقاوم می‌کند (Deenamo et al. 2018). یک مطالعه نشان داد که کاربرد SA با افزایش فعالیت‌های POD و APX مقاومت دو رقم گوجه‌فرنگی را در برابر ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) افزایش داد (Li et al. 2019).

مطالعه حاضر به منظور بررسی واکنش گوجه‌فرنگی به کاربرد خارجی SA و بررسی اثر آن بر میزان بیان ژن برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و ژن‌های PR این محصول انجام شد، زیرا این ژن‌ها مهم‌ترین عوامل موثر در دفاع گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده هستند.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی و اعمال تیمارها: به منظور بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر میزان بیان برخی از ژن‌های آنتی‌اکسیدان و مرتبط با بیماری‌زایی در گوجه‌فرنگی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در محیط گلخانه اجرا شد. بذور گوجه‌فرنگی پس از ضدعفونی در سینی‌های کشت حاوی مخلوط خاک رس، پیت‌ماس و پرلیت تا رسیدن به مرحله دو برگه آبیاری شدند. پس از ۱۵ روز و رسیدن به مرحله یک تا دو برگه حقیقی، گیاهچه‌ها از خاک بیرون آورده شده و ریشه آنها با آب مقطر سترون شسته شد و سپس، ریشه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ قرار گرفت. ریشه گیاهچه‌های شاهد نیز با آب سترون شسته شد. جدایه شناسایی شده قارچ *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* جهت رشد اولیه به محیط کشت PDA منتقل و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی در داخل انکوباتور قرار داده شد. این جدایه از مرکز تحقیقات گیاهپزشکی استان آذربایجانغربی تهیه شد. از کشت‌های هفت روزه قارچ، قرصی به قطر ۵ میلی‌متر برداشته و به محیط کشت PDA در تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت دو هفته جهت اسپورزایی قرار داده شد. پس از رشد کامل و تولید اسپور برای تهیه سوسپانسیون اسپور، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی محیط مذکور ریخته شد و با اسکالپل، میسیلیوم‌ها از محیط کشت جدا و

مختلف از جمله فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را در گیاهان دستکاری می‌کند. پیشنهاد شده است که SA از طریق جذب عناصر غذایی، روابط آب، تنظیم روزنه و فتوستتیز بر رشد گیاه تحت تنش تأثیر می‌گذارد (Hayat et al. 2009). همچنین، این هورمون فعالیت آنزیم‌های مختلف مانند پراکسیداز (POD)، پلی فنل اکسیداز (PPO)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، فنیل آلانین لیاز (PAL) و غیره را که اجزای اصلی دفاع القایی گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده هستند، تنظیم می‌کند. انفجار اکسیداتیو (تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)) پاسخ فوری گیاهان به تیمار محرک از جمله SA است. مسیرهای پیام‌رسانی مختلفی به واسطه ROS برای تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با مکانیسم‌های دفاعی گیاه ایجاد می‌شود و نقش آن‌ها به عنوان پیام‌رسان دوم در مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی به خوبی مشخص شده است (Li et al. 2019).

یکی از اثرات عمده SA در دفاع گیاه، القای بیان ژن‌های PR (Pathogenesis-Related) است که پروتئین‌های دارای فعالیت ضد میکروبی را کد می‌کنند. تاکنون ۱۷ خانواده از پروتئین‌های PR شناسایی شده‌اند (Hoffmann-Sommergruber, 2000; Stintzi et al. 1993). در بین ژن‌های *PR1*، *PR2* و *PR5* به شدت بر اثر آلودگی توسط بیمارگرهای بیوتروف و نیمه بیوتروف القا می‌شوند. بیان *PR1*، *PR2* و *PR5* به SA وابسته است (Leah et al. 1991; Zhang et al. 2010) و این ژن‌ها اغلب به عنوان نشانگر مسیر SA استفاده می‌شوند. عملکرد بیوشیمیایی *PR1* در حال حاضر ناشناخته است، اگرچه در یک مطالعه نشان داده شد که *PR1* دارای فعالیت اتصال استرول است که با جداسازی استرول از عوامل بیماری‌زا، رشد پاتوژن را مهار می‌کند (Gamir et al. 2017). آنزیم او۳-بتاگلوکاناز توسط *PR2* کد می‌شود، در حالی که *PR5* یک پروتئین شبه تاوماتین را رمزگذاری می‌کند (Leah et al. 1991).

استفاده از بنزو (۱،۲،۳) تیادiazول S-متیل استر (BTH)، یک آنالوگ SA، بیان بیش از حد ژن‌های مربوط به دفاع را در گندم القا کرد (Pasquer et al. 2005). علاوه بر این، کاربرد SA باعث القای پروتئین‌های PR در *Solanum melongena* (L.) در برابر *Verticillium dahlia* Kleb شد (Mahesh et al. 2005). همچنین، مشخص شد که SA از طریق افزایش فعالیت‌های CAT، پراکسیداز

با روش (Sudhakar et al. 2006) برآورد و از بیماری‌زایی عامل بیمارگر اطمینان حاصل شد که نتایج آن در مقاله آورده نشده است.

بررسی بیان ژن به روش Real Time PCR: ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (*PR1* و *PR10*) و ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (*SOD*، *POX* و *CAT*) به عنوان ژن‌های هدف در این مطالعه انتخاب شدند. همچنین، از ژن اکتین به عنوان ژن خانه‌دار برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد. با استفاده از شماره دسترسی ژن‌های مورد نظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI که برای گوجه‌فرنگی موجود است، توالی‌های لازم جهت طراحی آغازگر به دست آمد. با استفاده از نرم افزار Primer 3web، آغازگرها با رعایت تمام اصول حاکم بر طراحی آغازگر و با تعیین اندازه ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت بازی برای محصول PCR طراحی شد (با توجه به این نکته که در Real Time PCR محصول PCR باید دارای اندازه کوچکتر از PCR متداول باشد). لازم به ذکر است که توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های آنتی‌اکسیدان از مقاله (Vitti et al. 2015) استخراج شد (جدول ۱).

در داخل آب غوطه‌ور شدند. در سوسپانسیون حاصل برای جداسازی، ریشه‌ها از پشم شیشه استریل عبور داده شد و پس از شمارش تراکم اسپور با لام هماسیتومتر، از غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر برای مایه‌زنی استفاده شد (Amini, 2009).

برای مایه زنی، گیاهچه‌های ۴ الی ۶ برگی انتخاب و بعد از شستشوی ریشه با جریان آب ملایم، ریشه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه درون سوسپانسیون اسپور غوطه‌ور شدند. گیاهچه‌ها در گلدان‌هایی که از یک روز قبل خاک آن‌ها آبیاری شده بود، کشت شدند. ریشه گیاهچه‌های شاهد نیز به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر سترون قرار گرفت و سپس، در گلدان‌ها کشت شدند (Amini, 2009). نشاهای گوجه‌فرنگی منتقل شده به گلدان‌های اصلی بلافاصله با اسید سالیسیلیک به غلظت ۰/۱ میلی مولار محلول‌پاشی شده و در روزهای صفر، ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۴ روز پس از محلول‌پاشی، نمونه‌های برگ‌ی جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه جهت بررسی میزان بیان ژن-های مورد مطالعه منتقل شدند. در این پژوهش شدت بیماری‌زایی

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Sequence of primers used in the present study

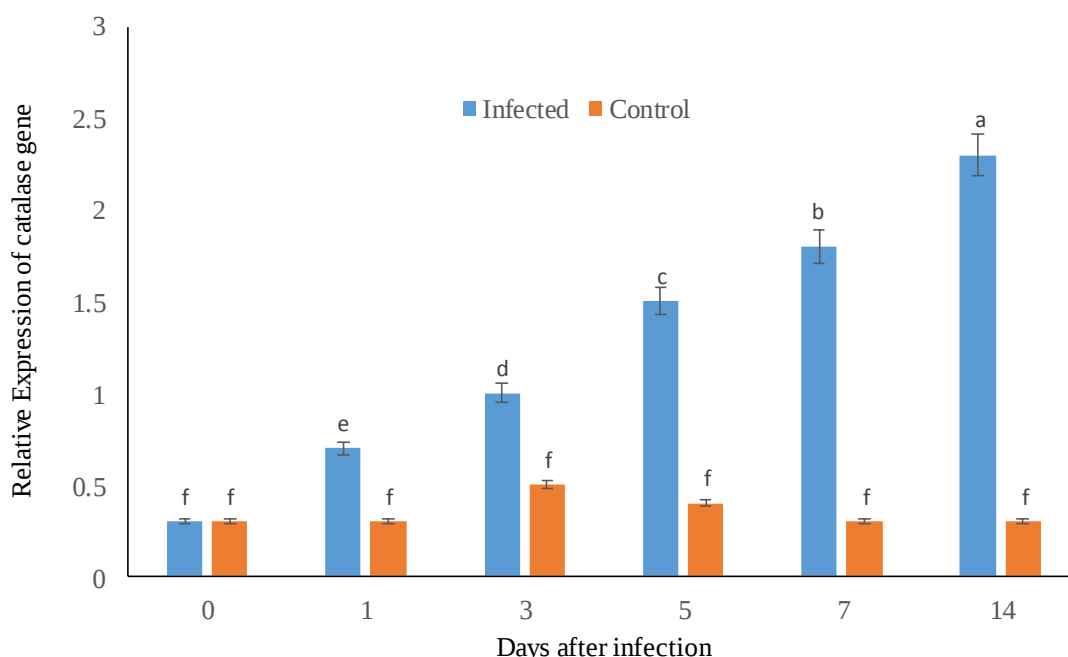
Target gene	Primer sequence	Accession number	Reference
<i>CAT</i>	5'-AGCCGGTGGGAAGATTAGTT-3' 5'-GATGAGCACACTTTGGAGC-3'	NM-001247257	Vitti et al. (2015)
<i>SOD</i>	5'-AGATGAACGCAGAAAGGTGCT-3' 5'-GCGTGTTCCTCAAAACGCTCTAT-3'	XM-004240820	Vitti et al. (2015)
<i>POX</i>	5'-GGACCTGATGTTCCCTTTCA-3' 5'-CAAGGTCCCTCAAAACCAGA-3'	AY974805	Vitti et al. (2015)
<i>Actin (ACT)</i>	5'-GTGTTTCCTAGTATTGTTGGTTCG-3' 5'-TGATGCCAGATCTTCTCCAT-3'	BT013524	NCBI
<i>PR1</i>	5'-TGCTGTGAAGATGTGGGTTGA-3' 5'-GTTACGCCACACCACCTGAG-3'	NM-001247429.1	NCBI
<i>PR10</i>	5'-GGAGATGGAGTTGTGTTTCC-3' 5'-CAGAAGGATTAGCGAGGAGGT-3'	KF682292.1	NCBI

سلسیوس و سپس ۴۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه ۹۵ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سلسیوس) بود. پس از پایان واکنش PCR، رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ۹۵-۶۰ درجه سلسیوس با اختلاف ۰/۵ درجه در هر چرخه انجام گرفت. به منظور استاندارد کردن داده‌ها، نمونه‌ها با ژن خانه‌دار اکتین نرمال شدند. نرخ بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد. رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel 2013 انجام شد.

بررسی بیان ژن (RT-qPCR) با استفاده از دستگاه Real time PCR مدل Light cyclor 96 Roche انجام شد. هر واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر آغازگر رفت (Forward primer) و آغازگر برگشت (Reverse primer)، ۲ میکرولیتر cDNA و ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه

نتایج و بحث

نتایج تجزیه داده‌ها نشان داد که اثر اسید سالیسیلیک بر میزان بیان ژن کاتالاز بین بوته‌های آلوده به قارچ در روزهای مختلف پس از آلودگی تفاوت معنی‌داری داشت، ولی در بوته‌های بدون آلودگی، تفاوتی از نظر بیان این ژن طی روزهای مختلف مشاهده نشد. میزان بیان نسبی ژن کاتالاز در گیاهان شاهد تا روز چهاردهم روند تا حدودی نزولی داشت، ولی در بوته‌های تلقیح شده با عامل



شکل ۱- میزان بیان نسبی ژن کاتالاز در برگهای گوجه فرنگی آلوده به قارچ فوزاریوم طی زمانهای مختلف پس از تیمار با اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی مولار. حروف متفاوت بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

Fig 1. Relative expression rate for catalase gene in tomato leaves infected by *Fusarium* during different intervals after treatment with 0.1 mM salicylic acid. Different letters indicate significant difference at 5% probability level.

از آنجایی که CAT به حفظ هموستازی اکسیژن فعال در زمان ایجاد تنش کمک می‌کند، فعالیت آن در گیاه به هنگام تنش افزایش یافته و سنتز آن نوعی پاسخ سازگاری در برابر تنش اکسیداتیو است (Balabanova et al. 2016). در تحقیق حاضر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تا روز ۱۴ روند افزایشی داشت. بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در آفتابگردان‌های آلوده به اسکروتینیا نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در لاین مقاوم به طور قابل توجهی حدود سه برابر در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد (Peluffo et al., 2010). در برگ‌های لاین‌های حساس و مقاوم کتان، بیماری کپک بودری موجب افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم کاتالاز شد (Naglaa and Heba, 2011). بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در لاین‌های مقاوم و کمترین آن در لاین‌های حساس آفتابگردان در مواجهه با اسکروتینیا گزارش شده است (Davar, 2010). پژوهش دیگری روی گیاه آفتابگردان، قارچ اسکروتینیا میزان فعالیت کاتالاز را افزایش داد (Emamgholi et al. 2015). طبق نتایج حاصل از این پژوهش، گیاهان آلوده با قارچ نسبت به گیاهان شاهد در بیشتر زمان‌های پس از آلودگی، فعالیت کاتالازی بیشتری داشتند. افزایش بیان ژن آنزیم‌های آنتی اکسیدان در مواجهه گیاه گوجه‌فرنگی با قارچ فوزاریوم گزارش شده است (El Khallal, 2007). در آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) نیز کاربرد اسید

سالیسیلیک باعث افزایش بیان ژن کاتالاز شد. در این پژوهش، گیاهان آلوده به قارچ فوزاریوم پس از تیمار با اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی مولار، فعالیت کاتالازی بیشتری داشتند. این نتایج با نتایج پژوهش‌های دیگر در گیاهان آلوده به قارچ فوزاریوم سازگار است. در این پژوهش، گیاهان آلوده به قارچ فوزاریوم پس از تیمار با اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی مولار، فعالیت کاتالازی بیشتری داشتند. این نتایج با نتایج پژوهش‌های دیگر در گیاهان آلوده به قارچ فوزاریوم سازگار است.

سالیسیلیک موجب افزایش بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدان شد (Mahmoodi Tarkhorani et al., 2019). نتیجه مطالعه دیگری نشان داد که کاربرد اسید سالیسیلیک موجب مهار رشد عوامل بیماریزای بیوتروفیک و همی‌بیوتروفیک شد و از تولید هیف‌های عوامل قارچی جلوگیری کرد. همچنین، این هورمون موجب مقاومت گیاهچه‌های گندم به فوزاریوم شد (Sorahinobar et al., 2015).

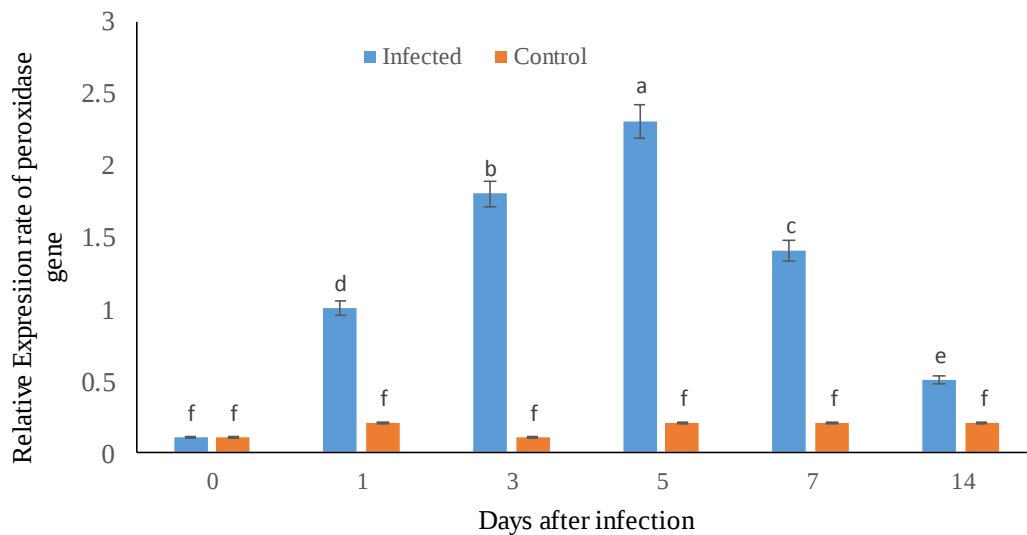
تیمار اسید سالیسیلیک بر میزان بیان ژن پراکسیداز در بوته‌های سالم گوجه‌فرنگی معنی‌دار نبود، ولی در بوته‌های آلوده تفاوت معنی‌داری طی روزهای پس از تلقیح قارچ مشاهده شد. میزان بیان نسبی ژن پراکسیداز در گیاهان شاهد روند تقریباً ثابتی داشت، ولی در گیاهان آلوده بیان ژن پراکسیداز تا روز پنجم افزایش و سپس کاهش نشان داد (شکل ۲). پراکسیدازها یکی از آنزیم‌های مهم هستند که در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان شرکت می‌کنند. پراکسیدازها پروتئین‌های آهن‌داری هستند که با استفاده از پراکسید هیدروژن بسیاری از سوبستراهای آلی و غیر آلی را اکسید می‌کنند. در این بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار بافت‌های ریشه (ریشه آلوده شده با قارچ) روز اول تا روز پنجم بصورت افزایشی بود (این عمل باعث القای سنتز پراکسیداز و مکانیسم‌های دفاعی شده است). پراکسیداز در سنتز برخی ترکیبات دفاعی از جمله پراکسید هیدروژن و لیگنینی شدن دیواره سلولی گیاه دخالت دارد و همچنین، باعث ایجاد پل‌های عرضی هیدروکسی پرولین موجود در دیواره سلول‌های ریشه می‌شود. نتیجه این امر مقاومت-سازی بافت‌های ریشه در برابر عامل بیمارگر است (Mohammadi and Kazemi, 2002; Silva et al., 2004; Zacheo et al., 1995). کاربرد اسید سالیسیلیک موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در هندوانه آلوده به فوزاریوم شده است (Zhu et al., 2022).

طبق نتایج تحزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری میان بوته‌های آلوده به قارچ فوزاریوم طی رزوه‌های پس از آلودگی از نظر بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز ملاحظه شد. بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز روند مشابهی با ژن کاتالاز داشت، به طوری که در گیاهان آلوده روند افزایشی تا پایان روز چهاردهم دیده شد، ولی در گیاهان

شاهد تغییری در بیان ژن مشاهده نشد (شکل ۳). نتایج به دست آمده در مورد بررسی اثر ژن سوپراکسید دیسموتاز در ایجاد مقاومت در مقابل عوامل بیمارگر نشان‌دهنده این واقعیت است که مقاومت گیاه به عامل بیماریزا بستگی به وجود میزان بالای فعالیت سوپراکسید دیسموتاز دارد (Ehsani-Moghaddam et al. 2006; Mandal et al. 2008). در آلودگی برگ‌های توت‌فرنگی با قارچ *Mycosphaerella fragariae* فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ارقام مقاوم دو روز پس از آلودگی به بیشترین مقدار خود رسید (Ehsani-Moghaddam et al. 2006). گزارش شده است که ۲۲ ساعت بعد از مایه‌کوبی با قارچ فوزاریوم در گوجه‌فرنگی افزایش میزان سوپر اکسید دیسموتاز دیده شده است (Kayali and Tarhan, 2005). در مطالعه دیگری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در ژنوتیپ‌های مقاوم در چهار روز پس از مایه‌زنی افزایش داشت (Madadkhah et al., 2012). گزارش شده است که کاربرد توام اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک تا ۸۰٪ موجب کاهش علائم بیماری ویروس موزاییک خیار در گوجه‌فرنگی شده است (Gholi-Tolouie et al. 2018).

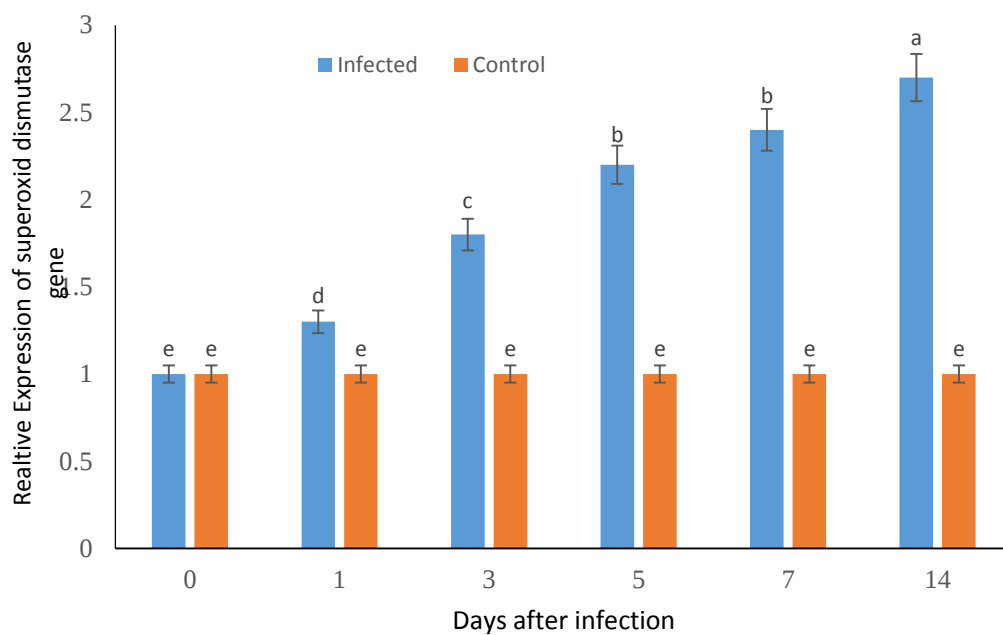
وجود تعادل بین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم‌های حذف‌کننده H_2O_2 مانند کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در ایجاد مکانیسم دفاعی مقاوم در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاه می‌تواند نقشی اساسی داشته باشد (Badawi et al. 2004).

بین تیمارهای آلوده به قارچ و بوته‌های سالم گوجه‌فرنگی از نظر بیان ژن *PR1* طی روزهای پس از محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. میزان بیان نسبی ژن *PR-1* در همه گیاهان سالم و تلقیح شده تا روز چهاردهم روند افزایشی داشت، ولی در گیاهان تلقیح شده میزان بیان ژن در روز چهاردهم حدود دو برابر بیشتر از گیاهان تلقیح نشده بود (شکل ۴). بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به تیمار تلقیح با قارچ در روز چهاردهم با مقدار ۱۸/۴ بود. بیشترین تأثیر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک بر بیان این ژن در روز سوم و در گیاهان تلقیح شده در مقایسه با شاهد مشاهد شد که افزایش حدود هفت برابری را نشان می‌دهد. تاکنون بیش از ۱۷ خانواده از پروتئین‌های دفاعی در گیاهان شناخته شده‌اند که یکی از گسترده‌ترین آن‌ها خانواده *PR-1* است.



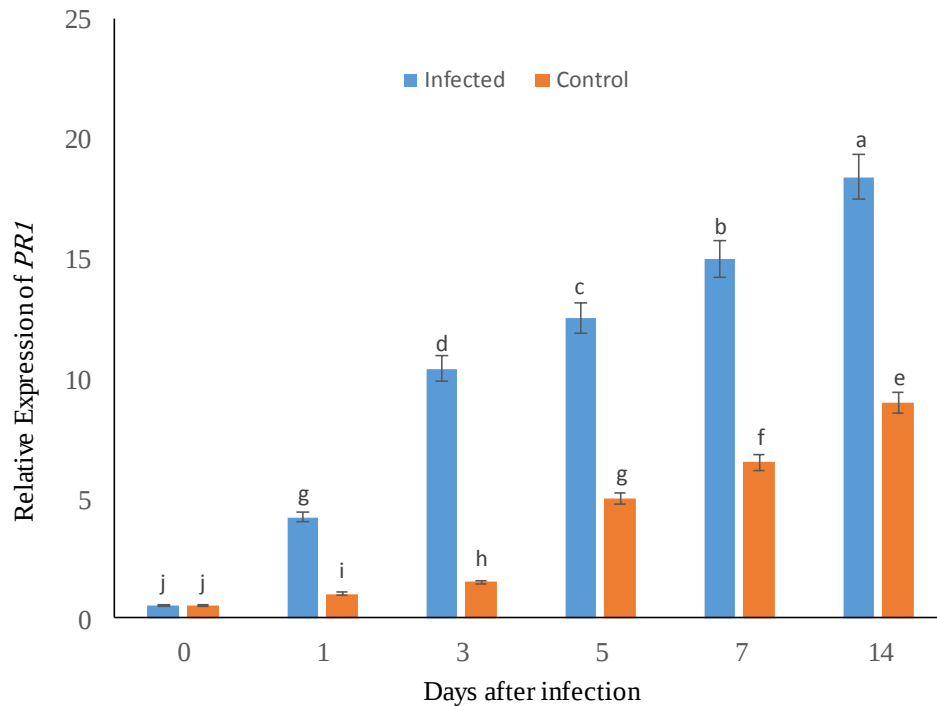
شکل ۲- میزان بیان نسبی ژن پراکسیداز در برگهای گوجه فرنگی آلوده به قارچ فوزاریوم طی زمانهای مختلف پس از تیمار با اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی مولار. حروف متفاوت بیانگر اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۵٪ است.

Fig 2. Relative expression rate for peroxidase gene in tomato leaves infected by *Fusarium* during different intervals after treatment with 0.1 mM salicylic acid. Different letters indicate significant difference at 5% probability level.



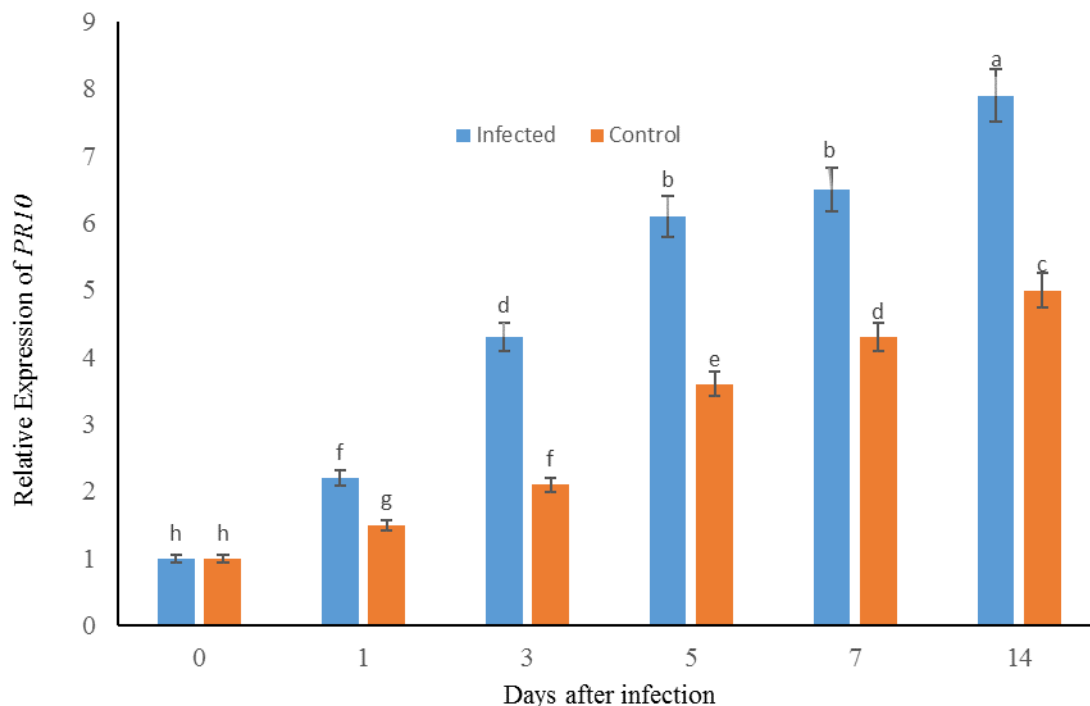
شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن سوپراکسید دیسموتاز در برگهای گوجه فرنگی آلوده به قارچ فوزاریوم طی زمانهای مختلف پس از تیمار با اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی مولار. حروف متفاوت بیانگر اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۵٪ است.

Fig 3. Relative expression rate for superoxide dismutase gene in tomato leaves infected by *Fusarium* during different intervals after treatment with 0.1 mM salicylic acid. Different letters indicate significant difference at 5% probability level.



شکل ۴- میزان بیان نسبی ژن *PR1* در برگهای گوجه فرنگی آلوده به قارچ فوزاریوم طی زمانهای مختلف پس از تیمار با اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی مولار. حروف متفاوت بیانگر اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۵٪ است.

Fig 4. Relative expression rate for *PR1* gene in tomato leaves infected by *Fusarium* during different intervals after treatment with 0.1 mM salicylic acid. Different letters indicate significant difference at 5% probability level.



شکل ۵- میزان بیان نسبی ژن *PR10* در برگهای گوجه فرنگی آلوده به قارچ فوزاریوم طی زمانهای مختلف پس از تیمار با اسید سالیسیلیک ۰/۱ میلی مولار. حروف متفاوت بیانگر اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۵٪ است.

Fig 5. Relative expression rate for *PR10* gene in tomato leaves infected by *Fusarium* during different intervals after treatment with 0.1 mM salicylic acid. Different letters indicate significant difference at 5% probability level.

بار در سلول‌های کشت شده جعفری تحت تیمار محرک‌ها کشف شدند (Jwa et al. 2001). تمام پروتئین‌های PR-10 اسیدی بوده و در هیچ یک از آن‌ها سیگنال پپتیدی وجود ندارد. از این رو پروتئین‌های این خانواده درون سلولی هستند و توسط بیمارگر‌ها القا می‌شوند (Sundar et al. 2001). تفاوت بین ارقام مختلف گیاهان در هنگام بیان پروتئین در شرایط وجود عامل بیماری بروز می‌یابد و چنین نتیجه‌ای در مورد ژن PR-10 برنج صورت به دست آمده است (Babaeizadeh and Sayyari, 2013). ژن PR-10 در برنج به طور طبیعی در برگ‌ها بیان نمی‌شود و به زخم‌ها واکنش نشان نمی‌دهد، اما بالقوه در سطح بالایی به وسیله اتیلن و اسید سالیسیلیک بیان می‌شود (Heydari-Nezhad et al. 2014).

نتیجه گیری کلی

طبق نتایج حاصل از این بررسی، به نظر می‌رسد که اسید سالیسیلیک، محرک مناسبی برای القای ژن‌های مقاومت و بالا رفتن میزان بیان ژن‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، PR-1 و PR-10 در گیاه است. در نتیجه سبب تحریک مکانیسم دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی علیه قارچ فوزاریوم می‌شود و می‌تواند به عنوان یک عامل کنترل کننده بیولوژیک و به عنوان یک القا کننده سیستم دفاعی گیاه در مدیریت بیماری پژمردگی فوزاریوم مورد توجه قرار گیرد.

پروتئین‌های این خانواده در پاسخ به آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در سطوح بسیار بالایی بیان می‌شوند. به عنوان مثال، بیان ژن‌های کد کننده PR-1 متعاقب شرایط تنش در توتون بیش از ۱۰۰۰ بار افزایش می‌یابد و به همراه سایر پروتئین‌های دفاعی (مانند گلوکانازها، کینازها، کیتینازها) و آنزیم‌های متابولیسم ثانویه (مانند آنزیم‌های دخیل در بیوستز فیتوالکسین‌ها) موجب افزایش سطح مقاومت می‌شوند (Alexander et al. 1993). با وجود گستردگی پروتئین‌های PR-1 و ارتباط آن‌ها با دفاع گیاه، مکانیسم عمل آن‌ها تا حدود زیادی ناشناخته مانده است. با توجه به اینکه این پروتئین‌ها همولوژی بالایی با برخی پروتئین‌های مشابه در مخمرها، حشرات و مهره‌داران دارند، بررسی مکانیسم عمل پروتئین‌های مشابه می‌تواند به شناخت مکانیسم عمل آن‌ها در گیاهان کمک کند (Van Loon and Strain, 1999).

بیان ژن PR-10 در تیمارهای مختلف طی روزهای پس از محلول-پاشی اسید سالیسیلیک تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد. میزان بیان نسبی ژن PR-10 در روز چهاردهم و در واکنش به تیمار اسید سالیسیلیک به بیشترین حد خود در گیاهان تلقیح شده رسید که تقریباً عدد هشت را نشان می‌دهد. در گیاهان تلقیح نشده نیز اسید سالیسیلیک موجب افزایش بیان این ژن تا روز چهاردهم شد (شکل ۵).

پروتئین‌های PR-10 شامل پروتئین‌های دفاعی داخل سلولی می‌باشند که ساختاری شبیه ریبونوکلائازها دارند. این پروتئین‌ها اولین

منابع

- Agrios G. 2004. Plant Pathology. 5th Ed. ISBN: 9780120445653. Elsevier.
- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock CKW, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. Proceeding of National Academy of Science of USA, 90:7327-7331.
- Amini K. 2009. Physiological race of *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici in Kurdistan Province of Iran and reaction of some tomato cultivars to race 1 of pathogen. *Plant pathology* 8: 68-73.
- Anonumous. 2010. "Fusarium Wilt." Pan Germany. Pestizid Aktions-Netzwerk. Web. 23 Nov.
- Babaeizadeh V, Sayyari M. 2013. Intervention of Lipoxigenase gene and multiple pathogenesis related (PR) genes in the resistance of Tarom and anonymous cultivars of rice to *Rhizoctonia solani* Disease. 12th Iranian Congress of Genetics. May 21-23, Tehran.
- Badawi GH, Kawano N, Yamauchi Y, Shimada E, Sasaki R, Kubo A, Tanaka K. 2004. Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiologiae Plantarum* 121:231-238.

- Balabanova DA, Paunov N, Goltsev V, Cuypers A, Vangronsveld J, Vassilev A. 2016.** Photosynthetic performance of the imidazolinone resistant sunflower exposed to single and combined treatment by the herbicide imazamox and an amino acid extract. *Frontiers in Plant Science* 7:1559-1570.
- Dashtipoor S, Sahebani N, Aminian, H. 2017a.** Application effects of *Bacillus subtilis* and salicylic acid on the tomato plants against *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 6(4): 1-10.
- Dashtipoor S, Sahebani N, Aminian, H. 2017b.** Induction of resistance and changes of phenol and peroxidase in tomato plants treated with *Bacillus subtilis* and salicylic acid against *Fusarium* wilt and root-knot diseases. *Research in Plant Pathology* 5(1): 47- 58.
- Davar R. 2010.** Comparative study of anatomical structure, structural and developmental changes of stem in resistant and susceptible lines and disease resistant genetics. Ph.D. dissertation. Tarbiat Moallem University. Tehran.
- Deenamo N, Kuyyogsuy A, Khompatara K, Chanwun T, Ekchaweng K. 2018.** Salicylic acid induces resistance in rubber tree against *Phytophthora palmivora*. *International Journal of Molecular Science* 19:1883-1895.
- Ehsani-Moghaddam B, Charles MT, Carisse O, Khanizadeh S. 2006.** Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. *Journal of Plant Physiology* 163:147-153.
- El Khallal SM. 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): 1- Changes in growth, some metabolic activities and endogenous hormones related to defence mechanism. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1(4): 691-705.
- Emamgholi A, Zaefizadeh M, Imani A. 2015.** The proteomic analysis of resistance to *Sclerotinia Sclerotiorum* fungus in sunflower seedling stage. *Trend in Life Science* 4:2319-5037.
- Gamir J, Darwiche R, Van't Hof P, Choudhary V, Stumpe M, Schneider R, Mauch F. 2017.** The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant Journal* 89: 502-509.
- Gholi-Tolouie S, Sokhandan-Bashir N, Davari M, Sedghi M. 2018.** Evaluation of antioxidant gene expression in tomato plants inoculated by Cucumber mosaic virus after treatment with salicylic and jasmonic acids. *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 6 (2): 223-235.
- Gonsalves AK, Ferreira SA. 1993.** Extension Plant Pathologist, Department of Plant Pathology, CTAHR, University of Hawaii at Manoa. *Fusarium oxysporum*.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2009.** Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68:14-25.
- Hayat S, Ahmad A. 2007.** Salicylic Acid – A Plant Hormone. Springer. ISBN 978-1-4020-5183-8.
- Heydari-Nezhad AM, Babaeizad V, Rahimian H. 2014.** Studying PR2 and PAL genes involvement in rice resistance against *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae*. *Journal of Agricultural Biotechnology* 7(4): 67-81.
- Hoffmann-Sommergruber K. 2000.** Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? *International Archives of Allergy and Immunology* 122:155-166.
- Hooft Van Huijsduijnen RA, Alblas SW, De Rijk RH, Bol JF. 1986.** "Induction by salicylic acid of pathogenesis-related proteins or resistance to alfalfa mosaic virus infection in various plant species". *Journal of General Virology* 67 (10): 2135-2143.
- Hu X, Li W, Chen Q, Yang Y. 2009.** Early signal transduction linking the synthesis of jasmonic acid in plant. *Plant Signaling and Behavior* 4:696-697.
- Jwa NS, Kumar AG, Rakwal R, Park CH, Prasad AV. 2001.** Molecular cloning and characterization of a novel jasmonate inducible pathogenesis-related class 10 protein gene, JIOsPR10, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 286: 973-983.
- Kayali HA, Tarhan L. 2005.** Role of pyruvate and ascorbate production in regulation of antioxidant enzymes and membrane LPO levels in *Fusarium Acuminatum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 120:15-27.
- Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J. 1991.** Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *Journal of Biological Chemistry* 266: 1564-1573.
- Li T, Huang Y, Xu Z, Wang F, Xiong A. 2019.** Salicylic acid-induced differential resistance to the tomato yellow leaf curl virus among resistant and susceptible tomato cultivars. *BMC Plant Biology* 19: 3104-3111.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Lu H. 2009.** Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks. *Plant Signaling and Behavior* 4:713-717.
- Madadkhah E, Nasertorabi M, Soleimani A, Moghbeli E. 2012.** Activity of peroxidase and cucurbitacin D in melon genotypes following challenge by the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis race 1. *Scientia Horticulturae* 135:171-176.
- Maffei ME, Mithofer A, Boland W. 2007.** Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry* 68:2946-2959.
- Mahesh HM, Murali M, Anup Chandra Pal MA, Melvin P, Sharada MS. 2017.** Salicylic acid seed priming instigates defense mechanism by inducing PR-proteins in *Solanum melongena* L. upon infection with *Verticillium dahliae* kleb. *Plant Physiology and Biochemistry* 117:12-23.
- Mahmoodi Tarkhorani S, Sanjarian Dehghani F, Monsef Shokri M. 2019.** The effect of salicylic acid treatment on the antioxidant enzymes activity in *Thymus vulgaris* seedlings. *Modares Journal of Biotechnology* 10(1): 37-44.
- Mandal S, Mitra A, Mallick N. 2008.** Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f.

- sp. lycopersici. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 56-61.
- Mohammadi M, Kazemi H. 2002.** Changes in peroxidase and polyphenol activity in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*. 162. 491-498.
- Naglaa AA, Heba IM. 2011.** Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to powdery mildew. *World Journal of Agricultural Sciences* 7: 78-85.
- Pasquer F, Isidore E, Zarn J, Keller B. 2005.** Specific patterns of changes in wheat gene expression after treatment with three antifungal compounds. *Plant Molecular Biology* 57:693-707.
- Peluffo L, Lia V, Troglia C, Maringolo C, Norma P, Escande A, Hopp HE, Lytovchenko A, Fernie AR, Heinz R, Carrari F. 2010.** Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Phytochemistry* 71: 70-80.
- Rivas-San Vicente M, Plasencia J. 2011.** Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 62(10):3321-3338.
- Silva HSA, Romeiro RDS, Macagnan D, Halfeld-Vieira BDA, Pereira MCB, Mounteer A. 2004.** Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: Non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control* 29: 288-295.
- Snyder WC, Hansen HN. 1940.** The species concept in *Fusarium*. *American Journal Botany* 27:64-67.
- Sorahinobar M, Jahedi A, Safaie N, Niknam V, Ebrahimzadeh H. 2015.** Dual functional role of Salicylic acid against *Fusarium*; long lasting priming and direct immediate effect. *International Journal of Farming and Allied Sciences* 4 (5): 442-447.
- Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B. 1993.** Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75: 687-706.
- Sudhakar N, Nagendra-Prasad D, Mohan N, Murugesan K. 2006.** Induction of systemic resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against Cucumber mosaic virus by using ozone. *Journal of Virological Methods* 139(1): 71-77.
- Sundar AR, Velazhahan R, Viswanathan R, Vidhyasekaran P. 2002.** Induction of active oxygen species (AOS), lipoxygenase and lipid peroxidation in suspension-cultured sugarcane cells by a glycoprotein elicitor isolated from *Colletotrichum falcatum*. *Journal of Plant Disease Protection* 109:441-451.
- Van Loon LC, Strrain EA. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their functions and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Vitti A, La Monaca E, Sofo A, Scopa A, Cuypers A, Nuzzaci M. 2015.** Beneficial effects of *Trichoderma harzianum* T-22 in tomato seedlings infected by Cucumber mosaic virus (CMV). *BioControl* 60:135-147.
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. 2009.** "Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease". *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- War AR, Paulraj MG, War MY, Ignacimuthu S. 2011a.** Herbivore- and Elicitor- Induced Resistance in Groundnut to Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) *Plant Signaling and Behavior* 6(11): 1769-1777.
- War AR, Paulraj MG, War MY, Ignacimuthu S. 2011b.** Jasmonic acid- mediated induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) *Journal of Plant Growth Regulation* 30:512-523.
- Zacheo G, Bleve-Zacheo T, Pacoda D, Orlando C, Durbin RD. 1995.** The association between heat induced susceptibility of tomatoes to *Meloidogyne incognita* and peroxidase activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46: 491-507.
- Zhang J, Du X, Wang Q, Chen X, Lv D, Xu K, Qu S, Zhang Z. 2010.** Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. *BMC Research Notes* 3:208-214.
- Zhu F, Wang Z, Su W, Tong J, Fang Y, Luo Z, Yuan F, Xiang J, Chen X, Wang R. 2022.** Study on the role of salicylic acid in watermelon-resistant fusarium wilt under different growth conditions. *Plants* 11(3): 293-304. <https://doi.org/10.3390/plants11030293>.