Iranian Journal of Plant ProtectionScience
Vol 51, No 2, Autumn and winter 2020 (297-313)
DOI: 10.22059/ijpps.2020.299224.1006932

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۹ (۳۱۳-۲۹۷)

تأثیر هورمون گیاهی اسپرمیدین در القا مقاومت دو رقم متحمل ترمه و حساس کاپیتان گوجه‌فرنگی به بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* فیتوهورمونها و مقاومت گیاهان به بیماریها

سید کاظم صباغ[1]، مسعود گلستانی[2]، اسمعیل عباسی سریزدی[3]، محمد رضا سرافراز اردکانی[4] و مرضیه طاهری[5]

۱. دانشیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه یزد

۲. استادیار فیزیولوژی گیاهی دانشگاه پیام نور یزد

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده منابع طبیعی و کویر شناسی دانشگاه یزد

۴. استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه یزد

۵. کارشناس آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر مظاهری

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۰۵)

چکیده

در این پژوهش اثر پلی‌آمین اسپرمیدین در القاء مقاومت دو رقم حساس و متحمل گوجه‌فرنگی به بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* بررسی شد. بدین منظور یک طرح فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه انجام شد. محلول اسپرمیدین به‌عنوان القاءکننده مقاومت در غلظت‌های ۰، ۱ و ۰/۱ میلی‌مولار با روش مه‌پاشی گیاهان گوجه‌فرنگی استفاده شد. نمونه‌برداری در دو بازهٔ زمانی ٤٨ و ٧٢ ساعت بعد از آلودگی انجام شد. میزان چند آنزیم آنتی‌اکسیدانی و همچنین بیان تعدادی از فاکتورهای نسخه‌برداری به‌عنوان تنظیم‌کنندگان بالادستی ژن‌های مختلف مرتبط با بیماری‌زایی (*npr1*, *eds1*, *pds*) به ترتیب با روش طیف‌سنجی و بیان ژن در زمان واقعی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان دادند که تقریباً بیشترین میزان فعالیت آنزیمی مرتبط با گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده با تیمار ۱ میلی‌مولار اسپرمیدین بعد از ۷۲ ساعت از آلودگی به‌وسیلهٔ قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* است. آنالیز بیان ژن نشان داد که تمام ژن‌های موردبررسی در گیاهان بیمار، تحت تأثیر کاربرد اسپرمیدین قرار گرفته‌اند. بیشترین و کمترین میزان بیان به ترتیب مربوط به ژن‌های *npr1* و *pds* بود. بر اساس این نتایج ما پیشنهاد می‌شود که کاربرد خارجی اسپرمیدین با غلظت مناسب در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش بیماری می‌تواند شرایط رشدی گیاه را بهبود بخشیده که این امر می‌تواند منجر به مقاومت گیاهان به حمله بیمارگر شود

واژه‌های کلیدی: اسپرمیدین، مقاومت القایی، بیان ژن، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بیماری‌های گیاهی.

The effect of spermidine phytohormone on inducing resistance of two tolerant Termeh and sensitive Capitan cultivar of tomato against Fusarium wilting disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Seyed Kaem Sabbagh[1*], Masoud Golestani[2], Esmaeil Abbasi saryazdi[3], Mohammad Reza Sarafraz ardakani[4] and Marzieh Taheri[5]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University
2.Department of Agriculture, Peyam-Noor University of Yazd
3.MSc student of Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Natural Resources of Desert, Yazd University
4. Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University
5. Laboratory of medical genetics of doctor Mazaheri

(Received: March 16, 2020 - Accepted: Sept 26, 2020)

ABSTRACT

In this research, the effects of spermidine polyamine on induced resistance of two sensitive and tolerant cultivars of tomato to Fusarium wilting disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* was investigated. For this reason, a designed factorial experimental based on randomized completed block design was performed under greenhouse conditions. Spermidine solution at 0, 1, and 0.1 mM concentrations was used as a resistance inducer by spraying on tomato plants. Tomato at the six-leaf stage was inoculated by the pathogen. Sampling was performed at 48 and 72h periods after inoculation. The level of several antioxidant enzymes and also the expression of some transcription factors as up-stream regulators of various resistance-related genes (*npr1*, *eds1*, and *pds*) were measured by spectrophotometry and Real-time PCR, respectively. Results showed that approximately the highest enzyme activity was related to infected tomato plants treated with 1mM concentration of spermidine 72 h after inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Gene expression analysis showed that all tested genes were affected by spermidine application in infected plants. The highest and lowest expression level was observed for *npr1* and *pds* genes, respectively. Based on these results, we suggest that exogenous application of spermidine with an appropriate concentration on tomato under disease stress condition could improve the plant growth condition, which can result in plant resistance against pathogen attack.

Keywords: Antioxidant enzymes, Gene expression, Induced resistance, Plant disease, Spermidin

* Corresponding author E-mail: sksabbagh@yazd.ac.ir

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum,* Solanaceae) از گیاهان عالی گل‌دار دولپه بوده که دارای واریته‌های بسیار متنوعی ازنظر غذایی، شرایط کشت و کیفیت میوه، شکل میوه و مقاومت به آفات و بیماری‌های گیاهی است. گوجه‌فرنگی در حال حاضر چهارمین سبزی ازنظر محبوبیت در میان سبزی‌های تازه در بازار بعد از سیب‌زمینی، کاهو و پیاز است و یکی از پرمصرف‌ترین میوه‌ها در سبد غذایی بوده که به‌طور روزانه از آن‌ها استفاده می‌شود. با توجه به نقش حرارت و رطوبت در کشت گوجه‌فرنگی به‌ویژه در شرایط گلخانه، این محصول همواره مورد هجوم بیماری‌های مختلفی قرار می‌گیرد. بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گوجه‌فرنگی است که خسارت زیادی به گیاه وارد می‌کند و تولید گوجه‌فرنگی را در دنیا محدود می‌کند (Mandal, Mallick, *et al.,* 2009). علایم بیماری شامل پژمردگی، کم‌رشدی، زردی برگ‌های پایینی، قهوه‌ای شدن آوندها و درنهایت خشک شدن بوته است (Amini and Sidovich, 2010). استفاده از ارقام مقاوم و قارچ‌کش‌ها به‌عنوان راه‌های اصلی مبارزه با این عامل بیماری معرفی شده‌اند ولی استفاده از آفت‌کش‌ها علاوه بر هزینه‌های بالای مصرف، خطر آلودگی محیط‌زیست و انتقال بقایای سم به انسان را در بر خواهد داشت. اقبال عمومی به کاهش مصرف سموم، پژوهشگران را به آن داشته است تا درصدد دست‌یابی به ترکیبات طبیعی سازگار با محیط‌زیست برآیند (Fravel, Olivain, *et al.,* 2003; Holland, Bianchi, *et al.*, 2016).

پلی‌آمین‌ها ترکیبات پلی‌کاتیونی موجود در تمام موجودات زنده هستند که انواع ساختاری آن‌ها شامل اسپرمیدین، دی و تری آمین‌ها، کاداورین و غیره است (Takahashi, 2016). این ترکیبات نه‌تنها در رشد و نمو گیاهان نقش دارند بلکه در پاسخ به تنش‌های مختلف زیستی نظیر عوامل میکروبی و تعاملات بین گیاه و میکروب‌ها نیز مؤثر هستند (Kusano, Yamaguchi, *et al*., 2007).

این تعاملات میکروبی حتی باعث تغییر در تشکیل ساختار پلی‌آمین‌ها از طریق تغییر در تولید زیستی این ترکیبات در حالت تنش زیستی شده است به‌طوری‌که در حضور عامل بیمارگر قارچ و یا ویروس، انواع مختلفی از این ترکیبات آمینی حاصل می‌شوند (Walters, 2003 Walters, 2000;). شواهد نشان می‌دهند که افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های زیستی در ارتباط با افزایش میزان این ترکیبات در گیاهان در حال تنش بوده است (Prabhavathi and Rajam, 2007 Waie and Rajam, 2003). تعاملات غیراختصاصی بین میکروب و گیاه باعث فعال شدن آنزیم‌های مسئول تولید زیستی پلی‌آمین‌ها می‌شوند. آنزیم‌هایی مانند اورنتین دی‌کربوکسیلاز و آرژنین دکربوکسیلاز نیز در حالت ایجاد تنش و بیماری در گیاه افزایش یافته است که همگی منجر به افزایش مقاومت گیاه به بیماری شده است (Kim, *et al.,* 2013; Yoda, *et al.,* 2009).

ژن *npr1*[1] در پایین‌دست مسیر تولید اسید سالیسیلیک قرار گرفته که بیان آن در موقع حمله بیمارگر باعث تحریک و افزایش تولید فاکتورهای نسخه‌برداری نظیر WRKY و TAGs می‌شود. مونومرهای npr1 آزاد شده و به سمت هسته حرکت می‌کنند و در آنجا به‌صورت مستقیم و یا غیرمستقیم با فاکتورهای رونویسی TGA واکنش می‌دهند و باعث تولید PR می‌شوند (Peleg-Grossman *et al.,* 2010). هورمون‌های گیاهی نظیر سالیسیلیک اسید و جاسمونات‌ها به ترتیب به میزان ۵۰ و ۲۵ درصد فاکتور نسخه‌برداری WRKY را تحریک نموده و این فاکتور به‌نوبهٔ خود باعث افزایش فعالیت ژن‌های مسئول بیماری‌زایی در گیاهان می‌شود. در گوجه‌فرنگی ژن eds12[2] برای مقاومت به دامنهٔ وسیعی از بیمارگرهای قارچی، باکتریایی و ویروسی، احتیاج است (Hu *et al*., 2005). در مسیر پیام‌رسانی اسید

1. None-experessor pathogenecity resistance gene 1 (npr1)
2 .Enhanced Disease susceptibility -1 (eds1)

سالیسیلیک، ژن‌هایی مثل *eds1* و *pds* در پایین‌دست ژن‌های R ولی در بالادست مسیر تولید اسید سالیسیلیک قرار می‌گیرند (Wiermer *et al.*, 2005). ژن pds در گوجه‌فرنگی باعث تولید آنزیم فیتون واسرشت‌ساز می‌شود که این آنزیم در مسیر تولید کارتنوییدها نقش اساسی بر عهده دارد (Lois, *et al.*, 2000) و خاموشی این ژن باعث کاهش میزان تولید کارتنوییدها شده و منجر به زردی میوه شود (Fraser, *et al.*, 1994) به‌طوری‌که افزایش این ترکیبات در میوه‌های در حال رسیدن به میزان ۱۰ برابر افزایش یافته است (Orzaez, *et al.*, 2006). استفاده از این ژن به‌عنوان یک نشانگر در جلبک‌ها در ایجاد مقاومت به علف‌کش‌ها به اثبات رسیده است و مشخص‌شده است که ایجاد جهش‌های نقطه‌ای در این ژن باعث ایجاد مقاومت جلبک سبز *Chlorella zofingiensis* به علف‌کش Norflurazon شده است (Huang, *et al.*, 2008). با توجه به پژوهش‌های بسیار اندک در ارتباط با نقش مستقیم پلی‌آمین‌ها در ایجاد مقاومت القایی و اکتسابی در گیاهان، در این پژوهش تأثیر پلی‌آمین اسپرمیدین در ایجاد مقاومت دو رقم گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به بیماری پژمردگی فوزاریومی از طریق بررسی میزان بیان ژن‌های *npr1*، *eds1* و *pds* و همچنین چند آنزیم آنتی‌اکسیدانی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاه

در این پژوهش از دو رقم ترمه (شرکت زرین دان جنوب) متحمل و رقم کاپیتان (شرکت یوکسل ترکیه) حساس به فوزاریوم، استفاده شد. در ابتدا بذرها به‌وسیله کلرامین **T** (۱ درصد) به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند و در زیر هود زیستی روی کاغذ واتمن استریل، خشک شدند. بذرها در سینی‌های سخت پلی‌استرونی حاوی خاک پیت ماس و کوکوپیت سترون کاشته و در ژرمیناتور نشاء گوجه‌فرنگی تولید شد و نشاها در مرحله ۲ برگی به گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک پیت ماس و کوکوپیت استریل با قطر ۱۸ سانتی‌متر منتقل شدند و به‌صورت مرتب با روش قطره‌ای آبیاری صورت گرفت. در مرحلهٔ پنجه‌دهی تعداد بوته در هر گلدان با تنک کردن به ۱ بوته رسید. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

تهیه محلول اسپرمیدین

در این پژوهش از هورمون گیاهی اسپرمیدین تجاری استفاده شد. از حلال آبی برای حل کریستال‌های اسپرمیدین و رقیق‌سازی آن استفاده گردید. برای تهیهٔ غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی‌مولار محلول هورمونی، از ۰/۱۴۵ گرم پودر هورمون اسپرمدین با وزن مولکولی ۱۴۵/۱۲۵ گرم، در ۱ لیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ضدعفونی شده استفاده شد (۱ میلی‌مولار). از روغن توین ۲۰ به غلظت ۱ درصد حجمی به‌عنوان دترژانت استفاده گردید. محلول تهیه‌شده روی دستگاه هات پلیت با حرارت ملایم به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد تا تمام مواد در محلول، حل گردد. با استفاده از یک مه‌پاش، عمل اسپری هورمون بر روی گیاهان گوجه‌فرنگی در مرحلهٔ چهار برگی انجام گرفت. عمل اسپری تا مرحلهٔ ۶ برگی و تا قبل از آلودگی بوته‌ها با قارچ، دوبار در هفته تکرار گردید. برای هر غلظت در هر مرحله مقدار ۲۵۰ میلی‌لیتر از محلول هورمونی با غلظت‌های ذکرشده استفاده شد.

تهیه مایهٔ تلقیح قارچ

جدایهٔ استاندارد قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه رفسنجان تهیه شد. با توجه به اینکه ضعیف شدن جدایه به علت نگهداری طولانی‌مدت محتمل بود اثبات بیماری‌زایی جدایه بر روی رقم حساس گوجه انجام و مجدداً قارچ از بوته‌های تلقیح شده و پژمرده جدا و خالص‌سازی و برای آزمون آلوده‌سازی استفاده شد. بدین منظور در ابتدا یک دیسک از کلنی قارچ به محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar, Sigma) منتقل و در گرمخانه در دمای ۲±۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. سپس مقداری از پرگنهٔ قارچ تازه رشدکرده جهت

اسپوردهی به ارلن حاوی دانه‌های گندم استریل با کمی رطوبت منتقل شد و در دمای ۲±۲۵ درجهٔ سلسیوس به مدت دو هفته نگهداری شد. به‌منظور آزمون بیماری‌زایی، تمام تیمارهای موردآزمایش به همراه گیاه شاهد، با تعداد ۳-۴ عدد بذر حاوی پوشش قارچی و اسپور از طریق ریشه تلقیح شدند. برای تسریع در بیماری‌زایی زخم‌های کوچکی در ناحیهٔ طوقه با تیغ سترون ایجاد گردید. نمونه‌برداری از برگ گیاه در دو بازهٔ زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تلقیح قارچ عامل بیماری انجام شد.

استخراج عصارهٔ گیاهی

برای عصاره‌گیری، ۱ گرم از بافت گیاهی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در هاون چینی ریخته و پس از خُرد کردن برگ‌ها با ازت مایع، عصارهٔ حاصل از پارچه ململ دولایه عبور و در ظرفی سترون ریخته شد. باقی‌ماندهٔ مواد در روی پارچه دو بار و هر بار با ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد شستشو انجام داده و به عصارهٔ داخل ظرف اضافه گردید. عصارهٔ صاف‌شده به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس رسوب حاصل حذف و از محلول رویی برای اندازه‌گیری فنل استفاده شد (Seevers, Daly, *et al*., 1971).

اندازه‌گیری فنل کل

برای اندازه‌گیری میزان فنل کل، از محلول فولین استفاده شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از عصارهٔ به‌دست‌آمده، با ۷ میلی‌لیتر آب مقطر سترون در یک لوله‌آزمایش ریخته و کاملاً مخلوط کرده و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین به لوله اضافه شده و مجدداً محتویات لوله باهم مخلوط شد.

پس از ۳ دقیقه یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به لوله اضافه و حجم مخلوط با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و پس از یک ساعت مقدار جذب رنگ در طول‌موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (Analytica Jena 1500S) خوانده شد. برای تهیهٔ محلول استاندارد از اسید کافییک استفاده شد و مقدار فنل کل برحسب میلی‌گرم در یک گرم برگ تازه محاسبه گردید.

سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

عصاره‌گیری به روش گانگ و همکاران با کمی تغییرات صورت گرفت (Gong *et al.,* 2001). بدین منظور مقدار ۰/۲ گرم بافت گیاهی تازه را در هاون چینی به همراه ازت مایع و ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج فسفات پتاسیم (۵۰ میلی‌مولار، pH ۶/۸)، EDTA (۰/۱ مولار) و آب مقطر تخریب نموده و محلول هموژنیزه و یکنواختی تهیه شد. سپس مخلوط به‌دست‌آمده به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، از فاز بالایی محلول عصاره، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، در ابتدا در یک محلول واکنش به حجم ۳ میلی‌لیتر، مقدار ۳۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی، ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH ۷)، ۷۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۵۰ میلی‌مولار (pH ۷) و ۱۵۰۰ میکرو لیتر آب مقطر اضافه شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در مدت‌زمان ۱۸۰ ثانیه و برحسب Abs/min با طول‌موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درنهایت میزان فعالیت آنزیمی برحسب میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف‌شده در دقیقه در واحد گرم وزن‌تر گیاه محاسبه گردید **(Weydert and Cullen, 20110)** .

تعیین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز

جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز به ۱۰۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی،۴۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۰/۲ مولار (PH ۷/۶)، پیروگالول ۰/۰۲ مولار به میزان ۱ میلی‌لیتر، ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن پیروگالول به مخلوط واکنش شروع شد. فعالیت آنزیم در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر طیف‌سنج در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه پس از

افزودن پیروگالول اندازه‌گیری شد (Kar and Mishra, 1976).

تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از معرف گایاکول به‌عنوان سوبسترا با توجه به میزان افزایش جذب در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در محلول واکنش به حجم ۱ میلی‌لیتر، ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی‌مولار (۷/۶ =pH)، ۳۰۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنهٔ ۱۰ میلی‌مولار، معرف گایاکول ۳ میلی‌مولار اضافه شد. مقدار ۱۰ میکروگرم از پروتئین کل به محلول واکنش اضافه گردید و میزان جذب در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۵ دقیقه بررسی و اندازه‌گیری شد. مقدار آنزیم پراکسیداز برحسب میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم از پروتئین اندازه‌گیری شد(Jebara et al., 2005) .

تعیین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

جهت تعیین میزان تغییرات آنزیم آسکوربات پراکسیداز به مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مول (pH ۷)، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار، هیدروژن پراکسیداز ۲ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۲۰ میکرو لیتر عصارهٔ آنزیمی اضافه شد. به دنبال اکسید شدن آسکوربیک اسید با آغاز واکنش آنزیمی، کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر در ۱۸۰ ثانیه پس از آغاز واکنش نسبت به زمان آغاز واکنش محاسبه شد. با استفاده از تغییرات جذب در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر و ضریب خاموشی ۲/۸ mMol/cm میزان آسکوربیک اسید برجای‌مانده در ۱۸۰ ثانیه و هر ۱۰ ثانیه یک‌بار ثبت گردید (Jebara et al., 2005) .

بررسی تغییرات بیان ژن

جهت ارزیابی میزان بیان ژن‌های موردآزمایش در ابتدا ۵۰ گرم از برگ‌های گیاه موردنظر جدا و جهت استخراج RNA در مراحل بعدی استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری توپاز ژن (TopazGene, Alborz,Iran) انجام شد. رشتهٔ اول DNA از مولکول‌های mRNA با استفاده از کیت تجاری سیناژن ساخته شد. کمیت و کیفیت مولکول‌های cDNA به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo 100, USA) و ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. مقدار ۵۰ نانوگرم از cDNA برای انجام آنالیز بیان ژن استفاده شد. آغازگرهای مورداستفاده برای qRT-PCR توسط نرم‌افزار آنلاین (http://Fokker.wiPrimer3.mit.Primer3 deu/primer3/input.htm) طراحی و توسط شرکت سیناژن ساخته شد (جدول ۱). واکنش qRT-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرو لیتر cDNA(50 ng/µl)، ۲ میکرولیتر از مخلوط دو آغازگر (20µM)،۴ میکرولیتر از Mastermix (Hot Tag EvaGreen, Cinnagene, France) و با استفاده از دستگاه کوربت (HRM3500, Curbet, Australia) با برنامهٔ دمایی ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه و به دنبال آن ۳۵ چرخهٔ حرارتی شامل ۹۵ درجهٔ سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجهٔ سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. سه تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی برای هر تیمار انجام شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

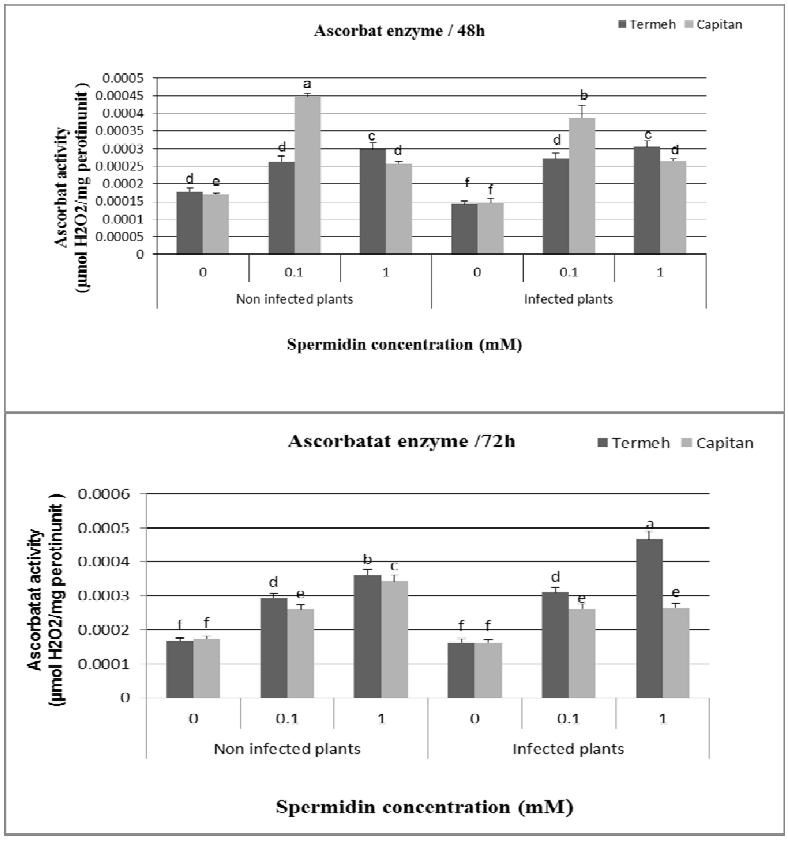
تجزیهٔ واریانس داده‌ها بر اساس طرح فاکتوریل و بلوک‌های کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 تحت تجزیهٔ واریانس یک‌طرفه قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد و نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل (Excel) رسم شدند. تجزیه‌وتحلیل داده‌های به‌دست‌آمده برای بررسی بیان ژن به روش کمی با روش $\Delta\Delta Ct$ انجام شد (Pffafi, 2001).

نتایج

آنزیم آسکوربات

نتایج مربوط به تأثیر هورمون اسپرمیدین بر روی افزایش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات در بازهٔ زمانی

۴۸ ساعت پس از آلودگی با شاهد نشان داد که در هر دو رقم متحمل و حساس، میزان تغییرات این آنزیم متغیر است. چنانچه در شکل ۱ مشخص است، در حالت عدم کاربرد هورمون در دو حالت (بیماری و عدم بیماری)، در میزان فعالیت آنزیم بین دو رقم تغییر چندانی دیده نمی‌شود. در حالت بیماری میزان آنزیم نسبت به حالت سالم در غلظت صفر مقدار ناچیزی کاهش داشته است که می‌تواند ناشی از تنش اولیهٔ بیماری باشد ولی با کاربرد هورمون در دو حالت میزان آنزیم تغییر معنی‌داری نسبت به حالت عدم کاربرد هورمون (غلظت صفر) داشته است. بیشترین میزان تغییر آنزیم مربوط به غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اسپرمیدین بوده است. در دو حالت در رقم کاپیتان این افزایش رخ داده است که با توجه به حساس بودن رقم می‌توان نتیجه گرفت که اسپرمیدین در این غلظت می‌تواند در برابر تنش بیماری مؤثر و مقاومت القایی گیاه را افزایش دهد.



شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف اسپرمیدین بر مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات در دو رقم گوجه‌فرنگی ترمه و کاپیتان تحت تنش زیستی توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در دو بازهٔ زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی. تیمارها با حروف متفاوت در سطح ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

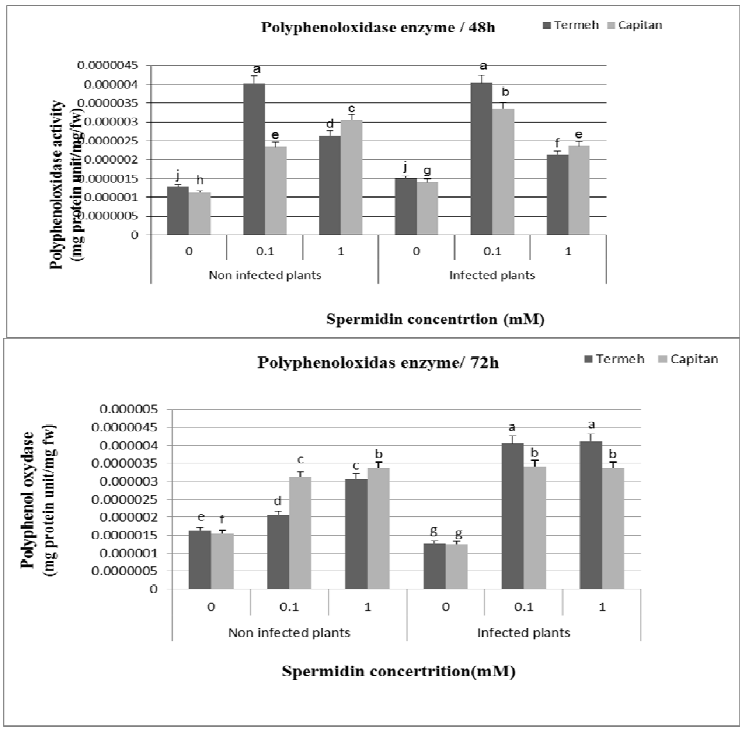
Figure 1. The effect of different spermidine concentration on the rate of Ascorbat enzyme activity in two tomato cultivars Termeh and Capitan, under biotic stress by *F. oxusporum* f.sp. *lycopersici* at two time periods (48 and 72 h) after inoculation. Treatments with different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ level.

در بازهٔ زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی تغییراتی آنزیمی نسبت به بازهٔ زمانی ۴۸ ساعت بعد از آلودگی تغییرات زیادتری را نشان داد. بیشترین میزان آنزیم در غلظت ۱ میلی‌مولار از اسپرمیدین و در تیمار گیاهان آلوده به بیماری مشاهده شد. در این بازهٔ زمانی رقم متحمل ترمه بیشترین میزان افزایش آنزیم

را نشان داد که نشان از افزایش تجمعی آنزیم در رقم متحمل بعد از گذشت زمان است (شکل ۱).

آنزیم پلی فنل اکسیداز

میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تیمارهای مختلف از اسپرمیدین در دو رقم حساس و مقاوم در شکل ۲ نشان داده شده است. حداکثر میزان فعالیت آنزیم مربوط به تیمار ۰/۱ میلی‌مولار اسپرمیدین است. رقم متحمل ترمه در دو حالت بیماری و سالم تأثیر بیشتری از این آنزیم دریافت و میزان این آنزیم نسبت به رقم حساس کاپیتان بیشتر بوده است. ولی با افزایش غلظت به ۱ میلی‌مولار، رقم حساس کاپیتان نیز توانسته است فعالیت آنزیمی خود را افزایش دهد. در حالت بیماری افزایش میزان آنزیم در رقم حساس کاپیتان در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اسپرمیدین نشان از واکنش سریع مقاومتی بعد از کاربرد اسپرمیدین بوده است. در هر دو رقم وجود عامل بیماری باعث کاهش اثر اسپرمیدین علیرغم افزایش میزان غلظت آن شده است.



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف اسپرمیدین بر مقدار فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در دو رقم گوجه‌فرنگی ترمه و کاپیتان تحت تنش زیستی توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در دو بازهٔ زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی. تیمارها با حروف متفاوت در سطح ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

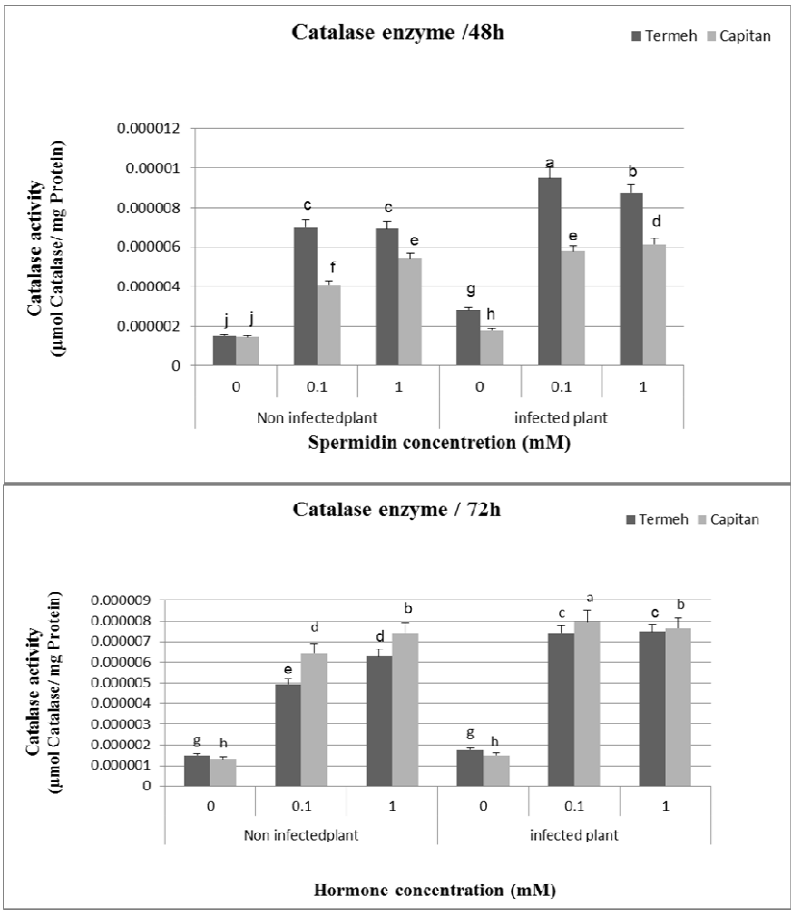
Figure 2. The effect of different spermidine concentration on the rate of Polyphenoloxidase enzyme activity in two tomato cultivars Termeh and Capitan, under biotic stress by *F. oxusporum* f.sps *lycopersici* at two time intervals periods (48 and 72 h) after inoculation. Treatments with different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ level.

چنانچه در شکل ۲ مشاهده می‌شود میزان آنزیم در حالت غیر بیمار از غلظت صفر به بالا به‌صورت تدریجی افزایش می‌یابد و بیشترین غلظت مربوط به تیمار ۱ میلی‌مولار اسپرمیدین مشاهده می‌شود. تأثیرپذیری آنزیم در رقم حساس کاپیتان از رقم ترمه متحمل به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است ولی در حالت بیماری این تأثیرپذیری در رقم ترمه متحمل بیشتر بوده است که این امر می‌تواند به علت اثر عامل بیمارگر و مقاومت ذاتی گیاه باشد. در رقم حساس کاپیتان افزایش میزان آنزیم با افزایش غلظت نسبت به

غلظت صفر از اسپرمیدین، مشاهده می‌شود. افزایش غلظت برای رقم حساس تقریباً تأثیر چندانی در افزایش القا مقاومت نداشته است.

کاتالاز

در بازۀ زمانی ۴۸ ساعت بعد از آلودگی با افزایش غلظت اسپرمیدین در هر دو رقم، میزان افزایش آنزیم نسبت به غلظت صفر معنی‌دار بوده است ولی بیشترین میزان افزایش مربوط به رقم متحمل ترمه در حالت بیماری ثبت گردیده است؛ اگرچه افزایش آنزیم در رقم حساس کاپیتان نیز معنی‌دار بوده است و بیماری نتوانسته است بر روند افزایش آنزیم تأثیرگذار باشد (شکل ۳).



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف اسپرمیدین بر مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز در دو رقم گوجه‌فرنگی ترمه و کاپیتان تحت تنش زیستی توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در دو بازۀ زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی. تیمارها با حروف متفاوت در سطح ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

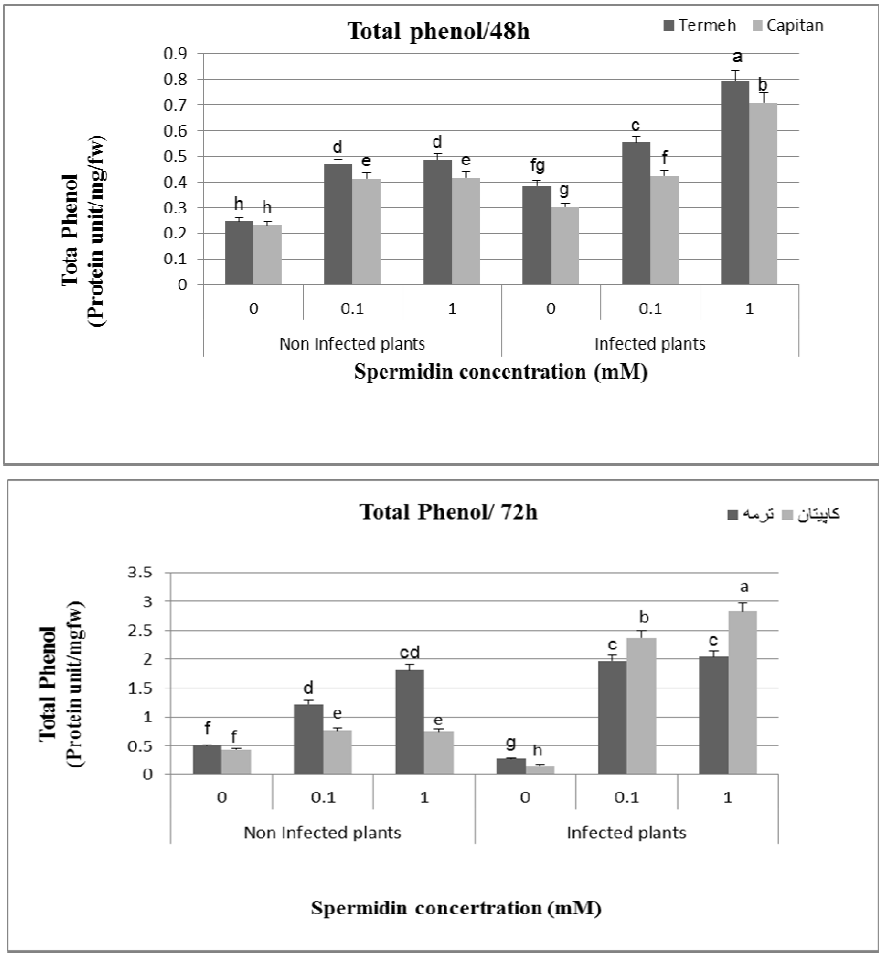
Figure 3. The effect of different spermidin concentration on the rate of Catalase enzyme activity in two tomato cultivars Termeh and Capitan, under biotic stress by *F. oxusporum* f.sp. *lycopersici* at two time periods (48 and 72 h) after inoculation. Treatments with different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ level.

چنانچه در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در بازۀ زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی نیز مشخص شد که کاربرد اسپرمیدین باعث تغییر در میزان آنزیم نسبت به عدم کاربرد آن شده است. در هر دو غلظت در شرایط عدم حضور بیمارگر، میزان افزایش آنزیم به‌ویژه در رقم حساس کاپیتان بالاتر است. با افزایش میزان غلظت اسپرمیدین، میزان افزایش آنزیم نیز به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت‌های کمتر، افزایش داشته است. در

حالت بیماری افزایش میزان آنزیم در دو رقم اگرچه بالا بوده است ولی در هر دو رقم و برای هر دو غلظت تقریباً یکسان بوده است. با توجه به نتایج مشخص گردید که این آنزیم نسبت به بقیه آنزیم‌ها تأثیرپذیری بیشتری از اسپرمیدین را داشته است.

فنل کل

نتایج حاصل از بررسی میزان فنل کل در گیاهان بیمار و سالم مربوط به دو رقم حساس کاپیتان و متحمل ترمه نشان از افزایش میزان این ترکیبات اصلی در واکنش‌های دفاعی داشت. به‌طوری‌که همواره در رقم متحمل ترمه این میزان بیشتر از رقم حساس کاپیتان بود و با توجه به مقاومت ذاتی رقم ترمه، این امر متصور است. با ایجاد تنش بیماری، میزان ترکیبات فنل در هر دو رقم به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت صفر افزایش داشته است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده چنین به نظر می‌رسد که اسپرمیدین قادر به تحریک مسیرهای بیوشیمیایی مقاومت در گیاه است. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های حاصل از فنل کل در شکل ۴ آمده است.



شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف اسپرمیدین بر محتوای فنل کل در دو رقم گوجه‌فرنگی ترمه و کاپیتان تحت تنش زیستی توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در دو بازهٔ زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی. تیمارها با حروف متفاوت در سطح ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

Figure 4. The effect of different spermidin concentration on the total phenol content enzyme activity in two tomato cultivars Termeh and Capitan, under biotic stress by *F. oxusporum* f.sp. *lycopersici* at two time periods (48 and 72 h) after inoculation. Treatments with different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ level.

در بازۀ زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی میزان تغییر در ترکیبات فنلی در رقم متحمل ترمه بیشتر از رقم حساس کاپیتان بود و این میزان افزایش تغییرات برای رقم متحمل ترمه در دو حالت، وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت، میزان آن نیز افزایش معنی‌داری نسبت به غلظت صفر نشان داد. میزان تغییرات فنل کل اگرچه در رقم حساس کاپیتان نسبت به ترمه افزایش بیشتری نداشت ولی نسبت به غلظت شاهد (صفر) افزایش قابل‌توجهی داشت ولی این افزایش وابسته به غلظت نبود و با افزایش غلظت میزان ترکیبات فنل افزایش چشمگیری نداشت (شکل ۴).

تجزیۀ واریانس داده‌های حاصل از فعالیت‌های اندازه‌گیری شده آنزیمی و همچنین اندازه‌گیری فنل کل نشان داد که در بازۀ زمانی ۴۸ ساعت بعد از بیماری بین تیمارهای رقم و تنش بیماری ارتباط معنی‌داری وجود دارد. نتایج حاصل از تجزیۀ واریانس داده‌های به‌دست‌آمده در جدول ۱ درج شده‌اند.

جدول ۲. نتایج تجزیۀ واریانس صفات مربوط به فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و محتوای فنل کل طی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی به‌وسیلۀ قارچ *Fusarum oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Table 2. Analysis of variance results of related traits to Polyphenol oxidase, Catalase, and Ascorbat proxidase enzymes activities and total Phenol content during 72 h after inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Source of variation	Catalase	Ascorbat proxidase	Polyphenol oxidase	Total Phenol	Freedown
Stress	262.015**	2.631**	23853.828**	29.302**	1
Hormone	863.334**	2.344**	3606.520**	11.100**	1
Cultivar	505.552**	000**	103174.583**	342.745**	2
Stress×Hormone	3370.627**	16.300**	9939.778**	84.766**	1
Stress×Cultivar	2726.001**	9.827**	35972.238**	23.418**	2
Cultivar ×Hormone	1203.584**	.089**	402.679**	402.679**	2
Cultivar ×Stress× Hormone	1236.698**	000	23075.328**	000**	2
Error	0.017	0.002	0.02	0.150	24

در بازۀ زمانی ۷۲ ساعت بعد از بیماری نیز تجزیۀ واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارهای بکار رفته و داده‌های آنزیمی در سطح ۵ درصد ارتباط معنی‌داری وجود داشته است. نتایج حاصل از تجزیۀ واریانس داده‌ها در جدول ۲ آمده است.

آنالیز بیان ژن

بررسی میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش نشان داد که در دو حالت گیاه سالم و بیمار تیمار شده با اسپرمیدین میزان بیان ژن‌های هدف افزایش بیان داشته‌اند. بررسی میزان بیان ژن‌ها با مقایسۀ تیمارهای بیمار و سالم انجام گردید. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشخص گردید که در هر دو رقم با افزایش میزان غلظت، میزان بیان ژن‌های موردمطالعه افزایش یافته است ولی بیشترین میزان افزایش مربوط به ژن *eds1* ثبت گردید (شکل ۵).

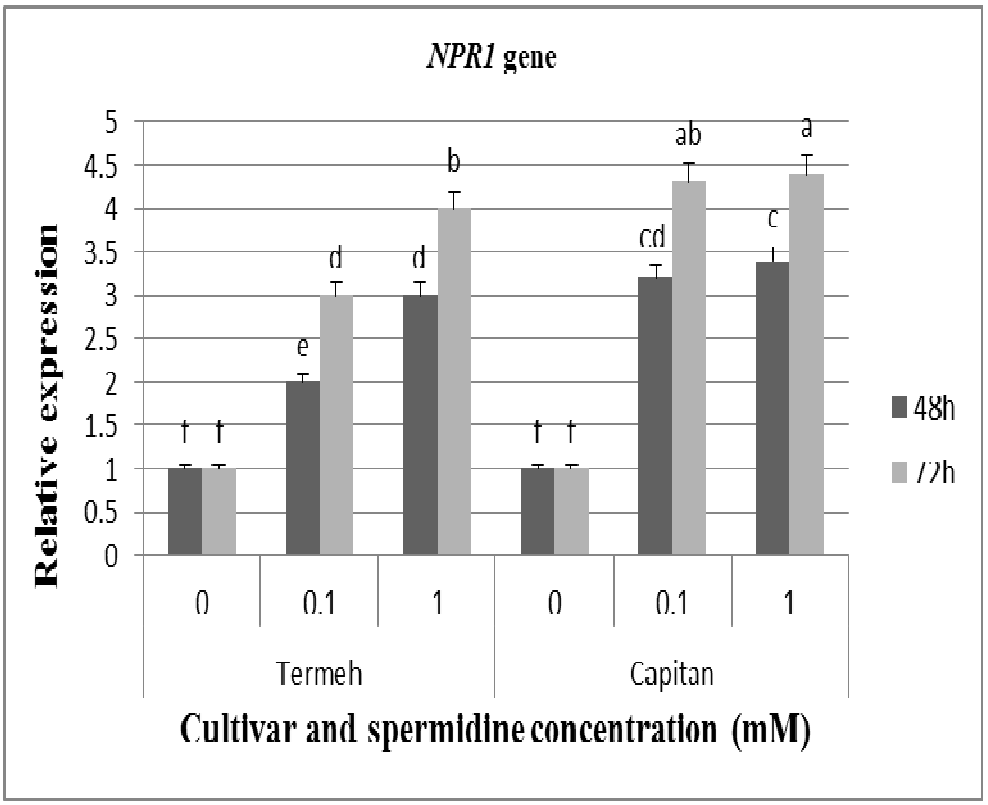
با توجه به نقش مؤثر این ژن در مسیرهای مقاومتی گیاهان، می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد اسپرمیدین می‌تواند در مسیرهای بالادستی القا مقاومت القایی مؤثر باشد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن نشان دادند که بیشترین میزان تغییرات ژنی مربوط به‌به ژن *eds1* بوده که رقم حساس کاپیتان بیشترین میزان بیان ژن را نشان داده است (شکل ۶).

ژن *pds* کمترین میزان بیان را در هر دو رقم نشان داد (شکل ۷). با افزایش میزان غلظت اسپرمیدین میزان بیان ژن‌ها در رقم متحمل ترمه افزایش یافته است ولی در رقم حساس کاپیتان تغییر معنی‌داری را نشان نداده است.

جدول ۲. نتایج تجزیهٔ واریانس صفات مربوط به فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و محتوای فنل کل طی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی بوسیلهٔ قارچ *Fusarum oxysporum* f.sp. *lycopersici*

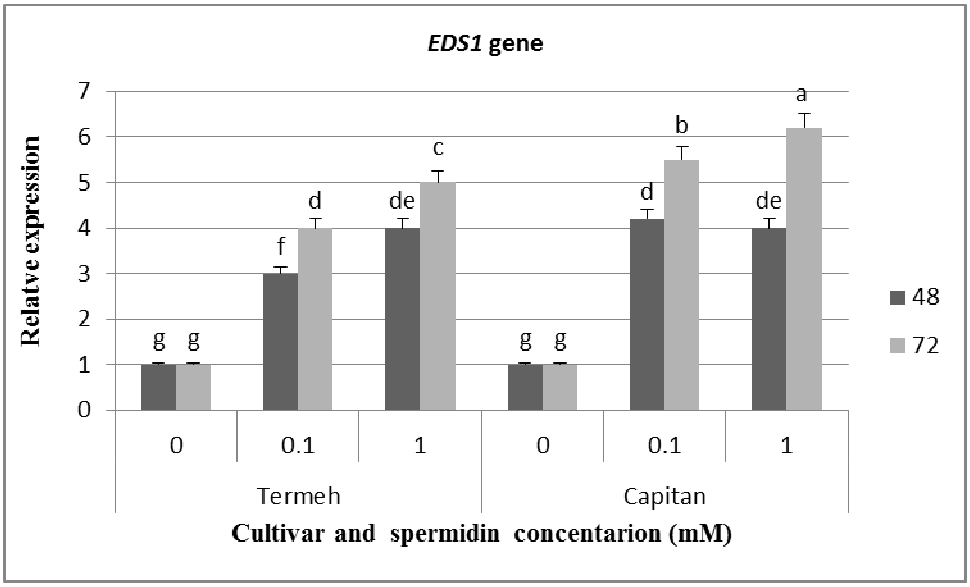
Table 2. Analysis of variance results of related traits to Polyphenol oxidase, Catalase, and Ascorbat proxidase enzymes activities and total Phenol content during 72 h after inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Source of variation	Ascorbat proxidase	Catalase	Polyphenol oxidase	Total Phenol content	Freedown
Stress	333.484**	778,545**	805.851**	0.052^{ns}	1
Hormone	1168.943**	434.128**	1580.081**	16.194**	1
Cultivar	222.574**	162.912**	9542.134**	20.786**	2
Stress×Hormone	182.555**	294.725**	2160.874**	27.086**	1
Stress×Cultivar	3029.669**	43.137**	12045.077**	4.754*	2
Cultivar ×Hormone	1248.278**	2243.789**	725.532**	7.674**	2
Cultivar ×Stress× Hormone	1326.302**	3462.766**	544.708**	117.919**	2
Stress	0.077	0.013	0.052	0.003	24



شکل ۵. اثر اسپرمیدین بر میزان تغییرات بیان ژن *NPR1* در دو رقم ترمه و کاپیتان آلوده به‌وسیلهٔ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در دو بازهٔ زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از بیماری.

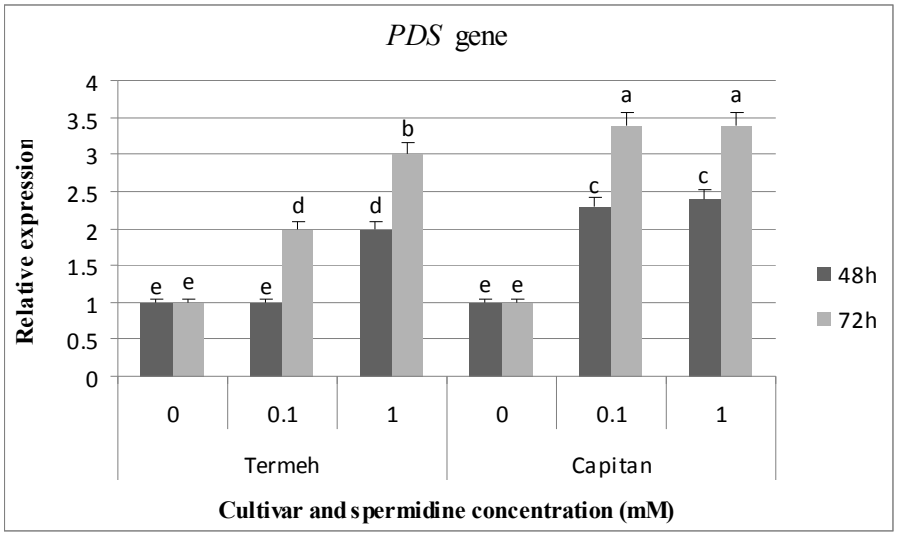
Figure 5. The effect of spermidine on relative expression of *npr1* gene in two tomato cultivars Termeh and Capitan infected with *F. oxusporum* f.sp. *lycopersici* at two time periods (48 and 72 h) after inoculation.



شکل ۶. اثر اسپرمیدین بر میزان تغییرات بیان ژن *EDS1* در دو رقم ترمه و کاپیتان آلوده به‌وسیلهٔ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در دو بازهٔ زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از بیماری.

Figure 6. The effect of spermidine on relative expression of *npr1* gene in two tomato cultivars Termeh and Capitan infected with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* at two time periods (48 and 72 h) after inoculation.

.



شکل ۷. اثر اسپرمیدین بر میزان تغییرات بیان ژن *PDS* در دو رقم ترمه و کاپیتان آلوده به‌وسیلهٔ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در دو بازهٔ زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از بیماری.

The effect of spermidine on relative expression of *npr1* gene in two tomato cultivars Termeh and Capitan infected with *F. oxusporum* f.sp. *lycopersici* at two time periods (48 and 72 h) after inoculation.

آنالیز بیان ژن در بازهٔ زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی نشان داد که میزان تغییرپذیری بیان ژن‌های مورد مطالعه نسبت به بازهٔ زمانی ۴۸ ساعت بعد از آلودگی بیشتر بوده است ولی در این بازه نیز بالاترین میزان

بیان برای ژن *eds1* ثبت شد. همانند بازهٔ ۴۸ ساعت بعد از آلودگی در این بازه نیز بین غلظت اسپرمیدین و افزایش بیان رابطهٔ مستقیمی وجود دارد.

بحث

کنترل بیماری‌های خاک زاد گیاهی با استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی علاوه بر لزوم هزینه کرد بالا، می‌تواند منجر به آلودگی‌های زیست‌محیطی شود. روش‌های مختلفی بر مبنای حفاظت از محیط‌زیست در راستای کنترل بهینه بیماری‌های گیاهی به‌ویژه بیماری‌های خاک زاد برای محصولات مختلف گیاهی به‌وسیله گروه‌های پژوهشی مختلف ارایه شده است (García-Fraile, *et al*., 2017; Mishra, *et al.,* 2015; Pathak, *et al.,* 2017Sarma, *et al.*, 2015;). بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از قارچ *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* یکی از بیماری‌ها قارچی مهم گلخانه‌ای در ایران بشمار می‌آید که خسارت قابل‌توجهی را به محصولات صیفی و سبزی ازجمله گوجه‌فرنگی وارد می‌کند. امروزه استفاده از عوامل کنترل زیستی و القاءکننده‌های مقاومت به‌عنوان روش‌های جایگزین سالم برای عوامل شیمیایی به‌شدت مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، از روش القای مقاومت به‌وسیله پلی‌آمین اسپرمیدین جهت کنترل و کاهش میزان بیماری استفاده شد. داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که علاوه بر توانایی گیاه برای بیان مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) که پس از آلودگی اولیه در گیاه تولید می‌شود، هورمون اسپرمیدین با افزایش سطح آنزیم‌های اندازه‌گیری‌شده، سبب ایجاد مقاومت به نام مقاومت سیستمیک القاء شده (ISR) در گیاه شده است. اثر کاربرد خارجی اسپرمیدین بر روی تغییرات آنزیمی نشان داد که این هورمون علاوه بر افزایش سطح آنزیم‌ها سبب افزایش رشد محسوس رویشی گیاه شده است که این افزایش رشد می‌تواند درنتیجه افزایش جذب مواد غذایی و تحرکات هورمونی باشد. پوترسین و پلی‌آمین‌های اسپرمیدین و اسپرمین در طیف گسترده‌ای از موجودات ازجمله باکتری‌ها تا گیاهان و حیوانات در فعال کردن مولکول‌های کوچک و اساسی که در ارتقاء رشد و نمو گیاهچه و تولید اسیدهای نوکلئیک نقش دارند (Walters, 2003). سوخت‌وساز پلی‌آمین‌ها که در مدت‌زمان طولانی شناخته شده است در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در گیاه تغییر می‌کند و تحمل تغییرات عمیق در گیاهان در تعامل با بیمارگرهای قارچی و ویروسی را بالا می‌برد (Rajam, e*t al.,* 1985). افزایش میزان اسپرمیدین در گیاه جو آلوده به زنگ قهوه‌ای و همچنین در گیاه جو آلوده به بیماری سفیدک پودری که همراه با افزایش میزان آنزیم‌های کاتالیکی مسئول در تولید پلی‌آمین‌ها هستند نشان از نقش این مواد در واکنش‌های حساسیتی به تنش‌های زیستی دارد (Walters, 2000; Walters, 2003). این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر پلی‌آمین اسپرمیدین بر میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های دفاعی و درنتیجه کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی در گوجه‌فرنگی در ۳ غلظت ۰، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار از هورمون اسپرمیدین انجام و نتایج نشان دادند که در میزان آنزیم‌های موردبررسی در تمام تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. کاربرد خارجی متیل جاسمونات در گیاه گندم آلوده به قارچ فوزاریوم عامل اسکب گندم نیز نشان از افزایش تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بوده است. در یک پژوهش که روی گیاه خیار آلوده به بیماری بوته‌میری انجام شده است، نتایج مشابهی با این نتایج مشاهده شده‌اند (Sabbagh, *et al.,* 2018). مشاهدهٔ چنین نتایجی نشان می‌دهد که گیاهان در مواجه با تنش‌های زیستی، مسیرهای مولکولی مقاومتی خود را فعال و گسترش می‌دهند. چنین مسیرهایی می‌تواند منجر به تولید واکنش‌های مقاومتی فوق حساسیت در گیاهان از طریق محدودکردن کردن عامل بیمارگر در نواحی آلوده از طریق ایجاد سدهای دفاعی و تولید لیگنین و سوبرین شود. افزایش میزان آنزیم پلی‌فنل اکسیداز می‌تواند نشانه‌هایی از ایجاد مقاومت در گیاه باشد. افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ممکن است سازوکارهای دفاعی گیاه ازجمله تسریع در فعالیت چوبی (لیگنینی) شدن و ایجاد پل‌های عرضی هیدروکسی پرولین در

دیوارهٔ سلول‌ها را باعث شود که منجر به مقاوم‌سازی بافت‌های ریشهٔ گیاه شده و از توسعهٔ قارچ جلوگیری می‌کند.

در این پژوهش اثر بازدارندگی کاربرد خارجی هورمون اسپرمیدین واکنش بازدارندگی از طریق واکنش فوق حساسیت را نشان نداد.

نتایج بررسی‌های بیوشیمیایی نشان داد که میزان فنل کل و آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار هورمون بیشترین میزان افزایش را در گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری داشته است ولی بیشترین میزان تغییرات آنزیم‌های آسکوربیت و کاتالاز در محلول‌پاشی با غلظت ۱ میلی‌مولار هورمون بوده است. این تفاوت در میزان تغییرات آنزیمی می‌تواند ناشی از نقش آن‌ها در واکنش‌های دفاعی به‌ویژه در ساعات اولیهٔ برخورد با بیماری باشد. همچنین غلظت بالای اسپرمیدین حاکی از نیاز به غلظت بیشتر این هورمون برای شرکت در واکنش‌های دفاعی به‌صورت غیرمستقیم از طریق فعال نمودن آنزیم‌های دفاعی است. در پژوهش‌های مختلفی در اثر کاربرد کودهای زیستی و القاء کنندگان مقاومت سیستمیک انجام شده است (Sabbagh, *et al*., 2016, Sabbagh, *et al.,* 2017) میزان اکثر آنزیم‌های موردبررسی نسبت به گیاهان غیر تیمار شده افزایش داشته است که همگی نشان‌دهندهٔ نقش این آنزیم‌ها در القاء مقاومت گیاهان به بیمارگرها است.

البته در تمام موارد، کاربرد القاکنندگان مقاومت در گیاهان منجر به افزایش آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز نشده است. کاربرد اسید سالیسیلیک در گیاه سیب‌زمینی آلوده به قارچ *Rhizoctonia solani* نشان از کاهش این آنزیم نسبت به عدم کاربرد اسید سالیسیلیک داشته است (Hadi *et. al.*, 2016) که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی ندارد. توجیه پژوهش‌گران در این موارد، افزایش میزان انواع اکسیژن فعال (O_2، OH- و H_2O_2) ذکر شده است که می‌تواند برای قارچ سمی باشد ولی در چنین مواردی ممکن است این رادیکال‌های آزاد باعث مرگ سلول شود که در بیماری‌های ایجادکنندهٔ نکروز با واکنش فوق حساسیت قابل توجیه است ولی در روابط بیوتروفی و پژمردگی‌های آخر دوره رشد، نمی‌تواند قابل‌تصور باشد. با توجه به بررسی منابع به‌عمل‌آمده در هیچ مطالعه‌ای نقش کاربرد خارجی پلی‌آمین‌ها در ایجاد مقاومت و بازدارندگی بیمارگر در گیاهان بیمار بررسی نشده است ولی پژوهش‌های بی‌شماری در ارتباط با میزان تغییرات این مواد در گیاهان بیمار بررسی شده و نشان داده شده است که در گیاهان مقاوم یا متحمل، میزان آنزیم‌های دخیل در تولید پلی‌آمین‌ها از اسیدآمینه‌های آرژنین و اورنیتین که هر دو نقش حذف یک مولکول CO_2 را بر عهده دارند افزایش یافته است (Takahashi, 2016; Walters, 2003Xie, *et al.*, 2014). در بررسی میزان بیان ژن‌های *eds1*، *npr1* و *pds* تفاوت معنی‌داری در میزان بیان این ژن‌ها با گیاهان شاهد مشاهده نشد. با توجه به مسیرهای علامت‌دهی اسید سالیسیلیک در گیاهان و ارتباط مستقیم بیان این ژن‌ها به‌عنوان محرک فاکتورهای نسخه‌برداری چنین برمی‌آید که ترکیبات پلی‌آمینی ارتباط مستقیمی در مسیرهای علامت‌دهی سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات ندارند و درنتیجه بیان این ژن‌ها تحت تأثیر قرار نگرفته است. ولی با این وجود افزایش میزان بیان ژن‌ها در رقم حساس می‌تواند به علت فعال شدن مسیر پاسخگویی به تنش بیماری باشد ولی آیا این ژن‌ها به‌طور مستقیم باعث ایجاد مقاومت در گیاه می‌شوند یا خیر، نیاز به بررسی پروتئومیکس و همچنین خاموش‌سازی این ژن‌ها در گیاه دارد. هرچند عدم افزایش بیشتر این ژن‌ها در رقم متحمل این گمانه‌زنی را بیشتر کرده است که این ژن‌ها نمی‌توانند به‌عنوان ژن‌های اصلی ایجادکننده مقاومت القایی ارقام در برابر این قارچ به‌حساب آیند اگرچه برای عوامل بیماری‌زای دیگری مانند باکتری‌ها در این محصول می‌تواند متفاوت باشد. در یک کار قبلی بررسی ژن خاموشی در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری *Ralstonia solanacearum* نشان دادیم که در بین سه ژن فوق، ژن *npr1* و *eds1* نقش مهمی در مسیر مقاومتی گیاه بازی می‌کنند به‌طوری‌که گیاهان گوجه‌فرنگی مقاوم بیمار حامل پلاسمیدهای نوترکیب بیان‌کننده توالی‌های مربوط به این دو ژن، در برابر بیماری حساس شدند و علایم بیماری را نشان دادن

درحالی‌که در گیاهانی که فاقد پدیده ژن خاموشی بودن این اتفاق نیافتاد و بشدت بیماری بسیار کم بوده است (Bolok Yazdi, *et al*., 2018). نقش مقاومتی این ژن‌ها در بیماری‌های ویروسی با پدیده‌های ژن خاموشی به اثبات رسیده است (Liu, *et al*., 2002, Villanueva-Alonzo, *et al.,* 2013) ولی در ارتباط با بیماری‌های قارچی و همچنین مسیرهای علامت‌دهی به‌غیراز سالیسیک اسید یا اتیلن و جاسمونات ها در القا بیان این ژن‌ها، اطلاعات دقیقی در دست نیست. در این مطالعه سعی شد علاوه بر تعیین نقش اسپرمیدین در ایجاد مقاومت، گریزی هم به این سری از ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های کمتر مطالعه شده در مسیرهای القایی مقاومت زده شود ولی به علت اینکه محصولات پروتئین‌های این ژن‌ها نقش آنزیمی فعالی ندارند، اندازه‌گیری بیوشیمیایی آن‌ها برای بررسی مقاومت القایی مورد توجه قرار نگرفت است ولی آنالیزهای بیوانفورماتیکی توالی‌های پروتئینی برگرفته از اسیدهای آمینه می‌تواند در معرفی این ژن‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی در تعیین بهترین القاگرهای مقاومت و غربالگری ارقام مقاوم مفید باشد. نقش این ترکیبات پلی‌آمینی، حتی تولیدشده توسط خود گیاه در حالت بیماری در فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی نشده است. استفاده از القاءکنندگان مقاومت و حتی افزایش‌دهندگان رشد می‌تواند در راستای کشاورزی پایدار مورد توجه قرار گیرد ولی مسئله مهم در نوع و نحوه استفاده و مهم‌تر از همه میزان استفاده از آن‌ها است.

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های این پژوهش چنین نتیجه‌گیری می‌شود که اسپرمیدین به‌تنهایی نمی‌تواند به‌عنوان یک القاگر مقاومت کاربرد داشته باشد. کنترل تلفیقی بیماری با عوامل هم سازگار مانند میکوریزها یا باکتری‌های تحریک‌کنندهٔ رشد می‌توانند باعث بالا بردن اثربخشی هورمون‌های گیاهی شود. در این پژوهش آزمایشگاهی مشخص گردید که اگرچه آهنگ ایجاد مقاومت از طریق افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یکنواخت نبود ولی تا اندازه‌ای توانست در رقم حساس واکنش دفاعی گیاه را تحریک نماید. داده‌های بیان ژن نشان از آن دارد که این ژن‌ها اگرچه می‌توانند در مسیرهای مقاومتی نقش داشته باشند ولی به‌عنوان نشان‌گر مقاومتی در غربالگری ارقام نمی‌توانند استفاده شوند.

REFERENCES

1. Amini, J. & Sidovich, D. (2010). The effects of fungicides on Fusarium oxysporum f sp. lycopersici associated with Fusarium wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research*, 50(2), 172-178. (In Farsi)
2. Bolok Yazdi, H. R., Sabbagh, S. K., Mazaheri, M., Salar, M. & 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
3. Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W. & Bramley, P.M. (1994). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression). *Plant Physiology*, 105(1), 405-413 .
4. Fravel, D., Olivain, C. & Alabouvette, C. (2003). Fusarium oxysporum and its biocontrol. *New Phytologist*, 157(3), 93-502
5. García-Fraile, P., Menéndez, E., Celador-Lera, L., Díez-Méndez, A., Jiménez-Gómez, A., Marcos-García, M. & Rivas, R. (2017). Bacterial probiotics: a truly green revolution. *Probiotics and Plant Health*, 131-162
6. Holl, J.M., Bianchi, F.J., Entling, M.H., Moonen, A.C., Smith, B.M. & Jeanneret, P. (2016). Structure, function and management of semi□natural habitats for conservation biological control: a review of European studies. P*est Management Science*, 72(9), 1638-1652
7. Huang, J., Liu, J., Li, Y. & Chen, F. (2008). Solution & characterization of the phyton desaturase gene as apotential selective marker for genetic enginering of the astaxanthin production green algae *Chlorella zofingiensis*. *Journal of Phycology*, 44(3), 684-690 .

Jebara, S., Jebaram M., Limamm F., Aouanim ME. (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology*,162(8), 929-36

8. Kim, N.H., Kim, B. S. & Hwang, B.K. (2013). Pepper arginine decarboxylase is required for polyamine and γ-aminobutyric acid signaling in cell death and defense response. *Plant Physiology*, 162(4), 2067-2083 .
9. Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T. & Takahashi, Y. (2007). Advances in polyamine research in 2007. *Journal of Plant Research*, 120(3), 345-350 .
10. Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R. & DineshKumar, S. (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N□mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 30(4), 415-429 .
11. Lois, L.M., Rodríguez□Concepción, M., Gallego, F., Campos, N. & Boronat, A. (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1□deoxy□D□xylulose 5□phosphate synthase. *The Plant Journal*, 22(6), 503-513 .
12. Mandal, S., Mallick, N. & Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(7), 642-649
13. Mishra, S., Singh, A., Keswani, C., Saxena, A., Sarma, B. & Singh, H. (2015). Harnessing plant-microbe interactions for enhanced protection against phytopathogens Plant Microbes Symbiosis: *Applied Facets*, 111-125
14. Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland , W.H. & Granell, A. (2006). Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology*, 140(1), 3-11 .
15. Pathak, D., Kumar, M. & Rani, K. (2017). Biofertilizer application in horticultural crops. In: Deepak, P., Ygeshvari, K.J., Vyas, R. & Shelat, H. (Ed.). Microorganisms for Green Revolution: *Microb for sustainable crop protection*,1, 215-227).
16. Prabhavathi, V.R. & Rajam, M.V (2007). Polyamine accumulation in transgenic eggplant enhances tolerance to multiple abiotic stresses and fungal resistance. *Plant Biotechnology*, 24(3), 273-282 .
17. Rajam, M. V., Weinstein, L. H. & Galston, A. W. (1985). Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamine biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6874-6878 .
18. Sabbagh, E., Sabbagh, S.K., Panjehkeh, N. & Bolok-Yazdi, H.R. (2018). Jasmonic Acid Induced Systemic Resistance in Infected Cucumber by Pythium aphanidermatum. *Tarim Journal of Agricultural Sciences*, 24(1), 143-152 .
19. Sabbagh, S.K., Kermanizadeh, B., Gholamalizadeh, A. & 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 Farsi)
20. Sabbagh, S.K., Poorabdollah, A., Sirousmehr, A. & Gholamalizadeh, A. (2017). Bi-fertilizers and Systemic Acquired Resistance in Fusarium Infected Wheat. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19(2), 453-464
21. Sabbagh, S.K., Roudini, M. & 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 ..(In Farsi)
22. Sabbagh, S.K., Kermanizadeh, B., Gholamalizzadeh Ahangar, A. & Sirousmehr, A. (2016). Effects of fertilizer treatments on components, performance components and induce resistance to wheat scab disease. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 1(47), 77-85. (In Farsi)
23. Sarma, B.K., Yadav, S.K., Singh, S. & Singh, H. B. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, 25-33 .
24. Seevers, P., Daly, J. & Catedral, F. (1971). The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physiology*, 48(3), 353-360 .
25. Takahashi, Y. (2016). The role of polyamines in plant disease resistance. *Environmental Control in Biology*, 54(1), 17-21 .
26. Villanueva-Alonzo, H.J., Us-Camas, R.Y., López-Ochoa, L. A., Robertson, D., Guerra-Peraza, O., Minero-García, Y. & Moreno-Valenzuela, O.A. (2013). A new virus-induced gene silencing vector based on Euphorbia mosaic virus-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology Letters*, 35(5), 811-823 .
27. Waie, B. & Rajam, M.V. (2003). Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Science*, 164(5), 727-734 .

28. Walters, D. (2000). Polyamines in plant–microbe interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(4), 137-146 .
29. Walters, D. R. (2003). Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*, 64(1), 97-107 .
Weydert, CJ, & Cullen, JJ. (2010), Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*, 5(1),51.
30. Xie, S.., Wu, H.-J., Zang, H.-Y., Wu, L.-M., Zhu, Q. & Gao, X.-W. (2014). Plant growth promotion by spermidine-producing Bacillus subtilis OKB105. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(7), 655-663 .
31. Yoda, H., Fujimura, K., Takahashi, H., Munemura, I., Uchimiya, H. & Sano, H. (2009). Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host-and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Molecular Biology*, 70(2), 103-112 .