اثر کود نیتروکسین بر میزان بیان ژن *Chitinase* و *Cupi4* در گیاهچه‌های خیار آلوده به *Pythium aphanidermatum*

Effects of Nitroxin Fertilizers on Gene Expression of *Chitinase* and *Cupi4* Genes in Cucumber Seedlings Infected to *Pythium aphanidermatum*

شاهو ولی‌زاده[۱] و سیدکاظم صباغ[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۱

چکیده

خیار میزبان بسیاری از عوامل بیماریزای خاکزاد می‌باشد. شبه‌قارچ *Pythium apanidermatum* به‌عنوان یک عامل خاکزاد، سبب بیماری بوته‌میری در خیار می‌گردد. با توجه به توسعه کشاورزی پایدار، استفاده از کودهای بیولوژیک برای مدیریت بیماری‌های گیاهی امری ضروری خواهد بود. در این تحقیق اثر کود نیتروکسین در مقاومت گیاهچه‌های خیار (رقم ES-2862) مورد بررسی قرار گرفت. بعد از تیمار گیاهچه‌های آلوده با نیتروکسین، شدت بیماری در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری شد. از برگ گیاهچه‌ها برای استخراج RNA کل و بررسی بیان کمی دو ژن مسئول مقاومت در گیاه با PCR زمان واقعی استفاده شد. نتایج این ارزیابی نشان داد که شدت بیماری در اثر اعمال کود نیتروکسین کاهش یافت. همچنین بیان ژن‌های *Chitinase* و *Cupi4* در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح افزایش یافت. میزان بیان ژن *Cupi4* نسبت به ژن *Chitinase* تغییرات بیشتری داشت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که کاربرد نیتروکسین می‌تواند باعث افزایش مقاومت خیار علیه بیماری مرگ گیاهچه شود.

واژه‌های کلیدی: کود زیستی، نیتروکسین، بیان ژن، خیار، qRT-PCR

۱. دانش آموخته کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل

۲. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه یزد، یزد

*: نویسنده مسوول Email: sksabbagh@yazd.ac.ir

مقدمه

خیار با نام علمی *Cucumis sativus* یکی از رایج‌ترین و گسترده‌ترین محصولات صیفی کشت داده شده در جهان می‌باشد. این گیاه میزبان بسیاری از عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد و هوازاد است *تولایی* (Tolaei, 2013). عوامل مختلفی روی رشد خیار نقش دارند که از آن جمله می‌توان به تغذیه متعادل با کودها اشاره نمود. رشد گیاه بستگی به فراهم بودن نیتروژن در خاک دارد، زیرا این عنصر در ساختار پروتئین‌ها، آمینواسیدها، اسیدهای نوکلئیک و سایر ترکیبات گیاهی حضور دارند *مانوئل روئیز و رومرو* (Manuel Ruiz and Romero, 1999). در میان بیماری‌ها، بوته‌میری جالیز ناشی از *P. aphanidermatum* به‌عنوان مهم‌ترین عامل پوسیدگی ریشه و طوقه در گلخانه‌ها، ازجمله عوامل محدودکننده کشت محصول می‌باشد *الهی‌نیا؛ اسماعیلی شیرازی‌فرد* و *بنی هاشمی* (Elahinia, 2009; Esmaeili Shirazifard and Banihashemi, 2009). قارچ بیمارگر در تمام مراحل رشدی در صورت وجود شرایط مساعد می‌تواند بوته‌ها را مورد حمله قرار دهد. محل حمله عامل بیمارگر قارچی باریک و نرم گردیده و از بین می‌رود *روانلو و بنی‌هاشمی* (Ravanlou and Banihashemi, 2003). کودهای بیولوژیکی از دیرباز توسط انسان مورد استفاده قرار گرفته ولی در چند دهه اخیر که استفاده از کودهای شیمیایی رایج گردید، کودهای بیولوژیکی به فراموشی سپرده شدند. با این وجود، امروزه به‌دلیل استفاده بی‌رویه از کودهای شیمیایی و اثرات زیان‌بار آن بر سلامت انسان و خاک، بشر به استفاده از کودهای بیولوژیکی برای تأمین نیاز گیاهان روی آورده است *آسترایی و کوچکی* (Asteraei and Koucheki, 1996). نخستین کود میکروبی با نام تجاری نیتراژین در سال ۱۸۹۵ میلادی برای فروش عرضه شد و پس از آن تعدادی کودهای دیگر، حاوی باکتری‌های ازتوباکتر و فسفوباکترها تولید شدند که به‌دلیل هم‌زمانی با تولید کودهای شیمیایی، موفقیت چندانی به‌دست نیاوردند *قلاوند* و همکاران (Ghalavand *et al.*, 2006). نیتروکسین حاوی مجموعه‌ای از مؤثرترین سوش‌های باکتری‌های تثبیت‌کننده از جنس *Azotobacter*/*Azospirillum* و حل‌کننده فسفات از جنس *Pseudomonas* می‌باشد. باکتری‌های جنس ازتوباکتر و آزوسپیریلوم از مهم‌ترین باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌باشند که علاوه‌بر تثبیت زیستی نیتروژن، با تولید مقادیر قابل ملاحظه‌ای از هورمون‌های تحریک‌کننده رشد به‌ویژه انواع اکسین، جیبرلین و سیتوکنین، رشد و نمو و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند *کریمی و صدیق* (Karimi and Siddique, 1991). در زمان وقوع بیماری در گیاه، عکس‌العمل مولکولی گیاه منجر به بیان ژن‌های مسئول مقاومت می‌شود که محصولات پروتئینی این ژن‌ها تحت عنوان پروتئین‌های خاص موسوم به پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن پدید می‌آیند که توان مقابله با بیماری را دارند *ساراوانان* و همکاران (Saravanan *et al.*, 2004). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی که اغلب پروتئین‌های PR خوانده می‌شوند، شامل گروه متنوع از پروتئین‌های گیاهی هستند. این پروتئین‌ها توزیع گسترده‌ای در گیاهان داشته ولی در مقدار بسیار پایینی وجود دارند. اما به دنبال حمله عوامل بیماری‌زا یا تنش‌های محیطی، در غلظت بسیار بالاتری تولید می‌شوند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری به‌صورت درون سلولی و برون سلولی، به‌ویژه در دیواره‌های سلولی بافت‌های مختلف گیاهی وجود دارند. انواع متفاوتی از پروتئین‌های مرتبط با بیماری از گیاهان مختلف جدا شده‌اند. اندام‌های مختلف گیاه مانند برگ‌ها، ریشه‌ها و بذرها ممکن است مجموعه‌های مختلفی از پروتئین‌های PR را تولید کنند. القاء پروتئین‌های مرتبط با دفاع در بسیاری از گونه‌های گیاهی در برابر آلودگی باکتری، قارچ، ویروس و یا حمله حشرات ثابت شده است. این نوع پروتئین‌ها در تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها، تکامل خود را حفظ نموده‌اند *وان لون* و همکاران (Van Loon *et al.*, 1994). مشخص گردیده است که بیان هم زمان دو یا چند ژن *PR*، با اثر تشدیدکنندگی باعث افزایش مقاومت و در نتیجه کنترل مؤثرتر بیماری می‌گردد *زوو* و همکاران (Zhu *et al.*, 1994). تلقیح خیار با پاتوژن‌های مختلفی نشان داده که مولکول‌های mRNA مربوط به ژن *Cupi*4 به‌صورت سیستمیک در برابر پاتوژن‌ها در گیاه خیار تجمع یافته و با تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری موجب ایجاد مقاومت در برابر این پاتوژن‌ها می‌شود *فانتومارت* و همکاران (Phuntumart *et al.*, 2006). کیتین پس از سلولز بزرگ‌ترین منبع توده زیستی تجدیدپذیر در طبیعت می‌باشد. این پلی‌مر در دیواره سلولی برخی قارچ‌ها وجود دارد. کیتیناز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های زیستی می‌باشد که در تجزیه مواد کیتینی نقش اساس و اولیه دارد در بنابراین اولین و مهم‌ترین مرحله در تجزیه طبیعی کیتین، ترشح آنزیم‌های کیتینازی می‌باشد. میزان این آنزیم در بسیاری از گیاهان در مواجهه با عوامل تنش‌زای زیستی و غیرزیستی افزایش می‌یابد *پانژا و زانگ* (Punja and Zhang, 1993). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی همچون کیتیناز که نقش ضدباکتریایی و ضدقارچی دارد در ارتباط با مقاومت سیستمیک القایی می‌باشد *استیکر* و همکاران (Sticher *et al.*, 1997). در حالت مقاومت اکتسابی، مسیرهای دفاعی گیاه علیه عامل

بیماری از طریق فعال شدن ژن‌های مرتبط فعال شده و پروتئین‌های حاصل با مسیرهای مختلف باعث جلوگیری از توسعه بیماری در کل گیاه می‌شود *ریالز* و همکاران (Ryals *et al.*, 1996). تولید گیاهان مقاوم به‌عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی و ویروسی از طریق انتقال ژن‌های کدکننده مواد ضدمیکروبی، روش امیدوارکننده‌ای برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی است *زاسلوف* (Zasloff, 2002). یکی از مشهورترین مثال‌ها، تولید گیاهان تراریخته‌ای است که از طریق افزایش بیان ژن‌های کیتیناز مقاومت زیادی نسبت به عوامل بیماری‌زا کسب کرده‌اند *سارینا* و همکاران (Sareena *et al.*, 2006). استفاده از تکنیک کمیت‌سنجی مقادیر یک ژن در زمان بیان واقعی (qRT-PCR)، روش مناسبی برای مطالعه تظاهر ژن‌ها با دقت و حساسیت زیاد و اطمینان بالا به‌شمار می‌رود. این روش بیشترین حساسیت را در بین روش‌های کمی دارد و می‌توان از آن برای مقایسه سطوح mRNA برای تعیین الگوی تظاهر ژن و تفاوت بین گونه‌های خویشاوندی و تجزیه ساختار RNA استفاده نمود *بوستین* (Bustin, 2000). بدین‌منظور در این پژوهش، اثر کود نیتروکسین در القاء مقاومت خیار به *P. aphanidermatum* و بیان ژن‌های *Chitinase* و *Cupi4* مسئول در مقاومت به بیماری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کاشت و آماده سازی گیاه

خیار رقم ES-2862 (بذر F1) جهت کشت و آماده‌سازی گیاه استفاده شد. کود نیتروکسین (Nitroxin) در بسته‌بندی‌های تجاری (شرکت آوای زمین) به‌صورت محلول تهیه گردید. مخلوط خاک شامل خاک بکر و ماسه شسته شده به نسبت ۱: ۱، قبل از استفاده، با اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱ اتمسفر به‌مدت یک ساعت سترون شد. کود نیتروکسین که به‌صورت مایع می‌باشد به‌صورت پوشش بذری قبل از کاشت (به‌مدت ۵ دقیقه در محلول نیتروکسین) استفاده شد. بذرهای خیار در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلدان‌های ۱/۵ کیلویی با ۴ تکرار کشت گردید. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲۷°C- ۲۵ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۷۰ درصد قرار گرفت و به با آب مقطر استریل فاقد مواد مغذی آبیاری انجام شد.

تهیه اینوکلوم و تعیین پیشرفت بیماری‌زایی

به‌منظور تهیه مایه تلقیح جهت آزمون بیماری‌زایی، قطعاتی از محیط‌کشت حاوی کلنی قارچ به پتری‌دیش حاوی محیط کشت جامد CMA (Corn Meal Agar, Merck, Germany) منتقل و جهت رشد سریعتر قارچ عامل بیماری زا به رشد سریع، تعداد ۲۰ عدد بذر ضدعفونی شده شاهدانه به محیط اضافه گردید. سپس پتری‌دیش‌ها به داخل گرمخانه در دمای ۲۵ ±۱°C منتقل شدند. پس از بازبینی‌های مرتب با مشاهده کلنیزه شدن بذرهای شاهدانه بوسیله پرگنه قارچ عامل بیماری زا، از آنها جهت تلقیح در هر گلدان مورد استفاده قرار گرفت. بدین‌وسیله جهت تلقیح گیاهچه‌ها، ابتدا، اطراف طوقه هر گیاهچه در مرحله ۲-۳ برگی در عمق یک سانتی‌متری از خاک، سه عدد بذر شاهدانه قرار داده شد و سپس به‌وسیله ماسه استریل پوشانده شد. پس از مایه‌زنی، به‌منظور افزایش رطوبت محیط، روی گیاهان و سطح گلدان با آب مقطر مه‌پاشی صورت گرفت و پوشش پلاستیکی سلوفان روی آن‌ها کشیده شد. رطوبت نسبی در زیر پوشش پلاستیکی ۹۵ درصد حفظ شد. پس از ۷۲ ساعت پوشش پلاستیکی برداشته شده و گیاهچه‌ها در دما و رطوبت طبیعی نگهداری شدند. یادداشت‌برداری از نمونه‌ها دو هفته بعد از تلقیح به مدت ۳۰ روز انجام شد. برای ارزش‌گذاری شدت آلودگی و ارزیابی عکس‌العمل گیاهان در مقابل عامل بیماری و تعیین پیشرفت بیماری با شمارش لکه‌های نکروزه در تیمار آلوده با کود و مقایسه آن با شاهد آلوده بدون کود انجام گرفت *اوزگونن و ارکیلیک* (Ozgonen and Erkilic, 2007).

طراحی آغازگرهای مورد استفاده

از توالی ژن *Cupi4* (DQ482461.1) و ژن *Chitinase* (HM015248.1) برای طراحی آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن استفاده شد. جهت طراحی آغازگرها از نرم‌افزار Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3) استفاده شد. مناسب‌ترین آغازگر با توجه به وضعیت بازهای آلی تشکیل دهند انتخاب و با آغازگرهای این ژن‌ها در منابع علمی مورد ارزیابی قرار گرفت *فانتومارت* و همکاران (2006). از ژن *Actin* (AB010922) به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده در مطالعه بررسی تأثیر نیتروکسین در بیان ژن‌های دخیل در مقاومت القایی خیار

Table 1: The primers used in study of the effect of nitroxin on expression of involved genes in cucumber acquired resistance

ژن Gene	آغازگر رفت Forward primer	آغازگر برگشت Reverse primer	طول قطعه Fragment length	دمای ذوب Annealing temperature
Chitinase	CCGCAGTGTCCAATACCAGA	GCCGTCCACTGATTCCATGA	149	**60.5**
Cupi4	TCACTGTGGTGTGTGCTCTC	ACTCAAGCCATTGCCTTCCA	180	**59.5**
Actin	GAAGGAATAACCACGCTCAG	ACACAGTTCCCATCTACGAG	117	**60**

جدول ۲: آنالیز بیان ژن‌های *Cupi4* و *Chitinase* با نرم‌افزار Rest ۲۴ ساعت بعد از تلقیح: نیتروکسین همراه با آلودگی (IN)، آلودگی بدون نیتروکسین (IWN) و شاهد (C)

Table 2: Gene expression analysis of *Cupi4* and *Chitinase* genes by Rest software 24 h post infection: Infected with nitoxin (IN), Iinfected without nitroxin (WN) and Control (C)

تیمار Treatment	ژن Gene	نوع Type	کارایی واکنش Reaction efficiency	بیان Expression	خطای استاندارد Std. Error	نتایج Result
IWN	*Chitinase*	TRG	1.01	0.642	0.538-0.766	-
IWN	*Cupi4*	TRG	1.04	5.868	4.63-7.05	UP
IN	*Cupi4*	TRG	1.04	15.529	10.010-18.684	UP
IN	*Chitinase*	TRG	1.01	2.235	1.464-3.621	UP
C	*Cupi4*	TRG	1.04	1.529	1.010-3.684	UP
C	*Chitinase*	TRG	1.01	0.235	0.464-1.62	UP

جدول ۳: آنالیز بیان ژن‌های *Cupi4* و *Chitinase* با نرم‌افزار Rest ۴۸ ساعت بعد از تلقیح: نیتروکسین همراه با آلودگی (IN)، آلودگی بدون نیتروکسین (IWN) و شاهد (C)

Table 3: Gene expression analysis of *Cupi4* and *Chitinase* genes by Rest software 48h post infection: Infected with nitoxin (IN), Iinfected without nitroxin (WN) and Control (C)

تیمار Treatment	ژن Gene	نوع Type	کارآیی واکنش Reaction efficiency	بیان Expression	خطای استاندارد Std. Error	نتایج Result
IWN	*Chitinase*	TRG	1.01	0.750	0.418-0.666	-
IWN	*Cupi4*	TRG	1.04	7.868	9.633-12.941	UP
IN	*Cupi4*	TRG	1.04	18.529	16.212-22.645	UP
IN	*Chitinase*	TRG	1.01	3.150	2.446-4.512	UP
C	*Cupi4*	TRG	1.04	1.529	1.010-3.684	UP
C	*Chitinase*	TRG	1.01	0.845	1.464-3.621	UP

استخراج RNA و سنتز cDNA

از برگ‌های تهیه شده در مرحله ۴-۳ برگی گیاه جهت استخراج RNA استفاده شد. بدین منظور ۵۰ گرم از برگ‌های مربوط به هر تیمار با استفاده از ازت مایع در داخل هاون چینی پودر و استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری Cinnapure RNA (Sinaclon, Iran) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت مولکول‌های mRNA به‌ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و روش طیف‌سنجی با دستگاه اسکن‌دراپ (Scandrop, Analytika, Germany) انجام شد. سنتز رشته اول از مولکول‌های تک‌رشته‌ای mRNA با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR (Vivantis, Sinaclon, Iran) انجام گردید.

بررسی میزان بیان ژن

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در حالت القاء مقاومت در گیاه تحت تنش بیماری با استفاده از روش کمیت‌سنجی با استفاده از دستگاه لایت سایکلر ساخت شرکت کوربت (Curbet3000, Australia) انجام شد. محلول واکنش با حجم ۲۰ میکرو لیتر در تیوب‌های مخصوص تهیه گردید. این محلول شامل ۲ میکرو لیتر (۵۰ نانوگرم) cDNA، ۱ میکرو لیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکو مولار)، ۱۰ میکرو لیتر Hot Tag EvaGreen qPCR premix[with Rox dye (Biotium, Inc., Hayward,

CA, USA]) (ساخت شرکت سیناژن) و حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر عاری از آنزیم RNase به ۲۰ میکرو لیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. به منظور به‌دست آوردن دمای مناسب اتصال آغازگرها، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شیب دمایی توسط دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان انجام گرفت. دماهای مورد استفاده از ۵۹ تا ۶۳ درجه در نظر گرفته شد. پس از آن جهت تأیید سنتز تمام cDNAها واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط آغازگرهای ژن‌های *Cupi4* و *Chitinase* و ژن مرجع *Actin* انجام گرفت. چرخه‌های حرارتی واکنش شامل ۹۴°C به‌مدت ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه ۹۴°C به‌مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰°C به‌مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۳۰ ثانیه تنظیم گردید. هر آزمایش در چهار تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی انجام شد. داده‌های حاصل از سطح آستانه چرخه‌های هر واکنش با استفاده از روش *پی فافل* (Pffafl, 2001) و معادله زیر تجزیه و آنالیز شدند (*پی فافل*، 2001).

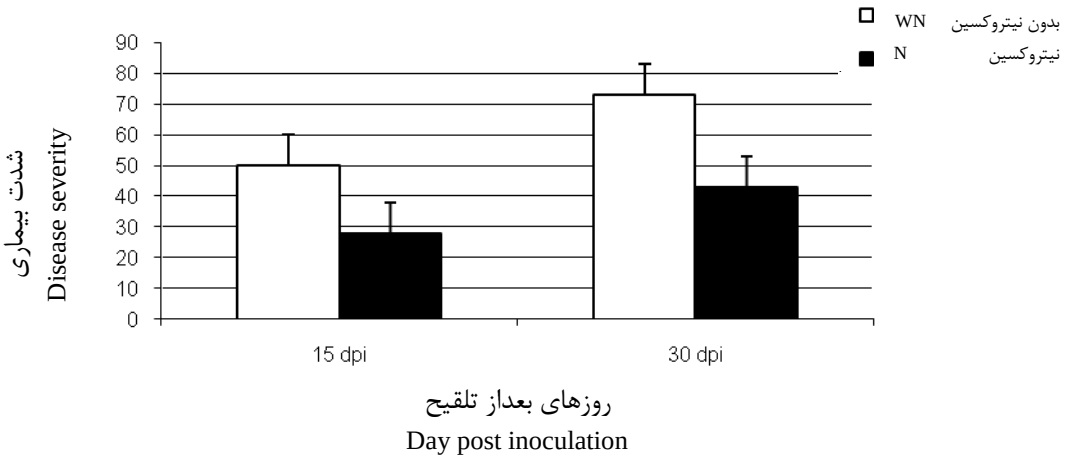
$$\text{Ratio} = \frac{Efficiency_{\ GOI}^{\Delta CP(control-sample)}}{Efficiency_{\ GHK}^{\Delta CP(control-sample)}}$$

در این معادله نسبت سطح بیان ژن هدف براساس راندمان واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (E) برای ژن هدف (GOI) و مرجع (GHK) و تفاوت (Δ) نقطه تقاطع (CP) یا محل برخورد نمودار خطی تکثیر با خط مربوط به سطح آستانه تکثیر (Ct) یک نمونه در مقابل کنترل (ΔCP control-sample) محاسبه می‌شود که در نهایت Ratio به‌دست می‌آید که بدون واحد می‌باشد که مقدار تغییرات بیان ژن در تیمارها نسبت به شاهد را نشان می‌دهد (*پی فافل*، 2001). آنالیز داده‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار REST 2009 که تخصصی داده‌های خروجی Real Time PCR می‌باشد انجام گرفت.

نتایج

درصد پیشرفت بیماری

بررسی شدت بیماری در گیاهچه‌های تلقیح شده در حضور کود نیتروکسین و بدون آن در فاصله زمانی ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از آلودگی نشان داد که در تیمارهای کودی شدت بیماری نسبت به شاهد آلوده کمتر بود. آنالیز داده‌های حاصل نشان داد که ۱۵ روز بعد از آلودگی شدت بیماری در حضور کود ۲۸ درصد بوده است و در این زمان در گیاه آلوده بدون کود این مقدار ۵۵ درصد تعیین شد. برای زمان ۳۰ روز بعد از آلودگی شدت بیماری در حضور کود ۴۳ درصد (متحمل) و بدون کود ۷۳ درصد تعیین شد (شکل ۱). نتایج این بخش نشان می دهد که کود نیتروکسین توانسته است میزان توسعه بیماری در گیاه را کاهش دهد.

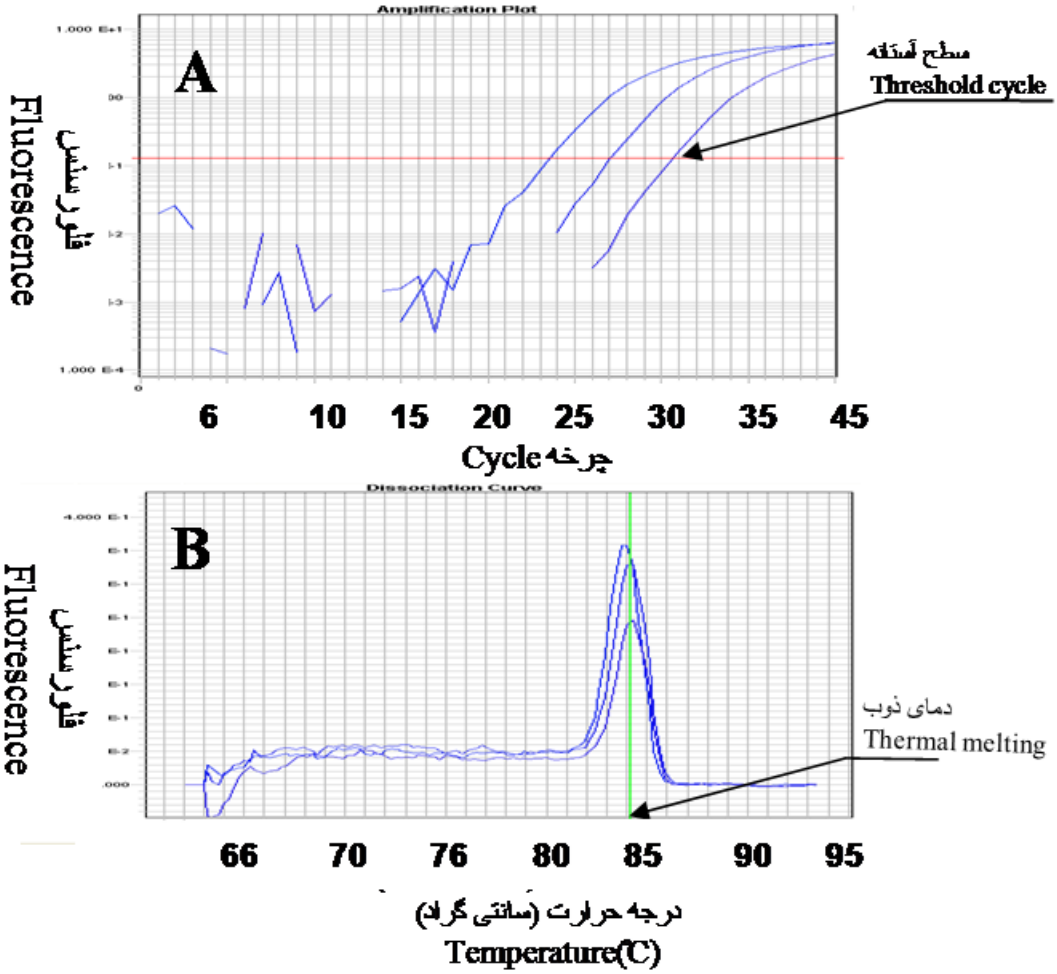


شکل ۱: تأثیر نیتروکسین بر پیشرفت بیماری در گیاهچه‌های خیار آلوده؛ تیمار با نیتروکسین (N) و بدون نیتروکسین (WN) دو تا چهار هفته بعد از تیمار (dpi)

Fig. 1: The effect of nitroxin on disease development in infected cucumber seedlings treated with nitroxin (N) and without nitroxin (WN) 15- 30 day pos infection (dpi)

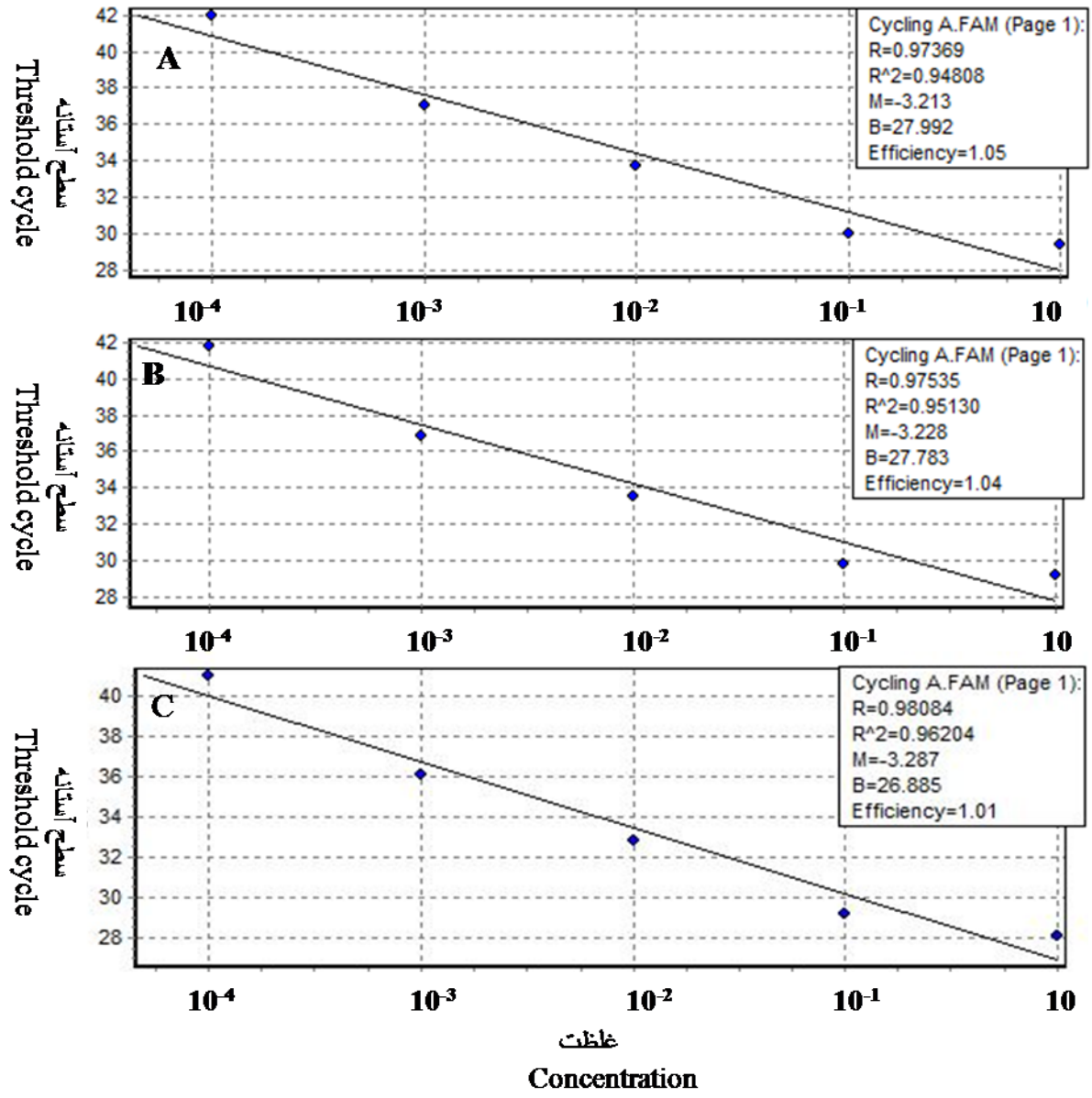
آنالیز بیان ژن

داده‌های حاصل از بررسی کمیت‌سنجی بیان ژن با نرم‌افزار Rest نشان داد که هر دو ژن مورد بررسی در واکنش زنجیره نوری پلی‌مراز به صورت پیوسته تکثیر و آغازگرهای انتخاب شده با بالاترین کیفیت و حساسیت قادر به تکثیر قطعات ژنی مربوطه می‌باشند (شکل ۲-۳). در این تحقیق میزان بیان ژن *Cupi4* و *Chitinase* در گیاهچه‌های خیار در سه تیمار مختلف شاهد بدون آلودگی، آلودگی بدون نیتروکسین و آلودگی با نیتروکسین نشان داد که هر دو ژن در حالت آلودگی به میزان‌های مختلفی با شاهد تفاوت در بیان را نشان می‌دهند. در زمان ۲۴ ساعت بعد از آلودگی میزان بیان ژن *Cupi4* به‌میزان قابل توجهی نسبت به شاهد افزایش نشان داد و این درحالی بود که این تغییر برای ژن *Chitinase* نسبت به شاهد قابل ملاحظه نبود (جدول ۲ و ۳). نتایج این بازه زمانی نشان می‌دهد که علی‌رغم مشاهده افزایش میزان بیان ژن *Chitinase* این افزایش نسبت به ژن *Cupi4* بسیار کمتر و در حد ۱۵ درصد می‌باشد. نمودار میله‌ای این تغییرات نیز نشان می‌دهد در سه تیمار مورد آزمایش ژن *Cupi4* نسبت به تیمار آلوده بدون نیتروکسین افزایش قابل ملاحظه و معنی‌داری داشته است. آنالیز داده‌های واکنش توسط نرم‌افزار Rest همچنین نشان می‌دهد که نتایج حاصله در سطح نسبتاً خوب و بالا مورد تجزیه قرار گرفته و اعداد مربوط به انحرافات آزمایش نشان می‌دهد که خطای تکنیکی در تهیه محلول‌های واکنش بسیار ناچیز بوده است (جدول ۳ و ۴). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تیمار کودی نیتروکسین قادر به تقویت گیاه شده و همچنین تحریک گیاه آلوده به عامل مرگ گیاهچه را به افزایش بیان دو ژن مورد بررسی سبب می‌شود.



شکل۲: A: میزان تغییرات فلورسانس به تعداد چرخه‌های تکثیری در سه غلظت مختلف از cDNA اولیه، B: منحنی دمای ذوب آغازگر ژن *Cupi4* از چرخه‌های تکثیری PCR در دمای واقعی

Fig. 2: A: Kinetic of fluorescence signal versus cycle number performed with three concentration of cDNA primary (d: 10^{-1}, 10^{-2} and 10^{-3}), B: Dissociation curves *Cupi4* gene of amplified cycles in qRT-PCR.



شکل ۳: منحنی استاندارد مربوط به ژن‌های *Actin* (A)، *Cupi4* (B) و *Chitinase* (C)

Fig. 3: Standard Curve related to *Actin* (A), *Cupi4* (B) and *Chitinase* (C) genes

بحث

بیماری مرگ گیاهچه خیار یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول به‌ویژه در شرایط گلخانه می‌باشد. استفاده از ارقام مقاوم یکی از مؤثرترین و کم هزینه‌ترین راه‌های کنترل بیماری‌های خاکزاد به‌شمار می‌رود. در این تحقیق از رقم خیار حساس به این بیماری مرگ گیاهچه (ES-2862) استفاده شد رستمی و همکاران (Rostami *et al.*, 2011). مطالعات مختلفی نشان داده است که نیتروکسین در بهبود شرایط رشدی و افزایش اجزاء عملکرد گیاهان زراعی نقش مؤثری داشته است اورتاس و آکپینار؛ *وو* و همکاران (Ortas and Akpinar, 2006; Wu *et al.*, 2005). مطالعات مختلفی در ارتباط با تأثیر کودهای مختلف زیستی به تنهایی یا مخلوط در کنترل بیماری‌های قارچی نظیر فوزاریوم، ورتیسیلیوم و رایزوکتونیا موجب افزایش مقاومت گیاهان بیمار به بیماری شده است *لانگ* و همکاران؛ *زوو* و همکاران (Lang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 1994). در ارتباط با کنترل بیمارگرهای گروه قارچی *Oomycetes* به‌وسیله کودهای زیستی به‌ویژه نیتروکسین مطالعات بسیار اندکی صورت گرفته است و اطلاعات قابل استنادی در دسترس نمی‌باشد. با توجه به اهمیت گیاه خیار و حساسیت اغلب ارقام وارداتی پرمحصول و همچنین مقاومت در حال افزایش آنها به قارچ‌کش‌های رایج، در این تحقیق توانایی کنترل این بیمارگر به‌وسیله کود زیستی نیتروکسین مورد بررسی قرار گرفت. بلافاصله بعد از تلقیح گیاهچه‌ها توسط عامل بیماری روند توسعه و شدت بیماری مورد بررسی قرار گرفت و

۱۵ روز بعد از تلقیح به‌مدت دو هفته آماربرداری از شدت علایم بیماری انجام گرفت. در طول زمان آزمایش مشاهدات عینی و داده‌های حاصل نشان داد که در تیمار کودی نیتروکسین شدت بیماری نسبت به شاهد آلوده کمتر می‌باشد. علت کاهش شدت بیماری در فاصله زمانی ۴۸ ساعت بعد از آلودگی نشان‌دهنده ایجاد مقاومت نسبی در گیاه در طول زمان می‌باشد. با توجه به بررسی مولکولی به‌عمل آمده در یک تا دو روز بعد از تلقیح می‌توان چنین استنباط نمود که بیان بیش از حد ژن‌های مسئول مقاومت بلافاصله بعد از تحریک توسط عامل بیماری شرایط ایجاد مقاومت القایی را در گیاه فراهم و به‌دنبال آن در روزهای بعد در شدت توسعه بیماری در گیاه تأثیر نسبتاً قابل‌قبولی برجای گذاشته است.

علاوه‌بر دلیل فوق در ایجاد مقاومت نسبی، کاهش شدت بیماری در اثر اعمال کود نیتروکسین احتمالاً در نتیجه در دسترس قرار دادن نیتروژن برای گیاه می‌باشد که با سرعت بخشیدن تولید ترکیبات اصلی گیاه و همچنین پروتئین‌های آنزیمی مسئول تقسیمات سلولی و تشکیل سلول‌های مریستمی موجب افزایش مقاومت گیاه به بیماری و می‌تواند در فرار گیاهچه از بیماری به ویژه در مراحل اولیه آلودگی کمک نماید (Salardini and Mojtahedi, 1889 ;*سالاردینی و مجتهدی*). ژن *Cupi4* یکی از ژن‌های مؤثر در ایجاد مقاومت خیار به بیماری مرگ گیاهچه گزارش شده است که در حالت ایجاد مقاومت میزان بیان آن نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است می‌شود (*فانتومارت* و همکاران، 2006). نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار نیتروکسین می‌تواند بیان این ژن کاندیدا در ایجاد مقاومت را به میزان قابل‌توجهی در گیاهچه‌های آلوده افزایش دهد. ژن کیتیناز نیز یکی از ژن‌های مسئول مقاومت به بیماری‌های مختلف در اکثر خانواده‌های گیاهی می‌باشد که بیان آن در گیاهان تحریک شده قابل تغییر می‌باشد الحدرامی و همکاران؛ *پانژا و زانگ* El Hadrami *et al.*, 2010; Punja) and Zhang, 1993). آنالیز بیان ژن های مقاومت در خیار در اثر تحریک با نیتروکسین نشان داد که بیان ژن *Cupi4* نسبت به ژن *Chitinase* افزایش بیشتری داشت که احتمالاً کاهش بیان ژن *Chitinase* نسبت به ژن *Cupi4* مربوط به ساختار دیواره شبه‌قارچ تلقیح شده باشد که در ساختار خود میزان کیتین بسیار کمی دارد. در این بررسی افزایش بیشتر بیان ژن *Cupi4* نشان از اهمیت این ژن در مقابل این بیماری دارد البته برای مشخص شدن تخصصی بودن ژن در مقابل استرس بیماری باید با سایر عوامل بیماری‌زا نیز بیان آن بررسی گردد. پروتئین‌های حاصل از *Cupi4* در تقویت ترکیب دیواره سلولی و فعالیت ضد پاتوژنی دارند و سرعت انباشته شدن ژن *Cupi4* نسبت به ژن *Chitinase* در برگ‌های گیاه خیار بیشتر می‌باشد. البته بیان هر دو ژن به‌صورت سیستمیک در گیاه در می‌آید که ژن*Cupi4* به میزان بیشتری در بافت‌ها دیده می‌شود (*فانتومارت* و همکاران، 2006). مطالعات نشان داده است استفاده از مواد تحریک‌کننده رشدی شامل Imidacloprid، Isonicotinic acid و Acibenzolar-s-methyl در بیماری شانکر مرکبات آلوده به باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* نشان داد که ژن β-*PR-2* (1, 3 glucanase) بعد از ۲۴ هفته به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش داشت *فرانسیس* و همکاران (Francis *et al.*, 2009). نتایج حاصل از آنالیز داده های بیان ژن نشان داد که ضریب کارآیی واکنش برای تمام واکنش‌ها مثبت بوده که خود نشان‌دهنده کارآیی نسبتاً بالای آغازگرها می‌باشد اگرچه کیتینازها بیشتر فعالیت ضدقارچی دارند و در برهمکنش‌های بین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی با گیاهان نقش عمده‌ای دارند ولی مطالعات نقش لیزوزیمی را نیز برای کیتینازها اثبات کرده و استنباط شده که از این طریق باعث تجزیه دیواره سلولی سایر عوامل بیماری‌زای دیگر می‌شوند *فریتیج* و همکاران؛ *هیتز* و همکاران (Fritig *et al.*, 1998; Heitz *et al.*, 1994). نتایج یک تحقیق نشان داد که تلقیح بوته‌های جوان خیار با پاتوژن‌های مختلف می‌تواند منجر به مقاومت سیستمیک گسترده در گیاه بر علیه ۱۳ بیماری به‌مدت ۴-۶ هفته گردد *کوک و ریچموند* (Kuc and Richmond, 1977). پیش‌نیاز تولید ارقام مقاوم، شناسایی مکانیسم‌های گیاهی درگیر در واکنش به عوامل بیماری‌زا است که منجر به ظهور مقاومت در ارقام مقاوم و حساسیت در ارقام حساس گیاهی می‌شود *بیکر* و همکاران (Baker *et al.*, 1997). بررسی اجزاء عملکرد مربوط به تأثیر کودهای آلی و شیمیایی نشان داده شده است که اجزای عملکرد رویشی و بعضی از صفات زراعی به میزان قابل‌قبولی با کاربرد این کودها تغییر کرده است *آرانکون* و همکاران؛ *اتیه* و همکاران، Arancon *et al.*, 2004; Atiyeh *et al.*, 2002; Atiyeh *et al.*, 2000). ولی گزارشات کمی در ارتباط با نقش کودها به‌ویژه در سطح ریزوسفر در افزایش مقاومت به بیماری‌های گیاهی وجود دارد از این‌رو با آگاهی از میزان بیان ژن‌های درگیر در مقاومت گیاهان می‌توان به تولید و معرفی ارقام مقاوم پرداخت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از کودهای زیستی می‌تواند در مقاوم‌سازی ارقام پر محصول حساس به بیماری‌های گیاهی به‌کار گرفته شود.

سپاسگزاری

از سرکار خانم دکتر مهتا مظاهری به خاطر کمک در آنالیز داده‌های بیان ژن و همچنین از مسئول و کارشناسان محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل که ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌شود. این تحقیق با مساعدت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد سیستان و بلوچستان در قالب بخشی از طرح مصوب پژوهشی اجراء گردید.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۸-۱۹ متن انگلیسی مراجعه شود.