گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۴۰ شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

تاثیر اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانتی و نسخه برداری ژن های بتاگلوکوناز و اگزالات اکسیداز در گندم آلوده به بیماری بلایت خوشه

سید کاظم صباغ [۱*]، مرجان پیکانی [۲] و صدیقه اسمعیل زاده بهابادی [۳]

۱- *نویسنده مسوول: دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد، ایران (sksabbagh@yazd.ac.ir)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

۳- استادیار فیزیولوژی گیاهی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۲۳

چکیده

در این پژوهش اثر غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک (۰، ۲۰۰، ٤۰۰ و ٦۰۰ میلی گرم در لیتر) بر فعالیت تعدادی از آنزیم های آنتی اکسیدانتی و دو ژن بتا ۱،۳- گلوکوناز و اگسالات اکسیداز در گیاه گندم آلوده به بیماری بلایت خوشه گندم ناشی از قارچ *Fusarium graminearum* مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان تیمار شده با سوسپانسیون اسپور قارچ (با غلظت 10^5 ماکروکنیدی در میلی لیتر) به روش تزریق در زیر محل خوشه مایه زنی گردیدند. فعالت آنزیم های آنتی اکسیدانتی، محتوای فنل کل و سطح نسخه‌برداری ژن های فوق به عنوان شاخص های مقاومتی در بازه های زمانی صفر، ٢٤، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح عامل بیماری مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج بررسی آنزیمی نشان داد که بیشترین میزان افزایش آنزیم و فنل کل مربوط به غلظت ٤۰۰ میلی گرم در لیتر و زمان ۷۲ ساعت بعد از آلودگی بود. آنالیز سطح نسخه‌برداری دو ژن فوق با استفاده از روش کمیت سنجی در زمان واقعی در ۷۲ ساعت بعد از آلودگی نشان داد که غلظت ٤۰۰ میلی گرم در لیتر بیشترین تاثیر را در سطح نسخه‌برداری هر دو ژن داشته است اما میزان نسخه‌برداری ژن بتا گلوکاناز نسبت به اگسالات اکسیداز در غلظت مشابه افزایش بیشتری داشت. بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ نشان داد که اثر بازدارندگی با افزایش غلظت، افزایش یافت و غلظت ٦۰۰ میلی گرم در لیتر صد در صد از رشد قارچ جلوگیری کرد. با توجه به نتایج به دست آمده، اسید سالیسیلیک می تواند در القای مقاومت به بیماری بلایت خوشه مفید باشد

کلید واژگان: اسید سالیسیلیک، آنزیم آنتی اکسیدانتی، بیان ژن، بلایت خوشه گندم، مقاومت القایی

مقدمه

در میان گیاهان زراعی، گندم با دارا بودن موادغذایی با ارزشی مانند انواع پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و موادمعدنی، حدود ۲۵ درصد کالری غذایی جهان را تامین کرده و همواره یکی از محصولات غذایی استراتژیک در ایران و سراسر جهان به شمار می آید (Karimi and Siddique, 1991). تنش‌های زیستی شامل آفات و بیماری‌ها از جمله عواملی هستند که باعث کاهش عملکرد محصول گندم در واحد سطح می‌گردند. بیماری بلایت فوزاریومی خوشه گندم که به‌وسیله قارچ *Fusarium graminearum* ایجاد می‌شود یکی از بیماری‌های زیان‌آور گندم‌زارها در مناطق گرم و مرطوب جهان می‌باشد که باعث ایجاد خسارات متعددی به گیاه (Ryu et al., 1988) شده وسلامت انسان و دام را به مخاطره می اندازد. این بیماری قارچی در مرحله گلدهی ایجاد می شود (Gilbert and Tekauz, 2000; Goswami and Kistler, 2004). این بیماری علاوه بر کاهش عملکرد دانه، باعث تولید زهرابه های قارچی سرطان زا در انسان شامل: دی اکسی

نیوالنول (DON)[1]، نیوالنول (NIV)[2] و مشتقات استیلی آنها [۳- استیل دی اکسی نیوالنول (3-AcDON)، ۱۵- استیل دی اکسی نیوالنول (15-AcDON) و۴-استیل نیوالنول(4-AcNIV)] می شود (Craddock, 1986; Luo et al., 1990; Groves et al., 1998). کنترل شیمیایی این بیماری علاوه بر هزینه های بالای اقتصادی همواره خطرات زیست محیطی و مقاومت عامل بیماری زا به قارچ کشها را به همراه داشته است. از اینرو کنترل بیولوژیک و تقویت گیاه میزبان در جهت القای مقاومت سیستمیک مورد توجه محققان قرار گرفته است. اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک و اتیلن به عنوان هورمون‌های گیاهی نقش حیاتی در مقابل بیمارگرهای متعدد گیاهی ایفا می کنند و به عنوان عوامل کلیدی در القای مقاوت گیاهان به عوامل بیمارگر به رسمیت شناخته شده‌اند (De Vos et al., 2005; Koornneef and Pieterse, 2008; Shoresh et al., 2005). اسید سالیسیلیک ترکیبی درون‌زا و کلیدی در مقاومت نسبت به بیماری‌های موضعی و همه‌گیر در گیاهان محسوب می‌شود (Wildermuth et al., 2001). این ماده متعلق به گروهی ازترکیبات فنلی است که به طور وسیعی درگیاهان وجود دارد و امروزه به عنوان ماده شبه هورمونی محسوب می‌شود (Raskin, 1992). اسید سالیسیلیک در القای مسیر انتقال سیگنال مربوط به سنتز ترکیبات دفاعی مانند پلی فنل‌ها، آلکالوییدها یا پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی نقش دارد (Creelman and Mullet, 1995; Tamari et al., 1995). این ماده عمدتاً با مقاومت در مقابل بیمارگرهای انگل اجباری و نیمه‌اجباری در ارتباط است و باعث تحریک مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR)[3] در بسیاری از گیاهان، از جمله *Arabidopsis thaliana* و گندم می‌شود (De Vos et al., 2005; Glazebrook, 2005). گیاهان دراثر حمله عوامل بیماری‌زا چندین واکنش دفاعی نشان داده و می توانند از طریق القای آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانتی که حفاظت علیه آسیب بیشتر را فراهم می‌کنند، به طیف وسیعی از تنش‌ها مانند دما، خشکی، شوری، اوزون، اشعه UV و حمله بیمارگرها پاسخ دهند (Lai and Joklik, 1973). گیاهان از طریق مقاومت سیستمیک اکتسابی که توسط محصول ژن‌های غیر بیماری‌زای بیمارگرها یا توسط عوامل فیزیکی یا شیمیایی تحریک می‌شود، سبب مقاومت طولانی مدت به آلودگی‌های ثانویه طیف وسیعی از بیمارگرها از جمله ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌گردند (Durrant and Dong, 2004). مقاومت اکتسابی سیستمیک با بیان مجموعه‌ای از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مربوط به بیمارگر(PR) در گیاهان دو لپه، مانند تنباکو و *A. thaliana* همراه است (Uknes et al., 1992; Ward et al., 1991).

ژن‌های ضدقارچی، گروهی از پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی را رمز می‌کنند که موجب تخریب دیواره سلول قارچ، ایجاد اختلال در غشای سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماری‌زایی و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می شوند (Dahleen et al., 2001). نقش ژن های بتاگلوکوناز[4] و اگزالات اکسیداز[5] در مقاومت القایی گیاهان مختلف در برابر عوامل بیمارگر قارچی مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Hu et al., 2010; Liang et al., 2001). آنزیم بتاگلوکوناز پیوند پلی‌ساکارید بین کربن‌های ۱ و ۳ در ساختمان گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ را تخریب می کند (Leah et al., 1991). آنزیم اگزالات اکسیداز در حضور اکسیژن مولکولی، اگزالات را به آب اکسیژنه و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌نماید (Dunwell et al., 2000) و در گیاهان مورد هجوم توسط عوامل بیمارگر باعث مقاومت القایی سیستمیک در گیاه می شود

1- Deoxynivalenol (DON)
2- Nivalenol
3- Systemic Acquired Resistance

3β- 1,3- glucanase
4- Oxalate oxidase

(Bolwell and Wojtaszek, 1997). هدف از این تحقیق بررسی اثر سالیسیلیک اسید در ایجاد مقاومت گندم آلوده به بیماری بلایت خوشه می باشد. بدین منظور فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی، میزان فنل کل و میزان نسخه برداری ژن های بتاگلوکوناز و اگزالات اکسیداز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش به منظور ارزیابی القای مقاومت نسبت به بیماری بلایت خوشه گندم از رقم تجن استفاده گردید. این رقم از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. بذرها توسط الکل ۷۰٪ ضدعفونی سطحی و سپس با آب مقطر سترون سه مرتبه شستشو داده شدند. تعداد ۱۰ عدد بذر در هر گلدان پلاستیکی (قطر ۳۰cm) حاوی خاک مزرعه سترون کشت شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه و در دمای°C ۲۵-۱۹ با دور آبیاری منظم نگهداری شدند. در مرحله پنجه دهی تعداد بوته در هر گلدان با تنک کردن به ۶ بوته رسید.

تهیه و تلقیح عامل بیماری بلایت خوشه

از جدایه استاندارد *F. graminearum* تهیه شده از آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه اردبیل استفاده گردید. یک دیسک از پرگنه قارچ به محیط کشت تازه PDA[1] منتقل و در دمای°C ۲۷ نگهداری شد. پس از گذشت یک هفته از کشت قارچ، برای تهیه مایه تلقیح از کاه خرد شده مرطوب در ارلن‌هایی به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر استفاده شد (Ghazimohseni et al., 2014). سپس ارلن‌های حاوی پرگنه قارچ در دمای°C ۲۵ روی شیکر دورانی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۶-۵ روز نگهداری شدند. پس از رشد قارچ و تولید اسپور، با صاف کردن محتوای ارلن، و با استفاده از لام گلبول شمار (هموسیتومتر) غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد. تلقیح بوته‌ها ، بوسیله ۱ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور *F. graminearum* برای هر بوته انجام شد (Bernardo et al., 2007). نمونه‌برداری از بوته‌های گندم در بازه‌های زمانی ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از آلودگی با سالیسیلیک اسید از برگ‌های جوان گیاه انجام گرفت، و بلافاصله پس خشک شدن در ازت مایع به فریزر °C۸۰- تا زمان انجام آزمایشات انتقال یافت.

محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک

از اسید سالیسیلیک شرکت سیگما (Sigma) برای تهیه غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ ، ۶۰۰ پی‌پی‌ام استفاده شد. بدین منظور ابتدا یک گرم از پودر اسید سالیسیلیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر الکل ۹۶٪ حل شد و سپس حجم محلول با آب مقطر سترون به ۱ لیتر رسانده شد (Oka et al., 1997). محلول پاشی اسید سالیسیلیک در زمان پر شدن خوشه ها بوسیله یک افشانه دستی بر سطح خوشه‌ها و اندام‌های هوایی صورت گرفته و ۲۴ ساعت بعد از پاشش، گیاهان بوسیله اسپورهای قارچ بیمارگر تلقیح شدند. برای بوته‌های شاهد، از آب مقطر خالص استفاده گردید.

تهیه عصاره گیاهی

عصاره‌گیری به روش گانگ و همکاران با کمی تغییرات صورت گرفت (Gong et al., 2001). بدین منظور مقدار ۰/۲ گرم بافت گیاهی را در هاون چینی سرد با محلول عصاره‌گیری (۱۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم با PH= ۶/۸ ، ۲۰ میکرولیتر EDTA۰/۱ مولار و ۳۸۰ میکرولیتر آب مقطر) تخریب و مخلوط یکنواختی ایجاد شد. سپس به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ از فاز بالایی عصاره برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

اندازه گیری میزان فنل کل

استخراج مواد فنلی از برگ‌های گیاهان تیمار شده انجام گردید. بدین منظور، یک گرم از بافت گیاهی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در هاون چینی

1- Potato Dextrose Agar(Sigma)

خرد شده و با استفاده از متانول ۸۰ درصد بر روی پارچه ململ دو لایه شستشو و صاف گردید. عصاره صاف شده به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول رویی با استفاده از معرف فولین برای اندازه‌گیری فنل استفاده شد و در نهایت مقدار فنل کل برحسب میکروگرم در یک گرم برگ در طول موج ۷۲۵ نانومتر محاسبه شد (Seevers et al., 1971).

تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز

جهت تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز، به عصاره آنزیمی بدست امده از گیاهان تیمار شده و شاهد، ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (PH=7)، ۴۰۰ میکرولیتر گایاکول یک میلی‌مولار، ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳ میلی‌مولار اضافه شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع می‌شود. فعالیت آنزیم در طول موج ۴۷۵ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج خوانده شد و یک دقیقه پس از افزودن آب اکسیژنه دوباره قرائت گردید.

تعیین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز

جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی،۴۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۰/۲ مولار (PH=7/6)، پیروگالول۰/۰۲ مولار به میزان ۱ میلی‌لیتر، و ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن پیروگالول به مخلوط واکنش شروع شد. فعالیت آنزیم در طول موج ۴۲۰ نانومتر طیف سنج در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه پس از افزودن پیروگالول اندازه‌گیری شد (Kar and Mishra, 1976).

تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، به ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۵ مولار با (PH= ۶/۸) ، ۰/۲ میکرولیتر EDTA ۰/۲ میکرومولار، ۵۰ میکرولیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، آب مقطر ۹۹/۸ میکرولیتر، و ۳۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه اضافه شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. میزان کاهش جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج خوانده شد و یک دقیقه بعد از اضافه کردن آب اکسیژنه دوباره قرائت شد (Eaton, 1991).

استخراج RNA و سنتز cDNA

از برگ‌های بوته های آلوده تحریک شده با اسید سالیسیلیک در غلظت های مختلف، جهت استخراج مولکول های RNA استفاده شد. بدین منظور ۵۰ گرم از برگ‌های مربوط به هر تیمار (با سرعت و بدون اتلاف وقت بین مرحله جداشدن از گیاه و زمان استخراج) با استفاده از ازت مایع در داخل هاون چینی پودر و استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری ژنال (GeneAll, South Korea) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت مولکول‌هایmRNA به ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و روش طیف سنجی با دستگاه اسکن دراپ (Scandrop, Analytika, Germany) انجام شد. سنتز cDNA از مولکول های تک رشته ایmRNA با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit (Vivantis, Sinagene, Iran) انجام گردید.

بررسی بیان ژن‌ها به روش qReal Time PCR

بررسی بیان ژن های مورد مطالعه با استفاده از روش کمیت سنجی در زمان واقعی[1] با استفاده از دستگاه لایت سایکلر ساخت شرکت کوربت (Curbet3000, Australia) انجام شد. محلول واکنش شامل ۲ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) cDNA، ۱ میکرو لیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکومولار) (جدول ۱) ، ۱۰ میکرولیتر Hot Tag EvaGreen 2X(Biotium,USA) بود. حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر عاری از آنزیم RNase به ۲۰ میکرولیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. به منظور به دست آوردن دمای مناسب اتصال آغازگرها، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شیب دمایی توسط دستگاه ترموسایکلر گرادیان (Eppendorf,

1- Quantitative Real Time- PCR

(Germany) انجام گرفت. دماهای مورد استفاده از ۶۰ تا ۶۴ درجه در نظر گرفته شد. پس از آن جهت تأیید سنتز تمام cDNA ها واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط آغازگرهای ژن های بتاگلوکوناز و اگزالات اکسیداز و ژن خانه‌دار بتاتوبولین[1] جهت استانداردسازی سطح نسخه‌برداری دو ژن هدف انجام گرفت (جدول ۱). چرخه های حرارتی واکنش شامل ۹۴°C به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه شامل:۹۴°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۲°C به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه تنظیم گردید. هر آزمایش در چهار تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی انجام شد. داده‌های حاصل از روش کمیت سنجی در زمان واقعی به صورت نسبی و براساس روش محاسبه میزان تغییرات سطح آستانه تکثیر ژن (Ct) در گیاهان تیمار شده و شاهد (ΔΔCt) با داده‌های ژن مرجع خانه‌دار بتاتوبولین نرمال شدند(Pfaffl, 2001). داده های حاصل به فایل ایکسل منتقل و نمودارهای مربوطه رسم گردید.

بررسی بازداری از رشد

اثر بازداری اسید سالیسیلیک بر رشد قارچ *F. graminearum* به روش اختلاط با محیط کشت PDA مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور غلظت های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ پی پی ام به محیط کشت اضافه گردید و برای شاهد محیط PDA به تنهایی مورد استفاده قرار گرفت. یک دیسک قارچ به قطر ۵ میلی‌متر از لبه پرگنه ۷ روزه قارچ عامل بیماری برداشته و در مرکز هر یک از ظروف پتری آماده شده گذاشته شد. ظروف در انکوباتور ۲۵ °C نگهداری شدند. پس از گذشت ۵ روز قطر رشد هر پتری اندازه‌گیری شد. در این آزمایش برای هر غلظت ۳ تکرار در نظر گرفته شد. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف با بهره‌گیری از فرمول زیر انجام گرفت:

$$\%GI= (dc-dt/dc)\times 100$$

GI = بازدارندگی از رشد (میلی‌متر)[2]

dc = میانگین قطر رشد قارچ در تیمار شاهد (میلی‌متر)[3]

dt = میانگین قطر رشد قارچ در تیمار مورد بررسی (میلی‌متر)[4]

آنالیز آماری

تجزیه واریانس داده ها بر اساس طرح فاکتوریل بر پایه کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 تحت آنالیز واریانس یکطرفه قرار گرفتند و میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P<0.05$ بعنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده های به دست آمده از میزان تغییرات فنل کل نشان داد که بین مقادیر فنل کل در تیمار شاهد آلوده و تیمارهای اسید سالیسیلیک اختلاف معنی‌داری سطح ۵٪ وجود داشت. غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک باعث افزایش قابل ملاحظه فنل در گیاهان تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد بدون تیمار شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که مقدار ترکیبات فنل کل در گیاه از روز نخست به تدریج افزایش یافته و در روز سوم به بیشترین میزان خود رسیده و سپس به تدریج رو به کاهش گذاشت. بیشترین میزان افزایش برای غلظت ۴۰۰ میلی گرم در لیتر و در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی و کمترین مقدار برای غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر و در بازه زمانی ۱۲۰ ساعت ثبت گردید (جدول ۲).

همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز در تمام غلظت‌ها با شاهد آلوده دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بود. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از اولین روز تا روز سوم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری روند افزایشی داشت، اما از روز پنجم رو به کاهش نهاد. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در تیمار ۴۰۰ پی‌پی‌ام اسید سالیسیلیک دربازه زمانی ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی مشاهده شد (جدول ۳).

1- β-Tubolin
2- Growth Inhibition
3- Diameter control
4- Diameter treatment

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Characterestic of primers used in this study

Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Product size (bp)	Accesse number
B-1,3-glucanase	AACGACCAGCTCTCCAACAT	GTATGGCCGGACATTGTTCT	527	AAY90061.1
Oxalat Oxidase	TGCAGTTCAACGTCGGTAAG	ATGGCACGAAGACGATACC	358	AJ556991
β-Tubolin	GGACAGGATTGACAGATTGATA	CTCGTTCGTTATCGGAATTAA	180	_

جدول ۲- میزان ترکیبات فنل کل (میلی گرم / گرم عصاره) در گندم های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

Table 2. Rate of total phenolic compounds (mg /gr fresh tissue) in infected wheat treated with different salycilic acid concentrations

Treatment	Sampling time intevales (h)		
	24	72	120
Control	0.81 c	0.84 c	0.75 c
Salycilic acid (200ppm)	0.83 b	0.89 b	0.79 b
Salycilic acid (400ppm)	0./89 a	0.95 a	0.85 a
Salycilic acid (600ppm)	0.84 b	0.89 b	0.80 b

Similar letters in each column are not significantly different at 5% probability level.

جدول ۳- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز (میلی گرم / پروتئین) در گندم های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

Table 3. Change of proxidase activity (mg prtein) in infected wheat treated with different salycilic acid concentrations

Treatment	Sampling time intevales (h)		
	24	72	120
Control	10.42 c	13.39 d	9.43 d
Salycilic acid (200 ppm)	15.72 b	18.9 c	13.78 c
Salycilic acid (400 ppm)	20.21 a	28.56 a	25.63 a
Salycilic acid (600 ppm)	19.43 a	24.32 b	17.6 b

Similar letters in each column are not significantly different at 5% probability level.

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در در گندم های آلوده تحت تاثیر اسید سالیسیلیک با غلظت‌های مختلف افزایش قابل ملاحظه ی با گیاهان شاهد نشان داد. با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در غلظت‌های ۴۰۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام اسید سالیسیلیک با شاهد آلوده دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بود. در حالی که غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسید سالیسیلیک با شاهد آلوده اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۴). میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در بین روزهای مختلف نمونه برداری از اولین روز دوره مورد بررسی تا روز سوم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری روند افزایشی داشت، اما از روز پنجم

به تدریج کاهش یافت. تجزیه واریانس داده‌ها همچنین نشان داد که بین مقادیر آنزیم گایاکول پراکسیداز در شاهد آلوده و گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ وجود داشت (جدول ۵). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان می دهد که فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در تیمار ۴۰۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام اسید سالیسیلیک نسبت به شاهد آلوده دارای اختلاف معنی‌دار بود. در حالیکه تیمار اسید سالیسیلیک ۲۰۰ پی‌پی‌ام اختلاف معنی‌داری با شاهد آلوده نداشت. میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در تیمار اسید سالیسیلیک ۴۰۰ میلی گرم در لیتر و روز سوم پس از مایه‌زنی به حداکثر خود رسید و از نظر تفاوت با شاهد در همین زمان بیشترین اختلاف و افزایش را نشان داد. میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز از اولین روز زمان بررسی تا روز سوم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری روند افزایشی داشت، اما از روز پنجم رو به کاهش نمود (جدول ۵). در بین روزهای مختلف نمونه برداری روز سوم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری بالاترین میزان و پس از آن روز پنجم بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز را نشان داد.

با توجه به بالاترین میزان تغییرات آنزیمی در تمام غلظت های اسید سالیسیلیک در زمان ۷۲ ساعت بعد از آلودگی، میزان تغییرات بیان ژن های بتاگلوکوناز و اگزالات اکسیداز در گندم های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در این بازه زمانی با گیاهان شاهد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز بیان ژن نشان داد که میزان نسخه‌برداری ژن بتاگلوکوناز در ۷۲ ساعت پس از آلودگی در گیاهان تیمارشده با غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک در مقایسه با شاهد آلوده افزایش یافته است (جدول ۶). حداکثر میزان نسخه‌برداری این ژن در غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام اسید سالیسیلیک مشاهده شد (شکل ۱).

نتایج حاصل از داده‌هایReal-Time PCR نشان داد که نسخه‌برداری ژن اگزالات اکسیداز در غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک نسبت به شاهد افزایش یافت (جدول ۷)، به طوری که بیشترین میزان نسخه‌برداری ژن اگزالات اکسیداز در گندم های تیمار شده با غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام اسید سالیسیلیک مشاهده شد (شکل ۲).

جدول ٤- فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (میلی گرم/پروتئین) در گندم های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

Table 4. Activity of polyphenol oxidase (mg protein) in infected wheat treated with different salycilic acid concentrations

	Sampling time intevales (h)		
Treatment	24	72	120
Control	7.77[c]	14.62[c]	11.47[d]
Salycilic acid (200 ppm)	11.40[b]	14.03[c]	12.27[c]
Salycilic acid (400 ppm)	19.66[a]	28.38[a]	21.58[a]
Salycilic acid (600 ppm)	19.92[a]	21.84[b]	19.16[b]

Similar letters in each column not significantly different at 5% probability level.

جدول۵- تجزیه واریانس فنل کل، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز در گندم های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

Table 5. Analysis of variance of total phenol, proxidase, polyphenole oxidase and gayacol in infected wheat treated with different salycilic acid concentrations

		Mean of square			
Source of variance	df	Gayacol	Polyphenol oxidase	Peroxidase	Total phenol
Salycilic acid	3	24.464 **	257.857 **	312.427*	0.015*
Sampling day	2	66.134 **	50.157 **	90.291**	0.027**
Standard error	24	0.59	6.051	7.092	0.004
Coefficient of variation		7.063	14.715	14.903	12.847

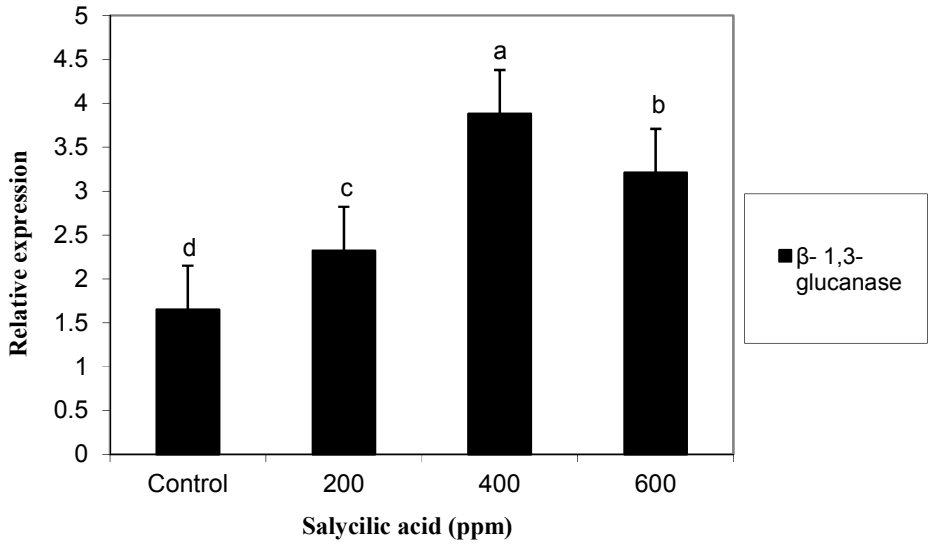
ns: non significant; * significant< 5% and ** significant< 1%

جدول ٦- تجزیه واریانس نسخه‌برداری ژن بتاگلوکونازدر گندم های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

Table 6. Analyse of variance of β-*Gluconase* gene expression in infected wheat treated with different salycilic acid concentrations

		Mean of Square
Source of variance	df	β- 1,3- glucanase
Salycilic acid	3	3.327**
Standard error	8	0.054
Coefficient of variation		9.64

**significant at P<1%



شکل ۱- سطح نسخه‌برداری ژن بتاگلوکوناز در گندم های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک (میانگین های با حروف یکسان، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن دارای اختلاف معنی دار نمی باشند)

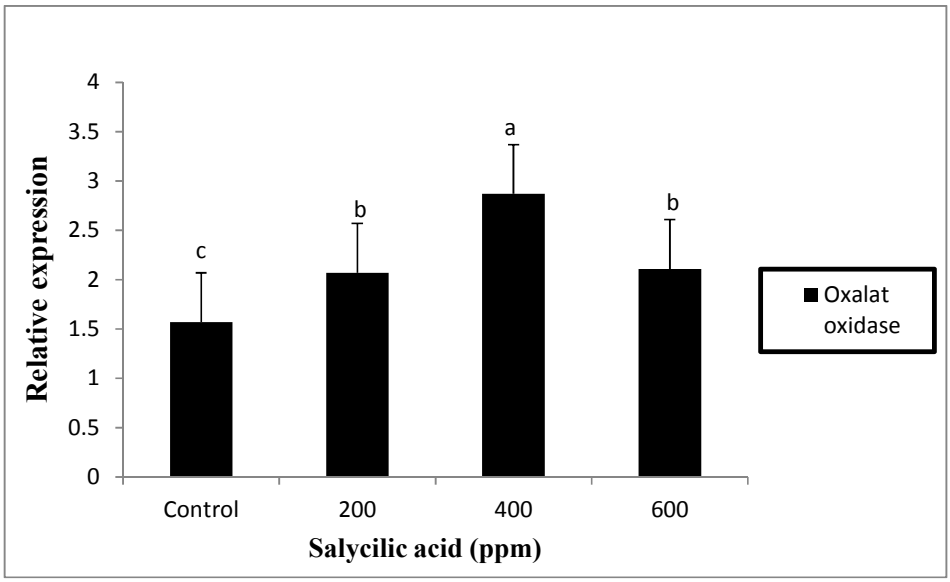
Figure 1. Transcription level of β-*Gluconase* gene in infected wheat treated with different salycilic acid concentration. Similar letters (Means followed by the same letter are not significantly different, Duncan' s tests, P>0.05).

جدول۷- تجزیه واریانس بیان ژن اگزالات اکسیداز در گندم های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

Table 7. Analyse of variance of oxalate oxidase gene expression in infected wheat treated with different salycilic acid concentrations

		Mean of squares
Source of variance	df	Oxalat oxidase
Salycilic acid	3	8.013**
Standard error	8	0.055
Coeffecient of variance		9.66

**significant at 1% probability level.



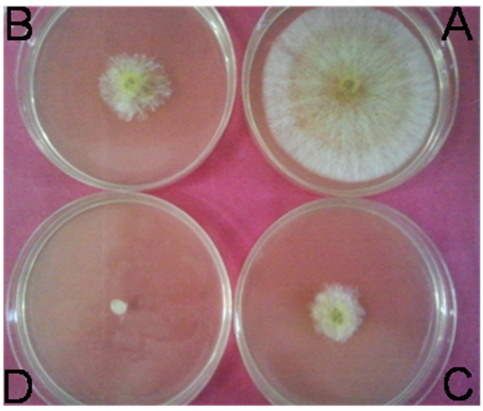
شکل ۲–سطح نسخه‌برداری ژن اگزالات اکسیداز در گندم های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک
(میانگین های با حروف یکسان، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن دارای اختلاف معنی دار نمی باشند)

Figure 2. Transcription level of Oxalat oxidase gene in infected wheat treated with different salycilic acid concentrations (Means followed by the same letter are not significantly different, Duncan' s tests, P>0.05).

اسید سالیسیلیک به عنوان یک مولکول علامت دهنده، نقش کلیدی در شکل‌گیری پاسخ‌های دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرهای گیاهی دارد. در این تحقیق اثر سالیسیلیک اسید در القای مقاومت گندم به بیماری فوزاریوز گندم و همچنین تاثیر آن بر رشد میسیلیومی قارچ در شرایط آمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی قدرت بازدارندگی اسید سالیسیلیک از رشد قارچ عامل بیماری با غلظت های مختلف در محیط کشت جامد، نشان داد که با افزایش غلظت، قدرت بازدارندگی نیز بیشتر می شود به طوری که بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌ام ثبت گردید (شکل ۳). متوسط رشد قطر پرگنه در شاهد بعد از یک هفته ۶/۵ سانتی‌متر بود در حالیکه در غلظت ۶۰۰ پی پی ام تقریباً صفر ثبت گردید. این اثر برای غلظت های دیگر نیز در مقایسه با شاهد قابل ملاحظه بود (جدول ۸). بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر روی جوانه زنی کنیدی ها و میسیلیوم‌های قارچ *F. graminearum* نشان داده است که کاربرد اسید سالیسیلیک در محیط کشت مایع و جامد باعث بازدارندگی رشد قارچ و کاهش قدرت جوانه زنی کنیدی های آن شده است (Qi et al., 2012) که نتایج تحقیق ما با یافته‌های آن‌ها مطابقت دارد.

نقش اسید سالیسیلیک در روند القای مقاومت سیستمیک در گیاهان و ایجاد پیام های مورد نیاز برای پاسخ دفاعی گیاه بیمار به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است و مشخص شده است که این ماده یکی از هورمون های مهم در جریان مقاوم سازی گیاهان به بیمارگر ها می باشد (Gaffney et al., 1993; Hammerschmidt, 2009). تحقیقات نشان می دهند که اسید سالیسیلیک باعث فعال شدن مسیر SAR و القا پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی می گردد و باعث کاهش رشد میسیلیومی قارچ در بافت های سالم گیاه بیمار می شود (Durrant and Dong, 2004).



شکل ۳- مقایسه رشد میسیلیومی قارچ *F. graminearum* در محیط کشت حاوی اسید سالیسیلیک با غلظت‌های صفر (شاهد) (A)، ۲۰۰ پی‌پی‌ام (B)، ٤٠٠ پی‌پی‌ام (C)و٦٠٠ پی‌پی‌ام (D).

Figure 3.Comparasion of mycelial growth of in culture medium containing salycilic acid with concentration of zero (control)(A), 200ppm (B), 400ppm (C) and 600ppm (D).

جدول ۸- درصد بازدارندگی رشد میسیلیوم قارچ *F. graminearum* تحت تاثیر اسید سالیسیلیک بعد از یک هفته

Table 8. Inhibitory percentage of *F. graminearum* mycelium growth affected with salycilic acid after one week

Concentration (ppm)	Mean of growth (cm)	Inhibitory percentage
Control (0)	6.5	%0[d]
200	3.5	%46[c]
400	1.2	%81[b]
600	0	%100[a]

Means within each row followed by the similar letters are not significantly different (Duncan's, P>0.05).

پروتئین های PR از جمله پروتئین هایی هستند که به محض مواجه گیاه با بیمارگر در گیاه میزبان تولید و منجر به ایجاد مقاومت سیستمیک القایی می شوند. گروه اول این پروتئین ها (PR1) از اولین پروتئین های کشف شده مرتبط با بیماری زایی با وزن مولکولی ۱۷-۱۵ کیلو دالتون می باشند که نقش ضد قارچی آن ها به اثبات رسیده است (Stintzi et al.,1993) و در دولپه‌ای‌هایی مثل سیب زمینی، گوجه‌فرنگی و آرابیدوپسیس و تک لپه‌ایها شناسایی و بررسی شده است (Edreva, 2004).

بازدارنگی رشد قارچ و کاهش قدرت بیماریزایی در گندم ناشی از متابولیز اسید سالیسیلیک توسط قارچ از طریق دو مسیر کاتکول یا ژنتیساس می باشد. آنالیز بیان ژن در قارچ *F. graminearum* متاثر از اسید سالیسیلیک با روش ریز آرایه (Microarray) نشان داد که سالیسیلیک اسید باعث افزایش نسخه ژن های القای مقاومت در گیاه گندم (PR1, NPR1, Pdf1.2, and PR4) شده است (Qi et al., 2012) . در این تحقیق نیز افزایش نسخه های ژن های آزمایش شده نشان از القای مقاومت در گیاه علیه بیمارگر دارد.

اسید سالیسیلیک با تحریک مستقیم روی بیان ژن های درگیر در سیستم دفاعی گیاه سبب افزایش فعالیت SAR می‌گردد (Durrant and Dong, 2004). آنزیم پراکسیداز به عنوان یک القا شونده سیستمیکی و به عنوان نشانگری برای القای مقاومت در گیاه برای محکم کردن دیواره سلولی ضروری است (Kuć, 2001) و با دخالت در مرحله نهایی تولید لیگنینی شدن، باعث افزایش مقاومت به بیماری می گردد (Lagrimini et al., 1987). مقاومت القایی ایجاد شده در گیاهان لوبیای آلوده با بیمارگرهایی مانند *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* تیمار شده با اسید سالیسیلیک سبب کاهش رشد میسیلیومی قارچ و توسعه آن در گیاه آلوده شده است (Al-Hakimi and Alghalibi, 2009). کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک در کنترل بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*، نقش موثری داشته است. حفاظت از گیاه در برابر عوامل بیمارگر، حاصل تحریک پاسخ‌های مختلف دفاعی است. سیستم یکپارچه دفاعی با تحریک همزمان چندین آنزیم دفاعی توسط الیسیتور به کار رفته، آغاز می‌شود. البته طبیعت تحریک و تولید ترکیبات و آنزیم‌های دفاعی جهت مقاومت به بیماری‌ها و آفات گیاهی است اما در مورد نتیجه حاصل از تولید یا افزایش این ترکیبات در میزبان‌های آلوده، نتایج متفاوتی از تحقیقات مختلف به دست آمده است (Agrawal et al., 2002).

در گیاهان گوجه فرنگی آلوده به *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* نیز افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز گزارش شده است (He and Wolyn, 2005). مطالعات نشان داده است که در لوبیا چشم بلبلی تیمار شده با اسید سالیسیلیک، فعالیت پلی فنل اکسیداز در پاسخ به *R. solani* افزایش یافت (Chandra et al., 2007). با توجه به نتایج حاصل از آنالیزهای آنزیمی به

نظر می‌رسد که مقاومت ایجاد شده توسط اسید سالیسیلیک بیشتر مربوط به القای فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی می‌باشد که در اثر فعالیت این آنزیم‌ها، مقاومت به بیماری نیز افزایش می‌یابد. در این تحقیق میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تمام غلظت های مورد استفاده افزایش قابل ملاحظه ای داشت که با نتایج تحقیقات مشابه مطابقت دارد. نتایج ارزیابی مقدار ترکیبات فنلی در گیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک نشان از افزایش آن به بالاترین میزان، در بازه زمانی۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری در تیمارهای اسید سالیسیلیک داشت و پس از آن روند کاهشی داشت که این امر تائید کننده نقش محرک های زیستی در القای مقاومت در ساعات اولیه بیماری می باشد و کاهش میزان ترکیبات فنلی می تواند ناشی از کاهش میزان غلظت محرک در گیاه و همچنین کاهش قدرت توسعه قارچ به عنوان یک محرک واکنش مقاومتی در گیاه باشد. مطالعات نشان داده است که اغلب ژن های مسئول مقاومت در گیاهان توسط اسید سالیسیلیک تحریک و بیان آنها در گیاهان تیمار شده افزایش می یابد (Ward et al., 1991). در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی آنزیمی نشان داد که بیشترین میزان تغییرات و افزایش تولید آنزیم ها در اکثر غلظت ها، مربوط به بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی می باشد. بدین منظور بررسی میزان تغییرات بیان دو ژن بتاگلوکوناز و اگزالات اکسیدازدر بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی در مقایسه با گیاهان شاهد مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که بیان این ژن‌ها درگیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک در تمام غلظت های استفاده شده افزایش یافته به طوری که در غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام به حداکثر میزان خود رسید، که تفاوت معنی‌داری با شاهد آلوده بدون تیمار اسید سالیسیلیک نشان داد. در مطالعه‌ای که بر روی اثر سیلیکون در القای مقاومت گندم به بیماری بلایت خوشه انجام شد بیشترین میزان تغییرات آنزیمی برای اکثر تیمارها مربوط به بازه های زمانی ۷۲ و ۱۲۰ ساعت بعد از آلودگی بود ولی میزان بیان ژن های مورد بررسی در بازه زمانی ۱۲۰ ساعت بعد از آلودگی بیشترین مقدار را داشت (Ghazimohseni et al., 2014) که این امر می تواند مربوط به نحوه و زمان تاثیر این دو ماده در القای مقاومت باشد. مطالعات مختلف نشان داده است که بهترین زمان تاثیر و القای مقاومت القاکنندگان مقاومت در گیاهان در ساعات اولیه آلوده سازی صورت می گیرد و پارامترهای اندازه گیری شده مرتبط با واکنش های مقاومتی در این ساعات بیشترین مقدار افزایش را نشان داده اند و بعد از گذشت زمان این میزان کاهش می یابد (Eder and Cosio, 1994; Garcia-Brugger et al., 2006). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که بیشترین میزان تغییرات آنزیمی و بیان ژن های اندازه گیری شده در ساعات اولیه بود که با نتایج مطالعات دیگر مطابقت دارد. کاربرد پروتئین القای کننده مقاومت (PemG1) در برنج آلوده به قارچ *Magnoporthe grisea* نشان داده است که در ۳۶ ساعت بعد از آلودگی اطراف لکه های برگی نکروزه و به رنگ قهوه ای متمایل به سیاه تبدیل و از توسعه بیماری بر روی برگها جلوگیری شد ولی میزان بیان ژن های مسئول Pr1 در سه بازه زمانی ۶، ۱۲ و ۲۴ بعد از تیمار برگی برنج سالم با القا کننده PemG1 نشان از افزایش سریع بیان این ژن داشت. در حالی که بیان این ژن در گیاه برنج آلوده با قارچ بیمارگر در بازه های زمانی ۲۱، ۲۸ و ۳۶ روز بعد از القاء، نشان از افزایش بیان ژن های مورد استفاده داشت ولی بیشترین میزان مربوط به بازه ۲۱ روز بود و با گذشت زمان این مقدار رو به کاهش گذاشت (Peng et al., 2011) که با کاهش میزان بیان ژن با گذشت زمان بعد از آلودگی در این تحقیق مطابقت دارد. اثر مستقیم سالیسیلیک اسید و چند هورمون گیاهی طبیعی و شیمیایی در بازدارندگی رشد میسیلومی قارچ های بیمارگر *Raizoctonia solani, Sclerotium rolfsi* و *Fusarium solani* fsp. *pisi* مورد ارزیابی قرار گرفته است و نشان داده شده است که در شرایط

آزمایشگاهی در غلظت های مختلف باعث بازدارندگی از رشد میسیلیومی قارچ های فوق شده است (El-Mougy, 2002). نتایج ما در این تحقیق نشان داد که سالیسیلیک اسید در غلظت های مختلف در شرایط آزمایشگاهی بر روی رشد میسیلیومی قارچ عامل بیماری اسکب گندم اثر بازدارندگی مستقیم دارد که این یافته با نتایج مطالعات مشابه مطابقت دارد.

کاربرد همزمان هورمون های گیاهی و یا محرک های القای مقاومت می تواند سیستم مقاومتی گیاهان را تحت تاثیر قرار داده و گاهاً منجر به کاهش مقاومت شود. کاربرد اسید جاسمونیک و اسیدآبسیزیک بهمراه هم روی گیاه برنج آلوده به قارچ *M. grisea* تیمار شده با اسید سالیسیلیک به طور موثری سبب کاهش بیان ژن مسئول PR1در گیاه مورد آزمایش شده است. در حالی که کاربرد اسید جاسمونیک و اسید آبسیزیک هر کدام به تنهایی، سبب افزایش میزان PR1 شده است. این در حالی بود که اسید سالیسیلیک به تنهایی در گیاه سالم و همچنین گیاه برنج آلوده به عامل بیماری بلاست (*Magnoporthe grisea*) سبب افزایش میزان PR1 شده است (Agrawal et al., 2002). با توجه به نتایج مشاهده شده در این تحقیق چنین نتیجه گیری می شود که اسید سالیسیلیک می تواند به عنوان یک محرک در القای مقاومت گیاهان نسبت به بیمارگرهای قارچی در کنترل بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

از جناب آقای دکتر داوری عضو هیات علمی دانشگاه اردبیل به خاطر در اختیار گذاشتن جدایه استاندارد قارچ *Fusarim graminearum* و همچنین سرکار خانم حمیده خواجه به خاطر کمک در انجام بعضی از آزمایشات آنزیمی تشکر به عمل می آید.

REFERENCES

Agrawal, A., Tuzun, S., and Bent, E. 2002. Maternal effects associated with herbivory: mechanisms and consequences of transgenerational induced plant resistance. Ecology, 83: 3408-3415.

Al-Hakimi, A., and Alghalibi, S. 2009. Thiamin and salicylic acid as biological alternatives for controlling broad bean rot disease. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 11(4): 125 -131.

Bernardo, A., Bai, G., Guo, P., Xiao, K., Guenzi, A. C., and Ayoubi, P. 2007. *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between Fusarium head blight-resistant and susceptible wheat cultivars. Functional and Integrative Genomics,7: 69-77.

Bolwell, G. P., and Wojtaszek, P. 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. Physiological and Molecular Plant Pathology, 51(3): 347-366.

Chandra, A., Saxena, R., Dubey, A., and Saxena, P. 2007. Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhance resistance in cowpea against *Rhizoctonia solani*. Acta Physiologiae Plantarum, 29(4): 361-367.

Craddock, V. 1986. Effect of the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol on nitrosamine-induced oesophageal cancer and on relevant enzymes in oesophagus and liver. IARC Scientific Publications, 84: 266-269.

Creelman, R. A., and Mullet, J. E. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(7): 4114-4119.

Dahleen, L. S., Okubara, P. A., and Blechl, A. E. 2001. Transgenic approaches to combat Fusarium head blight in wheat and barley. Crop Science, 41(3): 628-637.

De Vos, M., Van Oosten, V. R., Van Poecke, R. M., Van Pelt, J. A., Pozo, M. J ,.Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Van Loon, L., and Dicke, M. 2005. Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. Molecular Plant-Microbe Interactions, 18(9): 923-937.

Dunwell, J. M., Khuri, S., and Gane, P. J. 2000. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(1): 153-179.

Durrant ,W., and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology, 42: 185-209.

Eaton, J. W. 1991. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 118(1): 3-4.

Eder, J., and Cosio, E. G. 1994. Elicitors of plant defense responses. W.J. Kwang, and J. Jonathan. (eds.) In International Review of Cytology, Academic Press: pp. 1-36.

Edreva, A. 2004. A novel strategy for plant protection: induced resistane. Journal of Cell and Molecular Biology, 3: 61-69.

El-Mougy, N.S. 2002. In vitro studies on antimicrobial activity of salicylic acid and acetylsalicylic acid as pesticidal alternatives against some soilborne plant pathogens. Egyptian Journal of Phytopathology, 30: 41-55.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science, 261(5122): 754-756.

Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Molecular Plant-Microbe Interactions, 19(7): 711-724.

Ghazimohseni, V., Sabbagh, S. K., Esmaeilzadeh Bahabadi, S., and Ghorbani, M. 2014. Application of silicon in induction of systemic resistance against Fusarium wheat head blight disease. Biological Control of Pest and Plant Disease, 2(3): 128-13 (In Farsi with English abstract).

Gilbert, J., and Tekauz, A. 2000. Review: recent developments in research on Fusarium head blight of wheat in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 22(1): 1-8.

Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology, 43: 205-227.

Gong, Y., Toivonen, P. M., Lau, O., and Wiersma, P. A. 2001. Antioxidant system level in Braeburn' apple is related to its browning disorder. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 42: 259-264.

Goswami, R. S., and Kistler, H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular Plant Pathology, 5(6): 515-525.

Groves, F. D., Zhang, L., Chang, Y.-S., Ross, P.F., Casper, H., Norred, W.P., You, W.C., and Fraumeni, J. F. 1998. Fusarium mycotoxins in corn and corn products in a high-risk area for gastric cancer in Shandong Province, China. Journal of AOAC International, 82(3): 657-662.

Hammerschmidt, R. 2009. Systemic acquired resistance. Advances in Botanical Research, 51: 173-222.

He, C., and Wolyn, D. 2005. Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. Plant Pathology, 54(2): 227-232..

Hu, J.L., Lin, X.G., Wang, J.H., Shen, W.S., Wu,S., Peng,S.P., and Mao, T.T. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation enhances suppression of cucumber fusarium wilt in greenhouse soils. Pedosphere, 20(5): 586-593.

Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57(2): 315-319.

Karimi, M., and Siddique, K. 1991. Crop growth and relative growth rates of old and modern wheat cultivars. Crop and Pasture Science, 42(1): 13-20.

Koornneef, A., and Pieterse, C. M. 2008. Cross talk in defense signaling. Plant Physiology,146: 839-844.

Kuć, J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European Journal of Plant Pathology, 107(1): 7-12.

Lagrimini, L. M., Burkhart, W., Moyer, M., and Rothstein, S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. Proceedings of the National Academy of Sciences, 84(21): 7542-7546.

Lai, M.-H. T., and Joklik, W. K. 1973. The induction of interferon by temperature-sensitive mutants of reovirus, UV-irradiated reovirus, and subviral reovirus particles. Virology, 51(1): 191-204.

Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I., and Mundy, J. 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. Journal of Biological Chemistry, 266(3): 1564-1573.

Liang, H., Maynard, C. A., Allen, R. D., and Powell, W. A. 2001. Increased Septoria musiva resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing a wheat oxalate oxidase gene. Plant Molecular Biology, 45: 619-629.

Luo, Y., Yoshizawa, T., and Katayama, T. 1990. Comparative study on the natural occurrence of Fusarium mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high-and low-risk areas for human esophageal cancer in China. Applied and Environmental Microbiology, 56(12): 3723-3726.

Oka, Y., Chet, I., and Spiegel, Y. 1997. Are pathogenesis-related proteins induced by *Meloidogne javanica* or *Heterodera avenae* lnvasion. Journal of Nematology, 29(4): 501-511.

Peng, D.-H., Qiu, D.-W., Ruan, L.-F., Zhou, C.-F., and Sun, M. 2011. Protein elicitor PemG1 from *Magnaporthe grisea* induces systemic acquired resistance (SAR) in plants. Molecular Plant-Microbe Interactions, 24(10): 1239-1246.

Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Research, 29(9): 2002-2007.

Qi, P. F., Johnston, A., Balcerzak, M., Rocheleau, H., Harris, L.J., Long, X. Y., Wei, Y. M., Zheng, Y.L., and Ouellet, T. 2012. Effect of salicylic acid on *Fusarium graminearum*, the major causal agent of fusarium head blight in wheat. Fungal Biology, 116(13): 413-426.

Raskin ,I. 1992. Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Biology,43(1): 439-463.

Ryu, J. C., Ohtsubo, K., Izumiyama, N., Nakamura, K., Tanaka, T., Yamamura, H., and Ueno, Y. 1988. The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice. Toxicological Sciences, 11(1): 38-47.

Seevers, D., Daly, J., and Catedral, F. 1971. The role of peroxidase isozyme in resistance to wheat stem rust disease. Journal of Plant Physiology, 48: 353-360.

Shoresh, M., Yedidia, I., and Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. Phytopathology,95(1): 76-84.

Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B. 1993. Plant 'pathogenesis-related'proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie, 75(8): 687-706.

Tamari, G., Borochov, A., Atzorn, R., and Weiss, D. 1995. Methyl jasmonate induces pigmentation and flavonoid gene expression in *petunia corollas*: a possible role in wound response. Physiologia Plantarum, 94(1): 45-50.

Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J. 1992. Acquired resistance in Arabidopsis. The Plant Cell, 4(6): 645-656.

Ward, E., Uknes ,S., Williams, S., Dincher, S., Wiederhold, D., Alexander, D., Ahl-Goy, P., Metraux, J., and Ryals, J. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. The Plant Cell, 3(10): 1085-1094.

Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F. M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. Nature, 414(6863): 562-565.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 40(1) Spring 2017

Salicylic acid effect on antioxidant enzymes activity and transcription of β 1,3- gluconase and oxalat oxidase genes in infected wheat with head blight disease

S.K. Sabbagh[1*], M. Paykani[2] and S. Esmaeilzadeh Bahabadi[3]

1. **Corresponding author:** Associate Professor of Plant Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Iran (sksabbagh@yazd.ac.ir)
2. M.Sc. student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, University of Zabol, Iran
3. Assistant Professor of Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Iran

Received: 2 January 2016 Accepted: 14 October 2016

Abstract

In this study, the effect of different concentrations of salicylic acid (0, 200, 400 and 600 ppm) was investigated on some antioxidant enzymes activity and transcription level of two 1,3- Gluconase and Oxalat oxidase genes in infected wheat to head blight disease caused by *Fusarium graminearum*. The treated plants were inoculated with spore suspension (at concentration of 10^5 spore/mL) by injection into the lower part of spikelet. The activity of antioxidant enzymes, total phenolic content and transcription level of above genes as indicators of resistance at 0, 24, 72 and 120 h time interval after inoculation was assayed. The results of the enzyme assay showed that the highest rate of enzyme and total phenol production was related to the concentration of 400 ppm and 72 hours post-infection. Transcription level analysis of two tested genes by Real time-PCR showed that in 72 hours after infection the concentration of 400 ppm had the most influence on the expression of both genes but Transcription level of β- 1,3- glucanase gene in the same concentration was increased higher than oxalate oxidase. Effect of salicylic acid on inhibition of mycelium growth showed that the inhibitory effect was increased by increasing concentration and concentration of 600 mg/l absolutely prevened mycelium growth. According to the results, it can be concluded that salicylic acid may be useful in the induction of resistance to head blight.

Keywords: Salicylic acid, Antioxidan enzymes, Gene expression, Head blight, Induced resistance