تأثیر فسفیت پتاسیم بر تجمع پراکسیدهیدروژن و بررسی الگوی بیان ژن دیفنسین در گیاه خیار (*Cucumis sativus*) تحت تنش قارچ پیتیوم (*Pythium ultimum*)

مریم مفیدنخعی*[۱]، علی دهستانی[۲]، سحر حیدرزاده[۳]، سمیرا شعبانی[۴]
[۱] دانشجوی دکتری سبزیکاری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران
[۲] استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
[۳] دانش‌آموخته رشته بیوتکنولوژی، دانشگاه کشاورزی شاهرود، شاهرود
[۴] دانش‌آموخته رشته بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، کرج
* نویسنده مسئول: mofid.nakhaei@yahoo.com

چکیده

فسفیت پتاسیم می‌تواند به‌طور مؤثری اثرات تخریبی قارچ‌های اوومیست بر میزبان‌های گیاهی را کاهش دهد. بااین‌حال ساز و کارهای مولکولی تغییرات ایجاد شده در بافت‌های گیاهی به‌طور دقیق مشخص نشده‌اند. در تحقیق حاضر، میزان تجمع پراکسیدهیدروژن و بیان ژن دیفنسین در گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم تحت تنش پاتوژن پیتیوم بررسی شدند. با ظهور دومین برگ حقیقی خیار، محلول‌پاشی برگی فسفیت پتاسیم (غلظت‌های ۰، ۱ و ۴ گرم بر لیتر) انجام گرفت. پنج روز بعد، آلوده‌سازی با قارچ پیتیوم انجام گردید. همچنین ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح، نمونه‌گیری جهت استخراج و اندازه گیری پراکسیدهیدروژن صورت گرفت. سطح تظاهر ژن دیفنسین ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با استفاده از روش ارزیابی نیمه‌کمی بررسی شد. نتایج نشان داد، بیشترین بیان ژن مربوط به تیمارهای فسفیت پتاسیم (غلظت ۱ گرم بر لیتر) ۴۸ ساعت پس از تلقیح قارچ بود. میزان پراکسیدهیدروژن در تیمار فسفیت پتاسیم در غلظت ۴ گرم بر لیتر نسبت به تیمارهای دیگر در ۲۴ ساعت پس از تلقیح به‌طور معنی داری ($P<0.01$) بیشتر بود.

کلمات کلیدی: **ارزیابی نیمه‌کمی، اوومایست، بیان ژن، ساز و کار مولکولی و محلول‌پاشی.**

مقدمه

گونه‌های مختلف پیتیوم مانند *Pythium ultimum* سبب از بین رفتن دانهال‌های جوان گیاهان زینتی و باغبانی مختلف در گلخانه و مزرعه می‌شوند. قارچ پیتیوم در گیاه خیار می‌تواند سبب بوته‌میری شود که سالانه باعث از بین رفتن مقدار زیادی از این محصول می‌شود. این قارچ در آب و هوای گرم و مرطوب سبب پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی خانواده‌ی کدوئیان مخصوصاً خیار می‌شود (Samavatian and Shahriari, 2011). به دلیل اثرات نامطلوب قارچ‌کش‌ها بر سلامت انسان‌ها و محیط‌زیست، باید به دنبال راهکارهای استفاده از ترکیبات بی‌ضرر بود. ازجمله مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر پاتوژن‌ها، واکنش فوق حساسیت، تجمع فیتوالکسین‌ها و فعال‌سازی مسیر فنیل‌پروپانوئید می باشند (Kavousi *et al.*, 1990).

دیفنسین‌ها گروهی از پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی هستند که در اثر تحریک پاتوژن، در گیاهان تولید می‌شوند. دیفنسین‌ها با اتصال به اسفنگو لیپیدها که گیرنده‌های غشای سلولی قارچ‌ها هستند، از طریق نفوذپذیری غشاء باعث تسریع مهار آن می‌شوند (Madhu *et al.*, 2015). در میان مواد مختلف، ترکیباتی به نام فسفیت‌ها (نمک‌های معدنی اسید فسفر) وجود دارند که برای کنترل بیماری‌های ناشی از گونه‌های پیتیوم و بیماری‌های دیگر قارچی و باکتریایی شناخته‌شده‌اند (Adams and Conral, 1953).

در مطالعه حاضر، تأثیر فسفیت پتاسیم بر تغییرات میزان فعالیت پراکسیدهیدروژن و تغییرات الگوی بیان ژن دیفنسین در گیاه خیار، تحت تنش قارچ بیماری‌زای پیتیوم بررسی شد تا واکنش گیاه خیار به قارچ پیتیوم، مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در گلخانه و آزمایشگاه پژوهشکده‌ی برنج و مرکبات، واقع در دانشگاه کشاورزی ساری در سال ۱۳۹۳ انجام شد. طرح پژوهش کاملاً تصادفی، شامل ۳ تیمار و ۳ تکرار به‌صورت گلدانی بود. تیمارها شامل تیمار فسفیت پتاسیم با غلظت‌های ۰، ۱ و ۴ گرم بر لیتر بود. برای تهیه محلول فسفیت پتاسیم، فسفوروس اسید و هیدروکسیدپتاسیم تا رسیدن به pH=6.3 با هم ترکیب شدند. با ظهور دومین برگ حقیقی خیار، رقم بومی اصفهان، محلول‌پاشی برگی تیمارهای فسفیت پتاسیم (غلظت‌های ۱ و ۴ گرم بر لیتر) انجام گرفت. گیاهان شاهد (۰ گرم بر لیتر) توسط آب مقطر محلول‌پاشی شدند.

پنج روز بعد، آلوده سازی به‌وسیله اینوکولوم قارچ پیتیوم انجام گردید. قارچ پیتیوم جدا شده از خیار، از بخش گیاهشناسی مؤسسه تحقیقات کشاورزی تهران تهیه گردید. جهت تهیه مایه تلقیح از روش رامرتی و همکاران (2002)، با کمی تغییرات استفاده شد. پراکسیدهیدروژن با استفاده از روش Sergiev *et al.*, 1997 موردانداز‌ه‌گیری قرار گرفت. استخراج RNA کل از برگ‌های گیاهان در بازه‌های زمانی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آلودگی قارچی، با استفاده از ترایزول انجام گرفت. به‌منظور حذف آلودگی‌های احتمالی DNA از RNA از کیت DNase I, RNase-free ساخت شرکت فرمنتاس (Cat. No: EN0525) استفاده گردید. سپس با استفاده از آغازگرهای Oligo(dT)18، رشته اولیه Complementary DNA (cDNA) توسط کیت شرکت فرمانتاس (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit) ساخته شد.

برای طراحی آغازگرها، ابتدا توالی ژن‌های رفرنس (اکتین) و مسیرهای مقاومتی موجود در پایگاه اینترنتی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) استخراج شده و پس از هم‌ردیف نمودن توالی‌های بدست آمده با استفاده از ClustalW آغازگرها به‌وسیله نرم‌افزارهای BioEdit 7.0.9.0 و OligoExplorer V1.4 طراحی شدند (جدول ۱). آغازگرهای مورد استفاده توسط شرکت بایونیر سنتز شدند.

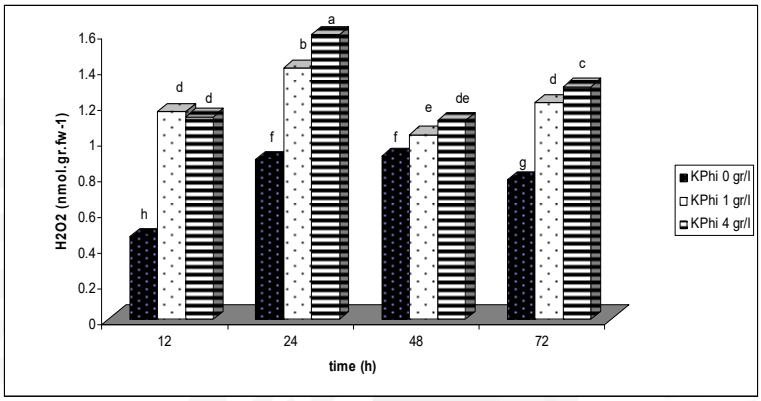
جدول ۱- مشخصات پرایمرهای Real-time

نام پرایمر	طول پرایمر(bp)	توالی (۵َبه ۳َ)
Defensin F	۲۰	**GAGGCGAGGGTATGCGAATC**
Defensin R	۱۸	**GCAGCGACGGCGAAATCC**
ActF	۲۲	**GATTCTGGTGATGGTGTGAGTC**
ActR	۲۰	**TCGGCAGTGGTGGTGAACAT**

تجزیه و تحلیل بیان ژن مورد بررسی، با استفاده از تکنیک Quantitative Real- Time PCR توسط دستگاه C1000™ Thermal Cycler (BioRad) انجام شد. کیت مورد استفاده برای بررسی بیان ژن Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) از شرکت فرمنتاس (Cat. No: K0221) بود. نرخ بیان ژن با استفاده از روش ^{Ct} $2^{-\Delta\Delta}$ (Livak and Schmittgen 2001) اندازه‌گیری شد و پس از محاسبه بیان ژن‌های مورد مطالعه، نمودارهای آن‌ها توسط نرم‌افزار Excel، رسم گردید. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد استفاده شد.

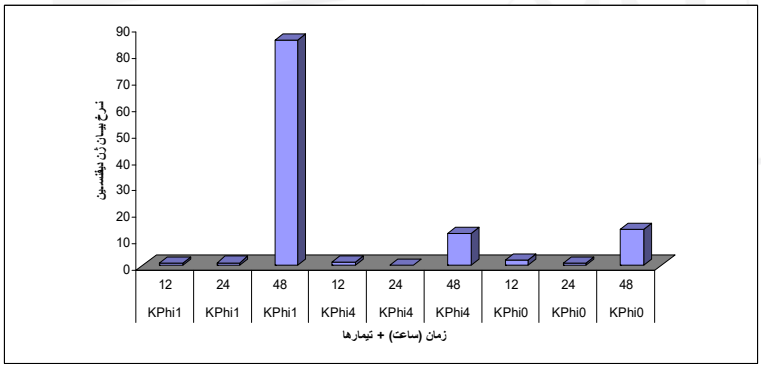
نتایج و بحث

طبق شکل ۱، در مطالعه‌ی حاضر، استفاده از فسفیت پتاسیم، به افزایش فعالیت پراکسیدهیدروژن منجر شد. مطالعه انجام شده توسط Machinandiarena *et al.*, (2012) افزایش پاسخ ایمنی سیب‌زمینی تحت تیمار با فسفیت، پس از تلقیح با قارچ *Phytophthora infestans* نشان داد. آن‌ها دریافتند که فسفیت، ابتدا تولید پراکسید هیدروژن و آنیون سوپر اکسید می‌کند که آن‌ها از گسترش پاتوژن جلوگیری می‌کنند. طبق نتایج، مشاهده شد میزان رادیکال‌های آزاد سوپراکسید و پراکسید هیدروژن با پیشرفت بیماری، افزایش چشمگیری داشت که می‌توان آن را نوعی پیام‌دهی برای فعال کردن سیستم حفاظتی گیاه در پاسخ به عامل بیماری دانست. اگرچه، H_2O_2 در غلظت‌های بالا برای گیاه می‌تواند سمی باشد. اما در غلظت‌های پایین می‌تواند نقش پیام‌آور در گیاه داشته باشد. به‌طوری‌که در القای مرگ سلولی و فعال‌سازی ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌تواند نقش بسیار مؤثری را ایفا کند (Qinghua *et al.*, 2008).



شکل ۱- تأثیر فسفیت پتاسیم بر میزان پراکسیدهیدروژن خیار تحت تنش قارچ پیتیوم

شکل ۲، نشان‌دهنده‌ی یک روند نسبی افزایشی در میزان ژن دیفنسین بوده است. بیشترین بیان ژن مربوط به تیمار فسفیت پتاسیم (غلظت ۱ گرم بر لیتر) ۴۸ ساعت پس از تلقیح قارچ بود. تحقیقی که بر روی گیاهان بومی استرالیا صورت گرفت، نشان داد، فسفونیک تیمار شده به گیاه تلقیح شده با پاتوژن، باعث از بین رفتن کامل پاتوژن نمی‌شود: بلکه باعث شروع تحریک گیاه به بیان ژن‌های دفاعی و فعال شدن پروتئین‌ها و ژن‌های مقاومت به بیماری زایی و دیفنسین‌ها می‌شود (Hanslamber, 2013). همچنین نظریه دیگری مبنی بر ایجاد آنیون‌های سوپر اکسید توسط فسفیت پتاسیم، وجود دارد که این عامل سبب افزایش بیان ژن دیفنسین می‌شود(Franky *et al.*, 1998). این نتایج در توافق با نتایج ما بود.



شکل ۲- تأثیر فسفیت پتاسیم بر میزان بیان ژن دیفنسین در برگ خیار تحت تنش قارچ پیتیوم

منابع

Adams, F. and J.P. conral. **1953**. Transition of phosphate to phosphite soil. soil science, 75:361-371.

Franky, R.G. Terras., A.M.A. Iris., I. J.G. Penninckx., F. B. Willem. 1998. Evidence that the role of plant defensins in radish defense responses is independent of salicylic acid. Planta. 206: 117-124.

Hanslambers. 2013. phosphorus nutrition of phosphorus-sensitive Australian native plants: threats to plant communities in a global biodiversity hot spot. Conservation physiology. vol. 1.

Kavousi, H.R., Marashi, H., Mozafari, J., and Bagheri, A.R. 2009. Expression of phenylpropanoid pathway genes in chickpea defense against race 3 of *Ascochyta rabiei*. Plant Pathology Journal 8: 127-132.

Machinandiarena, M.F., M.C. Lobato., M.L. Feldman., G.R. Daleo and A.B. Andreu. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. Journal of Plant Physiology, 169: 1417-1424.

Madhu, B., R. Thankappan., G. Abhay and M. Prakash. **2015**. Overexpression of a fusion defensin gene from radish and fenugreek improves resistance against leaf spot diseases caused by *Cercospora arachidicola* and *Phaeoisariopsis personata* in peanut. Turkish Journal of Biology. 39: 2-11.

Qinghua, S. H. and Z. Zhujun. 2008. Effect of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents andantioxidative system in cucumber. Environmental and Experimental Botany. 63: 317-326.

Ramoorthy, V., T. raguchander and R. Samiyappan. 2002. Enhancing Resistance of tomato and hot peper to Pythium disease by seed treatment with fluorescent Pseudomonas. Eur Journal of Plant pathology, 108, 429-441.

Samavatian, M. and A. Shahriari. 2011. The first national conference on sustainable agriculture and healthy crop production.

Sergive, I., V. Alexieva and E. Karanov. **1997**. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markes in plants. Comptes redus de lAcademie bulgare des Sciences, 51: 121-124.

Effect of Potassium Phosphite on Accumulation of Hydrogen Peroxide and The Pattern of Defensin Gene Expression in Cucumber (*Cucumis sativus*) Infected with Pythium (*Pythium ultimum)* Fungus

Maryam Mofidnakhaei[1]*, Ali Dehestani[2], Sahar Heidarzadeh[3], Samira Shabani[4]
[1*] Ph. D Student of Horticultural Science, Olom Tahghighat University of Tehran
[2] Associate Professor, Dep. of Biotechnology Science, Agricultural and Natural Resources University of Sari
[3] Greduate Master of Biotechnology, University of shahrood
[4] Greduate Master of Biotechnology, University of karaj
Corresponding Author: mofid.nakhaei@yahoo.com

Abstract

Potassium phosphite efficiently mitigates the adverse effects of Oomycete pathogens on host plants, but the exact molecular mechanisms of the Phosphite activity in plant tissues have not been clearly identified. In the present study the Hydrogen peroxide accumulation along with defensin gene expression in the potassium phosphite-treated cucumber plants under *Pythium ultimum* stress were investigated. The plants were sprayed with different concentrations of Potassium phosphite (0, 1 and 4 grL-1) after the emergence of second true leaves. The plants were then inoculated with *P. ultimum* after 5 days. 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation samples were collected from plants for Hydrogen peroxide measurement. The defensin gene expression changes was analyzed at 12, 24 and 48 hours after inoculation through qPCR analysis. Results showed that the highest rate of defensin gene expression was recorded in plants treated with 1 grL-1 Potassium phosphite 48 hours after inoculation. The hydrogen peroxide content in plants treated with 4 g L-1 Potassium phosphite was significantly ($P < 0.01$) higher than other treatments at 24 hours after treatment.

***Keywords*: Gene expression, molecular mechanisms, Oomycete, Semi-quantitative assessment, Spray.**