تاثیر پیوند در مقاومت گیاه خیار به شته جالیز *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae)

فاطمه مقدری پور[۱]، شهناز شهیدی نوقابی*[۲]، محمود رقامی[۳]

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد حشره شناسی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان

۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان

*نویسنده مسئول: shahidi@vru.ac.ir

چکیده

پیوند یک روش معمول ازدیاد رویشی است. در این پژوهش، تاثیر پیوند خیار روی پایه کدو بر آنزیم‌های دفاعی گیاه خیار علیه شته جالیز *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) بررسی شد. بذرهای کدو رقم RS 841 در گلدان‌های پلاستیکی، بذرهای خیار رقم هیبرید INCI F1، در سینی نشاء در اتاقک رشد در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۷۵±۱۰ درصد و با شرایط نور طبیعی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. تیمارها برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاه خیار پیوندی بدون حشره، خیار پیوندی با حشره، خیار غیرپیوندی بدون حشره و خیار غیرپیوندی با حشره، هر کدام با ۳ تکرار بودند. سطح آنزیم‌های دفاعی گیاه در گیاهان پیوندی و پس از آلوده‌سازی آن با شته جالیز نسبت به گیاهان غیرپیوندی افزایش یافت. به طوری‌که بررسی آنزیم‌های دفاعی گیاه نشان داد که در گیاهان پیوندی میزان آنزیم پراکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و هم‌چنین متابولیت‌های ثانویه گیاه و نیز پروتئین‌کل نسبت به گیاهان غیرپیوندی بیش‌تر بود. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که استفاده از پیوند که در دنیا روش مورد تاییدی جهت دستیابی به محصول سالم با عملکرد بالا است، می‌تواند به عنوان گزینه مناسبی به جای استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی علیه شته جالیز استفاده شود.

کلمات کلیدی: شته جالیز، خیار، پیوند، کدو

مقدمه

شته جالیز *Aphis gossypii* (Glover) یک آفت بزرگ اقتصادی است که به محصولات و سبزیجات گلخانه‌ای در سرتاسر جهان و ایران حمله می‌کند (Van Steenis and El-Khawass, 1995). به دلیل اثرات زیان‌بار زیست‌محیطی و بروز پدیده مقاومت در شته نسبت به حشره‌کش‌ها استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی روزبه‌روز در دنیا در حال کاهش است (Klingler *et al*., 2001). بنابراین، برای مدیریت و کنترل این آفت جایگزین کردن روش‌های کنترل کم خطر در قالب راهبرد کنترل تلفیقی آفات بسیار ضروری است. تکنیک پیوند در سطح وسیع و به صورت تجاری در کشت و پرورش سبزی‌ها در کشورهای صنعتی و توسعه یافته به کار رفته است (Yamakawa, 1983). دلایل اصلی برای پیوند خیار افزایش مقاومت به آفات و بیماری‌هاست. پیوند گوجه‌فرنگی روی پایه‌های *Lagenaria* باعث مقاومت به کنه قرمز تارعنکبوتی *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) شده است نتایج نشان می‌دهد که پایه‌ها، تولید یک سری مواد القاکننده مقاومت می‌کند که از طریق پیوند به شاخ و برگ گیاهان کدو منتقل می‌شود (Edelstein *et al*., 2000). پیوند بقا و باروری شته سیب‌زمینی *Macrosiphum euphorbiae* و هم‌چنین رشدونمو سوسک کلرادو سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* در شاخ و برگ *Solanum* وحشی را کاهش داده است بر اساس نتایج یک عامل شیمیایی یا عوامل موثر در مقاومت در برابر سوسک کلرادو سیب‌زمینی از برخی از گونه‌های Solanum وحشی به شاخ و برگ سیب‌زمینی منتقل می‌شوند. (Pelletier and Clark, 2004). پاسخ پاداکسندگی (آنتی اکسیدانی)، یک فرایند مهم برای محافظت گیاهان در مقابل آسیب‌های اکسایشی است (Wei *et al*., 2009). پروتئین در واکنش‌های مقاومت گیاهی به عنوان متاولیت‌های ثانویه عمل کرده و تا حدودی باعث از بین رفتن حشرات آفت می‌شود (Gomes *et al*., 2005). آنزیم پراکسیداز نقش مهمی در کاهش فعالیت رادیکال-های آزاد اکسیژن ناشی از تنش در برگ گیاهان دارد که منجر به کاهش تخریب غشاهای سلولی و آسیب‌دیدگی گیاهان می‌شود

(Miller *et al*., 2010). آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز که مواد لیگنین و سوبسترای لازم برای آنزیم پراکسیداز را فراهم می‌کند در پاسخ گیاه به تنش‌های مختلفی فعال می‌شود و آنزیم مهم و کلیدی در بیوسنتز ترکیبات فنلی به شمار می‌رود که به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی در سلول عمل کرده و باعث جمع‌کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (Chen *et al*., 2000).

مواد و روش‌ها

تهیه پایه و پیوندک

بذرهای کدو رقم RS 841 در گلدان‌های یک کیلویی پلاستیکی مشکی به قطر ۱۴ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۳سانتی‌متر حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۵۰:۵۰ در گلخانه دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان کشت شدند. بذرهای خیار رقم هیبرید INCI F1، در سینی نشاء در اتاقک رشد در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۱۰±۷۵ درصد و با شرایط نور طبیعی ۸: ۱۶ (تاریکی: روشنایی) کشت شدند.

پرورش شته جالیز

جمعیتی از شته جالیز از روی گیاهان خیار آلوده از شهر ماهان کرمان جمع‌آوری و به اتاقک رشـد با دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۵۰ درصد و دوره نوری ۸: ۱۶ (تاریکی: روشنایی) منتقل شـدند. برای پرورش و حفظ کلنی شته از گیاهان تازه خیار که داخل قفس‌هایی که با توری پوشیده شده بودند، استفاده شد.

تیمارها

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و پروتئین کل، برگ‌ها از ارتفاع مشابه از گیاهان در تیمارهای مختلف جدا شدند. برای هر تیمار چهار برگ (تکرار) به‌طور تصادفی از هر گیاه استفاده شد. تیمارها شامل خیار پیوندی بدون حشره، خیار پیوندی با حشره، خیار غیرپیوندی بدون حشره، خیار غیرپیوندی با حشره بودند. آنزیم‌ها و پروتئین کل در زمان‌های صفر، ۱۰ و ۲۰ روز پس از آلودگی گیاه خیار با شته‌جالیز اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری پروتئین کل

برای سنجش پروتئین کل از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره اضافه شد و در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش Hildebrand و همکاران (۱۹۸۶) استفاده شد. به ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ۲/۷۷ میلی‌لیتر بافر فسفیت پتاسیم، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول و ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) اضافه و در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر و در ۴ زمان، ۶۰ ثانیه یک‌بار خوانده شد.

اندازه‌گیری آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)

برای سنجش آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز با روش وانگ و ژو (۱۹۸۰) مورد ارزیابی قرار گرفت. به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج، ۵۰۰ میکرولیتر فنیل‌آلانین ۰/۰۱ مولار، ۴۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر اضافه شد و به مدت یک ساعت در داخل حمام بن‌ماری و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گذاشته شد. سپس، ۵۰۰ میکرولیتر هیدروژن‌کلرید ۶ مولار به نمونه‌ها اضافه و در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون Mann-Whitney Test با کمک نرم‌افزار SPSS 16.0 تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

پروتئین کل

بیش‌ترین میزان پروتئین در گیاهان پیوندی ۱۰ و ۲۰ روز پس از آلودگی با شته جالیز مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری از دیگر تیمارها در زمان‌های مختلف پس از آلودگی بیش‌تر بود. کم‌ترین مقدار پروتئین در تیمار گیاهان غیر پیوندی بدون حشره، ۲۰ روز پس از آلودگی با شته جالیز مشاهده شد. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، مقادیر مربوط به میزان پروتئین کل در تیمار گیاهان پیوندی با حشره، در تمام زمان‌های پس از آلودگی از دیگر تیمارها بالاتر بود (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج مقایسه میانگین محتوای پروتئین کل (mg/g FW) در روزهای نمونه‌برداری

تیمار	زمان‌های نمونه‌برداری (روز بعد از قرار دادن حشره)		
	۰	۱۰	۲۰
پیوندی با حشره	۰/۰±۰۶۳/۰۰۴^{aA}	۰/۰±۰۷۰/۰۰۲^{aA}	۰/۰±۰۷۴/۰۱۷^{abA}
پیوندی بدون حشره	۰/۰±۰۶۳/۰۰۴^{aA}	۰/۰±۰۶۹/۰۰۰۵^{aA}	۰/۰±۰۷۳/۰۰۳^{aA}
غیرپیوندی با حشره	۰/۰±۰۶۱/۰۰۲^{aA}	۰/۰±۰۵۹/۰۰۳^{bA}	۰/۰±۰۶۳/۰۰۲^{bA}
غیرپیوندی بدون حشره	۰/۰±۰۶۱/۰۰۲^{aA}	۰/۰±۰۵۹/۰۰۵^{bAB}	۰/۰±۰۵۰/۰۰۱^{cB}

حروف کوچک غیرمشابه در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$).
حروف بزرگ غیرمشابه در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$).
روز صفر مصادف با روز ۶۰ بعد از پیوند می‌باشد.

آنزیم پراکسیداز

بیش‌ترین فعالیت آنزیم پراکسیداز (۰/۲۶۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در گیاهان پیوندی ۲۰ روز پس از آلودگی با شته جالیز مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری از دیگر تیمارها در زمان‌های مختلف پس از آلودگی بیش‌تر بود. بر اساس نتایج، مقادیر مربوط به میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار گیاهان پیوندی با حشره، در تمام زمان‌های پس از آلودگی از دیگر تیمارها بالاتر بود (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین آنزیم پراکسیداز (unit/mg protein) در روزهای نمونه‌برداری

تیمار	زمان‌های نمونه‌برداری (روز بعد از قرار دادن حشره)		
	۰	۱۰	۲۰
پیوندی با حشره	۰/۰±۰۳۳/۰۰۶^{aB}	۰/۰±۰۳۹/۰۰۶^{bB}	۰/۰±۲۶۴/۰۴۸^{aA}
پیوندی بدون حشره	۰/۰±۰۳۳/۰۰۶^{aB}	۰/۰±۰۶۷/۰۰۸^{aA}	۰/۰±۰۸۱/۰۳۳^{bA}
غیرپیوندی با حشره	۰/۰±۰۹۲/۰۴۶^{aA}	۰/۰±۰۸۶/۰۳۳^{abA}	۰/۰±۱۸۴/۰۴۵^{aA}
غیرپیوندی بدون حشره	۰/۰±۰۹۲/۰۴۶^{aA}	۰/۰±۰۹۳/۰۷۰^{abA}	۰/۰±۰۹۲/۰۳۶^{bA}

حروف کوچک غیرمشابه در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$).
حروف بزرگ غیرمشابه در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$).
روز صفر مصادف با روز ۶۰ بعد از پیوند می‌باشد.

آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

بیش‌ترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (۲/۴۸۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در گیاه غیرپیوندی با حشره ۲۰ روز پس از آلودگی با شته جالیز مشاهده شد. کم‌ترین مقدار این آنزیم (۱/۶۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار گیاهان غیر پیوندی بدون حشره، ۲۰ روز پس از آلودگی با شته جالیز مشاهده شد. بر اساس نتایج، مقادیر مربوط به میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در تیمار گیاهان غیرپیوندی با حشره، در تمام زمان‌های پس از آلودگی از تیمار غیرپیوندی بدون حشره بالاتر بود (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (unit/mg protein) در روزهای نمونه‌برداری

تیمار	زمان‌های نمونه‌برداری (روز بعد از قرار دادن حشره)		
	۰	۱۰	۲۰
پیوندی با حشره	۱/۰±۶۹۸/۰۸۷^{aA}	۱/۰±۹۸۱/۱۴۸^{aA}	۲/۰±۰۸۲/۵۶۲^{abA}
پیوندی بدون حشره	۱/۰±۶۹۸/۰۸۷^{aA}	۱/۰±۸۶۸/۱۵۶^{aAB}	۲/۰±۰۴۶/۱۱۶^{aB}
غیرپیوندی با حشره	۱/۰±۹۱۹/۱۹۹^{aA}	۱/۰±۹۷۴/۲۱۹^{aA}	۲/۰±۴۸۲/۲۳۱^{aA}
غیرپیوندی بدون حشره	۱/۰±۹۱۹/۱۹۹^{aA}	۱/۰±۶۴۶/۱۷۸^{aA}	۱/۰±۶۲۱/۰۹۲^{bA}

حروف کوچک غیرمشابه در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$).
حروف بزرگ غیرمشابه در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$).
روز صفر مصادف با روز ۶۰ بعد از پیوند می‌باشد.

با توجه به نتایج و مشاهدات حاصل از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت گیاه مکانیسم‌های مقاومتی متفاوتی را برای غلبه بر شته جالیز از خود بروز می‌کند. وقتی گیاه مورد حمله شته قرار می‌گیرد، مکانیسم‌های دفاعی که به طور طبیعی در گیاه وجود دارد، مثل ضخیم بودن دیواره سلولی و یا مواد شیمیایی مقاومت که باعث مقاومت گیاه خواهند شد، فعال می‌شوند. از طرف دیگر ممکن است مکانیسم‌های دفاعی بعد از حمله شته در گیاه ظاهر شوند که در این هنگام است که گیاه تولید فیتوالکسین می‌نماید و از خود دفاع می‌کند (مقاومت القایی) که بسته به رابطه‌ای که بین گیاه و شته برقرار می‌شود، مقاومت و حساسیت در گیاه به وجود می‌آید. با توجه به نتایج می‌توان بیان داشت که پیوند هم می‌تواند منجر به تحریک سیستم دفاعی گیاهان شود و باعث افزایش سطح آنزیم‌های دفاعی و القای مقاومت در گیاهان گردد. آنزیم‌ها به تنهایی در القای مقاومت به حشره نقش ندارند و افزایش هم‌زمان آن‌ها منجر به بروز مقاومت در گیاه می‌شود. در این مطالعه نتایج نشان داد میزان پروتئین کل در گیاهان پیوندی بیش‌تر از غیرپیوندی و در تیمارهای آلوده به حشره بیش‌تر از تیمارهای غیرآلوده به حشره بود. پروتئین یک ماده مغذی معمول و مهم برای رشد حشرات آفت است می‌تواند فیزیولوژی آفات را با استفاده از کاهش اندازه حشرات بالغ، نرخ رشد و بقا آن‌ها را تغییر دهد. تنش آفت شته جالیز در گیاه خیارپیوندی باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد پراکسیداز باعث سخت کردن بافت برگ شده و از تغذیه شته از گیاه میزبان جلوگیری کرده و باعث مقاومت به حشره در گیاه شده است (Gong *et al*., 2001). در بین تیمارهای غیرپیوندی تیمار دارای حشره بیش‌ترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین-آمونیالیاز را داشت که نشان‌دهنده نقش این آنزیم در مکانیسم دفاعی گیاه در برابر تنش آفت است که در نتیجه باعث افزایش مقاومت گیاه به صورت مقاومت اکتسابی سیستمیک به شته جالیز شد (Chen *et al*., 2009).

منابع

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Biochemistry, 72: 248-254.

Chen, C., Belanger, R., Benhamou, N. and Paulitz, T. 2000. Defence enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56: 13-23.

Chen, C., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z. and Fan, B. 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. Plant Signaling Behavior, 4: 493-496.

Edelstein, M., Tadmor, Y., Abo-Moch, F., Karchi, Z., Mansour, F. 2000. The potential of *Lagenaria* rootstock to confer resistance to the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) in Cucurbitaceae. Bulletin of Entomological Research, 90: 113-117.

Gomes, F. B., Moraes, J. C. D., Santos, C. D. and Goussain, M. M. 2005. Resistance induction in wheat plants by silicon and Aphids. Science Agriculture Entomologia, 62: 547-551.

Gong, Y., Toivonen, M., Lau, O. and Wiesrsma, A. 2001. Antioxidant system level in Braeburn apple is related to its browing disorder. Botanical Journal of the Linnean Society, 42: 259-264.

Klingler, J., Kovalski, I., Silberstein, L., Thompson, G. A. and Perl-Treves, R. 2001. Mapping of cottonmelon aphid resistance in melon. Journal of American Society of Horticultural Science. 126: 56-63.

Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-yilmaz, A. N. and Mittler, R. O. N. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. Plant, Cell and Environment, 33(4): 453-467.

Pelletier, Y. and Clark, C. 2004. Use of reciprocal grafts to elucidate mode of resistance to Colorado potato beetle [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)] and potato aphid [*Macrosiphum euphorbiae* (Thomas)] in six wild *Solanum* species. American Journal of Potato Research, 81: 341-346.

Van Steenis, M. J. and El-Khawass, K. A. M. H. 1995. Life history of *Aphis gossypii* on cucumber: influence of temperature, host plant and parasitism. Entomologia Experimentalis et Applicata, 76:121-131.

Wang, J. and Xue, Y. 1980. Studies on plant Phenylalanine amonia lyase. Acta Phytophysiologia, 7: 374-380.

Wei, G. P., Yang, L. F., Zhu, Y. L. and Chen, G. 2009. Changes in oxidative damage, antioxidant enzyme activities and polyamine contents in leaves of grafted and non-grafted eggplant seedlings under stress by excess of calcium nitrate. Scientia Horticulturae, 120(4), 443-451.

Yamakawa, B. 1983. Grafting in vegetable hand book. ed. Nishi, S., Yokendo Book Co., Tokyo, 141-153.

The effect of grafting on cucumber resistance of Aphis gossypii (Glover) (Hemiptera: Aphididae)

Fatemeh Moghadari pour, Shahnaz Shahidi-Noghabi, Mahmoud Raghami
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
**Corresponding author: shahidi@vru.ac.ir*

Abstract
Grafting is a common method of vegetative propagation. In this study, the effect of cucumber graft on pumpkin root was studied on cucumber plant defense enzymes against *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae). Pumpkin seeds of cultivar RS 841 were cultivated in plastic pots. Cucumber seeds of hybrid cultivar INCI F1 were cultivated in seedling tray in a growth chamber at 25 ± 2 °C with relative humidity of 75 ± 10% and natural light conditions of 16 hours of light and 8 hours of darkness. The treatments for measuring the activity of defense enzymes of the plant were insect-free cucumber, insect-transplanted cucumber, insect-free cucumber and insect-free cucumber, each with 3 replications. The study of plant defense enzymes showed that in grafted plants the amount of peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase as well as plant secondary metabolites and total protein were higher than non-grafted plants.