مقاله کوتاه

ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو توده مقاوم و حساس کنجد نسبت به بیماری بوته‌میری فوزاریومی با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp *sesami* *

EVALUATION OF PEROXIDASE ACTIVITY IN TWO RESISTANT AND SUSCEPTIBLE SESAME GERMPLASMS TO Fusarium DAMPING OFF CAUSED BY *Fusarium oxysporum* f.sp *sesami*

اعظم فلاح پوری [۱]، حشمت الله امینیان [۱]** و سید علیرضا اسمعیل‌زاده حسینی [۲]

(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۷)

چکیده

کنجد (*Sesamum indicum* L.) از گیاهان روغنی است که کشت آن در دنیا رایج می‌باشد. بوته‌میری فوزاریومی کنجد با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami*، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه دردنیا می‌باشد. در این تحقیق میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان یکی از مکانیسم‌های دخیل در مقاومت، در توده محلی آسفیج (بهاباد، یزد) به عنوان توده مقاوم و توده محلی کهنوج (کرمان) به عنوان توده حساس به این بیماری بررسی شد. بدین منظور از نمونه‌های جمع‌اوری شده از سطح مزارع کنجد استان یزد، ۱۵ جدایه *F. oxysporum* جداسازی و خالص‌سازی شد و از این میان جدایه ای که دارای بالاترین سطح بیماری‌زایی بود انتخاب و در آزمون تعیین دامنه‌میزبانی مورد استفاده قرار گرفت. در بررسی دامنه میزبانی عامل بیماری، از بین ده گونه گیاهی متعلق به خانواده‌های مختلف که به‌طور مصنوعی با عامل بیماری آلوده شدند، تنها گیاه کنجد علائم بیماری را نشان داد که بیانگر این مطلب بود که جدایه مربوطه *F. oxysporum* f.sp. *sesami* می‌باشد. در مرحله بعدی تحقیق، میزان فعالیت آنزیم پراکسیدازتوده‌های مقاوم و حساس کنجد در ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ روز پس از مایه زنی با قارچ عامل بیماری اندازه گیری شد. فعالیت آن پس از مایه‌زنی با قارچ در توده مقاوم با شیب تندی افزایش و در روز چهارم به اوج خود رسید و سپس کاهش یافت. ولی در توده حساس، افزایش فعالیت آنزیم به میزان کمتری رخ داد. نتایج این تحقیق بیان کننده این مطلب است که میزان افزایش آنزیم پراکسیداز در گیاه، می‌تواند نقش احتمالی در بروز القا مقاومت داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami*، توده محلی، پراکسیداز، کنجد

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: haminian@ut.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲. مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد

مقدمه

کنجد (*Sesamum orientale* L.)، مترادف با *S.indicum* L.، متعلق به خانواده Pedaliaceae است و شامل ۱۶ جنس وتقریباً ۶۰گونه می باشد (Kobayashi 1991).

بوته‌میری با عامل Sch.:Fr. f.sp. *sesami* (zap.) cas. *Fusarium oxysporum* به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد کنجد در کشورهای مختلف مطرح بوده است که خسارت اقتصادی قابل توجهی را وارد می‌سازد (Pineda & Avila 1988). یکی از مهم‌ترین شیوه‌های مبارزه برعلیه بیماری‌های گیاهی به خصوص بیماری‌های خاکزاد تولید و به‌کارگیری ارقام مقاوم است. سرعت پاسخ دفاعی رقم حساس معمولاً اندک و یا با تأخیر است، بنابراین تولید اجزای دفاعی برای ممانعت کلی رشد بیمارگر کافی نیست و یا این‌که سنتز اجزای مهم دفاعی طی فرآیند آلودگی با سرعت کمی فعال می‌گردد. تأخیر در شناسایی بیمارگر و القای پاسخ دفاعی ممکن است یکی از عوامل دخیل در حساسیت باشد (Bernards *et al.* 2004). پراکسیدازها گروهی فراگیر از آنزیم‌ها هستند که در بافت‌های مختلف پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند (Gajhede 2001). پراکسیدازها به دنبال تحریک القاگرهای زنده یا غیرزنده، در گیاهان افزایش می‌یابند و به دنبال آن مقاومت گیاه نسبت به عوامل بیماری‌زا نیز افزوده می‌شود. پراکسیدازهای محلول در انواع پروسه‌های دفاعی مانند واکنش فوق حساسیت، سنتز لیگنین، اتصال فنل‌ها به گلیکوپروتئین‌ها و تولید فیتوالکسین‌ها نقش دارند (Seevers *et al.* 1971). بررسی‌های *ماگدا و همکاران* (۲۰۰۷) نشان داد که در رقم Gs-۱۲ گوجه‌فرنگی که یک رقم مقاوم به *Fusarium oxysporum* است، پس از مایه‌زنی قارچ فعالیت پراکسیداز نسبت به شاهد افزایش می‌یابد. در حالی‌که در رقم Castle rock که یک رقم حساس به این قارچ است، افزایش قابل ملاحظه‌ای در فعالیت پراکسیداز اتفاق نمی‌افتد(Magda *et al.* 2007). تحقیق حاضر با هدف، ارزیابی تغییرات آنزیم پراکسیداز در دو توده مقاوم و حساس کنجد نسبت به بیماری بوته‌میری فوزاریومی با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami.* پس از آلودگی با عامل بیماری و بررسی نقش آنزیم پراکسیداز در القای مقاومت در توده مقاوم انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از اوایل تیر۱۳۸۷ از شهرستان‌های مختلف استان یزد (میبد، ابرکوه، طبس، صدوق، و هرات) شروع و تا پایان آبان ماه ۱۳۸۷ به اتمام رسید. نمونه‌ها شامل بوته‌های کنجد بیمار با علائم بوته‌میری بودند که در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور جداسازی عامل بیماری قطعاتی از ناحیه طوقه (مرز بین بافت بیمار و سالم) تهیه و جداسازی به روش *کاواک و بویداک* (۲۰۰۶) روی محیط PDA انجام گرفت. برای خالص‌سازی جدایه‌ها از روش کشت نوک ریسه استفاده شد (Nelson *et al.* 1983). جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از کلید *نلسون و همکاران*(Nelson *et al.* 1983)و *برگس و همکاران*(Burgess *et al.* 1994) تشخیص داده شدند

جهت تهیه زادمایه قارچ از زادمایه خاک آلوده به قارچ با استفاده از گندم استفاده شد (Kavak & Boydak 2006).

از نمونه‌های جمع‌آوری شده در سطح مزارع استان یزد، ۱۵ جدایه*F. oxysporum* جداسازی و خالص‌سازی

شد. از بین جدایه‌ها با توجه به رشد میسلیومی و قدرت تولید اسپور، ۹ جدایه (h9, m13, t3, t9, t11, t12, t17, t18, t19) انتخاب و در آزمون بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش بیماری‌زایی روی رقم داراب۲ که یکی از ارقام حساس به این بیماری است، در قالب طرح کاملا" تصادفی با ۱۰ تیمار و ۳ تکرار برای هر جدایه صورت گرفت (Banihashemi 1982). درصد بیماری‌زایی(تعداد بوته های آلوده) بر اساس مقیاس ۵–۱ به شرح زیرارزیابی شد.
1=1-20%, 2=20.01-40%, 3=40.01-60%, 4=60.01-80%, 5=80.01-100% (Kavak & Boydak. 2006).
به منظور تعیین دامنه میزبانی از گونه‌های گیاهی متعلق به خانواده‌های مختلف (کنجد، خیار، کلم، کدو، گوجه فرنگی، میخک، نخود فرنگی، لوبیا، گندم و تربچه) براساس روش چنگ *و وو* (Cheng and Wu 1991) استفاده شد و آلوده‌سازی به روش خاک آلوده به قارچ انجام گرفت. جدایه t9 در آزمون اثبات بیماری‌زائی بیشترین درصد بیماری‌زایی را نشان داده بود که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملا" تصادفی با ۲۰ تیمار و ۳ تکرار صورت گرفت.

بر اساس تحقیقات نگارنده و همکاران در سال ۱۳۸۸، توده محلی آسفیج بهاباد یزد به عنوان مقاومترین توده و توده محلی کهنوج به عنوان حساس‌ترین توده نسبت به بیماری بوته میری فوزاریومی با عامل *F. oxysporum* f.sp. *sesami* از میان ۱۰ توده محلی کنجد بررسی شده در این تحقیق، مشخص شد (Fallahpori *et al*. 2010). از این دو توده و جدایه t9 جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در آزمایشگاه استفاده شد. گیاهچه‌های توده‌های مقاوم و حساس در مرحله ۴برگی به گلدان‌های حاوی خاک آلوده و خاک سترون به عنوان شاهد (با ترکیب خاک مزرعه، ماسه، کمپوست برگ، به نسبت ۱ : ۱ : ۱، سترون شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت یک ساعت در ۳ روز متوالی) منتقل شدند. مایه زنی به روش خاک آلوده به قارچ انجام گرفت. آزمایش در گلخانه‌ای با متوسط دمای ۳۰–۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و گیاهچه‌ها هر دو روز یک‌بار آبیاری شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل ۶×۴ در قالب طرح کاملاً تصادفی تنظیم شد. تیمارها شامل شاهد سالم در هر دو توده مقاوم و حساس و توده‌های مقاوم و حساس تلقیح شده با یک جدایه بود. نمونه‌ها در ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری جمع‌آوری شدند. ریشه‌ها در زیر آب شیر به خوبی شسته و در پاکت‌هائی گذاشته شدند. نام تیمار بر روی پاکت درج شد و به دمای ۲۰ – درجه سانتی‌گراد تا اتمام نمونه‌برداری منتقل شدند.

به منظور ارزیابی میزان پروتئین‌کل، اولین گام، استخراج پروتئین از بافت ریشه بود. ۰/۵ گرم بافت ریشه گیاه را در هاون چینی با استفاده از ازت مایع به خوبی ساییده، سپس ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH 6 به آن اضافه گردید. عصاره حاصل به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و توسط سانتریفوژ به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰× g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی به ویال‌های مشابه منتقل و جهت آزمایشات بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (Madhaiyan *et al*. 2004).

برای تهیه منحنی استاندارد، از سرم‌آلبومین‌گاوی (BSA) استفاده شد. مقدار ۵ میلی‌گرم از این ماده در آب‌مقطر سترون حل و از آن به ترتیب مقادیر معادل ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۰ میکروگرم به طور جداگانه به لوله‌های آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر معرف بردفورد اضافه شد. پس از اختلاط کامل محتویات لوله بلافاصله میزان جذب در طول موج ماکزیموم ۵۹۵ نانومتر با دستگاه

اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. برای هر میزان غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد و میانگین آنها جهت تهیه منحنی استاندارد با استفاده از نرم‌افزار Excell و روش Trendline استفاده شد (Bradford 1976).

جهت تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در بافت، میزان پروتئین تام موجود در نمونه‌ها به روش بردفورد(Bradford 1976) به شرح زیر تعیین شد. ابتدا در لوله‌های آزمایش ۳ میلی‌لیتر معرف بردفورد ریخته و از عصاره‌های تهیه شده مقدار ۳۰ میکرولیتر به لوله‌ها اضافه، کاملاً مخلوط کرده و به کیووت منتقل شد. مقدار جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومترتوسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. برای صفر کردن دستگاه از لوله‌های شاهد که شامل ۳ میلی‌لیتر معرف بود استفاده شد. برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز، دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری عصاره (دارای ۴۰ میکروگرم پروتئین)، ۲۰ میکرولیتر گوئیکول(Guaiacol) ۲۰۰ mM و مقدار کافی بافر سیترات-فسفات (pH 5.4) طوری که حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر باشد، در یک لوله آزمایش کاملاً مخلوط و دستگاه اسپکتروفوتومتر با استفاده از آن صفر گردید. دستگاه اسپکتروفوتومتر روی برنامه کینتیک با مشخصات طول موج ۴۷۵ نانومتر، زمان یک دقیقه، فواصل زمانی ۱۰ ثانیه و جذب نور تنظیم گردید و درست قبل از اندازه‌گیری سرعت واکنش مقدار ۱۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) ۳۰٪ به مخلوط واکنش اضافه گردید و پس از اختلاط مختصر تغییرات جذب نور در ۴۷۵ نانومتر به مدت یک دقیقه با فواصل زمانی ۱۰ ثانیه قرائت گردید. میزان فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب نور در ۴۷۵ نانومتر بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین بیان شد (Janda *et al*. 2003).

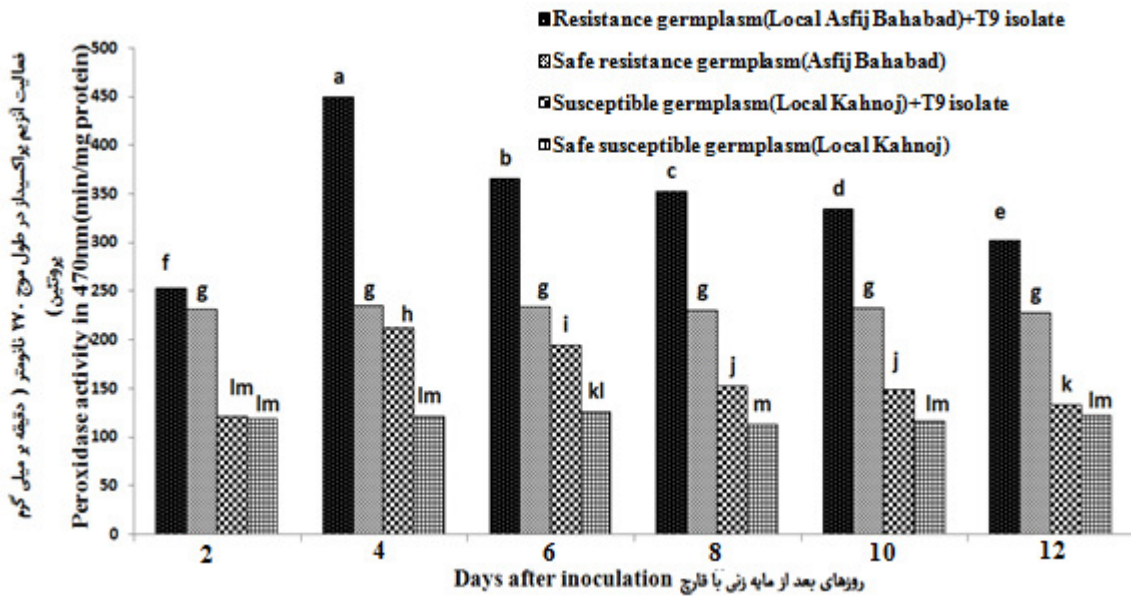
نتیجه و بحث

از بوته‌های کنجد آلوده جمع‌آوری شده، ۴۴ جدایه قارچ جداسازی و خالص‌سازی شد که ۱۵ جدایه، بر اساس کلید *نلسون و همکاران* (Nelson *et al*. 1983) و *برگس و همکاران* (Burgess *et al*. 1994)، *Fusarium oxysporum* تشخیص داده شد.

از میان ۹ جدایه (h9 , m13 , t3 , t9 , t11 , t12 , t17 , t18 , t19) که برای آزمون بیماریزائی انتخاب شده بودند، جدایه t9 با ۷۳٪ آلودگی، بیشترین درصد آلودگی و t11 با ۲۷٪ آلودگی، کمترین درصد آلودگی را نشان داد. جدایه‌های h9 و t3 غیربیماری‌زا بودند. بنابراین از جدایه t9 برای ادامه کار استفاده شد.

در آزمون تعیین دامنه میزبانی از میان ۱۰ گونه گیاهی مورد آزمایش، تنها کنجد علایم آلودگی به فوزاریوم قبیل پژمردگی و نکروز آوندی را نشان داد و سایر گیاهان هیچ‌گونه علامتی از بیماری نشان ندادند. نتایج این آزمایش با نتایج به دست آمده توسط *چنگ و وو*(Cheng and Wu 1991) مطابقت دارد.

نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو توده مقاوم و حساس به بیماری بوته‌میری با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* نشان‌داد که بین تیمارهای آزمایشی و روزهای نمونه‌برداری و اثر متقابل آنها در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز اختلاف معنی‌دار($P\leq 0/01$) وجود داشت. از شکل۱ این گونه استنباط می‌شود که در هر دو توده مقاوم و حساس بین تیمار آلوده و سالم اختلاف معنی‌دار وجود داشت و بالاترین میزان آنزیم در هر دو توده مقاوم و حساس آلوده به قارچ در روز چهارم بعد از مایه‌زنی دیده شد اما این میزان در توده مقاوم آلوده بیش از دو برابر توده حساس



شکل ۱. تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در توده مقاوم محلی آسفیج بهاباد و حساس محلی کهنوج در اثر جدایه t9 قارچ عامل بیماری بوته میری فوزاریومی کنجد در شرایط گلخانه با متوسط دمای ۲۵^{O}C و نور طبیعی در شش مرحله زمانی بعد از مایه‌زنی. ستون‌ها میانگین سه تکرار است. اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در سطح ۵٪ در آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

Fig. 1. Variation of peroxidase enzyme in resistant germplasm(Asfij Bahabad) and susceptible germplasm(Kahnoj) affected by t9 isolate of agent of sesame damping off in greenhouse at 25^{OC} and light in 6 stages after inoculation. Columns is average of tree replication. Numbers fallowed by different letter are significantly different (P=0/05) according to Duncan multiple range test.

آلوده بود. در توده مقاوم آلوده بین میزان فعالیت آنزیم در تمام روزها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در توده مقاوم و حساس آلوده به قارچ از روز دوم تا چهارم افزایش یافت و سپس تا روز دوازدهم سیر نزولی داشت. در توده مقاوم سالم بین میزان فعالیت آنزیم در تمام روزها اختلاف معنی‌دار وجود نداشت اما در توده حساس سالم در روزهای ششم و هشتم اختلاف معنی وجود داشت به‌طوری که در روز ششم میزان فعالیت آنزیم اندکی کاهش و در روز هشتم اندکی افزایش یافت اما این میزان نوسانات در مقابل تغییرات فعالیت آنزیم در تیمارهای آلوده بسیار اندک و جزئی بود. در تیمارهای شاهد هر دو توده، میزان فعالیت آنزیم در روزهای مختلف تقریباً روند یکنواخت دارد. به طور کلی میزان فعالیت آنزیم در توده مقاوم نسبت به توده حساس بیشتر است. این نتایج با یافته‌های بسیاری از محققین مطابقت دارد (Simous & Ross 1995, Dally 1971, Ye *et al*. 1990). نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در توده مقاوم و حساس در تیمارهای سالم و آلوده به قارچ در روز دوم، تفاوت چندانی با هم ندارند اما در روز چهارم در هر دو توده مقاوم و حساس، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمارهای آلوده به قارچ نسبت به تیمارهای سالم افزایش معناداری یافت. بنابراین بین سرعت پاسخ دفاعی در توده مقاوم و حساس در این تحقیق تفاوتی وجود نداشت اما میزان افزایش آنزیم پراکسیداز در توده مقاوم آلوده به قارچ نسبت به توده حساس آلوده، بیشتر است و این امر احتمالاً

در بروز مقاومت در توده مقاوم موثر است.

پیشنهاد می‌شود در بررسی مقاومت ارقام کنجد نسبت به این بیماری از توده‌های محلی نقاط مختلف ایران استفاده و از پتانسیل توده‌های محلی در مقاومت به بیماری در فرآیند اصلاح ژنتیکی ارقام بهره‌وری شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (36-35) متن انگلیسی مراجعه شود.