نقش ترکیبات فنولی در واکنش ارقام نیشکر به بیماری سیاهک*

سحر بهاری، مهدی صدروی** و کوروش طاهرخانی[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۹)

چکیده

سیاهک مهم‌ترین بیماری نیشکر درایران و بیشتر مناطق کشت این گیاه در جهان است. مؤثرترین روش مدیریت بیماری، شناسایی و کشت ارقام مقاوم است. هدف این پژوهش بررسی تغییرات سطح ترکیبات فنولی در دو رقم حساس و مقاوم به بیماری و تعیین ترکیبات فنولی شاخص مقاومت، برای شناسایی سریعتر این گونه ارقام بود. دو رقم NCO-310 و CP78-1628 حساس و مقاوم به بیماری انتخاب شدند و با روش کشت مریستم انتهایی ساقه، گیاهچه‌های چهار برگی از آن‌ها تولید شدند. گیاهچه‌ها با سوسپانسیون مخلوطی از اسپوریدیوم‌های دو تیپ آمیزشی سازگار بیمارگر مایه‌زنی شدند. ساقه‌ی گیاهچه‌های مایه‌زنی شده هر رقم و شاهد آن‌ها در زمان‌های صفرتا ۱۲۰ ساعت پس ازمایه‌زنی نمونه‌برداری و اسیدهای فنولی محلول و موجود در دیواره سلولی آن‌ها استخراج شدند و با روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا(HPLC)، وجود و غلظت اسیدهای فنولی پاراکوماریک، فرولیک، پاراهیدروکسی‌بنزوییک و سیرینجیک در آن‌ها شناسایی وتعیین شدند. نتیجه مقایسه داده‌های به دست آمده از دستگاه HPLC نشان داد که در بین این اسیدهای فنولی تنها غلظت اسیدهای فرولیک و سیرنجیک متصل به دیواره در رقم مقاوم نسبت به حساس سطح بالاتری دارند، که این حالت نشان دهنده نقش این اسیدهای فنولی در واکنش مقاومت است. بنابراین می‌توان این اسیدها را به عنوان شاخص مقاومت در نظر گرفت و از این راه ارقام مقاوم را سریعتر شناسایی کرد و بیماری را مدیریت نمود.

کلیدواژه: سیاهک، مقاومت، نیشکر، اسید سیرنجیک، ***Sporisorium***

---

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه یاسوج.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: msadravi@yu.ac.ir

۱. گروه گیاهپزشکی دانشگاه یاسوج و موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر.

Role of phenolic compounds in reaction of sugarcane cultivars to smut disease

S. Bahari, M. Sadravi*, and K. Taherkhani[1]

(Received: 19.9.2016; Accepted: 20.3.2018)

Abstract

Smut is the most important disease of sugarcane in Iran, and most of the plant growing areas in the world. The most effective method of disease management, is identification and cultivation of resistant varieties. The aim of this study was to investigate changes in the level of phenolic compounds in resistant and susceptible cultivars to disease and detection phenolic compounds resistance index, to accelerate the identification of resistant cultivars. Two cultivars NCO-310 and CP78-1628, susceptible and resistant to the disease were selected, and with apical meristem and lateral buds culture method, their seedlings with four leaves were produced. Seedlings were inoculated with a suspension of a mixture of two compatible mating type of pathogen. Stem of plants were sampled at 0-120 hour post-inoculation. Soluble and cell-wall binding phenolic acids were extracted from samples, and presence and concentration of phenolic acids p-coumaric , ferulic, p-hydroxybenzoic and syringic acids were detected and determined by high performance liquid chromatography (HPLC) method. Comparison the data obtained from HPLC device showed only titer of cell wall-bound phenolic acids ferulic and syringic showed enhancement, in the resistant cultivar, this reflects the role of these phenolic acids in the resistance reaction. Thus, these phenolic acids can be considered as an indicator of resistance, and in this way quickly identify resistant cultivars and management disease.

Keywords: Smut, Resistant, Sugarcane, Syringic acid, *Sporisorium*

*Corresponding author's E-mail: msadravi@yu.ac.ir

1. Department of Plant Protection, Yasouj University, Iran and Sugarcane Development Research and Training Institute, Ahvaz, Iran.

مقدمه

نیشکر(*Saccharum officinarum* L.) گیاه بومی گینه-نو است، که دربیشتر مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان، برای تهیه قند و شکر از شیرابه ساقه آن کشت می-شود (Lisboa *et al.* 2011). سیاهک یک بیماری مهم اقتصادی نیشکر است که کم و بیش در تمام مناطق کشت آن در جهان شیوع دارد و در برخی از کشورها خسارت زیادی به محصول وارد می‌کند (Martínez *et al.* 2000). بوته‌های بالغ بیمار، دارای برگ‌های کوچک و باریک هستند. فاصله بین گره‌های ساقه آن‌ها کوتاه و پهن و اندام-های شلاق مانند بلند، با پوسته نقره‌ای و حاوی گرد سیاه رنگی در نوک ساقه‌ها پدید می‌آیند. سرانجام این پوسته پاره شده و گرد سیاه رنگ، با جریان هوا به روی سایر بوته‌ها پخش می‌شود و تنها سوراخی در ساقه در محل آن باقی می‌ماند. بعد از سیاه شدن نوک ساقه، جوانه‌های جانبی پایین‌تر شروع به رشد می‌کنند که آن‌ها نیز به یک اندام شلاقی سیاه دیگر ختم می شوند، به این ترتیب از کمیت و کیفیت ساقه این گیاه که محصول اصلی است به شدت کاسته می‌شود. عامل بیماری *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw. است که اولین بار در سال ۱۸۷۷ از آفریقای جنوبی گزارش شده است (Singh *et al.* 2004). بیماری در ایران ابتدا در سال ۱۳۵۰ از استان خوزستان گزارش شده، ولی اکنون در استان مازندران هم شیوع دارد و به عنوان مهمترین بیماری این گیاه در ایران شناخته می-شود(Ershad & Bani-Abbassi 1971, Banihashemi 1999, Taherkhani 1998) . مؤثرترین روش مدیریت بیماری، شناسایی و کشت ارقام مقاوم است (Xu *et al.* 2004). در بین ارقام تحت کشت در ایران، یک رقم به عنوان مقاوم، دو رقم نیمه مقاوم و بقیه حساس شناخته شده‌اند (Taherkhani 1998).

واکنش مقاومت گیاهان به بیماری‌ها یک فرآیند چند عاملی است، که در مرحله‌ی پاسخ به نفوذ بیمارگر به گیاه تجمع ترکیبات مختلف، مانند مواد فنولی، را شامل می‌شود (Kuc 1990). بسیاری از فنول‌ها به عنوان ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده‌اند که برای بیوسنتز لیگنین، که جزء ساختاری مهم دیواره‌های سلولی گیاهان است، ضروری هستند (Hahlborck & Sheel 1989). اسیدهای فنولی از دو گروه اسیدهای هیدروکسی‌بنزوییک و هیدروکسی-سینامیک در بروز مقاومت در برابر بیمارگرها نقش مهمی دارند. این اسیدها به صورت محلول درون سلول و در دیواره‌ی سلولی گیاهان حضور دارند (Schieber & Aranda Saldana 2009, Dai & Mumper 2010, Lin & Harnly 2010). واکنش حساسیت یا مقاومت به بیماری سیاهک نیشکر و سیاهک آشکار گندم به تفاوت در سطح ترکیبات فنولی ارقام این گیاهان نسبت داده شده است (de Armas *et al.* 2007, Anjum *et al.* 2012).

با توجه به اهمیت زیاد بیماری سیاهک نیشکر در ایران و گزارش‌های موجود در مورد نقش ترکیبات فنولی در مقاومت گیاهان به بیماری‌ها، این پژوهش جهت بررسی ارتباط واکنش ارقام نیشکر به بیماری با تغییرات سطح ترکیبات اسیدهای فنولی تولید شده در یک رقم مقاوم و حساس، انجام شد تا اسیدهای فنولی موثر در بروز واکنش مقاومت شناخته شوند و از این راه روش سریعتری برای شناسایی ارقام مقاوم و مدیریت بیماری به دست آید.

مواد و روش‌های بررسی

تهیه‌ی گیاهچه‌های نیشکر از کشت بافت

سرساقه ارقام نیشکر NCO-310 و CP78-1628 که به عنوان حساس و مقاوم به سیاهک شناخته شده

بودند(Taherkhani 1998)، در کلکسیون زنده ارقام مؤسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی ، نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها ۴۸ ساعت در آب مستغرق گردیدند (هر ۱۲ ساعت آب تعویض شد) و سپس در آب با دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳ ساعت ضدعفونی شدند. آن‌گاه ۱/۵–۱ ساعت درون محلول آنتی اکسیدانت (۱۵۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک +۱۰۰ میلی‌گرم اسید سیتریک در یک لیتر آب مقطر) قرار داده شدند تا از اکسیده و قهوه‌ای شدن آن‌ها جلوگیری شود. سپس به مدت ۱۲ دقیقه در محلول کلرید جیوه (۰/۷ در هزار) ضدعفونی سطحی شدند. پس از سه بار شستشو با آب مقطر سترون و خشک نمودن آن‌ها روی کاغذ صافی سترون، از بافت مریستم انتهایی ساقه در شرایط سترون ریزنمونه‌ها جدا گردیدند. ریزنمونه‌ها روی محیط کشت پایه‌ی بافت‌های گیاهی MS ، کشت شدند. این محیط از پنج ماده معدنی پرمصرف، هفت ماده معدنی کم مصرف، میواینوزیتول، چهار نوع ویتامین، آهن، ساکارز، آگار و آب دوبار تقطیر با تنظیم pH =۵/۸ تهیه شد و در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و تحت فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شده بود(Murashige & Skoog 1962). آن‌ها در دمای ۲۷–۲۵ درجه‌ی سلسیوس در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در اتاقک رشد نگهداری گردیدند و پس ازمشاهده‌ی رشد ریزنمونه‌ها و اطمینان از استقرار آن‌ها، به محیط MS حاوی ۳–۲/۵ میلی‌گرم هورمون ۶–بنزیل‌آمینو پورین (BAP) و حدود ۰/۴ میلی‌گرم هورمون اسیدایندول‌بوتیریک (IBA) جهت شاخه‌زایی منتقل شدند. به طور معمول هر دو هفته یک بار واکشت و انتقال به محیط کشت جدید انجام شد. جهت تهیه‌ی محیط کشت ریشه‌زایی، ۳ گرم زغال فعال، ۳–۲/۵ میلی‌گرم هورمون IBA و ۰/۴ میلی‌گرم هورمون BAP به محیط کشت پایه‌ی MS اضافه گشت و گیاهچه‌های متمایز منفرد به صورت مستقل در شیشه‌های سترون حاوی این محیط کشت شدند. سپس هر گیاهچه ریشه‌دار در یک گلدان در خاک سترون کشت گردید. گیاهچه‌ها تا زمان رسیدن به مرحله‌ی چهار برگی درون گلخانه در دمای ۳۰–۲۸ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت ۷۰–۶۰ درصد نگهداری گردیدند (Santiago *et al.* 2009).

تهیه‌ی زادمایه بیمارگر

تلیوسپورهای قارچ بیمارگر از شلاق‌های ارقام حساس آلوده به سیاهک، از مزارع کشت و صنعت‌های شرکت توسعه‌ی نیشکر و صنایع جانبی استان خوزستان جمع‌آوری گردید. تلیوسپورها به مدت دو ساعت در آب مقطر سترون حاوی ۰/۳ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین و سه بار شستشو با آب مقطر سترون ضدعفونی سطحی شدند (Singh *et al.* 2004). سوسپانسیون رقیق شده با آب مقطر سترون تلیوسپورها با لوپ سترون روی محیط(Potato dextrose agar=PDA) کشیده شد. تشتک‌های پتری به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۸–۲۷ درجه‌ی سلسیوس در تاریکی قرار گرفتند تا تلیوسپورها جوانه بزنند. هر تک تلیوسپورجوانه زده به محیطPDA جدیدی منتقل و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور تحت شرایط قبلی نگهداری شدند. یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر تشتک اضافه شد و پس از کمی تکان دادن، سوسپانسیون حاصل توسط لوپ سترون به صورت زیگزاک روی محیط (Yeast glucose chloramphenicol=YGC) کشیده شد و درون انکوباتور انتقال داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، هر یک از تک کلونی‌های حاصله توسط لوپ سترون به محیط کشت

مجزا منتقل شد و با قرار گرفتن درون انکوباتور، پس از گذشت ۴۸ ساعت کشت تک اسپوریدیومی به دست آمد. به منظور تعیین نوع تیپ آمیزشی کشت‌های تک اسپوریدیومی خالص، به صورت دو به دو روی محیط کشت YGC با هم تلاقی داده شدند. سی تلاقی اسپوریدیومی به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. تشکیل میسلیوم سفید رنگ در محل تلاقی نشان-دهنده‌ی وجود دو تیپ جنسی مخالف سازگار بود که یکی مثبت و دیگری منفی در نظر گرفته شد (Izadi & Moosawi-Jorf 2007).

مایه‌زنی گیاهچه‌ها

به منظور مایه‌زنی، از گیاهچه‌های با چهار برگ کامل گسترش یافته استفاده شد. برای تهیه‌ی سوسپانسیون اسپوریدیوم از کشت‌های ۴۸ ساعته خالص تک اسپوریدیوم که تیپ آمیزشی آن‌ها مشخص شده بود، استفاده شد. گیاهچه‌ها به وسیله‌ی سرنگ همیلتون ۵۰ میکرولیتری محتوی سوسپانسیون مخلوطی از دو تیپ آمیزشی به غلظت ۲×۱۰^{۶} اسپوریدیوم در میلی‌لیتر مایه‌زنی شدند. مایه‌زنی گیاهچه‌های شاهد نیز با ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون صورت گرفت. مایه‌زنی سه سانتی‌متر بالاتر از اولین برگ، از طریق غلاف برگ به ساقه انجام شد (Santiago *et al.* 2009).

نمونه‌برداری و تهیه‌ی عصاره‌ی بدون سلول

گیاهچه‌های مایه‌زنی شده و شاهد در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی نمونه-برداری شدند. نمونه‌برداری با برشی شش سانتی‌متری (سه سانتی‌متر بالا و پایین نقطه‌ی مایه‌زنی)از ساقه‌ی هرگیاهچه صورت گرفت (Santiago *et al.* 2009). ساقه‌های نمونه‌برداری شده در نیتروژن مایع پودر شدند و نیم گرم از پودر حاصل توسط هفت میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در طول ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس عصاره‌گیری شد. پس از آن، سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز رویی را نگهداری نموده و با هدف دستیابی به عصاره‌ی مطلوب‌تر، رسوب باقیمانده به همان صورت که ذکر شد دوباره عصاره‌گیری و سانتریفیوژ شد. سپس دو فاز رویی ترکیب و در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. رسوب باقیمانده از سانتریفیوژ دوم به مدت ۲۴ ساعت درون آون در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس خشک شد و در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد (de Ascensao & Dubery 2003).

استخراج اسیدهای فنولی محلول

یک‌ونیم میلی‌لیتر از فاز رویی (عصاره‌ی بدون سلول) برداشته و دو میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر به آن اضافه گشت. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر شد تا استخراج اسیدهای فنولی محلول صورت گیرد. مرحله‌ی استخراج دو سری انجام شد (Santiago *et al.* 2009).

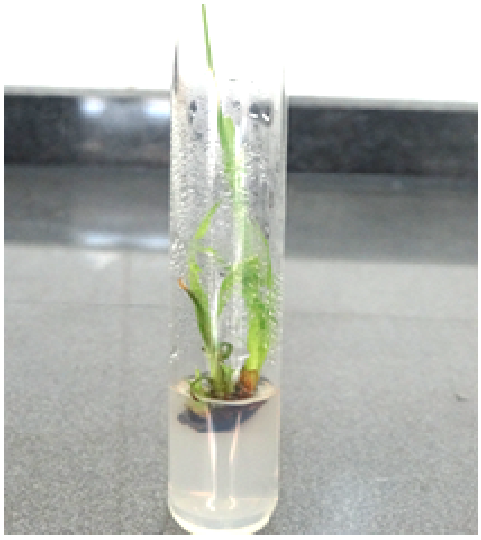
استخراج اسیدهای فنولی متصل به دیواره‌ی سلولی

ده میلی‌گرم از رسوب باقیمانده‌ی خشک‌شده، در یک میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید نیم مولار به مدت یک ساعت در دمای ۹۶ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت. فاز رویی با اسید هیدروکلریک یک مولار تا اسیدیته‌ی دو اسیدی گشت و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه

سانتریفیوژ گردید. به فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ، سه میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر گردید تا استخراج انجام شود. مرحله‌ی استخراج دو سری انجام شد (Campbell & Ellis 1992).

تشخیص اسیدهای فنولی با کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

تشخیص اسیدهای فنولی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (High Performance Liquid Chromatography = HPLC) مجهز به شناساگر مرئی_فرابنفش (UV-Vis) و ستون Nucleosil C18 (ابعاد ۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر و اندازه ذرات پنج میکرومتر) انجام شد. جداسازی به روش گرادیان و با استفاده از دو حلال A (۱۰۰ درصد استونیتریل) و B (دو درصد اسید استیک: ۹۸ درصد آب)، با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه و دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس صورت گرفت. برنامه‌ی زمانی و تغییرات نسبت حلال‌ها در زمان کروماتوگرافی به صورت زیر بود: از شروع به مدت هفت دقیقه ۱۰۰ درصد حلال B و از زمان هفت تا ۲۵ دقیقه، ۲۵ درصد حلال A و ۷۵ درصد حلال B. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های تهیه شده در طول موج ۲۷۰ نانومتر به دستگاه تزریق شد. با مقایسه کروماتوگرام بدست آمده با کروماتوگرام استاندارد اسیدهای فنولی که از قبل با تزریق آن‌ها به دستگاه تهیه شده بود، حضور و غلظت این اسیدها در عصاره این ارقام تعیین شد. داده‌های به دست آمده از دستگاهHPLC با نرم افزار آماری SPSS16 با آزمون t مستقل مورد مقایسه (غلظت هر اسید فنولی در بافت گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با شاهد در هر زمان) قرار گرفتند (de Armas *et al.* 2007). نمودارها با استفاده از نرم‌افزارExcel 2013 رسم گردیدند.



شکل ۱. رشد طولی گیاهچه‌های نیشکر حاصل از کشت بافت در محیط کشت نیمه جامد MS بدون هورمون.

Fig. 1. Longitudinal growth of tissue cultured sugarcane plantlets in semi-solid MS medium without hormone.

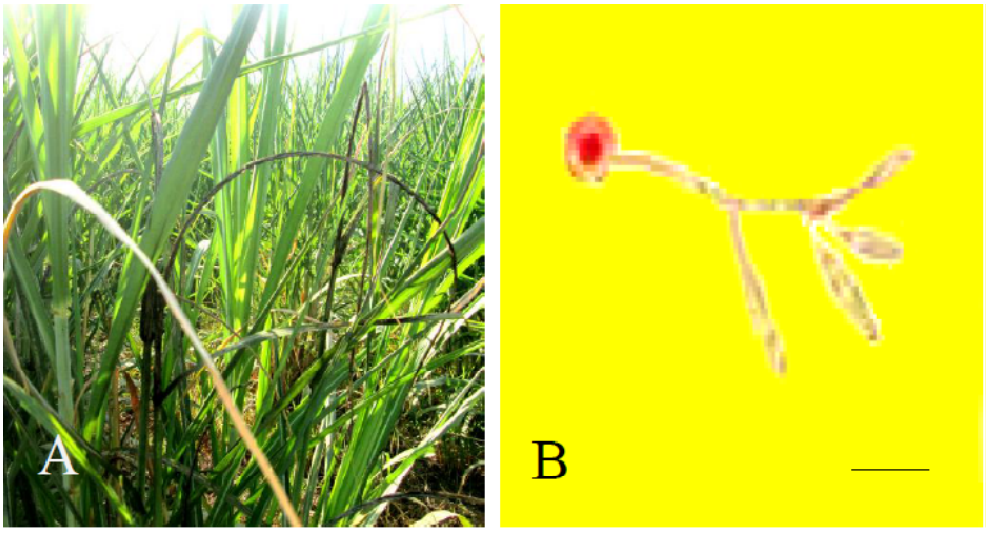
نتایج

گیاهچه‌های تهیه شده از کشت بافت ارقام حساس و مقاوم نیشکر

پس از گذشت سه هفته از قرار دادن بافت مریستمی ساقه این ارقام روی محیطMS رشد و استقرار اولیه‌ی کامل آن‌ها مشاهده شد (شکل ۱). حدود سه هفته بعد از انتقال آن‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی سیستم ریشه‌ی گیاهچه‌ها به طور کامل توسعه یافت. پس از گذشت ۳-۴ هفته از انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه، گیاهچه‌ها به مرحله‌ی چهار برگی رسیدند.

زادمایه بیمارگر

تلیوسپورهای کشت شده پس از ۱۸ ساعت جوانه زده و پرومیسلیوم و اسپوریدیوم تولید نمودند(شکل ۲). چهل وهشت ساعت پس از پخش سوسپانسیون روی محیط



شکل ۲. A . شلاق‌های سیاهک در نوک ساقه نیشکر، B. تلیوسپور جوانه‌زده *Sporisorium scitamineum* عامل بیماری سیاهک نیشکر و بازیدیوسپورهای تشکیل شده روی لوله تندشی آن (خط مقیاس= ۱۰ میکرومتر).

Fig. 2. A. The black whip on the tip of sugarcane stem. B. The germinated telliospore of *Sporisorium scitamineum* causal sugarcane smut and basidiospores produced on its germ tube (Bar=10µm).

YGC پرگنه‌های مخمری سفید تا کرم رنگ مشاهده شد و ۴۸ ساعت پس از تلاقی دو به دو کشت‌های تک اسپوریدیومی، در محل برخی از تلاقی‌ها، ریسه‌های سفید رنگ افراشته، که حاکی از تیپ آمیزشی سازگار آن‌ها بود، مشاهده گردید.

اسیدهای فنولی شناسایی شده

در آنالیز اسیدهای فنولی محلول و نیز اسیدهای فنولی متصل به دیواره، در هر دو گیاهان تیمار و شاهد از هر دو رقم حساس و مقاوم، اسیدهای پاراکوماریک و فرولیک از گروه اسیدهای هیدروکسی‌سینامیک و اسیدهای پاراهیدروکسی‌بنزوییک و سیرینجیک از گروه اسیدهای هیدروکسی‌بنزوییک شناسایی شدند (شکل ۳).

نتایج مقایسه غلظت اسیدهای فنولی محلول و موجود در دیواره سلولی که در تمام زمان‌های نمونه‌برداری، داده مشخصی از دستگاه HPLC برای آن‌ها به دست آمد، با آزمون tمستقل در رقم حساس در جدول ۱ و در رقم مقاوم در جدول ۲ آورده شده است.

این جدول‌ها نشان می‌دهند که در اولین بازه زمانی برای تمام اسیدهای فنولی میان تیمار مایه‌زنی شده و شاهد تفاوت معنی‌دار مشاهده نمی‌شود و در طی زمان غلظت اسیدهای فنولی محلول در هر دو رقم حساس و مقاوم گاهی بیشتر و گاهی کمتر از تیمار شاهد بوده است ولی تیتر اسیدهای فرولیک و سیرنجیک موجود در دیواره سلولی رقم مقاوم همواره در تیمار مایه‌زنی شده بیشتر از شاهد می‌باشد. بنابراین اسیدهای فرولیک و سیرنجیک موجود در دیواره سلولی، که تنها در رقم مقاوم همواره بیشتر تولید شده‌اند، شاخص مقاومت به این بیماری هستند. به منظور درک بهتر تفاوت غلظت اسیدهای فنولی شناسایی شده بین ارقام مقاوم و حساس، نسبت این اسیدها در گیاهچه‌های بیمار به شاهد در هر زمان محاسبه شد و نمودار خط سیر تغییرات این نسبت با زمان‌های پس از مایه‌زنی برای هر اسید فنولی ترسیم شد. نمودارهای تغییرات این نسبت غلظت اسیدهای فرولیک و سیرنجیک

جدول ۱. مقایسه داده‌های مقدار اسیدهای فنولی در بافت گیاهچه‌های مایه‌زنی شده و شاهد نیشکر رقم NCO-310 حساس به سیاهک تا ۱۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی، به دست آمده از دستگاه HPLC *،**.

Table 1. Data comparison of phenolic acids in tissue of inoculated and non-inoculated seedlings of sugarcane cultivar NCO-310 susceptible to smut until 120 hour after inoculation, from HPLC device*, **.

Time (Hour)	Treatment	Concentration(µg/g)*,** p-coumaric acid (S)	Ferulic acid (S)	Ferulic acid (CWB)	Syringic acid (S)	Syringic acid (CWB)	p-hydroxy benzoic acid (S)
0	Inoculated	26.10 a	36.15 a	770.00 a	7.57 a	42.10 a	4.05 a
	Check	26.07 a	36.10 a	770.02 a	7.50 a	42.02 a	4.00 a
24	Inoculated	40.12 a	20.07b	919.50 a	2.35 b	57.97 a	4.52 a
	Check	25.10 b	22.25 a	835.05 b	4.22 a	55.20 b	4.10 b
48	Inoculated	35.15 a	21.15 b	875.65 a	4.30 a	57.10 a	4.20 b
	Check	23.25 b	30.07 a	833.95 b	3.07 b	54.20 b	5.85 a
72	Inoculated	38.15 a	18.07 b	818.05 b	3.25 a	57.50 b	4.55 b
	Check	28.10 b	30.17 a	834.50 a	2.80 b	76.57 a	5.05 a
96	Inoculated	32.10 a	24.10b	835.05 b	4.87 a	58.05 b	3.80 b
	Check	30.17 b	28.10 a	835.52 a	3.05 b	77.30 a	5.10 a
120	Inoculated	28.12 b	26.12 a	835.05 a	6.07 a	59.02 b	3.50 b
	Check	31.25 a	26.20 a	835.07 a	3.80 b	78.62 a	5.12 a

* S = Soluble, CWB=Cell wall-bound

**Data compared with independed t test between inoculated and check treatments in each time.

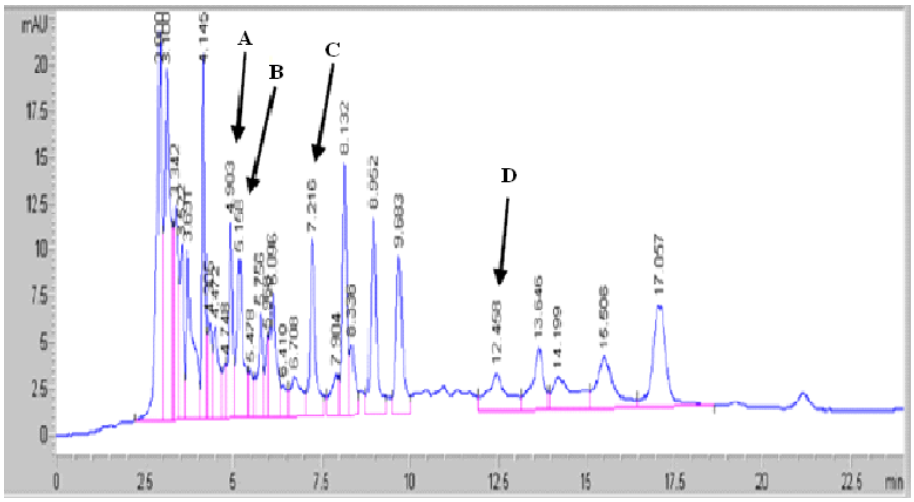
جدول ۲. مقایسه داده‌های مقدار اسیدهای فنولی در بافت گیاهچه‌های مایه‌زنی شده و شاهد نیشکر رقم CP78-1628 مقاوم به سیاهک تا ۱۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی، به دست آمده از دستگاه HPLC *،**.

Table 2. Data comparison of phenolic acids in tissue of inoculated and non-inoculated seedlings of sugarcane cultivar CP78-1628 resistance to smut until 120 hour after inoculation, from HPLC device*, **.

Time (Hour)	Treatment	Concentration(µg/g)*,** p-coumaric acid (S)	ferulic acid (S)	ferulic acid (CWB)	syringic acid (S)	syringic acid (CWB)	p-hydroxy benzoic acid (S)
0	Inoculated	27.07 a	23.10 a	794.50 a	10.10 a	9.02 a	17.07 a
	Check	27.10 a	23.05 a	794.50 a	10.17 a	9.00 a	17.07 a
24	Inoculated	18.10 b	13.10 b	874.07 a	9.52 b	20.02 a	12.15 b
	Check	24.12 a	23.17 a	794.52 b	14.15 a	16.05 b	16.05 a
48	Inoculated	4.12 b	5.12 b	957.45 a	8.50 b	30.05 a	11.07 b
	Check	8.12 a	7.25 a	832.47 b	12.17 a	14.20 b	15.05 a
72	Inoculated	6.10 b	2.07 b	966.05 a	9.07 a	33.97 a	10.10 b
	Check	10.27 a	3.32 a	840.02 b	9.07 a	19.97 b	13.07 a
96	Inoculated	8.17 b	4.12 a	1005.55 a	8.25 a	40.05 a	6.00 b
	Check	12.12 a	4.07 a	840.00 b	8.17 a	22.20 b	8.07 a
120	Inoculated	10.10 b	4.15 a	1052.47 a	8.05 a	45.02 a	3.07 b
	Check	13.25 a	4.17 a	842.07 b	7.80 b	22.47 b	6.07 a

* S = Soluble, CWB=Cell wall-bound

**Data compared with independed t test between inoculated and check treatments in each time.



شکل ۳. کروماتوگرام اسیدهای فنولی تشخیص داده شده درنیشکر رقم CP78-1628 مقاوم به سیاهک. A. پاراهیدروکسی‌بنزوییک، B. سیرینجیک، C. پاراکوماریک، D. فرولیک.

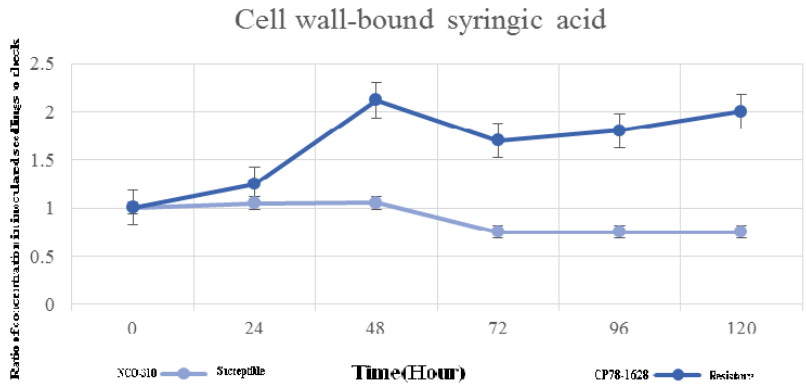
Fig. 3. Chromatogram of phenolic acids in sugarcane cultivar CP78-1628 resistant to smut, A. p-Hydroxybenzoic acid, B.Syringic acid, C.p-Coumaric acid, D.Ferulic acid.

موجود در دیواره سلولی در دو رقم مقاوم و حساس در گیاهچه‌های بیمار به شاهد در شکل ۴ نشان داده شده‌اند. مقادیر بیشتر از یک بیانگر این است که غلظت هر اسید در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده بیشتر از شاهد و مقادیر کمتر از ۱ نشان دهنده غلظت در گیاهچه‌های شاهد بیشتر از مایه‌زنی شده است.

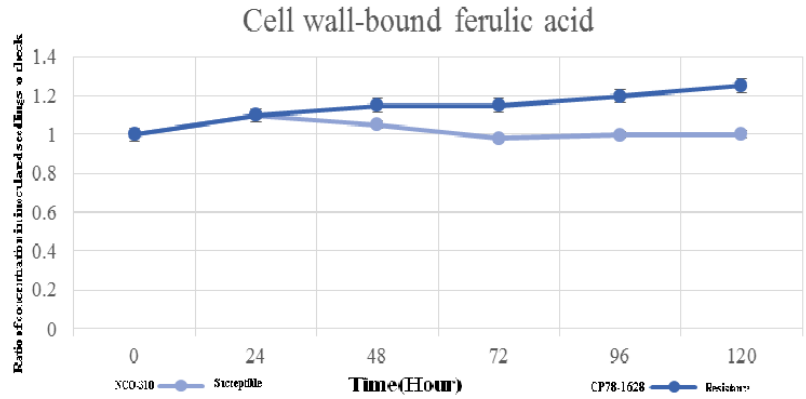
بحث

بررسی تغییرات غلظت اسیدهای فنولی محلول در دو رقم دیگر حساس و مقاوم به سیاهک نیشکر با استفاده از روش HPLC نیز هیچ تجمع قابل توجهی از این اسیدها در رقم مقاوم پس از مایه‌زنی بیمارگر نشان نداده است، که این حالت حاکی از عدم تاثیر آن‌ها در واکنش مقاومت می‌باشد (de Armas *et al.* 2007).

افزایش سطح اسیدهای فنولی متصل به دیواره به عنوان یک واکنش دفاعی معمول در ارقام مقاوم کاهو در برابر سفیدک کرکی نیز به اثبات رسیده است (Sedlářová & Lebeda 2001). بسیاری از گیاهان از طریق مواد فنولی متصل به دیواره‌ی سلولی و تشکیل لیگنین به حملات میکروبی پاسخ می‌دهند (Boudet *et al.* 1995). دیواره‌ی سلولی چوبی شده، در برابر آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی دیواره‌ی سلولی تولید شده توسط قارچ‌های بیماری‌زا مقاومت نشان می‌دهد (Hückelhoven 2007). شواهد نشان داده که استری شدن فنول‌ها با مواد دیواره‌ی سلولی یک واکنش متداول در بیان مقاومت است و حضور اسید-های فنولی در دیواره سلولی ریشه موز باعث افزایش مقاومت آن‌ها به آنزیم‌های قارچ عامل پژمردگی بوده و به عنوان یک مانع فیزیکی در مقابل نفوذ بیمارگر عمل می‌کند (de Ascensao & Dubery 2000). در این پژوهش نیز افزایش بیشتر اسیدهای فنولی متصل به دیواره در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس، نشان می‌دهد که رقم مقاوم ظرفیت بهتری برای تقویت دیواره‌ی سلولی پس از مایه-زنی با عامل سیاهک دارد. بنابراین از آن‌جا که مؤثرترین روش مدیریت بیماری سیاهک نیشکر، شناسایی و کشت



(A)



(B)

شکل ٤. تغییرات غلظت اسیدهای فنولی موجود در دیواره سلولی ارقام حساس و مقاوم نیشکر به سیاهک نسبت به شاهد در زمان‌های پس از مایه‌زنی با بیمارگر . A. اسید سیرنجیک ، B. اسید فرولیک.

Fig. 4. The concentration of phenolic acids in the cell wall of susceptible and resistant sugarcane cultivars to smut, compared to control at times after inoculation with the pathogen. A. Syrengic acid, B. Ferulic acid.

ارقام مقاوم می‌باشد، با استناد به نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان بررسی وجود و میزان اسیدهای فنولی فرولیک و سیرنجیک موجود در دیواره سلولی ارقام مختلف را به عنوان شاخصی برای شناسایی ارقام مقاوم پیشنهاد کرد، تا از این راه این ارقام سریعتر شناخته شوند و مدیریت بیماری تسهیل گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری صمیمانه و موثر جناب آقای دکتر مهراورنگ قائدی استاد شیمی دانشگاه یاسوج در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Anjum T., Fatima S. and Amjad S. 2012. Physiological changes in wheat during development of loose smut. Tropical Plant Pathology 37(2): 102-107.

Banihashemi Z. 1995. The occurrence of sugarcane smut in Mazandarn Province. Iranian Journal of Plant

Pathology 31:40-41.
Boudet A. M., Lapierre C. and Grima-Pettenati J. 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. New Phytologist 129: 203-236.
Campbell M. M. and Ellis B. E. 1992. Fungal elicitormediated responses in pine cell cultures: cell wall-bound phenolics. Phytochemistry 31: 737–742.
Dai J. and Mumper R. S. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15: 7313–7352.
de Armas R., Santiago R., Legaz M. E. and Vicente C. 2007. Levels of phenolic compounds and enzyme activity can be used to screen for resistance of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). Australasian Plant Pathology 36: 32-38.
de Ascensao A. R. F. D. C. and Dubery I. A. 2000. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race four. Phytopathology 90: 1173–1180.
de Ascensao A. R. F. D. C. and Dubery I. A. 2003. Soluble and wall-bound phenolics polymer in *Musa acuminate* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Phytochemistry 63: 679-686.
Ershad D. and Bani-Abbassi N. 1971. The occurrence of the sugarcane smut in Iran. Iranian Journal Plant Pathology 7: 19-22.
Hahlborck K. and Sheel D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Plant Molecular Biology 40: 347-369.
Hückelhoven R. 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. Annual Review Phytopathology 45: 101-127.
Izadi M. B. and Moosawi-Jorf S. A. 2007. Isolation and Identification of Yeast-Like and Mycelial Colonies of *Ustilago scitaminea* Using Specific Primers. Asian Journal of Plant Sciences 6: 1137-1142.
Kuc J. 1990. Compounds from plants that regulate or participate in disease resistance. Ciba Foundation Symposia 154: 213-224.
Lin L. Z. and Harnly J. M. 2010. Phenolic Component Profiles of Mustard Greens, Yu Choy, and 15 Other *Brassica* Vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 6850-6857.
Lisboa C. C., Butterbach-Bahl K., Mauder M. and Kiese R. 2011. Bioethanol production from sugarcane and emissions of greenhouse gases: known and unknowns. Global Change Biology Bioenergy 3: 277–292.
Louis V. and Negrel J. 1991. Tyramine hydroxycinnamoil transferase in the roots of wheat and barley seedlings. Phytochemistry 30: 2519-2522.
Martinez M., MedinaI I., Naranjo S., Rodriguez C. W. and de Armas R. 2000. Changes of some chemical parameters, involved in sucrose recovery from sugarcane juices, related to the susceptibility or resistance of sugarcane plants to smut (*Ustilago scitaminea*). International Sugar Journal 102 (1221): 445-448.
Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3):473–497.
Peltonen S. 1998. Responses of barley and wheat to pathogens, non-pathogens and wounding as indicated by induced phenylalanine ammonia-lyase activity. Acta Agriculturæ Scandinavica. Section B, Soil and Plant Science 48: 184–191.
Razolan M. K. 2003. *Introduction to plant tissue culture*. Science Publisher Inc. 409 p.
Santiago R., de Armas R., Fontaniella B., Vicente C. and Legaz M. E. 2009. Changes in soluble and cell-bound hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in sugarcane cultivars inoculated with *Sporisorium scitamineum* sporidia. European Journal of Plant Pathology 124: 439-450.
Sedlářová D. and Lebeda A. 2001. Histochemical detection and role of phenolic compounds in the defence response of *Lactuca* spp. to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). Journal of Phytopathology 149: 693-697.
Schieber A. and Aranda Saldana M. D. 2009. Potato peels: a source of nutritionally and pharmacologically interesting compounds- a review. Food 3: 23–29.
Sharma B. K. and Singh U. P. 2003. Ferulic acid may prevent infection of *Cicer arietinum* by S*clerotium rolfsii*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19: 123–127.
Singh N., Somai B. M. and Pillay D. 2004. Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars. Plant Science 167 (5): 987-994.
Taherkhani K. 1998. Reactions of important varieties of sugarcane to smut disease caused by *Ustilago scitaminea*

Syd. Abstract book of 13th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran, p:175.
Xu L. P., Chen R. K. and Chen P. H. 2004. Analysis on infection index of smut caused by *Ustilago scitaminea* in sugarcane segregated population. Chinese Journal of Tropical Crops 25: 33–36.