نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 31، شماره 4، زمستان 1396، ص. 661-653

Journal of Plant Protection
Vol. 31, No. 4, Winter 2018, P. 653-661

تأثیر میدان الکترومغناطیس روی تولید اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین آمونیالیاز در توتون آلوده به ویروس ایکس سیب‌زمینی (*Potato virus X;* (PVX))

امین رادمرد تیتکانلو[1*]- سعید نصراله نژاد[2]- رحیم احمدوند[3]- عباس رضایی اصل[4]- فروه سادات مصطفوی نیشابوری[5]

تاریخ دریافت: 1395/09/29
تاریخ پذیرش: 1396/09/28

چکیده

ویروس ایکس سیب‌زمینی (***Potato virus X;*** **(PVX))** یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های توتون در مزارع می‌باشد، که با توجه به تلاش‌های صورت گرفته برای کنترل این ویروس، تاکنون روش مناسبی برای کنترل این ویروس ارائه نشده است. در مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثر میدان الکترومغناطیسی روی کنترل این ویروس، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در یازده تیمار (10، 50 و 90 میلی‌تسلا در مدت زمان‌های 60، 90 و 120 دقیقه روی گیاهچه‌های توتون آلوده به ویروس و دو تیمار شاهد، یکی آلوده و دیگری عاری از آلوگی به ویروس) و در شش تکرار بر روی نهال توتون به اجرا درآمد. پس از مایه‌زنی گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگی، آنالیز نتایج حاصل از آزمون الایزا دوطرفه با آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای PVX نمونه ها بررسی شد. همچنین میزان اسیدسالیسیلیک و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز که در مقاومت سیستمیک اکتسابی و مکانیسم دفاعی گیاه دخالت دارند، در تیمارهای مورد بررسی اندازه‌گیری شد، به‌طوری‌که برای ارزیابی اسید سالیسیلیک از HPLC و برای سنجش فنیل آلانین آمونیالیاز براساس تشکیل ترانس سینامیک اسید استفاده گردید. نتایج نشان داد که میدان الکترومغناطیس میزان کدورت سنجی ویروس را در گیاه توتون کاهش داده و میزان اسید سالیسیلیک و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز را افزایش می‌دهد. بر این اساس، برای میزان کدورت سنجی ویروس تیمار 8 (100 میلی‌تسلا و 120 دقیقه) و برای فعال کردن مکانسیم دفاعی گیاه تیمار 7 (50 میلی‌تسلا و 60 دقیقه) بهترین تیمار تشخیص داده شد. با توجه به نتایج می‌توان استفاده از الکترومغناطیس را بعنوان یک روش مناسب و جدید برای کنترل PVX در نهال‌های توتون در خزانه پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: کنترل ویروس، مقاومت اکتسابی سیستمیک، میدان‌های ضعیف مغناطیسی

مقدمه

مغناطیس به‌عنوان یکی از تنش‌های محیطی شناخته شده است که می‌تواند بصورت مستقیم یا غیرمستقیم روی گیاهان بخصوص گیاهان تحت تنش‌های مختلف اثر بگذارد. این میدان‌های مغناطیسی می‌توانند اثرات مفیدی روی گیاه به‌جای بگذارند. میدان‌های ضعیف مغناطیسی اثرات بیولوژیکی مختلفی روی گیاهان در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی دارند (14). به طور مثال تأثیر بر تحریک جوانه‌زنی بذر (3، 13 و 21) و رشد گیاهان (10) گزارش شده است. احتمالاً میدان مغناطیسی به‌عنوان یک عامل حفاظتی در برابر تنش گرما عمل می‌نماید (31). نقی و فیشل (25) تأثیر میدان مغناطیسی روی سرعت رشد و تعداد اسپور پرورش یافته در چندین گونه بیمارگر قارچی را بررسی کردند. در تحقیق دیگری میدان مغناطیسی 50 هرتز و 0/1 میلی‌تسلا باعث تحریک شدن در وزن خشک و مرطوب در قارچ میکوریزا شده است (30). در بررسی که توسط محققین بر روی اثر ضدباکتریایی میدان الکترومغناطیسی بر روی *Serratia marcescens* انجام گرفت، مشاهده گردید که قرار گرفتن در معرض یک میدان 8/2 میلی‌تسلا منجر به مهار رشد این باکتری می‌گردد (29). در گزارش دیگری بیان شد، میدان الکترومغناطیس سبب کاهش بیماری جاروک لیموترش در درختان آلوده شده که احتمالاً به علت کاهش فیتوپلاسما در بافت‌های گیاهی بوده است (1). تیمار بذور گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس و Alternaria توسط میدان مغناطیسی، در بروز اولین علایم ظهور بیماری‌های ویروسی و Alternaria در مرحله رویشی تأخیر معنی‌داری مشاهده شده است (11). پژوهشگران به این نتیجه دست یافتند که فرکانس مغناطیسی خیلی پایین باعث مقاومت توتون به ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic*

1، 2 و 4- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: Email: amin.radmard70@gmail.com)
3- استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
5- دانشجوی دکتری بیماری شناسی، دانشگاه زابل
DOI: 10.22067/jpp.v31i4.60067

virus; TMV) می‌شود که احتمالاً بدلیل درگیر کردن مسیر پیام رسانی Ca^{2+} و افزایش هورمون‌های PAL [1] و ODC [2] در گیاه می باشد (17). اثرات ناشی از تحریک بوسیله میدان ضعیف مغناطیسی بر نفوذپذیری غشای سلولی و مسیر انتقال بستگی به یک راه پیچیده از غلظت شار الکترومغناطیسی، مدت زمان درمان و پیش رفتار مواد گیاهی دارد (31، 34، 4 و 28). دانش حاضر اطلاعاتی محدودی در مورد تأثیر میدان مغناطیس بر پاسخ دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرها دارد. گیاهان دارای مکانیسم‌های مختلف دفاع از خود در برابر حملات مداوم عوامل بیمارگر هستند. یکی از این مکانسیم‌ها فعالیت‌های واکنشی عوامل ضد میکروبی اختصاصی پس از شناسایی بیمارگر است. بنابراین، تشخیص بیمارگر از طریق گیرنده های عوامل پاسخ های دفاعی صورت می‌گیرد که در نهایت منجر به جلوگیری از گسترش بیمارگر خواهد شد. به طور کلی گیاهان به بیمارگرهای مرده‌پرور از طریق فعال سازی مسیر جاسمونیک اسید (JA) واکنش نشان می‌دهند در حالی‌که پاسخ دفاعی به بیمارگرهای زیواپرور به مسیر اسید سالیسیلیک (SA) وابسته می‌باشد (15). در گیاهان استرس زنده و غیرزنده ممکن است باعث القا یک مقاومت شود که منجر به مقاومت به استرس بعدی شود و این مقاومت می‌تواند موضعی یا سیستمیک باشد (3 و 12). برای تعیین این که آیا استرس خاصی باعث القا مقاومت شده، یک رویکرد کلی شامل ارزیابی تأثیر پیوند گیاه با یک بیمارگر و میزان علایم ناشی از این تلقیح و شدت غلظت بیمارگر در گیاه می‌تواند باعث قبول یا رد وابستگی یا عدم وابستگی مقاومت به استرس باشد. با توجه به خسارت شدید ویروس ایکس سیب‌زمینی در مزارع توتون و نبود روش مؤثر برای کنترل این بیماری، در مطالعه حاضر تأثیرات زیستی میدان‌های ضعیف مغناطیسی در واکنش گیاه توتون در مقابله با این ویروس بعنوان بیمارگر مورد بررسی قرار گرفته است و سطح مقاومت با تجزیه و تحلیل درصد، شدت و تعیین OD ویروس ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه توتون رقم خالص سامسون از مؤسسه تحقیقات تیرتاش بهشهر و ویروس ایکس سیب‌زمینی از گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس با $OD \leq 3$، از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند. به منظور نگهداری ویروس در گلخانه و استفاده از آن در تیمارهای آزمایشی، از انتقال مکانیکی ویروس به توتون استفاده شد. گیاهان در گلخانه با دمای ثابت 25 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری 16 ساعت روز و 8 ساعت شب نگهداری شدند. گیاهان از لحاظ ظهور علائم پس از دو هفته مورد بازدید قرار گرفتند و پس از ظهور علایم ویروسی در اکثر گیاهان جهت تأیید آلودگی به PVX نمونه‌ها با آزمون ساندویچ دوطرفه الایزا (DAS-ELISA) و با آنتی سرم اختصاصی چندهمسانه‌ای ویروس (تهیه شده از شرکت Bioreba سویس) به روش کلارک و آدامز (9) بررسی شدند.

طراحی دستگاه الکترومغناطیسی و اعمال میدان مغناطیسی

دستگاه الکترومغناطیس مورد استفاده در این آزمایش توسط سیم پیچ به دور فلز آهن، منبع تغذیه و تسلامتر طراحی شد (شکل 1).

بعد از گذشت 14 روز از مایه‌زنی گیاهان به PVX، ابتدا میزان کدورت سنجی ویروس تعیین و پس از اطمینان از یکسان بودن میزان آلودگی، در مرحله بعد گیاهان در یازده تیمار (جدول 1) و شش تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی درون دستگاه الکترومغناطیس قرار داده شدند. 30 روز بعد از اعمال میدان مغناطیسی، تیمارها با استفاده از آزمون ساندویچ دوطرفه الایزا و آنتی سرم اختصاصی PVX جهت تأثیر میدان مغناطیسی در میزان آلودگی به ویروس مورد بررسی قرار گرفتند و میزان OD بدست آمده از آزمون الایزا در هر یک از تیمارها نسبت به شاهد بدون آلودگی بررسی شد. در آزمون الایزا، با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) با استفاده از فرمول $\bar{X}$+3SD، آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. نمونه‌هایی با جذب بالاتر از آستانه، به عنوان نمونه آلوده به ویروس تشخیص داده شدند. داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD انجام شد.

جدول 1- تیمارهای مورد استفاده در آزمایش
Table 1- Treatments Used in Experiment

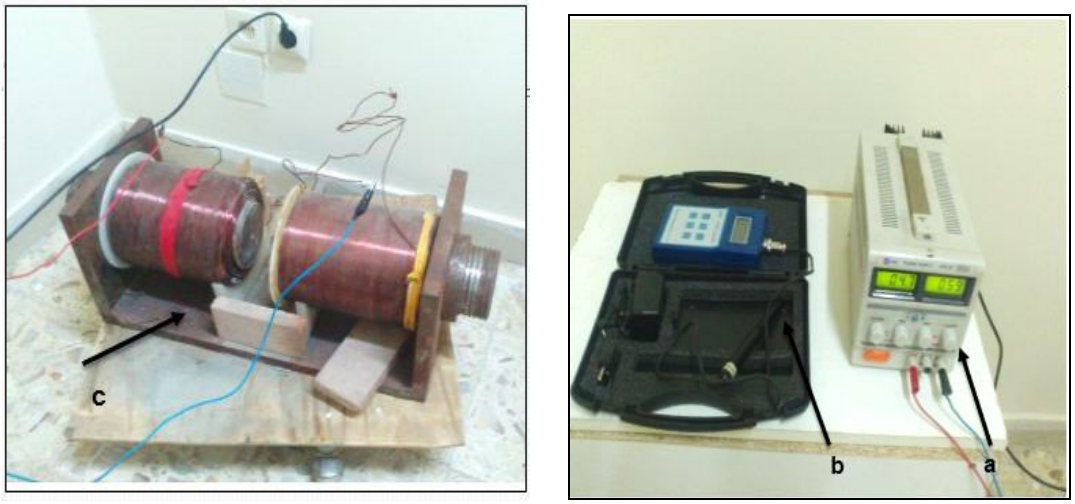
تیمار Treatment	میلی تسلا (mt)	زمان (برحسب دقیقه) Time (minute)
1(شاهد)(contorol)	0	0
2	10	60
3	10	120
4	10	90
5	50	120
6	50	90
7	50	60
8	100	120
9	100	90
10	100	60
11(شاهد آلوده)	0	0

اندازه‌گیری هورمون اسید سالیسیلیک

برای استخراج اسید سالیسیلیک از روش تویو و همکاران (36)

1- phenylalanine ammonia-lyase
2- ornithine decarboxylase

استفاده شد. ابتدا یک گرم بافت در 10 میلی‌لیتر متانول بسیار خالص هموژن شده و به مدت 30 دقیقه در حرارت 80 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس در 4000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شده و به آن اسید کلریدریک دو مولار اضافه و به مدت 60 دقیقه در 80 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و مجدداً در 4000 دور در دقیقه سانتریفوژ گردید.



شکل 1- دستگاه الکترومغناطیس (a: منبع b: دستگاه تسلامتر c: سیم‌پیچی میدان)
Figure 1- Electromagnetic device (a: source b: tesla meter c: winding field)

محلول رویی با آب مقطر به نسبت 1:2 رقیق شده و با فیلتر 0/45 میکرون فیلتر شد. برای اندازه‌گیری اسید سالیسیلیک از دستگاه HPLC استفاده شد. برای این منظور، 20 میکرولیتر عصاره استخراجی به ستون Zarbax SB-C18 به طول 10 سانتی‌متر و قطر ذرات 3 میکرومتر با حرارت 45 درجه سانتی‌گراد تزریق شد. فاز متحرک بصورت گرادیانت شامل آب مقطر با 0/1 درصد اسید اورتوفسفریک 85% و استو نیتریل است. در شروع شستشو از استو نیتریل 5% بمدت دو دقیقه با وضعیت ایزوکراتیک استفاده و در نهایت به 25% از استونیتریل رسید. از اسید سالیسیلیک استاندارد برای تعیین غلظت آن در نمونه مجهول استفاده شد (37).

اندازه‌گیری آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

ابتدا مقدار 0/1 گرم بافت در یک میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری شامل بافر بورات با اسیدیته 8/8 که حاوی 38 گرم بوراکس (دی سدیم ترا بورات) و 6 گرم پلی وینیل پایرولیدون و چند قطره بتامرکاپتواتانول پنج میلی‌مولار و EDTA دو میلی مولار هموژن شد. سپس به مدت 20 دقیقه با دور 14000 در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. از محلول رویی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز استفاده گردید (41). براساس تشکیل ترانس سینامیک اسید که در 290 نانومتر دارای جذب می‌باشد، سنجش فنیل آلانین آمونیالیاز انجام شد. برای این منظور، محلول واکنش شامل Tris-HCL 50 میلی‌مول با اسیدیته 8/5، L-phenylalanine 12/1 میلی‌مول و 100 میکرولیتر عصاره استخراجی از بافت در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه قرار گرفت. در پایان از ترانس سینامیک اسید تشکیل شده در هر ثانیه و با استفاده از منحنی استاندارد بیان شد (7).

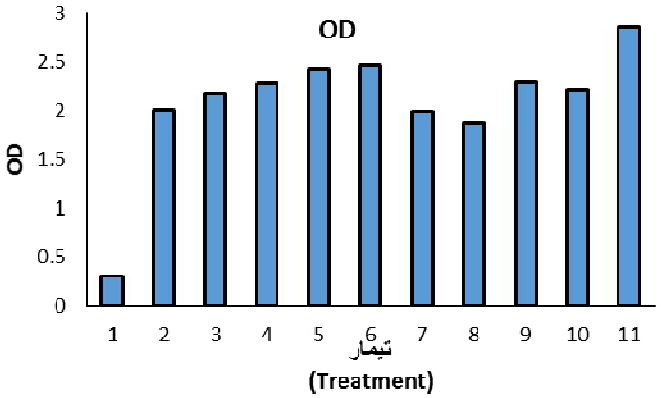
نتایج و بحث

مایه‌کوبی مکانیکی عصاره گیاه آلوده به PVX به گیاه توتون رقم سامسون منجر به بروز علایم موزائیک پس از 14 گردید و نتایج این آلودگی با آزمون الایزا مورد تأیید قرار گرفت.

اعمال میدان الکترومغناطیسی در گیاهان آلوده به PVX

برای اطمینان از آلودگی گیاهچه‌های توتون تلقیح شده، قبل از اعمال تیمارها ابتدا میزان کدورت سنجی ویروس تعیین شد (تمامی گیاهچه‌ها بیشتر از 3). بررسی آماری نتایج آزمون الایزا مشخص کرد که بین تیمارها در سطح 0/05 اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول 2). به‌طوری‌که تیمار یک هیچ گونه آلودگی نداشت و تیمار 11 که به ویروس آلوده شده بود اما در معرض میدان الکترومغناطیسی قرار نگرفته بود اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشتند. در بین تیمارهایی که در معرض میدان الکترومغناطیسی قرار داشتند به ترتیب تیمار 8 و 7 کمترین OD (کمتر از 2) را در آزمون الیزا نشان دادند در صورتی که مقدار OD در تیمار 11 و یک (فاقد آلودگی) به ترتیب

2/85 و 0/35 مشاهده شد. همچنین میزان OD در سایر تیمارهایی که در معرض میدان قرار داشتند بین 2/00 تا 2/46 قابل رؤیت بودند. نتایج نشان داد که بین تیمار 11 (شاهد آلوده) و تیمار 8 که مطلوب ترین تیمار از نظر کاهش در میزان OD است، اختلاف 0/98 در میزان OD وجود دارد. همچنین اختلاف بین تیمارهایی که در معرض میدان الکترومغناطیسی قرار گرفتند نیز 0/59 دیده شد (شکل 2). نتایج بیان کننده این مطلب است که میدان الکترومغناطیسی سبب کاهش میزان OD در گیاهچه توتون آلوده به PVX می‌شود. در واقع نتایج اینگونه تفسیر می‌شود که زمان و شدت میدان از هیچ الگوی خاصی برای تغییر میزان OD پیروی نمی‌کند. تأثیر هر تیمار (شامل پارامتر شدت میدان الکترومغاطیسی و زمان در معرض‌گزاری) کاملا مجزای از سایر تیمارهاست، که به‌دلیل بزرگ بودن عدد میلی تسلا می‌باشد (یعنی اختلاف بین تسلاهای موجود زیاد است). در واقع به علت نبود سابقه تحقیق کافی در مورد تأثیر میدان الکترومغناطیس بر روی بیماری‌های ویروسی، هدف از آزمایش تعیین کردن محدوده‌ی شدت میدان الکترومغناطیس و زمان در معرض‌گزاری برای مبارزه و یا کنترل بیماری ویروسی ایکس سیب‌زمینی در گیاهچه‌های میزبان می‌باشد.



شکل 2- نمودار تغییرات میزان OD در گیاهان توتون

Figure 2- Chart changes in OD levels in tobacco plants

نقی و فیشل (25) اعلام کردند که میدان الکترومغناطیسی سبب کاهش سرعت رشد در *Alternaria alternata*، *Curvularia inaequalis* و *Fusarium oxysporum* می‌گردد. همچنین در این پژوهش تعداد اسپور پرورش یافته نیز مورد بررسی قرار گرفت به طوری‌که در *Alternaria alternata* و *Curvularia inaequalis* با افزایش 133-68 درصدی همراه بود اما در *Fusarium oxysporum* در واقع 83-79 درصد کاهش داشته است. در تحقیق دیگری میدان الکترومغناطیسی 50 هرتز و 0/1 میلی‌تسلا باعث تحریک شدن در وزن خشک و مرطوب در قارچ میکوریزا شده است (30). در گزارشی تأثیر میدان الکترومغناطیسی برروی پراکسیداسیون چربی، میزان H_2O_2، پرولین، پروتئین، وزن خشک و مرطوب و میزان کربوهیدرات در برگ گیاهان دو ساله لیموی (*Citrus aurantifolia*) (سالم و آلوده به Candidatus *Phytoplasma aurantifoliae* که در معرض میدان قرار داشتند، نشان داده شد که وزن خشک و مرطوب برگ، میزان پرولین و پروتئین افزایش یافتند. در هر دو گیاه سالم و آلوده که در معرض میدان قرار داشتند در مقیاس با شاهد و همچنین هیدروژن پراکسید و میزان کربوهیدرات در هر دو گیاه سالم و آلوده نسبت به شاهد کاهش را نشان دادند. همچنین این میدان سبب کاهش بیماری جاروک لیموترش در درختان آلوده شده که احتمالاً با توجه به کاهش فیتوپلاسما در بافت‌های گیاهی بوده است (1). در بررسی که توسط پیاتی و همکاران (29) بر روی اثر ضدباکتریایی میدان الکترومغناطیسی بر روی *Serratia marcescens* انجام گرفت، مشاهده گردید که قرار گرفتن در معرض یک میدان 8/2 میلی‌تسلا منجر به مهار رشد این باکتری می‌گردد. نتیجه یک تحقیق بیان می‌کند که میدان الکترومغناطیسی سبب مهار شدن جوانه‌زنی کنیدی *Alternaria alternate* در شدت 1/5-1 میلی‌تسلا تا 80 درصد می‌گردد اما زمانی که همین قارچ در معرض میدان 0/1-0/5 و 3/5-2 میلی‌تسلا قرار میگیرد جوانه‌زنی 170-120 درصد تحریک می‌شود. همچنین قارچ *Curvularia inaequalis* هنگامی که در معرض میدان الکترومغناطیسی 0/5-1/5 میلی‌تسلا قرار گرفت نسبت جوانه‌زنی 140-120 درصد تحریک شد این در حالی بود که زمانی که در معرض میدان 3/5-2 میلی‌تسلا قرار می گرفت نسبت جوانه‌زنی 80-40 درصد کاهش را در مقیاس با شاهد نشان می‌داد. همچنین میدان الکترومغناطیسی سبب کاهش 15-10 درصدی سرعت رشد میسیلیوم در شش گونه قارچ *Alternaria alternate, Curvularia inaequalis, Fusarium oxysporum,*

Macrophomina phaseolina, *Trichoderma* sp. و *Sclerotinia sclerotirum* می‌شود (24). در واقع نتایج پژوهش‌های محققین بیان می‌کند میدان الکترومغناطیس در شدت و زمان در معرض قرار گرفتن‌های مختلف سبب کاهش میزان پاتوژن و افزایش مقاومت گیاه در برابر پاتوژن می‌گردد، که این نتایج با نتیجه این پژوهش در مورد تأثیر الکترومغناطیس بر کاهش میزان پاتوژن همخوانی دارد. با این وجود مسیری که بعنوان مسیر اصلی که میدان الکترومغناطیسی سبب این کاهش میزان پاتوژن و افزایش مقاومت در گیاه می‌شود دقیقا مشخص نیست و ممکن است شامل چندین مکانیسم باشد. همچنین این اختلاف در نتایج بدست آمده توسط محققین را می‌توان ناشی از یکنواخت نبودن میدان‌های الکترومغناطیسی که اعمال کردند و همچنین بررسی‌ها صورت گرفته در پارامترهای مختلفی بوده، تفسیر کرد.

بررسی تأثیر الکترومغناطیس روی هورمون اسید سالیسیلیک و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در گیاه آلوده و سالم توتون

نتایج بررسی اسید سالیسیلیک و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز مشخص کرد بین تیمارهای گیاه توتون، اختلاف معنی‌داری در سطح 0/05 وجود دارد (جدول 2). بطوری‌که تیمار 7 (50 میلی‌تسلا و 60 دقیقه) بیشترین میزان اسید سالیسیلیک و همچنین آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز را نشان داد. (شکل 3 و 4). در واقع با ورود بیمارگر به میزبان هم اسید سالیسیلیک و هم فنیل آلانین آمونیالیاز افزایش پیدا می‌کنند. اما با اعمال تنش الکترومغناطیس در بعضی تیمارها مقدار هر دو صفت، از گیاه آلوده هم بیشتر می‌شود. البته در بعضی از تیمارها این میزان کمتر از تیمار 11 (شاهد آلوده) می‌باشد (اما در تیمار 4 اسید سالیسیلیک این میزان کمتر از گیاه سالم هم قرار گرفت). نکته جالب توجه در هر دو تیمار مورد بررسی این بود که بیشترین میزان هر دو صفت در تیمارهای 7، 6 و 5 مشاهده شد. در واقع در تفسیر نتایج این آزمایش همانند آزمایش میزان کدورت سنجی اینگونه تفسیر می‌شود که زمان و شدت میدان از هیچ الگوی خاصی برای تغییر در اسید سالیسیلیک و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز پیروی نمی‌کنند.

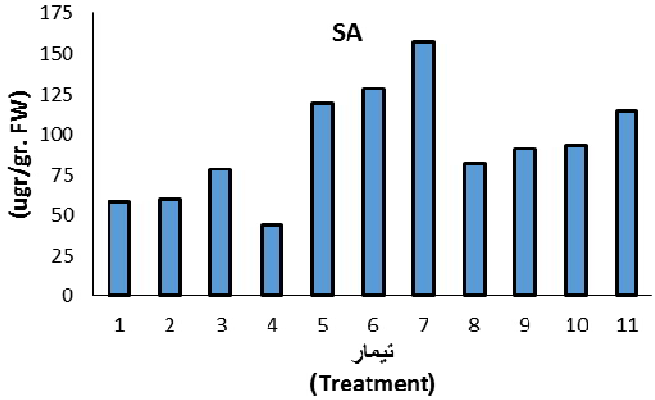
جدول 2- نتایج تجزیه واریانس اسید سالیسیلیک، PAL و OD در گیاه توتون تحت میدان الکترومغناطیسی

Table 2- Results of analysis of variance of salicylic acid, PAL and OD in tobacco plants under electromagnetic field

منابع تغییر (S.O.V)	درجه آزادی (D.F.)	اسید سالیسیلیک (SA)	PAL	OD
تیمار (T)	10	34832.43**	19.968**	1.250**
خطا (E)	22	456.86	1.021	1.25
کل (T)	32	35286.31	20.989	13.757

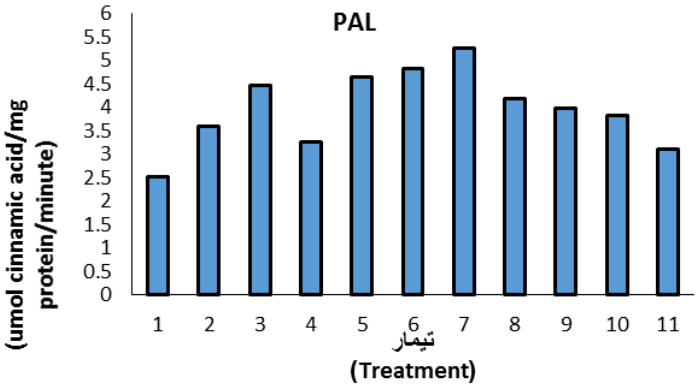
* و ** بترتیب بیانگر غیر معنی‌دار بودن و معنی دار بودن در سطح 0/05 و 0/01

* and ** respectively represent a significant and non-significant at 0.05 and 0.01



شکل 3- نمودار تغییرات اسید سالیسیلیک در گیاهان توتون

Figure 3- Chart Salicylic Acid Changes in Tobacco Plants



شکل 4- نمودار تغییرات PAL در گیاهان توتون

Figure 4- Chart PAL changes in tobacco plants

تأثیر هر تیمار (شامل پارامتر زمان و شدت میدان الکترومغناطیسی) کاملا مجزای از سایر تیمارهاست، که به‌دلیل بزرگ بودن عدد میلی‌تسلا می‌باشد (یعنی اختلاف بین تسلاهای موجود زیاد است). این آزمایش تعیین کننده محدوده‌ی شدت میدان الکترومغناطیس و زمان در معرض‌گزاری می‌باشد. همچنین نمی‌توان بطور کامل بیان کرد که عامل کاهش پاتوژن در میزبان بدلیل افزایش اسید سالیسیلیک و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز است، ممکن است عوامل دیگری هم در کاهش پاتوژن مؤثر باشد.

نقش اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک ماده تنظیم کننده رشد در القای تحمل به بسیاری از تنش‌های زیستی و غیرزیستی همچون باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، تنش سرمازدگی، و تنش خشکی مورد توجه قرار گرفته است (22). سالیسیلیک اسید نقش مهمی در دفاع گیاهان علیه ویروس‌ها ایفا می‌کند. مقاومت اکتسابی سیستمیک القا شده توسط سالیسیلیک اسید باعث مقاومت طولانی مدت به طیف وسیعی از بیمارگرها از جمله ویروس‌ها می‌شود. در مورد ویروس‌ها، سالیسیلیک اسید می‌تواند از سه مرحله اساسی در چرخه بیماریزایی ویروس شامل همانندسازی، حرکت سلول به سلول و حرکت در مسافت طولانی جلوگیری کند. سالیسیلیک اسید بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی را از طریق یک مسیر وابسته به NPR1 در پاسخ فوق حساسیت و مقاومت اکتسابی سیستمیک القا می‌کند. سالیسیلیک اسید همچنین بیان ژن‌های RNA پلی مراز وابسته به RNA آرابیدوپسیس و توتون را القا می‌کند و نقش مهمی در خاموشی RNA ایفا می‌کند (35). سالیسیلیک اسید به اغلب آنزیم‌های حاوی آهن از قبیل کاتالاز، آکوتیناز، لیپوکسیداز و پراکسیداز متصل می‌شوند و به آنزیم‌های گیاهی فاقد آهن متصل نمی‌شوند. این اسید یک ترکیب پیغام دهنده ثانویه در گیاهان است که با اتصال و ممانعت از فعالیت آنزیم کاتالاز باعث افزایش H_2O_2 در سلول شده و ژن‌های مرتبط با دفاع گیاه را فعال می‌کند (32). از طرف دیگر اسید سالیسیلیک با تنظیم ساختار دفاعی آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی و غیرآنزیمی، گیاه را در برابر تنش اکسیداتیو حمایت می‌کند (33). تیمار اسید سالیسیلیک می تواند از طریق دخالت در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و سطوح پروتئین‌ها در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی دخالت داشته باشد (18). از طرفی اسید سالیسیلیک با کاهش pH دیواره سلولی موجب فعال شدن آنزیم‌هایی ازجمله اکسیدازها و پراکسیدازها شود و از این راه موجب چوبی شدن سلول‌ها شود. همچنین از آنجایی که اسید سالیسیلیک یک ترکیب فنلی است چوبی شدن را تشدید می‌کند (32). اسید سالیسیلیک اهمیت متفاوتی در طول HR دارد اما یک عملکرد ثابت در طول SAR دارد. یکی از نشانه های SAR القای مجموعه‌ای از پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی است. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی با فعالیت کیتیناز و بتاگلوکاناز دارای خاصیت ضد قارچی و باکتریایی هستند (5). به‌طور کلی کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک در گیاهان، سبب القای مقاومت نسبت به انواع مختلف بیمارگرهایی که تأثیر خود را از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال، تأثیر بر دیواره‌ی سلولی و کم و زیاد کردن بیان ژن‌های مقاومت اعمال می‌کنند، می‌شود (26). در مطالعه ضیغمی و شریفی (40)، پیش تیمار گیاهان با اسید سالیسیلیک باعث افزایش معنی‌داری فعالیت PAL گردید که نشان دهنده‌ی نقش این آنزیم در مکانیسم دفاعی گیاه در برابر تنش مذکور است، این مطالعات نشان می‌دهند که اسید سالیسیلیک بر بیمارگرهایی مانند *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* نیز مؤثر است. کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک در کنترل بیماری پژمردگی گوجه فرنگی با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*، نقش مؤثری داشته است. تحقیقات نشان می‌دهند که اسید سالیسیلیک اثر ضد قارچی ندارد. بلکه باعث فعال شدن مسیر SAR و القای PR ها می‌شود که مستقیماً رشد قارچ را تحت تأثیر قرار می‌دهند (12). کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک عملکرد گیاهی را تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش می‌دهد و همچنین این

هورمون مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را در مواجه با انواع تنش‌ها کنترل می‌کند. یکی از واضح‌ترین علایم و نشانه‌های مرگ برنامه-ریزی شده سلولی تحت تأثیر اسید سالیسیلیک تغییر در میزان بیان پروتئین‌ها می‌باشد (23). آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز یکی از آنزیم های کلیدی در مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی میباشد. شواهد نشان می‌دهد که هورمون‌های گیاهی بر بیان ژن در گیاهان مؤثر بوده و موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌گردند. علاوه بر این سیستم دفاعی گیاه را از طریق فعال‌سازی رونویسی ژن‌های مرتبط با مکانیسم دفاعی گیاه تحریک نموده باعث تنظیم مقاومت القایی می گردند. تیمار اسید جاسمونیک، اسید جیبرلیک و اسید سالیسیلیک باعث افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز شد (2). میدان مغناطیسی ثابت با شدت 30 میلی‌تسلا می‌تواند عاملی برای تحریک رشد بعدی در گیاه کلم قرمز باشد. قرار گرفتن گیاه در مرحله رویشی در معرض میدان مغناطیسی ثایت با شدت 30 میلی‌تسلا سبب کاهش فعالیت آنزیم PAL، کاهش لیگنین و افزایش فنل‌های متصل به دیواره در هر دو بخش هوایی و ریشه گردید که تأخیر در بلوغ و کاهش چوبی شدن دیواره‌ها در این اندام‌ها را تحت تأثیر میدان مغناطیسی پیشنهاد می‌کند. میدان مغناطیسی مزبور همچنین سبب افزایش محتوی آنتوسیانین بخش هوایی و کاهش محتوای قند محلول در هردو بخش هوایی ریشه گردید (20). این آنزیم در مراحل اولیه سنتز لیگنین عمل می‌کند. در تنش‌های تغذیه‌ای اوج فعالیت این آنزیم در 24 ساعت اولیه تیمار و سپس کاهش فعالیت آن در مراحل بعدی، گزارش شده است (16). القای این آنزیم در مقابل بسیاری از محرک‌ها از جمله حمله بیمارگرها، زخم و اشعه UV ثابت شده می-باشد (7). در پاسخ به *Rhizoctonia solani* در لوبیا چشم بلبلی تیمار شده با اسید سالیسیلیک فعالیت PAL و POX افزایش را نشان داد (8). زاچئو و همکاران (39) ارتباط مستقیمی بین افزایش میزان فنیل آلانین آمونیالیاز و مقاومت به نماتود (*Meloidogyne javanica*) در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی پیدا کردند. آنها همچنین نشان دادند که تشکیل لیگنین در گیاه شدیداً مرتبط با فعالیت آنزیم-های فنیل آلانین آمونیالیاز و Anidic peroxidase موجود در دیواره سلولی گیاه می‌باشد. تغییر در میزان PAL از جمله معیارهای تعیین سنتز لیگنین نیز می‌باشد. بنابراین مطالعه PAL می‌تواند به‌عنوان معیار کیفی واکنش دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرها باشد. در گیاهچه-های سورگوم مایه‌زنی شده با *Peronosclerospora sorghi* تجمع زیاد mRNA PAL در کولتیوارهای مقاوم در مقایسه با کولتیوارهای حساس مشاهده شده است (39). در کشت سلول‌های کاج تیمار شده با الیسیتورهای قارچی نیز القای مقاومت در ارتباط با افزایش میزان PAL، لیگنین و دیگر آنزیم‌های مرتبط می‌باشد (6). مهار نمودن بیان ژن PAL در توتون مقاوم به ویروس موزائیک توتون، موجب غیرفعال شدن مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) و بروز آلودگی شده است (27). هی پینگ و همکاران (19) القای PAL را در طول آلودگی گندم با عامل زنگ سیاه گندم را نشان دادند. آنها نتیجه گرفتند که الیسیتورهای زنده قارچی و الیسیتورهای استخراج شده از قارچ (مانند کیتین) و حتی الیسیتورهای با ماهیت شیمیایی قادر به القای PAL می‌باشند. علاوه بر ساقه و برگ، سنتز PAL در ریشه‌ها نیز به میزان قابل توجهی صورت می‌گیرد که نشان دهنده مشارکت این آنزیم در مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌باشد (19).

در مقایسه نتایج آزمون الایزای گیاهانی که تحت میدان‌های الکترومغناطیسی مختلف قرارگرفته بودند بررسی‌ها نشان داد تیمار 11 که تیمار شاهد آلوده بدون قرار گرفتن در معرض میدان بود دارای بیش‌ترین میزان آلودگی به ویروس بوده در حالی‌که تیمار 8 (100 میلی‌تسلا و مدت 120 دقیقه) و 7 (50 میلی‌تسلا و مدت 60 دقیقه) کمترین میزان کدورت سنجی ویروس را نشان دادند. همچنین در اندازه‌گیری هورمون اسید سالیسیلیک و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در هر دو صفت مورد تحقیق مشاهده گردید که تیمار شماره 7 در هر دو صفت بعنوان بیشترین مقدار مشاهده گردید. این نتایج حاکی از تأثیر مثبت الکترومغناطیس در کاهش میزان کدورت سنجی ویروس، افزایش اسید سالیسیلیک و افزایش آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز که هورمون و آنزیم درگیر در مکانیسم دفاعی گیاه هستند، دارد. اما دلیل قطعی این کاهش میزان کدورت سنجی، افزایش اسید سالیسیلیک و افزایش آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز نیست و ممکن است الکترومغناطیس تأثیر روی سایر مکانیسم‌های دفاعی گیاه مانند سیستم آنتی اکسیدانتی، رادیکال‌های آزاد، ترکیبات فنلی و همچنین پروتئین‌های اختصاصی ضد میکروبی و.. داشته باشد. که نیاز به پژوهش بیشتر در این زمینه می‌باشد.

با توجه به نبود راه مؤثر برای درمان بیماری ویروسی ایکس سیب‌زمینی و نتایج حاصل از این آزمایش، امکان استفاده از الکترومغناطیس بعنوان راهی نوین برای درمان این بیماری ارائه می شود. هر چند که نتایج این تحقیق نتوانست بطور کامل نهال آلوده به ویروس PVX را درمان کند اما مشاهده شد که میدان مغناطیسی سبب کاهش میزان کدورت سنجی ویروس و افزایش هورمون و آنزیم درگیر در مکانیسم دفاعی گیاه شود، بطوری‌که برای کاهش میزان کدورت سنجی ویروس، تیمار 100 میلی‌تسلا، 120 دقیقه و برای تقویت سیستم دفاعی گیاه تیمار 50 میلی‌تسلا، 60 دقیقه بعنوان بهترین تیمارها گزارش شدند. لذا امید است با تحقیقات بیش‌تر در این زمینه توانست گیاه عاری از ویروس تهیه نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، به‌خاطر فراهم کردن امکانات لازم برای انجام آزمایشات قدردانی می

گردد. همچنین این پژوهش تحت حمایت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان قرار گرفت.

منابع

1- Abdollahi F., Niknam V., Ghanati F., Masroor F., and Noorbakhsh S. N. 2012. Biological effects of weak electromagnetic field on healthy and infected lime (*Citrus aurantifolia*) trees with Phytoplasma. The Scientific World Journal, 2012.
2- Abdkhani S., Sloki M., Shiri Y., and Yaos A. 2015. The effect of hormone gibberellic acid, jasmonic acid and salicylic acid on gene expression Fnylalanynamvnyalyaz (PAL) at different growth stages. *Ocimum basilicum* L. Journal of biotech crops, 21: 4-30.
3- Agrios GN. 2005. Plant Pathology (fifth edition). San Diego, California: Elsevier Academic Press. p 237–242.
4- Baure´us Koch CLM., Sommarin M., Persson BRR., Salford LG., and Eberhardt JL. 2003. Interaction between low frequency magnetic fields and cell membranes. Bioelectromagnetics 24:395–402.
5- Bowles D. J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. Annual review of biochemistry. 59:873-907.
6- Campbell M.W., and Ellis B.E. 1992. Fungal-elicitor mediated responses in pine cell culture.1.Induction of phenyl propanoid pathway. Plantae 186:409- 417.
7- Cheng G. W., and Breen P. J. 1991. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science. 116:865-869.
8- 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. 29:361-367.
9- Clark M. F., and Adam A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of general virology. 34:475-483.
10- Davis MS. 1996. Effects of 60 Hz electromagnetic fields on early growth in three plant species and a replication of previous results. Bioelectromagnetics 17:154–161.
11- De Souza A., Garcí D., Sueiro L., Gilart F., Porras E., and Licea L. 2006. Pre-sowing magnetic treatments of tomato seeds increase the growth and yield of plants, Bioelectromagnetics, 27:247-257.
12- Durrant WE., and Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. Annu Rev Phytopathol 42:185–209.
13- Fischer G., Tausz M., Kock M., and Grill D. 2004. Effects of weak 16.2/3 Hz magnetic fields on growth parameters of young sunflower and wheat seedlings. Bioelectromagnetics 25:638–641.
14- Galland P., and Pazur A. 2005. Magnetoreception in plants. J Plant Res 118:371–389.
15- González-Lamothe R., El Oirdi M., El Rahman T. A., Sansregret R., Bathily H., Bouarab K., and Daayf F. 2009. Cross talk between induced plant immune systems. Molecular Plant-Microbe Interactions, 163.
16- Ghanati F., Morita A., and Yokota H. 2005. Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. Plant and soil, 276(1-2), 133-141.
17- Grazia T., Francesco B., Lisa L., Patrizia T., G. Lorenzo C., and Lucietta B. 2007. Extremely Low Frequency Weak Magnetic Fields Enhance Resistance of NN Tobacco Plants to Tobacco Mosaic Virus and Elicit Stress-Related Biochemical Activities. Bioelectromagnetics 28: 214-223.
18- Hamidzade S., Kahriz J. S. and Ebadi A. 2014. How to change the content of carbohydrates, total protein Nzym¬Hay planned oxidant effect of salicylic acid in cell death in two wheat cultivars. Crop production, 2: 97-112. (in Persian with English abstract)
19- Hi-Ping L., Rainer F., and Yu C. L. 2001. Molecular evidence for induction of phenylalanine ammonia lyase during *Puccinia graminis* infection and elicitation in wheat. Can. J. Plant Phatol. 23:286-291.
20- Khosh sokhan M. M., Ghanati F., Zare M. H., Abdolmaleki P., Khorami S. K., Eteadi B., and Vaez zade M. 2004. Effect of Static Magnetic Field on the metabolism of some phenolic compounds in red cabbage plants. Research and development, 70:63-69. (in Persian with English abstract)
21- Kobayashi M., Soda N., Miyo T., and Ueda Y. 2004. Effects of combined DC and AC magnetic fields on germination of hornwort seeds. Bioelectromagnetics 25:552–559.
22- Mardani H., Bayat H., and Azizi M. 2011. Effect of foliar application of salicylic acid on morphological characteristics of cucumber seedlings under drought stress. Journal of Horticultural Science, 25(3): 320-326. (in Persian with English abstract)
23- Mauch F., Mauch-Mani B., Gaille C., Kull B., Haas D., and Reimmann C. 2001 .Manipulation of salicylate content in Arabidopsis thaliana by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. The Plant Journal. 25:67-77.
24- Nagy P. 2003. The effect of light and low frequency magnetic fields on microscopic fungi (Doctoral dissertation, Hungarian Academy of Sciences).
25- Nagy P. 2005. The effect of low inductivity static magnetic field on some plant pathogen fungi. Journal of

Central European Agriculture, 6(2): 167-172.
26- Paxton J. 1981. Phytoalexins—a working redefinition. Journal of phytopathology. 101:106-109.
27- Piacentini MP., Piatti E., Fraternale D., Ricci D., Albertini MC., and Accorsi A. 2004. Phospholipase C-dependent phosphoinositide breakdown induced by ELF-EMF in *Peganum harmala* calli. Biochimie 86:343–349.
28- Piatti E., Albertini M. C., Baffone W., Fraternale D., Citterio B., Piacentini M. P., and Accorsi A. 2002. Antibacterial effect of a magnetic field on *Serratia marcescens* and related virulence to *Hordeum vulgare* and *Rubus fruticosus* callus cells. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 132(2): 359-365.
29- Ruzic R., Berden M., and Jerman I. 1998. The effects of oscillating electromagnetic fields on plants. Summary Report, Proc. First World Congress on the Bioeffects of Electricity and Magnetism on the Natural World, Madeira, UK. pp. 1-6.
30- Ruzic R., and Jerman I. 2002.Weak magnetic field decreases heat stress in cress seedlings. Electromagnetic Biol Med 21:69–80.
31- Seo S., Okamotoc M., Iwaia T., Iwanod M., Fukuie K., Isogaid A., Nakajimaf N., and Ohashiet Y. 2000. Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive response. Plant Cell 12:917–932.
32- Singh Gill S., and Tuteja N. 2010. Reactive Oxygen Species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48: 909-930.
33- Stange B. C., Rowland R. E., Rapley B. I., and Podd J. V. 2002. ELF magnetic field increase amino acid uptake into *Vicia Faba* L. roots and alter ion movement across the plasma membrane. Bioelectromagnetics 23:347–354.
34- Takahashi Y., Berberich T., Miyazaki A., Seo S., Ohashi Y., and Kusano T. 2003. Spermine signalling in tobacco: Activation of 222 Trebbi et al. mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitocondrial dysfunction. Plant J 36: 820–829.
35- Toiu A., Vlase L., Oniga I., and Tamas M. 2008. HPLC analysis of salicylic acid derivatives from Viola species. Chemistry of Natural Compounds. 44:357-358.
36- Toiu A., Vlase L., Oniga I., Benedec D., and Tãmaş M. 2011. HPLC analysis of salicylic derivatives from natural products. Farmacia. 59:106-112.
37- Walker J. 2005. Fusarium wilt of tomato. The American phytopathological society. Iranian, J. Agric. Sci. 36.
38- Wang J. W., Zheng L. P., Wu J. Y., and Tan R. X. 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*, *15*(4), 351-358.
39- Zacheo G., Bleve-Zacheo T., Pacoda D., Orlando C., and Durbin R. 1995. The association between heat-induced susceptibility of tomato to Meloidogyne incognita and peroxidase activity. Physiological and molecular plant pathology. 46:491-507.
40- Zeighami nejad R., and Sharifi S. G. 2013. Related gene expression and enzyme activity of the pathogen in the induction of resistance to powdery mildew pumpkin by salicylic acid. Journal of Agricultural Biotechnology, 5(1): 97-110. (in Persian with English abstract)