کاربرد ریبوفلاوین بعنوان القاء کننده مقاومت در گیاه برنج

پریسا طاهری و سعید طریقی
گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده:
ویتامینها از جمله مواد کم مصرف حیاتی برای حفظ سلامت انسان و حیوانات، و همچنین جزء تنظیم کننده های رشد و فعال کننده های سیستم دفاعی گیاهان علیه استرس های ناشی از عوامل زنده و یا غیر زنده می باشند. تحقیقات انجام شده در سالهای اخیر در مورد کاربرد ویتامینها در گیاهان تک لپه و دو لپه مختلف بمنظور فعال سازی پاسخ های دفاعی گیاه علیه عوامل بیماریزا نشانگر اثرات قابل توجه این ویتامینها در فعال سازی مکانیسم های دفاعی گیاهان می باشد. در این پژوهش، نقش ویتامین ب دو (ریبوفلاوین) بعنوان فعال کننده مکانیسم مقاومت در گیاه برنج علیه قارچ های رایزوکتونیا، بیماریزا در غلاف برنج، از نظر سلولی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. کاربرد ریبوفلاوین در سطح اندام های هوایی گیاه، موجب بروزمقاومت سیستمیک علیه قارچ های مذکور گردید. ریبوفلاوین موجب بروز مرگ سلولی در برنج نگردید و هیچگونه اثر مستقیمی بر روی رشد عوامل بیماریزا در محیط کشت نداشت. لزوم وجود فاصله زمانی بین کاربرد ریبوفلاوین و مایه زنی با عوامل بیماریزا، برای کاهش شدت بیماری، نشانگر تحریک ایجاد مقاومت در گیاه توسط ریبوفلاوین می باشد. این مورد با بررسی پاسخ های دفاعی سلولی و مولکولی گیاه مورد تایید قرار گرفت. تولید لیگنین در سلولهای گیاهان برنج تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با کنترل با استفاده از روش فلوروگلوسینول- اسیدکلریدریک و همچنین با سنجش میزان تیوگلیکولیک اسید تعیین گردید. در گیاهان تیمار شده، سرعت و میزان تولید لیگنین در مقایسه با گیاهان کنترل بیشتر بود که در ارتباط با افزایش مقاومت گیاهان تیمار شده می باشد. نتایج بررسی بیان ژن پراکسیداز کاتیونی، دخیل در تولید لیگنین در برنج، نشانگر پایین بودن سطح بیان این ژن در کنترل در مقایسه با گیاهان تیمار شده بود و تحریک ایجاد مقاومت توسط ریبوفلاوین در ارتباط با افزایش بیان این ژن در گیاهان تیمار شده بود. بنابراین، افزایش سرعت و شدت تولید لیگنین و بیان ژن مذکور از مکانیسم های القاء مقاومت ناشی از ریبوفلاوین در گیاه برنج می باشند. این نتایج بیانگر امکان استفاده از ریبوفلاوین در مدیریت بیماریهای رایزوکتونیایی برنج، بعنوان یک روش نوین و بی ضرر برای محیط زیست می باشد که می تواند بمنظور کاهش خسارات ناشی از این بیماریها بکار گرفته شود.

واژه های کلیدی: ، ریبوفلاوین، رایزوکتونیا، مقاومت القایی، لیگنین، پراکسیداز

مقدمه:
در سالهای اخیر، با استفاده از ارقام برنج حساس و کاربرد بیش از حد کودهای نیتروژندار، خسارت ناشی از بیماریهای رایزوکتونیایی در نواحی برنج کاری دنیا افزایش یافته است. اگر چه مقاومت نسبی ژنتیکی علیه بیماری شیت بلایت در برنج گزارش شده، اما تاکنون هیچ ژنی بعنوان مسئول ایجاد مقاومت کامل در برنج علیه این بیماری شناسایی نشده است (6 و 10). اکثر ارقام برنج کشت شده در بیش از ۹۰ درصد از نواحی برنج خیز دنیا حساس به این بیماری می باشند. بدلیل دامنه میزبانی وسیع عامل بیماریزا، تنوع

ژنتیکی بالای آن، و سطح پایین مقاومت واریته های برنج به این بیماری و عدم وجود واریته های کاملا مقاوم، کنترل این بیماریها بسیار مشکل و نیازمند مبارزه تلفیقی است (17). بنابراین، استفاده از مواد شیمیایی محافظت کننده و فعال کننده سیستم دفاعی گیاه بمنظور کاهش خسارت ناشی از این بیماریها ضروری بنظر می رسد. در برخی شرایط، گیاهان قادر به افزایش میزان مقاومت خود علیه عوامل بیماریزا می باشند. این پدیده بعنوان مقاومت القایی (Induced resistance) شناخته شده است (15). بر اساس مکانیسمهای مختلفی که در ایجاد این مقاومت دخیل اند، انواع متفاوتی از مقاومت القایی تعریف شده اند(18). سیگنالهایی همچون سالیسیلیک اسید (Salicylic acid; SA) ، جاسمونیک اسید (Jasmonic acid; JA) ، واتیلن (Ethylene; ET) ، همچنین مواد شیمیایی نظیر بنزو (۱و ۲و۳)- تیادیازول- N - کربوتیونیک اسید- S – متیل استر (BTH) ، بتا-آمینو بوتیریک اسید و پروبنازول و انواعی از ویتامینها نظیر تیامین و ریبوفلاوین قادر به ایجاد مقاومت القایی در گیاهان مختلف علیه طیف وسیعی از پاتوژنها می باشند (12 و 13 و 16). سیگنالهای دفاعی نوینی در مکانیسم عملکرد برخی مواد شیمیایی فعال کننده پاسخهای دفاعی گیاه، دخیل شناخته شده اند. بعنوان مثال، بررسی هامس اخیر (8) نشان داد که مقاومت القایی ناشی از کاربرد بتا-آمینو بوتیریک اسید (β-amino buthyric acid; BABA) در انگور علیه *Plasmopara viticola* عامل بیماری سفیدک داخلی در ارتباط با سیگنالهای دفاعی مربوط به JA pathway و تولید سدهای دفاعی گیاه در برابر پاتوژن نظیر لیگنین و کالوز می باشد و ارتباطی با مسیر انتقال سیگنال سالیسیلیک اسید، که یکی از مهمترین سیگنالهای دخیل در القای مقاومت می باشد، ندارد.

ویتامین B2 یا ریبوفلاوین یک ویتامین محلول در آب است که در چرخه های تنفسی و تولید انرژی بعنوان یک کوآنزیم در واکنش های انتقال الکترون و تولید یا تخریب رادیکالهای اکسیژن در متابولیسم سلولی دخالت دارد. در آرابیدوپسیس و تنباکو با استفاده از ریبوفلاوین، مقاومت القایی و حفاظت نسبی علیه عوامل بیماریزای بیوتروف و نکروتروف قارچی، باکتریایی، و ویروسی مشاهده شده است. مقاومت ناشی از کاربرد این ویتامین در دولپه ایها در ارتباط با دخالت سیگنالهای مربوط به پروتئین کیناز و ژن NPR 1 (که تنظیم کننده پاسخهای دفاعی گیاه در هر دو مورد SAR و ISR است) می باشد اما ارتباطی با تولید و تجمع سالیسیلیک اسید ندارد (11). بعلاوه ، تیمار گیاهان برنج با این ویتامین و مشتقات آن موجب ایجاد مقاومت القایی سیستمیک علیه قارچ *Pyricularia oryzae* عامل بیماری بلاست برنج شده است (۲).

در این مطالعه، اثر ریبوفلاوین در ایجاد مقاومت القایی سیستمیک علیه بیماریهای رایزوکتونیایی غلاف برنج مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط آن با واکنشهای دفاعی سلولی و مولکولی، سیگنالهای دفاعی مختلف و بیان ژن دفاعی پراکسیداز کاتیونی در گیاه برنج ارزیابی گردید.

مواد و روش ها:

رشد گیاه و تیمار با ریبوفلاوین:

گیاه برنج از واریته IR-64 که یکی از واریته های حساس به بیماریهای رایزوکتونیایی می باشد در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت بذور این واریته در پتری های با رطوبت نسبی ۹۵ درصد در دمای ۲۸ ° C بمدت چهار روز خیسانده شدند. سپس بذور جوانه زده در خاک حاوی کمپوست (Klassman-Deilman, Geeste, Germany) و تحت شرایط گلخانه شامل دمای ۴ ° C ± ۳۰ و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در شبانه روز، کشت شدند. کوددهی گیاهان با استفاده از ۲ گرم سولفات آمونیم به ازای هر متر مربع و در روزهای ۸ و ۱۵ و ۲۲ پس از ظهور گیاهچه ها انجام شد. گیاهان

چهار هفته ای برای مایه زنی با رایزوکتونیا مورد استفاده قرار گرفتند. ریبوفلاوین از شرکت سیگما خریداری و در آب مقطر استریل حل شد. غلظتهای مختلف ریبوفلاوین در آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد Tween-20 بر روی بخشهای هوایی گیاه اسپری شدند.

تهیه ایناکولوم و مایه زنی غلافهای برنج:

جدایه بیماریزای NL-84 از قارچ *R. solani* AG1-IA و جدایه بیماریزای KKD-1.33 از *R. oryzae-sativae* در محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار (Potato- dextrose- agar; PDA) در دمای ۲۸°C رشد داده شدند (17) و در لوله های آزمایش محتوی محیط کشت PDA در دمای ۴ °C برای کوتاه مدت نگهداری شدند. نگهداری بلند مدت جدایه ها به روش فریز-درای کردن اسکلروتها انجام شد. ایناکولوم شامل قطعات دو سانتیمتری خلال دندان کلونیزه شده با میسلیوم قارچ بود (17). هر قطعه خلال دندان در بین غلاف و ساقه ماشوره ای اولین برگ پایینی گیاه برنج در پنجه اصلی و درفاصله پنج سانتیمتری از سطح خاک قرار گرفت.

برای هر تیمار، دوازده گیاه برنج با استفاده از طرح کاملا تصادفی مایه زنی شدند و آزمایش دو بار تکرار شد. یک قطعه خلال دندان کلونیزه نشده با پاتوژن، که بر روی محیط کشت PDA فاقد قارچ قرار داده شده بود، بعنوان کنترل منفی در تست های بیماریزایی مورد استفاده قرار گرفت. پس از مایه زنی، گیاهان فورا در گلخانه با رطوبت ۹۲ تا ۱۰۰ درصد قرار داده شدند. ارزیابی شدت بیماری با اندازه گیری طول علایم ایجاد شده در زمان های مختلف پس از مایه زنی گیاهان انجام شد (14).

اثر ریبوفلاوین بر رشد عوامل بیماریزا:

قارچهای *R. solani* و *R. oryzae-sativae* بر روی محیط کشت PDA حاوی غلظتهای مختلف ریبوفلاوین شامل ۰، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ میکرومولار کشت شدند. پس از ۶ روز رشد در انکوباتور با دمای ۲۸ °C قطر کلونی قارچها اندازه گیری شد. در هر آزمایش، برای هر قارچ در هر غلظت ریبوفلاوین، ۶ تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش دو بار تکرار گردید.

بررسی سیتولوژیکی مرگ سلولی:

بمنظور ردیابی مرگ سلولی، گیاهان برنج با غلظتهای مختلف ریبوفلاوین (از ۰ تا ۵۰۰۰ میکرومولار) اسپری شدند. سپس احتمال بروز مرگ سلولی ناشی از کاربرد ریبوفلاوین پس از گذشت پنج روز از تیمار، بطور میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان برنج تیمار نشده که با استفاده از قارچ نکروتروف *R. solani*، عامل ایجاد مرگ سلولی، مایه زنی شده بودند بعنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند. برای ردیابی میکروسکوپی مرگ سلولی از روش رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شد (۴ و 19). همه نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus U-MWB2) مشاهده شدند و تصاویر با استفاده از دوربین دیجیتال (Olympus Color View II Camera, Aartsellar, BA) گرفته شدند و پردازش تصاویر با استفاده از برنامه Olympus Analysis Cell F انجام شد.

انتقال سیستمیک پاسخهای دفاعی ناشی از ریبوفلاوین:

بمنظور بررسی انتقال سیستمیک پاسخهای دفاعی ناشی ازکاربرد ریبوفلاوین، دو برگ پایینی هر گیاه با ریبوفلاوین یک میلی مولار یا محلول ۰/۰۵ درصد از Tween ۲۰ در آب (کنترل یا Mock) اسپری شدند و در حین اسپری برگهای پایینی، قسمتهای بالاتر گیاه کاملا با پاکت پلاستیکی پوشانده شدند. پنج روز پس از تیمار، مایه زنی در غلاف برگ تیمار شده و یا برگ تیمار نشده بالایی انجام شد. پیشرفت بیماری در روزهای مختلف پس از مایه زنی با اندازه گیری طول زخمها انجام گردید. میزان بیان ژنهای PO-C1، PAL، و LOX در برگهای تیمار شده و تیمار نشده بالایی ارزیابی گردید.

استخراج RNA و بررسی بیان ژنها به روش RT-PCR:

استخراج RNA از بخشهای هوایی گیاهان برنج با استفاده از روش TRIZOL انجام شد. پس از تیمار نمونه های RNA با RNase-free DNase (TURBO DNA-free kit) خریداری شده از شرکت Ambion (USA) بمنظور حذف DNA از نمونه های RNA، میزان RNA در هر نمونه بوسیله اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت نمونه های RNA در ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیم بروماید بررسی گردید. سپس cDNA با استفاده از پرایمر oligo (dT) 18 و آنزیم SuperScript Reverse Transcriptase ساخته شد و در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. سپس پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای هر یک از ژنهای مورد بررسی که در جدول ۱ ذکر شده اند ، مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژنهای PO-C1، PAL، و LOX. ژن actin بعنوان کنترل در واکنش های RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت.

rimer	Gene	Accession number	Product size (bp)
5′-GACCAGGTGCTCTTCAACAA-3′ (F)	PO-C1	AF247700	342
5′-GGCAAATCTGCATGTACCAC-3′ (R)	PO-C1	AF247700	342
5′-CTGCGGGTATCCATGAGACT-3′ (F)	actin	X15865	154
5′-GGAGCAAGGCAGTGATCTTC-3′ (R)	actin	X15865	154

F= Forward, R=Reverse

اختصاصی بودن هر یک از این پرایمرها برای بررسی بیان ژن مربوطه، بوسیله انجام آنالیز BLAST در NCBI مورد تایید قرار گرفت. در واکنش های PCR شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۵ دقیقه ای در دمای C ° ۹۴ و سپس ۲۵ تا ۳۵ سیکل PCR (شامل ۳۰ ثانیه در C ° ۹۴ ، ۳۰ ثانیه در C ° ۵۸ و یک دقیقه در C ° ۷۲) و در نهایت مرحله گسترش نهایی بمدت ۷ دقیقه در دمای C ° ۷۲ بود.

بمنظور تعیین تعداد سیکل PCR مناسب برای بررسی بیان هر یک از ژنها، پس از ۲۰ ، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ سیکل، PCR متوقف و محصول PCR در ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر آزمون RT-PCR، نمونه های RNA که فقط با DNase تیمار شده بودند و فرآیند ساخته شدن cDNA برای آنها انجام نشده بود (نمونه های RT–) نیز بعنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند تا احتمال آلودگی به DNA ژنومی در آنها بررسی گردد. هر RT-PCR دو بار تکرار شد.

بررسی سیتولوژیکی تولید لیگنین و آزمون تیوگلیکولیک اسید:

بمنظور بررسی تولید لیگنین در سلولهای گیاه برنج، نمونه برداری از برگها در زمانهای مختلف پس از مایه زنی با *R. solani* انجام شد. نمونه ها در محلول فلوروگلوسینول ۱٪ در اتانل ۷۰٪ برای بیرنگ شدن نگهداری گردیدند(11). نمونه ها پس از شسته شدن در اسیدکلریدریک ۲۵٪ بکمک میکروسکوپ فلورسنت (Olympus U-MWB2) مشاهده شدند و تصاویر با استفاده از دوربین دیجیتال (Olympus Color View II Camera, Aartsellar, BA) گرفته شدند و پردازش تصاویر با استفاده از برنامه Olympus Analysis Cell F انجام شد.

برای تعیین میزان تولید لیگنین از آزمون تیوگلیکولیک اسید استفاده شد (5) و میزان جذب برای هر نمونه در طول موج 280 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید.

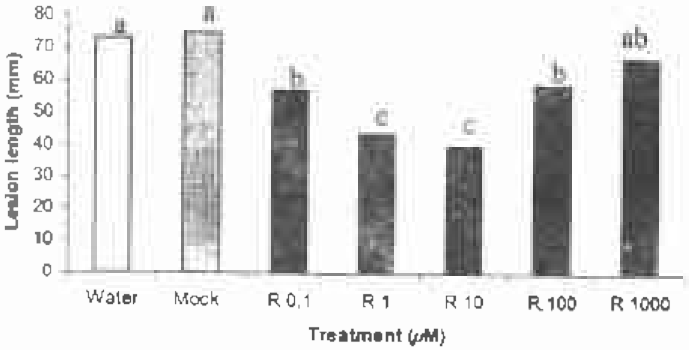
نتایج و بحث:

ایجاد مقاومت در گیاهان برنج علیه *R. solani* و *R. oryzae-sativae* با کاربرد ریبوفلاوین:

بمنظور ارزیابی کارآیی ریبوفلاوین در حفاظت از گیاهان برنج علیه عوامل بیماریزای مورد بررسی و فعال سازی سیستم دفاعی گیاه، گیاهان برنج با غلظتهای مختلف ریبوفلاوین (۰/۱ تا ۱۰۰۰ میکرومولار) اسپری شدند و شدت پیشرفت بیماری در گیاهان مایه زنی شده با هر یک از گونه های رایزوکتونیا ارزیابی گردید. کاهش شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با کنترل در هر دو مورد مایه زنی با *R. solani* و یا *R. oryzae-sativae* قابل مشاهده بود (شکل ۱). تفاوت معنی داری بین طول زخمهای ایجاد شده ناشی از هر یک از این عوامل بیماریزا بر روی گیاهان تیمار شده با محلول کنترل یا Mock در مقایسه با گیاهان تیمار شده با آب مشاهده نشد که نشانگر این است که تیمار با Mock هیچگونه تاثیری بر روی آلودگی گیاهان با این عوامل بیماریزا ندارد. بیشترین تاثیر ریبوفلاوین در حفاظت از گیاهان برنج علیه این گونه های رایزوکتونیا در غلظتهای پایینی همچون ۱ و ۱۰ میکرومولار مشاهده گردید و میزان پیشرفت بیماری در گیاهان تیمار شده با این دو غلظت، تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشت. این نتایج نشانگر این است که غلظت ۱ میکرومولار، از موثرترین غلظتهای ریبوفلاوین برای ایجاد مقاومت در پاتوسیستم برنج-رایزوکتونیا می باشد و در آزمایشات بعدی برای ارزیابی بیشتر مکانیسم های سلولی و ملکولی دخیل در ایجاد مقاومت در این پاتوسیستم، می توان از این غلظت استفاده نمود.

غلظت پایین تر مورد استفاده (۰/۱ میکرومولار)، سطح پایین تری از حفاظت از گیاهان را در برابر این عوامل بیماریزا نشان داد. بالاترین غلظت ریبوفلاوین بکاررفته در این تحقیق (۱ میلی مولار) اثر معنی داری در حفاظت از گیاهان برنج علیه گونه های رایزوکتونیا در مقایسه با کنترل نداشت (شکل ۱). بدست آمدن این نتایج ممکن است بدلیل تولید رادیکالهای اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن در غلظتهای بالای ریبوفلاوین باشد (مشاهدات اولیه نگارنده، داده ها ارائه نشده اند). تولید رادیکالهای اکسیژن منجر به ایجاد مرگ سلولی و در نتیجه تشدید فعالیت بیماریزایی قارچ نکروتروف رایزوکتونیا می شود و کاهش اثر ریبوفلاوین در حفاظت از گیاهان در برابر این عوامل بیماریزا را در پی خواهد داشت. با کاربرد این غلظتهای ریبوفلاوین از طریق افزودن به خاک به همراه آب آبیاری نتایج مشابهی بدست آمد (داده ها ارائه نشده اند) اما میزان حفاظت گیاهان در برابر این عوامل بیماریزا در این روش در مقایسه با کاربرد ریبوفلاوین از طریق اسپری کردن گیاهان کمتر بود. پایین تر بودن سطح مقاومت در این روش می تواند بدلیل جذب و

تجزیه مقادیری از ریبوفلاوین بوسیله ذرات خاک و میکروارگانیسم های موجود در خاک باشد که در نتیجه موجب جذب مقدار کمتری از این ویتامین توسط گیاه می شود.

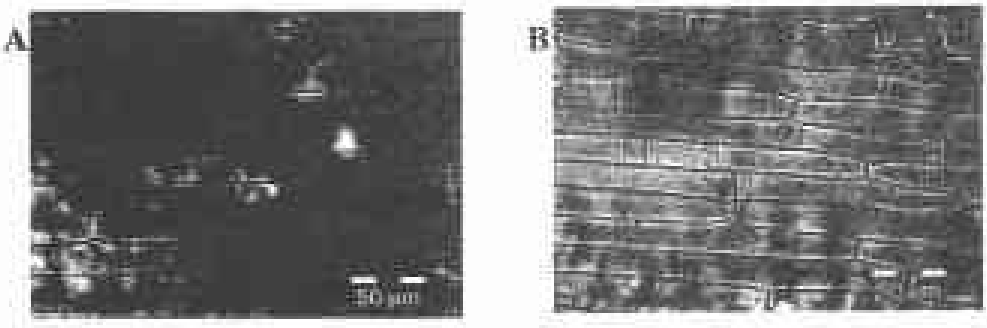


شکل ۱- تاثیر ریبوفلاوین در غلظتهای مختلف بر روی پیشرفت بیماری سوختگی غلاف برنج ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* در واریته IR-64 در زمان چهار روز پس از مایه زنی. گیاهان برنج (۳۶ گیاه به ازاء هر تیمار، شامل ۱۲ گیاه برای هر تیمار در هر آزمایش و نهایتا با سه بار تکرار آزمایش مربوط به هر تیمار) ریبوفلاوین در هر یک از غلظت های مورد بررسی (۰/۱ تا ۱۰۰۰ میکرومولار) بر روی گیاهان اسپری شد و سه روز پس از تیمار، مایه زنی با *R. solani* انجام شد. آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (۱۶) بر اساس آنالیز Kruskal-Wallis و آزمون مقایسه ای Mann-Whitney در سطح P=0.05 انجام گردید. حروف مختلف نشان داده شده بر روی بارها نمایانگر اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف و یا غلظت های مختلف می باشند.

ظهور سریعتر و شدیدترعلایم بیماری سوختگی غلاف در گیاهان کنترل در مقایسه با گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین مشاهده شد. اکثر غلافهای برگ در تیمار کنترل، ابتدا علایمی شامل زخمهای تخم مرغی تا بیضی شکل به رنگ خاکستری مایل به سبز در اولین روز پس از مایه زنی نشان دادند. در مقایسه، حفاظت از گیاهان توسط ریبوفلاوین در گیاهان تیمار شده با این ویتامین کاملا مشهود بود. این گیاهان هیچگونه علایمی را در روز اول پس از مایه زنی نشان ندادند. علایم بیماری بر روی این گیاهان که شامل لکه های کوچک محاصره شده با حاشیه قهوه ای رنگ بود، در روز دوم و یا سوم پس از مایه زنی ظاهر گردیدند. این گیاهان در روز دهم پی از مایه زنی در گلخانه هنوز زنده و سرسبز بودند در حالیکه در همین زمان، گیاهان کنترل در اثر پیشرفت شدید بیماری سوختگی غلاف کاملا مرده بودند.

تاثیر ریبوفلاوین بر سلولهای گیاهان برنج و گونه های رایزوکتونیا :

در ارزیابی اثرات احتمالی گیاه سوزی و مرگ سلولی ناشی از ریبوفلاوین در گیاهان برنج در غلظت های فوق، گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین فاقد هر گونه مرگ سلولی میکروسکوپی و ماکروسکوپی و یا هر گونه تغییر در رشد و وضعیت ظاهری بودند (شکل ۲).



شکل۲- بررسی میکروسکوپی گیاهان برنج مایه زنی شده با قارچ نکروتروف *R.solani* بعنوان کنترل مثبت برای ایجاد مرگ سلولی (A) در مقایسه با گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین (B). در رنگ امیزی با تریپان بلو، سلولهای نکروزه شدیدا رنگ را جذب کرده و به رنگ تیره در تصویر A مشاهده می شوند.

بررسی تاثیر غلظت های مختلف ریبوفلاوین بر روی رشد گونه های رایزوکتونیای مورد استفاده در این مطالعه نشان داد که ریبوفلاوین در غلظت های ۰/۱ تا ۴۰۰۰ میکرومولار افزوده شده به محیط کشت PDA هیچگونه اثر مستقیمی بر رشد قارچهای *R. solani* و *R. oryzae-sativae* نداشت(جدول ۱).

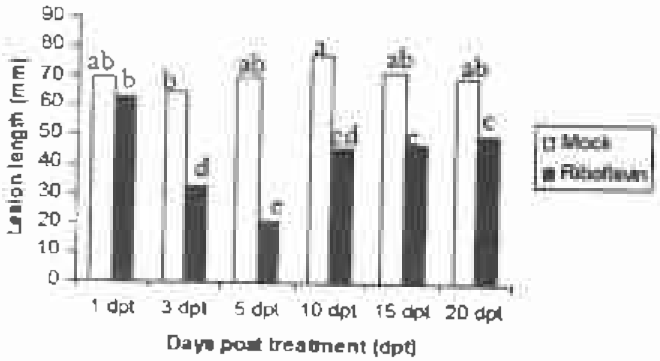
Riboflavin concentration (μM)	*R. solani* colony diameter (cm)	*R. oryzae-sativae* colony diameter (cm)
0	8.2 ± 0.1	4.9 ± 0.2
0.1	8.2 ± 0.2	5.1 ± 0.1
1	8.1 ± 0.4	5.0 ± 0.1
10	8.3 ± 0.1	4.9 ± 0.3
100	8.0 ± 0.3	5.0 ± 0.2
1000	8.2 ± 0.1	4.8 ± 0.5
5000	8.0 ± 0.2	5.1 ± 0.1

جدول ۱- بررسی اثر غلظتهای مختلف ریبوفلاوین بر رشد قارچهای خاکزاد نکروتروف مورد بررسی در محیط کشت PDA.

مشاهده عدم وجود هیچگونه اثر مستقیمی از ریبوفلاوین بر روی رشد قارچ ها در محیط کشت (جدول ۱) و عدم ایجاد گیاه سوزی و مرگ سلولی در برنج در غلظت های مورد بررسی(شکل ۲) نشانگر این است که ریبوفلاوین دارای شرایط لازم برای یک ماده شیمیایی فعال کننده پاسخهای دفاعی گیاه می باشد (9).
این نتایج دارای تطابق با گزارش دانگ و بیر(7) در مورد استفاده از ریبوفلاوین بعنوان فعال کننده سیستم دفاعی گیاهان دو لپه ای نظیر آرابیدوپسیس و تنباکو علیه عوامل بیماریزای مختلف بدون تاثیر مستقیم به عوامل بیماریزا و یا اثر سوء بر روی گیاه می باشد.

ارتباط طول مدت دوام مقاومت القایی ایجاد شده توسط ریبوفلاوین با بیان ژن دفاعی پراکسیداز کاتیونی در گیاه برنج:

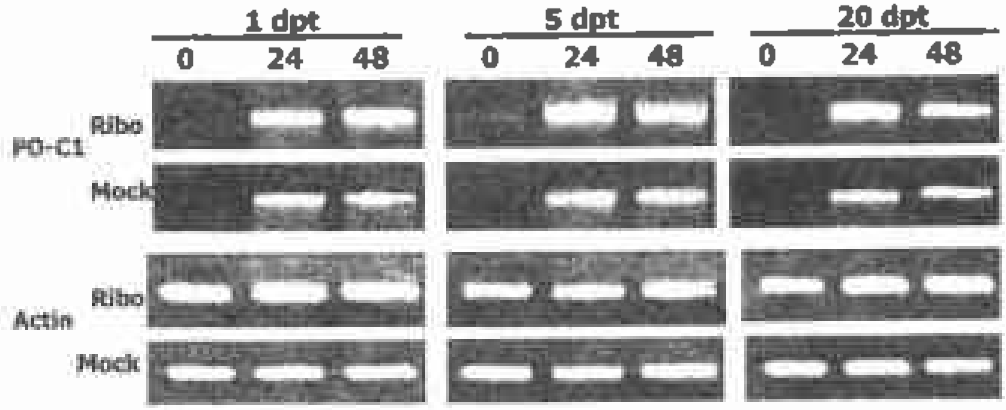
برای ارزیابی طول مدت دوام مقاومت القایی ناشی از کاربرد ریبوفلاوین، گیاهان برنج در زمانهای مختلف پس از تیمار با ریبوفلاوین، با *R. solani* مایه زنی شدند. با توجه به شکل ۳، مقاومت القایی ناشی از ریبوفلاوین تا بیش از بیست روز دوام دارد. بهترین تاثیر ریبوفلاوین در حفاظت از گیاهان، در گیاهان مایه زنی شده در روز پنجم پس از تیمار با ریبوفلاوین مشاهده گردید که نشان دهنده لزوم وجود فاصله زمانی بین تیمار با ریبوفلاوین و مایه زنی عامل بیماریزا برای تحریک سیستم دفاعی گیاه توسط ریبوفلاوین و کاهش شدت پیشرفت بیماری می باشد. کاهش مقاومت القایی ناشی از ریبوفلاوین در گیاهان مایه زنی شده در روز دهم پس از تیمار با ریبوفلاوین مشاهده گردید، اما هنوز تیمار با ریبوفلاوین برای حفاظت از گیاه در برابر آلودگی به *R. solani* (تا بیش از بیست روز پس از تیمار) موثر بود.



شکل ۳- پیشرفت بیماری سوختگی غلاف برنج بر روی گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین یک میکرومولار و یا کنترل -مایه زنی در روزهای مختلف پس از تیمار انجام شد. تعداد تکرارها و روش آنالیز آماری داده ها مطابق موارد ذکر شده برای شکل ۱ می باشد.

بنابراین، بررسی تاثیر ریبوفلاوین بر روی بیان ژنهای دفاعی عمده گیاه برنج در زمانهای مختلف پس از تیمار بمنظور ارزیابی مکانیسم های دخیل در ایجاد مقاومت القایی توسط ریبوفلاوین در تعامل بین برنج و رایزوکتونیا مهم و ضروری می باشد. بیان ژن پراکسیداز کاتیونی در برنج (PO-C1) که می تواند در تولید سدهای دفاعی گیاه در برابر عوامل بیماریزا و یا در ایجاد رادیکالهای اکسیژن و ایجاد واکنش فوق حساسیت دخیل باشد، بررسی گردید.

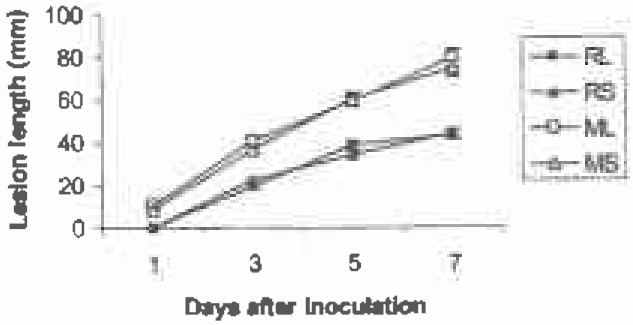
افزایش بیان ژن مورد بررسی در گیاهان برنج پس از مایه زنی با *R. solani* مشاهده شد که نشانگر دخالت این ژن دفاعی در مقاومت پایه گیاه برنج علیه این عامل بیماریزا میباشد. میزان بیان ژن PO-C1 در گیاهان مایه زنی شده در روز پنجم پس از تیمار با ریبوفلاوین در مقایسه با گیاهان کنترل اندکی بیشتر بود. آنالیز ترانسکریپتوم تفاوتهای قابل توجهی را در بیان PAL در زمانهای مختلف پس از مایه زنی در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با کنترل نشان نداد.



شکل ۴- بررسی بیان ژن دفاعی PO-C1، در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین ویا کنترل (Mock) و مایه زنی شده در روزهای اول، پنجم و بیستم پس از تیمار(days post treatment;dpt). ژن Actin بعنوان کنترل در واکنش های RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد.

ارتباط اثرات سیستمیک ریبوفلاوین با افزایش بیان ژن PO-C1 :

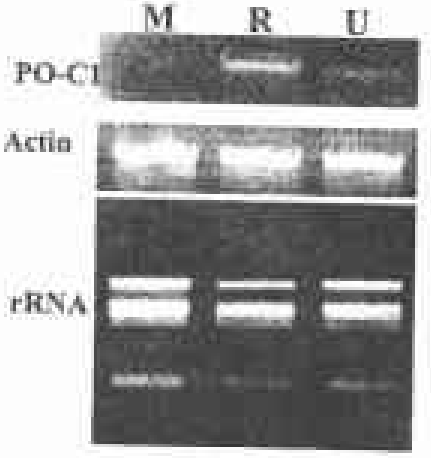
بمنظور بررسی امکان سیستمیک بودن مقاومت القایی ناشی از کاربرد ریبوفلاوین، این ویتامین فقط بر روی برگهای پایینی گیاهان برنج اسپری گردید. مایه زنی *R. solani* به برگهای تیمار شده و یا تیمار نشده بالایی نشان داد که مقاومت القایی ناشی از ریبوفلاوین بطور سیستمیک در سرتاسر گیاه پیشرفت می نماید، چراکه تفاوت معنی داری در طول زخمهای ناشی از عامل بیماری سوختگی غلاف در برگهای تیمار شده در مقایسه با برگهای تیمار نشده در زمانهای مختلف پس از مایه زنی مشاهده نگردید (شکل ۵).



شکل ۵- اثر سیستمیک ریبوفلاوین در القاء مقاومت در برنج علیه *R. solani*

در آزمایشاتRT-PCR افزایش قابل ملاحظه بیان ژن PO-C1 هم در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین (Riboflavin-treated; R) و هم در نمونه های مربوط به برگهای بالاتر تیمار نشده (Untreated; U) در زمان شش روز پس از مایه زنی مشاهده شد، اما این سطح از بیان ژنها برای نمونه های کنترل مشاهده

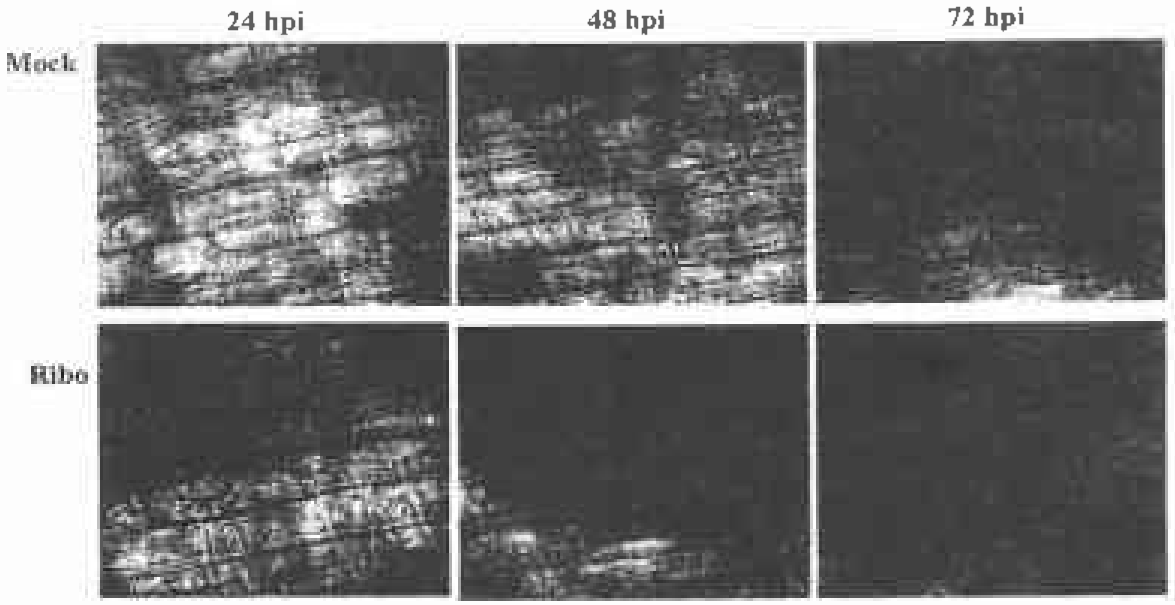
نگردید (شکل ۶). این نتایج نشانگر آن است که ریبوفلاوین در افزایش و تسریع و تقویت پاسخهای دفاعی گیاه که می توانند به بخشهای تیمار نشده گیاه نیز انتقال یابند موثر می باشد.



شکل ۶- اثر ریبوفلاوین بر روی بیان ژنهای دفاعی گیاه در برگهای پایینی تیمار شده با ریبوفلاوین (R) و برگهای بالایی تیمار نشده (U) در مقایسه با کنترل (M). آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد.

ایجاد مقاومت سیستمیک، همچنین افزایش سیستمیک بیان ژنهای دفاعی در گیاهان تیمار شده با ریبوفلاوین نشانگر توانایی این ویتامین در فعال سازی سیگنال های دفاعی گیاه و در نتیجه تحریک ایجاد مقاومت در برنج علیه *R. solani* بود، همانطور که ایجاد مقاومت توسط ریبوفلاوین قبلا در دولبه ای ها گزارش شده است (7).

سنجش کیفیت و کمیت تولید لیگنین در سلولهای گیاهی:
بررسی کیفیت تولید لیگنین بکمک روش رنگ آمیزی فلوروگلوسینول/اسید کلریدریک که منجر به مشاهده رنگ قرمز مایل به قهوه ای در سلولهای لیگنینی شده می گردد، انجام شد. بطور کلی، سرعت وشدت تولید لیگنین در سلولهای تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با کنترل در زمانهای مختلف پس از مایه زنی با پاتوژن بیشتر بود (شکل 7).
نتایج آزمون تیوگلیکولیک اسید انجام شده بمنظور تعیین دقیق میزان تولید لیگنین، نشانگر افزایش لیگنینی شدن سلولهای تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با کنترل بود (داده ها ارائه نشده اند). این نتایج در ارتباط با افزایش مقاومت گیاهان تیمار شده با این ویتامین علیه گونه های رایزوکتونیای بیماریزا میباشد و بیانگر نقش لیگنین در جلوگیری از پیشرفت بیشتر پاتوژن در گیاه و در نتیجه کاهش شدت بیماری است.
بطور خلاصه، یافته های حاصل از این تحقیق نقش نوینی را برای ریبوفلاوین در فعال سازی سیستمیک پاسخهای دفاعی گیاه تشریح می نماید. کاربرد ریبوفلاوین موجب مقاوم شدن سیستمیک گیاهان برنج از طریق افزایش بیان ژن دفاعی PO-C1 و افزایش سرعت وشدت تولید لیگنین در سلولهای گیاه شد.



شکل 7- افزایش سرعت و شدت تولید لیگنین در سلولهای گیاه برنج تیمار شده با ریبوفلاوین در مقایسه با کنترل در زمانهای مختلف پس از مایه زنی با *R. solani* عامل بیماری سوختگی غلاف.

این نتایج نشانگر نقش عمده ژن پراکسیداز کاتیونی دخیل در تولید لیگنین (بعنوان یکی از سدهای دفاعی اصلی گیاه در برابر عامل بیماریزا) در مقاومت القایی ناشی از ریبوفلاوین در تعامل بین گیاه برنج و قارچ نکروتروف رایزوکتونیا باشد. کارآیی ریبوفلاوین در تحریک ایجاد مقاومت در گیاه برای بیش از بیست روز پس از تیمار، نشانگر این است که ریبوفلاوین یک فعال کننده موثر سیستم دفاعی گیاه است که در مقایسه با سایر عوامل محرک سیستم دفاعی گیاه، مقاومت القایی با دوام تری ایجاد می نماید. همراه با استراتژی های متداول برای کنترل بیماری های رایزوکتونیایی برنج نظیر استفاده از واریته های نسبتا مقاوم، کاربرد ریبوفلاوین می تواند یک روش نوین و بی خطر برای محیط زیست باشد که موجب تقویت مکانیسم های دفاعی گیاه و نهایتا کاهش شدت بیماری و خسارت حاصل از آن می گردد.

منابع:

1. Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., and Hofte, M. 2002. Induction of systemic resistance to Botrytis cinerea in tomato by Pseudomonas aeruginosa 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. Mol. Plant-Microbe Interact. 15:1147-1156.
2. Aver'yanov, A. A., Lapikova, V. P., Nikolaev, O. N., Stepanov, A. I. 2000. Active oxygen-associated control of rice blast disease by riboflavin and roseoflavin. Biochem. Moscow 65:1292-1298.
3. Blee, E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. Trends Plant Sci. 7:315-321.
4. Bowling, S. A., Clarke, J. D., Liu, Y. D., Klessig, D. F., Dong, X. N. 1997. The cpr5

mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. Plant Cell 9:1573-1584.

5. Campbell, M. M., and Ellis, B. E. 1992. Fungal elicitor mediated responses in pine cell cultures.1. Induction of phenylpropanoid metabolism. Planta 186:409-417.
6. Dasgupta, K. 1992. Rice sheath blight: the challenge continues, in: V.S. Singh, A. Mukhopadhyay, J. Kumar, A.S. Chambe (Eds.), Plant Diseases of International Importance, Diseases of Cereals and Pulses, vol. 1, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.
7. Dong, H., and Beer, S. V. 2000. Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. Phytopathology 90:801-811.
8. Hamiduzzaman, M. M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J. M., and Mauch-Mani, B. 2005. Beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:819-829.
9 Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J.,Ward, E., Uknes, S., and Ryals, J. 1994. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. Ann. Rev. Plant Pathol. 32:439–459.
10. Kumar, K. K., Poovannan, K., Nandakumar, R., Thamilarasi, K., Geetha, C., Jayashree, N., Kokiladevi, E., Raja, J. A. J., Samiyappan, R., Sudhakar, D., and Balasubramanian, P. 2003. A high throughput functional expression assay system for a defence gene conferring transgenic resistance on rice against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. Plant Sci. 165:969-976.
11. Mauch-Mani, B., and Slusarenko, A. J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. Plant Cell 8:203-212.
12. Mondal, A. H., Nehl, D. B., and Allen, S. J. 2005. Acibenzolar-S-methyl induces systemic resistance in cotton against black root rot caused by *Thielaviopsis basicola*. Aust. Plant Pathol. 34:499-507.
13. Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B., and Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. Eur. J. plant Pathol. 107:19-28.
14. Singh, A., Rohilla, R., Singh, U. S., Savary, S., Willocquet, L., Duveiller, E. 2002. An improved inoculation technique for sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Can. J. Plant Pathol. 24:65-68.
15. Sticher, L., MauchMani, B., and Metraux, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. Ann. Rev. Phytopathol. 35: 235-270.
16. Suo, Y., Leung, D. W. N. 2001. Induction of resistance to *Diplocarpon rosae* and *Agrobacterium tumefaciens* by acibenzolar-S-methyl (BTH) in rose. J. Plant Dis. Protec. 108:382-391.
17. Taheri, P., Gnanamanickam, S., and Höfte, M. 2007. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases. Phytopathology 97:373-383.
18. Van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J., and Ton, J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:5602-5607.
19. Yin, Z. C., Chen, J., Zeng, L. R., Goh, M. L., Leung, H., Khush, G. S., and Wang, G. L. 2000. Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with