نشریه علوم باغبانی ایران
دوره ۴۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳ (ص۱۳۶-۱۲۷)

بررسی تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و فنل‌کل در برخی ارقام گلابی آلوده‌شده به بیماری آتشک

علی عبادی[1*]، جواد عرفانی[2]، حمید عبداللهی[3] و محمدرضا فتاحی مقدم[4]
۱ و ۴. استاد و دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۲. دانشجوی سابق دکتری پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و استادیار دانشگاه ایلام
۳. دانشیار بخش باغبانی مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۱۰ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۲/۵)

چکیده

بیماری آتشک یکی از بیماری‌های مخرب گیاهان در زیرخانوادهٔ *Pomoideae* از خانوادهٔ رزاسه است که توسط باکتری *Erwinia amylovora* القا می‌شود. هدف از این پژوهش، تعیین سطوح مقاومت در ۳۰ رقم گلابی و بررسی تغییرات بیوشیمیایی القاشده در برخی ارقام مقاوم و حساس با مایه‌زنی ترکیبی از ۴ سویه باکتری *E. amylovora* بود. ارزیابی مقاومت براساس درصد نسبت پیشرفت بیماری آتشک در شاخه به کل طول شاخه انجام شد. درنهایت ارقام درگزی و هاروسوئیت به‌عنوان خیلی‌مقاوم، رقم بارتلت، حساس و رقم محمدعلی، خیلی‌حساس برای ارزیابی بیوشیمیایی انتخاب شدند. برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گوایکول پراکسیداز (POX) و مقدار فنل‌کل در روزهای صفر (قبل از آلودگی) ۳، ۶ و ۱۲ روز بعد از مایه‌زنی با باکتری، به‌منظور تعیین نقش آنها در مکانیزم مقاومت بعد از حملهٔ پاتوژن انتخاب شدند. فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در ارقام خیلی‌مقاوم اختلاف معناداری در مقایسه با ارقام حساس در طول دورهٔ تلقیح داشت و در روز ششم بعد از تلقیح به حداکثر خود رسید. فعالیت آنزیم گوایکول پراکسیداز در ارقام خیلی مقاوم تا روز سوم بعد از مایه‌زنی افزایش یافت، ولی در روز ششم نسبت به ارقام حساس هم کمتر شد. حملهٔ پاتوژن همچنین سبب افزایش در مقدار فنل‌کل در همهٔ ارقام آلوده‌شده گردید اما تفاوت معناداری بین آنها مشاهده شد.

واژه های کلیدی: آنزیم آنتی‌اکسیدانت، ارقام مقاوم، بیماری آتشک، فنل‌کل، گلابی.

مقدمه

بیماری آتشک یکی از بیماری‌های مخرب گیاهان در زیرخانوادهٔ *Pomoideae* از خانوادهٔ رزاسه به‌خصوص سیب (*Malus* spp.) و گلابی (*pyrus* spp.) است. بیماری آتشک توسط باکتری *Erwinia amylovora* القا می‌شود و یکی از بیماری‌های بسیار خطرناک در نواحی معتدله در سراسر جهان است (Vanneste, 2000). ورود باکتری به داخل گیاه اغلب از طریق گل‌ها یا زخم‌های موجود در برگ و شاخه‌ها انجام شد. در ارقام حساس تکثیر و پیشرفت باکتری در سلول‌های پارانشیم انجام می‌شود و به دنبال آن بافت نکروز می‌شود و گسترش پیدا می‌کند، درحالی‌که در ارقام مقاوم بافت نکروز در نقطهٔ آلوده‌شده محدود و متوقف می‌شود (Venisse *et al*., 2002). واکنش‌های مختلفی در گیاهان بر اثر حملهٔ پاتوژن وجود دارد. همهٔ آنها می‌توانند حملهٔ پاتوژن را تشخیص دهند (Clarke *et al*., 2000; Delledonne *et al*., 1998). بعد از تشخیص باکتری گیاهان دامنه‌ای از واکنش دفاعی را از خود نشان می‌دهند. در سلول‌های ابتدایی نقاط آلوده‌شده، مولکول‌های اکسیژن فعال با سرعت زیادی تولید می‌شود. همچنین مولکول‌های لیپید پراکسیده و به‌صورت ذرات یونی پخش می‌شوند (Venisse *et al*., 2001). برخی گیاهان برای جلوگیری از پیشرفت باکتری یک واکنش فوق حساسیت از خود نشان می‌دهند چنان‌که مقدار زیادی رادیکال‌های آزاد

تلفن: ۰۹۱۲۵۶۷۷۵۲۱
E-mail: aebadi@ut.ac.ir

اکسیژن در نقاط آلوده‌شده تولید و سبب مرگ سلول‌های اطراف می‌شود (Tenhaken, 1995). به دنبال این واکنش یک مقاومت اکتسابی (LAR) در سلول‌های مجاور نقاط آلوده‌شده اتفاق می‌افتد که بر اثر آن دیواره‌های سلولی تقویت می‌شوند، تجمع phytoalexins روی می‌دهد و پروتئین‌های مختلف دفاعی ازجمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پروتئین‌های pathogenesis-related (PR) فعال می‌شوند (Somssich & Hahlbrock, 1998; Van Loon *et al*., 2006). در بسیاری موارد تنش سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌شود (Foyer *et al*., 1994). ROSها در بسیاری از فرایندهای مهم گیاهی فعالیت دارند (Elstner *et al*., 1994). رادیکال‌های آزاد اکسیژن توانایی القای پراکسیده‌شدن لیپیدها را دارند (Halliwel & Gutteridge, 1989) که اخیراً Venisse *et al*. (2001) نشان دادند که عامل بیماری آتشک (*E. amylovora*) مانند برخی باکتری‌های بیگانه به‌عنوان مثال *Pseudomonas syringae* در تنباکو، در ارقام حساس هم سبب ایجاد رادیکال آزاد در سلول‌ها می‌شود (پراکسیده‌شدن لیپیدها و فعال‌شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی) که نقش تخریبی در گیاه دارند.

در بسیاری از گیاهان میزبان، مقاومت علیه انواع مختلف قارچ و باکتری در ارتباط با تولید ترکیبات فنلی است (Snyder & Nicholson, 1990). نقش ترکیبات ثانویه در القای مقاومت علیه بیماری آتشک در بین ارقام گلابی بیان شده است. ارتباط میان مقاومت به بیماری آتشک و انتشار ترکیبات خاص یا افزایش سطح ترکیبات فنلی توسط Bell *et al*. (2003) گزارش شده است. در سیب ارتباط بین سطح فنل‌کل و مقاومت علیه بیماری آتشک گزارش شده است. این مطالعات نشان می‌دهد که تجمع ترکیبات فنلی و فنل‌های ساده، بازدارندهٔ حرکت باکتری *E. amylovora* در سلول‌های گیاهان میزبان است (Bell *et al*., 2003). تا کنون اطلاعات کمی در ارتباط با مقاومت به بیماری آتشک در بین ارقامی که در ایران کشت‌وکار می‌شوند، وجود دارد. بنابراین، هدف از این مطالعه غربال‌کردن اولیه ارقام علیه بیماری آتشک و به دنبال آن بررسی تغییرات بیوشیمیایی بود که در بافت‌های گیاهان میزبان بعد از حملهٔ پاتوژن ایجاد می‌شود.

سبب تخریب دیواره‌های سلولی می‌شود. در شرایط طبیعی رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و سایر واکنش‌های متابولیکی غیرآنزیمی مانند ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی و پروتئین‌ها، به‌سرعت در سلول تجزیه می‌شوند (Kovtun *et al*., 2000; Lim *et al*., 1993). آزادشدن رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش مستلزم این است که برخی واکنش‌های دفاعی در گیاه فعال شود (Doke, 1997). برای جلوگیری از خسارت سلولی، سلول‌های گیاهان چندین واکنش آنزیمی و غیرآنزیمی برای حذف‌کردن رادیکال‌های آزاد از سلول‌ها را دارند. از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، سوپراکسی دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز را می‌توان نام برد (Noctor & Foyer, 1998; Mittler, 2002).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، مقاومت ۳۰ رقم گلابی اروپایی و آسیایی در شرایط گلخانه با ترکیبی از چهار سویه *E. amylovora* (Z1, Z2, K1 and Ea273) مولد عامل بیماری آتشک ارزیابی شد. این باکتری‌ها قبلاً در آزمایش‌های مختلف بررسی شده و بیماری‌زایی آنها به اثبات رسیده بود. ارقام گلابی اروپایی و سویه‌های باکتری از مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج و ارقام گلابی آسیایی از دانشگاه تربیت مدرس تهیه شده است (جدول۱). در شهریور سال ۱۳۸۸ این ارقام بر روی پایهٔ گلابی رقم درگزی در نهالستان مؤسسهٔ پیوند و گیاهان در شرایط مزرعه در فصل بهار و تابستان ۱۳۸۹ رشد کردند. اواخر اسفند ۱۳۸۹ نهال‌های پیوندی به گلدان‌های ۲۰ کیلویی (45 cm x 35 cm x 25 cm) منتقل و به گلخانهٔ مؤسسه با فتوپریود معمولی، دمای (26±5°c) و رطوبت ۷۰-۸۵درصد دارای سیستم خنک‌کننده و رطوبت‌ساز انتقال داده شدند. برای تحریک رشد فرعی جوانه‌ها، سرشاخه‌ها در ارتفاع ۵۰ سانتی‌متری گیاه قطع و نهال‌ها تقریباً به‌مدت ۶۵ روز در این شرایط نگهداری شدند تا شاخه‌های جدید به اندازهٔ ۲۵ تا ۳۵ سانتی‌متر رشد کنند. نهال‌ها اواخر اردیبهشت سال ۱۳۹۰ برای القای باکتری آماده شدند. در این پژوهش از طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و ۹ نهال برای هر رقم استفاده شد.

در هر گلدان ۳ نهال و برای هر نهال ۳ شاخه انتخاب شدند. در هر گلدان ۲ نهال با باکتری آلوده و یک نهال به‌منزلهٔ شاهد در نظر گرفته شد که آب مقطر به آن تزریق شد.

آماده‌سازی باکتری *E. amylovora*

چهار سویهٔ *E. amylovora* (Z1, Z2, K1 and Ea273) مولد عامل بیماری آتشک که همهٔ آنها به غیر از Ea273 از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده بودند، در این پژوهش استفاده شدند. سویهٔ Ea273 بسیار بیماری‌زا و در کشور آمریکا شناسایی شد. باکتری‌ها به‌طور جداگانه در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر به‌مدت یک شب در محیط کشت مایع LB کشت و بعد از سانتریفیوژ با یکدیگر ترکیب و درنهایت با غلظت $۱۰^{۸}$ (CFU/mL) در آب مقطر حل و برای مایه‌زنی استفاده شد. برای تزریق تقریباً ۰/۵ میلی‌لیتر از مخلوط باکتری توسط سرنگ در دو روز متوالی در جوانهٔ انتهایی سرشاخه‌ها تزریق شد. بلافاصله بعد از تزریق باکتری، سرشاخه‌ها با آب مقطر توسط مه‌پاش آب‌پاشی شد. علاوه بر این به‌منظور تأمین رطوبت کافی در گلخانه، کف گلخانه به‌مدت ۲۰ روز بعد از القای باکتری در چند نوبت در طول روز آبیاری شد. ارزیابی مقاومت براساس صفت سرعت پیشرفت نکروز و شاخص حساسیت واریته‌ای (I.V.S.) که به‌صورت نسبت طول منطقهٔ نکروزه‌شده به طول کل شاخه بود، محاسبه شد. ارزیابی آلودگی در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۸ روز بعد از تلقیح باکتری انجام شد.

ارزیابی بیوشیمیایی

برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گوآیکول پراکسیداز به همراه فنل‌کل در برگ نهال‌های کنترل و تیمار شده درگزی و هاروسوئیت به‌عنوان ارقام خیلی‌مقاوم، رقم حساس بارتلت و رقم خیلی‌حساس محمدعلی در روزهای صفر (قبل از آلودگی) ۳، ۶ و ۱۲ روز بعد از مایه‌زنی در گروه باغبانی دانشگاه تهران و آزمایشگاه مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال بذر اندازه‌گیری شد. به‌منظور استخراج این ترکیبات، نمونهٔ برگ از زیر نقطهٔ آلوده‌شده در گیاهان مذکور جمع‌آوری و بلافاصله در داخل نیتروژن مایع قرار گرفتند و در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. استخراج آنزیم‌های مذکور براساس روش Zhang *et al.* (2009) با کمی تغییر انجام شد. برای استخراج کاتالاز و گوایکول پراکسیداز، ۱ گرم از نمونه برگ در نیتروژن مایع پودر و سپس به ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (۰/۱ مولار فسفات سدیم (pH=7)، ۱ میلی‌مولار EDTA و ۱۰۰ میلی‌گرم PVPP) منتقل شد. سپس این محلول در سانتریفیوژ یخچال‌دار به‌مدت ۲۰ دقیقه در دور ۹۵۰۰ و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ و روشناور به فالکون جدید منتقل و برای اندازه‌گیری کاتالاز و گوایکول پرکسیداز به کار رفت. برای اندازه‌گیری کاتالاز، واکنش با اضافه‌کردن ۲۰۰ میکرولیتر از عصارهٔ استخراج‌شده به ۲/۵ میلی‌لیتر از ترکیب واکنشی شامل ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱درصد و ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر ۰/۰۵ مولار فسفات سدیم (pH=7) آغاز شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در طول موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه با اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری آنزیم گوایکول پراکسیداز، ۱/۴ میلی‌لیتر از بافر ۰/۰۵ مولار فسفات سدیم (pH=7) به‌علاوه ۸۰۰ میکرولیتر گوایکول ۲درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱درصد در داخل کووت به‌مدت ۹ دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی به آن اضافه و فعالیت این آنزیم در طول موج ۴۷۰ نانومتر به‌مدت ۱ـ۳ دقیقه با دستگاه اسپکترفتومتر قرائت شد.

برای استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز، ۱ گرم نمونه برگ در نیتروژن مایع پودر و ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج این آنزیم (۰/۰۵ مولار فسفات سدیم (pH=7)، ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱۰۰ میلی‌گرم PVPP و ۰/۵ میلی‌مولار اسید آسکوربیک) به آن اضافه شد. سپس این محلول در سانتریفیوژ یخچال‌دار به‌مدت ۲۰ دقیقه در دور ۹۵۰۰ و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ و روشناور به فالکون جدید منتقل و برای اندازه‌گیری آسکوربات پرکسیداز استفاده شد. برای تعیین فعالیت این آنزیم، ۲ میلی‌لیتر از بافر واکنش شامل ۰/۰۵ مولار فسفات سدیم (pH=7)، ۱ میلی‌مولار EDTA و ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک به همراه ۲۰۰ میکرولیتر از عصارهٔ آنزیمی استفاده شد. واکنش با اضافه‌شدن ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۱۵درصد آغاز و فعالیت

آنزیم آسکوربات پراکسیداز در طول موج ۲۹۰ نانومتر به‌مدت ۱ دقیقه با اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای تمامی آنزیم‌های فوق تغییرات واکنشی براساس OD مشاهده‌شده قرائت و ثبت شد. مقدار فنل‌کل براساس روش Gao (2000) به دست آمد. ۱ گرم نمونهٔ برگ در نیتروژن مایع پودر و در ۱۰ میلی‌لیتر محلول متانول ۸۰درصد حل و سپس این محلول در سانتریفیوژ یخچال‌دار به‌مدت ۳۰ دقیقه در دور ۹۵۰۰ و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ و روشناور به فالکون جدید منتقل شد. محلول به‌دست‌آمده در دمای ۶۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه و سپس ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰درصد به آن اضافه شد. برای اندازه‌گیری فنل، ۲۰۰ میکرولیتر از این عصارهٔ متانولی با ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین شکلاتی و ۰/۷۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰درصد به‌مدت ۱ ساعت انکوبه شد. مقدار فنل‌کل با اسپکترفتومتری در طول موج ۷۶۷ نانومتر قرائت شد. متانول به‌منزلهٔ بلانک محلول و اسید گالیک (۰ـ ۵ میلی‌گرم) به‌منزلهٔ استاندارد در نظر گرفته شد. مقدار فنل‌کل براساس میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم مادهٔ گیاهی بیان شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با برنامهٔ Excel و نرم‌افزار SAS انجام شد و برای تجزیهٔ واریانس از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد.

جدول۱. ارقام استفاده‌شده در ارزیابی مقاومت به بیماری آتشک

کد رقم	رقم	گونه	کد رقم	رقم	گونه
۱	Beurre Diel	*P. communis*	۱۶	Beurre Hardy	*P. communis*
۲	Spadona	*P. communis*	۱۷	KS6*	*P. serotina*
۳	فلسطینی	*P. communis*	۱۸	KS9*	*P. serotina*
۴	Bartlett	*P. communis*	۱۹	KS7*	*P. serotina*
۵	سیف تبریز	*P. communis*	۲۰	محمدعلی	*P. communis*
۶	Harrow Sweet	*P. communis*	۲۱	Bulghar No. II	*P. communis*
۷	Passe Crassane	*P. communis*	۲۲	بیروتی	*P. communis*
۸	Packhams Triumph	*P. communis*	۲۳	نطنزی	*P. communis*
۹	درگزی	*P. communis*	۲۴	دم‌کج سبز	*P. communis*
۱۰	Alvert	*P. communis*	۲۵	Louise Bonne	*P. communis*
۱۱	Beurre d' Amanlis	*P. communis*	۲۶	KS8*	*P. serotina*
۱۲	نامشخص ۳	*P. communis*	۲۷	Doyenne du Comice	*P. communis*
۱۳	نامشخص ۱	*P. communis*	۲۸	نامشخص ۲	*P. communis*
۱۴	شاهک	*P. communis*	۲۹	شاه‌میوه	*P. communis*
۱۵	Duchesse	*P. communis*	۳۰	Coscia	*P. communis*

* ارقام گلابی ژاپنی مربوط به پروژهٔ ملی گلابی آسیایی است که در دانشگاه تربیت مدرس در حال اجراست.

نتایج و بحث

بعد از القای باکتری بروز علائم آلودگی در سرشاخه‌ها نشان‌دهندهٔ موفقیت کار بود. علائم بیماری مانند بافت پژمرده و نکروزه در برگ‌ها و نوک ساقهٔ ارقام حساس مشاهده شد درحالی‌که هیچ نشانه‌ای از آلودگی در ارقام خیلی‌مقاوم قابل مشاهده نبود. اولین علائم آلودگی در روز سوم در ارقام بسیارحساس مانند محمدعلی، KS6 و دوشس شناسایی شد اما در بیشتر ارقام به غیر از درگزی، هاروسوئیت و نطنزی، علائم اولیهٔ آلودگی در روز ششم شناسایی و ثبت شد. در ارقام هاروسوئیت و نطنزی علائم بسیار کمی از پیشرفت بیماری در روز ۱۲ مشخص شد اما هیچ پیشرفتی از بیماری در رقم درگزی حتی در روز ۱۸ شناسایی نشد و در این مطالعه به‌عنوان یکی از بهترین ارقام برای مقاومت به بیماری آتشک بود. علائم پیشرفت بیماری در ارقام محمدعلی، دوشس، هاروسوئیت و درگزی در روز ۱۲ در شکل ۱ نشان داده شده است.

تجزیهٔ واریانس مقاومت به بیماری آتشک، تفاوت معناداری را بین ارقام نشان داد (شکل۲). ارقام مختلف گلابی سطوح مختلفی از مقاومت را در برابر این بیماری از ۰/۴درصد تا ۱۰۰درصد از خود نشان دادند. در این مطالعه ارقام به ۴ گروه از خیلی‌حساس تا خیلی‌مقاوم

تقسیم شدند. پیشرفت بیماری در ارقام خیلی‌حساس ۸۱ـ ۱۰۰ درصد، در ارقام حساس ۵۱ـ ۸۰ درصد، ارقام نیمه‌مقاوم ۱۱-۵۰ درصد و ارقام خیلی‌مقاوم صفر تا ۱۰درصد بود که این تقسیم‌بندی براساس درصد پیشرفت نکروز در کل شاخه صورت گرفت. ۳ رقم شامل درگزی، هاروسوئیت و نطنزی به‌عنوان ارقام خیلی مقاوم، ۱۴ رقم نیمه‌مقاوم، ۱۰ رقم حساس و ۳ رقم محمدعلی، دوشس و رقم ژاپنی KS6 به‌عنوان ارقام خیلی‌حساس شناسایی شدند (شکل۲). تمامی طول شاخه در ارقام خیلی‌حساس در روز ۱۸ بر اثر پیشرفت باکتری آلوده شد و از بین رفت. گزارش‌های متعددی روی حساسیت و یا مقاومت نسبت به باکتری *E. amylovora* در بسیاری از گیاهان میزبان این باکتری به‌عنوان مثال در سیب (Korba *et al*., 2008; Gardner *et al*., 1980)، گلابی (Korba & Kudela, 2004; Oitto *et al*., 1970)، گلابی و به (Bell, 2004)، تمشک سیاه (Stewart *et al*., 2003) و تمشک قرمز (Ries & Otterbacher, 1977) منتشر شده است. آنها نشان دادند سطوح مختلفی از مقاومت در بین گیاهان میزبان وجود دارد.

رقم درگزی رقم هاروسوئیت رقم محمد علی رقم دوشس

شکل۱. علائم آلودگی و میزان پیشرفت باکتری *E. amylovora* در ۴ رقم گلابی ۱۲ روز بعد از آلودگی

نتایج این پژوهش نشان داد که بین ارقام مطالعه‌شده سطوح مختلفی از مقاومت نسبت به بیماری آتشک وجود دارد که پتانسیل کافی برای استفاده از آنها در برنامهٔ اصلاح گلابی برای مقاومت به این بیماری و یا تولید گلابی در ایران را دارند. رقم درگزی در شرایط مزرعه هم درجهٔ بالایی از مقاومت نسبت به این بیماری دارد در صورتی که بسیاری از ارقام در شرایط مشابه تحت‌تأثیر بیماری آتشک قرار می‌گیرند. این رقم اغلب در شرق کشور کشت‌وکار می‌شود و به لحاظ کیفیت میوه در درجهٔ مطلوبی قرار ندارد اگرچه از بذر آن به‌منزلهٔ پایه برای سایر ارقام گلابی استفاده می‌شود. رقم درگزی همچنین می‌تواند به‌منزلهٔ یک والد برای انتقال ژن مقاومت در برنامه‌های اصلاح گلابی استفاده شود.

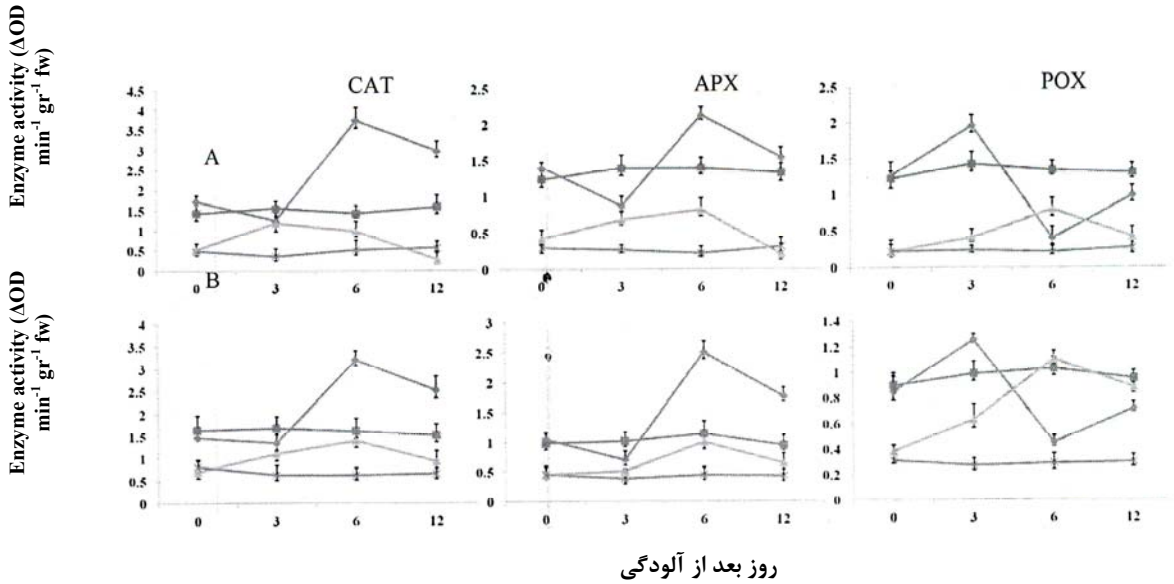
شکل۲. مقایسهٔ میانگین پیشرفت بیماری میان ۳۰ رقم گلابی

تغییرات بیوشیمیایی برگ در طول رشد باکتری

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گوایکول پراکسیداز به همراه مقدار فنل‌کل در چهار رقم درگزی، هاروسوئیت، محمدعلی و بارتلت اندازه‌گیری شدند.

نتایج نشان داد الگوی فعالیت آنزیمی یا تجمع فنل‌کل در دو گروه حساس و مقاوم روند مشابهی ندارد. در ارقام مقاوم فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز کاهش معناداری در روز سوم بعد از القای پاتوژن داشت اما در روز ششم به حداکثر خود رسید و بعد از آن تا روز ۱۲ به‌تدریج کم شد. در ارقام خیلی‌حساس محمدعلی و حساس بارتلت فعالیت این دو آنزیم بعد از القای آلودگی به‌تدریج تا روز ششم افزایش و بعد از آن تا روز ۱۲ کاهش یافت و در رقم محمدعلی در روز ۱۲ به کمتر از حد گیاه کنترل هم رسیده بود.

فعالیت آنزیم گوایکول پراکسیداز در ارقام مقاوم تا روز سوم بعد از القای باکتری افزایش ولی در روز ششم کاهش یافت و در این روز مقدار آن حتی از ارقام حساس هم کمتر شده بود ولی فعالیت این آنزیم تا روز ۱۲ افزایش و تقریباً به حالت تعادل رسید. این نکته جالب بود که سطح اولیه تمامی این آنزیم‌ها در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس بیشتر بود. تغییرات آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گوایکول پراکسیداز در ارقام خیلی‌مقاوم درگزی و هاروسوئیت، رقم حساس بارتلت و رقم خیلی‌حساس محمدعلی در شکل۳ مشخص شده است.



شکل۳. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گوایکول پراکسیداز (POX) در برگ ارقام درگزی و محمدعلی (ردیف A)، ارقام هاروسوئیت و بارتلت (ردیف B)، ارقام درگزی و هاروسوئیت خیلی‌مقاوم: تیمارشده ——◆—— کنترل ——■——، رقم خیلی‌حساس محمدعلی و رقم حساس بارتلت: تیمارشده ——▲—— کنترل ——×——

پژوهشگران مختلفی گزارش کردند که افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در ارتباط با مقاومت به تنش‌های مختلف است.

به‌عنوان مثال Naglaa *et al.* (2011) گزارش کردند فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ‌های آلوده‌شدهٔ گیاهان مقاوم کتان بر اثر حملهٔ عامل بیماری سفیدک پودری نسبت به ارقام حساس بیشتر است. همچنین Niebel *et al.* (1995) در گیاه سیب‌زمینی فعالیت آنزیم کاتالاز را تحت شرایط حملهٔ نماتد گزارش کردند. در این مطالعه فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ ارقام مقاوم درگزی و هاروسوئیت نسبت به ارقام حساس محمدعلی و بارتلت در روز ششم بعد از تلقیح بالاتر بود که اهمیت زیادی در القای مقاومت به بیماری آتشک دارد. این افزایش کاتالاز سبب حفاظت سلول‌های گیاهی در ارقام مقاوم در برابر

خسارات اکسیداتیو با حذف سریع رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود.

کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در روزهای اولیهٔ بعد از القای آلودگی در ارقام مقاوم درگزی و هاروسوئیت ممکن است سبب ایجاد یک واکنش فوق حساسیت در آنها شود. در ارقام مقاوم، واکنش فوق حساسیت یک واکنش دفاعی موضعی و سریع است که منجر به مرگ سلول‌های ناحیهٔ آلوده‌شده می‌شود و از پیشرفت باکتری و گسترش آلودگی جلوگیری می‌شود. گزارش‌های متعددی در زمینهٔ واکنش فوق حساسیت منتشرشده و واکنش‌هایی که در واکنش فوق حساسیت القا می‌شوند سبب بروز مقاومت می‌شود (Bent, 1996; Hammond & Jones, 1996; Durner *et al*., 1997). سالیسیلیک اسید یک نقش کلیدی در القای واکنش حساسیت و بروز مقاومت در برابر حملهٔ پاتوژن دارد (Hammond & Jones 1996; Durner *et al*., 1997). سالیسیلیک اسید درواقع یک بازدارندهٔ آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز است که این دو آنزیم نقش کلیدی در حذف رادیکال‌های آزاد ازجمله پراکسید هیدروژن دارند (Conrath *et al*., 1995; Durner & Klessing, 1995).

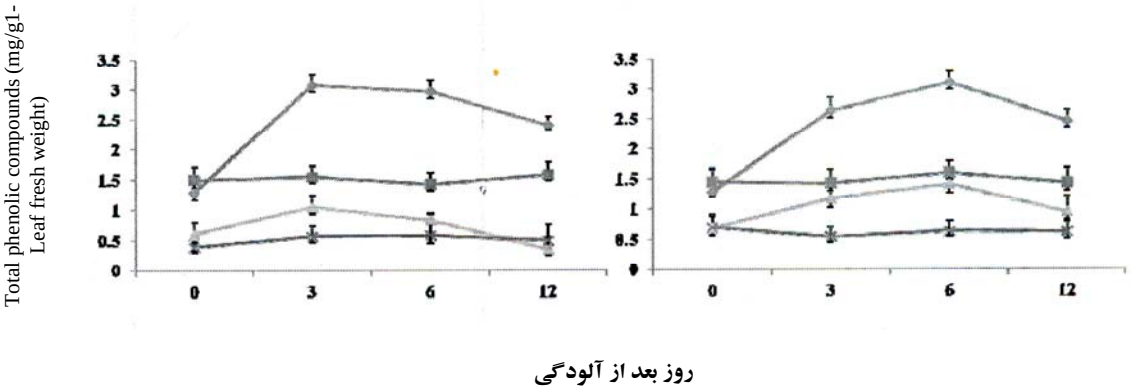
در ارقام درگزی و هاروسوئیت در روزهای اولیهٔ بعد از حملهٔ پاتوژن مقدار زیادی رادیکال آزاد ازجمله پراکسید هیدروژن تولید می‌شود و بازدارندگی آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز سبب ایجاد یک واکنش فوق حساسیت در آنها می‌شود که سبب القای مقاومت می‌شود. در ارقام خیلی‌حساس محمدعلی مقدار رادیکال آزاد بعد از حملهٔ پاتوژن بسیار بالاست اما سیستم دفاعی و آنتی‌اکسیدانی گیاه به‌علت پایین‌بودن آنزیم‌های درگیر، قادر به حذف آنها نیست و باکتری با سرعت در داخل گیاه پیشرفت و درنهایت سبب مرگ گیاه می‌شود.

فنل‌کل

در این پژوهش تفاوت معناداری در مقدار فنل‌کل در میان ارقام بعد از تیمار با باکتری مولد بیماری آتشک مشاهده شد. بعد از القای آلودگی سطح فنل‌کل در گیاهان تیمارشده نسبت به گیاهان شاهد بیشتر بود. مقدار فنل‌کل در ارقام مقاوم نسبت به گیاهان کنترل و ارقام حساس آلوده‌شده هم بیشتر بود. این تغییر و افزایش فنل‌کل بعد از آلودگی ثابت می‌کند که ترکیبات فنلی در القای مقاومت نقش مهمی دارند. در ارقام مقاوم در روز سوم بعد از آلودگی سطح فنل‌کل به‌طور معناداری در مقایسه با گیاه مقاوم کنترل افزایش یافت. در ارقام حساس محمدعلی و بارتلت افزایش موقتی در مقدار فنل‌کل در مقایسه با ارقام حساس شاهد ایجاد شد و بعد از آن کاهش یافت. در رقم مقاوم درگزی مقدار فنل‌کل بعد از افزایش در روز سوم، مقدار آن تا روز ششم تقریباً ثابت بود و بعد از روز ششم به‌تدریج کم شد. این نتایج نشان می‌دهد که سنتز ترکیبات فنلی بعد از حملهٔ پاتوژن تحریک می‌شود. تغییر در مقدار فنل‌کل در ارقام خیلی‌مقاوم درگزی و هاروسوئیت، رقم حساس بارتلت و رقم خیلی‌حساس محمدعلی در شکل۴ نشان داده شده است. گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد حملهٔ پاتوژن سبب تجمع ترکیبات فنلی در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس می‌شود. Roemmelt et al. (1999) گزارش کردند که تجمع ترکیبات فنلی در ارقام مقاوم به‌منزلهٔ یک سد شیمیایی در برابر حملهٔ باکتری *E. amylovora* عمل می‌کند و از پراکنش آن در داخل بافت جلوگیری می‌کند. اگرچه تجمع ترکیبات فنلی در ناحیهٔ آلوده‌شده مرتبط با محدودیت در انتشار پاتوژن است (Heath, 1980) همچنین اثرات سمی ترکیبات فنلی سبب مرگ باکتری و سایر میکروارگانیزم‌ها در داخل بافت گیاهی می‌شود. در گزارش‌های دیگری هم تجمع ترکیبات فنلی در ارقام مقاوم ثابت شده است (Goodman *et al*., 1986). مقاومت توسط استری‌شدن ترکیبات فنلی در دیوارهٔ سلولی ایجاد می‌شود (Nicholson, 1992). در مطالعات دیگر اکسیداسیون ترکیبات سادهٔ فنلی و تجمع آنها در نواحی آلوده‌شده است که سبب ایجاد مقاومت می‌شود (Bonhoff *et al*., 1987). در حالت کلی واکنش مقاومت گیاهان علیه حملهٔ پاتوژن بر اثر سنتز سریع ترکیبات فنلی یا پلیمریزه‌شدن آنها در دیوارهٔ سلولی است (Matern & Kneusel, 1988).

نتایج نشان داد تفاوت قابل توجهی میان ارقام مطالعه‌شده از نقطه‌نظر مقاومت به بیماری آتشک وجود دارد که پتانسیل خوبی برای تولید گلابی یا استفاده از

آنها در برنامهٔ اصلاح گلابی برای دستیابی به ارقام مقاوم با کیفیت مطلوب امکان‌پذیر می‌شود. در این پژوهش همچنین تغییراتی در سطوح آنتی‌اکسیدانت‌ها و فنل‌کل میان ارقام حساس و مقاوم مشاهده شد. نتایج نشان داد که حملهٔ باکتری عامل بیماری آتشک به‌منزلهٔ یک عامل بیگانه و ناسازگار توسط گیاه میزبان شناسایی و بعد از حملهٔ پاتوژن مقدار زیادی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های گیاهی تولید می‌شود. بااین‌حال تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن مستلزم فعال‌شدن سیستم‌های دفاعی گیاه میزبان است (Doke, 1997). همچنین فعال‌شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی در ارقام مقاوم از پیشرفت بیماری در این گیاهان جلوگیری می‌کند، اما در ارقام خیلی‌حساس و یا حساس مقدار رادیکال آزاد بعد از حملهٔ پاتوژن به‌سرعت بالا می‌رود و سیستم دفاعی و آنتی‌اکسیدانی گیاه به‌علت پایین‌بودن آنزیم‌های درگیر، قادر به حذف آنها نیست و باکتری با سرعت در داخل گیاه پیشرفت می‌کند و درنهایت سبب مرگ گیاه می‌شود.



شکل ۴. مقدار فنل کل در برگ ارقام درگزی و محمد علی(چپ)، ارقام هاروسوئیت و بارتلت(راست)، ارقام درگزی و هاروئیت خیلی مقاوم: تیمارشده ——◆—— کنترل ——■——، رقم خیلی‌حساس محمدعلی و رقم حساس بارتلت: تیمارشده ——▲—— کنترل ——✕——

سپاسگزاری

مواد گیاهی گلابی‌های ژاپنی از استاد گرامی جناب آقای دکتر ارزانی از دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد که نگارندگان کمال تقدیر و تشکر را از ایشان دارند. همچنین از آقای مهندس آتشکار به‌دلیل تکثیر آزمایشی این ارقام در مؤسسهٔ اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج تشکر می‌شود.

REFERENCES

1. Bell, A. C., Ranney, T. G., Danehower, D. A. & Eaker, T. A. (2003). Levels of endogenous phenolics in *Malus* taxa and their possible role in resistance to fire blight. *Sna Research Conference*, 48, 221-225.
2. Bell, A. C., Ranney, T. G., Eaker, T. A. & Sutton, T. B. (2004). Resistance to fire blight among flowering pears and quince. *HortScience*, 40, 413-415.
3. Bent A. F. (1996). Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell*, 8, 1757-1771.
4. Bonhoff, A., Rieth, B., Golecki, J. & Grisebach, H. (1987). Race cultivar-specific differences in callose deposition in soybean roots following infection with *Phytophthora megaperma* f. sp. glycinea. *Planta*, 172, 101-105.
5. Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R. D., Hancock, J. T. & Neill, S. (2000). No way back: nitric oxide and programmed cell death in Arabidopsis thaliana suspension cultures. *The Plant Journal*, 24, 667- 677.
6. Conrath, U., Chen Z. X., Ricigliano J. R. & Klessig D. F. (1995). Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 92, 7143-7147.
7. Delledonne, M., Xia, J., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394, 585-585.

8. Doke, N. (1997). *The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress in Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses* (ed.) J. G. Scandalios (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 785–813.
9. Durner, J. & Klessig, D. F. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 92, 11312-11316.
10. Durner, J., Shah, J. & Klessig D. F. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends-in-Plant-Science*, 2, 266-274.
11. Elstner, E. F., Schempp, H., Preibisch, G., hippeli, S. & Oswald, W. (1994). *Biological sources of free radicals*. In: Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology, 13-45.
12. Foyer, C. H., Lelandais, M. & Kunert, K. J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92, 696- 717.
13. Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Björk, L. & Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48,1485-90.
14. Gardner, R. G., Cummins, J. N. & Aldwinckle, H. S. (1980). Fire blight resistance in the Geneva apple rootstock breeding program. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 105, 907-912.
15. Goodman, R. N., Kiraly, Z., & Wood, K. R. (1986). *The Biochemistry and Physiology of Plant Diseases.* University of Missouri Press, Columbia, USA.
16. Halliwel, B. & Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free radicals in Biology and Medicine*, Claredon Press. Oxford.
17. Hammond, K. E. & Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8, 1773-1791.
18. Heath, M. C. (1980). Reactions of non susceptible to fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 18, 211-236.
19. Korba, J. & Kudela, V. (2004). Evaluation of the fire blight susceptibility of pear genotypes following inoculation. Acta *fytotechnica et zootechnica*, 7, 144-146.
20. Korba, J., Sillerova, J. & Kudela, V. (2008). Resistance of apple varieties and selections to *Erwinia amylovora* in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 44, 91-96.
21. Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G. & Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 2940–2945.
22. Lim, Y. S., Cha, M. K., Kim, H. K., Uhm, T. B., Park, J. W., Kim, K. & Kim, I. H. (1993). Removal of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 192, 273–280.
23. Matern, U. & Kneusel, R. (1988). Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica*, 16, 153-170.
24. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405–410.
25. Naglaa, A., Ashry, & Mohamed, H. I. (2011). Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to *Powdery mildew*. *World journal of agricultural sciences*, 7, 78-85.
26. Nicholson, L. R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 369-389.
27. Niebel, A., Heungens, K., Barthels, N., Inze, D., Van Montagu, M. Gheysen, G. (1995). Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, 371-378.
28. Noctor, G. & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and Glutathione: Keeping active oxygen under control. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 49, 249-279.
29. Oitto, W. A., Van der Zwet, T., & Brooks, H. J. (1970). Ratings of pear cultivars for resistance to fire blight. *HortScience*, 5, 474-476.
30. Roemmelt, S., Plagge, J., Treutter, D., Gutmann, M., Feucht, W., Zeller, W., Momol, M. T. & Saygili, H. (1999). Defence reaction of apple against fire blight: histological and biochemical studies. *Proceedings of the eighth international workshop on fire blight, Acta horticulturae*, 489, 335-336.
31. Snyder, B. A. & Nicholson, R. L. (1990). Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *Science*, 248, 1637-1639.
32. Somssich, I. E. & Hahlbrock, K. (1998). Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, 3, 86-90.
33. Stewart, P. J., Clark, J. R. & Fenn, P. (2003). Evaluation of Resistance to *Erwinia amylovora* and *Botryosphaeria dothidea* in Eastern U.S. Blackberry Cultivars. *Horticultural Studies, 520,* 32-34.

34. Tenhaken, R., Levine, a., Brisson, L. F. Dixon, R. A. & Lamb, C. (1995). Function of oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 4158- 4163.
35. Van Loon, L. C., Rep, M. & Pieterse, C. M. J. (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135-162.
36. Vanneste, J. L. (ed). (2000). *Fire blight*. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora.* CABI Pub., Wallingford, UK: 1-370.
37. Venisse, J. S., Gullner, G. & Brisset, M. N. (2001). Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology*, 125, 2164-2172.
38. Venisse, J. S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J. P., & Brisset, M. N. (2002). Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 1204-1212.
39. Zhang, Z., Nakano, K., & Maezawa, S. (2009). Comparison of the antioxidant enzymes of broccoli after cold or heat shock treatment at different storage temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 54, 101-105.