

پاسخ آنتی اکسیدانی لیموترش نسبت به باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Antioxidant Response of Mexican Lime to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

حسین میرزایی نجفقلی^۱، سعید طریقی^{۲*}، مرتضی گل محمدی^۳ و پریسا طاهری^۴

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶

چکیده

لیموترش (*Citrus aurantifolia*) یکی از ژنوتیپ‌های حساس مرکبات نسبت به باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* می‌باشد که در مناطق جنوب و جنوب غربی ایران کشت داده می‌شود. در این بیماری همه اندام‌های هوایی لیموترش آلوده می‌شوند و در آلودگی‌های شدید سبب برگ‌ریزی، بدشکلی و ریزش میوه، خشکیدگی سرشاخه و ضعف عمومی درخت می‌شود. در این پژوهش، اثر مایه‌زنی مصنوعی برگ‌های لیموترش با باکتری *Xcc* بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شامل سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز بررسی گردید. در مطالعه ما، فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ‌های مایه‌زنی شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از برگ‌های شاهد بود. هم‌چنین نتایج فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نشان داد که فعالیت آن به‌طور معنی‌داری در بازه زمانی دو، پنج و هفت روز بعد از مایه‌زنی افزایش یافته است. در فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در برگ‌های آلوده تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. هم‌چنین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ‌های مایه‌زنی شده در طول مدت آلودگی با باکتری *Xcc* بیشتر از شاهد بود، اما فقط در بازه زمانی دو و ۱۰ روز معنی‌دار بود. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند روش‌های جدیدی را در تحقیقات آینده به‌منظور کنترل شانکر، از طریق دستکاری در سازوکارهای دفاعی گیاه فراهم شود.

واژه‌های کلیدی: کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز

۱، ۲ و ۴. به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیاران گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۳. استادیار بخش گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

Email: starighi@um.ac.ir

*: نویسنده مسؤول

مقدمه

شانکر باکتریایی مرکبات یکی از مخرب ترین بیماری های مرکبات است، که همه کولتیوارهای مهم مرکبات را آلوده می کند. این بیماری سبب خسارت گسترده به مرکبات شده و شدت آلودگی آن بسته به گونه، وارسته و شرایط آب و هوایی متفاوت است. باکتری عامل بیماری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* می باشد داس؛ خلف و همکاران؛ حاسبی و همکاران؛ پرووست و همکاران (Pruvost et al., 2015; Hasabi et al., 2014; Das, 2003;) (Khalaf et al., 2007)، که همه قسمت های هوایی گیاه را آلوده می کند. علائم این بیماری به صورت زخم های نکروتیک قهوه ای تا قهوه ای روشن با حاشیه برآمده (آشفشانی شکل) بر روی برگ، ساقه و میوه، ریزش برگ، بدشکلی میوه سرخسکیدگی شاخه و زوال عمومی درخت است داتنگ و همکاران؛ لدوک و همکاران (Leduc et al., 2015; Deng et al., 2010). این بیماری سبب کاهش کیفیت و کمیت محصول شده و بازاری پسندی آن را کاهش می دهد لی و وانگ (Li and Wang, 2012). این بیماری در همه کشورهای مرکبات خیز جهان (به جز قاره اروپا) گسترش دارد داس (Das, 2003). در ایران بیماری شانکر باکتریایی مرکبات برای اولین بار توسط علیزاده و رحیمیان (1990) در منطقه کهنوج استان کرمان بر روی لیمو گزارش شده است علیزاده و رحیمیان (Alizadeh and Rahimian, 1990). به منظور کنترل این بیماری از روش های مختلفی مانند ریشه کنی و حذف درختان آلوده، ایجاد بادشکن در اطراف باغات، کاربرد باکتری کش های مسمی، گونه ها و ارقام مقاوم یا متحمل استفاده می گردد مصطفی و همکاران (Mustafa et al., 2014). اهمیت اقتصادی و غذایی مرکبات و گسترش شانکر سبب ایجاد مطالعات وسیعی جهت شناسایی ژنوتیپ های مقاوم شده است بل و کومار (Ebel and Kumar, 2012). پاسخ های دفاعی اولیه گیاه با همکاری مکانیسم های مختلف سلولی، مولکولی و نیز دخالت انواعی از مسیرهای انتقال سیگنال انجام می شود طاهری و طریقی (Taheri and Tarighi, 2009). در مقاومت پایه ای گیاه، جنبه های بیوشیمیایی و فیزیولوژی در سلول های گیاه علیه بیمارگر، به عنوان بخشی از مقاومت میزبان مورد بررسی قرار گرفته است. انفجار اکسیداتیو (Oxidative burst) اولین مکانیزم دفاعی گیاه در برابر عوامل زنده و غیرزنده می باشد طاهری و همکاران (Taheri et al., 2014) که توسط اکسیژن های فعال اتمی مانند رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) ایجاد می شود. هم چنین اکسیژن های فعال اتمی می توانند به عنوان پیام رسان های ثانویه در مکانیسم مقاومت، سبب فعال شدن ژن های مرتبط با دفاع، هورمون های گیاهی و نیتریک اسید شوند. متابولیسم اکسیژن های

فعال اتمی شدیداً توسط فعالیت آنزیمی آنتی اکسیدان هایی از قبیل سوپراکسید دسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (GP)، آسکوربات پراکسیداز (APOD) یا کاتالاز (CAT) تنظیم می شود کومار و همکاران؛ چن و همکاران؛ چودهاری و همکاران (Kumar et al., 2011a,b,c; Chen et al., 2012; Choudhary et al., 2012). رادیکال های سوپراکسید از طریق سوپراکسید دسموتاز به H_2O_2 دسموته می شوند. افزایش بیان ژن های سوپراکسید دسموتاز و سطوح آنزیمی می توانند سبب ایجاد مقاومت علیه بیماری های ویروسی، باکتریایی و قارچی شوند کومار و همکاران (Kumar et al., 2011a). حداکثر فعالیت SOD در برابر باکتری *Xcc* در کامکوات ناکامی (Fortunellan margarita) مشاهده شده است، که یک جنس سازگار جنسی و بسیار نزدیک به مرکبات است. بالا باقی ماندن سطح SOD با افزایش سطح H_2O_2 همبستگی داشت. به طوری که سبب کاهش ۷۵ درصدی در جمعیت ۸-۴ روزه باکتری شد (کومار و همکاران، 2011a). فعالیت پراکسیدازهای گروه سه برگ های آلوده در روز اول به بالاتر از شاهد رسید و هشت روز بعد از آن که کاهش یافت، به طوری که حدود سه برابر بیشتر از کنترل رسید. هم چنین دو ایزوفرم پراکسیداز گروه سه در برگ های آلوده و شاهد تشخیص داده شد. این مطالعه نشان داد که تجمع بالای هیدروژن پراکسید در برگ های کامکوات آلوده به *Xcc* در طی بیماری زایی، ابتدا با ممانعت از فعالیت آسکوربات پراکسیداز و سپس ممانعت از فعالیت کاتالاز افزایش می یابد (کومار و همکاران، 2011a).

با توجه به اهمیت فعالیت آنزیم های SOD، CAT، APOD و GP در مقاومت پایه ای ارقام مرکبات و به منظور درک بیشتر تغییرات بیوشیمیایی و آنزیمی میزبان در طول آلودگی با باکتری *Xcc*، هدف از این مطالعه بررسی تغییرات فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی گونه لیموترش در طی آلودگی به باکتری *Xcc* می باشد.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی باکتری عامل بیماری

از برگ و سرشاخه درختان لیموترش دارای علائم شانکر باکتریایی استان کرمان در طی بهار و تابستان ۹۲ نمونه برداری انجام گردید. نمونه ها به آزمایشگاه منتقل و با الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضد عفونی گردیدند. پس از شست و شو با آب مقطر سترون، درون هاون چینی له و روی محیط کشت آگار غذایی (NA) کشت و درون انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. پس از خالص سازی پرگنه های باکتریایی، آزمون های فنوتیپی و بیوشیمیایی گرم، اکسیداز، کاتالاز، تولید رنگدانه زانتامونادین، لوان، فوق حساسیت روی

(پیکسل‌ها) مربع مینا به تصویر باینری تبدیل و سپس شمارش شد و این تعداد مینای اندازه‌گیری مساحت در تصویر قرار داده شد. در مرحله بعد تعداد نقاط مربوط به ناحیه آلوده پس از آستانه گذاری مناسب توسط مارک ها به تصویر باینری تبدیل و شمارش گردید. پس از این محاسبات، تصویر به مدل HSI تبدیل شد که در این محیط تعداد نقاط سالم به کمک خصوصیت رنگ از پس زمینه جدا و باینری شد. همچنین به منظور ایجاد تصویر بهتر و از بین رفتن حفره‌های داخل این تصویر از متدهای پردازش تصویر استفاده گردید. بعد از این مرحله تصویر باینری حاصله با تصویر باینری حاصل از پردازش نقاط آلوده And منطبق شد. تصویر باینری حاصل شده نشان‌دهنده تمام نقاط سطح برگ بود که شمارش شد. حال به کمک این اعداد شمارش شده و فرمول‌های زیر مساحت ناحیه آلوده و نسبت آن‌ها محاسبه شد.

مساحت ناحیه آلوده (بر حسب سانتی‌مترمربع) = تعداد نقاط ناحیه آلوده / تعداد نقاط مربع مینا
مساحت تمام سطح برگ (بر حسب سانتی‌مترمربع) = تعداد تمام نقاط برگ / تعداد نقاط مربع مینا
نسبت آلودگی برگ = مساحت ناحیه آلوده / مساحت تمام سطح برگ

مایه‌زنی ارقام و استخراج عصاره آنزیمی

نهال‌های یکساله ارقام لیموترش از مرکز تحقیقات مرکبات کشور تهیه گردید. ارقام درون گلخانه با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۸ ساعت روشنایی و رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگهداری گردیدند. برگ‌های هم سن و یک شکل نهال‌های مرکبات با سوسپانسیون 10^8 CFU.ml⁻¹ به مقدار ۲۵ میکرولیتر مایه‌زنی گردید. سپس نمونه‌برداری در هفت زمان (صفر، ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۱۰ روز) از نمونه‌های شاهد و مایه‌زنی شده، انجام شد. نمونه‌های برگ‌ی توسط ازت مایع خرد شدند و در سه میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=۷ کاملاً له گردیدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. عصاره آنزیمی به درون میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتر انتقال و مقدار پروتئین کل توسط روش بردفورد اندازه‌گیری گردید (Bradford, 1976). عصاره آنزیمی حاصل برای اندازه‌گیری آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت.

توتون و شمعدانی، رشد روی محیط‌کشت YDC و تولید گاز سولفید هیدروژن از سیستمین انجام گردید شاد و همکاران (Schaad et al., 2001).

شناسایی مولکولی عامل بیماری با استفاده از آغازگر اختصاصی XACF و XCAR

به‌منظور شناسایی مولکولی عامل بیماری از جفت آغازگر اختصاصی XACF (5'-CGTCGCAATACGATTGGAAC-3') و XCAR (5'-CGGAGGCATTGTCTGAAGGAA-3') طراحی شده از ژن *hrpW* استفاده شد پارک و همکاران (Park et al., 2006). ابتدا دی‌ان‌ای جدایه‌های باکتری به‌روش جوشاندن به مدت ۱۰ دقیقه استخراج و به‌مدت پنج دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی شامل واسرشت سازی مقدماتی ۵ دقیقه در ۹۴°C، چرخه با واسرشت سازی ۱۵ ثانیه در ۹۴°C، اتصال ۳۰ ثانیه در ۶۰°C، سنتز ۷۲°C و سنتز نهایی ۷ دقیقه در ۷۲°C صورت گرفت. مواد و مقدار مورد استفاده برای واکنش PCR، شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (PCR buffer 10X)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (2.5 mM)، ۰/۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase (10 mM)، ۰/۲۵ میکرولیتر dNTPs (10 U/μl)، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت (10 μM)، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت (10 μM)، ۳ میکرولیتر دی‌ان‌ای و ۱۵/۲۵ میکرولیتر آب سترون.

تعیین شدت بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی

به‌منظور تعیین شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها از آزمون برگ بریده استفاده شد // صالح و همکاران؛ دی‌غود و کومار؛ کومار و کور (Al-Saleh et al., 2014; Dhaygude and Kumbhar, 2013; Kumar and Kaur, 2015). سوسپانسیون 10^8 CFU.ml⁻¹ جدایه‌های باکتریایی از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی محیط‌کشت NA، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تهیه گردید. برگ‌های کاملاً توسعه یافته لیموترش توسط هیپوکلرید سدیم یک درصد تجاری ضدعفونی شدند. میزان ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه به دو طرف برگ تزریق شد. برگ‌ها در سینی‌های با رطوبت بالا درون ژرمیناتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ۱۰ روز میزان علائم بیماری ایجاد شده توسط هر جدایه با استفاده از روش پردازش تصویر در نرم‌افزار MATLAB R2010b محاسبه شد. در این روش، نواحی آلوده به بیماری به‌صورت دستی علامت‌گذاری شد. همچنین بر روی سطح پس زمینه نیز یک مربع مینای مساحت به ابعاد یک سانتی‌متر قرار داده شد. به کمک پردازش تصویر ابتدا تعداد نقاط

جدول ۱: مشخصات جدایه‌های عامل شانکر مرکبات در استان کرمان

Table 1: Characteristics of citrus bacterial canker strains from Kerman province

بافت گیاهی Plant tissue	محل نمونه برداری Region of sampling	کد جدایه Strain code
برگ Leaf	کهنوج Kahnoj	KKXCC1
برگ Leaf	کهنوج Kahnoj	KKXCC2
شاخه Branch	کهنوج Kahnoj	KKXCC3
برگ Leaf	کهنوج Kahnoj	KKXCC4
برگ Leaf	وکیل آباد Vakil abad	KVXCC1
برگ Leaf	وکیل آباد Vakil abad	KVXCC2
شاخه Branch	وکیل آباد Vakil abad	KVXCC3
شاخه Branch	وکیل آباد Vakil abad	KVXCC4
برگ Leaf	ابراهیم آباد Ebrahim abad	KEXCC1
برگ Leaf	ابراهیم آباد Ebrahim abad	KEXCC2

۰/۰۱ مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. کاهش جذب آسکوربیک اسید در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت سه دقیقه اندازه گیری شد. واکنش با اضافه کردن H_2O_2 شروع می گردد.

بررسی آنزیم کاتالاز

به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از روش دهیندسا استفاده شد. براساس این روش ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی را با ۹۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۰/۰۵ مولار و پراکسید هیدروژن ۰/۰۱۵ مولار است مخلوط می کنیم. سپس جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری می شود. یک واحد آنزیمی کاتالاز برابر با تجزیه یک میلی مولار پراکسید هیدروژن در یک دقیقه است هیندسا و همکاران (Dhindsa et al., 1981). همه تیمارهای آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی توسط نرم افزار SAS 9.2.1 در سطح احتمال ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

تعداد ۱۰ جدایه زرد رنگ، گرم منفی، هوازی اجباری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی با پرگنه های زرد رنگ روی محیط کشت YDC جداسازی شدند. همه جدایه های لوان مثبت، قادر به تولید رنگدانه زانتامونادین، گاز سولفید هیدروژن از سیستمین و ایجاد واکنش فوق حساسیت روی توتون و شمعدانی بودند. همه

بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت گایاکول پراکسیداز (GP) با اضافه کردن گایکول به عنوان دهنده الکترون تعیین می گردد (طاهری و همکاران، 2014). محلول واکنش شامل بافر فسفات ۰/۱ مولار، گایاکول ۰/۴ مولار، H_2O_2 ۰/۵ مولار و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان جذب نمونه ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر به مدت ۷۰ ثانیه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیمی براساس میکرو مول بر دقیقه بر میکروگرم پروتئین بیان گردید.

بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دسموتاز

به منظور بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز (SOD) از مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۰/۱ مولار، EDTA ۰/۰۰۱ مولار، بی کربنات سدیم ۰/۵ مولار، HEPES ۰/۵ مولار، متیونین ۰/۱۳ مولار، تریتون X-100 ۰/۲۵ درصد وزنی - حجمی، NBT ۷/۵ میلی مولار، ریبوفلاوین ۰/۲ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده و در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد (طاهری و همکاران، 2014).

بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

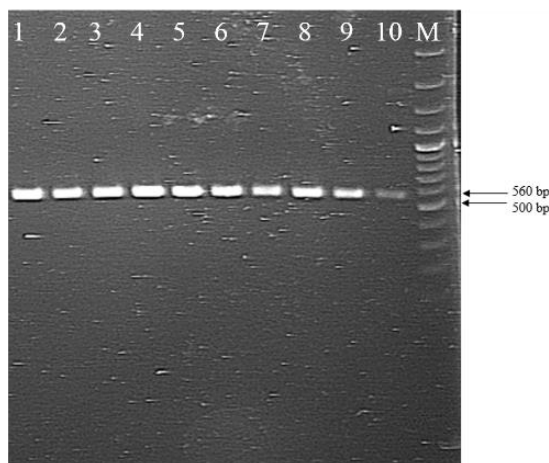
فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APOD) به روش ناکانو و اسدا با مقداری تغییر انجام شود چودهاری و همکاران (Choudhary et al., 2012). مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۰/۵۰ مولار، EDTA ۰/۰۰۱ مولار، آسکوربیک اسید ۰/۰۰۵ مولار، H_2O_2

تزریق به درون زیر برگ انجام گردید. ۱۰ روز پس از مایه زنی علائم به صورت لکه های آب سوخته قهوه ای با حاشیه زرد رنگ ظاهر شدند (شکل ۲).

جدایه های باکتریایی در واکنش PCR قطعه ۵۶۱ جفت بازی را تکثیر نمودند (شکل ۱).

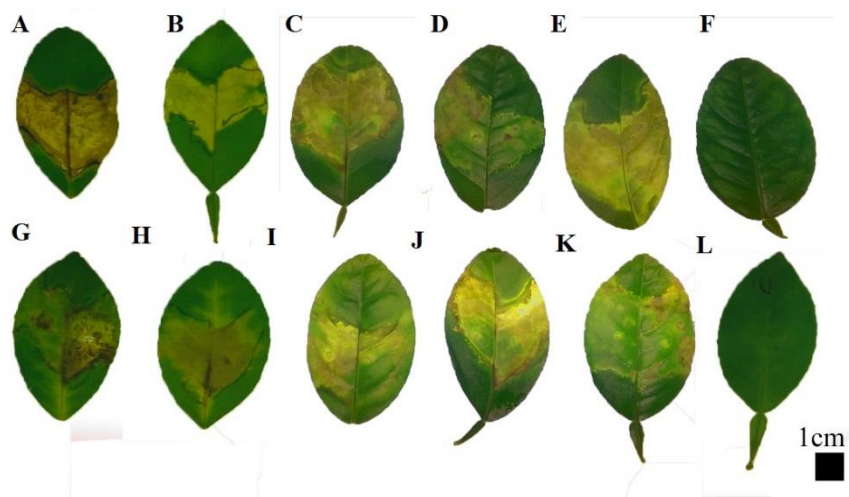
آزمون بیماری زایی جدایه های باکتریایی در آزمون برگ های بریده

آزمون بیماری زایی بر روی برگ های بریده لیموترش به روش



شکل ۱: نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه های *Xanthomonas citri* subsp. *citri* جدا شده از استان کرمان با آغازگر اختصاصی XACF/XACR. ۱. K VXCC1, ۲. KKXCC2, ۳. KKXCC3, ۴. KKXCC4, ۵. K VXCC1, ۶. K VXCC2, ۷. K VXCC3, ۸. K VXCC2, ۹. KKXCC1, ۱۰. K VXCC2.

Fig. 1: Agarose gel electrophoresis of PCR products of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains isolated from Kerman province with specific primer XACF/XACR. 1. K VXCC1, 2. KKXCC2, 3. KKXCC3, 4. KKXCC4, 5. K VXCC1, 6. K VXCC2, 7. K VXCC3, 8. K VXCC2, 9. KKXCC1, 10. K VXCC2.

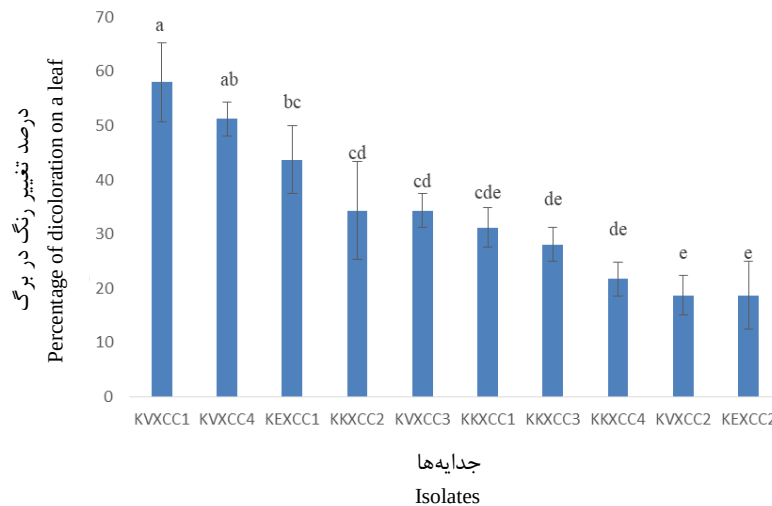


شکل ۲: علائم جدایه های باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* روی برگ بریده لیموترش. A: K VXCC1, B: K VXCC1, C: K VXCC1, D: K VXCC2, E: K VXCC1, F: شاهد, G: K VXCC2, H: K VXCC1, I: K VXCC3, J: K VXCC3, K: K VXCC2 و L: شاهد

Fig. 2: Symptoms of bacterial isolates of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on the detached leaves of *Citrus aurantifolia*. A. K VXCC1, B. K VXCC1, C. K VXCC1, D. K VXCC2, E. K VXCC1, F. Control, G. K VXCC2, H. K VXCC1, I. K VXCC3, J. K VXCC3, K. K VXCC2 and L. Control

قرار گرفت. هم چنین جدایه های K VXCC2 و K VXCC2 با شاخص بیماری ۱۸/۷۵ درصد کم ترین میزان بیماری را از خود نشان دادند (نمودار ۱).

جدایه K VXCC1 با شاخص بیماری زایی ۵۸ درصد به عنوان بیماری زا ترین جدایه انتخاب گردید و برای بررسی فعالیت آنزیم های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز نهال های لیمو ترش در برابر باکتری Xcc مورد استفاده



نمودار ۱: شاخص شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *Xanthomonas citri* subsp. *citri* در آزمون برگ بریده لیموترش
Chart 1: Disease severity index isolates of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in detached leaf assay of *Citrus aurantifolia*

محمدی و همکاران (Khodakaramian et al., 1999; Mohammadi et al., 2001). استفاده از آغازگرهای مولکولی به منظور تشخیص سریع و دقیق بیمارگرها به عنوان یکی از روش‌های ضروری در شناسایی و مدیریت بیمارگرها می‌باشد. در این بررسی از آغازگر اختصاصی XACR/XACF طراحی شده براساس ژن hrpW استفاده شد. این ژن از لحاظ توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در بین باکتری‌های گرم منفی بیمارگر گیاهی بسیار متغیر است. به طوری که میزان تشابه نوکلئوتیدی آن در باکتری *Xcc* با پتوارهای *X. campestris* نوکلئوتیدی *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* و *pv. campestris* Park (همکاران (et al., 2006) به ترتیب ۴۳/۹ و ۱۷/۲ درصد می‌باشد پارک و همکاران (et al., 2006).

در آزمون بیماری‌زایی به روش برگ بریده، در تعیین شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها از روش پردازش تصویر در نرم افزار MATLAB R2010b استفاده گردید /امارال و همکاران (Amaral et al., 2010). علائم در روزهای دوم و سوم به صورت زردی ظاهر گردید با گذشت زمان ناحیه آلوده ضخیم، برآمده و لکه‌های آب سوخته قهوه‌ای با حاشیه زرد رنگ ظاهر شدند. در این آزمون جدایه KVXCC1 با شاخص بیماری‌زایی ۵۸ درصد به عنوان بیماری‌زاترین جدایه تشخیص داده شد. استفاده از این روش نسبت به روش‌های نمره‌دهی و درجه‌بندی چشمی علائم، بسیار دقیق و حساس می‌باشد و علاوه بر تسريع در زمان اندازه‌گیری، خطای اندازه‌گیری و تعیین میزان علائم را کاهش می‌دهد. روش پردازش تصویر در زمینه‌های مختلف گیاه پزشکی و خصوصاً بیماری‌شناسی جهت تشخیص، تعیین میزان بیماری و دسته‌بندی بیماری‌های گیاهی توسط محققین زیادی مورد استفاده قرار گرفته است دانشجو و همکاران؛ ده‌یگود و کومبار؛

فعالیت آنزیم‌ها در طی آلودگی به باکتری *Xcc*

در بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ‌های مایه‌زنی شده لیموترش با باکتری *Xcc* در طی آلودگی، دو نقطه اوج در روزهای دوم و هفتم بعد از مایه‌زنی مشاهده شد. همچنین میزان فعالیت آن در روزهای دوم، پنجم، هفتم و دهم در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. تغییرات میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز در طی آلودگی به باکتری *Xcc* تغییر چندانی از خود نشان نداد. فقط در روز سوم بعد از آلودگی یک کاهش ناگهانی در میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز مشاهده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در بازه‌های زمانی به استثناء روز صفر و اول، در سایر بازه‌های زمانی تفاوت معنی‌داری با شاهد از خود نشان داد. میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ‌های مایه‌زنی شده در طی آلودگی به باکتری *Xcc* بیشتر از کنترل بود. اما فقط دو و ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی نسبت به شاهد در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (نمودار ۲).

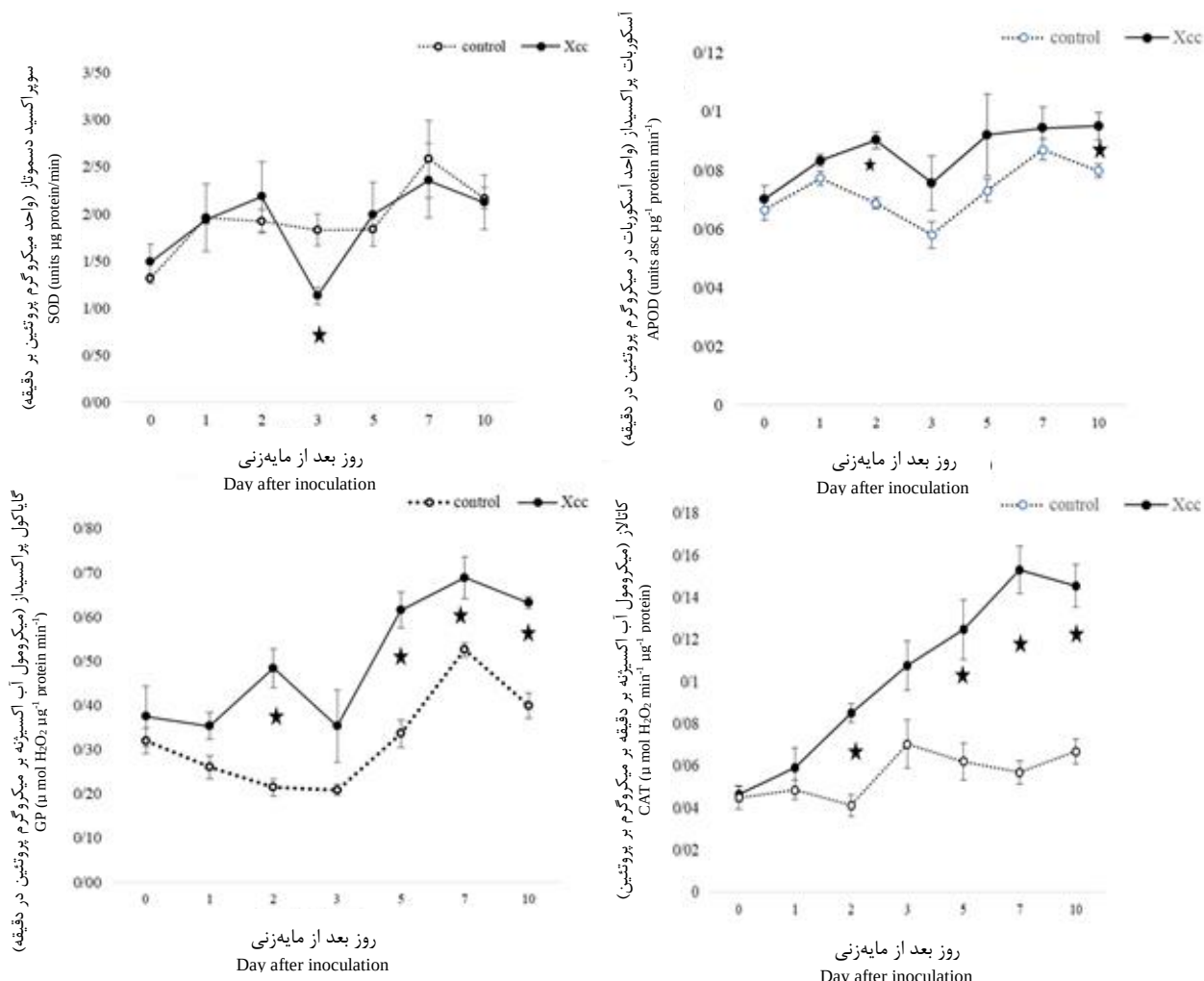
بحث

گونه لیموترش (*C. aurantifolia*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های مرکبات است که در نواحی جنوب و جنوب غربی کشور به طور گسترده کشت می‌گردد. این گونه به بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدی حساس است که از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های آن، می‌توان به بیماری شانکر باکتریایی مرکبات با عامل *Xanthomonas citri* subsp. *citri* اشاره نمود (کومار و همکاران، 2011a). در این پژوهش باکتری عامل بیماری زرد رنگ، گرم منفی، هوازی اجباری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی با پرگنه‌های زرد رنگ روی محیط کشت YDC بود. باکتری عامل بیماری از نظر خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی بررسی شده یکنواخت بود خد/کرمیان و همکاران؛

اکسیژن (ROS) در شرایط عادی توسط گیاهان به صورت سیستمیک انجام می‌گردد. تنش‌های زنده و غیرزنده سبب تغییر در تولید ROS در گیاهان می‌شوند. به طوری که می‌توانند به عنوان مولکول‌های سیگنال نقش مهمی در واکنش‌های دفاعی گیاه علیه بیمارگرها داشته باشند چودهاری و همکاران، ۲۰۱۲ (Choudhary et al., 2012)؛ و همکاران، ۲۰۰۵ (Hung et al., 2005). تجمع ROS در مقاومت بیولوژیکی و شیمیایی القا شده گیاهان نسبت به بیمارگرها نقش دارند دوسچاور و همکاران (De Vleeschauwer et al., 2009). آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز و آسکورات پراکسیداز سبب بهبود تحمل استرس‌ها از طریق سم‌زدایی ROS می‌شوند (چودهاری و همکاران، ۲۰۱۲).

باربدو؛ کومار و کور، ۲۰۱۵ (Daneshjoo et al., 2008; Dhaygude and Kumbhar, 2013; Barbedo, 2013).

گونه لیموترش نسبت به بیماری شانکر باکتریایی مرکبات به عنوان حساس‌ترین گونه در بین مرکبات معرفی شده است گوتوالد و همکاران؛ مصطفی و همکاران؛ خلف و همکاران؛ چن و همکاران، ۲۰۱۲ (Gottwald et al., 1993; Mustafa et al., 2012; Khalaf et al., 2007). در برهمکنش میزبان-بیمارگر مکانیسم‌های دفاعی ویژه‌ای شامل تغییرات بیوشیمیایی، مولکولی و سلولی در پاسخ به بیمارگرهای مختلف ایجاد می‌شود (طاهری و همکاران، ۲۰۱۴). به منظور توسعه راهکارهای موثر برای حفاظت از گیاهان درک این فرایندهای انجام شده در طی برهمکنش میزبان و بیمارگر ضروری می‌باشد که نهایتاً منجر به بیماری یا مقاومت در گیاه می‌شود. تولید گونه‌های فعال



نمودار ۲: میزان تغییرات آنزیم‌های A. سوپراکسید دسموتاز، B. آسکورات پراکسیداز، C. گایاکول پراکسیداز و D. کاتالاز لیموترش در طی آلودگی به باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* *: معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

Chart 2: A. superoxide dismutase (SOD), B. ascorbate peroxidase activity (APOD), C. guaiacol peroxidase activity (GP) and D. catalase activity (CAT) activity of *Citrus aurantifolia* leaves after inoculation of *Xcc* at indicated time. *: Significant at the 5% level

تعامل بین SOD، APOD و یا CAT در سلول‌ها نقطه بحرانی در حفظ سطح پایدار ROS هاست. ابتدا SOD، O_2^- را به H_2O_2 تبدیل می‌کند سپس H_2O_2 توسط APOD و CAT در طی چرخه‌های آنتی‌اکسیدانی در اندام‌های مختلف سم‌زدایی می‌شود. البته APOD بیشتر مسئول تعدیل ROS ها در مسیر سیگنالینگ است و CAT مسئول اصلی حذف ROS ها می‌باشد فهمی‌راد و همکاران (Fahimirad et al., 2013). در این پژوهش تغییرات آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز مورد بررسی قرار گرفت. افزایش بیان ژن‌ها و غلظت آنزیم SOD به عنوان مکانیسم مقاومت گیاهان در برابر بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی توسط محققین مختلف گزارش شده است بارنا و همکاران؛ ترتیوانیدیس و همکاران؛ وولوداکیس و همکاران (Barna et al., 2003; Tertivanidis et al., 2004; Voludakis et al., 2006). هم‌چنین SOD اولین خط دفاعی گیاهان در برابر ROS هاست که افزایش آن با افزایش مقاومت در گیاهان ارتباط دارد (طاهری و همکاران، 2014). در این پژوهش، میزان آنزیم SOD در طی آلودگی به باکتری *Xcc* به استثنای روز سوم، تفاوت معنی‌داری با گیاه شاهد نداشت. میزان آنزیم SOD در روزهای اول و دوم افزایش پیدا کرد اما در روز سوم به کم‌ترین مقدار خود در طی آلودگی رسید. کومار و همکاران فعالیت SOD را در رقم حساس *C. sinensis* در طی آلودگی به باکتری *Xcc* به مدت ۲۰ روز بررسی نمودند. در این بررسی فعالیت SOD در روزهای اول و هشتم افزایش یافت و در سایر روزها فعالیت آن کاهش یافت کومار و همکاران (Kumar et al., 2011 b). شروع علائم در برگ‌های مایه‌زنی شده در روز سوم مشاهده گردید، با استناد به مطالعات انجام شده در گذشته و نتایج این پژوهش، می‌توان پایین بودن فعالیت آنزیم SOD را به عنوان یکی از عوامل موثر در ظهور علائم و حساسیت لیموترش نسبت به باکتری *Xcc* نسبت داد. هم‌چنین افزایش فعالیت SOD در کلم‌های مقاوم به *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* مشاهده شده است. پایین بودن میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز با افزایش حساسیت در برنج نسبت به بیماری شیت بلایت نیز گزارش شده است (طاهری و همکاران، 2014). سطح آنزیم کاتالاز در طی آلودگی به باکتری *Xcc* سیر صعودی از خود نشان داد. بالا بودن فعالیت آنزیم CAT در ارقام حساس در طی آلودگی به باکتری *Xcc* و ویروس تریستزا در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است پرز-کلمنت و همکاران؛ کومار و همکاران؛ رسولنیا و همکاران (Pérez-Clemente et al., 2013; Kumar et al., 2011b; Rasoulunia et al., 2015). درحالی‌که میزان فعالیت H_2O_2 در ارقام مقاوم مرکبات در بازه‌های زمانی بعد از آلودگی توسط باکتری *Xcc* کاهش یافته

است (کومار و همکاران، 2011a). آنزیم CAT بیش‌ترین پیوستگی با میزان H_2O_2 را دارد و به همراه APOD نقش مهمی در نگهداری H_2O_2 در غلظت پایین دارند/بل و کومار (Ebel and Kumar, 2012). در بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GP) در برگ‌های مایه‌زنی شده لیموترش با باکتری *Xcc* در طی آلودگی، دو نقطه اوج در بازه‌های زمانی دو و هفت روز بعد از مایه‌زنی مشاهده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز در روزهای صفر، اول و سوم تقریباً ثابت بود. درحالی‌که میزان آن در بازه‌های زمانی دو، پنج، هفت و ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی سیر افزایشی نشان داد و در روز هفتم به حداکثر مقدار خود رسید. رسولنیا و همکاران (2013) فعالیت آنزیم پراکسیداز را در برهمکنش لیموترش با باکتری *Xcc* طی سه بازه زمانی یک، چهار و هفت روز بعد از مایه‌زنی بررسی نمودند. در این بررسی فعالیت این آنزیم در طول مدت آلودگی سیر افزایشی نشان داد و در روز هفتم به بالاترین مقدار خود رسید. کومار و همکاران (2011) در بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم حساس *C. sinensis* نشان دادند که فعالیت این آنزیم در روز اول افزایش، سپس در روز دوم کاهش و تا روز هشتم سیر افزایشی دارد. هم‌چنین کومار و همکاران (2011) فعالیت آنزیم GP را در رقم حساس گریپ فروت (*C. paradise*) بررسی نمود. در این بررسی فعالیت آنزیم GP تا روز دهم سیر افزایشی نشان داد. وانگ و همکاران (2011) فعالیت آنزیم GP را در دو رقم مقاوم و حساس *Fortunella crassifolia* و *C. sinensis* طی بازه‌های زمانی یک، سه، پنج و هفت روز بررسی نمودند. در این پژوهش فعالیت آنزیم GP در هر دو رقم مقاوم و حساس سیر افزایشی نشان داد. اما مقدار فعالیت آنزیم GP در رقم مقاوم در سطح بالاتری گزارش شده است. در پژوهش انجام شده فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بازه‌های زمانی یک، دو، چهار، پنج، هفت و ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی سیر افزایشی نشان داد، فقط در روز سوم مقدار فعالیت آنزیم APOD کاهش یافت. در پژوهش رسولنیا و همکاران (2001) فعالیت APOD در آپوپلاست بیشتر از گیاه شاهد، اما در نمونه برگ‌گی کمتر از گیاه شاهد بوده است، که با پژوهش انجام شده در تضاد است. در صورتی‌که فعالیت آنزیم APOD در رقم‌های حساس *C. sinensis* و *C. paradise* در بازه‌های زمانی بعد از مایه‌زنی توسط باکتری *Xcc* افزایش یافته است (کومار و همکاران، 2011b,c). هم‌چنین فعالیت آنزیم APOD در رقم مقاوم کامکوات در طی آلودگی توسط باکتری *Xcc* کاهش یافته است (کومار و همکاران، 2011c).

انفجار اکسیداتیو اولین سیستم دفاعی گیاه در مقابل حمله بیمارگرها می‌باشد. میزان سطح پایین آنزیم SOD و بالا بودن سطح آنزیم‌های CAT، APOD و GP سبب پایین نگه‌داشتن

میزان H_2O_2 و در نتیجه حساسیت و پیشروی بیشتر بیمارگر می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند روش‌های جدیدی را در تحقیقات آینده به‌منظور کنترل شانکر، از طریق دستکاری در سازوکارهای دفاعی گیاه فراهم آورد.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۳-۴ متن انگلیسی مراجعه شود.