مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

بررسی بیان نسبی ژن پراکسیداز و فعالیت آنزیمی در سه گونه و رقم مرکبات در برابر باکتری عامل بلاست مرکبات *Pesudomonas syringae* pv. *syringae*

مهسا خاکساری[۱]، ولی اله بابایی زاد*[۲]، حشمت الله رحیمیان [۳]، فرید بیگی[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
[۲ و ۳] دانشیار و استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
[۴] استادیار موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۲

چکیده

بیماری بلاست مرکبات (Citrus blast) ازجمله بیماری‌های شایع در برخی از مناطق مرکبات خیز دنیا به‌استثنای مناطق گرمسیری است که عمدتاً به‌وسیله جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902 (*Pss*) ایجاد می‌شود. واکنش گیاه به آلودگی توسط عوامل بیماری‌زا به‌وسیله‌ی تغییرات متابولیکی همچون، گونه‌های اکسیژن فعال و ژن‌های دخیل در مقاومت القایی سیستمیک ابراز می‌شود. سطح بیان ژن پراکسیداز با استفاده ازروش Real time و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سه گونه و رقم مرکبات (اوکیتسو، نارنج و لایم کوآت) در بازه‌های زمانی مختلف پس از تزریق باکتری در گلخانه موردبررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد میزان بیان ژن پراکسیداز در اوکیتسو و نارنج با مقاومت بالاتری هستند در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی در مقایسه با لایم کوآت به میزان اوج خود رسید درحالی‌که در دورگ حساس لایم کوآت در ساعت ۴۸ بعد از آلودگی به میزان اوج خود رسید. میزان تولید آنزیم پراکسیداز در هر سه ژنوتیپ بعد از آلودگی روند صعودی دارد و در نارنج و اوکیتسو در ساعت ۴۸ و در لایم کوآت در ساعت ۷۲ به بیشترین میزان خود رسید. دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تنها در لایم کوات روند صعودی داشته است. درمجموع بیان ژن پراکسیداز و در پی آن تولید آنزیم در ارقام مقاوم (اوکیتسو و نارنج)، بالاتر از ژنوتیپ حساس (لایم کوآت) است و میزان تولید دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در ارقام مقاوم کاهش و درنتیجه بیشتر شدن پراکسید هیدروژن و افزایش مقاومت را در پی دارد.

واژگان کلیدی: *آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان؛ بیان ژن؛ Pseudomonas syringae* pv. *syringae؛ بلاست مرکبات.*

* نویسنده مسئول: ولی اله بابایی زاد تلفن: ۰۹۱۱۳۵۳۸۹۳۳ Email: babaeizad@yahoo.com

مقدمه

باکتری‌های بیمارگر گیاهی، اثرات سوء بر رشد و عملکرد گیاه دارند و موجب کاهش محصول می‌شوند (Vidhyaskaran, 2002). مکانیزم‌های گیاهان آن‌ها را قادر می‌سازد که نه‌تنها در برابر استرس‌های محیطی و زخمی شدن مقاومت داشته باشند، بلکه حملات عوامل بیماری‌زا را نیز به مدیریت خود دربیاورند. واکنش گیاهان به حمله بیمارگرها پیچیده است و القای ژن‌های دخیل در مقاومت را شامل می‌شود (Van Loon *et al*., 1994; Jwa *et al*., 2006; Stintzi *et al*., 1993).

یکی از مکانیسم‌های گیاهان، تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR Proteins) در گیاهان در پاسخ به عوامل زنده و یا استرس‌های غیرزنده در گیاهان است (Van Loon and van Strien, 1999; Sayari *et al*., 2016). بیماری بلاست مرکبات از جمله بیماری‌های شایع در خیلی از مناطق مرکبات خیز دنیا است که عمدتاً بوسیله باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902 ایجاد می‌شود. گیاهان از طریق فعال کردن ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دفاعی نسبت به بیمارگرهای باکتریایی واکنش نشان می‌دهند. توسعه مقاومت به بیماری در بسیاری از همکنش‌های گیاه-بیمارگر باکتریایی، با تجمع پروتئین‌های القایی در گیاه مرتبط است (Van Loon *et al*., 2006). مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR)، پاسخ دفاعی است که به‌صورت موضعی در محلی که موردحمله پاتوژن قرارگرفته است و هم‌چنین به‌صورت سیستمیک در بخش‌های دورتر غیر آلوده گیاهی که موردحمله پاتوژن قرارگرفته است القا می‌شود (Zhang and Klessig, 1997). سالیسیلیک اسید باعث فعال شدن مسیر SAR می‌شود و در القای ژن‌های دفاعی نقش بسیار مهمی دارد. تجمع SA در بافت‌های گیاهی منجر به القای مستقیم بیان ژن‌های PR به‌صورت سیستمیک و موضعی و دفاع آنزیمی در بافت‌ها است (Van Loon *et al*., 2006; Zhou *et al*., 2014). پراکسیدازها یک عضو از گروه بزرگ گلیکوپروتئین‌ها هستند که واکنش بین سوبستراهای مختلف و پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌نماید و تقریباً در تمامی موجودات زنده موجود است (Hiraga *et al*., 2001). این آنزیم عضو گروه مهمی از آنزیم‌هاست که در جریان مقاومت گیاهان علیه بیمارگرهای قارچی (Christensen *et al*. 1992; Harrison *et al*., 1995; Curtis *et al*., 1997)، باکتریایی (Young *et al*., 1995; Bestwick *et al*., 1998)، ویروسی (Lagrimini and Rothstein, 1987; Hiraga *et al*., 2001) و ویروئیدی (Vera *et al*., 1993) قدیمی است، القا می‌شوند و شامل سه کلاس مختلف می‌باشند (Van Loon *et al*., 2006; Ye *et al*., 1990). کلاس یک درون‌سلولی‌اند، کلاس دو توسط قارچ‌ها تولید می‌شوند، کلاس سه که ترشحی‌اند،

در چرخه عملکردی معمول خود با احیا پراکسید هیدروژن سبب تنظیم سطح این ماده در گیاه می‌شوند که این عمل را با گرفتن الکترون از مولکول دهنده مختلف مانند ترکیبات فنولی، پیش سازهای لیگنین، اکسین (de Forchetti and Tigier, 1990; Lagrimini *et al*., 1997) و یا سوبستراهای ثانویه انجام می‌دهد (Passardi *et al*., 2004). این آنزیم ها از طریق لیگنینی شدن (Dean and Kolattukudy, 1976, Quiroga *et al*., 2000) استحکام دیواره آوند چوبی (Hilaire *et al*., 2001) تولید فرم های فعال اکسیژن (Mittler *et al*., 2004) سنتز فیتو آلکسین ها (Kristensen *et al*., 1999; Stoessl, 1967) و ترکیبات فنلی (Lagrimini, 1991) و فعالیت پراکسیداز در تعدادی از همکنش‌های مقاوم گیاه-باکتری افزایش می‌یابد. فعالیت پراکسیداز در برگ برنج مایه‌زنی شده با *X. oryzae* pv. *oryzae* افزایش می‌یابد (Matsuyama and Kozaka, 1981). در تعامل سیب‌زمینی شیرین و باکتری *Pectobacterium chrysanthemi* نیز افزایش بیان ژن POX مشاهده شد (Jang *et al*., 2004). پراکسیداز در ایجاد مقاومت دخیل است، برای مثال تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید و یا عوامل بیوکنترل مثل *Trichoderma harzianum* (*TH*)، فعالیت دو آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنول‌اکسیداز در گوجه‌فرنگی آلوده به *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* را افزایش می‌دهد (Ojha and Chandra Chaterjee, 2012). انفجار اکسیداتیو اولین سیستم دفاعی گیاهان در برابر حمله بیمارگرها است (Rasoulnia *et al*., 2013; Wojtaszk, 1997). انفجار اکسیداتیو پاسخ متعارف بیمارگرهای باکتریایی بر روی گیاهان‌اند که به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) منتج می‌شوند (Gayoso *et al*., 2004). اگرچه گونه‌های اکسیژن فعال نقش مفیدی در تولید سیگنال و کمک به القای مقاومت در گیاه دارند (Peng and Kuc, 1992; Baker and Orlandi, 1995; Foyer *et al*., 1997). ممکن است با تأثیر روی مولکول‌های زیستی سلولی به بافت‌های گیاهی آسیب برسانند (Mandal *et al*., 2004). بنابراین، یک تعادل آنزیمی منجر به حفظ موازنه تولید و مهار گونه‌های اکسیژن فعال در گیاه می‌شود (Rasoulnia *et al*., 2013).

آنتی‌اکسیدانت‌ها بوسیله میکروارگانیسم‌های هوازی برای خنثی کردن اثر تنش‌های اکسیداتیو ایجادشده بوسیله گونه‌های اکسیژن فعال تولیدشده‌اند (Racchi, 2013). این آنزیم‌ها شامل سوپر اکسید دسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1)، پراکسیدازها (POX, EC 1.11.1.7) و کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) می‌باشند. سوپر اکسید دسموتاز وظیفه تبدیل رادیکال اکسیژن را به آب‌اکسیژنه دارد و محصول واکنش مورد استفاده کاتالاز و پراکسیداز قرار می‌گیرد. در بین پراکسیدازها آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11)، (پراکسیدازهایی که از آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کنند و به‌طور

عمده در کلروپلاست، سیتوزول و پراکسی زوم تجمع داشته و وظیفه آن‌ها حذف پراکسید هیدروژن تولیدشده در این اندامک‌ها است) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX, EC 1.11.1.9)، (پراکسیدازهای دیگر در تمامی بخش‌های گیاه یافت می‌شوند و از فنول‌ها به‌عنوان دهنده الکترون استفاده کرده و در بیوسنتز لیگنین نقش دارند (Diaz, 2001)، نقش مهمی در از بین بردن پراکسید هیدروژن در گیاه دارند (Apel and Hirt, 2004). آلودگی به باکتری Xanthomonas باعث تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در گوجه‌فرنگی (Chandrashekar and Umesh, 2012)، کام کوات و نارنج (kumar *et al*., 2011) می‌شود.

آنزیم‌های کاتالاز از بین برنده پراکسید هیدروژن در پراکسی زوم بوده درحالی‌که آسکوربات پراکسیداز آنزیم اصلی چرخه آسکوربات-گلوتاتیون است که در سرکوب کردن تجمع پراکسید هیدروژن در کلروپلاست، سیتوزول، پراکسی زوم و آپوپلاست نقش دارد (Shigoeka *et al*., 2002). مطالعات نشان داد که سالیسیلیک اسید از جاروب شدن پراکسید هیدروژن توسط آسکوربات پراکسیداز سیتوزولی ممانعت نموده و سطح پراکسید هیدروژن را در گیاه بلافاصله بعد از تیمار سالیسیلیک اسید بر روی برگ توتون افزایش می‌دهد. لذا سالیسیلیک اسید می‌تواند تجمع پراکسید هیدروژن را در طی انفجار اکسایشی که به‌وسیله آلودگی با عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌گردد، تحریک نماید (Dempsey *et al*., 1999).

جهت بررسی مولکولی و آنزیمی بلاست مرکبات، پس از آلوده سازی با باکتری *Pss*، استخراج RNA از سه رقم لیموترش لایم کوآت (*Citrus auarantifolia*)، نارنج (*C. sinensis*) و نارنگی اوکیتسو (*C. reticulata*) در زمان‌های متفاوت انجام و سپس بیان ژن پراکسیداز بررسی و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

باکتری موردنظر از کلکسیون باکتری موجود در بخش کنترل بیولوژیک موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور واقع در موسسه تحقیقات برنج کشور (معاونت آمل) تهیه و در محیط NAS کشت شد.

تهیه نهال

در این بررسی از سه رقم متفاوت مرکبات؛ نارنگی رقم اوکیتسو (*Citrus reticulate* var *okitso*)، گونه نارنج (*Citrus aurantium*) و دورگ لایم کوآت از گونه لایم (*Citrus aurantifolia*) یک‌ساله پیوند زده‌شده بر روی پایه نارنج استفاده شد. تمامی نهال‌ها ۴ هفته قبل از انجام آزمایش‌ها سر برداری شد. نهال‌های مرکبات تحت شرایط گلخانه‌ای در درجه حرارت

۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد نگهداری شدند.

آزمون بیماری‌زایی

از کشت ۱-۲ روزه باکتری *Pss* در محیط کشت NAS سوسپانسیونی با غلظت $۷×۱۰^{۶}$ سلول (Colony-Forming Unit; CFU) در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. غلظت سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول‌موج ۶۰۰ نانومتر انجام شد. برای مایه‌زنی حدود ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله به روش مایه‌کوبی به‌وسیله سرنگ مخصوص انسولین به فضای میان‌برگی برگ‌های مرکبات تزریق شد. نهال‌ها، ۲۴ ساعت قبل و بعد از مایه‌زنی گیاهان، با استفاده از کیسه‌های پلاستیکی شفاف پوشیده شدند. نمونه‌برداری در بازه‌های متفاوت انجام و در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شد.

استخراج RNA و زدودن DNA ژنومی از نمونه‌ها

محتوی RNA کل از برگ‌های نمونه‌برداری شده در بازه‌های زمانی مختلف با استفاده از کیت RNXplus (شرکت سیناژن) انجام شد. به‌منظور زدودن DNA ژنومی از نمونه‌های RNA، از کیت RQ1 RNase-free DNase ساخت شرکت Fermentase طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

به‌منظور بررسی کیفیت RNA استخراجی از دو روش استفاده شد. نمونه‌های استخراج‌شده، با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE (40mM Tris acetate, 1 mM EDTA 1X) بررسی شدند. ژل در اتیدیوم‌بروماید (۰/۵ μ g/mL) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از شستشو با آب مقطر با UV دستگاه ژل خوان کداک از آن عکس‌برداری شد. درروش دوم درجه خلوص و غلظت نمونه‌ها در طول‌موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد.

ساخت و بررسی کیفیت cDNA

ساخت cDNA توسط کیت Revert Aid First Standard cDNA (Fermentase) و بر اساس دستورالعمل، از محتوی RNA کل استخراج‌شده ساخته شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری و تکثیر قطعات cDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و جفت آغازگر TEF انجام شد. ارزیابی محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE صورت گرفت.

بررسی میزان بیان ژن‌ها به کمک روش Quantitative Real- time PCR

بیان ژن‌ها به‌وسیله qRT-PCR، با استفاده از کیت Cyber Green و آغازگرهای مربوطه در دستگاه Thermal cycler(BioRad)M*3000P

انجام شد. حدود ۲ میکرولیتر از cDNA رقیق‌شده (۵۰ نانوگرم) از هر نمونه به‌عنوان الگو در واکنش‌ها استفاده شد و به ترکیب: ۱ میکرو لیتر از هر آغازگر، ۷/۵ میکرو لیترسایبرگرین، ۸/۵ میکرو لیتر آب (حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر) افزوده شد. پارامتر دمایی جهت تکثیر مطابق زیر است: ۱. مرحله واسرشته سازی اولیه: ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس. ۲. مرحله واسرشته سازی: ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس. ۳. مرحله اتصال آغازگر: ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس. ۴. مرحله تکثیر: ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس. ۵. مرحله تکثیر نهایی: ۵ دقیقه. در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و ۴۰ مرتبه چرخش بین مراحل ۲ الی ۴. لیست آغازگرهای مورداستفاده در این پژوهش نیز در جدول ۱ آمده است. در تمام آزمایش‌ها از ژن *tef* به‌عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. تمام واکنش‌های PCR در ۳ تکرار انجام گرفت.

تجزیه داده‌ها

تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار Bio-Rad cfx manager انجام شد. نرخ بیان هر ژن در این روش با استفاده از فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001).

جدول ۱. جفت آغازگرها در آزمایش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز.

Table 1. Primer pairs used in the present study and their nucleotide sequence.

Gene ژن	Primer sequence توالی آغازگر (5' ⟵ 3')	Accession number
elongation factor 1-alpha	F: GGTCAGACTCGTGAGCATGC R: CATCGTACCTAGCCTTTGAGTACTTG	AY498567
POX	F: GATCTTCGTGCTCGTGTTCA R: TGCGAATGTTTTGCTGTCTC	

بررسی فعالیت آنزیمی

روش عصاره گیری برای اندازه‌گیری میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای تهیه ۵۰ میلی‌لیتر بافر استخراج، ۰/۶۰۷ گرم تریس را با ۰/۰۵ گرم PVP در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌خوبی حل کرده و سپس با اسیدکلریدریک pH محلول را به ۸ تنظیم و بعد از آن محلول را به حجم نهایی ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و از آن برای عصاره گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. (بافر تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد). جهت عصاره گیری، ابتدا ۰/۵ گرم از پودر نمونه‌های برگی از همه بازه‌های زمانی گفته‌شده در بالا در سه تکرار نگهداری شده در فریزر ۷۲- درجه سلسیوس در لوله‌های ۲/۵ میلی‌لیتری آماده، سپس ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج به آن اضافه شد. مخلوط حاصل را در لوله اپیندورف و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ در جهت سلسیوس سانتریفیوژ نموده و پس‌ازآن فاز بالایی جهت تعیین میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها جدا شد.

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

برای تعیین غلظت پروتئین کل از روش برادفورد (Bradford, 1967) استفاده شد.

اندازه‌گیری محلول پراکسیداز (PRX)

برای اندازه‌گیری میزان غلظت کمی این آنزیم از روش چنس و ماهلی(Chance and Maehly) با اندکی تغییرات استفاده شد (Chance and Maehly, 1995). اندازه‌گیری بر اساس میزان اکسید شدن گایکول (Gaiacul) توسط این آنزیم انجام می‌گیرد. در این روش ۳۳ میکرولیتر از عصاره استخراج را با یک میلی‌لیتر از محلول پراکسیداز که شامل ۱۳ میلی مولار گوایکول، ۵ میلی مولار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و ۵۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (PH= ۸) است مخلوط نموده و به مدت یک دقیقه با فواصل ۱۰ ثانیه در طول‌موج nm ۴۷۰ جذب آن خوانده شد. برای ساختن ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم، ۳۹ میلی‌لیتر فسفات پتاسیم مونو بازیک ۵۰ میلی مولار را با ۶۱ میلی‌لیتر فسفات پتاسیم دی بازیک ۵۰ میلی مولار ترکیب شد.

اندازه‌گیری محلول آسکوربات پراکسیداز (APX)

برای اندازه‌گیری میزان غلظت کمی این آنزیم از روش ناکانو و آسادا استفاده شد (Nakano and Asda, 1989). بر این اساس ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج را با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری اسکوربیک پراکسیداز که شامل ۵۰ میلی مول بافر فسفات پتاسیم (pH=۸)، ۰/۱ میلی مول EDTA، ۰/۵ میلی مولار اسید اسکوربیک (ASA) و ۰/۱۵ میلی مولار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است مخلوط شد. سپس جذب آن در طول‌موج ۲۹۰nm بعد از مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. یک واحد آنزیمی اسکوربیک پراکسیداز برابر با تجزیه یک میلی مولار اسید اسکوربیک در یک دقیقه است.

اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز (CAT)

برای اندازه‌گیری میزان غلظت کمی این آنزیم از روش دهیندزا (Dhindza, 1981) استفاده شد. بر اساس این روش ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج را با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری کاتالاز که شامل ۵۰ میلی مول بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) و ۱۵ میلی مول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است مخلوط گردید. سپس جذب آن در طول‌موج ۲۴۰nm به مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. یک واحد آنزیمی کاتالاز برابر با تجزیه یک میلی مولار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در یک دقیقه است.داده‌ها در صفحه Excel مرتب و آنالیز آماری به کمک نرم‌افزار تجزیه آماری داده‌ها در سه تکرار توسط نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج

گسترش بیماری

پس از آلوده سازی ژنوتیپ‌ها، میزان توسعه بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که رقم اوکیتسو درجه بالایی از مقاومت در برابر *P. syringae* در مقایسه با نارنج و لایم کوآت بود. اندازه نقاط آب سوخته در اثر بیماری بلاست مرکبات در اوکیتسو تقریباً نصف دو رگ لایم کوات و در نارنج مقاومت بینابین بود (شکل۱). آنالیز آماری (p values < 0.001) با استفاده از آزمون Tuky تفاوت مشخصی را، بین سه رقم نشان داد(Heydarinezhad *et al*., 2016).

سطح بیان ژن POX

سطح بیان ژن پراکسیداز در دو رگ لایم کوات در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از آلودگی به باکتری *Pss*، بیشینه بیان داشت. در گونه نارنج و رقم اوکیتسو ۱۲ ساعت زودتر از لایم کوات، سطح بیان این ژن به اوج رسید. اختلاف معناداری در سطح پنج درصد در زمان ۲۴پس از آلودگی بین رقم اوکیتسو و نارنج و لایم کوآت وجود داشت. سطح بیان این ژن در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی در سطح ۵ درصد بین نارنج و اوکیتسو معنادار نبوده ولی با لایم کوآت معنادار است که نشان‌دهنده حساس بودن این رقم است. (شکل۲).

فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج بررسی آماری فعالیت آنزیم پراکسیداز حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین ارقام حساس و مقاوم قبل از آلودگی به باکتری *Pss* بود. لایم کوآت از پتانسیل کمتری در فعالیت این آنزیم برخوردار بود. روند تغییرات میزان تولید آنزیم در رقم اوکیتسو و گونه نارنج تا ساعت ۴۸ بعد از آلودگی صعودی بوده ولی در لایم کوات سیر صعودی تا ساعت ۷۲ و یا بیشتر حفظ شد. میزان تولید آنزیم پراکسیداز از بازه ۱۲ساعت تا ۷ روز بعد از آلودگی به باکتری *Pss* نشان داده شد. نتایج آنالیز آماری نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد بین ارقام حساس و مقاوم ازنظر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر بازه زمانی پس از آلودگی بود (شکل۳).

فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز در بررسی نشان داد هرچند تفاوت معنی‌داری در اغلب بازه‌های زمانی در بین ارقام بررسی‌شده وجود ندارد ولی سطح فعالیت آن به‌طور معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) در بازه زمانی ۲۴ ساعت پس از آلودگی در دو رگ لایم کوات بیشتر بود (شکل۴).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

تجزیه آماری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار در

سطح ۵ درصد بین ارقام حساس و مقاوم قبل از آلودگی به باکتری *Pss* بود. به‌طوری‌که رقم مقاوم اوکیتسو از پتانسیل کمی برای فعالیت این آنزیم برخوردار بود. میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بعد از آلودگی به باکتری *Pss* در دورگ حساس لایم کوآت روند صعودی داشته و در ساعت ۷۲ بعد از آلودگی به بیشترین مقدار خود رسید که و در سطح ۱ درصد با نارنج و اوکیتسو دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. در نارنج و اوکیتسو که مقاومت بالاتری نسبت به لایم کوآت دارند میزان آنزیم کاهش‌یافته و پایین‌ترین سطح در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی اتفاق افتاد (شکل۵).

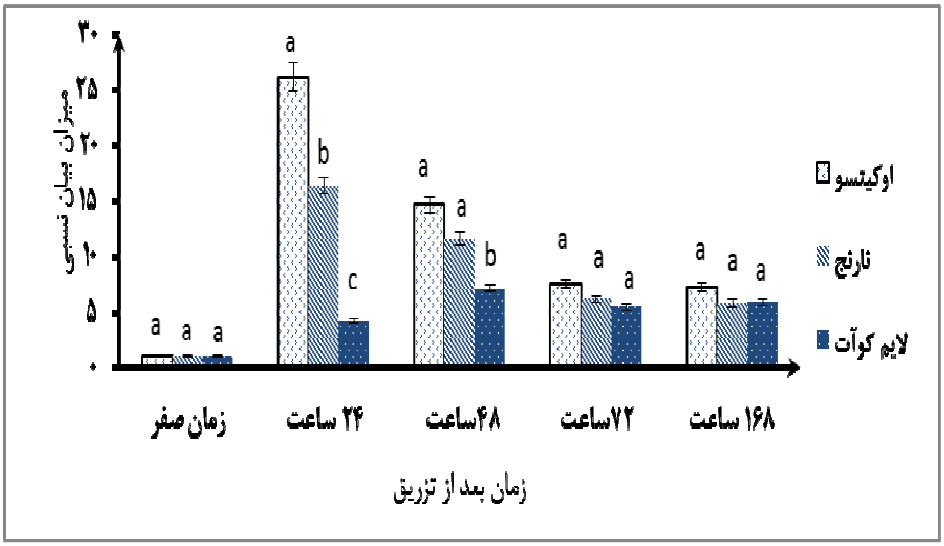
بحث

آنزیم‌های پراکسیداز از طریق لیگنینی شدن، استحکام دیواره آوند چوبی، تولید فرم‌های فعال اکسیژن، سنتز فیتوآلکسین‌ها و ترکیبات فنولی و فعالیت مستقیم خود در مقاومت گیاه به پاتوژن نقش دارند (Gang *et al*., 2010).

بر اساس بررسی‌های انجام‌شده توسط محققین، پراکسیدازها می‌توانند به‌عنوان یک آنزیم بیوکنترل عمل نموده لذا پراکسید هیدروژن را در حضور سوبستراهای مختلف اکسید کنند و هم آن را تولید نمایند (Blee *et al*., 2001). سطح بیان بالا و زودهنگام ژن پراکسیداز پس از اعمال آلودگی در ارقام مقاوم نسبت به حساس توسط (Nagela and Heba, 2011; Sasaki *et al*., 2004; Heydarinezhad *et al*., 2016) نیز گزارش شده است.

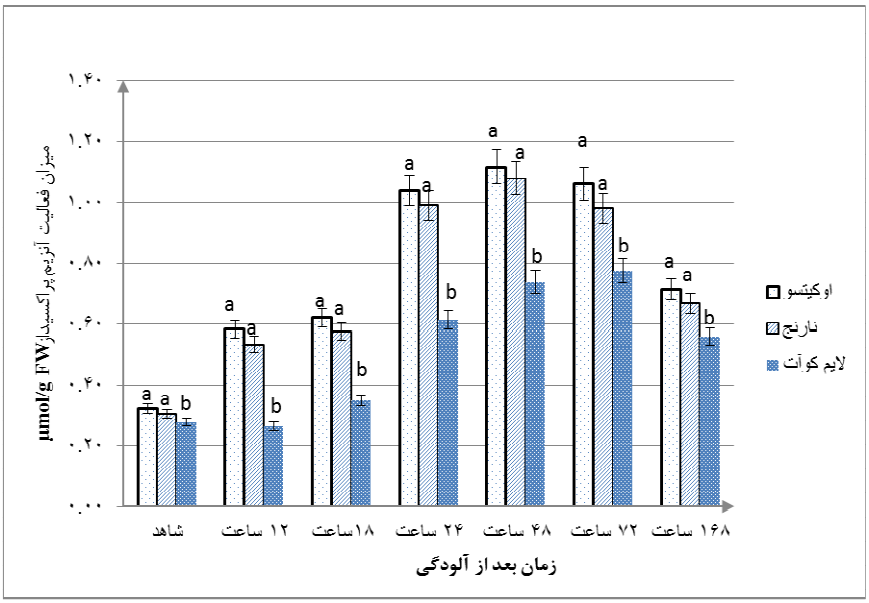
شکل ۱- پیشروی علائم بیماری بلاست در برگ ارقام به ترتیب از راست به چپ لایم کوات، انگشت بودا، نارنج، پرتقال فوکوموتو، لمون فینو، نارنگی اوکیتسو.

Figure 1- Development of disease symptom in leaves of lines, from Right to left: Limequat; fingered citron; sour orange; Fukumoto navel orange; finolemon and Okitso.



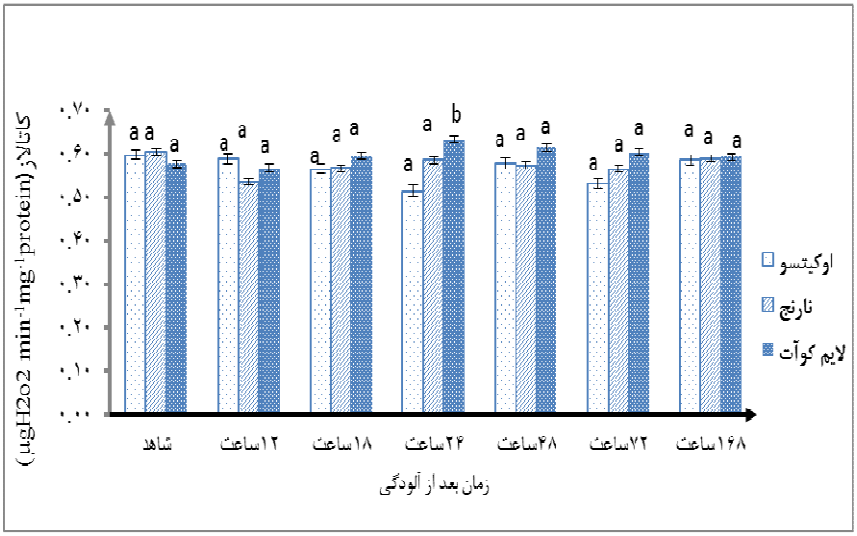
شکل ۲- بیان نسبی ژن پراکسیداز در لایم کوات، نارنج و اکیتسو بعد از مایه‌زنی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* بیان نسبی ژن با استفاده از روش منحنی استاندارد محاسبه شد. میانگین هایی که حرف مشترک دارند از نظر آماری با استفاده از آزمون دانکن ($P < 0.05$) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 2- Relative expression levels of peroxidase gene in Limequat, sour orange and Okitso after inoculation with Pss. Relative gene expression was calculated using the standard curve method. Means followed by the same letters are not significantly different for P < 0.05 according to the Duncan's test.



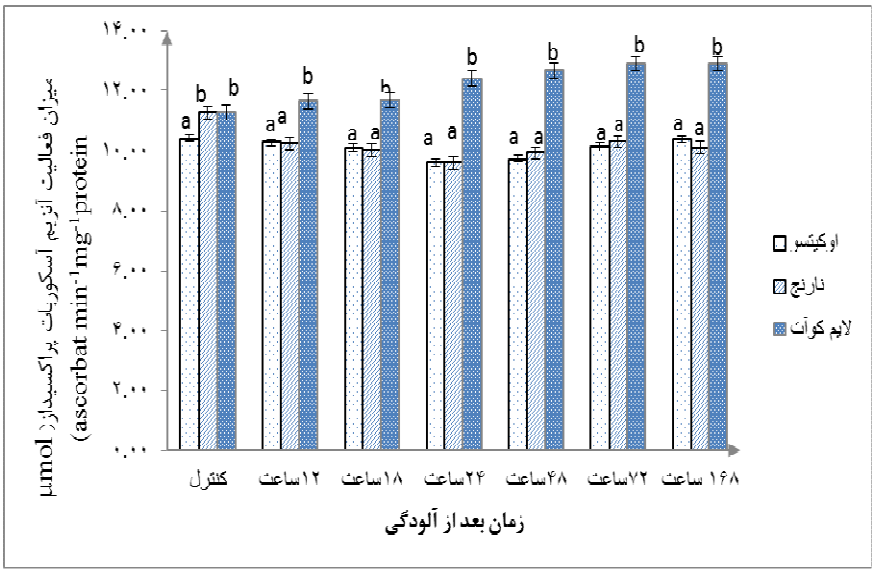
شکل ۳- فعالیت آنزیم پراکسیداز در اوکیتسو، نارنج و لایم کوات در بازه‌های زمانی مختلف پس از آلودگی با *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* میانگین هایی که حرف مشترک دارند از نظر آماری با استفاده از آزمون دانکن ($P < 0.05$) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 3- Peroxidase enzyme activity at different time intervals after inoculation of Limequat, sour orange and Okitso with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Means followed by the same letters are not significantly different for P < 0.05 according to the Duncan's test.



شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در اوکیتسو، نارنج و لایم کوات در بازه‌های زمانی مختلف پس از آالودگی با *Pseudomonas syringae* pv *syringae* . میانگین هایی که حرف مشترک دارند از نظر آماری با استفاده از آزمون دانکن ($P < 0.05$) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 4- Catalase enzyme activity at different time intervals after inoculation of Limequat, sour orange and Okitso with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Means followed by the same letters are not significantly different for P < 0.05 according to the Duncan's test.



شکل ۵- میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اوکیتسو، نارنج و لایم کوات در بازه‌های زمانی مختلف پس از آالودگی با *Pseudomonas syringae* pv *syringae* .میانگین هایی که حرف مشترک دارند از نظر آماری با استفاده از آزمون دانکن ($P < 0.05$) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 5- Ascorbate peroxidase enzyme activity at different time intervals after inoculation of Limequat, sour orange and Okitso with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Means followed by the same letters are not significantly different for P < 0.05 according to the Duncan'stest.

بیان ژن POX در نارنج و اوکیتسو در ساعات اولیه، ۲۴ ساعت بعد از تزریق باکتری به اوج رسید (شکل۱). نتایج سایر محققین نشان داد که در چند ساعت بعد از آلودگی مقداری بیان ژن پراکسیداز در گیاه بالا می‌رود تا با تولید گونه‌های اکسیژن فعال، رسوب دادن ترکیبات فنولی و لیگنینی شدن دیواره سلولی از ورود بیمارگر جلوگیری می‌کند (Bhuiyan *et al*., 2009). نشان داده شد که اوج بیان آن در ساعت ۲۴ بعد از آلودگی دیده می‌شود که با القای مرگ سلولی از پیشرفت بیماری جلوگیری می‌کند(Schweizer, 2008). در لایم کوات میزان بیان این ژن با ۱۲ ساعت تأخیر نسبت به دو گونه و رقم دیگر در ساعت ۴۸ به بیشینه خود رسید که می‌تواند تأییدکننده حساسیت بیشتر این دورگ نسبت به نارنج و اوکیتسو باشد. میزان بیان ژن POX در دورگ لایم کوات در ساعت ۷۲ کاهش داشت اما در بازه ۱۶۸ ساعت بعد از آلودگی، میزان بیان آن مجدداً افزایش یافت که به نظر می‌رسد به دلیل افزایش تحریک گیاه توسط باکتری بیمارگر در زمان بروز علائم است. در گونه و ارقام مقاوم‌تر میزان بیان این ژن بعد از اوج گرفتن در ساعت ۲۴ در ساعت ۴۸ کاهش می‌یابد اما نسبت به رقم حساس بیان بیشتری نشان داد که می‌تواند بیانگر واکنش دفاعی موفقیت‌آمیز در این‌گونه و ارقام باشد (Liu *et al*., 2005).

بررسی عوامل دخیل در مرگ سلولی نشان داده که یکی از عوامل اصلی ایجادکننده آن، ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال است که منجر به تغییر عوامل دخیل در حفظ ترکیبات غشایی، ترکیبات ضد انجماد، آنتی‌اکسیدانت‌ها و فرایندهای متعدد دیگر می‌باشند (Cao *et al*., 2010). زمانی که گیاه تحت استرس قرار می‌گیرد میزان گونه‌های اکسیژن فعال افزایش می‌یابد (Polle, 2001). افزایش این مواد اگرچه از جمعیت باکتری جلوگیری می‌کند (Peng and cuk, 1992) اما به نوکلوئیک اسید، پروتئین، رنگ‌دانه‌ها و چربی خسارت وارد می‌کند (Mendel, 2001). گیاهان برای کاهش خسارت ترکیبات اکسیژن فعال دفاع‌های آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی یا غیر آنزیمی را فعال می‌کنند (Apel and Hirt, 2004). ازجمله این دفاع‌های آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی می‌توان به آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز اشاره کرد (Liu, 2008). همچنین گزارش‌شده که پراکسیداز پس از کاتالاز در درجه دوم اهمیت در حذف پراکسید هیدروژن نقش ایفا می‌کند (Kunz *et al*., 2004). فعالیت آنزیم پراکسیداز (PRX) به‌عنوان پاسخ اولیه و زودهنگام در تعامل بین گیاه و بیمارگر است، به‌طوری‌که افزایش فعالیت این آنزیم با مقدار پراکسید هیدروژن گیاهان در هنگام تنش رابطه مستقیمی دارد (Sasaki *et al*., 2004). آلودگی برگ کام کوات به *Xanthamonas axopodonis* subsp. *citri* افزایش در میزان پراکسیداز را نشان

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

می‌دهد (Kumar *et al*., 2011). آلودگی برگ لایم به *Xannthomonas citri* subsp. *citri* با افزایش در میزان آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز همراه بود (Rasoulnia, 2013). آلودگی برگ گریپ‌فروت به شانکر باکتریایی مرکبات باعث افزایش پراکسیداز و کاتالاز شد (Kumar *et al*., 2013).

نتایج این بررسی نشان داد میزان آنزیم پراکسیداز در رقم مقاوم اوکیتسو بیشتر از ارقام با حساسیت بیشتر نارنج و لایم است. ازآنجایی‌که بیش‌ترین میزان گونه‌های اکسیژن فعال در مراحل ابتدایی تولید می‌شود گیاهی مقاومت بالاتری خواهد داشت که در همان ساعات اولیه آنزیم بیشتری تولید کند تا از تخریب‌های گونه اکسیژن فعال جلوگیری کند. با توجه به میزان تولید آنزیم پراکسیداز در سه گونه و رقم مشاهده شد که بالاترین سطح آن برای رقم اوکیتسو و گونه نارنج، در ساعت ۴۸ و در دورگ حساس‌تر لایم کوات در ساعت ۷۲ است. میزان اوج بیان ژن POX نیز در رقم اوکیتسو و نارنج در ساعت ۲۴ و در لایم کوات در ساعت ۴۸ بود (شکل ۱). این اختلاف می‌تواند احتمالاً به دلیل تأخیر در تخریب این آنزیم در سلول باشد به‌طوری‌که علی رقم کاهش بیان ژن میزان فعالیت آنزیم در سلول در سطح بالایی باقی می‌ماند. بر اساس نتایج این مطالعه فعالیت بالای آنزیم پراکسیداز می‌تواند به دلیل نقش این آنزیم در اتصالات عرضی و سنتز لیگنین در دیواره سلولی باشد. به‌طوری‌که این گیاهان به‌منظور مقابله با نفوذ بیمارگر با بستن منافذ دیواره سلولی از طریق افزایش قطر دیواره، سطح فعالیت پراکسیدازهای خود را در سلول افزایش می‌دهند و از سویی با تولید پراکسید هیدروژن سبب القای مرگ سلولی، در صورت پیشرفت بیماری می‌گردند، تا از نفوذ و توسعه بیمارگر ممانعت نمایند. میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانت به‌ویژه پراکسیداز در ارقام مقاوم بیشتر از ارقام حساس است (Asthir *et al*., 2010). بنابراین، این نتایج بیانگر توانایی ارقام مقاوم در القای فعالیت آنزیم پراکسیداز است که با نتایج (Haetach *et al*., 2008; Mohamad, 2012) مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم تحت شرایط تنش مطابقت دارد. نتایج بررسی‌های دیگر محققین نیز بیانگر افزایش فعالیت آنزیم در ارقام مقاوم و حساس پس از آلودگی در گیاهان بود (Clarke *et al*., 2002).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش بسیار مهمی را به‌عنوان واسطه سیگنال دهی برای فعال کردن اتفاقات پایین‌دست ازجمله بیان ژن برای ایجاد مقاومت به استرس بازی می‌نماید (Bowler and Fluhr, 2002). نتایج این بررسی حاکی از این بود که میزان فعالیت آنزیم در دورگ حساس لایم کوآت بیشتر از گونه و ارقام با مقاومت بالاتر نارنج و اوکیتسو بود. نتایج این بررسی با نتایج (Chen *et al*., 2006; Rasoulnia *et al*., 2013; Kumar *et al*., 2011) مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم حساس در

آلودگی بیمارگر هم‌خوانی دارد. اخیراً گزارش‌شده است که در طی تعامل بین گیاه و بیمارگر، بیان آنزیم‌های سم‌زدای گونه‌های اکسیژن فعال مانند آسکوربات پراکسیداز سرکوب می‌گردد که این ممانعت نقش مهمی را در افزایش سطح گونه‌های اکسیژن فعال ایفا نموده و به‌موجب آن سبب القای مرگ سلولی و سایر پاسخ‌های دفاعی در طی حمله بیمارگر می‌گردد (Mittler *et al.*, 1998). اسید سالیسیلیک تولیدشده در طی فوق حساسیت، سبب غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز می‌گردد (Chen *et al.*, 1993). شواهد نشان داد که تجمع سالیسیلیک اسید در طی فوق حساسیت با ممانعت از اکسیداسیون آسکوربات سبب سرکوب نمودن فعالیت cAPX در گیاه می‌گردند (Chen *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1997). با سرکوب نمودن بیان APX در توتون تراریخت، سبب کاهش فعالیت این آنزیم در جاروب کردن پراکسید هیدروژن موجود در سلول شده که درنهایت این عمل منجر به القای مرگ سلولی در توتون تراریخت در پاسخ به حمله باکتری *P. syringae* گردید. بر اساس نتایج این بررسی می‌توان استنباط کرد که گونه و ارقام مقاوم احتمالاً سبب فعال شدن مکانیسم SAR و افزایش سیگنال SA در گیاه شده که می‌تواند منجر به سرکوب نمودن آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه گردد. با توجه به این موضوع که کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز سبب افزایش سطح پراکسید هیدروژن درون‌سلولی در گیاه شده که می‌تواند به‌عنوان پیامبر ثانویه از طریق فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی سبب القای PR پروتئین‌ها و پروتئین‌های دفاعی دیگر شود (Miller *et al.*, 1999). بنابراین، گونه و ارقام مقاوم احتمالاً با به‌کارگیری این مکانیسم دفاعی سبب القای مقاومت به بلاست در مرکبات می‌شود.

گیاه توانایی بالایی در استفاده از کاتالاز در تجزیه آب‌اکسیژنه در حمله بیمارگر دارد (Rasoulnia *et al.*, 2013) آنزیم کاتالاز از اهمیت بالاتری نسبت به سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت موجود در گیاه برخوردار است (Kunz *et al.*, 2004). این آنزیم در طی تعامل گیاه با حمله بیمارگر سرکوب می‌گردد. دو حالت مختلف برای بازدارندگی کاتالاز پیشنهادشده که در فوق حساسیت رخ می‌دهد: ۱- بازدارندگی فعالیت کاتالاز به‌وسیله سالیسیلیک اسید ۲- سرکوب نمودن دائمی کاتالاز در سطح mRNA (Chen *et al.*, 1993). سرکوب نمودن کاتالاز منجر به افزایش PCD القاشده توسط بیمارگر و القای مکانیسم‌های دفاعی در گیاه می‌گردد (Chen *et al.*, 1993) تفاوتی در میزان بیان ژن کاتالاز در هیچ‌یک از بازه‌های زمانی به‌جز ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی در ارقام متفاوت مرکبات مشاهده نشد. در این مقطع زمانی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در دو رگ حساس لایم کوآت بیشتر از رقم مقاوم‌تر نارنج و اوکیتسو بود. فعالیت بالا از کاتالاز در رقم حساس Alg-S نسبت به رقم

مقاوم Alg-R نشان داد که افزایش فعالیت کاتالازی با افزایش فعالیت بیمارگر همراه است (Vanaker *et al*., 1998). بر اساس نتایج این بررسی ارقام موردبررسی از پتانسیل نسبتاً متفاوتی برای القای فعالیت آنزیم کاتالاز برخوردار می‌باشند و رقم حساس با فعالیت بالای کاتالاز در جهت کاهش پراکسید هیدروژن سبب کاهش مرگ سلولی و حمایت از باکتری بیمارگر می‌گردد. مطالعات نشان داد که آنزیم کاتالاز جاروب کننده پراکسید هیدروژن تولیدشده طی اعمال تنش در گیاه است (Chen *et al*., 2009). اگر چه پراکسید هیدروژن در غلظت بالا برای گیاه می‌تواند سمی باشد اما در غلظت‌های پایین می‌تواند نقش مولکول سیگنال در گیاه داشته باشد. به‌طوری‌که القای پراکسیدهیدروژن در القای مرگ سلولی و فعال‌سازی ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (*PRs*) می‌تواند نقش مؤثری ایفا کند. میتلر و همکاران (۱۹۹۸) توتون تراریخت شده را برای کاهش CAT1 (AS1) با باکتری *P. syringae* القاکننده HR، آلوده نمودند و در گیاهان تراریختAS1، پاسخ‌های فوق حساسیت را به محض آلودگی‌های باکتریایی مشاهده نمودند که نشان داد کاهش آنزیم‌های کاتالاز سبب افزایش PCD القاشده تحت حمله بیمارگر می‌گردد. همچنین در طی HR القاشده توسط بیمارگر میزان بیان ژن کاتالاز در توتون‌های تراریخت شده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. آلودگی دو رگ حساس لایم کوآت به *Xannthomonas citri* subsp. *citri* با افزایش در میزان محتویات کلروفیل، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز آپوپلاستی بعد از آلودگی همراه بود (Rasoulnia *et al*., 2013). بنابراین ارقام مقاوم با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز پس از آلودگی سبب افزایش سطح فعالیت پراکسید هیدروژن در گیاه می‌گردند. پراکسید هیدروژن تولیدشده می‌توانند به‌عنوان یک سیگنال عمل نموده و سبب فعال‌سازی مسیر SAR در گیاه گردد و بدین ترتیب با القای پاسخ‌های مقاومتی از گیاه در برابر بیمارگر باکتریایی محافظت نمایند.

به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت سطح بیان ژن مورد مطالعه و میزان فعالیت آنزیمی، در مقاومت رقم اوکیتسو و نارنج دخالت دارند. ژن پراکسیداز بیان زودتری در گیاه نارنج و اوکیتسو نسبت به لایم کوات داشت که خود تأییدی برای اثبات حساس‌تر بودن رقم نارنج و لایم کوات با توجه به مشاهدات مزرعه‌ای است. در بررسی فعالیت آنزیمی، تولید پراکسیداز بیشترین میزان را در اوکیتسو و نارنج در بازه ۴۸ ساعت بعد از آلودگی داشت ولی در لایم کوآت در زمان ۷۲ به میزان اوج رسید که با میزان بیان ژن پراکسیداز همخوانی دارد. در آنزیم کاتالاز ، فقط در بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از آلودگی در دو رگ حساس لایم کوات در مقایسه با دو ژنوتیپ مقاوم معنی‌دار بود. دو رگ لایم کوات با فعالیت بالای کاتالاز در جهت کاهش پراکسید هیدروژن سبب

کاهش مرگ سلولی و حمایت از باکتری بیمارگر می‌گردد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز همانند کاتالاز در لایم کوات بالاتر از ارقام مقاوم است که احتمالاً میزان کم این آنزیم در ارقام با مقاومت بالاتر با افزایش پراکسید هیدروژن همراه است که به‌عنوان فعال‌کننده PR پروتئین‌ها است.

منابع

Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annual Review Plant Biology 55: 373–399.

Asthir B, Kundal A, Bains NS, Mann SK (2010). Stimulation of ant oxidative enzymes and polyamines during stripe rust disease of wheat. Biological Plantarum 54: 329-333.

Baker CJ, Orlandi EW (1995). Active oxygen in plant/pathogen interactions. Annual Review of Phytopathology 33: 299-321.

Bestwick CS, Brown IR, Mansfield JW (1998). Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a non-host hypersensitive reaction in lettuce. Plant Physiology 118: 1067–78.

Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y, king J (2009). Role of lignifications in plant defenses. Plant signaling & Behavior 4: 158-159.

Blee KA, Jupe SC, Richard G, Zimmerlin A, Davies DR, Bolwell GP (2001). Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (Phaseolus vulgaris L.) and related members of the gene family. Plant Molecular Biology 47: 607–620.

Bowler C, Fluhr R (2000). the role of calcium and activated oxygens for eotrolling croos-tolerance. Trends Plant Science 5: 241-246.

Caruso C, Chilosi G, Leonardi L, Bertini L, Magro P, Buonocore V and Caporale C (2001). A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. Phytochemistry 58: 743–750.

Chandrashekar S, Umesha S (2012). induction of antioxidant enzymes associated with bacterial spot pathogenesis in tomato. International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences 2: 22-34.

Chen Z, silver H, cleaning FD (1993). Active oxygen speeds in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylicacid. Science 262: 1883-1886.

Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. Plant Signaling and Behavior 4: 493–496.

Clarke SF, Guy PL, Vurritt PL, Jameson PE (2002). Changes in the activities antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment, Physiologic Plantarum 114: 257-164.

Curtis MD, Rae AL, Rusu AG, Harrison SJ, Manners JM (1997). peroxidase gene promoter induced by phytopathogens and methyl jasmonate in transgenic plants. Molecular Plant–Microbe Interaction 10: 326–338.

De Forchetti SM, Tigier A (1990) Indole-3-acetic acid oxidase and syringaldazine oxidase activities of peroxidase isozymes in soybean root nodules. Physiology Plant 79: 327–330.

Dean BB, Kolattukudy P (1976). Synthesis of suberin during wound healing in jade leaves, tomato fruit, and bean pods. Plant Physiology 58: 411–416.

Dempsey DA, Shah J, Klessig DF (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences 18: 547–575..

Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF and Scott IM (1997). Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. Physiology Plant 100: 241–254.

Gang DR, Wang J, Dudareva N, Nam KH, Simon J, Lewinsohn E, Pichersky E (2001). An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil (Ocimum basilicum L.). Plant Physiology 125: 539–555.

Gayoso C, Pomar F, Merino F, Bernal MA (2004). Oxidative metabolism and phenolic compounds in Capsicum annuum L. var. annuum infected by Phytophthora capsici Leon. Scientia Horticulturae 102: 1–13.

Haetach BD, Fodor J, Pogany M, Preuss J, Barna B (2008). Antioxidant, ethylene and membrane responses to powdery mildew infection of near- isogonics barley lines with various types of resistance. European Journal Plant Pathology 121: 21-33.

Harrison MJ, Lawton MA, Lamb CJ, Dixon RA (1991). Characterization of a nuclear protein that binds to three elements within the silencer region of a bean chalcone synthase gene promoter. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88: 2515–2519.

Heydari-Nezhad AM, Babaeizad V, Rahimian H (2016). Studying PR2 and PAL genes involvement in rice resistance against Acidovorax avenae subsp. Avenae. Journal Biotechnology Agriculture7: 67-82.

Hilaire E, Young SA, Willard LH, McGee JD, Sweat T, Chittor JM, Guikema JA and Leach JE (2001). Vascular defense responses in rice: Peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. Molcular Plant–Microbe Interaction 14: 1411–1419.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001). A large family of class III plant peroxidases. Plant Cell Physiology 42: 462–468.

Jwa NS, Agrawal GK, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H and Rakwal R (2006). Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. Plant Physiology and Biochemistry 44: 261-273.

Kumar N, Ebel RC and Roberts PD (2011). SOD activity in Xanthomonas axonopodis pv.citri infected leaves of kumquat. Journal of Hortical Science Biotechnology 86: 62–68.

Lagrimini LM (1991). Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. Plant Physiology 96: 577–583.

Lagrimini ML, Rothstein S (1987). Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. Plant Physiology 84:438–442.

Liu Z J, Zhang XL, Bai J-G, Suo B X, Xu PL, Wang L (2008). Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. Scientia Horticulturae 121: 138-143.

Mandal S, Mitra A, Mallick N (2008). Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between Solanum lycopersicum and Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. Physiological and Molecular Plant Pathology 72: 56–61.

Matsuyama N, Kozaka T (1981). Increase of peroxidase activity unrelatedwith resistance to rice blast disease. Annual Phytopathology Society Japan 47: 654–661.

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Science 7: 405–410.

Mittler R, Feng X, Cohen M (1998). Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. Plant Cell 10:461–474.

Nagela AA, Heba IM (2011). Impact of secondary metabolites and related coziness in flax resistance and or susceptibility to powdery mildew. World Journal Agriculture Science 7: 78-85.

Ojha S, ChandraChatterjee N (2012). Induction of resistance in tomato plants against Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici mediated through salicylic acid and Trichoderma harzianum. Journal Plant Protection Research 52: 220–225.

Peng M, Kuc J (1992). Peroxidase generated hydrogen peroxide a source of anti-fungal activity in vitro and on tobacco leaf disc. Phytopathology 82: 696–699.

Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barcelo A, Amaya I, Medina L, Alonso F J, Milrad S, Forchetti D, Tigier H, Valpuesta V (2001). A Tomato Peroxidase Involved in the Synthesis of Lignin and Suberin1. Plant Physiology 122: 1119–1127.

Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB (1997). Influence of salicylic acid on H2O2 production, oxidative stress and H2O2-metabolizing enzymes. Plant Physiology 115:137-149.

Rasoulnia A, Alavi SM, Askari H, Farrokhi N, Najafabadi MS (2013) Antioxidant activity and lipid peroxidation in response to citrus canker bacterial infection. International Journal of Farming and Allied Sciences 2: 1179-1184.

Sasaki K, Iwai T, Hiraga S, Kuroda K, Seo S, Mitsuhara I, Miyasaka A, Iwano M, Ito H, Matsui H (2004). Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. Plant and Cell Physiolog 45: 1442-1452.

Sayari M, Babaeizad V, Tajick-Ghanbari MA, Rahimian H (2016). Resistance of Two Rice Cultivars to the Sheath Blight Agent Rhizoctonia solani AG1-1A. Journal of Agricultural Biotechnology 7: 97-112.

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1993). Plant pathogenesis-related‟ proteins and their role in defense against pathogens. Biochemistry 75: 687-706.

Stoessl A (1967). The antifungal factors in barley. IV. Isolation, structure, and synthesis of the hordatines. Candinan Journal Chemistry 45: 1745–1760.

Thordal-Christensen H, Brandt J, Cho BH, Gregersen PL, Rasmussen SK, Smedegaard-Petersen V, Collinge DB (1992). cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus Erysiphe graminis. Physiology Molcular Plant Pathology 40: 395–409.

Van Loon L (1975). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from Nicotiana tabacum var. „Samsun‟ and „Samsun NN‟: IV. Similarity of qualitative changes of specific proteins after infection with different viruses and their relationship to acquired resistance. Virology 67: 566-575.

Van Loon L, Van Strien E (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85-97.

Van Loon L, Rep M and Pieterse C (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review Phytopathology 44: 135-162.

Vera P, Tornero P, Conejero V (1993). Cloning and expression analysis of a viroid-induced peroxidase from tomato plants. Molcular Plant Microbe Interaction 6: 790–794.

Vidhyasekaran P (2002). Bacterial disease resistance in plants: molecular biology and biotechnological applications: Routledge. Food Products Press. Binghamton, USA. 322pp.

Ye XS, Pan SQ, Kuc J (1990). Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold (Peronospora tabacina) and to tobacco mosaic virus. Phytopathology. 80:1295-1298.

Young CB, Jung J (1999). Water-induced oxidative stress and antioxidant defenses in rice plants. Journal Plant Physiology. 155: 255–261.

Zhang S, Klessig DF (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. The Plant Cell Online. 9: 809-824.

Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice Nucleic Acids. Plant Pathology 42: 10903–10914.

Peroxidase gene expression and antioxidant enzymes activity in three citrus genotypes in challenging with bacterial blast agent Pesudomonas syringae pv. Syringae

Khaksari M., Babaeizadeh V., Rahimian H.[3], Beygi F.[4]

[1]M. Sc. Student, Department of Sari Agriculture Science and Resources University, Sari, Iran.
[2]Associate professor, Department of Sari Agriculture Science and Resources University, Sari, Iran.

[3]Professor, Department of Sari Agriculture Science and Resources University, Sari, Iran.

[4]Assistant professor of Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran. Iran.

Abstract

Citrus blast is a widespread disease citrus in most citrus growing areas of the world except in tropical regions. The disease is predominantly incited by strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae.* The reaction of the plants to infection with pathogen is manifested by metabolic changes in tissues exemplified by generation of reactive oxygen species and expression of genes involved in systemic acquired resistance (SAR). In the present study the expression of some defense genes including catalase, peroxidase and ascorbate oxidase was determined in three species and cultivar of citrus (Okitso Satsuma mandarin, Sour orange and limequat) using real-time PCR at different time intervals following injection-inoculation of the plant leaves. Expression of peroxidase peaked at 24 hours post inoculation (hpi) in satsuma mandarin and sour orange. Whereas in limquat it peaked at 48 hpi. The peroxidase level also showed an elevating trend, albeit more slowly, peaking 48 hpi in Okitso satsuma and sour orange and 12 hpi in limequat. The trend with catalase and ascorbate oxidase was the revers and elevated only in limequat plants. Therefore, the level of peroxidase in the resistant citrus species was higher than the susceptible limquat plant, whereas catalase and ascorbate oxidase levels was lower in the resistant species leading to build up of hydrogen peroxidase in the tissues appearance of the resistant phenotype.

Key word: *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae, antioxidant enzymes, bacterial blast.*