

تغییرات آنزیم‌های مرتبط با دفاع در گیاهچه چغندر قند رقم Brigita علیه ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندر قند (BSCTV) و باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین CHA0

عفت عالم‌زاده^{۱*}، کرامت‌اله ایزدپناه^۱، موسی زارعی^۲، علی‌اکبر بهجت‌نیا^۱

۱. مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

چکیده

تنش‌های مختلف محیطی شامل تنش‌های زنده و غیرزنده سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند از جمله این تنش‌ها می‌توان به برهمکنش گیاه-ویروس اشاره کرد. گیاهان با دارا بودن سیستم ضد اکسنده که شامل ترکیبات آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشد معمولا سطوح رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در سلول در حد متعادل نگه می‌دارند. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندر قند (BSCTV) و همچنین اثر این ویروس به همراه باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین CHA0 بر نحوه فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده در یک رقم حساس چغندر قند (Brigita) می‌باشد فعالیت ترکیبات آنزیمی ضداکسنده در این بررسی با استفاده از دستگاه طیف سنج در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که وقتی علائم شدید آلودگی روی برگ‌ها گسترش می‌یابد و مقدار ویروس به حداکثر می‌رسد افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده آسکوربیت پراکسیداز، پراکسیداز و کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده می‌شود. همچنین در تنش ویروس به همراه باکتری میزان فعالیت آنزیم‌ها در همه موارد با مقداری کاهش نسبت به گیاهان تحت تنش ویروس به تنهایی همراه بوده‌است.

واژه‌های کلیدی: ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندر قند، آنزیم‌های ضداکسنده، باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین CHA0

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ealeMZadeh@shirazu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۱۹

مقدمه

تنش‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا به طور جدی تولید محصولات زراعی را در مناطق مختلف محدود می‌کند. بیماری پیچیدگی بوته یا کرلی‌تاپ یکی از بیماری‌های مهم اقتصادی چغندر قند در نواحی خشک و نیمه‌خشک جهان است که توسط حداقل پنج گونه ویروس متعلق به تیره *Geminiviridae* ایجاد می‌شود. در ایران تاکنون دو گونه *Beet severe curly top virus* (BSCTV) و *Beet curly top Iran virus* (BCTIV) به عنوان عوامل ایجادکننده بیماری پیچیدگی بوته چغندر قند و چند محصول گیاهی دیگر از جمله گوجه‌فرنگی و فلفل گزارش شده‌اند (Briddon *et al.*, 1998; Bolok Yazdi *et al.*, 2008). تولید گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species, ROS) یک ویژگی معمول از اینگونه برهمکنش‌های گیاه-بیمارگر است. در تنش‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا تجمع رادیکال‌های اکسیژن فعال مانند رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) بخوبی شناسایی شده‌اند. مولکول ROS به طور معمول به میزان کم در سلول‌ها گیاهی بدون تنش در کلروپلاست و میتوکندری و همچنین توسط سیتوپلاسم متصل به غشا یا آنزیم‌های بیرون سلولی درگیر در واکنش‌های اکسیداسیون کاهشی تولید می‌شوند. علاوه بر این مولکول ROS به طور بالقوه دارای پتانسیلی است که با بسیاری از ترکیبات سلولی واکنش داده و سبب خسارت به غشا و سایر ماکرومولکول‌های ضروری از قبیل رنگدانه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها می‌شود، بنابراین میزان آن باید در سلول کنترل شود (Blokhina *et al.*, 2003). گیاهان با دارا بودن سیستم ضد اکسنده که شامل ترکیبات آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلووتاتیون پراکسیداز، آسکوربیت پراکسیداز و گلووتاتیون ردوکتاز) و غیر آنزیمی (اسید آسکوربیک، گلووتاتیون، کارتنوئیدها و توکوفرول) می‌باشد معمولاً سطوح ROS را در سلول در حد متعادل نگه می‌دارند (Al-aghaby *et al.*, 2004; Sgherri *et al.*, 2013).

باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) ترکیبات بهبود دهنده رشد گیاه نظیر هورمون‌های گیاهی اکسین، سایتوکینین، جیبرلین و سیدروفور را تولید می‌کنند و پپتیدهای ضدباکتریایی این باکتری‌ها باعث جلوگیری از رشد نژادهای بیماری‌زای آنها می‌شوند. باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین CHA0 از طریق تولید ترکیبات مختلفی از جمله سیدروفور پیووردین، سالیسیلیک اسید، ایندول استات و متابولیت‌های سمی، یک عامل بیوکنترل موثر علیه بیماری‌های ایجاد شده توسط بیمارگرهای خاک‌برد در مطالعات گلخانه‌ای می‌باشد. از این رو این باکتری از طریق تولید ترکیبات مختلف قادر به القا تنش و در نتیجه القای مکانیسم‌های مقاومت سیستمیک یا ISR در گیاه میزبان در برابر تنش‌ها می‌باشد. این مقاومت القا شده باعث ایجاد موانع فیزیکی در دیواره سلولی و همچنین باعث تغییرات

فیزیولوژیکی و واکنش‌های بیوشیمیایی در میزبان علیه بیمارگر می‌شود (Maurhofer et al., 1992; Maurhofer et al., 1994; Van-Loon et al., 1998). هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندر قند (BSCTV) و همچنین اثر این ویروس به همراه باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین CHA0 بر نحوه فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در یک رقم حساس (Brigita) (Fattahi et al., 2012) چغندر قند می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱- آماده‌سازی گیاه

بذور چغندر قند رقم Brigita حساس به ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندر قند (BSCTV) در خاک اتوکلاو شده و در گلدان‌های استریل به شکل خزانه کشت و در شرایط گلخانه (۲۵ درجه سلسیوس) نگهداری شد. علاوه بر این به تعدادی از گلدان‌های دارای خاک استریل (اتوکلاو شده دوبار با فاصله دو روز) به ازای هر گرم خاک 10^7 کلنی ($CFU/gr = 10^7$) از باکتری *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 به روش (Maurhofer et al., 1994) و همکاران (۱۹۹۴) اضافه شد. بطور اختصار، باکتری *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 کشت شده در محیط king B بعد از ۴۸ ساعت از سطح پتری دیش جدا شده و در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر دو بار استریل حل شدند و بلافاصله به خاک اتوکلاو شده در گلدان‌ها اضافه می‌شود. بعد از دو روز کشت نشای چغندر قند از خزانه در گلدان‌های حاوی باکتری انجام گرفت. سپس مایه‌زنی گیاهان کشت شده با همسانه عفونت‌زای دارنده ویروس بعد از شش هفته انجام شد.

۲- تهیه زادمایه برای مایه‌زنی بوته‌ها

در این مرحله از محلول ذخیره باکتری *Rhizobium radiobacter* استرین C58 (نگهداری شده در شرایط ۷۰- درجه سلسیوس در مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی دانشگاه شیراز) که حاوی همسانه‌های عفونت‌زای BSCTV بود استفاده شد. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر از محلول ذخیره‌ای به سه میلی لیتر محیط کشت مایع سترون LB حاوی ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر آنتی‌بیوتیک‌های ریغامپسین و کانامایسین اضافه و باکتری در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه سلسیوس، به مدت ۴۸ ساعت در حالت تکان خوردن رشد داده شد. غلظت باکتری‌های کشت شده در طول موج ۶۰۰ نانومتر با $OD=1$ ($CFU/gr = 10^7$) تنظیم گردید (Ebadzad, 2008).

۳- مایه‌زنی بوته‌ها به روش آگرواینوکولیشن

مایه‌زنی گیاهان چغندرقد رقم Brigita به روش آگرواینوکولیشن دارای همسانه عفونت‌زای BSCTV صورت گرفت. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از زادمایه‌های تهیه شده، به جوانه‌های جانبی و طوقه هر یک از گیاهان بعد از شش هفته با استفاده از سرنگ Hamilton تزریق گردید. در گلدان‌های شاهد از آب برای تزریق استفاده شد. از هر تیمار (آلوده، شاهد و آلوده به همراه باکتری) سه گلدان بعنوان تکرار در نظر گرفته شد. (Ebadzad Sahraei *et al.*, 2008).

۴- سنجش بیماری‌زایی ویروس

بعد از گذشت ۲۸ روز از زمان تلقیح علائم حاصل در گیاهان مایه‌زنی شده مورد بررسی قرار گرفت. استخراج دی‌ان‌ا با استفاده از CTAB انجام گرفت. سپس اثبات حضور دی‌ان‌ای ویروس از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی BSCTV-IR مورد بررسی قرار گرفت.

۵- سنجش آنزیم‌های ضد اکسنده

نمونه‌برداری از برگ گیاهان چغندرقد (۵/۰ گرم) ۲۸ روز پس از مایه‌زنی با همسانه عفونت‌زا انجام گرفت. سپس میزان تغییرات آنزیمی تعدادی از آنزیم‌های مرتبط با مقاومت با استفاده از دستگاه طیف سنج (UV/Vis 2100 spectrophotometer, Unico, USA) در دمای اتاق بررسی شد.

۵-۱- تهیه عصاره آنزیمی

نمونه‌های نیم گرمی از برگ‌های گیاهی در زمان نمونه‌برداری در داخل هاون در ازت مایع کوبیده و پودر شد. بعد از پودر شدن بافت ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) به آن اضافه نموده و مخلوط حاصل دوباره سائیده شد. سپس ۳ میلی‌لیتر از بافر استخراج (بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار pH=۷) اضافه گردید. پس از اینکه نمونه‌ها بخوبی له شد، عصاره گیاهی حاصل در سرعت ۱۵۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس فاز شفاف رویی جدا گردید. رونشین حاصل در حجم‌های کوچکتر تقسیم شد و بعد از انجماد در نیتروژن مایع به فریزر با دمای ۷۰- درجه سلسیوس منتقل شد. همه مراحل تهیه عصاره آنزیمی در دمای ۴ درجه سلسیوس صورت گرفت (Garmendia *et al.*, 2004).

۵-۲- کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC 1, 11, 1,6) به روش (Aebi, 1984) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۱۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۷۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار محلول در بافر فسفات

پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH = ۷) می‌باشد. مخلوط در کیووت مورد نظر ریخته شده و بوسیله آن جهت تعیین هضم تدریجی دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر بلنک گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی استخراج شده به آن اضافه گردید و فعالیت آنزیم کاتالاز در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه و بر حسب Abs/min اندازه‌گیری شد.

۳-۵- آسکوربیت پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز (APX, EC 1.11, 1.11) به روش (Nakano & Asada (1987) اندازه‌گیری گردید. مخلوط واکنش حاوی ۲۵۵۰ میکرولیتر آسکوربیت ۰/۵ میلی مولار محلول در بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH = ۷) و ۴۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۲ میلی مولار محلول در آب دوبار تقطیر می‌باشد. از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی در یک کیووت بعنوان شاهد اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر استفاده گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به آن اضافه شد و فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه بر حسب Abs/min اندازه‌گیری شد.

۴-۵- پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX, EC 1,11,1,7) به روش (Chance & Maehly 1995) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH = ۷)، ۷۵۰ میکرولیتر گواپیکول ۱۰ میلی مولار محلول در آب دوبار تقطیر، ۹۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی مولار محلول در بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH = ۷) و ۷۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل شده می‌باشد. مخلوط واکنش به اضافه ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در یک کیووت ریخته شده و با قرار گرفتن در دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در طول موج ۴۷۰ نانومتر و در مدت زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی به عنوان شاهد اسپکتروفتومتر استفاده گردید.

۵-۵- گواپیکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گواپیکول پراکسیداز (GPX, EC 1,11,1,7) به روش (Polle *et al.*, 1994) اندازه‌گیری شد. ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار با (pH = ۷) که حاوی به ترتیب ۲۰ و ۱۰ میلی مول گواپیکول و پراکسید هیدروژن در لیتر بود با ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی کاملاً مخلوط شده و با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نوری در طول موج ۴۳۶ نانومتر به مدت ۵ دقیقه در فواصل ۲۰ ثانیه خوانده شد. مخلوط فوق بدون گواپیکول به عنوان شاهد استفاده شد.

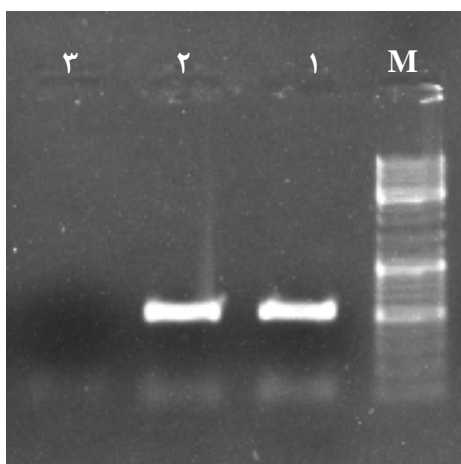
۶- تجزیه و تحلیل آماری

اندازه‌گیری هر یک از عوامل ذکر شده به صورت طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن سه تکرار صورت گرفت. بررسی داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS انجام گرفت و میانگین‌ها به وسیله‌ی آزمون دانکن در سطح احتمال مربوطه با یکدیگر مقایسه گردید.

نتایج

سنجش بیماری‌زایی ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندر قند

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BSCTV-IR تکثیر قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۴۹۵ جفت باز می‌باشد. تکثیر این قطعه نشان‌دهنده حضور ویروس در گیاهان مورد نظر می‌باشد.

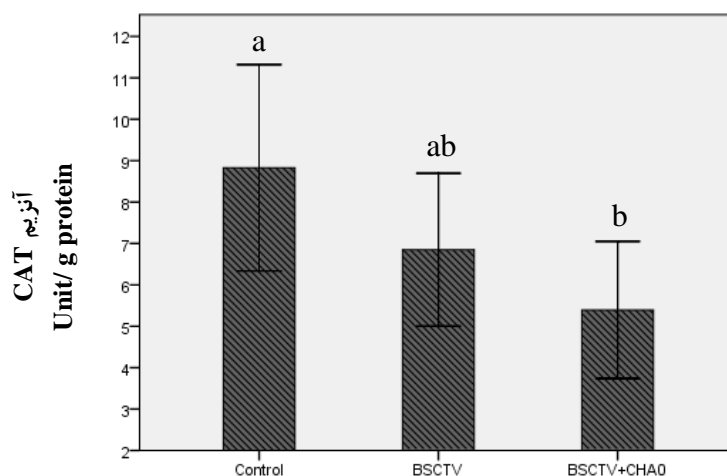


شکل ۱- تکثیر قطعه ۴۹۵ جفت بازی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BSCTV-IR. راهک ۱: گیاهان چغندر قند کشت شده در خاک سالم، راهک ۲: گیاهان چغندر قند کشت شده در خاک آلوده به باکتری *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0، راهک ۳: گیاهان شاهد و راهک M: مارکر.

Figure 1. 495 bp fragment obtained by PCR using specific primers BSCTV-IR. Line 1: Sugar beet plants grown in healthy soil, Line 2: Sugar beet plants grown in soil contaminated with *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0, Line 3: Control and line 5: Marker.

ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز

طبق نتایج تجزیه واریانس با اعمال تنش ویروس و تنش ویروس به همراه باکتری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تفاوت آماری معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده شد. همانگونه که در مقایسه میانگین مربوطه مشاهده می‌شود کمترین میزان آنزیم کاتالاز در تیمار ویروس به همراه باکتری و بیشترین میزان آنزیم کاتالاز در تیمار عدم تلقیح ویروس به ترتیب با میانگین میزان فعالیت ۵/۳۹۴۲ و ۸/۸۲۹۱ واحد بر گرم پروتئین بدست آمد (جدول ۱ و شکل ۲).



شکل ۲- اثر تیمارهای آلوده به BSCTV و BSCTV به همراه باکتری *P. fluorescens* بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در مقایسه با کنترل (گیاه سالم).

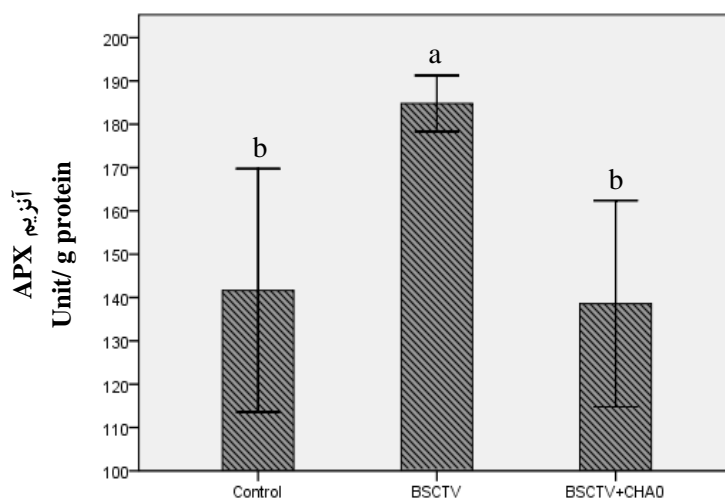
Figure 2. Effects of BSCTV and BSCTV with *P. fluorescens* on the activity of catalas (CAT) compared with controls (healthy plant).

ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان می‌دهد که با اعمال تنش ویروس و همچنین تنش ویروس همراه با باکتری تفاوت آماری در سطح ۱ درصد مشاهده شود. همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۱) نشان می‌دهد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز مربوط به گیاهان تحت تنش ویروس با سطح اطمینان ۹۹ درصد می‌باشد و کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز مربوط به گیاهان تحت تنش به همراه باکتری CHA0 می‌باشند که البته دارای تفاوت معنی داری با میزان آنزیم در نمونه کنترل نمی‌باشد. (شکل ۳).

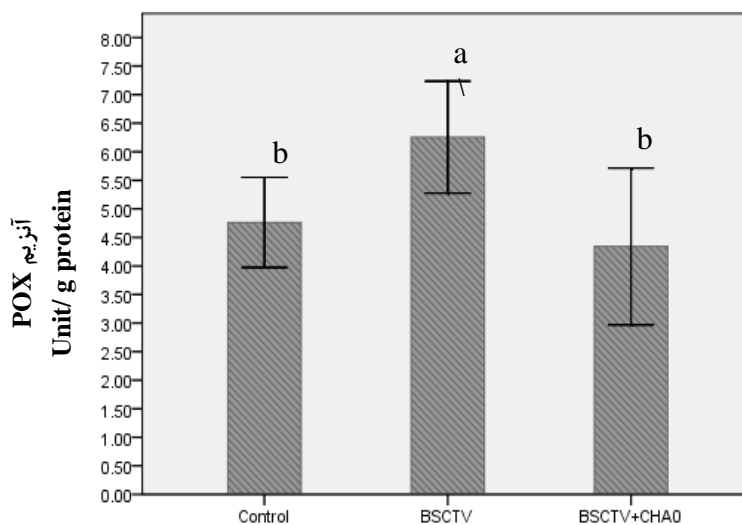
ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز

در این تحقیق فعالیت آنزیم پراکسیداز در اثر تنش ویروس افزایش یافت و نتایج تجزیه واریانس نشانگر تفاوت آماری معنی داری در سطح ۵ درصد می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین (جدول ۱) نشان می‌دهد بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به اعمال تنش ویروس و برابر ۶/۲۵۵۶ واحد آنزیم بر گرم پروتئین و کمترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به اعمال تنش ویروس به همراه باکتری و برابر با ۴/۳۴۰۹ واحد آنزیم بر گرم پروتئین می‌باشد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که تنش ویروس به تنهایی قادر به افزایش بیشتر آنزیم است و در تنش ویروس به همراه باکتری مقدار آنزیم پراکسیداز کاهش یافته است (شکل ۴).



شکل ۳- اثر تیمارهای آلوده به BSCTV و BSCTV به همراه باکتری *P. fluorescens* بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز (APX) در مقایسه با کنترل (گیاه سالم).

Figure 3. Effects of BSCTV and BSCTV with *p. fluorescens* on the activity of ascorbic peroxidase (APX) compared with controls (healthy plant).



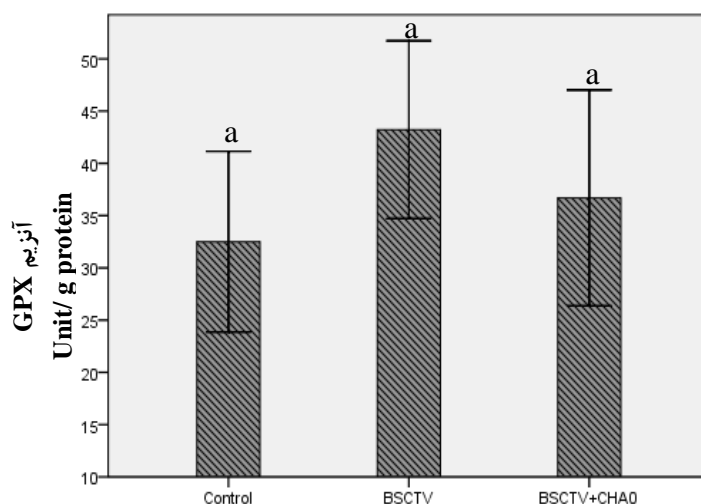
شکل ۴- اثر تیمارهای آلوده به BSCTV و BSCTV به همراه باکتری *P. fluorescens* بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) در مقایسه با کنترل (گیاه سالم).

Figure 4. Effects of BSCTV and BSCTV with *p. fluorescens* on the activity of peroxidase (POX) compared with controls (healthy plant).

ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم گوایکول پراکسیداز

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تنش ویروس و تنش ویروس به همراه باکتری CHA0 دارای اثر معنی دار بر میزان فعالیت آنزیم گوایکول پراکسیداز نمی‌باشد. نتایج به دست

آمده از مقایسه میانگین‌ها (جدول ۱) نشان داد که میزان فعالیت آنزیم گلوکسیداز برابر با ۴۳/۲۲۳ واحد بین المللی بر گرم پروتئین (U/ g protein) در تیمار ویروس به تنهایی، ۳۲/۴۹۶ واحد آنزیم بر گرم پروتئین در تیمار بدون تنش (کنترل) و ۳۶/۶۹۱۷ واحد آنزیم بر گرم پروتئین در تیمار ویروس و باکتری می‌باشد. به عبارتی دیگر مقدار آنزیم در اثر ایجاد تنش‌ها تغییر پیدا کرده است اما این میزان تغییر غیرمعنی دار است و تفاوتی با نمونه کنترل ندارند (جدول ۱ و شکل ۵).



شکل ۵- اثر تیمارهای آلوده به BSCTV و BSCTV به همراه باکتری *P. fluorescens* بر میزان فعالیت آنزیم گلوکسیداز (GPX) در مقایسه با کنترل (گیاه سالم).

Figure 5. Effects of BSCTV and BSCTV with *p. fluorescens* on the activity of glutathione peroxidase (GPX) compared with controls (healthy plant).

جدول ۱- مقایسه میانگین آنزیم‌ها در تیمارهای مختلف (*: هر عدد میانگین سه تکرار است).

Table 1.: Comparison of enzymes in different treatments (*: Each number is the average of three replications)

تیمار	POX (U/ g protein)	GPX (U/ g protein)	APX (U/ g protein)	CAT (U/ g protein)
Control	4.7619 ^{ab}	32.4962 ^a	41.6667 ^b	8.8291 ^a
BSCTV	6.2556 ^a	43.2231 ^a	184.8095 ^a	6.8494 ^{ab}
BSCTV+CHA0	4.3409 ^b	36.6917 ^a	138.5714 ^b	5.3942 ^b

بحث

در این تحقیق به بررسی میزان فعالیت برخی از آنزیم‌های ضد اکسنده در گیاهان چغندر رقم Brigita بدون اعمال تنش زیستی، تحت تنش ویروس BSCTV به تنهایی و تنش ویروس به همراه باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین CHA0 پرداخته شده است. فعالیت

آسکوربیت پراکسیداز نقش بسیار ضروری در تجزیه گونه‌های اکسیژن فعال ایفا می‌کند. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که در روز ۲۸ پس از آلودگی گیاهان آلوده به BSCTV افزایش معنی‌داری در میزان آنزیم آسکوربیت پراکسیداز نشان می‌دهند که این افزایش تقریباً ۵ برابر میزان فعالیت آن در نمونه کنترل بود. اما در همین حال میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با کنترل کاهش می‌یابد (شکل ۲ و ۳). این موضوع می‌تواند نشان دهد که تجزیه گونه‌های اکسیژن فعال توسط آنزیم آسکوربیت پراکسیداز صورت گرفته و کاتالاز نقش کمتری در تجزیه گونه‌های اکسیژن فعال داشته است. افزایش بارز فعالیت آسکوربیت پراکسیداز نشان‌دهنده اهمیت چرخه آسکورات - گلوکاتیون در تجزیه پراکسید هیدروژن تولید شده در آلودگی‌های ویروسی می‌باشد. این نتایج با نتایج بدست آمده از مطالعه Hakmaoui et al., (2012) مطابقت دارد. در تحقیق حاضر فعالیت آسکوربیت پراکسیداز کل مورد بررسی قرار گرفت که شامل ایزوزیم‌های قرار گرفته در کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها، میکروبادی‌ها و سیتوزول می‌باشد در حالیکه آنزیم کاتالاز در میتوکندری، پراکسی‌زوم و سیتوزول یافت می‌شود. کاهش در فعالیت کاتالاز گزارش شده در این تحقیق در دیگر سیستم‌های بیمارگر-میزبان مانند آلودگی درخت زردآلو توسط Plum pox virus نیز گزارش شده است (Clarke et al., 2002; Hernández et al., 2006; Yi et al., 2003).

از جمله آنزیم‌های مهم که در مقابله استرس‌های محیطی نقش مهمی را ایفا می‌کند، گلوکاتیون پراکسیداز می‌باشد که کاهش پراکسید هیدروژن را با استفاده از گلوکاتیون احیا شده (GSH) کاتالاز می‌کند و بدین ترتیب از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از اکسایش حفاظت می‌کند. در طی پاسخ‌های دفاعی پاتوژن، گونه‌های اکسیژن فعال در سلول‌های گیاهی از طریق افزایش فعالیت اکسیدازها و گوایکول پراکسیدازهای آپوپلاستی تولید می‌شوند. مقادیر زیادی از گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده توسط گوایکول پراکسیداز می‌تواند موجب شرایط محیطی بسیار سمی برای میکروب‌های مهاجم و ایجاد نکرز موضعی کند، درحالی که پخش سریع H_2O_2 می‌تواند خطوط متنوع دفاعی شامل مرگ برنامه ریزی شده سلول را فعال کند (Milosevic et al., 2012; Torres et al., 2006; Hernández et al., 2015). نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت گوایکول پراکسیداز مقداری افزایش را در گیاهان تحت تنش ویروس نشان می‌دهد. به عبارتی دیگر وقتی گیاه چغندر در معرض BSCTV قرار می‌گیرد افزایش فعالیت آنزیم گوایکول پراکسیداز معنی‌دار نمی‌باشد. از آنجایی که BSCTV تولید نکرز آوندی نمی‌کند به نظر می‌رسد در دفاع علیه BSCTV آنزیم‌های دیگر نقش مهم‌تری ایفا می‌کنند. آلودگی‌های طولانی مدت باعث ایجاد تنش اکسیداسیون به همراه عدم تعادل در متابولیسم ضداکسنده‌ها مخصوصاً در کلروپلاست‌ها و آپوپلاست می‌شود که این عدم تعادل احتمالاً با پیشرفت ویروس و توسعه علائم در ارتباط است. علاوه بر این، آلودگی‌های طولانی مدت

می‌توانند از طریق ایجاد اختلال در فتوسنتز و انتقال الکترون تنفسی سیستم ضد اکسیداسیون را تحت تاثیر قرار دهند و در نتیجه منجر به تنش اکسیداسیون در اندامک‌های مختلف شوند. در مطالعه‌ای که توسط Clarke *et al.*, (2002) انجام شده نشان داده شده است که در گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به سرعت بعد از آلودگی با ویروس موزائیک شبدر سفید کاهش می‌یابد، در حالیکه فعالیت پراکسیداز افزایش می‌یابد که نشان دهنده نقش احتمالی گونه‌های اکسیژن فعال بعنوان یک ضرورت برای تکثیر ویروس است. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Song *et al.*, (2009) انجام شده نشان داده شده است که آلودگی طولانی‌مدت CMV باعث ایجاد اختلال در فتوسنتز و انتقال الکترون و در نهایت منجر به ایجاد تنش‌های اکسایشی در اندامک‌های مختلف می‌شود.

در تحقیق حاضر همچنین به بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های ضد اکسند در گیاهان تحت تنش ویروس BSCTV کشت شده در خاک حاوی باکتری *P. fluorescens strain CHA0* نیز پرداخته شد. میزان فعالیت آنزیم‌ها در همه موارد با مقداری کاهش نسبت به گیاهان تحت تنش ویروس به تنهایی همراه بود. نتایج حاصل از بررسی آنزیم کاتالاز نشان دهنده تفاوت معنی دار کاهش میزان فعالیت آنزیم در برابر تیمار ویروس به تنهایی می‌باشد. نتایج Kohler *et al.*, (2009) بر روی کاهو نیز نشان داد که در شرایط نرمال بدون تنش گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری سودوموناس میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کمتری نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) نشان می‌دهد.

در رابطه با فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز نیز کاهش معنی دار میزان فعالیت آنزیم در برابر تیمار ویروس به تنهایی و فاقد باکتری مشاهده شد. در واقع باکتری با القا مقاومت باعث کاهش تولید آنزیم آسکوربیت پراکسیداز در گیاه شده است. نظام پراکسیداز گیاهان به صورت آیزوفرم‌های چندگانه موجود است که به طور دقیق تنظیم شده است و در پاسخ به محرک‌های محیطی فعال می‌گردد. افزایش در فعالیت این آنزیم از جمله پاسخ‌های عمومی به انواع تنش‌های اکسیدکننده می‌باشد و گزارش شده است که آیزوزایم‌های پراکسیداز نقش کلیدی در تحمل به تنش دارند (Riedle-bauer, 2000).

حضور باکتری در رابطه با میزان فعالیت آنزیم گواپیکول پراکسیداز در مقایسه با تیمار ویروس به تنهایی هیچ گونه اثر معنی داری نداشت اگرچه که باعث کاهش میزان فعالیت آن در مقایسه با تیمار بدون باکتری شده است. و برعکس میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار ویروس و باکتری کاهش معنی داری نسبت به تیمار ویروس به تنهایی داشته است. احتمالاً این نتایج نشان دهنده این مطلب است که باکتری *P. fluorescens strain CHA0* باعث القا مقاومت در گیاهان چغندرقد شده و اثر تنش ناشی از ویروس را از طریق مکانیسم دفاعی دیگری کاهش

می‌دهد و گیاه را در شرایط مناسبتری قرار می‌دهد زیرا فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تنها مکانیسم دفاعی گیاه در کاهش خسارت‌های اکسیداتیو نیست. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج بدست آمده از مطالعات (Kohler *et al.*, 2009) مطابقت دارد.

بطور کلی، مطالعات حاصل از بررسی ضدآکسنده‌ها در گیاهان تحت تنش ویروس نشان می‌دهد که تنش اکسیداسیون عامل مهمی در آلودگی‌های سیستمیک ویروس محسوب می‌شود اما تغییر در پروفایل آنزیم‌های ضدآکسنده باید به عنوان یک سازگاری تغییر یافته دارای ثبات و تعادل نسبت به آلودگی ویروسی و یا بخشی از بیماری‌زایی در نظر گرفته شود نه صرفاً بعنوان یک پاسخ دفاعی. متابولسیم ضدآکسیداسیون در گیاهان در پاسخ به پاتوژن‌های مهاجم بسیار دینامیک است، بنابراین نتایج متغیر و اغلب متناقض برای القا یا سرکوب آنزیم‌های ضدآکسنده در برهمکنش‌های ویروسی سازگار گزارش شده است. نبود فرایندهای مشخص احتمالاً بعلت ترکیبی از عوامل و متغیرها شامل تفاوت‌های متابولیکی بین گونه‌های گیاه مورد مطالعه، تفاوت در پیشرفت ویروس‌های مختلف، سرعت حرکت ویروس و یا همانندسازی، شرایط رشد گیاه و زمان نمونه برداری می‌باشد (Milosevic *et al.*, 2012).

منابع

- Al-Aghabary, K., Zhu, Z. & Shi, Q.H., 2004. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, 27: 2101-2115.
- Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress. *Annals of Botany*, 91: 179-194.
- Bolok Yazdi, H.R., Heydarnejad, J. & Massumi, H. 2008. Genome characterization and genetic diversity of Beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes*, 36: 539-545.
- Bridson, R., Stenger, D., Bedford, I., Stanley, J., Izadpanah, K. & Markham, P. 1998. Comparison of a *Beet curly top virus* isolate originating from the old world with those from the new world. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 77-84.
- Chance, B. & Maehly, A.C. 1995. Assay of catalases and peroxidases, pp. 764-775, In: Colowick S.P. & Kaplan N.O. (Ed.) *Methods in enzymology*. Acad. Press, New York.
- Clarke, S.F., Guy, P.L., Burritt, D.J. & Jameson, P.E. 2002. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiologia Plantarum*, 114: 157-164.
- Ebadzad Sahraei, G., Behjatnia, S.A.A. & Izadpanah, K. 2008. Viruses causing curly top of beet and other plants in Fars. 18th Iranian plant protection congress, 25-28 Agu. 2008, Hamedan, Iran.
- Fattahi, Z., Behjatnia, A., Afsharifar, A., Hamzeh Zarghani, H. & Izadpanah, K. 2012. Screening of sugar beet cultivars for resistance to Iranian isolate of *Beet severe curly top virus* using an infectious clone of the virus. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 48: 111-112. (In Persian with English abstract)

- Garmendia, I., Goicoechea, N. & Aguireolea, J. 2004. Effectiveness of three *Glomus* species in protecting pepper (*Capsicum annuum* L.) against Verticillium wilt. *Biological Control*, 31: 296-305.
- Hakmaoui, A., Perez-Bueno, M. L., Garcin-fontana, B., Camejo, D., Jimenez, A., Sevilla, F. & Baron., M., 2012. Analysis of the response of *Nicotiana benthamiana* to infection with two strains of pepper mild mottle virus. *Journal of Experimental Biology*, 63:5487-96.
- Hernández, J.A., Diaz-Vivancos, P., Rubio, M., Olmos, E., Ros-Barceló, A. & Martínez-Gómez, P. 2006. Long-term PPV infection produces an oxidative stress in a susceptible apricot cultivar but not in a resistant cultivar. *Physiologia Plantarum*, 126, 140–152.
- Hernández, J.A., Gullner, G., Clemente-Moreno, M.J., Künstler, A., Juhász, C., Díaz-Vivancos, P. & Király, L. 2015. Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, In Press.
- Kohler, J., Hernandez, J.A., Caravaca, F. & Roldan, A. 2009. Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 245-252.
- Maurhofer, M., Hass, D., Meuwly, P., Metraux, J-P. & Defago, G. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, 84: 139-146.
- Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Hass, D. & Defago, G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, 82: 190-195.
- Milosevic, S., Simonovic, A., Cingel, A., Jevremovic, S., Todorovic, S., Filipovic, B. & Suboti, A. 2012. Response of antioxidative enzymes to long-term Tomato spotted wilt virus infection and virus elimination by meristem-tip culture in two *Impatiens* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 79: 79-88.
- Nakano, A. & Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: Its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, 28: 131–140.
- Polle, A., Otter, T. & Seifert, F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, 106: 53–60.
- Riedle-bauer, M. 2000. Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes in Systemic Virus Infections of Plants. *Journal of Phytopathology*, 148: 297-302.
- Sgherri, C, Ranieri, A. & Quartacci, M.F. 2013. Antioxidative responses in *Vitis vinifera* infected by *grapevine fanleaf virus*. *Journal of Plant Physiology*, 170: 121– 128.
- Song, X.S., Wang, Y.J., Mao, W.H., Shi, K., Zhou, Y.H., Nogués, S. & Yu, J.Q. 2009. Effects of *cucumber mosaic virus* infection on electron transport and antioxidant system in chloroplasts and mitochondria of cucumber and tomato leaves. *physiologia plantarum*, 135: 246-57.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141: 373–378.

- Van-Loon, L., Baker, P.A. & Pieterse, C.M. 1998. Systemic resistance induced by rhizospher bacteria. *Annul Review Phytopathology*, 36: 453-483.
- Yi, S., Yu, S. & Choi, D. 2003. Involvement of hydrogen peroxide in repression of catalase in TMV-infected resistant tobacco. *Molecules and Cells*, 15: 364-369.

The defence related enzymatic content of suger beet against *Beet severe curly top virus* and *Pseudomonas fluorescens* strain CAH0

**Efat ALEMZADEH¹, Keramat IZADPANA¹, Moussa ZAREI²,
Ali Akbar BEHJATNIA¹**

*1. Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
(Corresponding author: ealemzadeh@shirazu.ac.ir)*

2. Department of biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Abstract

Various environmental stresses including biotic and abiotic stresses lead to the production of reactive oxygen species (ROS). Accumulation of reactive oxygen species often have been detected in plant pathogen- interactions. Plants with a combination of enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems usually ROS levels in cells kept in moderation. The aim of the present work is to study the effect of BSCTV infection and *Pseudomonas fluorescens* strain CAH0 on the activities of antioxidant enzymes in sugar beet plants by using a UV / Vis 2100 spectrophotometer. The results of the study showed when severe symptoms of the infection developed on the leaves and the virus content reached its maximum, a significant increase in the activities of several antioxidant enzymes, ascorbate peroxidase and peroxidase and a significant decrease in the developed on the leaves and the virus content reached its maximum, a significant increase in the activity of antioxidant enzyme, Catalase, was found. Also in virus's tension associated with bacteria, enzyme activity was reduced in all items.

Keywords: BSCTV, antioxidant enzymes, *Pseudomonas fluorescens* strain CAH0