

واکنش فلورسانس کلروفیل در ارقام گلابی حساس و متحمل به بیماری آتشک در شرایط کلروپلاستی
فعال و غیر فعال

**Chlorophyll Fluorescence Response in Susceptible and Tolerant Pear Cultivars to
Fire Blight in Active and Inactive Chloroplast Conditions**

زینب صالحی^۱، حمید عبداللهی^۲ و سیدمهدی میری^۳

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم باغبانی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲- دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،
کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۹

چکیده

صالحی، ز.، عبداللهی، ح.، و میری، س. م. ۱۳۹۷. واکنش فلورسانس کلروفیل در ارقام گلابی حساس و متحمل به بیماری آتشک در شرایط کلروپلاستی فعال و غیر فعال. مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۳۴: ۸۷-۱۰۲. [10.22092/sppj.2018.118102.73](https://doi.org/10.22092/sppj.2018.118102.73)

بیماری آتشک در اثر متقابل با درختان میزبان، خسارت قابل توجهی را از طریق انفجار اکسیداتیو و در نهایت نکروز بافت‌ها ایجاد می‌کند. در این تحقیق به منظور بررسی نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی در این اثر متقابل، به ارزیابی واکنش فلورسانس کلروفیل در ارقام گلابی حساس و متحمل به بیماری در شرایط کلروپلاست‌های فعال و غیرفعال پرداخته شد. به منظور مقایسه کلروپلاست‌های فعال و غیرفعال، آزمایش‌ها در شرایط درون شیشه در حضور سوکروز (زنجیره الکترونی کلروپلاستی غیرفعال) و عدم حضور سوکروز (زنجیره الکترونی کلروپلاستی فعال) انجام شد. نتایج نشان داد پیشرفت بیماری در رقم حساس‌تر و همچنین در حضور سوکروز سریع‌تر بود. همچنین شاخص‌های فلورسانس کلروفیل حداقل (Fo) و حداکثر (Fm) در حضور سوکروز در مقایسه با شرایط عدم حضور سوکروز کاهش یافت؛ بنابراین نقش منفی حضور سوکروز در فعالیت کلروپلاست‌ها تأیید شد. مقایسه تأثیر حمله پاتوژن بر شاخص‌های فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز نشانگر تأثیر حداقلی حمله پاتوژن بر شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل در حضور سوکروز بود، در حالی که در رقم حساس و در شرایط عدم حضور سوکروز این شاخص تغییرات زیادی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: گلابی، *Erwinia amylovora*، نکروز، زنجیره انتقال الکترون، سوکروز.

مقدمه

تاکنون نقش دو اندامک میتوکندری (Xie and Chen, 2000) و کلروپلاست (Abdollahi *et al.*, 2015) در این اثر متقابل گزارش شده است. میتوکندری، کلروپلاست و پراکسی‌زوم به‌عنوان سه منشأ اصلی تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در گیاهان شناخته شده‌اند. اگرچه بیان شده که پراکسی‌زوم‌ها به‌عنوان یکی از مراکز اصلی تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی هستند (Bhattacharjee, 2011)، ولی تاکنون مدرکی مبنی بر درگیر بودن این اندامک در اثر متقابل بین باکتری *E. amylovora* و میزبان‌های بیماری گزارش نشده است. از سوی دیگر، علی‌رغم نقش کلیدی انفجار اکسیداتیو در اثر متقابل این باکتری با گیاهان میزبان، به دلیل شناخت کم‌تر جزئیات این اثر متقابل، تاکنون سهم هر یک از این دو اندامک، در این اثر متقابل و تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن درگیر در فرآیند انفجار اکسیداتیو مقایسه نشده است. در سال‌های اخیر استفاده از خاصیت فلورسانس کلروفیل به‌صورت گسترده‌ای در جهت گزینش گیاهان برای مقاومت به تنش‌های مختلف نظیر تنش سرمای بهاره (Khanizadeh and Deell, 2005) و زمستانه (Percival and Henderson, 2003)، تنش خشکی (Fernandez *et al.*, 1997) و بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. پاسخ فلورسانس کلروفیل، یک شاخص تهییج انرژی در ساختارهای فتوسنتزی برگ بوده و به‌عنوان

بیماری آتشک با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora* از جمله مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار و به‌ویژه درختان گلابی و به در کشور است (Zakeri and Sharif Nabi, 1991)؛ (Maroofi and Mostafavi, 1996). این بیماری در سال ۱۳۶۸ برای اولین بار در کشور، در برغان کرج مشاهده و گزارش شد (Zakeri and Sharif Nabi, 1991). اولین طغیان بیماری در سال ۱۳۷۳ در قزوین و سلماس به وقوع پیوست (Mazarei *et al.*, 1994) و در سال‌های اخیر طغیان بیماری در مناطق مرکزی کشور مشاهده شده است. باکتری عامل این بیماری، در اثر متقابل سازگار با درختان میوه میزبان، انواع متعددی از پروتئین‌های مؤثره نظیر HrpA، HrpN، HrpW، AvrRpt2 و HopC1 و پروتئین‌های اختصاصی بیماری نظیر DspA/E را تولید کرده و سبب کلونیزه کردن بافت‌ها، ایجاد نکروز و درنهایت مرگ سلولی و پیشرفت بیماری می‌شود (Oh and Beer, 2005)؛ (Oh *et al.*, 2010).

پاسخ بافت‌های میزبان به حمله باکتری عامل آتشک، به‌صورت انفجار اکسیداتیو بوده (Venisse *et al.*, 2001) و رفتارهای متفاوتی در میزان و نوع این انفجار اکسیداتیو در ارقام حساس و متحمل به بیماری مشاهده و گزارش شده است (Abdollahi *et al.*, 2015).

الکترون و سطح تنش در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها است، تحقیق حاضر با هدف بررسی کامل نقش این زنجیره در اثر متقابل بین باکتری *E. amylovora* و درخت گلایی و همچنین بررسی نقش احتمالی این زنجیره در تعیین شدت حساسیت و یا تحمل به بیماری آتشک انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه باکتری

ارقام گلایی حساس و متحمل به بیماری آتشک به ترتیب شامل رقم بارتلت (Bartlett) (نام معادل رقم ویلامز-Williams) و رقم درگری (Erfani *et al.*, 2013) به وسیله کشت ریزقلمه در محیط درون شیشه مستقر شدند. به این منظور در آغاز فصل بهار سرشاخه‌های جوان ارقام فوق، از باغ تهیه و در آزمایشگاه به قطعات تک جوانه تقسیم و بعد از شستشو و سترون کردن، به ظروف شیشه‌ای حاوی کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA، یک‌دهم میلی‌گرم بر لیتر NAA، سی میلی‌گرم در لیتر سوکروز که با ۰/۶٪ آگار جامد شده بود منتقل و سپس در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی ایجاد شده با لامپ‌های فلورسنت سفید با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و در دمای شبانه‌روزی 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد منتقل و نگهداری شدند. پس از استقرار و رشد اولیه شاخه‌چه‌های تازه

یک سیستم تشخیص سریع و غیر مخرب برای تعیین مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی و به‌ویژه تنش‌های غیرزنده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Percival and Henderson, 2003). این رفتار در اثر پدیده تأثیر سازگاری با تاریکی (Dark adaptation effect) که در زنجیره‌های انتقال الکترون کلروپلاست انجام می‌شود و برای اولین بار توسط کاوتسکی و هیرش (Kautsky and Hirsch, 1931) گزارش شد، بروز می‌کند. در این پدیده، در شرایط عدم حضور نور، تعادل اکسیداسیون و احیاء زنجیره برقرار شده و شاخص فلورسانس کلروفیل در میزان حداقل (Fo) است. با افزایش ناگهانی تابش، فلورسانس کلروفیل به حداکثر (Fm) می‌رسد. تفاوت فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر (Fv) به عنوان شاخصی که بیانگر وضعیت تنش در گیاه است، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Anonymous, 2004).

لازم به ذکر است که تغییر در رفتار فلورسانس کلروفیل به عنوان یک تغییر ثانویه در واکنش به تنش‌های غیرزنده در گیاهان استفاده و گزارش شده است، در حالی که بر اساس بررسی‌های اخیر باکتری عامل بیماری آتشک، به‌طور مستقیم زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست را تحت تأثیر قرار داده و از آن به عنوان مرکز تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در راستای ایجاد انفجار اکسیداتیو استفاده می‌کند. بر این اساس با توجه به این که تغییرات فلورسانس کلروفیل، انعکاس مستقیمی از میزان

کالوس‌های تازه و سفید رنگ در انتهای آن‌ها، به محیط عاری از تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شدند (Nourmohammadi *et al.*, 2015). این روند سبب تولید برگ‌های توسعه‌یافته روی مواد گیاهی درون شیشه گلابی که دارای ریشه بودند، شد و به دلیل توسعه سطح برگ، امکان استفاده آن‌ها در سنسور دستگاه ارزیابی فلورسانس کلروفیل فراهم شد.

پس از تولید گیاهچه‌های فوق، به‌منظور بررسی رفتار فلورسانس کلروفیل در اثر متقابل بین باکتری عامل بیماری آتشک با ارقام گلابی، سویه Ea273 عامل بیماری (ATCC No. 49946, USA) در محیط کشت لوریا- برتانی (LB) مایع، شب‌گذران شده و بر اساس روش عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al.*, 2004) آلوده شدند. غلظت مایه تلقیح مورد استفاده در بافر فسفات اتوکلاو شده، روی کدورت ۲ (OD=2) به‌منظور به حداقل رسانیدن احتمال فرار سرشاخه‌ها از آلودگی تنظیم شد. به‌منظور کشت توأم، ۷۵ میکرولیتر مایه تلقیح به لوله آزمایش حاوی محیط کشت QL افزوده و سپس ریزشاخه‌چه‌های سه تا چهار سانتی‌متری که دارای طول میان‌گره‌های یکنواختی بودند، در محیط مستقر شدند. مقایسه سرعت پیشرفت نکروز بر اساس دو شاخص درصد طول شاخه‌چه نکروزه به طول کل شاخه‌چه و درصد میان‌گره‌های نکروزه به تعداد کل میان‌گره‌های

رشد کرده و فاقد آلودگی، به‌منظور تسریع در سرعت پرآوری به محیط QL تغییر یافته بر اساس لبلائی و همکاران (Leblay *et al.*, 1991) با افزایش میزان کلسیم به ۶/۴ میلی‌مول، آمونیوم به ۷/۵ میلی‌مول و نترات به ۳۷/۶ میلی‌مول در مقایسه با QL معمولی (Quoirin and Lepoivre, 1977) و با نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد بهینه‌سازی شده برای گلابی‌های گونه *P. communis* L. بر اساس عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al.*, 2005) شامل یک میلی‌گرم بر لیتر BAP، یک میلی‌گرم بر لیتر 2iP، یک دهم میلی‌گرم بر لیتر NAA و همچنین یک گرم بر لیتر پکتین مرکبات با فواصل زمانی شش هفته یک بار زیر کشت شدند. به دلیل ابعاد گرد سنسور دستگاه ارزیابی خاصیت فلورسانس کلروفیل (R=10 mm) و عدم توسعه کافی برگ‌های گلابی در محیط پرآوری فوق، جهت قرار گرفتن در سنسور ارزیابی پدیده اثر سازگاری با تاریکی، شاخه‌چه‌های پرآوری شده به محیط ریشه‌زائی گلابی حاوی نمک‌های پایه QL همراه با یک میلی‌گرم بر لیتر IBA منتقل شدند. محیط‌های ریشه‌زایی استفاده شده حاوی ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و ۵/۵ گرم بر لیتر آگار بودند. اسیدیته کلیه محیط‌ها قبل از افزودن آگار در حد ۵/۵ تنظیم شد. کلیه شاخه‌چه‌های مورد استفاده برای ریشه‌زایی به مدت چهار هفته در محیط حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفته و بعد از گذشت این مدت، هم‌زمان با آغاز

(Green bromo cersol) با غلظت یک میلی گرم بر لیتر به محیط‌های کشت اضافه و تغییرات pH محیط با استفاده از محلول‌های استاندارد pH حاوی نشانگر فوق به صورت مقایسه‌ای در طول آزمایش‌ها بر اساس سیستم ارزیابی اثر متقابل باکتری عامل بیماری آتشک و گلابی (Abdollahi *et al.*, 2004) ردیابی شد. کلیه آزمایش‌ها در پنج تکرار انجام و محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل انجام شد.

نتایج و بحث

پیشرفت بیماری در سرشاخه‌ها

نتایج بیانگر موفقیت کامل مایه‌زنی در دو رقم مورد بررسی در شرایط وجود سوکروز و فاقد سوکروز در محیط کشت بود و در هیچ یک از شاخه‌چه‌های تلقیح شده با باکتری عامل بیماری، فرار از آلودگی مشاهده نشد. از سوی دیگر، با توجه به انتخاب قبلی دو رقم با حساسیت متفاوت نسبت به بیماری، اولین علائم در شرایط وجود سوکروز در رقم حساس به آتشک بارتلت، در ۴۲ ساعت پس از تلقیح مشاهده و با سرعت نسبتاً سریع نکروز در طول شاخه‌چه‌های درون شیشه، طی ۴۸ ساعت پس از ظهور اولین علائم، میزان نکروز به ۱۰۰ درصد رسید (شکل ۱). ظهور اولین علائم در رقم درگزی ۷۲ ساعت پس از تلقیح و نکروز با سرعت کم‌تر در این رقم، به ۱۰۰ درصد رسید که نتایج بر اساس گزارش قبلی عبداللهی و

نکروزه در بازه زمانی پس از آلوده‌سازی بر اساس حداکثر زمان موردنیاز برای رسیدن نکروز به ۱۰۰ درصد در شاخه‌چه‌های هر دو رقم گلابی و با فواصل زمانی ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند. به دلیل درون شیشه بودن مواد گیاهی مورد استفاده و عدم امکان سترون‌سازی سنسور دستگاه، ارزیابی شاخص‌های میزان حداقل (Fo) و حداکثر (Fm) فلورسانس کلروفیل به صورت تخریبی، با خارج کردن شاخه‌چه‌ها از شرایط درون شیشه انجام شد. ارزیابی شاخص‌های فوق در سه برگچه درون شیشه و در پنج تکرار بیولوژیک در هر زمان نمونه‌برداری و در همان بازه زمانی ارزیابی نکروز و با همان فواصل زمانی ۲۴ ساعت یک‌بار انجام شد. به دلیل این که در شرایط معمول درون شیشه، به دلیل وجود سوکروز، فعالیت فتوسنتزی به حداقل ممکن افت می‌کند (Abdollahi *et al.*, 2015)، کلیه آزمایش‌های تأثیر متقابل باکتری-میزبان، در شرایط حضور سوکروز و عدم سوکروز در محیط مورد مقایسه قرار گرفتند. به منظور آماده‌سازی قبلی و فعال‌سازی سیستم فتوسنتزی مواد گیاهی مورد استفاده در شرایط فاقد سوکروز، پنج روز قبل از آلوده‌سازی، مواد فوق به محیط فاقد سوکروز منتقل و سپس در شرایط مشابه با عامل بیماری تلقیح شدند.

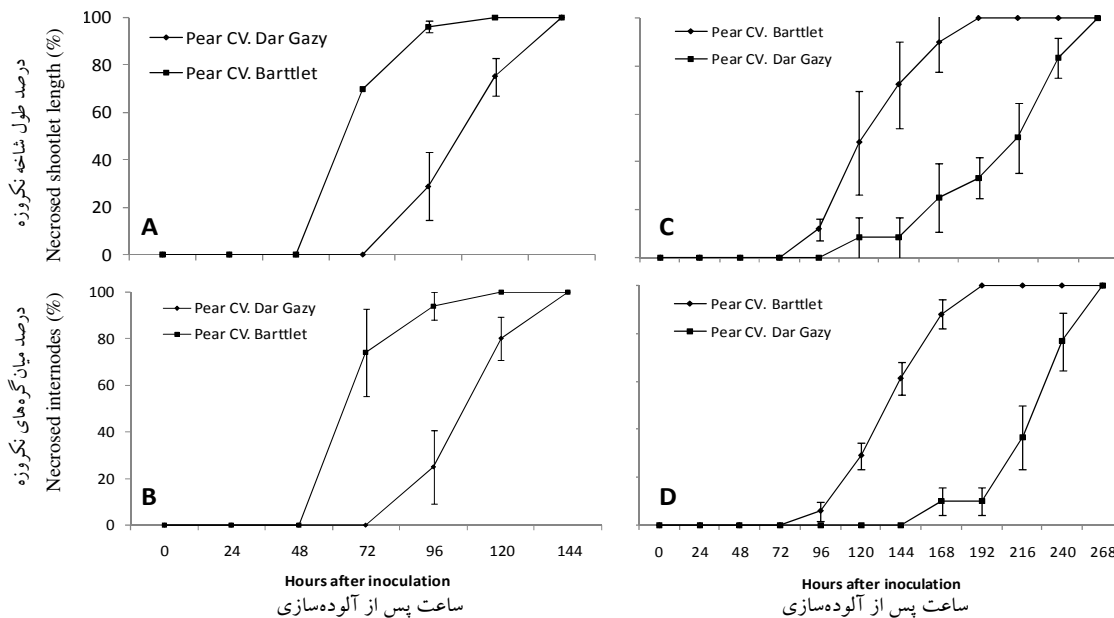
به منظور ارزیابی فعالیت باکتری در محیط رشد که سبب افت سریع pH در مقایسه با گیاه می‌شود، محلول مادری نشانگر بر مومکرزول سبز

پاسخ فلورسانس کلروفیل

مقایسه شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل (Fo) در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در شاخه‌چه‌های آلوده و غیر آلوده نشان داد که این شاخص با حضور سوکروز در محیط کشت به میزان قابل توجهی نسبت به شرایط عدم حضور سوکروز کاهش یافت (شکل ۲). این نکته نتایج تحقیقات دیگران مبنی بر این که حضور سوکروز زیاد در محیط سبب فعالیت حداقلی فتوسنتز گیاهان در شرایط درون شیشه (Iglesias *et al.*, 2001) در سطح زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی (Yabuta *et al.*, 2007) است را تأیید می‌کند.

مقایسه تأثیر حمله باکتری بر شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل در شرایط حضور سوکروز، نشانگر تأثیر حداقلی این حمله بر شاخص مذکور است (شکل ۲). با توجه به اهمیت حضور الکترون در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی به‌منظور بروز واکنش‌های اکسیداتیو و فلورسانس در شرایط تنش، طبیعی است که حضور سوکروز زیاد در محیط، سبب غیرفعال شدن زنجیره و عدم بروز واکنش‌های فلورسانس کلروفیل در این شرایط شده است. برعکس در شرایط عدم حضور سوکروز در محیط کشت، سطح بسیار بالاتر شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل در هر دو رقم گلابی قابل مشاهده است و تأثیر حمله باکتری بر شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل به‌ویژه در رقم حساس بارتلت مشاهده شد (شکل ۲).

همکاران (Abdollahi *et al.*, 2004) نشان‌دهنده این است که در شرایط درون شیشه، تحمل به بیماری به‌صورت تأخیر در پیشرفت علائم ظهور کرده و در شرایط ارزیابی گلخانه‌ای، به دلیل وجود بافت‌های چوبی، تحمل به بیماری آتشک به‌صورت پیشرفت نهائی کم‌تر در سرشاخه‌های آلوده‌شده ظهور پیدا می‌کند (Erfani *et al.*, 2013). گزارش‌های قبلی نشان داد که حضور سوکروز سبب فعالیت حداقلی فتوسنتزی گیاهان در شرایط درون شیشه (Iglesias *et al.*, 2001) به‌ویژه در سطح فعالیت آنزیم روپیسکو (Fuentes *et al.*, 2005) و زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی (Yabuta *et al.*, 2007) خواهد شد. بر این اساس، با توجه به نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلابی در اثر متقابل با باکتری عامل آتشک و انفجار اکسیداتیو ناشی از این اثر متقابل، ظهور علائم در شرایط حضور سوکروز در محیط کشت، نشان‌دهنده این است که به‌غیر از زنجیره الکترونی این اندامک، سایر اندامک‌های درگیر در تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و ایجاد انفجار اکسیداتیو (Bhattacharjee, 2011)، می‌توانند در پیشرفت باکتری در میزبان مؤثر باشند. همچنین مقایسه سرعت پیشرفت علائم نکروز در شرایط عدم حضور و حضور سوکروز بیانگر تأخیر قابل توجه در شرایط عدم حضور سوکروز در شاخه‌چه‌ها در دو رقم بارتلت و درگری بود (شکل ۱).

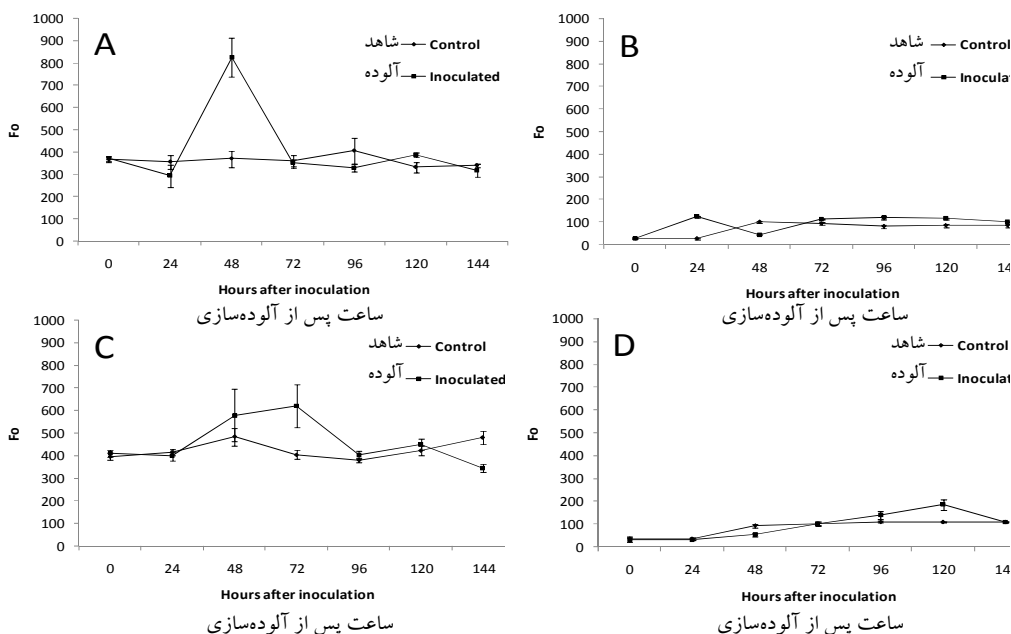


شکل ۱- مقایسه پیشرفت نکروز حاصل از عامل بیماری آتشک (*E. amylovora*) بر اساس درصد میان‌گره‌های نکروزه و درصد طول شاخه نکروزه در رقم حساس به آتشک (بارتلت) و رقم متحمل به آتشک (درگزی) در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در محیط کشت. A: درصد طول شاخه نکروزه با حضور سوکروز؛ B: درصد میان‌گره‌های نکروزه با حضور سوکروز؛ C: درصد طول شاخه نکروزه بدون حضور سوکروز؛ D: درصد میان‌گره‌های نکروزه بدون حضور سوکروز. ارزش‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد، بیان شده است.

Fig. 1. Comparison of the necrosis progress caused by fire blight causal agent (*E. amylovora*) according to percentage of necrosed internodes and percentage of necrosed shootlet length in fire blight susceptible cultivar (Bartlett) and tolerant cultivar (Dar Gazy) in sucrose presence and sucrose absence conditions. A: Percentage of necrosed shootlet length in sucrose presence condition; B: Percentage of necrosed internodes in sucrose presence condition; C: Percentage of necrosed shootlet length in sucrose absence condition; D: Percentage of necrosed internodes in sucrose absence condition. The values are means \pm standard errors.

کلروپلاستی (Yabuta *et al.*, 2007) خواهد شد. بنابراین برخلاف شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل که در شرایط فاقد سوکروز و حمله بیماری افزایش قابل توجهی به‌ویژه در رقم حساس نشان داد (شکل ۲)، شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل افزایش قابل توجهی نداشت (شکل ۳). با توجه به این که تأثیر حمله باکتری *E. amylovora* روی

همانند شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل، شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل (Fm) نیز با حضور سوکروز در محیط کشت به میزان قابل توجهی نسبت به شرایط عدم حضور سوکروز در محیط کشت کاهش یافت (شکل ۳). این رفتار نیز تأیید می‌کند که حضور سوکروز زیاد در محیط، سبب فعالیت حداقلی فتوسنتز گیاه در سطح زنجیره انتقال الکترون



شکل ۲- مقایسه تغییرات شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل (Fo) در شاخه‌چه‌های شاهد و آلوده شده با باکتری *E. amylovora* در رقم گلابی حساس به آتشک (بارتلت) و رقم متحمل به آتشک (درگزی) در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در محیط کشت.

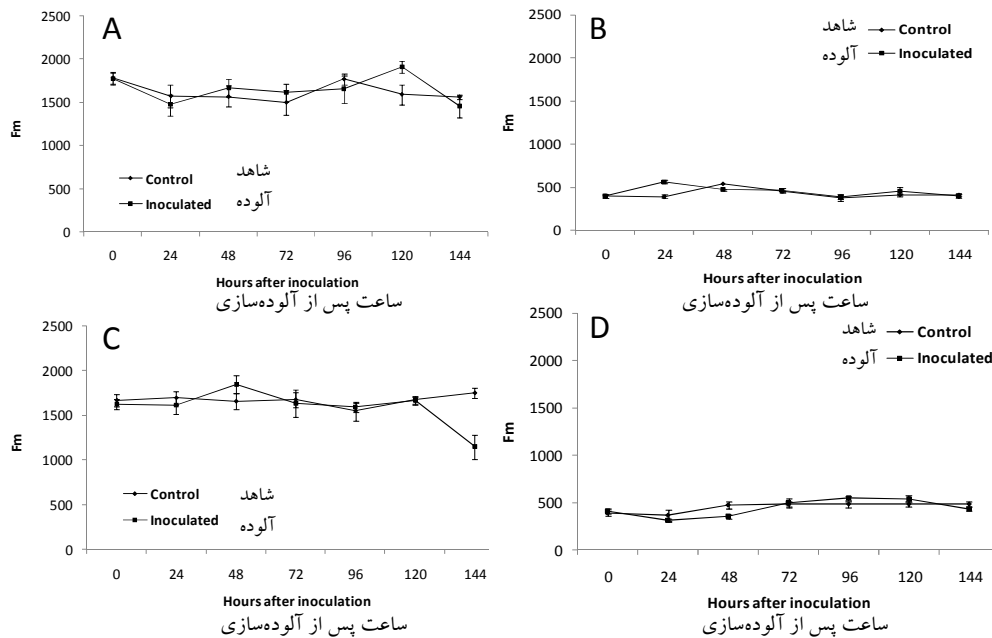
A: رقم حساس (بارتلت) بدون حضور سوکروز؛ B: رقم حساس (بارتلت) با حضور سوکروز؛ C: رقم متحمل (درگزی) بدون حضور سوکروز؛ D: رقم متحمل (درگزی) با حضور سوکروز. ارزش‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد، بیان شده است.

Fig. 2. Comparison of the variation in the minimum chlorophyll fluorescence (Fo) in control and inoculated pear shootlets by *E. amylovora* in fire blight susceptible cultivar (Bartlett) and tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence and sucrose absence conditions.

A: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose absence condition; B: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose presence condition; C: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose absence condition; D: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence condition. The values are means \pm standard errors.

کلروپلاست‌ها بروز می‌کند، در این شرایط به دلیل سرعت تأثیر باکتری روی بافت‌ها، شاخص حداکثر فلورسانس کلروفیل به صورت ثابت باقی خواهد ماند. برخلاف این شاخص، شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل به دلیل تفاوت نوع و این که تا حد زیادی به جریان الکترونی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی بستگی

بافت‌های گیاه یک تأثیر سریع است، به نظر می‌رسد که برخلاف تنش‌های طولانی مدت محیطی، به ویژه تنش‌های غیرزنده نظیر سرمای بهاره (Khanizadeh and Deell, 2005) و خشکی (Fernandez et al., 1997) که به صورت تغییر در میزان شاخص حداکثر فلورسانس کلروفیل در نتیجه تغییر در تعداد کل



شکل ۳- مقایسه تغییرات شاخص فلورسانس کلروفیل حداکثر (Fm) در شاخه‌چه‌های شاهد و آلوده شده با باکتری *E. amylovora* در رقم گلابی حساس به آتشک (بارتلت) و رقم متحمل به آتشک (درگزی) در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در محیط کشت.
 A: رقم حساس (بارتلت) بدون حضور سوکروز؛ B: رقم حساس (بارتلت) با حضور سوکروز؛
 C: رقم متحمل (درگزی) بدون حضور سوکروز؛ D: رقم متحمل (درگزی) با حضور سوکروز.
 ارزش‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد، بیان شده است.

Fig. 3. Comparison of the variation in the maximum chlorophyll fluorescence (Fm) in control and inoculated pear shootlets by *E. amylovora* in fire blight susceptible cultivar (Bartlett) and tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence and sucrose absence conditions.

A: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose absence condition; B: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose presence condition; C: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose absence condition; D: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence condition.
 The values are means \pm standard errors.

فلورسانس کلروفیل میزان حداقل (F0) است، در شرایط عدم حضور سوکروز (زنجیره الکترونی فعال)، به نظر می‌رسد در رقم حساس به دلیل بالاتر بودن سطح عدم تعادل اکسیداسیون و احیاء زنجیره، میزان شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل، به میزان قابل توجهی نسبت به رقم متحمل در گزی بالاتر

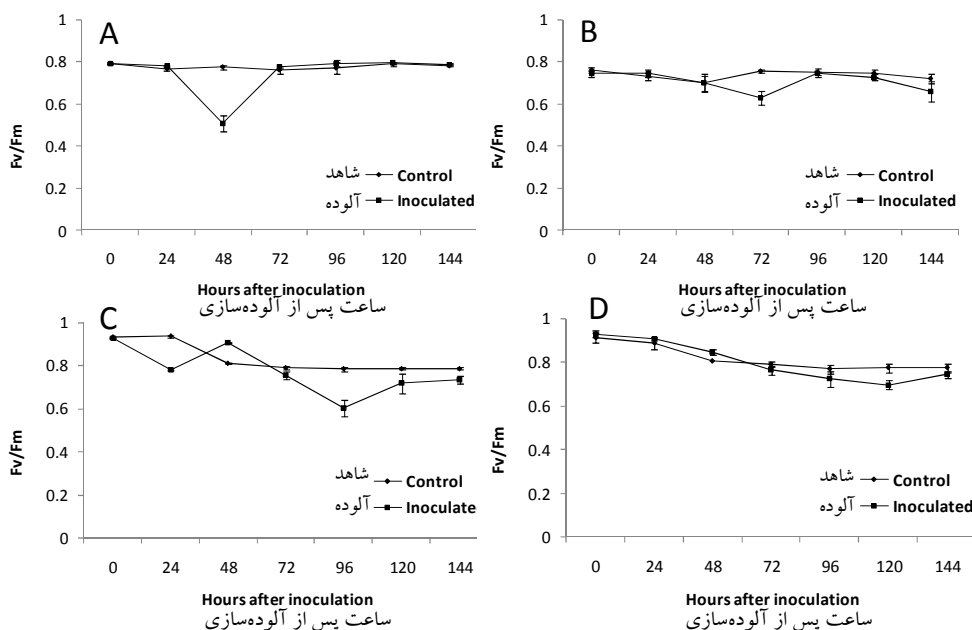
داشته و تأثیرپذیر از تغییرات کوتاه مدت و سریع زنجیره الکترونی است، در شرایط عدم حضور سوکروز در محیط، تفاوت قابل توجهی را در شرایط گیاه آلوده و غیر آلوده و همچنین دو رقم حساس و متحمل نشان داد. با توجه به این که در شرایط عدم حضور نور، میزان تعادل اکسیداسیون و احیاء زنجیره برقرار و شاخص

همکاران (Abdollahi et al., 2015) که نشان دادند در شرایط عدم حضور سوکروز، استفاده از بازدارنده‌های مختلف زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست، سبب ایجاد نکروز در شاخه‌چه‌های سیب و گلابی درون شیشه خواهد شد منطبق است. برخلاف این، در صورت حضور سوکروز در محیط، هیچ‌گونه نکروزی در اثر استفاده از بازدارنده‌های مختلف زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی روی شاخه‌چه‌های مذکور مشاهده نشد. دلیل این امر، ایجاد فقر غذایی حاصل از وجود بازدارنده در شرایط عدم حضور سوکروز بوده که به مرگ گیاه منجر می‌شود. برعکس، در حضور سوکروز، اولاً نیاز گیاه به کربوهیدرات، نه از طریق فتوسنتز، بلکه از طریق جذب سوکروز از محیط مورد تأمین قرار می‌گیرد و از طرفی به دلیل غیرفعال بودن زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی و نقش غیر مؤثر آن در تأمین انرژی گیاه، استفاده از بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی سبب ایجاد فقر غذایی و نکروز در شاخه‌چه‌ها نخواهد شد. نتایج فوق به نحو مطلوبی با نتایج دو شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر که در شرایط حضور سوکروز کاهش قابل توجهی در این تحقیق نشان داد مطابقت داشت.

از سوی دیگر، حذف سوکروز از محیط، سبب شد تا ظهور نکروز در شاخه‌چه‌های گلابی هر دو رقم حساس و متحمل، به میزان قابل توجهی با تأخیر همراه شود، اگرچه تفاوت

بوده است (شکل ۲). برخلاف این، به نظر می‌رسد که رقم متحمل از توان مهار بالاتری در سطح تعادل اکسیداسیون و احیاء زنجیره در شرایط حمله باکتری برخوردار بوده و این امر به صورت افزایش محدود شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل در این رقم نمود پیدا کرده است. همچنین برخلاف دو شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر که در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در گیاهان غیر آلوده تفاوت قابل توجهی نشان دادند (شکل ۲ و ۳)، شاخص تفاوت فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر (Fv) تفاوتی را در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در گیاهان غیر آلوده نشان نداد. دلیل این امر می‌تواند تأثیرپذیری یکنواخت هر دو شاخص فلورسانسی کلروفیل حداقل و حداکثر و حفظ نسبت مذکور در شرایط عدم آلودگی باشد. برخلاف این، در شرایط آلوده‌سازی میزبان‌ها با باکتری عامل آتشک، در شرایط عدم حضور سوکروز در محیط، به دلیل تغییرات قابل توجه شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل، شاخص تفاوت فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر (Fv) نیز در این شرایط دچار تغییرات قابل توجهی، به‌ویژه در رقم حساس تر بارتلت شد (شکل ۴).

در یک ارزیابی کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که شرایط حذف سوکروز در محیط کشت می‌تواند به نحو مؤثری به فعال‌سازی زنجیره انتقال الکترون و کلروپلاست‌ها منجر شود که از این نظر با نتایج به‌دست آمده توسط عبداللهی و



شکل ۴- مقایسه تغییرات شاخص نسبت فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm) در شاخه‌چه‌های شاهد و آلوده شده با باکتری *E. amylovora* در رقم گلابی حساس به آتشک (بارتلت) و رقم متحمل به آتشک (درگزی) در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در محیط کشت. A: رقم حساس (بارتلت) بدون حضور سوکروز؛ B: رقم حساس (بارتلت) با حضور سوکروز؛ C: رقم متحمل (درگزی) بدون حضور سوکروز؛ D: رقم متحمل (درگزی) با حضور سوکروز. ارزش‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد، بیان شده است.

Fig. 4. Comparison of the variation in the chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) in control and inoculated pear shootlets by *E. amylovora* in fire blight susceptible cultivar (Bartlett) and tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence and sucrose absence conditions.

A: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose absence condition; B: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose presence condition; C: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose absence condition; D: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence condition. The values are means \pm standard errors.

گزارش شده است. این اندامک‌ها به عنوان منشأ تولید گونه‌های فعال اکسیژن عمل نموده و هر نوع از گونه‌های فعال اکسیژن، نقش متفاوتی را در ایجاد تحمل و یا حساسیت به بیماری بر عهده دارند (Azarabadi, 2014). با توجه به این که بر اساس این گزارش، نقش گونه فعال اکسیژن H_2O_2 به صورت ایجاد تحمل به بیماری

زمانی در اثر تحمل بیش تر رقم درگزی به بیماری همچنان در شرایط حذف سوکروز از محیط نیز مشاهده شد. چنانچه اشاره شد تاکنون نقش دو اندامک میتوکنندری (Xie and Chen, 2000) و کلروپلاست (Abdollahi *et al.*, 2015) در اثر متقابل باکتری عامل بیماری آتشک با گیاهان میزبان

مقایسه شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل در دو رقم حساس و متحمل به بیماری در پاسخ به حمله باکتری عامل بیماری نشان داد که رقم متحمل از توان کنترل بالاتری در سطح تعادل اکسیداسیون و احیاء زنجیره در شرایط حمله باکتری برخوردار بوده و این امر به‌صورت افزایش محدود شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل در این رقم مشاهده شد. بر اساس این نتایج، به نظر می‌رسد که نقش اندامک کلروپلاست نه تنها در اثر متقابل بین باکتری و گیاه میزبان مؤثر است، بلکه این اندامک دارای مکانیسم(های) ناشناخته‌ای برای تعدیل اثرات مخرب باکتری روی گیاه است که تاکنون مورد توجه قرار نگرفته است. لذا در ادامه پیشنهاد می‌شود ضمن بررسی و مقایسه نقش و وزن دو اندامک میتوکندری و کلروپلاست در تولید گونه‌های فعال اکسیژن، به بررسی و شناسایی مکانیسم‌هایی که می‌توانند در کلروپلاست‌ها سبب ایجاد رفتار اکسیداسیون-احیاء متعادل‌تر در پاسخ به حمله بیماری و در نتیجه ایجاد تحمل بیش‌تر به بیماری نظیر آنچه در رقم در گزی مشاهده شد، پرداخته شود. در این رابطه، اولین ایده میزان حفاظت‌شدگی بسیار بالای ژنوم کلروپلاستی که کد کننده بسیاری از پروتئین‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها است در سطح یک گونه و حتی گونه‌ها نزدیک است. بنابراین این امر می‌تواند با مکانیسم‌های نقطه‌ای در سطح پروتئین‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها از طریق

و نقش رادیکال هیدروکسیل به‌صورت ایجاد حساسیت به بیماری آتشک مشاهده می‌شود، به نظر می‌رسد که نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی سهم مؤثرتری در تولید گونه فعال اکسیژن H_2O_2 داشته، بدین صورت که حذف سوکروز از محیط و فعال‌سازی این زنجیره سبب ایجاد تأخیر قابل توجه در بروز علائم در هر دو رقم شده است. بر این اساس، با توجه به این که غیر فعال‌سازی موقت زنجیره انتقال الکترون اندامک‌ها می‌تواند به‌عنوان مکانیسمی در کاهش خسارت بیماری در میزبان‌های آتشک مدنظر قرار گیرد، در ادامه بررسی‌ها روی مقایسه نقش اندامک‌ها در اثر متقابل باکتری-میزبان، لازم است میزان سهم دو اندامک میتوکندری و کلروپلاست به نحو دقیق‌تری در ایجاد گونه‌های مختلف فعال اکسیژن (به‌ویژه گونه فعال اکسیژن H_2O_2) و در نتیجه ایجاد مقاومت و یا حساسیت در میزبان مدنظر قرار داده شود.

در نهایت مقایسه شاخص فلورسانسی کلروفیل حداقل و حداکثر در گیاهان آلوده شده با عامل بیماری آتشک و شاهد بیانگر تأثیر قابل توجه و زودهنگام حمله بیماری، در زمانی بسیار زودتر از ظهور علائم روی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها بود. این نتایج به نحو مؤثری تأییدی بر گزارش اخیر عبداللہی و همکاران (Abdollahi et al., 2015) مبنی بر نقش این زنجیره در اثر متقابل باکتری *E. amylovora* با گیاهان میزبان است. از طرفی

مقایسه دو رقم اخیر با استفاده از توالیابی معمولی صورت پذیرد. نکته تسهیل کننده این امر، وجود توالی کامل ژنوم کلروپلاستی و ژنوم هسته گونه گلابی معمولی در بانک اطلاعاتی است که به طراحی آغازگرهای کاملاً اختصاصی برای نیل به این هدف کمک قابل توجهی می نماید. همه این موارد ممکن است گره گشای ساختار ناشناخته ژنتیکی تحمل به بیماری آتشک در گیاهان میزبان نظیر گلابی باشد.

References

- Abdollahi, H., Ghahremani, Z., Erfani Nia, K., and Mehrabi, R. 2015.** Role of electron transport chain of chloroplasts in oxidative burst of interaction between *Erwinia amylovora* and host cells. *Photosynthesis Research* 124: 231-242.
- Abdollahi, H., Muleo, R., and Rugini, E. 2005.** Evaluation of different basic salts, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) genotypes. *Seed and Plant Improvement Journal* 21: 373-384 (in Persian).
- Abdollahi, H., Ruzzi, M., Rugini, E., and Muleo, R. 2004.** *In vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 203-212.
- Anonymous. 2004.** Opti-Sciences OS-30p Chlorophyll Fluorometer Operation Manual. Opti-Sciences Company, Hudson, USA. 51pp.
- Azarabadi, S. R. 2014.** Assessment of resistance and survey on some tolerance mechanisms to fire blight (*Erwinia amylovora*) in some new pear cultivars and rootstocks. M. Sc. Thesis, Varamin-Pishva Islamic Azad University, Tehran, Iran. 153pp. (in Persian).
- Bhattacharjee, S. 2011.** Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. Pp. 1-30. In: Dutta Gupta, S. (ed.). *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Erfani, J., Abdollahi, H., Ebadi, A., Fatahi Moghadam, M. R., and Arzani, K. 2013.** Evaluation of fire blight resistance and the related markers in some European and Asian pear cultivars. *Seed and Plant Improvement Journal* 29-1: 659-672 (in Persian).
- Fernandez, R. T., Perry, R. L., and Flore, J. A. 1997.** Drought response of young apple trees on three rootstocks. II. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations, and leaf abscisic acid. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122: 841-848.

- Fuentes, G., Talavera, C., Oropeza, C., Desjardins, Y., and Santamaria, J. M. 2005.** Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41: 69–76.
- Iglesias, D. J., Tadeo, F. R., Legaz, F., Primo-Mill, o E., and Talon, M. 2001.** *In vivo* sucrose stimulation of colour change in citrus fruit epicarps: interactions between nutritional and hormonal signals. *Physiologia Plantarum* 112: 244–250.
- Kautsky, H., and Hirsch, A. 1931.** Neue versuche zur kohlenensäureassimilation. *Naturwissenschaften* 19: 964-964.
- Khanizadeh, Sh., and Deell, J. 2005.** Chlorophyll fluorescence: a new technique to screen for tolerance of strawberry flowers to spring frost. *Small Fruits Review* 1: 61-67.
- Khodaei Chegeneh, F., Abdollahi, H., Ershadee, A., and Esna Ashari, M. 2011.** Determination of micro-propagation protocol for OH×F333 and OH×F69 pear clonal rootstocks. *Seed and Plant Improvement Journal* 27-2: 297-312 (in Persian).
- Leblay, C., Chevreau, E., and Robin, L. M. 1991.** Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 25: 99-105.
- Maroofi, A., and Mostafavi, M. 1996.** Evaluation of the resistance of apple, pear and quince varieties to fire blight. *Acta Horticulturae* 411: 395-400.
- Mazarei, M., Zakeri, Z., and Hassanzadeh, N. 1994.** Fire blight situation on fruit trees in West Azerbaijan and Ghazvin provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology* 30: 25-32 (in Persian).
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nourmohammadi, N., Abdollahi, H., Moeini, A., and Roohalamin, E. 2015.** Effects of growth media and Fe source on micropropagation and rooting of semi-dwarf pear rootstocks, Pyrodwarf and OH×F87. *Seed and Plant Improvement Journal* 31-1: 265-278 (in Persian).
- Oh, C. S., and Beer, S. V. 2005.** Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters* 253:185–192.
- Oh, C. S., Carpenter, S. C. D., Hayes, M. L., and Beer, S. V. 2010.** Secretion and translocation signals and DspB/F-binding domains in the type III effector DspA/E of

Erwinia amylovora. Microbiology 156:1211–1220.

Percival, G., and Henderson, A. 2003. An assessment of the freezing tolerance of urban trees using chlorophyll fluorescence. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78: 225-260.

Quoirin, M., and Lepoivre, P. 1977. Etude de mileux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. Acta Horticulture 78: 437-442.

Venisse, J. S., Guller G., and Brisset M. N. 2001. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. Plant Physiology 125: 2164-2172.

Xie, Z., and Chen, Z. 2000. Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. Molecular Plant-Microbe Interaction 13: 183-190.

Yabuta, Y., Mieda, T., Rapolu, M., Nakamura, A., and Motoki, T. 2007. Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany 58: 2661–2671.

Zakeri, Z., and Sharif Nabi, B. 1991. Fire blight disease in Karaj. Proceedings of the 10th Iranian Plant Pathology Congress, Kerman, Iran. Pp. 157.