

تأثیر بازدارنده‌های مختلف زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل باکتری *Erwinia amylovora* با ارقام حساس و متحمل سیب و گلابی*

EFFECT OF SEVERAL CHLOROPLAST ELECTRON TRANSPORT CHAIN INHIBITORS ON INTERACTION OF *Erwinia amylovora* WITH SUSCEPTIBLE AND TOLERANT APPLE AND PEAR CULTIVARS

کبری عرفانی نیا^۱، حمید عبداللهی^{۲**} و محمود خسروشاهلی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۳)

چکیده

بیماری آتشک مهم‌ترین بیماری درختان میوه دانه‌دار است. نقش زنجیره انتقال الکترون میتوکندری در اثر متقابل عامل بیماری - میزبان بررسی و مورد تأیید قرار گرفته است. این تحقیق به منظور بررسی و تایید نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در این اثر متقابل و تعیین محل احتمالی تأثیر پروتئین‌های مؤثره باکتری در این زنجیره انجام شد. عملکرد بازدارنده‌های زنجیره شامل متیل‌ویولوژن، گلو تارآلدهید و دیورون، با محل تأثیر بین پذیرنده الکترونی فرودوکسین و NADP، پلاستوسیانین و پلاستوکوینون QA و QB روی توسعه علائم بررسی شد. پایه‌های سیب MM-111 (متحمل) و MM-106 (حساس) و ارقام گلابی هاروسوئیت (Harrow Sweet) (متحمل) و اسپادونا (Spadona) (حساس) در محیط درون شیشه پرآوری شدند. تمایز محدوده زمانی ایجاد نکروز حاصل از بازدارنده‌ها و نکروز باکتری عامل، طی آزمایشات مقدماتی با غلظت‌های مختلف بازدارنده و بدون حضور باکتری انجام و غلظت‌های مناسب بر اساس فراهم کردن حداقل ۱۶۸ ساعت بدون نکروز حاصل از بازدارنده انتخاب شد. متعاقب آن تأثیر بازدارنده‌ها در بروز علائم بیماری، در یک دوره ۲۸۸ ساعته پس از آلوده‌سازی روی میزبان‌ها بررسی شد. داده‌ها نشان دادند که بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست سبب تأخیر در بروز علائم بیماری در ارقام مذکور شدند. این نتایج ضمن تأکید نتایج قبلی حاصل از بازدارندگی این زنجیره با اوراسیل، بیانگر شواهد محکم‌تری مبنی بر نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در این اثر متقابل است. هم‌چنین با توجه به محل‌های اثر متفاوت بازدارنده‌ها، محل احتمالی تأثیر پروتئین‌(های) مؤثره باکتری، جایی نزدیک به محل احیای NADP بیان شد.

واژه‌های کلیدی: آتشک، کلروپلاست، متیل‌ویولوژن، گلو تارآلدهید، دیورون

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hamidabdollahi@spii.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات،

تهران

۲. دانشیار پژوهشی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

مقدمه

اندامک‌ها به منظور مکان اصلی اثر متقابل بین پروتئین‌های مؤثره و سلول‌های میزبان استفاده نمایند (Taiz & Zeiger 2002). هم‌چنین زیه و چن (2002) نشان دادند که مرگ سلول‌های گیاهان فوق حساس به باکتری *Erwinia amylovora*، یک مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Programmed Cell Death) است که علائم مشخصه آپوپتوسیس (Apoptosis) جانوری از جمله فسفوریله شدن پروتئین‌ها و تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) را ایجاد می‌کند. تحقیقات بعدی ثابت کرد که مکانیسم آپوپتوسیس جانوری در میتوکندری و با ایجاد اختلال در زنجیره انتقال الکترون این اندامک به وجود می‌آید. بررسی مقاومت سلول‌های گیاه توتون در حضور اسید سالیسیلیک (Salicylic Acid) نسبت به ویروس موزاییک توتون (Tobacco mosaic virus) نشان داد که این مقاومت، به وجود SHAM (Salicylhydroxamic acid) به عنوان بازدارنده مسیر اکسیداسیون جایگزین میتوکندری حساس است. بررسی زیه و چن (2002) هم‌چنین مؤید نقش بازدارندگی پروتئین هارپین باکتری *E. amylovora* در سنتز ATP در سلول‌های توتون بود که این بازدارندگی با کاهش ظرفیت سیتوکروم مسیر انتقال الکترون میتوکندری انجام شد. استفاده از دی‌فنیل یودونیم (Diphenylene Iodonium) به‌عنوان بازدارنده انفجار اکسیداتیو نشان داد که عامل اصلی تأثیر هارپین در بازدارندگی سنتز ATP، شکست زنجیره انتقال الکترون میتوکندری است و انفجار اکسیداتیو نقش مستقیمی در این بازدارندگی نداشت (Xie & Chen 2002).

عبداللهی (Abdollahi 2003) در تحقیقی روی تظاهر ژن‌های کلروپلاست، میتوکندری و هسته مشاهده کرد که تغییر الگوی تظاهر ژن‌های کلروپلاستی در اثر متقابل

بیماری آتشک (Fire Blight) به عنوان مهم‌ترین بیماری درختان میوه دانه‌دار هر ساله خسارت قابل توجهی به تولیدکنندگان درختان میوه دانه‌دار در کشورهای تولیدکننده وارد می‌سازد (van der Zwet & Keil 1979). در اواخر قرن بیستم، پیشرفت‌های علم بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک باکتری‌ها، منجر به پیشرفت قابل توجهی در زمینه شناسایی مکانیسم‌های مولکولی بیماری‌زایی عامل بیماری آتشک گردید. ابتدای دهه ۹۰، باور و بیر (Bauer & Beer 1991) برای اولین بار کلاستر ژنی به طول تقریبی ۴۰ کیلو باز که عامل ایجاد بیماری در میزبان و واکنش فوق حساسیت در گیاهان غیر میزبان بود را در این باکتری شناسایی و گزارش نمودند. تحقیقات بعدی وی و همکاران (Wei et al. 1992) و کیم و بیر (Kim & Beer 1998) به ترتیب نشان دادند که پروتئین‌های هارپین N (HrpN) و هارپین W (HrpW) و DspA/E مسئول بیماری‌زایی باکتری می‌باشند. پس از شناسایی مکانیسم‌های بیماری‌زایی باکتری و مکانیسم‌های ظهور علائم، تحقیقات به شناسایی نحوه تأثیر پروتئین‌های هارپین بر سلول‌های میزبان معطوف شد. از جمله این تحقیقات شناسایی مسیر ترشح پروتئین‌های مؤثره (Effector Proteins) باکتری (Jin et al. 2001)، نحوه اثر آپوپلاست میزبان روی تظاهر ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی (Wei et al. 1992)، اثر متقابل هارپین و پمپ هیدروژنی غشای سلول میزبان (Popham et al. 1995) و نقش اندامک‌های درون سلولی در اثر متقابل پاتوژن-میزبان (Abdollahi 2003, Xie & Chen 2002) بود.

با توجه به مبدأ پروکاریوتیک اندامک‌های درون سلولی شامل کلروپلاست و میتوکندری، این احتمال وجود دارد که بسیاری از عوامل بیماری‌زای باکتریایی، از این

بازدارنده‌ها توقف زنجیره انتقال الکترون را در نواحی متفاوتی از این زنجیره باعث می‌شوند. این تحقیق با هدف تعیین محل تأثیر پروتئین‌های مؤثره باکتری *E. amylovora* در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست سلول‌های دو میزبان سیب (*Malus domestica* Borkh.) و گلابی (*Pyrus communis* L.) انجام شد. به این منظور بازدارنده‌های مختلف این زنجیره با گستره محل اثر در طول زنجیره، شامل متیل‌ویولوژن، گلو تار آلدئید و دیورون که به ترتیب باعث توقف در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست، در انتهای فتوسیستم I، بین پذیرنده الکترونی فرودکسین و NADP (Taiz & Zeiger 2002)، گیرنده الکترونی پلاستوسیانین (Hardt *et al.* 1977) و در نهایت محلی بین پلاستوکوئینون Q_A و Q_B در فتوسیستم II (Taiz & Zeiger 2002) می‌شوند مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به محل اثر این بازدارنده‌ها در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و تأثیر آنها در بروز علائم بیماری حاصل از باکتری *E. amylovora*، می‌توان نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل باکتری-میزبان را بررسی و محل احتمالی اثر پروتئین‌های مؤثره باکتری را در زنجیره مشخص نمود.

روش بررسی

استقرار مواد گیاهی در محیط درون شیشه

پایه‌های سیب MM-111 (متحمل)، MM-106 (حساس) (Fazio *et al.* 2006) و ارقام گلابی هاروسوئیت (Sweet Harrow) (متحمل) و اسپادونا (Spadona) (حساس) (Mohan Jain & Priyadarshan 2009) به وسیله کشت ساقه‌چه‌ها در محیط درون شیشه پرآوری شدند. به این منظور ساقه‌چه‌ها در ظروف شیشه‌ای ۲۰۰

میزبان-پاتوژن سریع‌تر از تغییر الگوی ژن‌های میتوکندریایی اتفاق می‌افتد. در این تحقیق احتمال عبور HrpW به عنوان یکی از پروتئین‌های مؤثره باکتری از غشاء کلروپلاست سلول‌های میزبان مورد بحث قرار گرفت. عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al.* 2004) شواهدی مبنی بر نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل باکتری *E. amylovora* با سلول‌های ارقام حساس و متحمل گلابی ارائه دادند. قهرمانی (۲۰۰۹) با استفاده از سیستم درون شیشه به فعال‌سازی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست ساقه‌چه‌های میزبان‌های سیب و گلابی با هدف مطالعه اثر متقابل عامل بیماری با این زنجیره پرداخت عبداللهی و قهرمانی (Abdollahi and Ghahremani 2011) با استفاده از اوراسیل به‌عنوان بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در محل اتصال Q_B به پروتئین D₁ در فتوسیستم II، به بیان نقش این زنجیره در اثر متقابل باکتری با سلول‌های دو میزبان سیب و گلابی پرداخت و نقش این زنجیره را در اثر متقابل باکتری-میزبان گزارش نمود.

با توجه به نقش احتمالی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست میزبان در بیماری‌زایی باکتری، انتظار می‌رود در این اثر متقابل به‌کار بردن مواد بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست، در کاهش میزان مرگ سلول میزبان و خسارت‌های بیماری مؤثر واقع گردد. از بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست تریازین، فنیل‌اوره آز، بنزوتیادiazول‌ها، نیتریل‌ها، کاربامات، اسید دکربوکسیلیک، مشتقات دی‌تیادiazولیل (Jordan *et al.* 1966)، دی‌فنیل‌اتر (Wayne Bugg *et al.* 1980)، فلزات سنگین (Jiang *et al.* 2008, Shioi *et al.* 1978) متیل‌ویولوژن (Taiz & Zeiger 2002)، گلو تار آلدئید (Hardt & Kok 1977)، دیورون (Taiz & Zeiger 2002) قابل ذکر است. این

بازدارنده‌ها بعد از گذراندن از فیلتر ۰/۲ میکرون (Millipore, USA) و سترون شدن، به محیط کشت پایه MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد و آگار اضافه و در لوله‌های آزمایش استریل توزیع و سپس شاخه‌چه‌ها مستقر شدند. در آزمایش مقدماتی، با بررسی زمان و شدت ظهور علائم نکروز حاصل از بازدارنده‌ها، غلظت‌های مناسب جهت آزمایش‌های بعدی (تأثیر بازدارنده بر بروز علائم بیماری) تعیین شد. برای تهیه باکتری مورد نیاز جهت تلقیح، استرین Ea273 باکتری *E. amylovora* (ATCC No.=49946) در محیط لوریا-برتانی (Luria Bertani) مایع به صورت شبگردان در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه کشت و بر اساس تجارب قبلی در زمینه بهینه‌سازی این سیستم، غلظت مایه تلقیح روی کدورت ۲ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (Abdollahi et al. 2004) تنظیم شد. به منظور آلوده‌سازی ارقام مورد استفاده در این تحقیق، ۷۵ میکرولیتر مایه تلقیح تهیه شده به هر لوله آزمایش حاوی ۷ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد (Ghahremani 2009). با استقرار شاخه‌چه‌هایی به طول تقریبی ۲ سانتی‌متر در لوله‌های آزمایش، آلوده‌سازی تحتانی انجام شد. به منظور اطمینان از فعالیت و رشد باکتری، معرف برموکروزول‌گرین (Bromocresol Green)، به عنوان شاخص تغییرات pH در محیط رشد با غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به کلیه محیط‌های کشت توأم افزوده شد (Abdollahi et al. 2004). به منظور فعال شدن زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست، با توجه به اینکه در شرایط درون شیشه حضور ساکاروز سبب غیرفعال شدن نسبی این زنجیره می‌گردد، بر اساس آزمایش‌های قهرمانی (۲۰۰۹) کلیه ارزیابی‌های انجام شده در محیط کشت فاقد ساکاروز انجام گرفت. بررسی اثر بازدارنده‌ها، از زمان شروع کشت توأم باکتری-میزبان،

میلی‌لیتری حاوی محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (Murashige & Skoog, 1962) به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۸٪ آگار مستقر و تکثیر شدند. pH محیط‌های رشد قبل از اتوکلاو کردن روی ۵/۷ تنظیم و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شدند. ساقه‌چه‌های زیر کشت شده به اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی ایجاد شده با لامپ‌های فلورسنت سفید و زرد با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و دمای شبانه‌روزی ۲۴±۱ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

ارزیابی تیمارهای غلظتی بازدارنده‌ها

بازدارنده‌های متیل‌ویولوژن با نام شیمیایی 1-1-Dimethyl- (Sigma- 4,4-bipyridinium dichloride hydrate Aldrich, USA) دیورون (DCMU) با نام شیمیایی (Sigma- 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurac Pentane- Aldrich, USA) و گلو تار آلدهید با نام شیمیایی 1,5-diol (Sigma-Aldrich, USA) در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به خاصیت علف‌کشی بازدارنده‌های فوق در غلظت‌های بالا، به‌منظور تمایز محدوده زمانی ایجاد نکروز توسط این بازدارنده‌ها و نکروز حاصل از باکتری عامل بیماری، طی آزمایشات مقدماتی غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بازدارنده‌ها بدون حضور باکتری، روی شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام سیب و گلابی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به عدم بروز نکروز حاصل از بازدارندگی دیورون تا غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، به منظور اثبات بازدارندگی این ماده روی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست، آزمایش با غلظت‌های ۰/۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیز انجام گرفت. این

بیماری، نشان داد که تنها دو غلظت بالای متیل ویولوژن شامل ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر باعث بروز علائم نکروز به صورت سیاه شدگی و مرگ بافت‌ها در طول شاخه‌چه‌ها در ارقام متحمل و حساس سیب و گلابی نسبت به شاهد (عدم وجود بازدارنده) شد. هم‌چنین در سایر غلظت‌های این بازدارنده (۰/۱، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم بر لیتر) هیچ‌گونه علائم نکروز و مرگ بافت‌های ارقام مورد بررسی حتی پس از گذشت ۲۱۶ ساعت روی شاخه‌چه‌ها مشاهده نشد (شکل ۱).

آزمایش مقدماتی انجام شده در حضور بازدارنده گلوآرالدهید نشان داد که گلوآرالدهید در کلیه غلظت‌های استفاده شده نسبت به شاهد باعث ایجاد نکروز در ارقام متحمل و حساس سیب و گلابی در عدم حضور عامل بیماری شد (شکل ۲). در این آزمایش با افزایش غلظت، شدت و سرعت بروز نکروز افزایش یافت. با مقایسه نتایج پیشرفت نکروز حاصل از عامل بیماری (آزمایشات کشت توام باکتری/میزبان‌های سیب و گلابی) در عدم حضور بازدارنده با نتایج پیشرفت نکروز حاصل از بازدارنده در عدم حضور باکتری مشخص گردید که غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میلی‌لیتر در لیتر برای ارزیابی این اثر متقابل به دلیل سرعت بروز علائم نسبت به باکتری و تداخل نکروز حاصله با نکروز حاصل از باکتری مناسب نبوده و تنها غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر در لیتر برای بررسی نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل باکتری - میزبان مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳).

آزمایش مقدماتی انجام شده در حضور بازدارنده دیورون نشان داد که غلظت‌های ۰/۱ تا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر این بازدارنده سبب ایجاد نکروز روی شاخه‌چه‌های درون شیشه سیب و گلابی در محدوده زمانی مورد مطالعه نشد. به این منظور تکرار آزمایش در غلظت‌های بالاتر

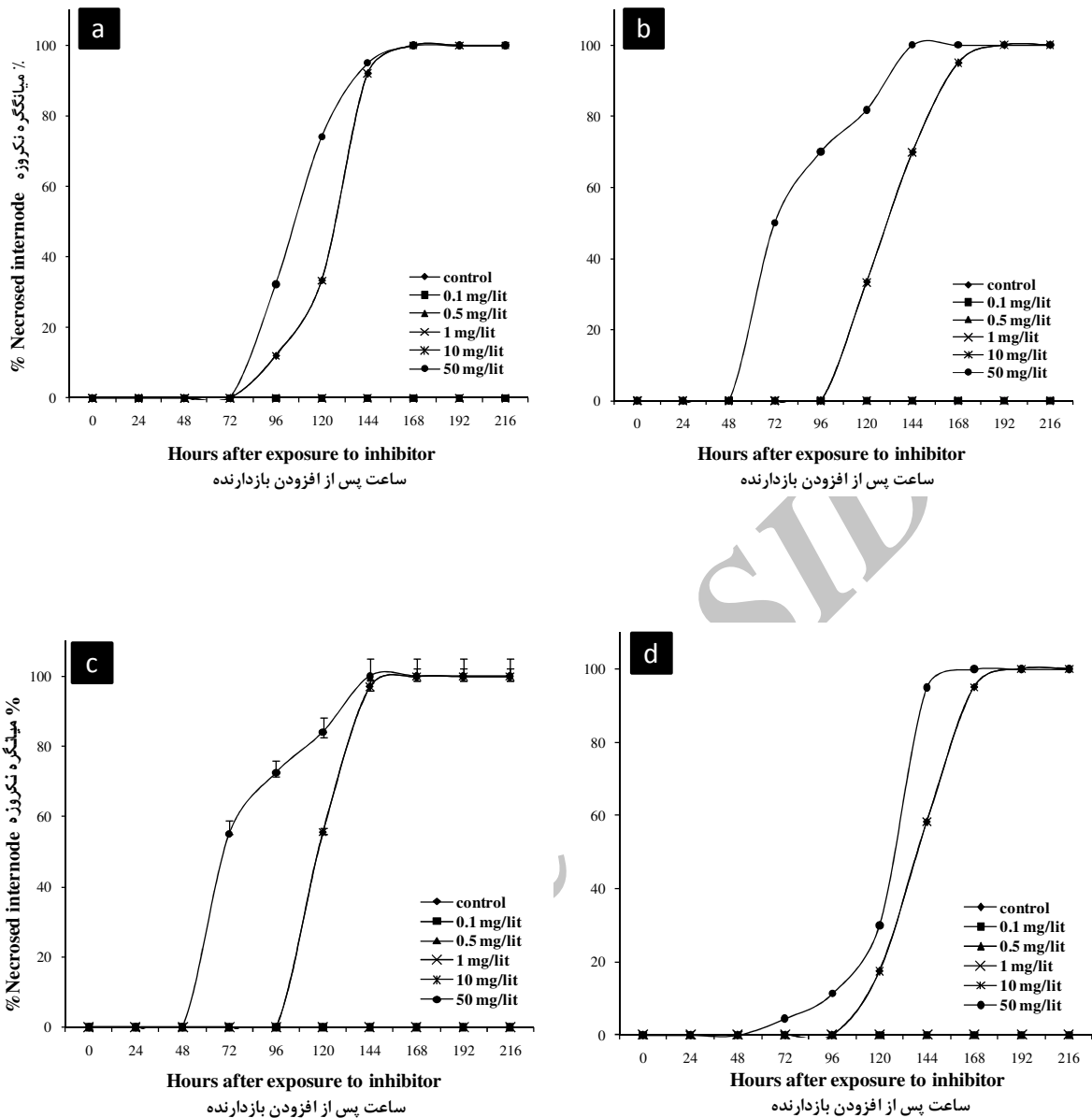
بررسی میزان پیشرفت نکروز در شاخه‌چه‌ها با فواصل زمانی هر ۲۴ ساعت یکبار و به مدت کلی ۲۸۸ ساعت انجام شد. بررسی پیشرفت نکروز حاصل از بازدارنده و باکتری (ظهور نکروزه شدن بافت ساقه از محل آلودگی و پیشرفت آن به سمت انتهای شاخه‌چه‌ها) بر اساس درصد میانگین تعداد میانگره نکروزه صورت گرفت. در کلیه آزمایشات هر تیمار در چهار تکرار انجام شد و ارزیابی آماری داده‌های حاصل با استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی‌ها نشان داد که استفاده از سیستم درون شیشه می‌تواند کارایی مطلوبی در بررسی اثر متقابل باکتری - میزبان و ارزیابی مواد بازدارنده داشته باشد. نتایج آزمون‌های غلظتی بازدارنده‌ها در آزمایش‌های مقدماتی نشان داد که بسته به نوع بازدارنده و میزان تحمل مواد گیاهی مورد استفاده در تحقیق، نکروز حاصل در غلظت‌های متفاوتی از این بازدارنده‌ها یا در زمان‌های متفاوت پس از حضور بازدارنده در محیط بروز می‌کند که بر اساس نتایج حاصله، غلظت‌های مناسب بازدارنده‌ها با هدف تفکیک نکروز حاصل از بازدارنده از نکروز حاصل از باکتری انتخاب گردید. در طی انجام تحقیق، در کلیه تیمارهای دارای عامل بیماری، pH محیط هم‌زمان با رشد باکتری کاهش یافت که شاخص رشد مطلوب عامل بیماری در این اثر متقابل بود.

تعیین محدوده غلظت‌های مناسب بازدارنده‌ها

نتایج آزمایش مقدماتی انجام شده به منظور تعیین غلظت‌(های) مناسب متیل ویولوژن روی ظهور نکروز حاصل از وجود این بازدارنده و در عدم حضور عامل

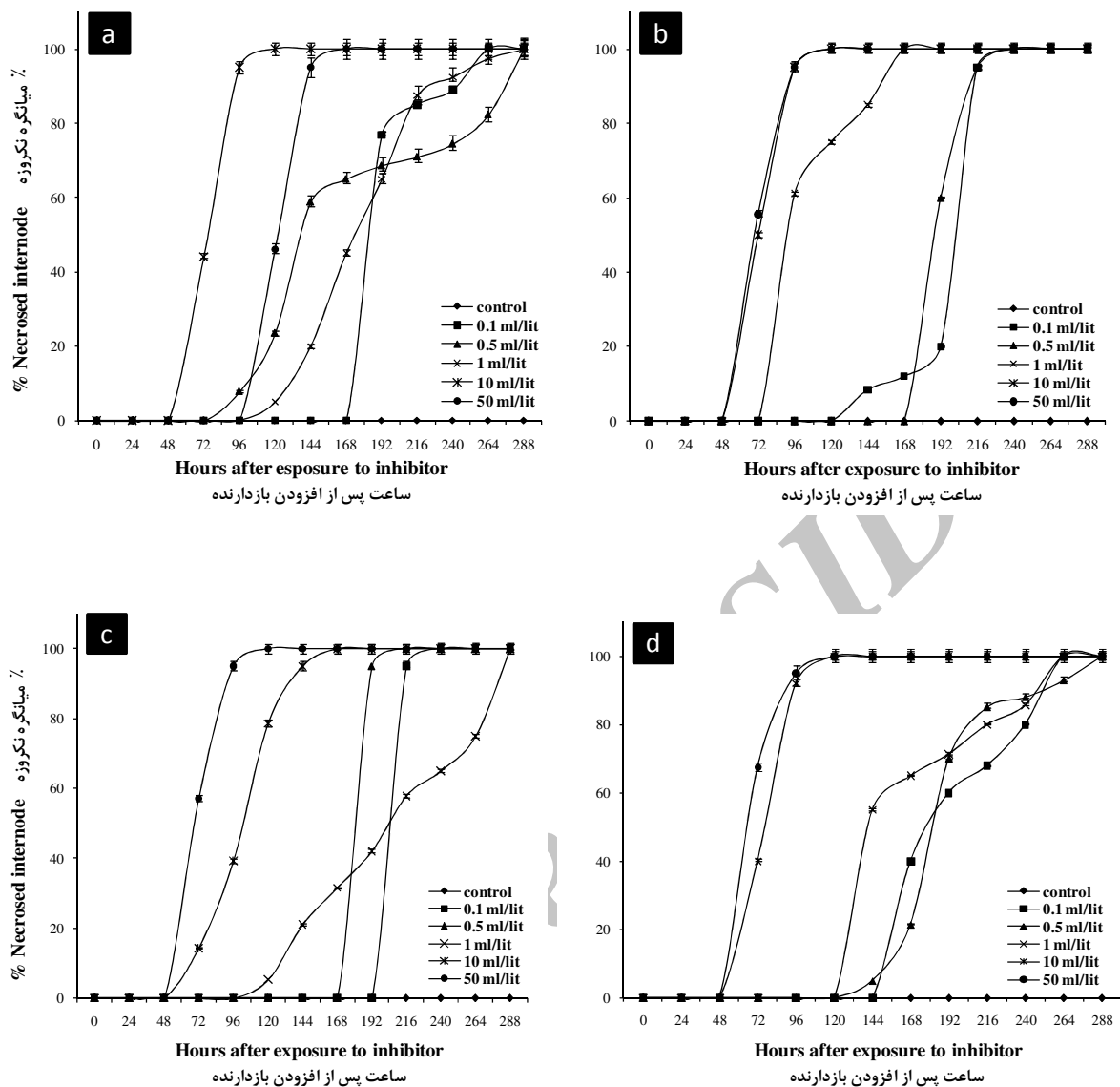


شکل ۱. تأثیر متیل ویولوژن در ایجاد نکروز حاصل از بازدارندگی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در گلابی هاروسویت (a) و اسپادونا (b) و سیب MM-111 (c) و MM-106 (d).

Fig. 1. Methyl viologen effect on appearance of necrosis caused by inhibitory effects of chloroplasts electron transport chain in Harrow Sweet (a) and Spadona (b) pears and MM-111(c) and MM-106 (d) apples.

(شکل ۴). همانند آزمایش قبلی، بر اساس این نتایج مشخص گردید که غلظت‌های بالای دیورون (۴۰۰-۷۵ میلی‌گرم در لیتر) به دلیل بروز علائم نکروز حاصل از بازدارندگی در مدت زمان کوتاه در مقایسه با شاهد (عدم

شامل: ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر انجام و مشخص گردید که دیورون در غلظت‌های ۷۵ میلی‌گرم در لیتر و بالاتر سبب ایجاد نکروز بازدارندگی روی شاخه‌های درون شیشه هر دو میزبان سیب و گلابی شد



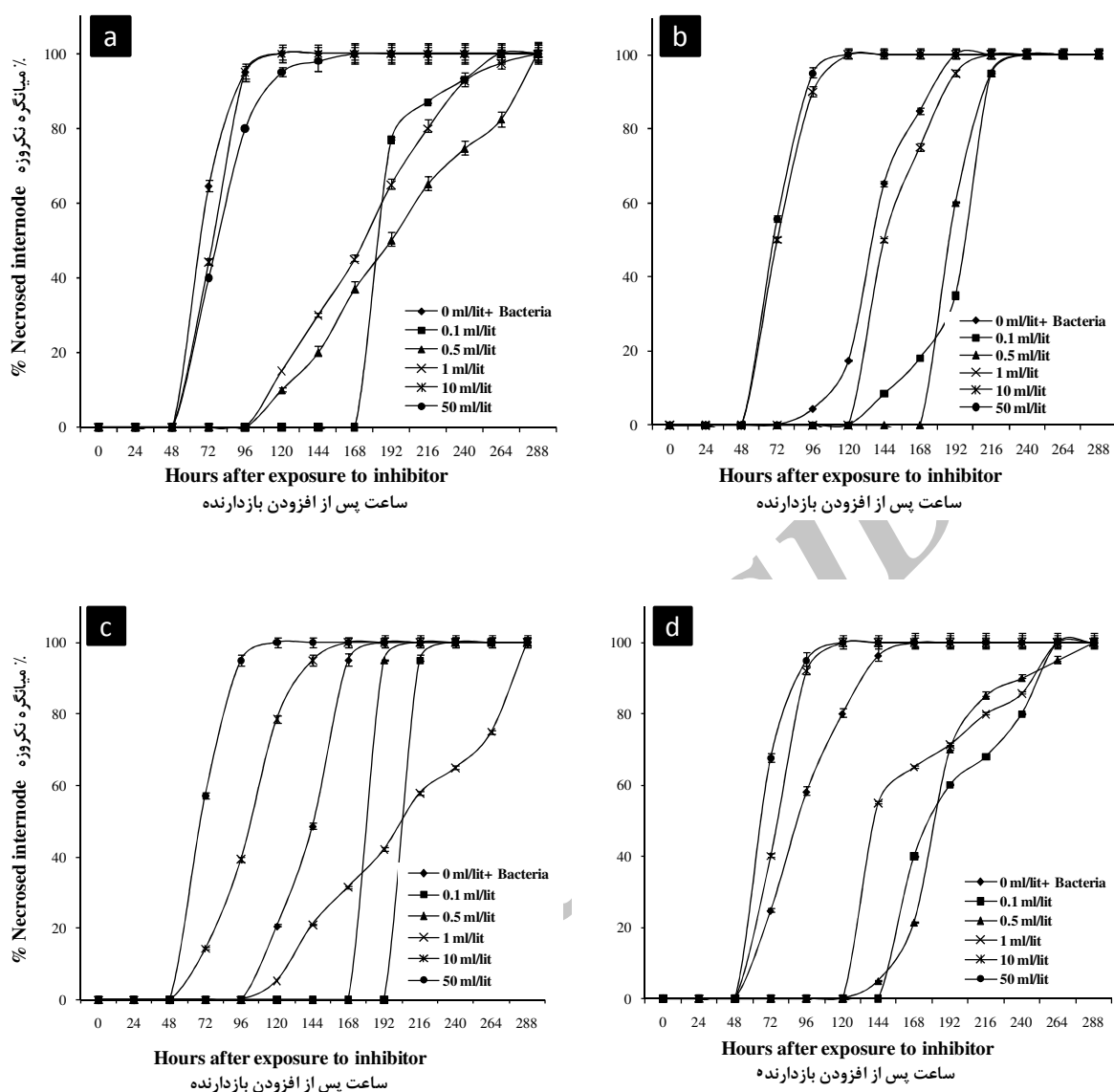
شکل ۲. تأثیر گلو تار آلدئید در ایجاد نکروز حاصل از بازدارندگی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در گلابی هاروسویت (a) و اسپادونا (b) و سیب (c) MM-111 و (d) MM-106.

Fig. 2. Glutaraldehyde effect on appearance of necrosis caused by inhibitory effects of chloroplasts electron transport chain in Harrow Sweet (a) and Spadona (b) pears and MM-111(c) and MM-106 (d) apples.

تأثیر بازدارنده‌ها در بروز علائم بیماری

به منظور تأیید نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل باکتری - میزبان و بررسی مکان تأثیر پروتئین‌های مؤثره باکتری، مطالعه تأثیر بازدارنده‌های فوق در بروز علائم بیماری در حضور بازدارنده متیل ویولوژن

حضور بازدارنده و حضور باکتری) برای ارزیابی این اثر متقابل مناسب نبوده و تنها غلظت‌های ۵۰-۰/۱ میلی گرم در لیتر دیورون برای بررسی نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل باکتری - میزبان می‌تواند استفاده شود.



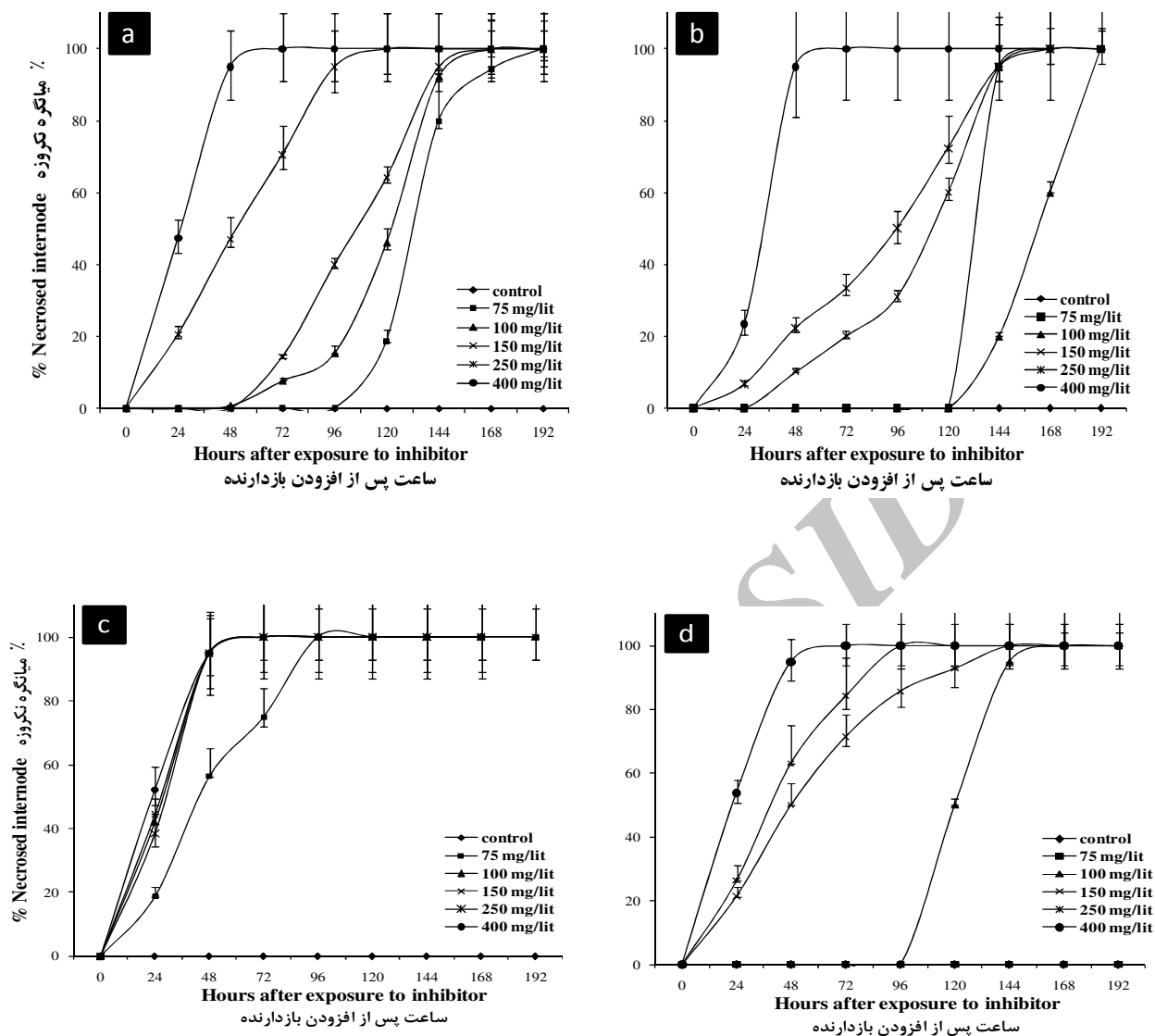
شکل ۳. تمایز نکروز حاصل از گلو تار آلدهید با نکروز حاصل از باکتری در گلابی هاروسوئیت (a) و اسپادونا (b) و سیب MM-111 (c) و MM-106 (d).

Fig. 3. Distinctness of Glutaraldehyde necrosis from necrosis of bacteria in Harrow Sweet (a) and Spadona (b) pears and MM-111(c) and MM-106 (d) apples.

بر اساس ارتباط مستقیم تولید ROS با بروز علائم بیماری آتشک (Ghahremani 2009)، به نظر می‌رسد حساسیت به آتشک می‌تواند در کلروپلاست و در نتیجه تولید ROS در آن رقم زده شود.

مقایسه نتایج آزمایش مقدماتی و تأثیر گلو تار آلدهید

در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر (غلظت‌های گزینش شده در آزمایش مقدماتی) نشان دادند که استفاده از متیل ویولوژن سبب تأخیر در بروز علائم نکروز حاصل از باکتری در ارقام حساس و متحمل هر دو میزبان سیب و گلابی نسبت به شاهد شد (شکل ۵).

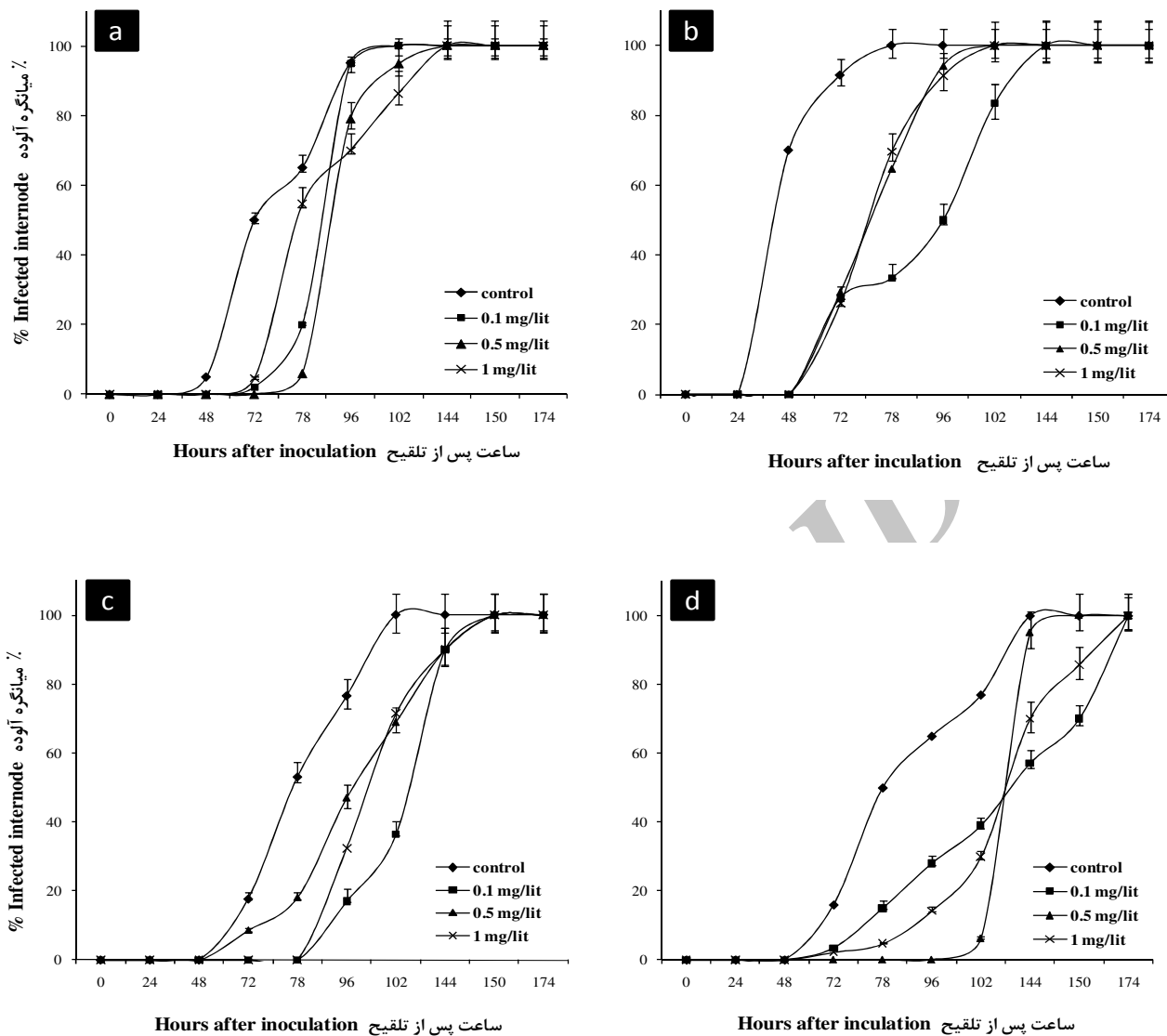


شکل ۴. تأثیر دیورون در ایجاد نکروز حاصل از بازدارندگی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در گلابی رقم هاروسوئیت (a) و رقم اسپادونا (b) و سیب (c) MM-111 و (d) MM-106.

Fig. 4. Diuron effect on appearance of necrosis caused by inhibitory effects of chloroplasts electron transport chain Harrow Sweet (a) and Spadona (b) pears and MM-111(c) and MM-106 (d) apples.

هم‌زمانی بروز نکروز با نکروز حاصل از باکتری قابل تمایز و تشخیص نبوده و غلظت‌های مناسبی تشخیص داده نشدند. داده‌ها نشان دادند که غلظت‌های پایین گلو تارآلدئید (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر در لیتر) نسبت به شاهد باعث تأخیر و کاهش در بروز علائم بیماری در ارقام متحمل و حساس گلابی و پایه حساس سیب

در بروز علائم در حضور باکتری نشان داد که نکروز حاصل از غلظت‌های پایین گلو تارآلدئید (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر در لیتر) به دلیل تأخیر زمان ظهور، قابل تمایز و تشخیص از نکروز حاصل از باکتری است، اما نکروز حاصل از غلظت‌های بالای گلو تارآلدئید (۱۰ و ۵۰ میلی‌لیتر در لیتر) در آزمایش مقدماتی به دلیل تسریع و

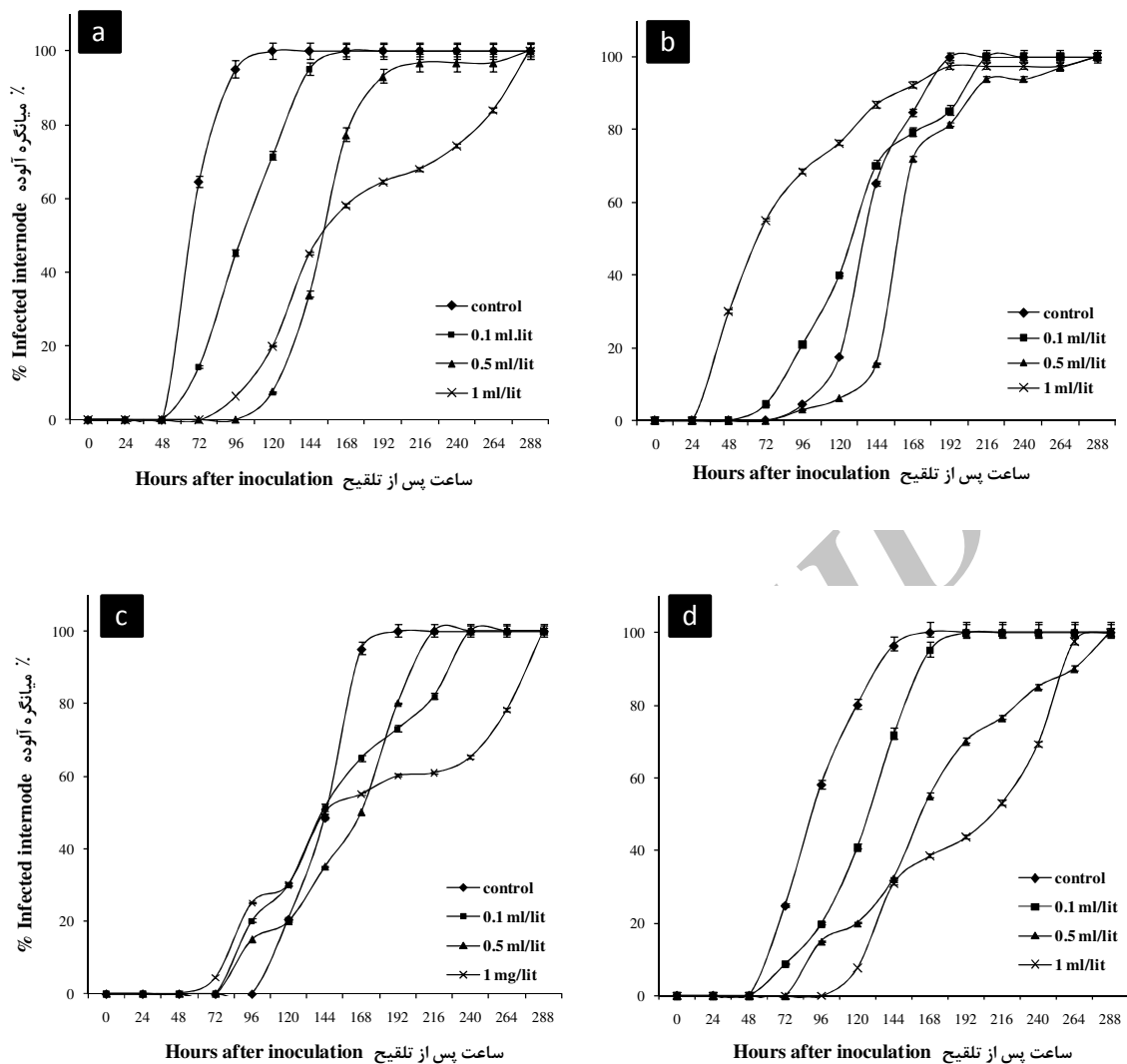


شکل ۵. تأثیر متیل ویولوژن در تأخیر ظهور علائم در حضور باکتری *E. amylovora* در گلابی هاروسونیت (a) و اسپادونا (b) و سیب (c) MM-111 و (d) MM-106.

Fig. 5. Methyl viologen effect on the delayed appearance of symptoms in the presence of *E. amylovora* in Harrow Sweet (a) and Spadona (b) pears and MM-111(c) and MM-106 (d) apples.

ناشی از بازدارندگی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در ارقام متحمل و حساس سیب و گلابی نشد اما در حضور باکتری بر علائم بیماری مؤثر و در ارقام متحمل و حساس سیب و گلابی غلظت‌های متفاوتی از بازدارنده مذکور، باعث تأخیر بروز علائم بیماری نسبت به شاهد شد (شکل ۷). غلظت‌های بالا (۴۰۰-۷۵ میلی‌گرم در لیتر)

شد (شکل ۶). به منظور مطالعه تأثیر بازدارنده دیورون در بروز علائم بیماری و براساس نتایج آزمایشات مقدماتی، بازدارنده دیورون در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (بخش اول آزمایش دیورون) اگرچه در شرایط عدم حضور باکتری باعث بروز نکروز

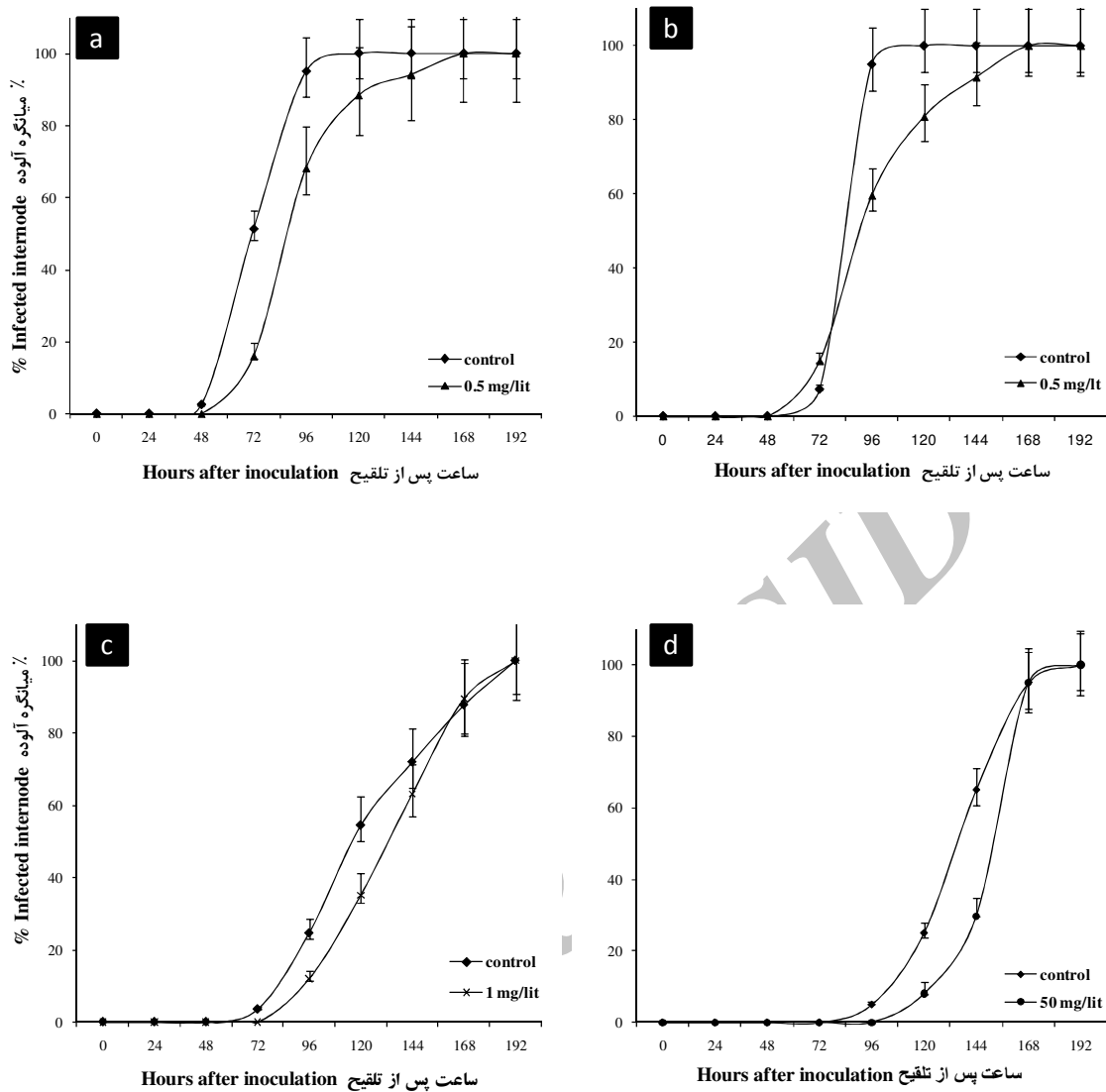


شکل ۶. تأثیر گلو تار آلدئید در تأخیر ظهور علائم در حضور باکتری *E. amylovora* در گلابی هاروسوئیت (a) و اسپادونا (b) و سیب (c) MM-111 و (d) MM-106.

Fig. 6. Glutaraldehyde effect on the delayed appearance of symptoms in the presence of *E. amylovora* in Harrow Sweet (a) and Spadona (b) pears and MM-111(c) and MM-106 (d) apples.

در اثر متقابل باکتری- میزبان نشان داد که در حضور باکتری و استفاده از بازدارنده اوراسیل نسبت به عدم استفاده از آن، تولید H_2O_2 و هم‌چنین زمان شروع تولید آن کاهش یافت. نام‌برده نشان داد که تولید کمتر رادیکال‌های فعال اکسیژن در حضور بازدارنده، باعث تأخیر در بروز علائم بیماری شد.

باعث تسریع و شدت بروز علائم بیماری نسبت به شاهد (صفر میلی‌گرم در لیتر) شد که نتیجه اثر افزایشی نکروز حاصل از بازدارندگی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و نکروز حاصل از عامل بیماری است (شکل ۸).
بررسی‌های قهرمانی (۲۰۰۹) در استفاده از اوراسیل به‌منظور بررسی نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست

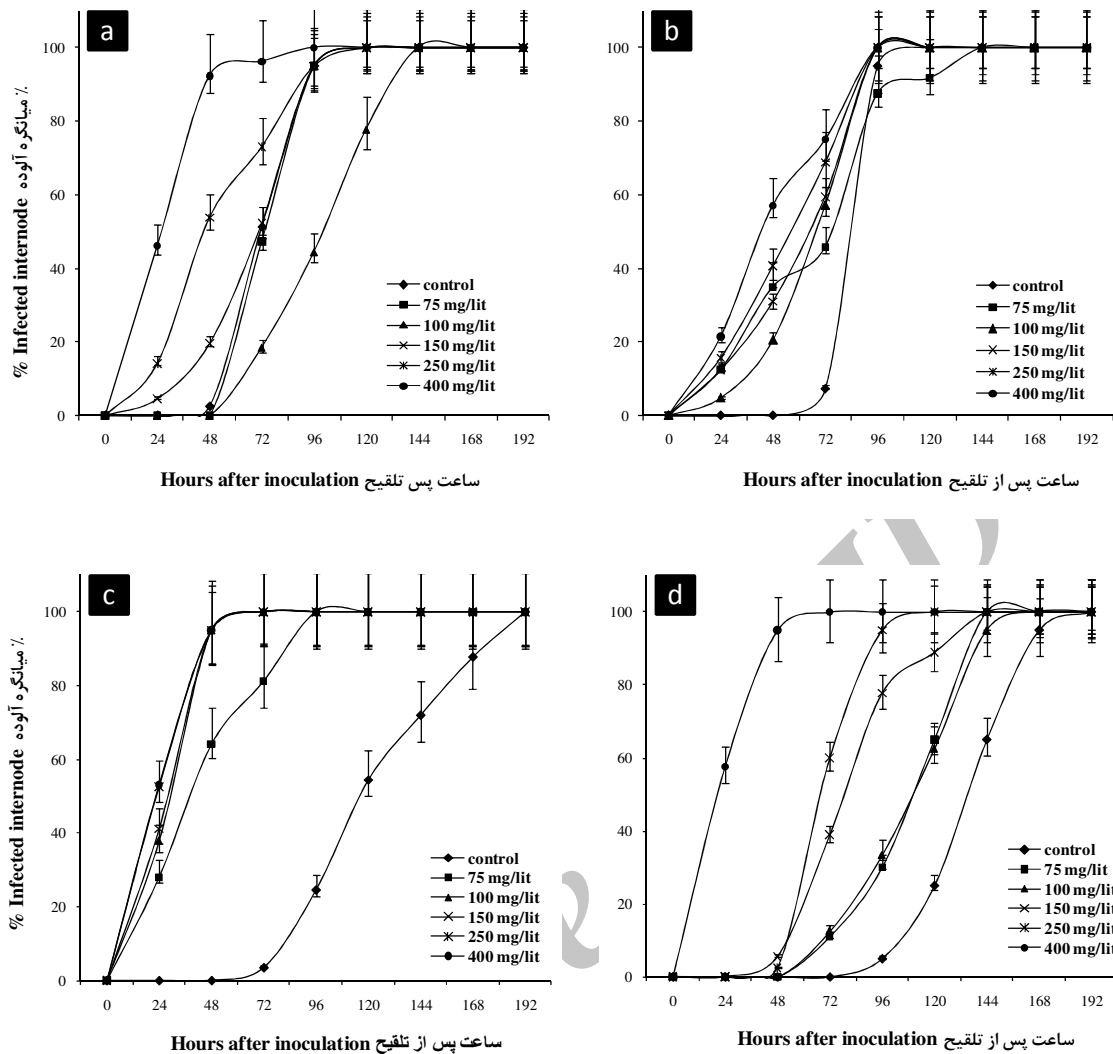


شکل ۷. تأثیر دیورون در تأخیر ظهور علائم در حضور باکتری *E. amylovora* در گلابی هاروسوئیت (a) و اسپادونا (b)، سیب MM-111 (c) و MM-106 (d).

Fig. 7. Diuron effect on the delayed appearance of symptoms in the presence of *E. amylovora* in Harrow Sweet (a) and Spadona (b) pears and MM-111(c) and MM-106 (d) apples.

حضور بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست مانند وضعیت تاریکی (که زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست غیر فعال است) با قطع جریان الکترون، این زنجیره را متوقف و غیر فعال می‌کند که به دنبال آن، اثر متقابل پروتئین‌های مؤثره باکتری با زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست متوقف و تولید ROS در این اندامک در این

زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست، یکی از منابع مهم تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در گیاه است (Taiz & Zeiger 2002). حضور باکتری خود به‌عنوان منبع ثانویه تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن است لذا در صورت فعال بودن این زنجیره، حضور باکتری باعث افزایش تولید H_2O_2 و تسریع بروز علائم بیماری می‌شود.



شکل ۸. تأثیر غلظت‌های بالای دیورون در تأخیر ظهور علائم در حضور باکتری *E. amylovora* در گلابی هاروسویت (a) و اسپادونا (b) و سیب (c) MM-111 و (d) MM-106.

Fig. 8. Great concentration Diuron effect on the delayed appearance of symptoms in the presence of *E. amylovora* in Harrow Sweet (a) and Spadona (b) pears and MM-111(c) and MM-106 (d) apples.

باکتری باعث افزایش تولید ROS و تسریع بروز علائم بیماری می‌شود. این نتایج مؤید نقش زنجیره انتقال اکترون کلروپلاست در اثر متقابل گیاه میزبان- باکتری عامل آتشک می‌باشد.

استفاده از بازدارنده‌هایی با محل‌های اثر متفاوت در زنجیره انتقال اکترون کلروپلاست در این تحقیق با هدف

اثر متقابل مختل می‌شود. در این شرایط تنها زنجیره انتقال اکترون میتوکندری صرفاً به تولید ROS ادامه می‌دهد (Xie & Chen 2000) و بنابراین با کاهش میزان تولید ROS، تأخیر در بروز علائم بیماری بروز خواهد نمود. در شرایط عدم حضور بازدارنده، مانند حالت روشنایی، زنجیره انتقال اکترون کلروپلاست فعال بوده و حضور

باعث تأخیر در بروز علائم می‌گردد. برعکس اگر بازدارنده جایی بعد از محل اثر باکتری باعث قطع زنجیره گردد تجمع الکترونها را در محل قبل از اثر خود باعث شده و حضور باکتری و اثر متقابل آن با زنجیره انتقال الکترون، انفجار اکسیداتیو شدیدی را سبب شده و تولید ROS افزایش می‌یابد. افزایش تولید ROS در حالت اخیر سبب تسریع بروز علائم بیماری می‌شود. پس می‌توان نتیجه گرفت که محل اثر پروتئین‌های مؤثره باکتری بر زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست بعد از محل اثر بازدارنده دیورون و متیل ویولوژن بر این زنجیره است که با توجه به مسیر حرکت الکترون و پتانسیل الکتروشیمیایی گیرنده‌های الکترون این زنجیره، بعد از گیرنده الکترونی فرودکسین است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (63-64) متن انگلیسی مراجعه شود.

شناسایی محل اثر پروتئین‌های مؤثره باکتری عامل بیماری آتشک در این زنجیره، مؤید این مطلب است که این محل احتمالی جایی نزدیک به محل احیای NADPH در انتهای فتوسیستم I است. در بررسی طرح Z برای موجودات فتوسنتز کننده‌ای که اکسیژن آزاد می‌کنند این نتیجه به دست آمده است که پتانسیل الکتروشیمیایی فتوسیستم I از پتانسیل الکتروشیمیایی فتوسیستم II کمتر است. به عبارت دیگر فتوسیستم I پتانسیل متوسط (تمایل یک ترکیب در گرفتن الکترون از ترکیبات دیگر) منفی‌تر و کم‌تری نسبت به فتوسیستم II دارد هم‌چنین گیرنده الکترونی فرودکسین، پتانسیل الکتروشیمیایی بیشتری نسبت به فتوسیستم I دارد (Taiz & Zeiger 2002). حال با شناخت محل اثر بازدارنده‌ها در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست (فتوسیستم I و فتوسیستم II) و با توجه به تأثیر این بازدارنده‌ها در کاهش بروز علائم بیماری، این نتیجه به دست می‌آید که اگر محل اثر بازدارنده زنجیره انتقال الکترون جایی قبل از محل اثر باکتری در زنجیره باشد توقف زنجیره انتقال الکترون توسط باکتری انفجار اکسیداتیوی را باعث نشده و تولید ROS کاهش یافته و