به‌زراعی کشاورزی
دوره ۲۴ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۴۰۱
صفحه‌های ۱۵۷-۱۴۵
DOI: 10.22059/jci.2021.325318.2564

مقاله پژوهشی:

بررسی برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در دو رقم رز ("Pearl" و "Angelina") تحت تنش بیمارگر *Agrobacterium tumefaciens*

اکرم وطن‌خواه[۱]، زهرا ایزدی[۲]، سعید ریزی[۳*]، عبدالرحمان معتمدی[۴]، مهدی قاسمی ورنامخواستی[۵]
۱. دانشجوی دکتری، بخش علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. استادیار، بخش مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳. استادیار، بخش علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۴. استادیار، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۵. دانشیار، بخش مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۴/۰۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۶/۱۵

چکیده

تنش‌های زیستی و غیرزیستی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان، آسیب به گیاه میزبان، کاهش قدرت آن و گاهی مرگ گیاه می‌شوند. گل رز شاخه‌بریده، یکی از محبوب‌ترین گیاهان زینتی است که به بیماری گال طوقه ناشی از *Agrobacterium tumefaciens* دچار می‌شود. برای بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و شاخص‌های فیزیولوژیک در دو رقم رز شاخه‌بریده، مایه‌کوبی عامل گال، به‌صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار در زمان پیوند به‌روش استنتینگ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهرکرد در شهریورماه ۱۳۹۹ انجام شد. تیمارها شامل آلودگی (مایه‌کوبی سوسپانسیون اگروباکتریوم و مایه‌کوبی آب) به‌عنوان عامل اول و تیمار رقم (Angelina و Pearl) به‌عنوان عامل دوم بودند. سه ماه پس از پیوند، نتایج نشان داد برهم‌کنش رقم و آلودگی (باکتری) بر صفات نشت یونی، پرولین و گایاکول پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌دار داشت. بیش‌ترین میزان قندهای محلول، MDA و پروتئین در نمونه‌های آلوده به‌ترتیب ۲۹۸/۶ میکروگرم بر گرم بر وزن تر، ۴۸۸/۶ میکرومول بر گرم در وزن تر و ۳۶/۷ میلی‌گرم بر گرم بر وزن تر مشاهده شد و بیش‌ترین RWC و سطح برگ در نمونه‌های سالم به‌ترتیب به میزان ۶۸/۵ درصد و ۲۱/۵ سانتی‌مترمربع بود. در این پژوهش مایه‌کوبی عامل گال طوقه، موجب ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن و تنش اکسیداتیو و ایجاد تغییر در لیپیدها، قندهای محلول و پروتئین کل شد.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، تنش‌های بیولوژیک، گال طوقه، *Agrobacterium tumefaciens*، *Rosa hybrida*.

Evaluation of some Physiological Parameters and Antioxidant Enzymes in Two Rose Cultivars ("Pearl" and "Angelina") under *Agrobacterium tumefaciens* stress

Akram Vatankhah[1], Zahra Izadi[2], Saeed Reezi[3*], Abdolrahman Motamedi[4], Mahdi Ghasemi-Varnamkhasti[5]
1. Ph.D. Student, Department of Science and Horticultural Engineering, Faculty of Agriculture, Shahrekord, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Biosystem Mechanics, Faculty of Agriculture, Shahrekord, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Science and Horticultural Engineering, Faculty of Agriculture, Shahrekord, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrekord, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
5. Associate Professor, Department of Biosystem Mechanics, Faculty of Agriculture, Shahrekord, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
Received: June 28, 2021 Accepted: September 06, 2021

Abstract

Biotic and abiotic stresses lead to the production of reactive oxygen species (ROS) in plants, damage to the host plant, reduction of its strength, and sometimes plant death. Cut flower rose is one of the most popular ornamental plants, suffering from crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens*. In order to investigate the activity of some antioxidant enzymes and physiological characteristics in two cultivars of cut roses, *A. tumefaciens* inoculation was performed as a factorial design in a completely randomized design with three replications at the time of grafting by stenting method in Shahrekord university research greenhouse in September 2020. Treatments include contamination (*Agrobacterium* suspension inoculation and water inoculation) as the first factor and cultivar treatment (Angelina and Pearl) as the second factor. Three months after grafting, results show that the effect of cultivar/infection interaction has significant effect on ion leakage, proline, and guaiacol peroxidase at the level of one percent probability. The highest levels of soluble sugars, MDA and protein are observed in infected samples, 298.6 (µg/g Fw), 488.6 (µmolg^{-1} Fw) and 36.7 (mg/g Fw), respectively and the highest RWC and leaf area in healthy samples are 68.5% and 21.5 (cm^2). In this study, inoculation of the crown gall lead to active oxygen species and oxidative stress, causing some changes in lipids, soluble sugars, and total protein.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, antioxidant enzymes, biological stresses, crown gall, *Rosa hybrida*.

* نویسنده مسئول
Email: sreezi@sku.ac.ir

۱. مقدمه

گال طوقه یکی از بیماری‌های مهم اقتصادی رز در گلخانه‌ها به‌شمار می‌آید. این بیماری گیاهی در سراسر جهان به‌ویژه در نواحی معتدل گسترش دارد و از مهم‌ترین علایم این بیماری ایجاد گال روی ساقه یا ریشه است (Atson, 2019). زیان اقتصادی این بیماری اصولاً در گلخانه‌های رز بیش‌تر است که باعث غیرقابل فروش‌شدن گل‌های گیاهان آلوده می‌شود (Chandrasekaran *et al*., 2019). باکتری *Agrobacterium tumefaciens* موجب القای تومور از طریق انتقال DNA (T-DNA) به سلول گیاهی می‌شود. حرکت سیستمیک اگروباکتریوم، اولین بار در گیاهان علفی گزارش شد. در گیاهان رز، انتقال *A. tumefaciens* از گال‌های طوقه و ریشه تنها منبع ایجاد گال‌های ثانویه نیست، بلکه این باکتری می‌تواند به‌صورت آلودگی‌های پنهان داخل گیاه وجود داشته باشد و گال‌های ساقه در شرایط محیطی مناسب ایجاد شوند (Atson, 2019; Cubero *et al*., 2006).

گال طوقه ناشی از *A. tumefaciens*، یکی از چالش‌برانگیزترین بیماری‌ها برای کنترل است که بیش از نود و سه خانواده گیاهی را تحت تأثیر قرار می دهد. گل رز *Rosa hybrida* L. یکی از محبوب‌ترین گل‌های زینتی جهان است که متأثر از این بیماری است. به‌طورکلی، گل‌های آلوده به گال طوقه دارای رشد آهسته، توقف رشد، کلروز برگ و کاهش عملکرد هستند و بسته به سن و نوع رز تا ٦٠ درصد کاهش عملکرد مشاهده شده است. تولید رز شاخه‌بریده مهم‌ترین جنبه کشت صنعتی رز در جهان است (Agrios, 2005; Azadi *et al*., 2013).

تنش‌های زیستی و غیرزیستی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن ROS در گیاهان می‌شوند (Danon *et al*., 2005). گونه‌های فعال اکسیژن، محصولات جانبی متابولیسم‌های طبیعی هستند و توسط اکسیدازهای متصل به غشا، پروکسی‌زوم‌ها، کلروپلاست و میتوکندری ایجاد می‌شوند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد که موجب آسیب غشا می‌شوند، نقش دارند (Chhabra *et al*., 2020). گیاهان مکانیسم‌های دفاعی پیچیده‌ای را برای جلوگیری از تهاجم بیمارگرها مانند تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، چوبی‌شدن و تقویت دیواره سلولی از طریق اتصال عرضی پروتئین‌های دیواره سلولی و رسوب‌گذاری پلی‌ساکارید کالوز ایجاد نموده‌اند. ROS به‌عنوان عوامل اکسیدکننده قوی، موجب آسیب اکسیداتیو در سطح مولکولی و سلولی و پراکسیداسیون چربی همراه با تخریب غشا، غیرفعال‌شدن پروتئین یا جهش DNA در گیاهان می‌شود (Pang *et al*., 2021). در پژوهشی (Chen *et al*., 2012)، مایه‌کوبی عامل شانکر باکتریایی *Xanthomonas citri subsp citri* (*Xcc*) بر کالاموندین و کامکوات نشان داد که ارقام مقاوم در برابر شانکر فعالیت آنزیمی آنتی‌اکسیدانی کم‌تری نشان دادند و H_2O_2 کم‌تری جمع کردند. نتایج یک پژوهش نشان داد که مایه‌کوبی عامل بیماری لکه سیاه در *Rosa centifolia* موجب افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده است (Khatun *et al*., 2009). در پژوهش Khizar *et al*. (2021)، اثر مایه‌کوبی *Aspergillus tubingensis* در دو رقم پنبه (NIA-Sadori و CIM-573) بررسی شد، نتایج نشان داد که میزان قند، پروتئین و پرولین در رقم NIA-Sadori بیش‌تر بود و میزان نشت الکترولیت در رقم CIM-573 به میزان قابل‌توجهی بیش‌تر بود. در پژوهش دیگری نیز اثر مایه‌کوبی *Verticillium dahliae* بر بادمجان (*Solanum melongena* L.) موجب کاهش قابل‌توجه گیاه رشد گیاه و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز شده است (Pang *et al*., 2021).

هدف از پژوهش حاضر، مایه‌کوبی *Agrobacterium tumefaciens* در ناحیه پیوند دو رقم رز شاخه‌بریده در روش

استنتینگ و بررسی تأثیر باکتری بر رشد رزها و شاخص‌های فیزیولوژیک و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بود.

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. کشت باکتری و آزمون‌های پاتوژنسیته و تهیه سوسپانسیون باکتری

رزهای دارای گال از نواحی مختلف جمع‌آوری شدند. گال‌های جوان، ریز، سفید و نرم از گیاهان مبتلا جدا و پس از ضدعفونی در هاون‌های سترون همراه آب مقطر سترون کاملاً له شد و به‌مدت یک شب در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. به‌وسیله یک لوپ استریل چند قطره از عصاره حاصله روی محیط کشتNA (Nutrient Agar) کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٨ ساعت تا ظهور پرگنه‌های باکتریایی در انکوباتور قرار داده شد. پس از رشد باکتری‌ها، برای خالص‌سازی، تک کلونی‌های شبیه به *Agrobacterium* (پرگنه‌های برجسته، مدور، براق) از روی محیط NA انتخاب و هر پرگنه به‌صورت جداگانه روی محیط کشتNA کشت شد. از تک‌کلونی‌های رشد کرده سوسپانسیون باکتری تهیه شد و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آزمون بیماری‌زایی روی دیسک‌های هویج و گیاهان گوجه‌فرنگی انجام شد (Chandrasekaran *et al*., 2019).

۲. ۲. استنتینگ و مایه‌کوبی باکتری

پژوهش حاضر در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهرکرد در شهریورماه ۱۳۹۹ صورت گرفت. گلخانه مجهز به سیستم مه‌پاش و فن و پد برای تنظیم دما و رطوبت بود. میانگین دما و رطوبت نسبی در طول انجام این آزمایش به‌ترتیب در دمای ٤±٢٦ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ٥±٧٠ درصد حفظ شد. در این آزمایش از رقم "Natal Briar" به‌عنوان پایه و برای پیوندک از دو رقم رز تجاری *Rosa hybrida* "Pearl" و "Angelina" استفاده شد. برای پیوندک از شاخه‌های گل‌دار رز که گل آن کامل شده بود و دارای یک جوانه غیرفعال و یک برگ پنج برگچه‌ای بود، استفاده شد. پایه از شاخه‌های نیمه‌چوبی و بالغ دارای دو گره و یک برگ انتخاب شد. پیوندک‌ها با استفاده از روش نیمانیم با زاویه ٤٥ درجه پیوند زده شدند. سوسپانسیون باکتری تهیه‌شده در مرحله قبل، به محل پیوند تزریق شد. ته قلمه-پیوندی‌ها با هورمون پودری اکسین (IBA) سه‌دهم درصد آغشته شده و درون بستر جیفی پلت (٦٠ درصد کوکوپیت+ ٤٠ درصد پرلایت) کشت شدند. در نهایت سینی‌ها در اتاقک کشت با رطوبت بالا و تحت نور لامپ‌های LED قرار گرفتند.

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC)، پنج عدد دیسک برگ تهیه و توزین شد (FW). سپس درون فالکون‌های حاوی آب مقطر به‌مدت شش ساعت در تاریکی قرار گرفت (حالت تورژسانس)، سپس وزن نمونه‌ها در حالت تورژسانس به‌دست آمد (TW). در نهایت وزن خشک نمونه‌ها محاسبه شد (DW) و RWC با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (Bastam *et al*., 2012).

رابطه ۱) $RWC= [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100$

به‌منظور اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت (Electrolyte Leakage) دیسک‌های برگی تهیه و درون فالکون‌های حاوی آب مقطر به‌مدت ٢٤ ساعت روی شیکر (مدل:FR602 ، ساخت ایران) قرار گرفتند و هدایت الکتریکی محلول (EC_1) اندازه‌گیری شد، پس از اتوکلاو (مدل 121A، ساخت ایران) به‌مدت ۲۰ دقیقه (دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس)، دوباره هدایت الکتریکی محلول (EC_2) اندازه‌گیری شد. میزان نشت الکترولیت از غشاها براساس رابطه (۲) محاسبه شد (Bastam *et al*., 2012).

رابطه ۲) نشت یونی غشا = $(EC1/EC2) \times 100$

سطح برگ: با استفاده از نرم‌افزار Digimizer (نسخه v5.4.6) سطح برگ اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری پرولین یک‌دهم گرم از هر برگ با پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد در هاون چینی ساییده شد و میزان پرولین به‌روش (Bates *et al.*, 1973) اندازه‌گیری شد. جذب نوری محلول در طول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد غلظت‌های صفر، ٤، ۸، ۱۲، ١٦ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین تهیه شد. معادله خط منحنی استاندارد y=۱۷/۰۲۲x−۰/۵٤۲۵ و R^2=۰/۹۹ به‌دست آمد.

برای اندازه‌گیری قندهای محلول، از یک دهم میلی‌لیتر از عصاره الکلی تهیه‌شده استفاده شد و میزان قندهای محلول به‌روش (Irigoyen *et al.*, 1992) اندازه‌گیری شد و جذب نوری محلول در طول موج ٦۲۵ نانومتر قرائت شد. استانداردها از گلوکز خالص در غلظت‌های صفر، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد و معادله خط منحنی استاندارد y =۳۸۹/۳۳x−۱۱/٦۹۲ و R^2 =۰/۹٤ به‌دست آمد.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدها، نیم گرم از نمونه برگ تازه با پنج میلی‌لیتر بافر پتاسیم‌فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) در هاون چینی ساییده شد. به یک میلی‌لیتر از محلول صاف‌شده یک میلی‌لیتر محلول نیم درصد تیوباربیتوریک اسید که حاوی تری‌کلرواستیک‌اسید است، اضافه شد. محلول در حمام آب داغ با دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس ظرف محتوای محلول به سرعت درون حمام یخ قرار داده شد تا واکنش متوقف شد. میزان جذب به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل PG instruments T80+، ساخت انگلستان) در دو طول موج ۵۳۲ و ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت مالون‌دی‌آلدهید از ضریب خاموشی ($۱۵۵mM^{-1}cm^{-1}$) و از رابطه (۳) استفاده شد (Heath & Packer, 1969).

رابطه ۳)

$$MDA\ (\mu molg^{-1}\ Fw) = (A532-A600/155)\times 1000$$

برای اندازه‌گیری پروتئین کل از ۵۰ میکرولیتر از عصاره تهیه‌شده در بافر فسفات‌پتاسیم (عصاره تهیه‌شده برای MDA) استفاده شد. سنجش پروتئین کل محلول به‌روش Bradford (1976) انجام شد. منحنی استاندارد با مقادیر صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ۵۰، ٦۰، ۷۰ میکرولیتر از محلول پروتئین استاندارد (پنج میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی در پنج میلی‌لیتر بافر استخراج پروتئین حل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود) رسم شد. با رسم منحنی رگرسیون و به‌دست آوردن معادله خط y =۲۱۲/۹۲ x− ۱۲/۹۸ و R^2= ۰/۹۷ و نسبت‌دادن جذب تیمارها با منحنی استاندارد، میزان غلظت پروتئین در نمونه‌ها به‌دست آمد.

سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

استخراج آنزیم کاتالاز از بافت گیاهی به‌روش Abei (1984) انجام شد. ابتدا به یک و ۹۵ میلی‌لیتر بافر فسفات یک‌دهم مولار (pH=۷)، ۱۰۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ۲٦٤ میلی‌مولار افزوده شد. پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر عصاره گیاهی جذب مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۱۰۰ ثانیه (با فواصل پنج ثانیه) در طول موج ۲٤۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل PG instruments T80+، ساخت انگلستان) قرائت شد. سپس فعالیت آنزیم کاتالاز براساس رابطه (٤) محاسبه شد (Narwal *et al.*, 2009).

رابطه ٤)

$$CAT\ (mmol_{H2O2}\ minute^{-1}\ mg^{-1}{}_{protein}) = (\Delta A_{240}/\Delta t)\ V_{mix}\ /\ \varepsilon d P V_{extr}$$

ΔA= میزان جذب، Δt= زمان واکنش (دقیقه)، V_{mix}= حجم نهایی واکنش (لیتر)، ε= ضریب خاموشی آب اکسیژنه در ۲٤۰ نانومتر که برابر است با ($٤۰mM^{-1}Cm^{-1}$)، d= پهنای کوت (سانتی‌متر)، P= غلظت پروتئین در نمونه ($mg\ mL^{-1}$)، V_{extr}= حجم نمونه به‌کاررفته در آزمایش (میلی‌لیتر).

آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

استخراج آنزیم گایاکول پراکسیداز از بافت گیاهی به‌روش Mac-Adam *et al.* (1992) انجام شد. ابتدا به یک و ۳۵ میلی‌لیتر بافر فسفات یک‌دهم مولار (pH=٦)، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ٤٥ میلی‌مولار افزوده شد. در ادامه ۵۰۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ٤٤ میلی‌مولار اضافه شد و پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر عصاره گیاهی، جذب محلول بلافاصله در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳۰۰ ثانیه (با فواصل ۱۰ ثانیه) در طول موج ٤٧٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل PG instruments T80+، ساخت انگلستان) قرائت شد. سپس فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز براساس رابطه (۵) محاسبه شد (Narwal *et al.*, 2009).

رابطه ۵)
$$GPX\ (mmol_{tetraguaiacol}\ minute^{-1}\ mg^{-1}_{protein}) = (\Delta A_{470}/\Delta t)\ V_{mix} / \varepsilon d P V_{extr}$$

ΔA= میزان جذب، Δt= زمان واکنش (دقیقه)، V_{mix}= حجم نهایی واکنش(لیتر)، ε= ضریب خاموشی اکسیدشدن گایاکول در ٤٧٠ نانومتر که برابر است با (٢٦/٦ $mM^{-1}Cm^{-1}$)، d= پهنای کوت (سانتی‌متر)، P= غلظت پروتئین در نمونه (mg mL^{-1})، V_{extr}= حجم نمونه به‌کاررفته در آزمایش (میلی‌لیتر).

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده با نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۲) و مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل با نرم‌افزار آماری MSTATC (نسخه ۱/۱) آزمون LSD در سطح پنج درصد انجام گرفت.

۳. نتایج و بحث

براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول‌های ۱ و ۲)، نوع رقم بر صفات محتوای نسبی آب برگ و سطح برگ در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی‌دار و بر صفات نشت یونی، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌دار داشته است.

درحالی‌که تیمار مایه‌کوبی باکتری بر صفات محتوای نسبی آب برگ، نشت یونی، سطح برگ، قندهای محلول، میزان MDA، پروتئین و گایاکول پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. برهم‌کنش رقم و آلودگی (باکتری) بر صفات نشت یونی، پرولین و گایاکول پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌دار داشت (جدول‌های ۱ و۲).

نتایج مقایسه میانگین اثرات تکی تیمارها (جدول ۳) نشان داد که در تیمار نوع رقم، بیش‌ترین میزان محتوای نسبی آب برگ (RWC) در رقم Pearl با میانگین (٦٧/٨٤) مشاهده شد. هم‌چنین در تیمار مایه‌کوبی باکتری بیش‌ترین میزان محتوای نسبی آب برگ در نمونه‌های سالم (٦٨/٥٠) مشاهده شد.

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای رقم (آنجلینا و پیرل) و آلودگی (مایه‌کوبی باکتری و مایه‌کوبی آب) بر محتوای نسبی آب برگ، نشت یونی، سطح برگ، پرولین، میزان قندهای محلول و مالون‌دی‌آلدهید

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		محتوای نسبی آب برگ (RWC)	نشت یونی	سطح برگ	پرولین	قندهای محلول	مالون‌دی‌آلدهید
رقم	۱	۳۱۲/۵۱*	٤٧١/٦٧**	١٦٢/٦٨*	١١/٦٢٩ns	٢٨٨/٠١ns	٤٢١٤٨/١٥ns
آلودگی	۱	٣٩٨/٧٦**	٦٢٩/٦١**	٢٨٦/٠١٠**	١٩/٢١١ns	٢١٠٥٢/٦**	١٢١٨٣٠/١**
رقم× آلودگی	۱	٥٤/٣٧ns	١٠٣١/٧٦**	٢٠/٣٦٩ns	٩٣/٧٠٧**	٢١٧٥/٤ns	١٤٨٩٥/٢٨ns
خطا	۸	٤٥/٦٠	٢٨/٨٠٠	١٩/٩٨٤	٧/٣٢	٢٠١٦/٠٧	٩٠٧٢/٠٤
CV %		١٠/٧٦	١٠/٢٦	٢٦/٨٤	٢٢/٦	١٧/٤٩	٢٤/٥٥

n.s: غیر معنی‌دار، * و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر رقم و آلودگی بر پروتئین، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		پروتئین	گایاکول پراکسیداز	کاتالاز
رقم	۱	۸۳/۸۷۳ns	۰/۰۰۰۱۹**	۰/۱۱۳۸***
آلودگی	۱	۳۱۹/۹۱**	۰/۰۰۱۵***	۰/۰۰۰۳ns
رقم× آلودگی	۱	۹۷/۹۲۷ns	۰/۰۰۰۶۷**	۰/۰۰۰۱۸ns
خطا	۸	۳۵/۸۰	۷/۲۲	۰/۰۰۰۵
CV %		۱۸/۹۷	۱۴/۵۶	۱۹/۹۶

n.s: غیر معنی‌دار، * و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۳. اثرات رقم و آلودگی بر RWC، سطح برگ، قندهای محلول، MDA، پروتئین کل و کاتالاز.

تیمارها		RWC (%)	سطح برگ (cm^2)	قندهای محلول (µg/gFw)	MDA (µmolg^{-1} Fw)	پروتئین کل (mg/g Fw)	کاتالاز (mmol H_2O_2 minute^{-1} mg^{-1} protein)
رقم	Angelina	۵۷/۶۳b±۰/۱۹	۲۰/۳۳a±۰/۲۱	۲۶۱/۶۲a±۱/۴۵	۳۲۸/۶۰a±۲/۸۵	۳۴/۱۷۹a±۰/۱۷	۰/۲۰۹a±۰/۰۰۰۷۶
	Pearl	۶۷/۸۴a±۰/۲۶	۱۲/۹۷b±۰/۱۰	۲۵۱/۸۲a±۱/۷۱	۴۴۷/۱۳a±۴/۳۲	۲۸/۸۹۱a±۰/۲۴	۰/۰۱۴b±۰/۰۰۰۱۱
باکتری	سالم	۶۸/۵۰a±۰/۲۶	۲۱/۵۳a±۰/۱۷	۲۱۴/۸۳b±۰/۹۲	۲۸۷/۱۰b±۲/۱۵	۲۶/۳۷b±۰/۱۸	۰/۱۱۷a±۰/۰۰۲۸۱
	آلوده	۵۶/۹۷b±۰/۱۵	۱۱/۷۶b±۰/۱۱	۲۹۸/۶۰a±۱/۲۴	۴۸۸/۶۲a±۳/۴۶	۳۶/۷۰a±۰/۱۶	۰/۱۰۶a±۰/۰۰۲۶۸

در هر ستون، میانگین‌های مربوط به هر عامل دارای حرف مشترک در آزمون LSD در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

RWC همبستگی منفی در سطح احتمال یک درصد با پروتئین (r=-۰/۶۷) و گایاکول پراکسیداز (r=-۰/۶۹) نشان داد. نشت یونی همبستگی منفی در سطح احتمال یک درصد با سطح برگ (r=-۰/۷۳) نشان داد (جدول ٤). کاهش محتوای نسبی آب برگ‌ها به مفهوم کاهش میزان آب گیاه است که با کاهش آب در سلول‌های گیاهی، منجر به متوقف‌شدن تقسیمات سلولی شده و کاهش وزن اندام هوایی و ریشه رخ می‌دهد. هم‌چنین منجر به بسته‌شدن روزنه‌ها و عدم ورود دی‌اکسیدکربن لازم برای فتوسنتز می‌شود. بنابراین احتمالاً یکی از دلایل کاهش میزان رشد در گیاهان تحت تنش باکتری، کاهش محتوای آب نسبی بافت‌های گیاهی است.

محتوای نسبی آب بالاتر گیاه، به معنی توانایی بالاتر گیاه در حفظ مقادیر آب در شرایط تنش است. محتوای نسبی آب بالا از طریق قابلیت تنظیم اسمزی و یا توانایی ریشه در جذب آب حاصل می‌شود (Chhabra *et al*., 2020). نتایج حاصل از این پژوهش حاضر نشان داد که در تیمار رقم بیش‌ترین RWC در رقم Pearl و در تیمار آلودگی بیش‌ترین RWC، در نمونه‌های سالم مشاهده شد. یکی از دلایل توقف و کاهش رشد نمونه‌های آلوده را می‌توان ناشی از کاهش محتوای نسبی آب دانست. به‌نظر می‌رسد تنش‌ها موجب افزایش نشت الکترولیت از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن در داخل سلول، کاهش پایداری غشا و افزایش نشت مواد سیتوپلاسمی از آن می‌شوند (Azari *et al*., 2012). در اثر تنش (مایه‌کوبی اگروباکتریوم)، نشت الکترولیت افزایش یافت بنابراین هر گیاهی که بتواند نشت الکترولیت کم‌تری داشته باشد، یا به‌عبارت دیگر حفاظت از غشای سلولی را بهتر انجام دهد، نسبت به اگروباکتریوم مقاوم‌تر است.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد بیش‌ترین میزان نشت الکترولیت در Angelina آلوده به باکتری دیده شد (جدول ۵). هم‌چنین براساس نتایج مقایسه میانگین در تیمار نوع رقم، بیش‌ترین سطح برگ در رقم Angelina (میانگین ۲۰/۳۳) و در تیمار مایه‌کوبی باکتری، بیش‌ترین سطح برگ در نمونه‌های سالم (میانگین ۲۱/۵۳) مشاهده شد (جدول ۳). سطح برگ همبستگی منفی در سطح احتمال پنج درصد با MDA (r= -/۶۰) و همبستگی مثبت در سطح احتمال پنج درصد با کاتالاز (r=۰/۶۰) نشان داد.

نتایج جدول مقایسه میانگین هم‌چنین نشان داد که میزان قندهای محلول در تیمار نوع رقم بین دو رقم Angelina و Pearl تفاوت معنی‌داری نشان نداد، درحالی‌که در تیمار مایه‌کوبی باکتری بیش‌ترین میزان قندهای محلول در نمونه‌های آلوده (۲۹۸/۶۰) مشاهده شد (جدول ۳). میزان قندهای محلول همبستگی مثبت در سطح احتمال یک درصد با پروتئین (r=۰/۷۱) و گایاکول پراکسیداز (r=۰/۸۰) نشان داد (جدول ٤). قندها پیش‌ساز سنتز متابولیت‌های ثانویه متعددی، مانند، فیتوالکسین‌ها، فنل‌ها، لیگنین و کالوز هستند.

جدول٤. همبستگی صفات اندازه‌گیری‌شده.

صفت	RWC	نشت یونی	سطح برگ	قندهای محلول	پروتئین کل	MDA	GPX	CAT	پرولین
RWC	۱								
نشت یونی	۰/۱۳٤ns	۱							
سطح برگ	-۰/۰۸٤ns	-۰/۷۳٤**	۱						
قندهای محلول	-۰/۳۸۲ns	۰/۱۸٦ns	-۰/۵۰۷ns	۱					
پروتئین کل	-۰/٦۷٦**	-/۰٤٤ns	-۰/۳٤٦ns	۰/۷۱۸**	۱				
MDA	-۰/٤۵۷ns	۰/۳۷۳ns	-۰/٦۰۱*	۰/۵۲۱ns	۰/۵۸۵*	۱			
GPX	-۰/٦۹۳**	-۰/۰٤٦ns	-۰/۳۳۳ns	۰/۸۰۱**	۰/۸۵۹**	۰/۵٤۳ns	۱		
CAT	-۰/۵۱۲ns	-۰/٤۸۳ns	۰/٦۰۰*	-۰/۰۳۷ns	۰/۲۱۰ns	-۰/٤۵۷ ns	۰/۲۲٤ns	۱	
پرولین	-۰/٤۱۷ns	-۰/٤۱۲ns	۰/۲۰۳ns	۰/۳۳۰ns	۰/۲۸۲ns	۰/۰۹۸ns	۰/٦٤۵*	۰/۳۲۵ns	۱

n.s: غیر معنی‌دار، * و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۵. برهم‌کنش رقم و آلودگی بر نشت الکترولیت، پرولین و گایاکول پراکسیداز

تیمار رقم	تیمار آلودگی	نشت الکترولیت (%)	پرولین (mg/L)	گایاکول پراکسیداز (mmol/min mg)
Angelina	سالم	۲۹/۵۱b±۰/٦٦	۱٤/٤a±۰/۱۸	۰/۰۳c±۰/۰۰۰۵
	آلوده	٦۲/۵۵a±۰/۳۲	۱۱/٤۱ab±۰/۳۸	۰/۰۳۷۵b±۰/۰۰۰۵
Pearl	سالم	٦۰/۵۹a±۰/۳۳	٦/۹۱b±۰/۱۸	۰/۰۰٦۹d±۰/۰۰۱۹
	آلوده	۵٦/۵٤a±۰/۵۳	۱۵/۰۳a±۰/۱۵	۰/۰٤٤۳a±۰/۰۰۰۱

در هر ستون میانگین‌های مربوط به هر عامل دارای حرف مشترک در آزمون LSD در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

مولکول‌های قند نقش مهمی در ایجاد مقاومت در برابر حمله پاتوژن به گیاهان دارند. بیمارگرها ممکن است با آسیب فیزیکی به دستگاه فتوسنتز یا با ایجاد اختلال در مسیرهای متابولیکی، تغییرات محتوای قند در گیاهان، ظرفیت فتوسنتز گیاهان را مختل کند (Murria *et al*., 2018). میزان قندهای محلول در گیاهان تحت حمله عوامل بیمارگر تغییر می‌کند و اصلاح می‌شود. سطح قندها با مصرف آن‌ها برای انرژی، اهداف ساختاری و جذب توسط عوامل بیماری‌زا کاهش می‌یابد. کاهش میزان قند را می‌توان به‌دلیل تبدیل محل آلودگی به یک سینک توضیح داد. در محل آلودگی قندها به‌وسیله عامل بیمارگر گرفته می‌شوند و میزان قند زیادی برای شروع واکنش‌های دفاعی مانند سنتز فنیل پروپانوئیدها یا فنل‌ها یا سنتز پروتئین‌های مرتبط با بیمارگر باشد. شدت تنفس در محل آلودگی افزایش می‌یابد (Morkunas & Ratajczak, 2014).

مانیتول یک قند الکی است که به‌وسیله کاهش گروه کتو یا آلدوز از قند شکل می‌گیرد. این ماده نقش مهمی در مقاومت به بیماری در میان تنش‌های زنده و غیرزنده در شکل مانیتول دهیدروژناز (MTD) یک آنزیم کاتابولیکی دارد. یک ایدئولوژی بیان می کند که مانیتول با جاروکردن گونه‌های مخرب واکنش اکسیژن (ROS) که در زمان تنش آبی تشکیل شده‌اند موجب کاهش اثر تنش می‌شود (Chhabra *et al*., 2020). در پژوهش حاضر بیش‌ترین میزان قند در تیمار آلودگی در ارقام آلوده به باکتری مشاهده شد که با نمونه‌های سالم تفاوت معنی‌داری نشان داد. افزایش میزان قندهای محلول در تیمار مایه‌کوبی باکتری در پژوهش حاضر را می‌توان به جهت حفظ اسمولاریته و حذف ROS ناشی از تنش نسبت داد.

براساس نتایج مقایسه میانگین اثر تیمار نوع رقم بر میزان MDA در ارقام Angelina و Pearl تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرده است، درحالی‌که در تیمار مایه‌کوبی باکتری بیش‌ترین میزان MDA در نمونه‌های آلوده (میانگین ٤٨٨/٦) مشاهده شد (جدول ٣). MDA همبستگی مثبت در سطح احتمال پنج درصد (r=٠/٥٨) با پروتئین و همبستگی منفی در سطح پنج درصد (r=-٠/٦٠) با سطح برگ نشان داد (جدول ٤). مالون‌دی‌آلدهید یک آلدهید واکنش‌پذیر است که باعث ایجاد تنش در سلول‌ها می‌شود. میزان این ترکیبات به‌عنوان نشانگری برای اندازه‌گیری سطح استرس اکسیداتیو در موجود زنده استفاده می‌شود. مالون‌دی‌آلدهید (MDA) که از شکست ثانویه لیپید هیدروپراکسیدهای اولیه ناشی می‌شود، به‌عنوان یک نشانگر برای مشخص‌کردن مقدار آسیب‌های اکسیداتیو به لیپیدها به‌کار می‌رود، گزارش شده است که MDA در *Brassica oleracea* L. در مقابل بیماری آلترناریا به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته و این حداکثر افزایش در ژنوتیپ‌های بسیار حساس بیش‌تر است (Atwal *et al*., 2004). در این پژوهش میزان MDA در تیمار آلودگی در نمونه‌های آلوده به باکتری به میزان زیادی افزایش یافته است که با نمونه‌های سالم تفاوت معنی داری را نشان داد.

براساس نتایج مقایسه میانگین (جدول ٣) میزان پروتئین در تیمار نوع رقم بین دو رقم Angelina و Pearl تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد، درحالی‌که در تیمار باکتری بیش‌ترین میزان پروتئین (میانگین ٣٦/٧٠) در نمونه‌های آلوده مشاهده شد. پروتئین کل همبستگی مثبت با قند محلول (r=٠/٧١) و گایاکول پراکسیداز (r=٠/٨٥) در سطح احتمال یک درصد و با MDA در سطح احتمال پنج درصد (r=٠/٥٨) نشان داد (جدول ٤). تعدادی از پروتئین‌ها و پپتیدها در گیاه بعد از تماس با عامل بیمارگر بیان می‌شوند که بیش‌تر این ترکیبات خاصیت ضدمیکروبی دارند. این پروتئین‌ها با تأثیر روی غشای سلولی بیمارگرها حفاظت بر علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها و

ویروس‌ها را فراهم می‌کنند. این پروتئین‌ها هم به‌صورت سیستمیک و هم به‌صورت موضعی در اثر حمله عوامل بیماری‌زا در غلظت‌های بالایی تولید می‌شوند و نقش مهمی در محافظت از گیاه بر عهده دارند. این پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی پروتئین‌های PR (پروتئین های رمزگذاری‌شده توسط گیاه که فقط در شرایط پاتولوژیک القا می‌شوند) نامیده می‌شوند (Okushima *et al*., 2000).

در صورتی‌که گیاهان دارای مولکول‌های پروتئینی خاصی باشند که به‌عنوان سوبسترا مورد نیاز بیمارگراست، حساس هستند (Goodman *et al*., 1967). به همین دلیل، اگر یک نوع نسبت کم‌تری از این پروتئین‌ها را داشته باشد و در نتیجه موجب حفظ مقاومت آن در شرایط نامساعد می‌شود، مقاوم در نظر گرفته می‌شود. در نتیجه، ارقامی که به میزان زیاد از این پروتئین ها را دارند، در شرایط مطلوب نیز مقاومت خوبی ندارند. براساس گزارش‌ها، میزان پروتئین به‌طور قابل‌توجهی در گیاهان مقاوم افزایش، اما در ارقام حساس به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت (Arun *et al*., 2010; Malhotra, 1993). پس از آلودگی، مقدار پروتئین کل در ارقام مقاوم و هم‌چنین حساس افزایش یافت، اما این افزایش در ارقام مقاوم بیش‌تر بود.

پروتئین‌های PR به پنج کلاس تقسیم می‌شوند:
Group 1 (PR-I tobacco proteins of 16 KD)، Group 2 (β-1, 3-glucanases)، Group 3 (Chitinases)، Group 4 of low molecular mass (13 and 14.5 KD)، Group 5 which includes 5A (osmotins of 24 kD) و 5B protein of unknown characteristics (approx. forty fivekD).

در میان پروتئین‌های PR، کیتینازها و β-1, 3-glucanases مهم‌ترین آنزیم‌های هیدرولیتیک هستند که پس از آلودگی توسط انواع مختلف عوامل بیماری‌زا در بسیاری از گونه‌های گیاهی تولید می‌شوند. غلظت این پروتئین‌های PR به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد و نقش اصلی را در محافظت در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی با آسیب‌رساندن به دیواره سلول ایفا می‌کند، زیرا کیتین و β-1, 3 گلوکان هر دو از اجزای حیاتی دیواره‌های سلولی بسیاری از بیماری‌های قارچی هستند. این پروتئین‌ها از طریق اتصالات دی‌سولفید تثبیت می‌شوند و نسبت به پروتئولیز و افزایش دما مقاوم هستند، درحالی‌که بسیاری از پروتئین های گیاهی دیگر با چنین شرایطی دناتور می‌شوند. کیتینازها شکاف پیوند بین C_1 و C_4 مونومرهای NAG متوالی کیتین را کاتالیز می‌کنند. β-1-3، گلوکاناز متعلق به خانواده PR-2 پروتئین‌های مرتبط با بیمارگر نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی گیاه به آلودگی پاتوژن دارند این آنزیم توانایی کاتالیز شکاف پیوندهای گلیکوزیدی در β-1-3، گلوکان را دارد. هم‌چنین عملکردهای دیگری مانند طویل‌شدن سلولی، رسیدن میوه، لقاح، جنین‌سازی سوماتیک، جوانه‌زنی بذر و گرده‌افشانی و گلدهی دارند (Chhabra, 2020).

در پژوهش حاضر، در تیمار آلودگی، میزان پروتئین کل در نمونه‌های آلوده افزایش یافت که با نمونه‌های سالم تفاوت معنی‌داری داشت که این نتیجه احتمالاً به‌دلیل افزایش سنتز پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن رخ داده است. جدول مقایسه میانگین هم‌چنین بیانگر این است که میزان فعالیت کاتالاز در تیمار رقم، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار و در تیمار مایه‌کوبی باکتری اثر معنی‌داری نداشته است، در تیمار نوع رقم، بیش‌ترین میزان کاتالاز (۰/۲۰۹) در رقم Angelina مشاهده شد (جدول ۳). گایاکول پراکسیداز همبستگی مثبت در سطح احتمال یک درصد با پروتئین (r=۰/۸۵) و با قند (r=۰/۸۰) نشان داد. کاتالاز همبستگی مثبت در سطح احتمال پنج درصد با سطح برگ (r=۰/٦۰) نشان داد (جدول ٤).

آنزیم‌ها نقش مهمی در دفاع از گیاه میزبان در برابر

پاتوژن‌ها دارند. در حضور اکسیژن، پلی‌فنل‌اکسیداز، ترکیبات فنلی را که به شکل O-diphenol هستند به O-quinone اکسید می‌کند. وجود تنش منجر به تولید ROS می‌شود که پس از واکنش با DNA میزبان، لیپیدها و پروتئین منجر به آسیب اکسیداتیو می‌شود و عملکرد طبیعی سلول را مختل می‌کند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد که موجب آسیب غشا می‌شوند، نقش دارند. پراکسیداز به‌عنوان جاروب‌کننده (Scavenger) پراکسیدهیدروژن عمل می‌کند و این آنزیم نقش اساسی در مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا دارد (Kumar *et al*., 2011). در مطالعه‌ای نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در دفاع در برابر بیماری لکه سیاه (black spot) در *Rosa centifolia* را بررسی کردند و افزایش میزان پراکسیداز، کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز را در اثر مایه‌زنی عامل بیمارگر در ارقام حساس مشاهده کردند (Khatun *et al.,* 2009).

یکی از آنزیم‌های دفاعی گیاه، کاتالاز است که در همه موجودات زنده تحت تنش تولید می‌شود. این آنزیم به‌طور مستقیم بر پراکسید هیدروژن اثر گذاشته و باعث کاهش اثرات سمی آن می‌شود. تجمع این ماده برای بافت‌ها و سلول‌های گیاهی آسیب‌رسان است و باید تجزیه شود، پراکسید هیدروژن برای سلول‌های گیاهی به‌ویژه برای کلروپلاست‌ها سمی است زیرا در غلظت‌های کم موجب مهار فعالیت آنزیم‌های چرخه کلوین به‌ویژه آنزیم‌های دارای سولفیدریل مانند گلیسرآلدهید ۱ و ٦ بیس‌فسفات‌دهیدروژناز و فروکتوز۳ فسفات می‌شود. کاتالاز از پراکسیدهیدروژن به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و با تجزیه این ماده اثرات مخرب آن را مهار می‌کند (Kumar *et al*., 2017). در پژوهش حاضر بیش‌ترین میزان کاتالاز در رقم Angelina مشاهده شد که با رقم Pearl تفاوت معنی‌داری نشان داد و تیمار مایه‌زنی اگروباکتریوم در کاتالاز تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد. بالاتربودن فعالیت آنزیم کاتالاز در Angelina نشان‌دهنده حساس‌تربودن این رقم نسبت به Pearl است. در مطالعه حاضر، مایه‌زنی اگروباکتریوم موجب کاهش فعالیت کاتالاز شد. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز سبب پایداری بیش‌تر می‌شود که نتیجه آن کاهش تکثیر، رشد و پیشرفت بیمارگر است (Chen *et al*., 2012). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در مایه زنی باکتری توسط پژوهش‌گران دیگر (Chen *et al*., 2012; Kumar *et al*., 2017) نیز گزارش شده است.

براساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل (جدول۵)، بیش‌ترین میزان پرولین در Pearl آلوده (۱۵/۰۳) مشاهده شد و کم‌ترین میزان در Pearl عاری از باکتری مشاهده شد. پرولین همبستگی مثبت در سطح احتمال پنج درصد با گایاکول‌پراکسیداز (r=۰/٦٤) نشان داد (جدول ٤). پرولین یک اسمولیت قوی و آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی است. این ماده نقش مهمی در نابودی انواع مختلف ROS به‌ویژه هیدروکسیل (OH^-) و رادیکال سوپراکسید (O_2^-) دارد و یک اثر مهاری در پراکسیداسیون چربی دارد. پرولین از پیش ماده و سوبسترا اسیدگلوتامیک و با ماده حد واسط پیرولین ۵-کربوکسیلات (P_5C) سنتز می‌شود. این مسیر توسط دو آنزیم در گیاهان یعنی پیرولین-۵ کاربوکسیلات ردوکتاز (P_5CR) و δ1-پیرولین-۵-کربوکسیلات‌سنتتاز (P_5CS) کاتالیز می‌شود وجود پرولین در سطوح بالاتر تحت شرایط تنش به‌دلیل کاهش تخریب یا افزایش سنتز می‌باشد. تجمع پرولین در پاسخ به شرایط تنش‌زا رخ می‌دهد (Chhabra *et al*., 2020).

افزایش قابل‌توجهی در میزان پرولین در برگ‌های آلوده ژنوتیپ‌های کتان را در مقایسه با ژنوتیپ‌های مقاوم یا حساس در واکنش به کپک پودری گزارش شده است (Naglaa & Heba, 2011). در این پژوهش تیمار مایه‌کوبی اگروباکتریوم به‌تنهایی بر میزان پرولین برگ تأثیر

معنی‌داری نداشته است هرچند موجب افزایش میزان پرولین در نمونه‌های آلوده شده است، اما این افزایش ناچیز بوده و معنی‌دار نشده است، که احتمالاً به این دلیل بوده است که *Agrobacterium tumefaciens* توانایی تولید آنزیم پرولین دهیدروژناز را دارد و در شرایط تنش پرولین را تجزیه و به‌عنوان منبعی از کربن و نیتروژن در اختیار گیاه قرار می‌دهد (Pérez -Pérez *et al*., 2009).

هم‌چنین نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش نوع رقم و مایه‌کوبی باکتری نشان داد که بیش‌ترین میزان گایاکول پراکسیداز در Pearl آلوده (۰/۰٤٤) مشاهده شد (جدول۵) که با Pearl سالم، Angelina سالم و Angelina آلوده تفاوت معنی‌داری نشان داد. پراکسیدازها نیز گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی هستند که در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شوند. پراکسیدازها معمولاً واکنش اکسیداسیون و احیا را بین پراکسیدهیدروژن به‌عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوبستراها مثل مواد فنلی، اسیدآسکوربیک، آمین‌های آروماتیک و سیتوکروم c کاتالیز می‌کنند به‌عنوان آنزیم‌های سم‌زدای گونه‌های اکسیژن فعال عمل می‌کنند.

آنزیم پراکسیداز با شکستن هیدروژن پراکسید در سلول از تولید ROS جلوگیری می‌کند و با بالارفتن سطوح این آنزیم، گیاه کم‌تر مورد تهاجم ROS قرار می‌گیرد. این گروه از آنزیم‌ها در سیتوسل، واکوئل، کلروپلاست و آپوپلاست وجود دارند (Kumar *et al*., 2017). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که مایه‌کوبی باکتری موجب افزایش میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز شده است به‌طوری‌که با نمونه‌های سالم تفاوت معنی‌داری‌نشان داد. هم‌چنین برهم‌کنش رقم و باکتری نشان داد که بیش‌ترین میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز در Pearl آلوده مشاده شده است. افزایش فعالیت این آنزیم در Pearl آلوده نشان‌دهنده نقش بیش‌تر این آنزیم در پاک‌سازی ROS دارد و بیانگر مقاومت بیش‌تر Pearl آلوده در مقابل آلودگی اگروباکتریوم دارد. افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز در تیمار مایه‌زنی باکتری توسط پژوهش‌گران دیگری نیز گزارش شده است (Kumar *et al*., 2011).

٤. نتیجه‌گیری

عوامل بیماری‌زا موجب ایجاد تنش در گیاهان می‌شوند. در پژوهش حاضر، مایه‌زنی باکتری عامل گال در محل پیوند موجب ایجاد تنش در گل رز شد که سبب ایجاد اختلال در دستگاه متابولیکی گیاه میزبان و تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن و سرانجام تنش اکسیداتیو در رزهای آلوده شد. این مولکول‌ها باعث ایجاد تغییر در کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، قند و پروتئین شد و در گیاهان مایه‌زنی شده به‌تدریج علایم کاهش قدرت گیاه (ضعف گیاه) و متعاقبا کم‌رشدی و کاهش عملکرد نمایان شد. در این پژوهش بالاترین میزان پرولین و گایاکول پراکسیداز در رقم Pearl آلوده به باکتری مشاهده شد، هم‌چنین بیش‌ترین میزان قندهای محلول، MDA و پروتئین کل در نمونه‌های آلوده به اگروباکتریوم مشاهده شد، بنابراین تیمار مایه‌کوبی آب در گیرایی طبیعی پیوند و رشد گیاه در هر دو رقم نتیجه خوبی داشت.

۵. تشکر و قدردانی

از دانشگاه شهرکرد برای تأمین بخشی از هزینه‌های این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

٦. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۷. منابع

Atson, E. (2019). *Use of Amino Oligosaccharins and Alternaria Activated Protein in Management of Crown Gall and Enhancement of Growth in Roses*. M.Sc. Thesis. Department of Plant Science and Crop Protection. College of Agriculture and Veterinary Sciences. University of Nairobi. 86p.

Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*, Academic press, Elsevier academic press. New York. 922 p.

Azadi, P., Beyrami Zadeh, E., & Otang Ntui, V. (2013). A simple protocol for somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* L. cv. Apollo. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *88*(4), 399-402.

Azari, A., Modares Sanavi, S.A.M., Askari, H. F., Ghanati, A., Naji, M., & Alizade, B. (2012). Effect of salinity stress on morphological and physiological of canola and turnip (*Brassica napus* and *B. rapa*). (In Persian, with English Abstract) Iran. *Iranian Journal of Crop Sciences*, *14*(*2*), 121-135.

Abei, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, *105*, 121-126.

Arun, K., Mali, P.C., & Manga, V.K. (2010). Changes in some phenolic compounds and enzyme activities of infected pearl millet caused by *Sclerospora graminicola*. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, *2*(*1*), 6-10.

Atwal, A.K., Kaur, R., Munshi, S.K., & Mann, A.P.S. (2004). Biochemical changes in relation to Alternaria leaf blight in Indian mustard. *Plant Disease Research*, *19*, 57-59.

Bastam, N., Baninasab, B., & Ghobadi, C. (2012). Improving salt tolerance by exogenous application of salicylic acid in seedling of pistachio. *Plant Growth Regulation*, *69*(3), 275-284.

Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, *39*, 205-207.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical biochemical*, *72*(*1*), 248-254.

Chandrasekaran, M., Lee, J.M., Moon, Ye.B., Jung, S.M., Kim, J., Kim, J.W., & Chul Chun, S. (2019). Isolation and characterization of a virulent and virulent strains of *Agrobacterium tumefaciens* from rose crown gall in selected regions of South Korea. *Journal Plants*, *8*(11), 452. https:// doi: 10.3390/plants8110452.

Cubero, J., Lastra, B.C., Salcedo, L., Diquer, J., & Lopez, M.M. (2006). Systemic movement of *Agrobacterium tumefaciens* in several plant species. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(2), 412-421. https:// doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02938.x.

Chhabra, R., Kaur, S., Vij, L., & Gaur, K. (2020). Exploring Physiological and Biochemical Factors Governing Plant Pathogen Interaction: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *9*(11), 1650-1666. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.911.197.

Chen, P.S., Wang, L.Y., Chen, Y.J., Tzeng, K.C., Chang, S.C., Chung, K.R., & Lee, M.H. (2012). Understanding cellular defense in kumquat and calamondin to citrus canker caused by *Xanthomonas citri subsp. citri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *79*, 1-12. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.03.001.

Danon, A., Miersch, O., Felix, G., Camp, R.G.L., & Apel, K. (2005). Concurrent activation of cell death regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *41*(1), 68-80. https:// doi: 10.1111/j.1365-313x.2004.02276.x.

Goodman, R.N., Kialy, Z., & Saitlin, M. (1967). *The biochemistry and physiology of infections plant disease*. David Van Nostrand Inc. p. 354.

Heath, R.L., & Packer, L. (1969). Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *125*(1), 189-198.

Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., & Sanchez-Diaz, M. (1992). Water stress induce changes in concentration of proline and total soluble sugar in modulated alfalfa (*Medicgo sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, *84*(1), 55-60.

Khizar, M., Haroon, U., Kamal, A., Inam, W., Chaudhary, H.J., Farooq, M., & Munis, H. (2021). Evaluation of virulence potential of *Aspergillus tubingensis* and subsequent biochemical and enzymatic defense response of cotton. *Microscopy Research and Technique, 84*(11), 2694-2701. https://doi.org/10.1002/jemt.23832.

Khatun, S., Bandhopadhyay, P.K., & Chatterjee, N.C. (2009). Phenols with their oxidizing enzymes in defense against black spot of rose (*Rosa centifolia*). *Asian Journal of Experimental Sciences*, *23*(1), 249-252.

Kumar, D., Al Hassan, M., Naranjo, M. A., Agrawal, V., Boscaiu, M., & Vicente, O. (2017). Effects of salinity and drought on growth, ionic relations, compatible solutes and activation of antioxidant systems in oleander (*Nerium oleander* L.). *Public Library of Science*, *12*(9), e0185017. https:// doi.org/10.1371/journal.pone.0185017.

Kumar, N., Ebel, R.C., & Roberts, P.D. (2011). H_2O_2 degradation is suppressed in kumquat leaves infected with *Xanthomonas axonopodis pv. citri*. *Scientia Horticulturae*, *130*(1), 241-247. doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.005.

Murria, S., Kaur, N., Arora, A., & Arora, N.K. (2018). Biochemical characterization of superior seedless variety of grape (*Vitis vinifera* L.) for resistance to anthracnose. *Indian Phytopathology*, *71*(3), 399-405.

Mac-Adam, J.W., Nelson, C.J., & Sharp, R.E. (1992). Peroxidase Activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiology*, *99*(3), 872- 878.

Morkunas, I., & Ratajczak, L. (2014). The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, *36*, 1607-1619.

Malhotra, S.K. (1993). Biochemical components of tomato genotypes in relation to *Fusarium* wilt. *Indian journal of mycology and plant pathology*, *23*(3), 302-304.

Narwal, S.S., Bogatek, R., Zagdaneska, B.M., Samoietro, D.A., & Vattuone, M.A. (2009). *Plant Biochemistry*. Studium Press LLC, Texas. 632 p.

Naglaa, A.A., & Heba, I.M. (2011). Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to powdery mildew. *African Journal of Biotechnology*, *11*(5), 1073-1077.

Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T., & Sano, H. (2000). Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, *42*(3), 479-488. https:// doi: 10.1023/a:1006393326985.

Pang, Y.Z., Wang, Z. H., Guo, S.S., Zhang, S.S., Zheng, L.W., Zhang, J.Z., & Guo, D.P. (2021). *Verticillium dahliae* reduces plant growth, constitutively induces antioxidant metabolism and gene expression in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology.* https://114,101641.doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101641

Pérez-Pérez, J.G., Robles, J.M., Tovar, J.C., & Botía, P. (2009). Response to drought and salt stress of lemon 'Fino 49' under field conditions: Water relations, osmotic adjustment and gas exchange. *Scientia Horticulturae*, *122*(1), 83-90. https://10.1016/j.scienta.2009.04.009.