

ارزیابی تغییرات سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی ارقام سویا در واکنش به بیماری پوسیدگی ذغالی طی مراحل رشد

سعید نواب‌پور^۱، سید شهاب میرکریمی^۲ و ابوالفضل مازندارانی^۳

۱، استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ۲، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ۳، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۹/۱۲)

Evaluation of Enzymatic and Non-Enzymatic Defense Mechanism in Response to Charcoal Rot Disease During Growth Stage in Soybean

S. NAVABPOUR¹, S.S. MIRKARIMI², A. MAZANDARANI³

1, Assistant professor of Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, 2, M.Sc. of Plant Breeding, Islamic Azad University, Science and Research Branch, 3, M.Sc. of Plant Breeding, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

(Received: Jun. 28, 2013 - Accepted: Nov. 3, 2013)

Abstract

Charcoal Rot is one of the most important fungal diseases in soybean particularly in northern region of Iran. This disease caused some damages to yield quality and quantity (up to 20%) especially in dried and worm seasons. Today there is not many researches in regards to enzymatic and non-enzymatic study in response to disease. In this study super oxide and hydrogen peroxide radicals have measured, also, super oxide dismutase, and catalase enzymes, as well as ascorbic acid changes, alphotochopheroll, carotenoid and TBARM (cellular oxidative levels) in soybean genotypes during growth stages (flowering, packing pod and grain filling) at two environmental conditions (control and disease). The result showed superoxide and hydrogen peroxide radicals content have increasing during growth stages, as the most amount accorded in final stage of sampling (grain filling). Katul cultivar and DPX × For a hybrid had more tolerance to charcoal rot disease due to antioxidant defense systems.

Keywords: Charcoal rot, Soybean, Enzymatic and non-enzymatic defense system, Reactive oxygen species

چکیده

بیماری پوسیدگی ذغالی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی سویا بویژه در مناطق شمالی کشور است و هر ساله به خصوص در سال‌های خشک و کم باران باعث آلودگی مزارع سویا، کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌گردد. در حال حاضر تحقیقات کمی در رابطه با فعالیت‌های سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی در پاسخ به این بیماری در داخل و خارج کشور صورت گرفته است. در این تحقیق میزان رادیکال‌های سوپر اکسید و پر اکسید هیدروژن، مقادیر آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز، تغییرات اسید اسکوربیک، آلفا توکوفرول، کاروتنوئید و میزان شاخص اکسیداسیون سلولی در پنج ژنوتیپ سویا (شامل Black williams × lan، Sahar × K188، DPX × Fora، ساری و کنول) تحت شرایط بدون بیماری (شاهد) و بیماری در مراحل زایشی (گلدهی، غلاف‌بندی و پر شدن دانه) اندازه‌گیری شد. عموماً میزان رادیکال‌های سوپر اکسید و پر اکسید هیدروژن در خلال رشد زایشی افزایش نشان داد به طوری که بیشترین مقدار در مرحله پر شدن دانه حاصل شد. با توجه به نقش مثبت آنزیم‌های پاد اکسیدان در کنترل پیشرفت بیماری پوسیدگی ذغالی، رقم کنول و تلاقی DPX × Fora با حداکثر فعالیت آنزیم‌های پاد اکسیدان (سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز) تحت تیمار بیماری پوسیدگی ذغالی وضعیت بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان دادند که بیانگر تحمل بیشتر آن‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی ذغالی، سویا، سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی، رادیکال‌های فعال اکسیژن

مقدمه

بیماری پوسیدگی ذغالی ناشی از قارچ خاکزری *Macrophomina phaseolina* است که از مخرب‌ترین بیماری‌های سویا می‌باشد. گاهی میزان تلفات کل محصول در اثر این بیماری به بیش از ۲۰ درصد هم می‌رسد. قارچ عامل بیماری، یک انگل ضعیف سویا است که به گیاهان جوانی که رشد آن‌ها به علت شرایط نامساعد آب و هوایی به تعویق افتاده حمله می‌کند (Jardine and Pearson, 1987). در اثر این بیماری در اواسط تابستان و زمانی که آب و هوا گرم و خشک است، کاهش محسوس سرعت رشد رخ می‌دهد. گیاهان دارای آلودگی شدید به دلیل تولید سموم زیاد دچار مرگ زودرس می‌شوند (Bhattacharya et al., 1994). قارچ عامل بیماری در خاک و روی بقایای سویا به صورت سختینه‌های (اسکلروت) سیاه رنگ باقی می‌ماند. این سختینه‌ها در طول فصل زمستان در اثر پوسیده شدن بقایای سویا و شخم بهاره، در داخل خاک مزارع پخش شده و منبع آلودگی اولیه به شمار می‌آید. آلودگی اولیه بیماری در مرحله گیاهچه اتفاق افتاده و معمولاً به صورت پنهان باقی مانده و علائم آن در اواسط تابستان در شرایط دمایی بالای ۲۸-۳۰ درجه سانتیگراد و رطوبت پایین خاک ظاهر می‌شود. این علائم به صورت پژمرده شدن بوته‌ها قبل از رسیدن، پاره شدن بافت پوست در پایین ساقه، تشکیل اسکلروت‌ها در آوندهای آبکش و زیر پوست بوده که با تشکیل آن‌ها بافت‌های داخلی به رنگ سیاه درمی‌آیند. برای کنترل شیمیایی بیماری پوسیدگی ذغالی با توجه به بیولوژی قارچ عامل بیماری و زمان ظهور علائم بیماری محدودیت‌های خاصی وجود دارد (Abawi and Pastor Corrales, 1990). یکی از روش‌های مهم مدیریت این بیماری بکارگیری ارقام متحمل می‌باشد. در سال‌های اخیر مکانیسم‌های دفاعی گیاهان به‌ویژه سازوکارهای بیوشیمیایی پاسخ به پاتوژن‌ها و آفات مورد توجه قرار گرفته است (Abdel-Monaim et al., 2012). عامل بیماری‌زا را تشخیص و به صورت بیوشیمیایی به آن‌ها پاسخ می‌دهد تا از بروز حمله پیشگیری نموده یا از تجمع عوامل بیماری‌زا در سلول‌های گیاهی ممانعت کند. افزایش این پاسخ در گیاهان زراعی می‌تواند موجب تقویت روش‌های پایدار در مدیریت بیماری‌های گیاهی شود. یک برهم کنش ناسازگار بین گیاهان و قارچ‌های بیماری‌زا موجب القاء پاسخ مقاومتی می‌شود، که طی آن فعالیت مسیرهای بیوشیمیایی موضعی و سیستمیک افزایش یافته و به طور مستقیم موجب محدود شدن تجمع

عوامل بیماری‌زا می‌شود. ترکیبات ضد میکروبی گیاه مانند فیتوالکسین‌ها که در پاسخ به هجوم عوامل بیماری‌زا ساخته می‌شوند، قادر هستند که مهاجم‌های بیماری‌زا را به دام انداخته یا از فعالیت آن‌ها جلوگیری نمایند (Paxton and Groth, 1994). در این راستا مشخص شده است که ترکیب بین عوامل کنترل کننده زیستی و القاء کننده‌های شیمیایی، بهترین نتیجه را در کنترل بیماری پوسیدگی ذغالی داشته است. لذا ارزیابی تغییرات برخی آنزیم‌ها و شاخص‌های بیوشیمیایی که نقش آن‌ها در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده در سایر گیاهان مشخص شده است می‌تواند در شناخت ارقام متحمل کمک شایانی نماید (Abdel-Monaim et al., 2012). از طرفی نقطه اشتراک اغلب تنش‌های زنده و غیر زنده تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن^۱ است (Mackerness et al., 2001). اگر چه غلظت بالای این رادیکال‌ها موجب بروز تنش اکسیداتیو و خسارت به مولکول‌های حیاتی می‌گردد ولی غلظت‌های متعادل آن‌ها از یک سو سبب سازگاری نسبی برای ایجاد مقاومت در گیاه شده و از سوی دیگر به عنوان عوامل انتقال پیام^۲ در روند تنظیم بیان ژن‌ها ایفای نقش می‌نمایند (Larkindal et al., 2005). در این تحقیق تأثیر بیماری پوسیدگی ذغالی بر میزان رادیکال‌های سوپر اکسید و پر اکسید هیدروژن تعیین گردید. همچنین میزان فعالیت سیستم پاد اکسیدان آنزیمی با اندازه گیری مقادیر آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز تعیین شد. فعالیت سیستم پاد اکسیدان غیر آنزیمی نیز با ارزیابی میزان تغییرات اسید اسکوربیک، آلفا توکوفرول و کاروتنوئید سنجدیده، و در نهایت میزان پراکسیداسیون چربی‌ها با انجام سنجش اسید تیوباربیتریک (TBARM^۳) انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد آزمایشی شامل تلاقی‌های Black williams × Sahar × K188، dan و DPX × Fora و ارقام ساری و کنترل بودند. ارقام کنترل و ساری از ارقام تجاری هستند که به طور رایج در اغلب استان‌های شمالی کشور کشت می‌شوند. سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نیز از ژنوتیپ‌های اصلاحی و مورد ارزیابی مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان بودند.

1. Reactive Oxygen Species (ROS)
2. Signal Factors
3. Thiobarbituric Acid Reactive Material

از هر کرت و هر تکرار ۵ بوته به صورت تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شد تا شدت بیماری و میزان مقاومت ارقام اندازه گیری شود.

اندازه‌گیری رادیکال‌های سوپر اکسید و پر اکسید هیدروژن

میزان یون سوپر اکسید (O_2^-) با استفاده از روش Heupel و Elstner (۱۹۷۶) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد. یک گرم نمونه برگ منجمد به طور یکنواخت کوبیده و مقدار ۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (6.8 pH) به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور 5000 g سانتریفیوژ گردید. یک میلی لیتر از محلول فوق برداشت و به همراه 0.9 میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم 6.8 mM ، 0.1 میلی لیتر هیدروکلراید هیدروکسیل آمین 10 mM در دمای 25 درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه قرار گرفت. پس از آن مقدار معادل حجم محلول اتیل اتر اضافه شد و با دور 1500 g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب در طول موج 530 نانو متر توسط دستگاه جذب نوری (BR-Technologies مدل BT 600) خوانده شد. با استفاده از منحنی نرمال استاندارد، مقدار یون سوپر اکسید بر حسب واحد تنظیم گردید.

میزان رادیکال پراکسید هیدروژن با کمک روش Brennan و Frenkel (۱۹۷۷) و با استفاده از کمپلکس پراکسید تیتانیوم انجام شد. میزان جذب در طول موج 415 نانومتر قرائت و به وسیله منحنی استاندارد غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تصحیح گردید و نتایج بر حسب واحد تنظیم شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پاد اکسیدان

میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کل با روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) به شرح زیر اندازه گیری شد. یک گرم نمونه برگ منجمد در هاون چینی کوبیده و یکنواخت شد، سپس مقدار 0.1 برگ کوبیده شده و 3 میلی لیتر محلول واکنش شامل (بافر فسفات پتاسیم 50 mM ، $\text{pH}=7.8$ ، متیونین 13 mM ، تترازایلوم $75 \mu\text{M}$ ، ریبوفلاوین $2 \mu\text{M}$ ، EDTA 0.1 mM) و آنزیم استخراج (سیگما) $100 \mu\text{M}$) مخلوط و یکنواخت گردید. مخلوط در شرایط نوری 5000 لوکس به مدت 15 دقیقه قرار داده شد. کالبراسیون با افزودن یک واحد آنزیم سوپر اکسید (سیگما) برای احیاء 50 درصد تترازایلوم افزوده و میزان فعالیت با طول موج 560 نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (BR-Technologies مدل BT 600) قرائت شد.

ارقام و تلاقی‌های مزبور براساس پتانسیل عملکرد و ویژگی‌های ظاهری انتخاب شدند.

نحوه اعمال بیماری

پس از آماده سازی زمین، نقشه کاشت تنظیم و هر کرت آزمایشی شامل 4 خط 5 متری با فاصله خطوط 50 سانتیمتر کشت گردید. سطح آلوده نیز به طریق مصنوعی بعد از آماده سازی زمین برای کاشت از طریق محلول پاشی با مایع قارچ به نسبت وزنی 100 گرم در 1 کیلوگرم خاک ایجاد شد (محلول پاشی با سم پاش های رایج صورت گرفت) (Rayatpanah and Alavi, 2006). بذور قبل از کاشت با باکتری رایزوبیوم جاپونیکوم^۱ آغشته شده و سپس به صورت هیبرم کاری کاشته شد. برای ارزیابی و اندازه گیری صفات از دو خط وسط هر کرت استفاده گردید.

این آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. بیماری پوسیدگی ذغالی به عنوان فاکتور اصلی آزمایش شامل دو سطح شاهد (عدم وجود بیماری) و آلودگی (وجود بیماری) بود. ترکیب فاکتوریل رقم و مرحله رشد (گلدهی، غلاف‌بندی و پرشدن دانه) نیز به عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شد. نمونه برداری تصادفی از برگ در مراحل گلدهی، غلاف‌بندی و پرشدن دانه صورت گرفت. در هر مرحله ده برگ به طور تصادفی از هر تیمار برداشت و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و به فریزر -80 درجه منتقل گردید.

اندازه‌گیری شدت بیماری

ارزیابی شدت بیماری و میزان مقاومت ارقام، با استفاده از مقیاس هورسفال-بارت (James, 1974) بر اساس روش علائم برگی در مرحله آغاز رسیدگی (R7) صورت گرفت. در این مرحله در گیاه به جای ریزش طبیعی برگ، برگ‌ها بر روی گیاه حفظ شده و علائم به صورت نکروز برگ مشاهده می‌شود. در روش علائم برگی جهت رتبه بندی ژنوتیپ‌ها از مقیاس 0 تا 11 (0 = هیچ نشانه ای ندارد، $1 = 0$ تا $3 = 3$ تا $6 = 3$ تا $12 = 4$ تا $25 = 5$ تا $50 = 6$ تا $75 = 7$ تا $87 = 8$ تا $94 = 9$ تا $97 = 10$ تا $100 = 11$) که نشان دهنده درصد نکروزه شدن برگ‌ها در اثر بیماری می باشد، استفاده شد. بر مبنای این مقیاس ارقام به چهار گروه، مقاوم در برابر بیماری (صفر)، نسبتاً مقاوم (<0 و <5)، نسبتاً حساس ($5 \leq$ و 8) و حساس ($8 \leq$) دسته بندی شدند. بدین منظور در مرحله آغاز رسیدگی

1. Rhizobium japonicum

اکسیداسیونی است، مقدار مالون دی آلدید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ است اندازه گیری می‌شود. در این خصوص از روش Hagege و همکاران (۱۹۹۰) با تغییراتی استفاده گردید. مقدار ۰/۵ گرم برگ هموژنیزه و یک میلی لیتر اسیدتری کلرواستیک (w/v) 15% به آن اضافه شد. محلول حاضر پس از افزودن ۱۰ میلی لیتر استون به شدت مخلوط شد و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب کوچک حاصل از سانتریفیوژ با ۵ میلی لیتر استن شستشو شد، پس از ورتکس مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس به آن مقدار ۳ میلی لیتر اسید فسفریک (1% w/v) و یک میلی لیتر اسید تیوباریوریتیک (0.6% w/v) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف شد و مقدار جذب محلول حاصل را با طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (BR-Technologies مدل BT 600) اندازه گیری گردید.

نتایج

نتایج مربوط به اندازه گیری میزان مقاومت ارقام نسبت به بیماری در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق این نتایج رقم کنترل و تلاقی DPX×Fora نسبتاً مقاوم بودند. تلاقی‌های Black williams × Ian و Sahar × K188 نسبتاً حساس و رقم ساری حساس به بیماری ارزیابی گردید. غلظت رادیکال سوپر اکسید و فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در ژنوتیپ‌های مختلف تحت شرایط کنترل و بیماری و در مراحل مختلف رشد در شکل ۱ نشان داده شده است. در مرحله گلدهی غلظت رادیکال سوپر اکسید در شرایط کنترل نسبت به شرایط بیماری در همه ژنوتیپ‌ها بیشتر بود. در بین ژنوتیپ‌های مختلف مقدار رادیکال‌ها سوپر اکسید در رقم ساری در هر دو حالت کنترل و بیماری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بالاتر بود. در مورد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در این مرحله مشاهده شد به جز در دو ژنوتیپ

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز I با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۴) به شرح زیر تعیین گردید. ۰/۵ گرم نمونه برگ منجمد کوبیده و به میزان ۰/۱ از آن در ۳ میلی لیتر بافر واکنش شامل (بافر فسفات پتاسیم ۵۰mM، pH=7.8، استاندارد پراکسید هیدروژن و آنزیم استخراج (سیگما) ۲۰۰µl) مخلوط و یکنواخت گردید. میزان جذب محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (BR-Technologies مدل BT 600) قرائت شد.

اندازه گیری عوامل پاد اکسیدان غیر آنزیمی

میزان نمک اسکوربات با کاربرد روش Arakawa و همکاران (۱۹۸۱) به شرح زیر صورت پذیرفت. مقدار ۰/۵ گرم نمونه یخ زده در ۱۰ میلی لیتر اسیدتری کلرو استیک ۵ درصد به طور یکنواخت مخلوط شد. مخلوط حاضر به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی به آرامی جداسازی و میزان جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد در دامنه ۲۵-۰ نانو مول تهیه و نتایج حاصله از نمونه بر حسب استاندارد تنظیم گردید.

میزان آلفا توکوفرول با استفاده از روش Munne-Bosch و همکاران (۱۹۹۹) اندازه گیری شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه منجمد برگ در ازت مایع به طور یکنواخت کوبیده شد و مقدار ۵ میلی لیتر متانول حاوی یک درصد اسکوربات به آن اضافه گردید. با افزودن ۴ میلی لیتر هگزان مخلوط حاضر به مدت یک دقیقه ورتکس و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شد. لایه هگزان فوقانی با دقت حذف و با کمک محفظه خلاء نسبی خشک گردید. مقدار ۲ میلی لیتر متانول به نمونه اضافه و محلول یکنواخت حاصل به دستگاه HPLC منتقل شد. میزان آلفا توکوفرول جدا شده به وسیله ستون التا سفر با (OD=5µm) در شدت ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه خالص سازی شد و غلظت آن با کمک دستگاه آشکار ساز فرابنفش در طول موج برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر و خروجی ۳۲۸ نانومتر تعیین گردید.

مقدار کاروتنوئید با انجام اسپکتو فوتو متری و استفاده از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) اندازه گیری شد.

سنجش TBARM

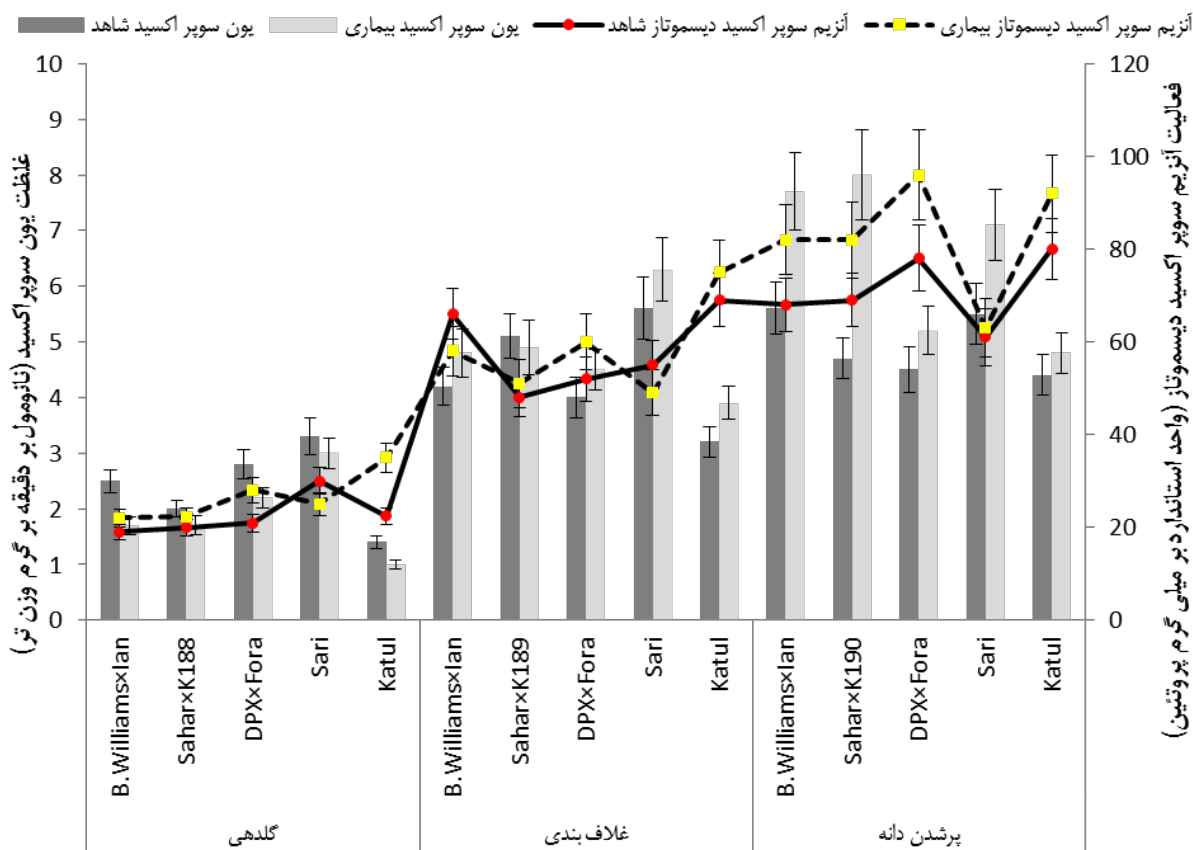
در این سنجش که معیاری برای اندازه گیری میزان تنش

جدول ۱- میزان مقاومت ارقام سویا به بیماری پوسیدگی ذغالی

ارقام	رتبه در مقیاس هورسفال- بارت	علائم برگ (درصد نکروزه شدن برگ)	میزان مقاومت
کتول	۳	٪۱۰/۴۶	نسبتاً مقاوم
DPX×Fora	۴	٪۲۳/۲۵	نسبتاً مقاوم
Black williams × lan	۶	٪۵۱/۳۴	نسبتاً حساس
Sahar × K188	۷	٪۷۹/۴۵	نسبتاً حساس
ساری	۸	٪۹۱/۲۳	حساس

دیسموتاز نیز افزایش چشمگیری نشان داد. در مرحله پرشدن دانه افزایش میزان رادیکال سوپر اکسید در شرایط بیماری قابل ملاحظه بود. فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در این مرحله افزایش نشان داد به طوری که در شرایط بیماری مقدار آن بیشتر بود و در رقم کتول و تلاقی DPX×Fora مقدار آن در هر دو شرایط کنترل و بیماری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود.

(Sahar×K188 و ساری)، در سه ژنوتیپ دیگر مقدار فعالیت این آنزیم در شرایط وجود بیماری افزایش پیدا کرد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در رقم کتول دیده شد که می‌تواند دلیلی بر عکس العمل بیشتر این رقم در برابر این بیماری باشد. در مرحله غلاف‌بندی میزان رادیکال سوپر اکسید افزایش یافت و این افزایش در شرایط بیماری بیشتر از شرایط کنترل (شاهد) بود. همچنین مقدار فعالیت آنزیم سوپر اکسید



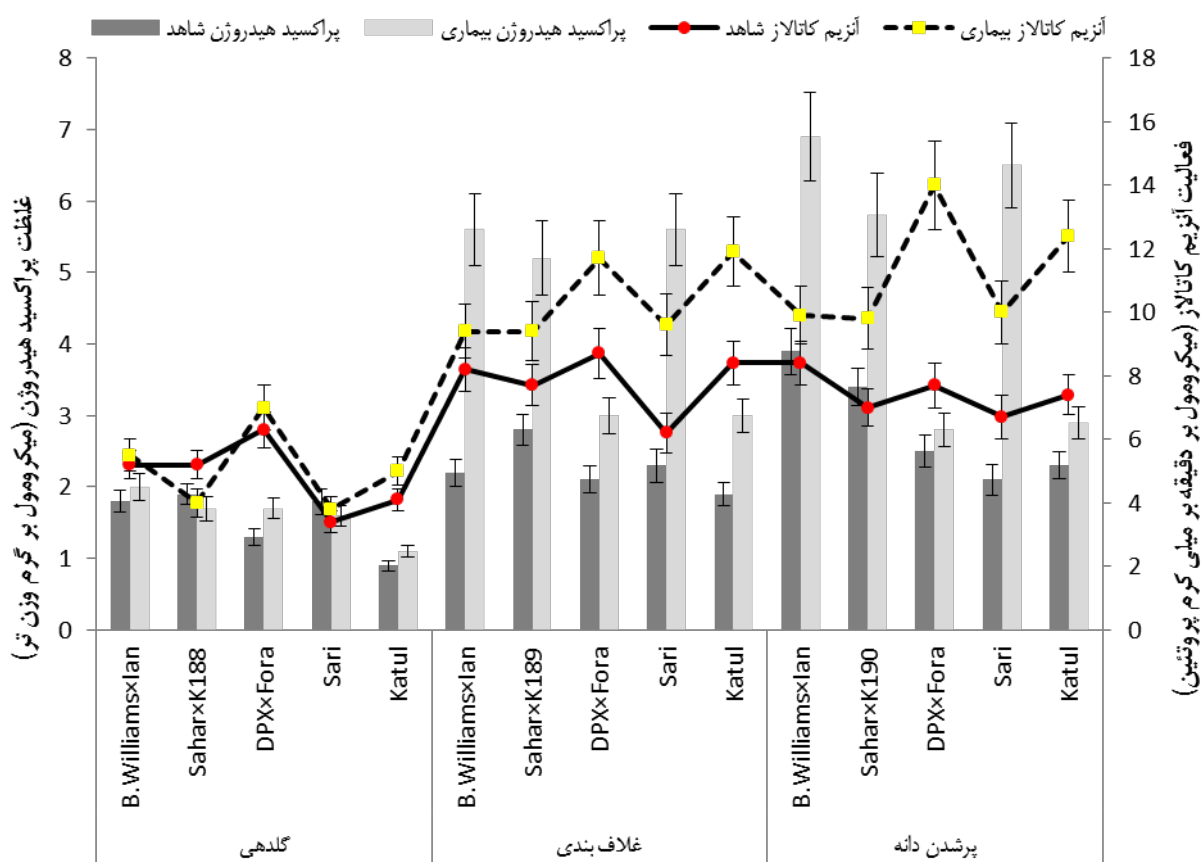
شکل ۱- میزان رادیکال سوپر اکسید (نمودار ستونی) و فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (نمودار خطی) تحت شرایط کنترل (شاهد) و بیماری در ژنوتیپ‌های سویا طی مراحل رشد. میزان خطای معیار (n=4) به صورت میله‌ای نشان داده شده است.

پراکسید هیدروژن به جز در رقم کتول در سایر ژنوتیپ‌ها در سطح نسبتاً یکسانی بود. در تلاقی Sahar×K188 و رقم ساری میزان غلظت رادیکال پراکسید هیدروژن در حالت شاهد

فعالیت رادیکال پراکسید هیدروژن در برابر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت شرایط کنترل و بیماری در مراحل رشد در شکل ۲ نشان داده شده است. در مرحله گلدهی غلظت

این افزایش مشاهده شد ولی مقدار آن کمتر بود. همچنین تلاقی DPX×Fora و رقم کنترل کم‌ترین میزان افزایش رادیکال پراکسید هیدروژن را نشان دادند. فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در این مرحله افزایش یافت به طوری که مقدار آن در تمامی ژنوتیپ‌ها در شرایط بیماری بیشتر از شرایط کنترل (شاهد) بود. بیشترین مقدار این آنزیم در هر دو شرایط کنترل (شاهد) و بیماری در تلاقی DPX×Fora و رقم کنترل مشاهده شد. در مرحله پرشدن دانه شرایط مشابه مرحله غلاف‌بندی بود.

(عدم بیماری) بیشتر از شرایط بیماری بود، در صورتی که در سایر ژنوتیپ‌ها عکس حالت فوق مشاهده شد. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله گلدهی در تلاقی DPX×Fora مشاهده شد. همچنین در رقم کنترل که کم‌ترین میزان رادیکال پراکسید هیدروژن در آن مشاهده شد فعالیت آنزیم کاتالاز نسبتاً بالا بود. در مرحله غلاف‌بندی میزان رادیکال پراکسید هیدروژن در شرایط بیماری به صورت چشمگیری افزایش پیدا کرد که نشان دهنده تأثیر بیماری در جهت فزونی این رادیکال بود. در شرایط کنترل (شاهد) نیز



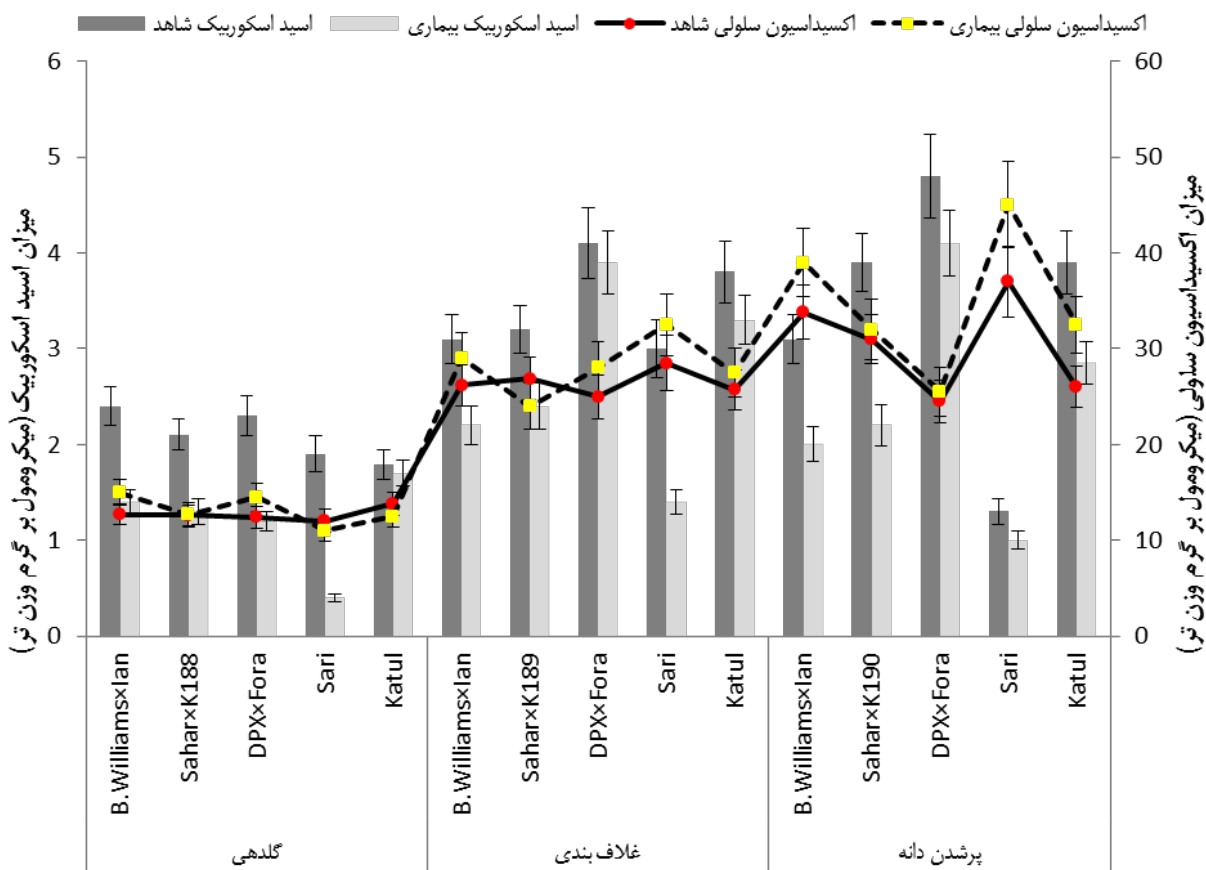
شکل ۲- میزان یون پراکسید هیدروژن (نمودار ستونی) و فعالیت آنزیم کاتالاز (نمودار خطی) تحت شرایط کنترل (شاهد) و بیماری در ژنوتیپ‌های سویا طی مراحل رشد. میزان خطای معیار (n=۴) به صورت میله‌ای نشان داده شده است.

شرایط بیماری بیشتر بود. مقدار این شاخص در ژنوتیپ‌های مختلف در شرایط بیماری متفاوت بود حال آنکه در شرایط کنترل تقریباً یکسان بود. در مرحله غلاف‌بندی میزان اسید اسکوربیک افزایش نشان داد که این افزایش در تلاقی DPX×Fora و رقم کنترل بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود. همچنین مقدار افزایش اسید اسکوربیک در شرایط بیماری نسبت به شرایط کنترل بیشتر بود. شاخص اسیداسیون

روند تغییرات اسید اسکوربیک در برابر شاخص اکسیداسیون سلولی (TBARM) در شکل ۳ نشان داده شده است. مرحله گلدهی میزان اسید اسکوربیک در همه ژنوتیپ‌ها در شرایط کنترل بیشتر از شرایط بیماری بود و در شرایط بیماری کم‌ترین مقدار آن مربوط به رقم ساری بود. در رابطه با میزان شاخص اسیداسیون سلولی در مرحله گلدهی، به جز رقم ساری در سایر ژنوتیپ‌ها مقدار آن در

رقم ساری بود. تغییرات مربوط به میزان کاروتنوئید و آلفاتوکوفرول در شکل ۴ نشان داده شده است. روند تغییرات مربوط به میزان کاروتنوئید از مرحله گلدهی به غلاف‌بندی و به مرحله پرشدن دانه بسیار زیاد بود. بیشترین مقدار کاروتنوئید در مرحله پر شدن دانه و در

سلولی در مرحله غلاف‌بندی در هر دو شرایط کنترل و بیماری در همه ژنوتیپ‌ها افزایش چشمگیری یافت و بیشترین مقدار آن در رقم ساری مشاهده گردید. در مرحله پرشدن دانه روندی مشابه با مرحله غلاف‌بندی مشاهده گردید. نکته حائز اهمیت در این مرحله افزایش قابل ملاحظه میزان شاخص اکسیداسیون سلولی در رقم ساری و تلاقی B.Williams×Ian و نیز کاهش میزان اسید اسکوربیک در



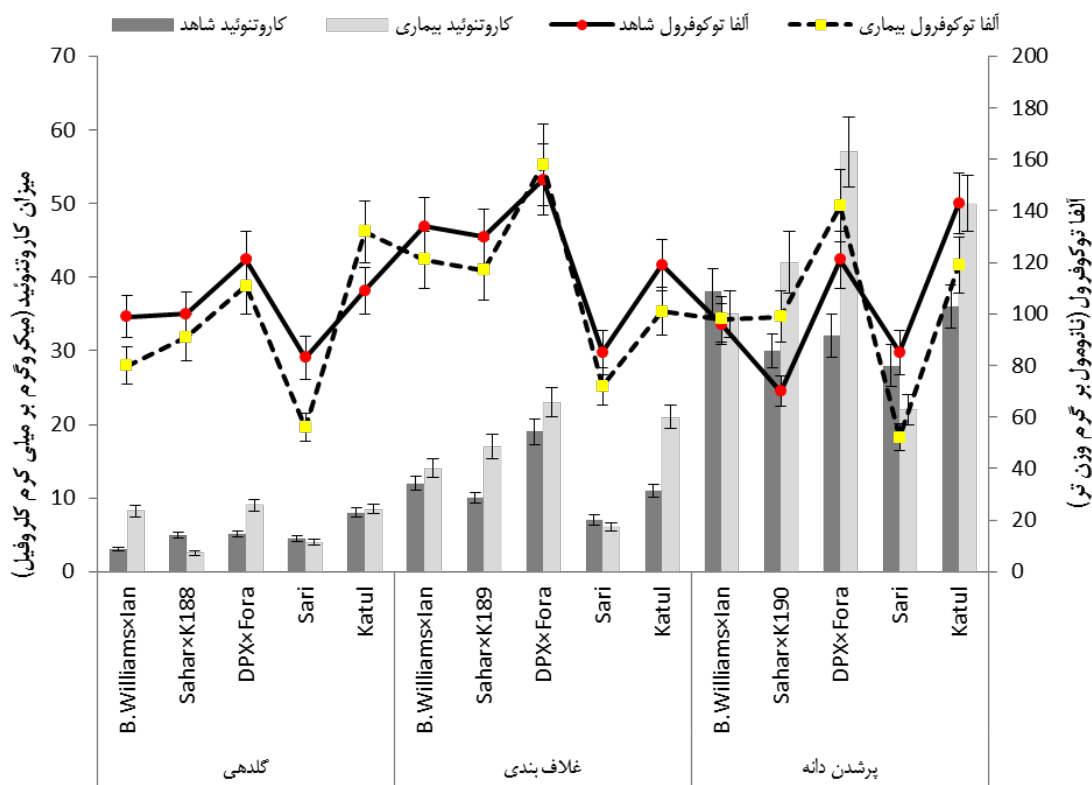
شکل ۳- میزان اسید آسکوربیک (نمودار ستونی) و مقدار شاخص اکسیداسیون سلولی (نمودار خطی) تحت شرایط کنترل (شاهد) و بیماری در ژنوتیپ‌های سویا طی مراحل رشد. میزان خطای معیار (n=۴) به صورت میله‌ای نشان داده شده است.

یافت. در مرحله پرشدن دانه میزان آلفا توکوفرول در ارقام کنترل و ساری در شرایط کنترل بیشتر از شرایط بیماری بود و در سه ژنوتیپ دیگر عکس این موضوع مشاهده گردید. نتایج تجزیه همبستگی ساده بین رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنزیمی و غیر آنزیمی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد بین رادیکال‌های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد. این رادیکال‌های آزاد با میزان اکسیداسیون سلولی همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان دادند که باتوجه به نقش آن‌ها در

شرایط بیماری در تلاقی DPX×Fora و رقم کنترل مشاهده شد. روند تغییرات آلفا توکوفرول در مراحل مختلف برای ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود. در مرحله گلدهی میزان آلفاتوکوفرول در رقم کنترل در شرایط بیماری بیشتر از شرایط کنترل بود، که در مورد چهار ژنوتیپ دیگر عکس این موضوع صادق بود. در مرحله غلاف‌بندی نیز شرایط مشابه با مرحله گلدهی بود با این تفاوت که به جای رقم کنترل در مورد تلاقی DPX×Fora شرایط فوق صادق بود. همچنین در این مرحله میزان آلفا توکوفرول در هر دو شرایط کنترل و بیماری افزایش

هیدروژن همبستگی منفی و غیرمعنی‌داری در هر دو مورد نشان داد. به طور کلی آلفا توکوفرول تنها با اسید اسکوربیک همبستگی مثبت و معنی‌دار نشان داد. در سایر موارد همبستگی مثبت و معنی‌داری بین عوامل مورد بررسی ملاحظه شد.

اکسیداسیون چربی‌ها قابل توجه می‌باشد. همچنین رادیکال‌های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن با آنزیم‌های کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز و کاروتنوئید همبستگی مثبت و معنی‌دار داشتند. یون سوپر اکسید با اسید اسکوربیک همبستگی مثبت و غیر معنی‌دار و با آلفا توکوفرول همبستگی منفی و غیر معنی‌دار نشان داد در صورتی که پراکسید



شکل ۴- میزان کاروتنوئید (نمودار ستونی) و میزان آلفا توکوفرول (نمودار خطی) تحت شرایط کنترل (شاهد) و بیماری در ژنوتیپ‌های سویا طی مراحل رشد. میزان خطای معیار (n=4) به صورت میله‌ای نشان داده شده است.

جدول ۲- تجزیه همبستگی ساده بین رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنزیمی و غیر آنزیمی

آلفا توکوفرول	کاروتنوئید	اکسیداسیون سلولی	اسید اسکوربیک	آنزیم کاتالاز	پراکسید هیدروژن	سوپر اکسید دیسموتاز	یون سوپر اکسید
-0.137 ^{NS}	0.594 ^{**}	0.883 ^{**}	0.177 ^{NS}	0.622 ^{**}	0.825 ^{**}	0.721 ^{**}	-
0.258 ^{NS}	0.869 ^{**}	0.775 ^{**}	0.586 ^{**}	0.799 ^{**}	0.494 ^{**}	-	سوپر اکسید دیسموتاز
-0.235 ^{NS}	0.382 [*]	0.745 ^{**}	-0.075 ^{NS}	0.563 ^{**}	-	-	پراکسید هیدروژن
0.357 ^{NS}	0.709 ^{**}	0.680 ^{**}	0.454 [*]	-	-	-	آنزیم کاتالاز
0.634 ^{**}	0.471 ^{**}	0.230 ^{NS}	-	-	-	-	اسید اسکوربیک
-0.093 ^{NS}	0.611 ^{**}	-	-	-	-	-	اکسیداسیون سلولی
0.245 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	کاروتنوئید
-	-	-	-	-	-	-	آلفا توکوفرول

NS، * و ** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد

بحث

ماهیت اصلی فرآیند تنش‌ها در ایجاد عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پاکسازی آن‌ها در سلول است که در هر دو نوع تنش زنده و غیرزنده رخ می‌دهد (Kar, 2011). غلظت بالا و سمی رادیکال‌های فعال اکسیژن باعث آسیب شدید به ساختارهای پروتئینی، مهار فعالیت آنزیم‌های متعدد از مسیرهای متابولیک و در نتیجه اکسیداسیون ماکرومولکول‌هایی از جمله چربی‌ها و DNA می‌باشد. تشدید و تداوم این رخدادها نامطلوب ممکن است منجر به مرگ سلولی شود (Gill and Tuteja, 2010; Kar, 2011). فعالیت عادی سوخت و ساز سلولی تحت شرایط رشد به طور منظم منجر به تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌شود. بنابراین سلول‌ها بالا رفتن میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن به صورت کنترل نشده را احساس می‌کنند و از آن به عنوان یک سازوکار انتقال پیام برای فعال کردن پاسخ‌های محافظتی استفاده می‌کنند (Moller and Sweetlove, 2010). همانطور که در نتایج این تحقیق مشاهده شد میزان رادیکال‌های آزاد سوپراکسید و پراکسید هیدروژن با پیشرفت بیماری در طی مراحل رشد افزایش یافت که می‌توان آن را نوعی پیام دهی برای فعال کردن سیستم حفاظتی گیاه در پاسخ به عامل بیماری دانست. افزایش میزان عوامل سیگنالی مانند سالیسیلیک اسید و پراکسید هیدروژن امکان القای مقاومت در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا از جمله پوسیدگی ذغالی را در گونه‌های مختلف گیاهی فراهم نموده است (Abdel-Monaim *et al.*, 2010; Abdel-Monaim, 2012). همبستگی مثبت و معنی‌دار ($r = 0/825$) بین رادیکال‌های آزاد می‌تواند دلیلی بر نقش فعال آن‌ها در گیاهان در زمان بروز تنش‌های مختلف باشد.

تبدیل سوپر اکسید به آب اکسیژنه اولین پل ارتباطی در پاکسازی آنزیمی رادیکال‌های فعال اکسیژن است. آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به عنوان مکانیسم دفاعی اولیه در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن مطرح است (Asada, 1999). همانطور که در نتایج ملاحظه شد با افزایش میزان غلظت رادیکال‌های سوپر اکسید میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نیز افزایش یافت که با توجه به نقش آن در تعدیل رادیکال سوپر اکسید، این افزایش توجیه‌پذیر است. چنین افزایشی در ژنوتیپ‌هایی که تحمل بالاتری از خود نشان دادند به مراتب بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود. بر اساس نتایج این مطالعه و سایر محققین به نظر می‌رسد مهم‌ترین پاسخ حفاظتی ژنوتیپ‌های

گیاهی در القای مقاومت به تنش در اختلاف فعالیت دفاع آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشد (Abdel-Monaim *et al.*, 2012; Abdel-Monaim, 2013).

آنزیم کاتالاز که تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می‌شود از دسته پروتئین‌های آهن دار محسوب می‌شود و هنگامی در سلول‌های گیاهی و جانوری وارد عمل می‌شود که مقدار ماده پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در محیط سلولی زیاد باشد. این آنزیم دارای ساختار پروتئینی پورفیرینی چهارتایی با آهن می‌باشد که وظیفه شکستن ترکیبات رادیکال‌های آزاد اکسیژن به ویژه پراکسید هیدروژن را دارد (Du *et al.*, 2002; Yang and Poovaiah, 2007). کاتالاز پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند (Du *et al.*, 2008). در این تحقیق همانطور که ملاحظه شد، همزمان با افزایش میزان پراکسید هیدروژن در اثر بیماری پوسیدگی ذغالی میزان آنزیم کاتالاز نیز افزایش یافت. Abdel-Monaim و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند، پراکسید اکسیژن در القای مقاومت به بیماری پوسیدگی ذغالی در بسیاری از گونه‌های گیاهان نقش دارد؛ در نتیجه با توجه به نقش انتقال پیام توسط پراکسید هیدروژن در القای مقاومت به این بیماری می‌توان گفت آنزیم کاتالاز در ایجاد این مقاومت نقش اساسی دارد. نتایج تجزیه همبستگی نشان می‌دهد بین آنزیم‌های کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز همبستگی مثبت و معنی‌داری ($r = 0/799$) وجود دارد. وجود این همبستگی و نیز همبستگی بین این آنزیم‌ها با رادیکال‌های آزاد اکسیژن بیانگر فعالیت سیستم دفاعی آنزیمی در حضور رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد.

اسید اسکوربیک یک ماده متابولیکی است که به میزان فراوان در سلول‌های گیاهی موجود می‌باشد و بعضی مواقع میزان آن تا ۱۰ درصد محتویات کربوهیدرات گیاه می‌رسد. اسید اسکوربیک نقش مهمی در پاسخ به تنش در گیاه ایفا می‌کند به گونه‌ای که این توانایی را دارد تا چندین گونه اکسیژن فعال از جمله سوپر اکسید را پاکسازی نماید (Padh, 1990). با توجه به نقش شناخته شده اسید اسکوربیک و بر اساس نتایج این مطالعه، کاهش میزان اسید اسکوربیک در شرایط بیماری با افزایش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن قابل توجیه می‌باشد. نتایج تجزیه همبستگی که نشان دهنده عدم همبستگی مثبت بین ای رادیکال‌ها و اسید اسکوربیک بود خود تأییدی بر این موضوع است. نتایج حاصل از بررسی میزان TBARM در ژنوتیپ‌های مختلف و در مراحل مختلف تحت شرایط کنترل و بیماری نشان داد که هر چه به مراحل پایانی رشد نزدیک می‌شویم و نیز با افزایش میزان

کاهش واکنش‌های فتوشیمیایی است (Taiz and Zeiger, 2006). همبستگی مثبت و معنی‌دار کاروتنوئید با آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) که نقش مهمی در کنترل میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارند، می‌تواند تأیید کننده نقش این عامل پاد اکسیدانی در پاکسازی این رادیکال‌ها باشد.

به طور کلی نتایج بدست آمده از این تحقیق بیانگر نقش فعال سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی گیاهان سویا در پاسخ به بیماری پوسیدگی ذغالی می‌باشد، چنانکه پیش‌تر نقش فعال این سیستم دفاعی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی توسط سایر محققین به اثبات رسیده است (Abdel-Monaim, 2013; Navabpour *et al.*, 2003). نتایج حاصله نشان‌دهنده آن است که رقم کتول و تلاقی DPX × Fora با داشتن خصوصیات مطلوب‌تر از لحاظ میزان فعالیت آنزیم‌های پاد اکسیدانی تحت بیماری پوسیدگی ذغالی وضعیت بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها داشته که بیانگر تحمل بیشتر آن‌ها نسبت به این بیماری بود. از آنجایی که تا کنون وارسته مقاوم به این بیماری در سویا شناخته نشده است می‌توان با ارزیابی میزان فعالیت سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی و همچنین بررسی سایر سازوکارهای دفاعی در برابر این بیماری، ژنوتیپ‌هایی را که از این حیث نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتری دارند شناسایی نموده و به عنوان ارقام متحمل نسبت به بیماری پوسیدگی ذغالی معرفی نمود.

بیماری میزان اکسیداسیون سلولی در گیاه افزایش می‌یابد. افزایش این شاخص تحت تأثیر تنش‌های زنده و غیر زنده و نیز در مراحل پایانی رشد در نتایج سایر محققین نیز گزارش شده است (Mackerness *et al.*, 2001; Navabpour *et al.*, 2003). همچنین همبستگی مثبت و معنی‌دار بین میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن و اکسیداسیون سلولی حاکی از نقش آن‌ها در افزایش میزان اکسیداسیون سلولی می‌باشد. آلفا توکوفرول از عوامل پاداکسیدان غشایی بوده که نقش آن عمدتاً در کنترل اکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد. فرم اکسید شده آلفاتوکوفرول به وسیله آسکوربات مجدداً احیاء و در چرخه پاداکسیدانی قرار می‌گیرد (Smirnoff and Wheeler, 2000). تغییراتی که در میزان این آنزیم در مراحل رشد و نیز در شرایط بیماری نسبت به شرایط کنترل مشاهده شد می‌تواند بیانگر نقش آن در القای پاسخ در گیاه در برابر بیماری پوسیدگی ذغالی باشد. همبستگی منفی و غیر معنی‌دار بین میزان آلفا توکوفرول و سطح اکسیداسیون سلولی که در نتایج این تحقیق مشاهده گردید به نوبه خود می‌تواند تأییدی بر این مسئله باشد. کاروتنوئیدها به‌عنوان اجزای اصلی کلروپلاست شناخته می‌شوند که در غیر فعال نمودن انواع اکسیژن‌های منفرد نقش دارند (Mittler, 2002). افزایش میزان کاروتنوئیدها در شرایط بیماری با توجه به نقش آن‌ها در سیستم دفاع پاد اکسیدانی برای محافظت از رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل) قابل انتظار است. افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن تا حد زیادی می‌توانند به کاروتنوئیدها آسیب برسانند. نتیجه این امر صدمه به رنگدانه‌های فتوسنتزی و

REFERENCES

- Abawi GS, Pastor Corrales MA (1990) Root rots of beans in Latin America and Africa; diagnosis, research methodologies and management strategies. CIAT, Colombia. 114 p.
- Abdel-Monaim MF (2013) Improvement of Biocontrol of Damping-off and Root Rot/Wilt of Faba Bean by Salicylic Acid and Hydrogen Peroxide. *Mycobiol.* 41(1): 47-55.
- Abdel-Monaim MF, Abdel-Gaid MA, Armanious HA (2012) Effect of chemical inducers on root rot and wilt diseases, yield and quality of tomato. *Int. J. Agric. Sci.* 7:211-220.
- Abdel-Monaim MF (2010) Integrated management of damping-off, root and/or stem rot diseases of chickpea with sowing date, host resistance and bioagents. *Egypt J. Phytopathol.* 38:45-61.
- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology.* 105: 121-126.
- Arakawa N, Tsutsumi K, Sanceda NG, Kurata T, Inagaki C (1981) Rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using diphenyl-1, 10-phenanthroline. *Agric. Biol. Chem.* 45:1289-1290.
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639
- Bhattacharya D, Dhar TK, Siddiqui KAI, Ali E (1994) Inhibition of seed germination by *Macrophomina phaseolina* is related to

- phaseolinone production. J. Appl. Bacteriol. 77:129-133.
- Brennan T, Frenkel C (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. Plant Physiol. 59: 411-416.
- Du YY, Wang PC, Chen J, Song CP (2007) The comprehensive functional analysis of catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. N.S.F.C. 121(1):16-23.
- Du YY, Wang PC, Chen J, Song CP (2008) Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. J. Integr. Plant Biol. 50(10): 1318-1326.
- Elstner EF, Heupel A (1976) Inhibition of nitrite formation from hydroxyl ammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. Anall. Biochem. 70: 616-620.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59: 309-314.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48(12): 909-30.
- Hagege D, Nouvelot A, Boucard J, Gaspar T (1990) Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. Phytochem. Anal. 1: 86-89.
- James WC (1974) Assessment of plant disease losses. Annu. Rev. Phytopathol. 12: 27-48.
- Jardine DJ, Pearson C (1987) Charcoal rot of soybean. Cooperative Extension Service. Kansas State University.
- Kar RK (2011) Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. Plant Signal Behav. 6(11): 1741-5.
- Larkindale JD, Hall JR, Knight M, Vierling E (2005) Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. Plant Physiol. 138: 882-897.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol. 148: 350-382.
- Mackerness SAH, John CF, Jordan B, Thomas B (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. FEBS Lett. 489: 237-242.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7: 405-410.
- Moller IM, Sweetlove LJ (2010) ROS signaling-specificity is required. Trends Plant Sci. 15(7): 370-374.
- Munné-Bosch S, Schwarz I, Alegre L (1999) Enhanced formation of α -tocopherol and highly oxidized abietanediterpenes in water-stress rosemary plants. Plant Physiol. 121:1047-1052.
- Navabpour S, Morris K, Harrison E, Mackerness S, Buchanan-Wollaston V (2003) Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. J. Exp. Bot. 54: 2285-2292.
- Padh H (1990) Cellular functions of ascorbic acid. Biochem. Cell Biol. 68: 1166-1173.
- Paxton JD, Groth J (1994) Constraints on pathogens attacking plants. Crit. Rev. Plant Sci. 13:77-95.
- Rayatpanah S, Alavi SV (2006) Study on soybean charcoal rot disease in Mazandaran. J. Agric. Sci. Natur. Resour. 13: 107-115.
- Smirnoff N, Wheeler GL (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. Critical Review Plant Sci. 19: 267-290.
- Taiz L, Zeiger E (2006) Plant Physiology. 4th Edition. Sinauer Associated, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts.
- Yang T, Poovaiah BW (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. Proc. National Acad. Sci. US. 99: 4097-4102.