فصلنامه گیاه‌پزشکی
(دانشگاه آزاد اسلامی شیراز)
جلد ۶، شماره ۲، سال ۱۳۹۳ (۱۶۱-۱۴۹)

مطالعه اثر اسید آمینه متیونین بر بیان ژن بتا ۱ و ۳ گلوکاناز و فعالیت آنزیم‌های مؤثر در القای مقاومت به بیماری شانکر مرکبات در لیموترش

وحیده حسبی[۱*]، حسین عسکری[۲]، سید مهدی علوی[۳]، مسعود سلطانی نجف‌آبادی[۴]، حمیدرضا زمانی زاده[۱]

۱. گروه گیاه‌پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۴. گروه دانه‌های روغنی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

چکیده

شانکر باکتریایی مرکبات با عامل *Xanthomonas citri* subsp. *citri*، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر محسوب می‌شود. تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی مانند بتا ۱و ۳ گلوکاناز در اثر حمله عوامل بیمارگر گیاهی، از جمله مکانیسم‌های دفاعی گیاهان علیه عوامل بیماری‌زا به شمار می‌رود. به منظور بررسی بیان ژن *PR-2* مرتبط با آنزیم بتا ۱و ۳ گلوکاناز و نیز فعالیت آنزیم‌های مؤثر در القای مقاومت به بیماری شانکر مرکبات، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در این مطالعه از اسید آمینه متیونین در غلظت ۲۵ میلی مولار و آب مقطر به عنوان کنترل استفاده گردید. گیاهان تیمار شده، پس از ۴۸ ساعت با ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (با غلظت 10^8 پرگنه در میلی‌لیتر) به روش تلقیح توسط سرنگ بدون سوزن مایه‌زنی شده و تحت شرایط گلخانه‌ای قرار گرفتند. بر اساس نتایج آزمایش فنوتیپی، بین گیاهان تیمار شده با اسید آمینه متیونین و گیاهان شاهد تیمار شده با آب مقطر سترون، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ وجود داشت. همچنین نتایج آزمون مولکولی نشان دهنده افزایش بیان ژن *PR-2* در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی در گیاهان تیمار شده بود. بر اساس نتایج حاصل از بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان تحت تنش، تیمار گیاهان با اسید آمینه متیونین به طور معنی‌داری سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیولیاز گردید در حالی که در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تأثیر چندانی نداشت.

واژه‌های کلیدی: شانکر باکتریایی مرکبات، القای مقاومت، بتا ۱و۳ گلوکاناز، *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: v.hasabi@srbiau.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۸/۰۶

مقدمه

شانکر باکتریایی مرکبات یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های مرکبات در دنیا و ایران است که پراکندگی فراوانی در تمام مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دارد. این بیماری توسط باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* رخ می‌دهد (Schaad *et al*., 2006) و دامنه میزبانی وسیعی در گونه‌های گیاهی خانواده روتاسه (Rutaceae) دارد که در بین آن‌ها برخی از ارقام مهم تجاری نظیر پرتقال (*Citrus sinensis*) و لیموترش (*Citrus aurantifolia*) خسارت شدیدی می‌بینند. علائم بیماری به صورت تشکیل زخم‌های آتشفشانی شکل با هاله آبسوخته روی برگ، ساقه و میوه درختان آلوده می‌باشد (Gottwald *et al*., 2000). گیاهان برای مقابله با عوامل بیماری‌زا از طیف وسیعی از مکانیسم‌ها استفاده می‌کنند. نتیجه برهمکنش گیاه با عوامل بیماری‌زا، القای بیان ژن‌های درگیر در مقاومت و در نتیجه کاهش زخم و آسیب توسط بیمارگر می‌باشد (Dixon *et al*., 1994). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (pathogenesis related proteins; PR) دسته‌ای از پروتئین‌ها محسوب می‌شوند که در اثر حمله پاتوژن‌ها و یا مواد مرتبط با بیمارگر در گیاه تولید می‌شوند (Agrios, 2005). واکنش اولیه گیاه به آلودگی توسط عوامل بیماری‌زا به وسیله تغییرات متابولیکی مقاومت همچون تولید گونه‌های اکسیژن فعال (relative oxygen species)، مقاومت اکتسابی سیستمیک (systemic acquired resistance; SAR) و مقاومت القایی سیستمیک (induced systemic resistance; ISR) ابراز می‌گردد. فعالیت و حضور پروتئین‌های مرتبط با SAR ارتباط مستقیمی با سطح مقاومت و حساسیت گیاه دارد. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی همچون بتا ۱و ۳ گلوکاناز (PR-2)، کیتیناز (PR-3) و پراکسیداز (PR-9) که نقش ضد باکتریایی و ضد قارچی دارند در ارتباط با مقاومت القایی می‌باشند. از دیگر آنزیم‌های کلیدی که در تولید مولکول‌های اولیه ضروری برای ساخت بیشتر مواد فنلی از جمله فیتوالکسین‌ها و لیگنین نقش دارد فنیل آلانین آمونیولیاز (Phenylalanin ammonia lyase; PAL) است که نقش مهمی در القای مقاومت در گیاه ایفا می‌کند (Herman *et al*., 2007). یکی از روش‌های مدیریتی مهم در کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده از القاگرهای مقاومت به بیماری (Disease resistance inducers) می‌باشد که از طریق القای واکنش‌های دفاعی در گیاه، منجر به کاهش بیماری می‌گردند (Graham and Leite, 2004). امروزه این تحقیقات، طیف بسیار گسترده‌ای یافته است چراکه استفاده از یک محرک، سبب القای مقاومت در گیاه شده و واکنش‌های دفاعی گیاه را در برابر بیمارگر از نظر زمانی یا مقدار، چند برابر افزایش می‌دهد. به این ترتیب درجه بالاتری از مقاومت در مدت زمان کوتاهی در گیاه ایجاد می‌شود (Heil *et al*., 2002, Graham *et al*., 2007, 2011). بنابراین با توجه به اهمیت بیماری شانکر مرکبات و محدودیت‌های موجود در روش‌های مدیریتی معمول در آن، مانند استفاده از سموم مسی که علاوه بر مقاوم شدن باکتری عامل بیماری به سم، با اثرات سوء

زیست محیطی مانند تجمع سم در خاک درختان مرکبات همراه است (Rinaldi & Leite, 2000)، استفاده از مواد طبیعی از طریق افزایش مقاومت طبیعی گیاه نسبت به بیمارگر می‌تواند به عنوان روشی کارا و مؤثر در برنامه‌های مدیریت تلفیقی این بیماری مهم، به شمار آید. از این رو در تحقیق حاضر به منظور کاهش اثرات مخرب سموم شیمیایی، تأثیر اسید آمینه متیونین بر القای مقاومت در گیاهان لیموترش علیه بیماری شانکر مرکبات مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز، کاتالاز و فنیل آلانین آمونیولیاز و همچنین بیان ژن *PR-2* مربوط به آنزیم بتا ۱و ۳ گلوکاناز ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

جهت آزمایش‌های گلخانه‌ای، تعدادی نهال دو ساله لیموترش شیرازی (*Citrus aurantifolia*) از جنوب کشور (استان هرمزگان) تهیه گردید. محل نگهداری نهال‌ها از نظر شرایط دمایی بهینه (۲۵-۳۰ °C) و رطوبت مناسب (۶۰-۵۸ درصد)، تحت کنترل قرار گرفت. همچنین به دلیل نیاز به برگ‌های جوان جهت مایه‌زنی باکتری، نهال‌ها مرتباً هرس شده و از نظر وجود آفات و بیماری‌های دیگر نیز تحت کنترل قرار گرفتند.

تیمار گیاهان

تیمار گیاهان با اسید آمینه متیونین با غلظت ۲۵ میلی مولار از طریق محلول‌پاشی ۵۰ ماکرولیتر بر سطح رویی برگ‌ها صورت گرفت که تعداد ۱۰ برگ از هر گیاه در سه تکرار محلول‌پاشی شد.

انتخاب سویه باکتریایی، تهیه مایه تلقیح و بهینه سازی شرایط مایه‌زنی گیاه میزبان

سویه ایرانی NIGEB_088 از کلکسیون بیمارگرهای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری در این مطالعه استفاده گردید. جهت تهیه محلول پایه، پرگنه‌های خالص باکتری به مدت ۴۸ ساعت، در دمای ۲۸ °C و دور ۱۸۰ rpm در محیط کشت YP (Yeast extract pepton) کشت گردیدند. به سوسپانسیون حاصل، پس از سانتریفیوژ یک حجم محلول YP و یک حجم گلیسرول ۴۰ درصد سترون اضافه گردید. این محلول پایه به منظور استفاده‌های بعدی در ۸۰- °C نگهداری شد. جهت تهیه مایه تلقیح، سویه مورد نظر در محیط کشت جامد NA (Nutrient agar) در دمای ۲۸ ° C به مدت ۴۸ ساعت رشد داده شد. سپس یک کلنی منفرد از کشت جامد این سویه در محیط کشت مایع YP رشد داده و زمانی که کشت سلولی به (۵×۱۰^{۸}) OD_{600}=۰/۴ رسید، در دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و توده سلولی حاصل، مجدداً در آب مقطر سترون سوسپانسیون شد (Francis *et al*., 2009).

مایه‌زنی گیاهان با سوسپانسیون باکتری، ۴۸ ساعت پس از تیمار انجام گردید که به روش تزریق به‌وسیله سرنگ بدون سوزن صورت گرفت. به این منظور تعداد ۱۰ برگ از گیاه میزبان و در هر برگ در دو طرف رگبرگ میانی، ورد مایه‌زنی قرار گرفت. جهت مایه‌زنی، ابتدا برگ‌ها با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شده و سوسپانسیون باکتری از طریق فشار ناشی از سر سرنگ وارد برگ شد. قطر ناحیه اینوکوله شده تقریباً ۶ میلی‌متر و حاوی ۵ ماکرولیتر سوسپانسیون باکتری بود. سپس گیاهان مایه‌زنی شده به منظور تأمین رطوبت لازم جهت فعالیت باکتری، به مدت یک روز در زیر پوشش پلاستیکی قرار گرفتند (Graham & Leite, 2004).

به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی، نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان تیمار شده با متیونین و نیز برگ‌های تیمار شده با آب مقطر به عنوان شاهد، صورت گرفته و در پس از منجمد شدن در ازت مایع در دمای $^{\circ}C$ ۸۰- نگهداری شد.

ارزیابی شدت بیماری

میزان شدت بیماری، چهار هفته پس از مایه‌زنی گیاهان با سوسپانسیون باکتری از طریق محاسبه میزان سطح نکروتیک برگ‌ها در مقایسه با گیاه شاهد صورت گرفت. بدین منظور میانگین سطح نکروتیک بخش‌های مایه‌زنی شده با سوسپانسیون باکتری با در نظر گرفتن سه تکرار برای هر تیمار به وسیله خط کش میلی‌متری محاسبه شد.

واکنش نسخه‌برداری معکوس و RT-PCR نیمه کمی

جهت استخراج RNA، برگ‌های نمونه‌برداری شده در زمان‌های معین، در هاون سترون با استفاده از ازت مایع پودر گردید. استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-Plus (CinnaGen co.) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به منظور تهیه cDNA، یک میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از آغازگر الیگومر تیمیدین (OligodT) و کیت M-MulV Reverse Transcriptase (Vivantis co.) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر سنتز شد. جهت بررسی سطح بیان ژن *PR-2*، از آغازگرهای الیگو نوکلئوتیدی طراحی شده (Distefano *et al.*, 2008) استفاده گردید و دستگاه ترموسایکلر (مدل Eppendorf) به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کار رفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیمه کمی در ۴۰ چرخه انجام شد. در صورتی که مقدار مساوی از cDNAی کل نمونه‌های مختلف و با غلظت یکسان به واکنش مقایسه‌ای زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه‌ای از cDNAی ژن مورد نظر وارد شود، می‌توان غلظت باند تکثیر شده در هر نمونه را به عنوان شاخص میزان بیان ژن مورد مطالعه در نظر گرفت. ژنی که باند تکثیر شده قوی‌تری را نشان می‌دهد، سهم نسبی بیشتری در cDNA دارد که این تناسب را می‌توان به طور مستقیم به غلظت mRNA آن ژن نسبت داد.

عصاره آنزیمی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیولیاز

جهت تهیه عصاره آنزیمی، نیم گرم از برگ منجمد شده با ازت مایع در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷) حاوی پلی وینیل پیرولیدون ۱٪ و EDTA یک میلی مولار همگن گردیدند و همگنای حاصل در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و بخش رویی جهت سنجش آنزیم‌های مورد نظر برداشته شد (Gapinska *et al*., 2008).

سنجش مقدار پروتئین کل

محتوای پروتئین کل با روش برادفورد و استفاده از آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976). میزان جذب همه نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل SPUV-26) خوانده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز با روش اسپکتروفتومتری و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در مدت ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷)، آب اکسیژنه (H_2O_2) ۱۵ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با اضافه کردن H_2O_2 آغاز شد و کاهش جذب در مدت ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری گردید (Dihindsa *et al*., 1991).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکول به عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷)، ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱٪ و ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۴٪ بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. هر واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقداری از آنزیم تعریف می‌شود که باعث ۰/۰۱ تغییر در جذب می‌گردد (Reuveni *et al*., 1995).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز

جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز، یک میلی‌لیتر از بافر استخراج، ۵۰۰ میکرولیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط شدند و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. واکنش با قرار دادن نمونه‌ها در یخ متوقف شد و جذب نمونه در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. یک واحد آنزیمی به عنوان یک میکرومول سینامیک اسید

تولید شده در مدت یک دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین تعریف شد (Ballester *et al.*, 2006).

آنالیز آماری

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به منظور آنالیزهای آماری از نرم‌افزار SAS v. 9.1 استفاده گردید و میانگین داده‌ها با آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

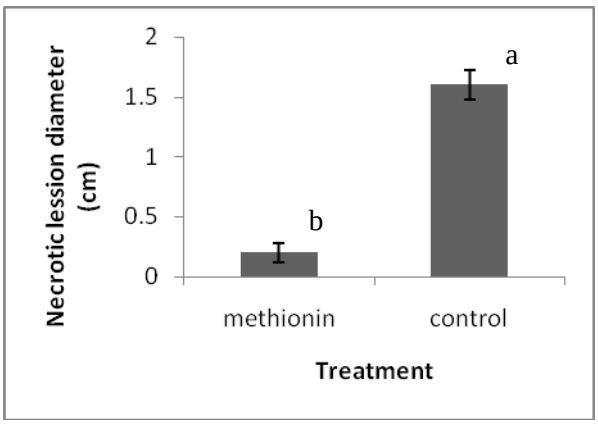
نتایج و بحث

ارزیابی شدت بیماری

شدت بیماری گیاهان آلوده به باکتری *X. citri* subsp. *citri*، چهار هفته پس از مایه‌زنی برگ‌های گیاه با سوسپانسیون باکتری از طریق محاسبه میزان سطح نکروتیک زخم مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایش‌های نشان داد که شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با متیونین در مقایسه با گیاهان شاهد تیمار شده با آب مقطر سترون دارای تفاوت معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). به طوری که تیمار گیاهان لیموترش با اسید آمینه متیونین منجر به کاهش شدت بیماری تا حدود ۶۰ درصد نسبت به گیاه شاهد گردید (شکل‌های ۱ و ۲).

شکل ۱- شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با متیونین (الف) و گیاهان تیمار شده با آب مقطر (شاهد) چهار هفته پس از مایه‌زنی با سوسپانسیون باکتری.

Figure 1. Disease severity in treated plants with methionine (A) and distilled water (control) (B) four weeks after inoculation with bacterial suspension

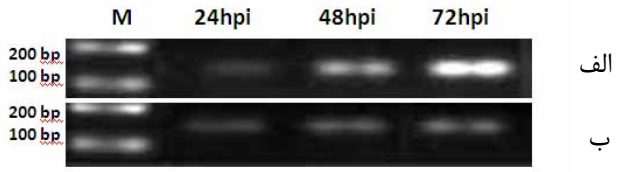


شکل ۲- سطح نکروتیک زخم در گیاهان تیمار شده با متیونین و گیاهان تیمار شده با آب مقطر (شاهد) چهار هفته پس از مایه‌زنی با سوسپانسیون باکتری. اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ دارای تفاوت معنی‌دار هستند.

Figure 2. Necrotic lesion diameter in treated plants with methionine (A) and distilled water (control) (B) four weeks after inoculation with bacterial suspension. Different letters showed significant difference basis on Duncan test in P<5%.

RT-PCR نیمه کمی

نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی نشان داد که میزان بیان نسبی ژن *PR-2* در گیاهان تیمار شده با اسید آمینه متیونین نسبت به گیاه شاهد افزایش داشته است. این افزایش بیان از ۲۴ ساعت پس از تیمار تا ۷۲ ساعت بعد مشاهده شد. لازم به ذکر است که حداکثر افزایش مربوط به زمان‌های نمونه‌برداری در ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی بود. میزان بیان این ژن در گیاه شاهد در تمامی زمان‌ها ثابت بود که نشان دهنده آن است که این ژن به طور یکنواخت در تمام زمان‌ها بیان داشته است (شکل ۳).



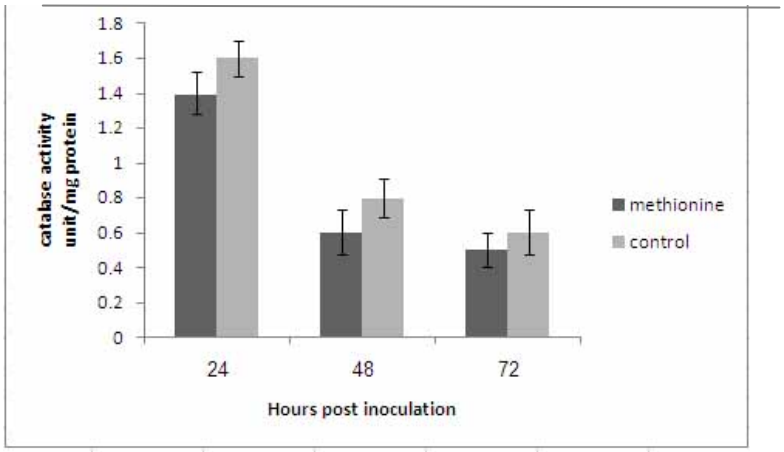
شکل ۳- مقایسه بیان ژن *PR-2* در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی در گیاهان تیمار شده با متیونین (الف) و گیاهان تیمار شده با آب مقطر (شاهد) (ب). M) نشانگر اندازه ladder DNA ۱۰۰bp.

Figure 3. comparision of *PR-2* gene experision at 24, 48 and 72 hours post inoculation in treated plants with methionine (A) and ditilled water (control) (B). M) 100 bp ladder DNA

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیولیاز

فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج حاصل از میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد پیش تیمار گیاهان با متیونین در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی باعث کاهش معنی‌دار فعالیت کاتالاز در شرایط تنش گردید. نتایج حاصل از آنالیز آنزیم کاتالاز نشان می‌دهد که تغییر فعالیت این آنزیم در گیاهان تیمار شده در مقایسه با گیاه شاهد معنی‌دار نیست. بنابراین به نظر می‌رسد در این شرایط آنزیم کاتالاز فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه نداشته است (شکل ۴).

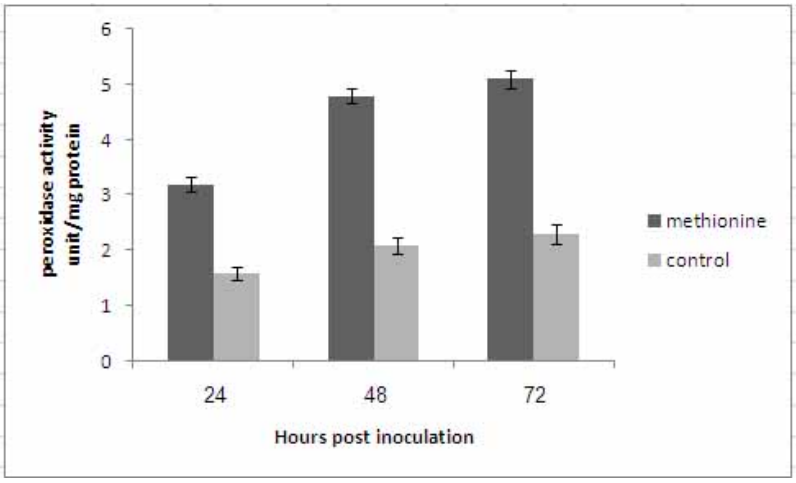


شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان تیمار شده با متیونین و گیاهان تیمار شده با آب مقطر (شاهد) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی.

Figure 4. Catalase enzyme activity in treated plants with methionine (A) and ditilled water (control) (B).

فعالیت آنزیم پراکسیداز

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز نشان داد که پیش تیمار گیاهان با اسید آمینه متیونین فعالیت این آنزیم را افزایش داده است. به طوری که در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش معنی‌داری نشان داد. آنزیم پراکسیداز از جمله آنزیم‌هایی است که در شرایط تنش در پاک‌سازی سلول از پراکسید هیدروژن شرکت می‌کند. در مطالعه حاضر، تنش گیاهان به بیماری موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شده و به کار بردن پیش تیمار متیونین در گیاهان تحت تنش باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت این آنزیم گردید که نشان دهنده این آنزیم در دفع رادیکال‌های آزاد اکسیژن تحت شرایط مذکور می‌باشد (شکل ۵).



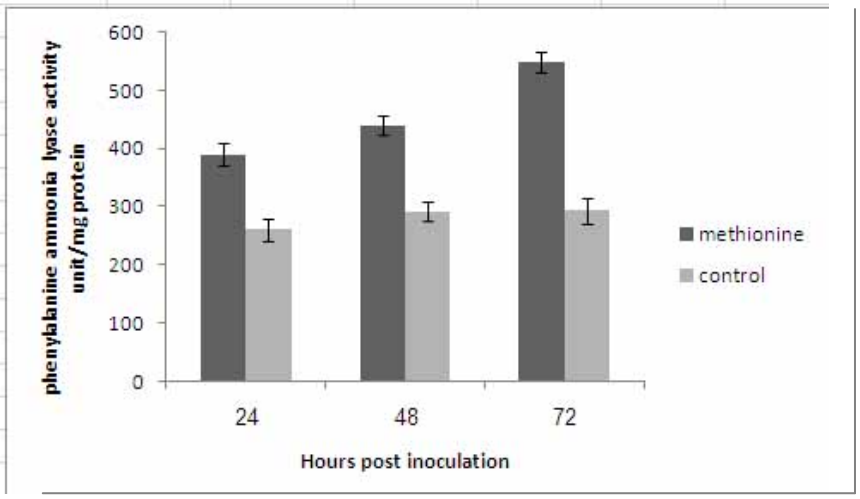
شکل ۵- میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با متیونین و گیاهان تیمار شده با آب مقطر (شاهد) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی.

Figure 5. Peroxidase enzyme activity in treated plants with methionine (A) and ditilled water (control) (B).

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز

نتایج حاصل از سنجش آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز نشان داد که در گیاهان تیمار شده با متیونین در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته است ($P<۰/۰۵$). فنیل آلانین آمونیولیاز اولین و مهم‌ترین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد که منجر به سنتز بنزوئیک اسید، سالیسیلیک اسید و دیگر فنل‌های وابسته به گیاه می‌گردد. این آنزیم تبدیل L- فنیل آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. سینامیک اسید به عنوان یک پیش ماده برای فنولیک‌ها، لیگنین و فیتوالکسین و دیگر متابولیت‌های پائین دست عمل می‌کند. در این مطالعه پیش تیمار گیاهان با اسید آمینه متیونین موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز گردید که نشان دهنده نقش این آنزیم در مکانیسم دفاعی گیاه در مقابل تنش مذکور است (شکل ۶).

یکی از مهم‌ترین شیوه‌های مدیریت بیماری‌های گیاهی، حفاظت گیاه و بالا بردن میزان مقاومت طبیعی در آن است که می‌تواند از طریق اعمال ترکیبات القاگر بر روی گیاه صورت گیرد. با توجه به اهمیت بیماری شانکر مرکبات و محدودیت‌های موجود در روش‌های مدیریتی معمول در آن، مانند استفاده از سموم مسی استفاده از مواد طبیعی از طریق افزایش مقاومت طبیعی گیاه نسبت به بیمارگر می‌تواند به عنوان روشی مؤثر در برنامه‌های مدیریتی این بیماری به شمار آید.



شکل ۶- میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز در گیاهان تیمار شده با اسید آمینه متیونین و گیاهان تیمار شده با آب مقطر (شاهد) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی.

Figure 6. Phenyl alanine ammonia lyase enzyme activity in treated plants with methionine (A) and ditilled water (control) (B).

از این رو میزان شدت بیماری و نیز بیان ژن *PR-2* و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و فنیل آلانین نسبت به گیاهان شاهد که تنها با آب مقطر سترون تیمار شده بودند مقایسه گردید. نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی و آنزیم‌های پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیولیاز و همچنین بررسی شدت بیماری در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد حاکی از افزایش بیان ژن *PR-2* و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های مذکور و کاهش شدت بیماری نسبت به شاهد بود.

نتایج مشابهی در تحقیقات صورت گرفته وجود دارد که نشان می‌دهد پیش تیمار گیاهان با ترکیباتی چون بتا آمینو بوتیریک اسید (β-amino butyric acid; BABA) (Graham *et al*., 2011)، ویتامین‌هایی مانند تیامین و ریبوفلاوین (Dong *et al*., 2000)، گروهی از اسیدهای چرب مانند اولئیک اسید (Oleic acid) و لینولئیک اسید (Linoleic acid) (Cohen *et al*., 1991) منجر به القای مقاومت در گیاهان علیه بسیاری از بیماری‌ها می‌شوند. ترکیبات دیگری که به عنوان القاگر مورد بررسی قرار گرفته‌اند، گروه‌های مختلف اسیدهای آمینه است. اولین بار کوک و همکاران (Kuc *et al*., 1957; 1959) دریافتند که هنگامی که فنیل آلانین (phenylalanine)، آلانین (alanine) و تریپتوفان به درون برگ‌های درختان سیب تزریق شوند، منجر به افزایش مقاومت گیاه علیه بیماری اسکاب سیب ناشی از *Venturia inaequalis* می‌شوند. همچنین در تحقیقی دیگر، ۵۰ اسید آمینه مختلف جهت القای مقاومت در خیار علیه بیمارگر *Cladosporium cucumerinum* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد اسیدهای آمینه سرین (serine) و ترئونین (threonine) دارای بیشترین فعالیت القاگری هستند (Van And el *et al*., 1958). همچنین در تحقیقی دیگر مشخص شد که تیمار گیاهان ارزن با اسید

آمینه متیونین منجر به القای مقاومت و در نتیجه افزایش بیان ژن‌های پراکسیداز، کیتیناز و بتا ۱و۳ گلوکاناز علیه بیماری سفیدک پودری می‌شود (Bejae *et al*., 2005). نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که پیش تیمار گیاهان با اسید آمینه متیونین در گیاهان لیموترش می‌تواند منجر به القای پاسخ‌های دفاعی گیاه در مقابل بیماری شانکر آسیایی مرکبات شود.

منابع

Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology* (5th ed.). Elsevier Academic Press.

Ballester, A.R., Lafuente, M.T.& González-Candelas, L. 2006. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 115-124

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

Cohen, Y., Gisi, U. & Mosinger, E. 1991. systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. Physiological and *Molecular Plant Pathology*. 38(4): 225-263.

Dhindsa, R.S., Dhindsa, P.& Thorpe, A.T. 1981. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decrease levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32: 93-101.

Distefano, G. La., Malfa, S., Vitale, A., Lorito, M., Deng, Z. & Gentile, A. 2008. Defencerelated gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial Trichoderma harzianum endochitinase during fungal infection. *Transgenic Research*. 17 : 873-879.

Dixon, R.A., Harrison, M.J.& Lamb, C.J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathology*, 32: 479-501.

Dong, H. & Beer, S. V. 2000. Riboflavin induces disease resistance in plant by activating a novel signal transducation pathway. *Phytopathology*, 90: 801- 811.

Francis, M.I., Redondo, A., Burns, J. K. & Graham, J H. 2009. Soil application of imidacloprid and related SAR inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *European Journal of Plant Pathology*, 124:283-292.

Gapinska, M., Sklodowska, M. & Gabara, B. 2008. Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30:11-18.

Gottwald, T. R.& Graham, J. H. 2000. Canker pp. 5-7, In: Timmer L.W., Garnsey S.M., Graham J.H. (eds*.) Compendium of citrus diseases*, 2nd edn. *APS Press, St. Paul*. 5–7.

Graham, J. H. & Leite R P. 2004. Lack of control of citrus canker by induced systemic resistance compounds. *Plant Disease*, 88:745-750.

Graham, J. H. & Leite, R P, Jr. 2007. Soil-applied neonicotinoids for control of bacterial diseases on young citrus trees. *Proceedings of International Workshop PR-Proteins and Induced Resistance Against Pathogens and Insects*. Doorn, The Netherlands.

Graham, J.H. & Myers, M.E. 2011. Soil Application of SAR Inducers Imidacloprid, Thiamethoxam, and Acibenzolar-*S*-Methyl for Citrus Canker Control in Young Grapefruit Trees. *Plant Disease*, 95(6): 725-728.

Heil, M. & Bostock, R.M. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annal Botany*, 89: 503-512.

Herman, M. A. B., Restrepo1, S. & Smart, C. D. 2007. Defense gene expression patterns of three SAR-induced tomato cultivars in the field. Physiol. *Mololcular Plant Pathology*. 71:192-200.

Kuc, J., Barnes, E., Daftsios, A. & Williams, E. B. 1959. The effect of amino acids on susceptibility of apple varieties to scab. *Phytopathology*, 49:313-315.

Kuc, J., Williams, E. B. & Shay, J. R. 1957. Increase of resistance to apple scab following injection of host with phenylthiourea and Dphenylalanine. (Abstr.) *Phytopathology*. 47:21-22.

Reuveni, R. 1995. Biochemical marker of disease resistance. pp. 99-114, *In* R.P. Singh. and U.S. Singh (eds). Molecular Methods in Plant Pathology. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.

Rinaldi, D.A.& Leite, J.r. R.P. 2000. Adaptation of Xanthomonas axonopodis pv. citri population to the presence of copper compounds in nature. *Proceeding International Society of Citriculturs*,. 2: p. 1064.

Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.A, Sechler & Garkova, L. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 90-695.

Van Andel, O. M. 1958. Investigations on plant chemotherapy II. Influence of amino acids on the relation plant-pathogen. Tijdschr. *Planteziekten*, 64:307-327.