

بررسی اثر فیتوپلاسمای همراه بیماری جاروک بر محتوای ترکیبات
فنولی در گیاه لیمو ترش*

EVALUATION OF RHIZOBACTERIA EFFECTS ON THE ACTIVITY
OF ROOT-KNOT NEMATODE, *Meloidogyne incognita* UNDER
GREENHOUSE AND LABORATORY CONDITIONS

سمیه ظفیری**، وحید نیکنام و حسن ابراهیم زاده معبود^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۱۸)

چکیده

اثر آلودگی فیتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش بر محتوای فنول‌ها، فلاونوئیدها و دو ترکیب مهم درگیر در مسیر سنتز آنها (کربوهیدرات‌ها و آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز) در برگ‌های لیمو ترش مورد بررسی قرار گرفت. نمونه برداری از گیاهان سالم و آلوده در ۱۲ و ۱۶ هفته بعد از مایه زنی انجام شد. به رغم گزارش‌های متعدد مبنی بر افزایش ترکیبات فنولی تحت شرایط تنش، نتایج به دست آمده از مطالعه کمی و کیفی این ترکیبات به کمک اسپکتروفتومتر و کروماتوگرافی گاز-مایع کاهش معنی دار کربوهیدرات‌های محلول، فنیل آلانین آمونیا لیاز، ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدها را در گیاه آلوده در مقایسه با گیاه سالم نشان داد. محتوای ترکیبات فنولی در هر دو نمونه برداری کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنولی، فیتوپلاسم، لیمو ترش

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول ارائه شده به دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی zsomaieh@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران

مقدمه

پروپانویید با تبدیل آنزیمی فنیل آلانین به سینامیک اسید آغاز می‌شود که توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز (PAL) کاتالیز می‌گردد. سطوح فعالیت این آنزیم یکی از فاکتورهای کلیدی در تنظیم این مسیر می‌باشد. از دیگر مسیرهای درگیر در سنتز ترکیبات فنولی مسیر شیکیمیک اسید می‌باشد که از کربوهیدرات‌های ساده شروع و به سمت تولید آمینواسیدهای آروماتیک ادامه می‌یابد (Keninget al. 1995, Lavaniaet al. 2006). آلودگی فیتوپلازما بر متابولیسم‌های ثانویه اثرگذار بوده و به علاوه شماری از مطالعات نشان می‌دهد که فیتوپلازما می‌تواند باعث تغییر در محتوای ترکیبات شیمیایی گیاه همانند ترکیبات فنولی، آنزیم‌های دفاعی و کربوهیدرات‌ها شود (Musettiet al. 2005, Lepkaet al. 1999). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر آلودگی فیتوپلازما همراه با جاروک لیموترش بر محتوای پلی فنول‌ها و فلاونوئیدها و دو ترکیب کلیدی در مسیر سنتز ترکیبات فنولی، کربوهیدرات‌ها و PAL، می‌باشد. هدف دیگر بررسی ارتباط تغییرات القاء شده در ترکیبات فنولی با نقش دفاعی آنها در طی بیماری جاروک لیموترش بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تشخیص فیتوپلازما

گیاهان لیموترش (*Citrus aurantifolia* (Christm.)) (wingle, key lime) با روش پیوند با عامل جاروک لیموترش مایه‌زنی گردیدند و در کیسه‌های پلاستیکی (۱۰×۱۰ سانتی‌متر) تحت شرایط گلخانه رشد داده شدند. گیاهان لیموترش آلوده‌ای که برای پیوند به کار برده شدند از بندرعباس جمع‌آوری و به گلخانه انتقال داده شدند. از شاخه‌هایی که علائم بارز جاروک را نشان می‌دادند برای پیوند به گیاهان لیمو ترش سالم استفاده شد. گیاهان آلوده

لیمو ترش (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, key lime) از مهم‌ترین محصولات اقتصادی جنوب ایران است که برای شمار زیادی از بیماری‌های ایجاد شده توسط عوامل بیماری‌زای مختلف از جمله فیتوپلازما، مستعد می‌باشد. بیماری فیتوپلازما جاروک لیمو ترش اولین بار در کشور پادشاهی عمان و سپس در امارات (Garnieret al. 1991) و ایران (Bovéet al. 2000, Salehiet al. 1997) دیده شد. فیتوپلازماها پروکاریوت‌های فاقد دیواره سلولی هستند که در آوند آبکشی مستقر می‌شوند و بین گیاهان، اغلب توسط زنجیرک‌های تغذیه کننده از شیره آبکشی انتقال می‌یابند (Davis 1995). براساس توالی 16S rDNA فیتوپلازمای جاروک لیمو ترش به عنوان عضوی از زیر گروه II از 16S rDNA، طبقه‌بندی (Davis & Sinclair 1998) و برای آن نام موقت *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* (Zreikeet al. 1995) پیشنهاد شد.

بیماری در شرایط گلخانه به وسیله پیوند زدن و یا توسط سس به لیمو ترش سالم انتقال می‌یابد (Bovéet al. 2000). گیاهان آلوده علائمی نظیر ازدیاد ساقه‌های نازک جانبی، زردی برگ‌ها، کاهش اندازه برگ‌ها و کوتاه‌تر شدن میانگره‌ها را نشان می‌دهند. علائم ظاهر شده در گیاهان آلوده ارتباط احتمالی *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* با متابولیسم ثانویه و تعادل تنظیم کننده‌های رشد را نشان می‌دهد. از طرف دیگر در تنش‌های زیستی و غیر زیستی متابولیسم‌های ثانویه همچون متابولیسم فنیل پروپانوییدها به تشکیل ترکیبات متعدد فنولی منجر می‌شود که دارای عملکردهای مهمی به عنوان فیتوالکسین در پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌باشند (Chérif et al. 2007). مسیر فنیل

دقیقه) انجام شد. از کنترل منفی برای بررسی وجود آلودگی در استخراج DNA نیز استفاده شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز در ژل آگاروز ۲ درصد در بافر TE (بافر ۱۰ میلی مولار تریس با pH هشت و EDTA دو میلی مولار) رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید و آشکارسازی با دستگاه UV Transilluminator شناسایی شد (شکل ۱).

استخراج و سنجش کربوهیدرات‌های محلول

برای استخراج کربوهیدرات‌ها، نمونه‌های برگ در سایه خشک و سپس آسیاب شدند. به ۰/۲ گرم از نمونه پودر شده دو میلی لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه و به مدت یک دقیقه ورتکس شد. پس از ده دقیقه سانتریفوژ کردن در ۷۰۰۰ دور در دقیقه، روشناور جمع‌آوری شد. دو میلی لیتر اتانول به رسوب باقی مانده اضافه و استخراج مشابه قبل تکرار شد. مجموع روشناور حاصل از چهار بار استخراج درون پتری دیش تبخیر گردید و باقی مانده ته ظرف با ۴۰ میلی لیتر آب مقطر نیمه گرم شسته و در چهار لوله سانتریفوژ تقسیم شد. به هر لوله ۱۰ میلی لیتر هیدروکسید باریم ۰/۳ نرمال و ۱۰ میلی لیتر محلول سولفات روی ۰/۵٪ اضافه شد. پس از ده دقیقه سانتریفوژ کردن در ۴۰۰۰ دور در دقیقه، بخش فوقانی جدا و باقی مانده با کمی آب مقطر حل و مجدداً سانتریفوژ گردید و بخش فوقانی جدا گردید. باقی مانده ته ظرف دور ریخته شد و محلول جدا شده به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید. از این عصاره برای سنجش کربوهیدرات‌های محلول به روش فنول سولفوریک اسید استفاده شد (Dubois et al. 1956).

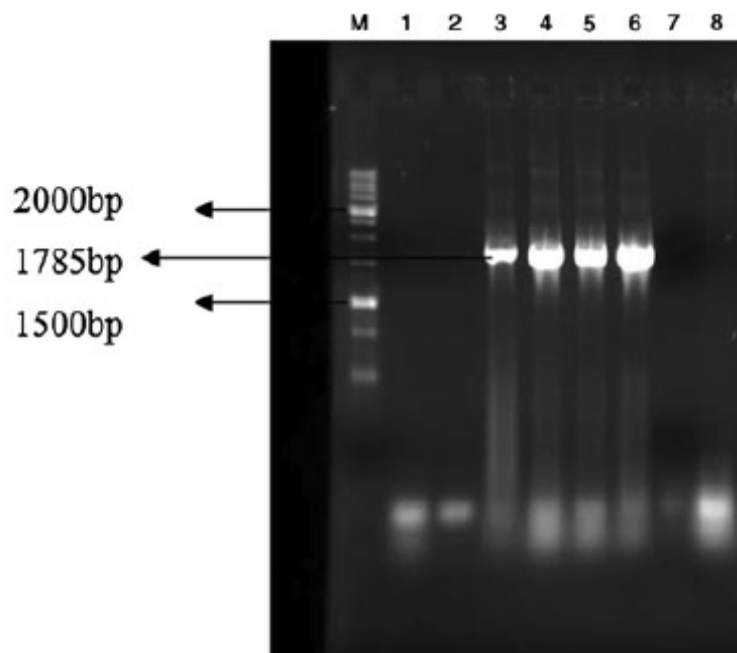
سنجش فنیل آلانین آمونیاک (PAL)

به منظور بررسی کمی آنزیم PAL به ۰/۱ میلی لیتر عصاره

شده علائمی مانند کاهش اندازه برگ، زردی و کوتاه‌تر شدن میانگره‌ها را نشان می‌دادند. حضور فیتوپلاسم در گیاهان آلوده و دارای علائم مشخصه جاروک با آزمون PCR به روش تغییر یافته لی و همکاران (Lee et al. 1993) اثبات شد. نمونه برداری از چهار گیاه آلوده در دو دوره زمانی، ۱۲ و ۱۶ هفته بعد از مایه زنی، انجام شد.

استخراج DNA و آنالیز PCR

استخراج دی ان ای کل از رسوبات حاصل با استفاده از کیست Omega (E.Z.N.A.® Plant MiniPrep) (Biotek, Norcross, GA, USA)، همان‌طور که توسط تورس و همکاران شرح داده شده است، انجام شد (Torres et al 2003). دی ان ای استخراج شده در ۱۰۰ میکرولیتر آب استریل Mili-Q حل شد و تا هنگام استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. این استخراج با ۳ بار تکرار انجام شد. PCR با استفاده از کیت Bioneer (Intron Biotechnology, Sungnam, Korea) در یک ترموسایکلر (Thermocycler-I-cycler, Biorad) با آغازگرهای عمومی فیتوپلاسم (5'-P1 (-3' AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' و P7 (5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') برای تکثیر یک قطعه DNA 1785-bp از ژن 16S rRNA، ناحیه فاصله انداز بین ژنی (SR) و یک قسمت از ناحیه 5' ژن 23S rRNA، انجام شد (Torres et al, 2003). تکثیر PCR شامل مرحله‌های Predenaturation (در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه)، Denaturation (در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه)، Annealing (در دمای ۵۸°C به مدت ۱ دقیقه)، و Extension (در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه) در ۳۴ سیکل و Final extension (در دمای ۷۲°C به مدت ۱



شکل ۱. ژل رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید محصولات تکثیر شده PCR با استفاده از دو آغازگر عمومی فیتوپلازما P1/P7. راهک ۱: کنترل منفی یا بدون DNA، راهک ۲: برگ‌های لیموترش سالم، راهک ۳ تا ۶، برگ‌های لیموترش آلوده شده با فیتوپلازما، راهک ۷: کنترل سالم و راهک ۸: کنترل منفی را نشان می‌دهند. باند مورد نظر (1785 bp) در راهک‌های ۳ تا ۶ مشاهده می‌شود. M اندازه مارکر را نشان می‌دهد.

Fig. 1. Ethidium bromide-stained gel of PCR amplification products obtained by using universal phytoplasma primer pairs P1/P7. Lane 1, negative control or no DNA; lane 2, healthy lime leaves; lanes 3–6, phytoplasma-infected lime leaves; lane 7, healthy control and lane 8 negative control. The band of the expected size (1,785 bp) is observed in lanes 3–6. M represents DNA size markers (bp).

M ۰/۰۵٪ اضافه شد و رسوب کاملاً در آن حل شد. جذب نمونه‌ها به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد (Hao et al. 2009).

استخراج و سنجش ترکیبات فنولی کل (پلی فنول‌ها)
مقدار ۰/۵ گرم از پودر نمونه توسط متانول ۸۰ درصد در بن ماری با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت سه ساعت استخراج گردید. ابتدا عصاره تهیه شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و تبخیر شد و پس از حل نمودن دوباره در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای اندازه‌گیری

پروتئینی استخراج شده به کمک بافر تریس هیدروکلرید (۵۰ mM، pH=۸/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول فنیل آلانین (۱۰ mM)، ۰/۴ میلی‌لیتر آب مقطر، و یک میلی‌لیتر از بافر تریس هیدروکلرید (۵۰ mM، pH=۸/۸) اضافه شد. نمونه به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (که دمای بهینه فعالیت آنزیم PAL است) گرمخانه گذاری شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از HCl ۶ مولار برای غیر فعال کردن PAL به آن اضافه شد و توسط ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات مورد شستشو قرار گرفت. سپس نمونه در معرض جریان هوا تبخیر شد و به رسوب، ۳ میلی‌لیتر از سود (NaOH)

ترکیبات فنولی بود، در استونیتریل حل شد. برای بررسی ترکیبات فنولی با روش کروماتوگرافی گاز-مایع (GLC) عصاره‌ها مشتق‌سازی شدند. بدین منظور استونیتریل موجود در ترکیبات فنولی تبخیر گردید و به آن معرف-های مشتق‌سازی چون پیریدین (1 mm)، هگزامتیل دی سیلازان (0/2 mm) و تری متیل کلروسیلان (0/1 mm) اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. همچنین مشتق‌سازی برای استاندارد مخلوط برخی از ترکیبات فنولی که از آن به منظور شناسایی ترکیبات فنولی موجود در عصاره استفاده می‌شود، نیز انجام گرفت. سپس دو میکرولیتر از استاندارد مخلوط ترکیبات فنولی و عصاره‌های مشتق‌سازی شده به دستگاه (GLC Shimadzu GC-16A, Tokyo, Japan) تزریق و کروماتوگرام آنها رسم شد (Saitta et al 2002)؛ براساس نزدیکی زمان بازداری (Retention Time: ±0.2min) هر کدام از منحنی‌ها به ترکیب فنولی استاندارد، نوع ترکیب آن مشخص گردید. کروماتوگرافی گازی با ستون CBP1-M25-025 و گرادیان دما از ۱۰۰°C (با میزان افزایش ۱۲ درجه در دقیقه) تا ۲۸۰°C انجام گرفت. دمای ۲۸۰°C تا ۱۰ دقیقه ثابت ماند و زمان کل آنالیز ۲۵ دقیقه به طول انجامید. دمای محل تزریق و شناساگر به ترتیب ۲۷۰°C و ۲۸۰°C تنظیم شد. از یونیزاسیون شعله‌ای (میزان شارژ هیدروژن و هوا به ترتیب ۰/۷ و ۰/۴ کیلوگرم بر سانتی‌متر مکعب) به عنوان شناساگر و نیتروژن (با میزان ۶۰ میلی‌لیتر در دقیقه) به عنوان گاز حامل استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد و کلیه تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون Student's T-test در سطح خطای ۰/۰۵ انجام گردید.

ترکیبات فنولی کل مورد استفاده قرار گرفت. سپس به یک میلی‌لیتر عصاره آماده شده یک میلی‌لیتر معرف فولین (Fulin-Denis) و دو میلی‌لیتر معرف کربنات سدیم اشباع افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه جذب محلول‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Singleton & Rossi 1956).

استخراج و سنجش ترکیبات فلاونوئیدی

مقدار یک گرم از پودر نمونه توسط روش الکلی با استفاده از متانول مطلق استخراج شد. ابتدا عصاره‌های متانولی با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و سپس تبخیر گردید؛ و با حل نمودن دوباره در متانول در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس به دو میلی‌لیتر از عصاره ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و پس از ۳۰ دقیقه جذب محلول‌ها در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Chang et al. 2002).

بررسی کیفی ترکیبات فنولی با استفاده از GLC

برای استخراج ترکیبات فنولی، ۰/۵ گرم ماده خشک گیاهی توسط چهار میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ عصاره‌گیری شد. عمل عصاره‌گیری سه بار تکرار شد و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید. سپس مجموعه روش‌ها در هوای آزاد تبخیر شد. باقی مانده حاصل از تبخیر در ته ظرف با ۷ میلی‌لیتر استونیتریل شستشو و در قیف دکانتور ریخته شد، سپس ۵ میلی‌لیتر آن-هگزان به آن اضافه گردید. بعد از مدتی دو فاز تشکیل شد که فاز فوقانی حاوی ناخالصی‌های فنولی مانند تری گلیسریدها در هگزان خارج و فاز تحتانی که حاوی

نتایج

حضور فیتوپاسما در گیاهان آلوده با آزمون PCR اثبات شد (شکل ۱). نتایج مربوط به محتوای کربوهیدرات‌ها، آنزیم PAL، پلی فنولها و فلاونوئیدها به کمک آزمون T جامع مستقل (independent sample test) در گیاه سالم و آلوده در دو مرحله از نمونه‌برداری، ۱۲ و ۱۶ هفته بعد از مایه‌زنی، آنالیز و در جدول ۱ ذکر شده است.

نتایج نشان داد که آلودگی فیتوپلاسمای همراه با جاروک لیموترش باعث کاهش محتوای پارامترهای سنجیده شده در گیاه آلوده لیمو ترش در مقایسه با گیاه سالم شد. به طوری که در نمونه‌برداری مرحله اول (۱۲ هفته بعد از مایه‌زنی) محتوای کربوهیدرات‌ها کاهش ۳۱٪، آنزیم PAL، ۴۰٪، پلی فنول‌ها، ۸٪ و فلاونوئیدها، ۳۲٪، را نشان داد. هم‌چنین نتایج مشابهی از کاهش برای این پارامترها در نمونه‌برداری مرحله دوم (۱۶ هفته بعد از مایه‌زنی) نیز مشاهده شد.

بررسی کیفی ترکیبات فنولی با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی صورت گرفت. درصد ترکیبات فنولی شناخته شده و شناخته نشده (*) مربوط به گیاه سالم و آلوده در دو مرحله نمونه‌برداری (هفته‌های ۱۲ و ۱۶ پس از مایه‌زنی) مشخص گردید (جدول ۲). در این مطالعه از هشت ترکیب فنولی استاندارد استفاده شد در حالی که برخی پیک‌های اصلی در کروماتوگرام نمونه سالم و آلوده با هیچ یک از استانداردها مطابقت نداشت (شکل ۲، A و B). نتایج به دست آمده نشان داد که آلودگی فیتوپلاسمای همراه با جاروک لیموترش برخی از ترکیبات فنولی را افزایش و برخی را کاهش می‌دهد. مقدار ترکیبات 1* به میزان ۰/۰۲، بنزوئیک اسید ۰/۲۲، سیرینژیک اسید ۰/۵۳، فرولیک اسید ۰/۰۳ و کافئیک

اسید ۰/۰۵ درصد در نمونه‌برداری مرحله اول در گیاه آلوده کاهش یافته بود. در صورتی که کوماریک اسید ۰/۰۲، گالیک اسید ۰/۰۴، نارینژین ۰/۱۲، پیک‌های ناشناخته ۰/۱۱*۲ و ۰/۹۵*۳ درصد افزایش یافته است. پیک سینامیک اسید در هر دو مرحله از نمونه‌برداری در هیچ‌کدام از عصاره‌های سالم و آلوده مشاهده نشد.

هم‌چنین در نمونه‌برداری مرحله دوم محتوای بنزوئیک اسید، فرولیک اسید، ترکیب ناشناخته 3* افزایش و کافئیک اسید، کوماریک اسید، گالیک اسید، سیرینژیک اسید، 2* و 1* کاهش نشان داد. بقیه پیک‌های موجود در دو نمونه به دلیل نزدیکی میزان ترکیبات فنولی شان در این پژوهش مورد ارزیابی قرار نگرفتند. به طور کلی بررسی ترکیبات فنولی به کمک GLC، در نمونه‌برداری ۱۲ و ۱۶ هفته بعد از مایه‌زنی به ترتیب کاهش ۰/۰۵ و ۰/۲۰ در صدی این ترکیبات را در نمونه آلوده به فیتوپلاسمای همراه با جاروک لیموترش نشان داد (جدول ۲).

برای بررسی وجود ارتباط بین گذشت زمان و درصد ترکیبات، داده‌های این مطالعه با استفاده از آزمون T زوج (Paired Samples Statistics) آنالیز شد. با بررسی تغییرات بین زمان و سطح ترکیبات مورد بررسی به کمک این آزمون می‌توان اشاره کرد که ضریب هم‌بستگی معنی‌داری بین زمان و سطح ترکیبات وجود دارد به گونه‌ای که میزان آنها با گذشت زمان ممکن است تغییر کند. به طور مثال در گیاهان لیموترش بدون در نظر گرفتن سالم و یا آلوده بودن آنها سطح آنزیم PAL در مرحله دوم نسبت به مرحله اول کاهش معنی دار ۰/۰۱۶ درصدی را نشان داد. این ارتباط معنی دار بین زمان و تغییر سطح سایر ترکیبات نیز دیده شد.

جدول ۱. مقایسه مقدار کربوهیدرات‌ها، PAL، پلی فنل‌ها و فلاونوئیدها در برگ‌های لیموترش شاهد و آلوده به فیتوپلاسمای جاروک، ۱۲ و ۱۶ هفته بعد از مایه‌زنی؛ اعداد میانگین سه تکرار می‌باشند.

Table 1. Comparison of contents of carbohydrates, PAL, polyphenols and flavonoids in the control and phytoplasma-infected lime leaves, 12 and 16 weeks after inoculation; Means \pm SE of three replicates of each experiment.

(Compounds)	ترکیبات	Content in tissues		مقدار در بافت های گیاهی	
		(Control)	شاهد	(Infected)	آلوده
		۱۲ هفته (12 weeks)	۱۶ هفته (16 weeks)	۱۲ هفته (12 weeks)	۱۶ هفته (16 weeks)
کربوهیدرات‌ها [g 100g ⁻¹ (d.m.) خشک]	(Carbohydrates)	8.11 \pm 0.18	8.56 \pm 0.06	5.64 \pm 0.27	4.69 \pm 0.15
PAL آنزیم [μ mol CA min ⁻¹ میکرو مول سینامیک اسید در دقیقه]		1.65 \pm 0.08	1.92 \pm 0.10	0.98 \pm 0.13	0.66 \pm 0.07
پلی فنل‌ها [mg 100g ⁻¹ (d.m.) خشک]	(Polyphenols)	0.81 \pm 0.01	0.84 \pm 0.01	0.74 \pm 0.00	0.69 \pm 0.01
فلاونوئیدها [g 100g ⁻¹ (d.m.)]	(Flavonoids)	4.97 \pm 0.11	5.15 \pm 0.00	3.36 \pm 0.04	3.20 \pm 0.03

بحث

می‌یابد (Keninget al. 1995). از آنجا که کربوهیدرات‌ها به عنوان پیش ماده‌های مسیر سنتز ترکیبات فنولی در تنش‌های زیستی و غیر زیستی دچار تغییر می‌شوند بررسی محتوای آنها در این پژوهش مورد توجه قرار گرفت. نتایج ارائه شده کاهش معنی‌دار محتوای کربوهیدرات‌ها را در گیاهان آلوده نشان داد که می‌توان آن را یکی از دلایل کاهش ترکیبات فنولی دانست. از آنجا که فیتوپلاسمای زردی کشنده نارگیل محدود به آوند آبکشی است به نظر می‌رسد که فیتوپلاسمای با ممانعت از انتقال کربوهیدرات‌ها، از طریق انسداد آوند آبکشی و استفاده از آنها به عنوان منبعی برای تغذیه باعث کاهش کربوهیدرات‌ها می‌شود (Maustet al. 2003).

وقتی گیاهان به وسیله میکروارگانیسم مورد تهاجم قرار می‌گیرند و یا به وسیله جراحات مکانیکی صدمه می‌بینند،

گیاهان برای نشان دادن عکس العمل موثر به حمله باکتری‌ها و قارچ‌ها به سرعت حضور عامل بیماریزا را تشخیص می‌دهند و سپس به سرعت تولید فیتوالکسین را آغاز می‌کنند. از جمله این فیتوالکسین‌ها ترکیبات فنولی می‌باشد که به عنوان مواد دفاعی ضد قارچ و باکتری عمل می‌کنند و ساخت آنها بلافاصله پس از آلودگی با عوامل بیماری‌زا صورت می‌گیرد. ترکیبات فنولی به روش‌های متفاوتی ساخته می‌شوند اما در ساخت اکثر آنها مسیر شیکیمیک اسید سهم بیشتری دارد (Mustafa&Verpoorte 2007). این مسیر از کربوهیدرات‌های ساده شروع و به سمت تولید آمینواسیدهای آروماتیک چون فنیل آلانین و تیروزین ادامه

جدول ۲. میزان ترکیبات فنولی در برگ‌های لیموترش شاهد و آلوده به فیتوپلاسمای جاروک، ۱۲ و ۱۶ هفته بعد از مایه‌زنی. میزان به صورت درصد محتوای ترکیبات فنولی کل بیان شده است. RT= زمان بازداری؛ *1، *2، *3= ترکیبات شناخته نشده

Table 2. Concentration of phenolic compounds in control and phytoplasma-infected lime leaves, 12 and 16 weeks after inoculation. Concentration is expressed as percentage of total phenolic compounds (GLC %). RT= retention time; *1, *2, *3= unknown compounds

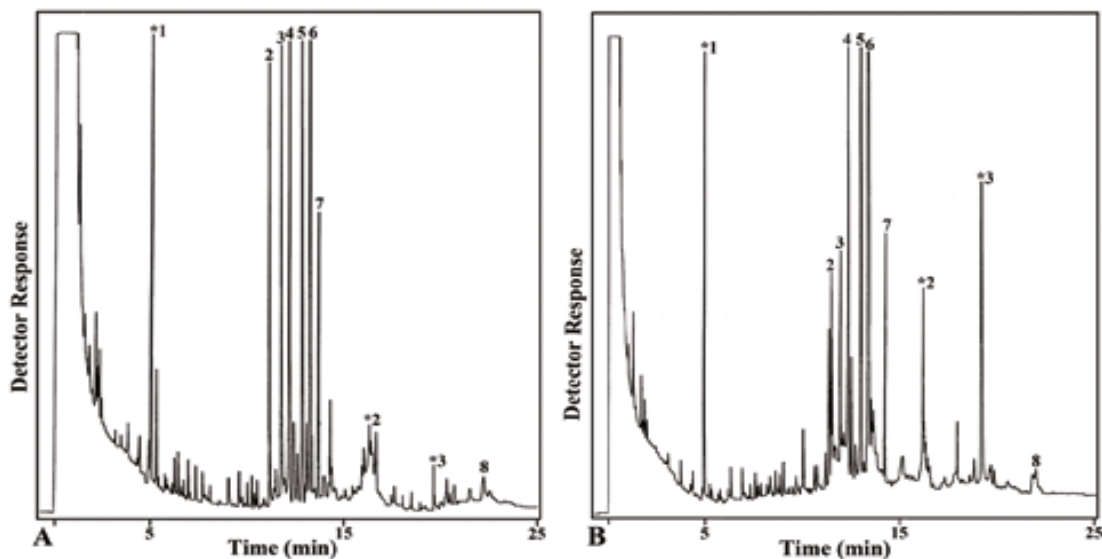
RT (min) زمان بازداری	Phenolic compound ترکیبات فنولی	Concentration غلظت			
		Control		Infected	
		12 weeks	16 weeks	12 weeks	16 weeks
5.00	*1	3.28	5.13	3.06	3.65
8.23	Cinnamic acid	—	—	—	—
11.99	Benzoic acid	2.96	2.46	2.28	2.53
12.77	Syringic acid	4.63	4.82	2.13	2.33
13.50	Coumaric acid	4.35	4.43	4.47	4.38
13.74	Gallic acid	4.88	5.01	5.11	2.30
15.01	Ferulic acid	5.41	5.14	5.24	5.61
15.39	Caffeic acid	2.72	2.96	2.57	2.08
16.3	*2	1.94	2.14	2.17	1.63
19.24	*3	1.61	2.19	3.15	3.42
22.44	Naringenin	0.49	1.07	0.55	—
ترکیبات کل (Total compound)					
[mg 100g ⁻¹ (d.m.) میلی گرم در صد گرم وزن خشک]		32.72	35.45	30.73	27.93

***1, *2, *3: Retention Times(RT)**

گیاهان تعمیم داد. از نتایج مطالعات مختلف می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت مسیرهای ترکیبات ثانویه در گیاهان مختلف قسمتی از یک شبکه پیچیده می‌باشد که توسط ترکیبی از عوامل مختلف تنظیم می‌شود (Mustafa & Verpoorte 2007).

نتایج به دست آمده در این مطالعه حاکی از کاهش محتوای آنزیم PAL، ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدها در نمونه آلوده نسبت به نمونه سالم است. بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنولی به وسیله GLC کاهش مقدار این

تغییرات مهم فیزیولوژیکی القا و عموماً آنزیم‌های دفاعی گیاه فعال می‌شوند. یکی از این آنزیم‌ها فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) می‌باشد که آنزیم اصلی مسیر سنتز ترکیبات فنولی است. مطالعات زیادی افزایش ترکیبات فنولی را در تنش‌های زیستی و غیر زیستی گزارش کرده‌اند (Sanchez Ballestaet al 2000, Mustafa & Verpoorte 2007). ولی از آنجا که انواع مختلف تنش‌ها آثار مختلفی بر مسیرهای متابولیتی بر جای می‌گذارند، نمی‌توان افزایش این ترکیبات را به همه انواع تنش‌ها و



شکل ۲. کروماتوگرام GLC عصاره فنولی (مشتق شده) برگ‌های لیمو ترش کنترل و آلوده به فیتوپلاسمای (به ترتیب A و B): *1, *2, *3= ناشناخته، 2= بنزوئیک اسید 3= سیرینژیک اسید، 4= کوماریک اسید، 5= گالیک اسید، 6= فرولیک اسید، 7= کافئیک اسید، 8= نارینژین

Fig. 2. Two representative GLC chromatograms of phenolic extracts (derivatized) of control and phytoplasma-infected lime leaves (respectively A, B); *1, *2, *3= unknown, 2= benzoic acid, 3= syringic acid, 4= coumaric acid, 5= gallic acid, 6= ferulic acid, 7= caffeic acid, 8= naringenin

افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در پاسخ به آلودگی لیمو ترش آلوده به فیتوپلاسمای باشد (Zafari 2009). احتمالاً یکی از دلایل کاهش متابولیت‌های ثانویه نیازهای گیاه به انرژی (Bednareket *et al.* 2003) و فقر ژنهای کد کننده ATP سنتتاز فیتوپلاسمای (Christensen *et al.* 2005) در زمان آلودگی می‌باشد که انرژی حاصل از تجزیه شدن این متابولیت‌ها در شرایط تنش به مصرف گیاه آلوده و عامل بیماری‌زا می‌رسد.

مطالعات قبلی نشان داده است که برای دفاع موفقیت آمیز، بیوستز سریع ترکیبات فنولی منشا گرفته از فنیل آلانین مورد نیاز می‌باشد (Mikulićpetlovšek *et al.* 2009). به طوری که گزارش شده است که تجمع سریع این ترکیبات در محل آلودگی رشد عامل بیماری‌زای قارچی را محدود کرده است. در بعضی از گیاهان آلوده شده با بیمارگر فعالیت PAL در طول بیماری، بسته به نوع گیاه و

ترکیبات را در نمونه آلوده نشان داد. این کاهش در نمونه‌برداری مرحله دوم (۱۶ هفته بعد از مایه‌زنی) چشمگیرتر از نمونه‌برداری مرحله اول (۱۲ هفته بعد از مایه‌زنی) می‌باشد. در این پژوهش بر خلاف گزارش‌های متعدد در مورد افزایش ترکیبات فنولی در شرایط تنش زا (Musettiet *al.* 2009)، یک روند کاهش در محتوای فلاونوئیدها مشاهده شده است که چنین کاهش معنی‌داری می‌تواند دلالت بر تغییر متابولیسم ثانویه بافت‌های درگیر با آلودگی فیتوپلاسمای داشته باشد. هم‌چنین گزارش شده است که هیچ‌گونه تغییری در محتوای ترکیبات فنولی گیاه *Catharanthus roseus* آلوده به فیتوپلاسمای مشاهده نشده است (Musettiet *al.* 2000). پراکسیدازها برای انجام عمل خود و تجزیه H_2O_2 به گهرمایه‌هایی مانند ترکیبات فنولی نیاز داشته و آنها را اکسیده می‌کنند. بنابراین کاهش محتوای ترکیبات فنولی در طی تنش می‌تواند مربوط به

سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشکده مهندسی وابسته به وزارت جهاد کشاورزی به خاطر تأمین قسمتی از اعتبار مالی این پروژه و نیز تهیه گیاهان لیموترش آلوده به *CandidatusPhytoplasmaaurantifolia*، سپاسگزاری می‌شود. هم‌چنین نویسندگان از حمایت مالی دانشکده علوم دانشگاه تهران صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (29-31) متن انگلیسی مراجعه شود.

بیمارگر، کاهش می‌یابد که احتمالاً به دلیل هجوم بیمارگر در گیاه، تکثیر سریع آن و ایجاد بیماری می‌باشد. از آنجا که آنالیز داده‌ها به کمک آزمون T به این نکته اشاره داشت که در نمونه سالم با گذشت زمان (فاصله زمانی بین دو نمونه برداری) ترکیبات فنولی افزایش و در نمونه بیمار کاهش می‌یابند، چنین به نظر می‌رسد که سرعت تکثیر عامل همراه با بیماری جاروک لیموترش از سرعت سنتز ترکیبات فنولی بیشتر است و نقش این ترکیبات در سازوکارهای دفاعی در مقابل تکثیر بی‌رویه فیتوپلازما ناتوان می‌ماند. با توجه به مطالعه حاضر و گزارش‌های بسیار مبنی بر پاسخ‌های مختلف ترکیبات فنولی به شرایط تنش‌زا بررسی تغییرات این فراورده‌ها در بازه‌های زمانی کوتاه‌تر جهت درک بهتر پیشنهاد می‌شود.