

بافت شناسی تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در تنش اکسیداتیو برهمکنش ژنوتیپ‌های به (*Cydonia oblonga* Mill.) با باکتری عامل بیماری آتشک

Histology of Reactive Oxygen Species Generation in Oxidative Burst of Interaction Between Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotypes with Causal Bacteria of Fire Blight Disease

فرشته خسروی نژاد^۱ و حمید عبداللهی^{۲*}

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.

۲- دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۲

چکیده

خسروی نژاد، ف. و عبداللهی، ح. ۱۴۰۲. بافت شناسی تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در تنش اکسیداتیو برهمکنش ژنوتیپ‌های به (*Cydonia oblonga* Mill.) با باکتری عامل بیماری آتشک. نهال و بذر ۳۹: ۲۷-۴۹

بیماری آتشک (Fire Blight)، مهمترین عامل محدودکننده کشت و پرورش درخت به محسوب می‌شود. پژوهش حاضر به منظور شناسایی و مقایسه سازکارهای تحمل به بیماری آتشک و همچنین پاسخ‌های مرتبط در سطح تنش اکسیداتیو در ارقام و ژنوتیپ‌های این درخت انجام شد. ژنوتیپ‌های درخت به شامل KVD4، NB2، PH2 و KVD3 همراه با پایه کوئینس C در شرایط درون شیشه با سویه تیپ Ea273 باکتری *Erwinia amylovora* تلقیح و ضمن مقایسه پیشرفت نکروز، در سه آزمایش مجزا، تولید سه گونه فعال اکسیژن، شامل رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، گونه فعال پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) در شاخه‌چه‌های شاهد و آلوده شده، بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده سه نوع پاسخ تنش اکسیداتیو در ژنوتیپ‌ها و ارقام بود. در ژنوتیپ NB2 و Quince C، با سطح تحمل بالاتر به بیماری، افزایش سریع‌تر سوپراکسید، تاخیر در تولید پراکسید هیدروژن و افزایش سریع‌تر هیدروکسیل مشاهده شد. همچنین ژنوتیپ KVD4، سطح حساسیت متوسط و حد متوسطی از نظر میزان تولید سه گونه فعال اکسیژن نشان داد. در گروه سوم، ژنوتیپ‌های حساس‌تر PH2 و KVD3، ضمن پیشرفت سریع نکروز، تولید کم سوپراکسید، افزایش سریع‌تر پراکسید هیدروژن و سپس سرعت کمتر افزایش هیدروکسیل را بروز دادند. چنین به نظر می‌رسد که واکنش دفاعی درخت به در مقابل عامل بیماری آتشک بر خلاف درخت گلایی که به صورت تجمع گونه فعال اکسیژن پراکسید هیدروژن صورت می‌گیرد، کاملاً متمایز از این گونه می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: گلایی، درون شیشه، نکروز، رادیکال اکسیژن، سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، هیدروکسیل.

مقدمه

درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) بومی مناطق قفقاز تا تالش در شمال غرب ایران است و ژنوتیپ‌ها و ارقام فراوانی از این درخت در مراکز تنوع این درخت در آسیای مرکزی، مناطق مختلف ایران، شرق اروپا، آسیای صغیر و کشورهای حاشیه دریای مدیترانه گسترش دارد (Bell and Leitão, 2011; Abdollahi, 2019). با توجه به تنوع گسترده ارقام و ژنوتیپ‌های بومی و وحشی درخت به، کشور ایران از گذشته به عنوان یکی از تولیدکنندگان عمده این محصول در جهان محسوب می‌شود، به صورتی که بر اساس آمار سازمان خوار و بار جهانی (FAO) در سال ۲۰۱۷، ایران با تولید بیش از ۸۲ هزار تن میوه به، پس از کشورهای ازبکستان، چین و ترکیه، بیش‌ترین تولید جهانی این محصول را به خود اختصاص داد (FAO, 2021).

بر اساس اطلاعات ارائه شده در آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی ایران در سال ۱۴۰۰، سطح زیر کشت درخت به در کشور حدود ۱۲ هزار هکتار و میزان تولید به حدود ۱۱۰ هزار تن افزایش یافته است و عملکرد حدود ۱۰ تن در هکتار از سطح این باغ‌ها استحصال شد (Anonymous, 2021). مقایسه آمار سطح زیر کشت، تولید کل و عملکرد باغ‌های به در کشور طی ده سال گذشته، نشان‌دهنده توسعه حدود ۳۰۰۰ هکتار باغ‌های این محصول طی سال‌های

اخیر در مناطق معتدله استان‌های جنوبی تر نظیر استان کرمان و فارس و همچنین استان‌های اصفهان، یزد و بخشی از استان کردستان است. رقم عمده تجاری درخت به در حال حاضر به اصفهان است که طی یک دهه اخیر دو رقم ویدوجا و اصفهان نیز معرفی و خصوصاً رقم اول در سطح گسترده‌تری در قالب باغ‌های الگوئی در اختیار تولیدکنندگان قرار گرفته است (Abdollahi, 2023).

بررسی مشکلات و معضلات گریبانگیر باغ‌ها و درختان به، خصوصاً در نیمه شمالی کشور و در مناطقی که دوره شکوفه‌دهی و رشد سرشاخه‌های بهاره این درخت با هوای نسبتاً ملایم و مرطوب بهاره مصادف می‌شود، نشان‌دهنده خسارت بسیار شدید و قابل توجه بیماری آتشک روی ارقام و ژنوتیپ‌های این درخت می‌باشد (Abdollahi, 2017). به صورتی که در حال حاضر، بیماری آتشک با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora*، نه تنها به عنوان معضل اصلی کشت و پرورش درخت به در کشور مطرح است، بلکه این درخت در زمره حساس‌ترین میزبان‌های این باکتری به عامل بیماری آتشک محسوب می‌شود (Mehrabipour et al., 2012; Maroofi and Mostafavi, 1996; Abdollahi, 2017).

بررسی‌های اخیر در ایران نشان داده اند که با توجه به شدت بیماری آتشک روی درختان به، این بیماری سبب نابودی باغ‌های یکدست این درخت در مناطقی از خراسان رضوی و اصفهان

اکسیژن و تنش اکسیداتیو، یکی از اولین تغییرات بیوشیمیایی قابل مشاهده در سطح بیوشیمیایی در پی حمله عامل بیماری آتشک به بافت‌های میزبان است (Venisse *et al.*, 2002). این تنش اکسیداتیو، سبب ایجاد آبگریزی و نکروز بافت‌ها شده و میزبان‌های مختلف و همچنین ژنوتیپ‌ها و ارقام متحمل و یا مقاوم، با تنظیم سطوح مختلف سه گونه اصلی اکسیژن فعال شامل H_2O_2 ، O_2^- و OH^- ، میزان حساسیت و یا مقاومت را با تنظیم شدت تولید رادیکال‌های فوق و جلوگیری از تولید زیاد رادیکال‌های خطرناک‌تر، تعیین می‌کنند (Abdollahi *et al.*, 2015; Azarabadi *et al.*, 2016).

علی‌رغم شناخت نسبی موجود در رابطه با ارتباط تولید سه گونه اصلی اکسیژن فعال با مقاومت به بیماری آتشک در سیب و گلابی و سازکار متفاوت آنها در دو گونه فوق‌الذکر، شناخت کافی در رابطه با سازکار مقاومت به بیماری آتشک در گونه درخت به، وجود ندارد. بنابراین، هدف اصلی این پژوهش ارزیابی شدت حساسیت بافت‌های درون شیشه ژنوتیپ‌های درخت به نسبت به بیماری آتشک و بررسی مقایسه‌ای واکنش‌های اکسیداتیو این ژنوتیپ‌ها به حمله باکتری عامل بیماری (*Erwinia amylovora*) در رابطه با گونه‌های اصلی فعال اکسیژن بود.

شده است (Abdollahi, 2021) و در حال حاضر یکی از مهم‌ترین راهبردهای اصلاح و تولید ارقام جدید درخت به بر پایه گزینش برای تحمل به این بیماری در ایران و دیگر کشورهای تولید کننده این محصول، نظیر ترکیه می‌باشد (Abdollahi, 2019; Şahin *et al.*, 2020).

اولین برنامه ارزیابی مقاومت به بیماری آتشک در درخت به، توسط معروفی و مصطفوی (Maroofi and Mostafavi, 1996) انجام شد. پس از آن در پی شناسایی ژنوتیپ‌های به اصفهان (Razavi *et al.*, 1999) و سپس جمع‌آوری و احداث اولین کلکسیون به کشور توسط عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al.*, 2013)، کلیه ارقام و پایه‌های جمع‌آوری شده این درخت در شرایط گلخانه و باغ مورد ارزیابی برای مقاومت به بیماری آتشک قرار گرفت (Mehrabipour *et al.*, 2012).

در بررسی‌های انجام گرفته در زمینه مقایسه سه میزبان اصلی بیماری آتشک، شامل درختان سیب، گلابی و به، گونه به (*C. oblonga* Mill.) بیش از سایر میزبان‌ها به بیماری آتشک حساسیت نشان داده است و پیدا کردن منابع مقاومت در این گونه، برای تحمل به بیماری آتشک بسیار دشوار به نظر می‌رسد. از سوئی شناسایی و مقایسه سازکار حساسیت و یا تحمل به بیماری آتشک در گونه‌های سیب و گلابی نشان داده است که تولید گونه‌های فعال

مواد و روش‌ها

استقرار درون شیشه مواد گیاهی

این پژوهش بر روی پنج ژنوتیپ و رقم درخت به (*C. oblonga* Mill.)، شامل ژنوتیپ‌های بومی PH2، NB2، KVD4 و KVD3 در کنار پایه کوئینس C (Quince C) در سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ در پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی در کرج انجام شد. به منظور تکرار پذیری آزمایشات و استفاده از یک سامانه استاندارد و با توجه به اینکه در شرایط گلدانی در هر سال تنها یک مرتبه امکان آلوده‌سازی مواد گیاهی وجود دارد، از سامانه درون شیشه برای آزمایشات استفاده به عمل آمد.

ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد استفاده، به وسیله کشت مرستم، در محیط درون شیشه مستقر و به این منظور، شاخه‌های فصل رشد جاری از درختان بالغ برداشت و به آزمایشگاه منتقل شدند. قطعات تک‌جوانه‌ای شاخه‌ها، یک مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و سپس با استفاده از محلول ضد عفونی حاوی دو ماده وایتکس تجاری ۱۲ درصد و کلور جیوه ۰/۳۵ گرم در لیتر، تحت شرایط خلاء به مدت پنج دقیقه ضد عفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. گنبد مرستمی جوانه‌ها با ابعاد تقریبی ۰/۲ تا ۰/۵ میلی‌متر در شرایط استریل جدا شدند و به ظروف کشت حاوی محیط استقرار دربردارنده محیط پایه QL

(Leblay *et al.*, 1991)، یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA، تا ظهور اولین ریزشاخه‌ها، تحت شرایط دوره روشنایی ۱۶ ساعت نور، ایجاد شده توسط لامپ‌های فلئورسنت سفید با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه، و دمای شبانه‌روز ۲۳ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از ظهور اولین ریزشاخه‌ها، تست عدم آلودگی باکتریایی ریزنمونه‌ها با استفاده از نمونه‌برداری و کشت نمونه‌ها در ۵۰ میلی‌لیتر محیط باکتریایی LB مایع انجام و عدم آلودگی کشت‌ها، با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد.

به منظور تکثیر درون شیشه ای مواد گیاهی مورد نظر، محیط کشت حاوی QL تغییر یافته (Leblay *et al.*, 1991) شامل ۶/۴ میلی‌مول کلسیم، ۷/۵ میلی‌مول آمونیوم و ۳۷/۶ میلی‌مول نیترات، با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BAP و نیم میلی‌گرم در لیتر 2IP، سه درصد ساکارز و ۰/۶ درصد آگار، همراه با معرف pH گرینوبروموکروزول (GBC)، به مقدار یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، جهت مشخص شدن علائم بروز بیماری و کاهش pH محیط کشت در دمای ۱۲۰ درجه و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو استریل و تهیه شد. اسیدیته محیط‌ها قبل از افزودن آگار، در حد ۵/۷ تنظیم شد. قطعات گره‌ای مورد مطالعه به وسیله کشت ساقه‌چه، به این محیط‌ها منتقل شدند. سپس در اتاق رشد با دوره

رادیکال هیدروکسیل (OH⁻) در شاخه‌چه‌های در سه آزمایش مجزا و در بردارنده کلیه رقم‌ها و ژنوتیپ‌ها، تولید سه گونه فعال اکسیژن مورد نظر، ارزیابی شد. در بررسی روند تولید رادیکال سوپراکسید، ریزنمونه‌های شاهد و آلوده‌سازی شده با باکتری عامل بیماری، در فواصل ۲۴ ساعت یکبار تهیه شد و با استفاده از اسکالپل به پنج قسمت نیم‌سانتی‌متری تقسیم و به صورت مستقل و شماره‌گذاری شده در میکروتیوپ‌های حاوی یک میلی‌لیتر محلول ۰/۰۵ درصد نیترو بلوترازولیوم (NBT)، همراه با بافر فسفات (pH=7) و ۰/۰۲ تریس، به مدت ۱۵ دقیقه برای نفوذ معرف، تحت تاثیر خلاء قرار داده شدند.

هر بررسی در هر مقطع زمانی در پنج تکرار انجام شد و تا زمان ظهور کامل رادیکال سوپراکسید در طول کل شاخه‌چه‌های درون شیشه با بیشترین شدت، ادامه پیدا کرد. بر این اساس در هر مرحله تعداد ۲۵ شاخه‌چه و در هر آزمایش مستقل بیش از ۲۵۰ شاخه‌چه درون شیشه، به صورت تخریبی نمونه‌برداری شد. شدت تولید هر یک از گونه‌های فعال اکسیژن، بر اساس شدت رنگ و به صورت دستورالعمل آذرآبادی و همکاران (Azarabadi et al., 2016)، به صورت صفر (فاقد هر گونه رد تولید گونه فعال اکسیژن مد نظر) تا پنج (بیشترین شدت تولید گونه فعال اکسیژن مد نظر) مشخص و یادداشت‌برداری شد (شکل ۱).

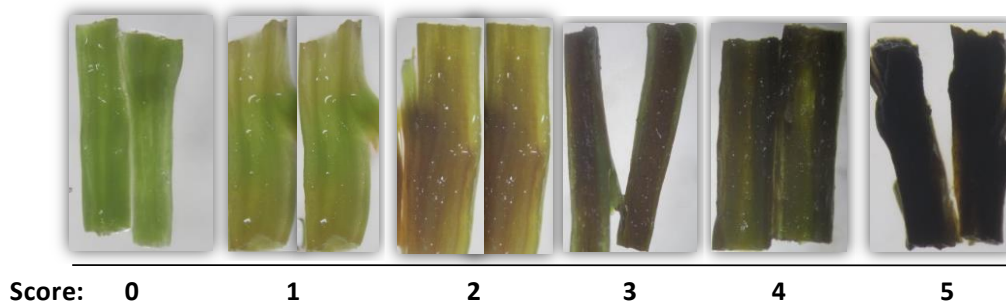
روشنایی ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و دمای شبانه روزی ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تزریق عامل بیماری و مقایسه مقاومت

به منظور ارزیابی مقاومت به عامل بیماری آتشک، کشت‌های شبگذران، جدایه تیپ Ea273 باکتری *E. amylovora* در محیط عمومی لوریا- برتانی (LB)، با کدورت (OD) حدود دو در طول موج ۶۰۰ نانومتر، رسوب داده شد و با حجم معادل بافر فسفات (pH=7) رقیق شدند. غلظت بهینه مایه تلقیح باکتری *E. amylovora* بر اساس گزارش مقدماتی عبداللهی (Abdollahi, 2003)، تعیین شده بود که در آن حداقل احتمال فرار از بیماری در سرشاخه‌ها مشاهده می‌شود. آلوده‌سازی سرشاخه‌های درون شیشه با اضافه کردن ۷۵ میکرولیتر مایه تلقیح به هر لوله آزمایش انجام و بلافاصله ریزنمونه‌ها به اتاق کشت انتقال داده شدند. ارزیابی مقاومت به بیماری با استفاده از شاخص سرعت پیشرفت نکرود بیماری انجام شد. در نمونه‌های شاهد، شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام و ژنوتیپ‌ها صرفاً با آب مقطر استریل تیمار شدند.

تولید گونه‌های فعال اکسیژن

به منظور ردیابی و بررسی تولید سه گونه فعال اکسیژن، شامل رادیکال سوپراکسید (O₂⁻)، گونه فعال پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و



شکل ۱- شاخص تغییر رنگ از صفر (فاقد هر گونه رد تولید گونه فعال اکسیژن مد نظر) تا پنج (بیشترین شدت تولید گونه فعال اکسیژن مد نظر) برای بررسی ظهور و شدت تولید سه گونه فعال اکسیژن، شامل رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، گونه فعال پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) در شاخه‌چه‌های درون شیشه میزبان‌های بیماری آتشک شامل سیب، گلابی و به، بر اساس روش آذرآبادی و همکاران (Azarabadi *et al.*, 2016)

Fig. 1. Color index from 0 (without any trace of active oxygen species) to 5 (the highest severity of active oxygen species), used for evaluation of the first appearance and progress of three reactive oxygen species, superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl (OH^-) in the *in vitro* shootlets of fire blight hosts, including apple, pear and quince, following Azarabadi *et al.*, (2016)

تولید H_2O_2 مشاهده و یادداشت‌برداری شد.

بررسی میزان و روند تولید رادیکال OH^- ، در شاخه‌چه‌های درون شیشه ژنوتیپ‌های به، نیز پس از آلوده‌سازی در مقاطع زمانی ۲۴ ساعته همانند آزمایش‌های قبل انجام شد. بر این اساس شاخه‌چه‌ها، به وسیله اسکالپل به پنج قسمت نیم‌ساعتی متری تقسیم و در محلول، حاوی ۸/۵ میکرولیتر دی‌متیل سولفو کساید (DMSO)، همراه با ۱۰ ماکرولیت $EDTA-iron$ ، پنج میکرولیتر اسید آسکوربیک و ۱/۵ میکرولیتر بافر فسفات (pH=7)، به مدت ۱۵ دقیقه تحت تاثیر خلاء قرار داده شدند. سپس به هر میکروتیوپ

به منظور بررسی روند تولید H_2O_2 ، محلول مادری از ۱۰ میلی گرم پودر، دی‌آمینو بنزیدیل (DAB) همراه با نیم سی سی HCl ، ۹/۵ سی سی آب مقطر و ۰/۱٪ تریتون جهت نفوذپذیر بودن دی‌آمینو بنزیدیل، تهیه شد. همانند آزمون قبل، هر ریزنمونه به وسیله اسکالپل به پنج قسمت نیم‌ساعتی متری تقسیم و هر قطعه داخل یک میکروتیوپ حاوی یک میلی‌لیتر محلول معرف دی‌آمینو بنزیدیل قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری، سپس در زیر لوپ هر قسمت برش عمودی داده شد و ظهور و شدت

حاوی نمونه‌ها، مخلوطی از ۴۰ ماکرولیترا، اسیدتریکلورواستیک (TCA) و Nash اضافه شد و مجدد نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه تحت تاثیر خلاء قرار گرفتند. در پایان برش عمودی انجام و ظهور و شدت تولید رادیکال OH^- در هر رقم مشاهده و یادداشت‌برداری شد.

نتایج پژوهش براساس میزان شدت تیرگی ریزنمونه‌ها، از درجه یک تا پنج، درجه‌بندی و یادداشت‌برداری شد و داده‌های حاصل از ارزیابی در نرم‌افزار Excel ثبت گردید و پس از محاسبه خطای استاندارد، بر اساس نمودار ترسیم شده، مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

ظهور و پیشرفت نکروز

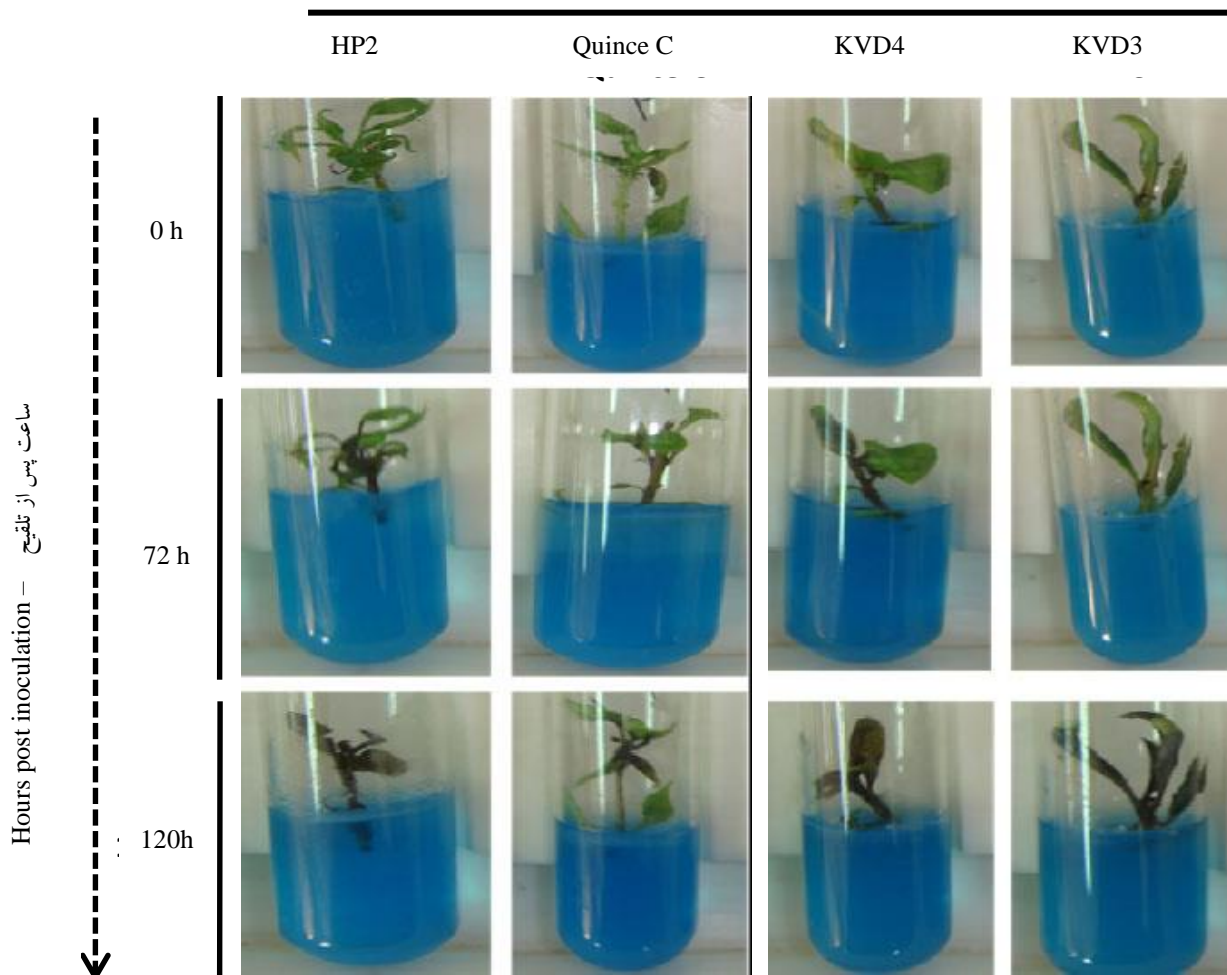
نتایج بیانگر موفقیت مایه‌زنی در بروز علائم بیماری آتشک در شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام و ژنوتیپ‌های به مورد بررسی بود (شکل ۲). به این ترتیب، اولین علائم به صورت آب‌گزیدگی و نکروز شدن بافت‌های ارقام و ژنوتیپ‌ها پس از حدود ۱۲ ساعت در ژنوتیپ PH2 و در سایر ارقام و ژنوتیپ‌ها پس از حدود ۲۴ ساعت شروع به ظاهر شدن کرد و با سرعت کم و بیش متفاوتی در شاخه‌چه‌ها به پیشرفت خود ادامه داد (شکل ۳). بر این اساس، در ژنوتیپ PH2 میزان بروز ۱۰۰٪ نکروز در حدود ۹۶ ساعت بعد از

آلوده‌سازی و در ژنوتیپ KVD4 حدود ۱۲۰ ساعت و در سایر ژنوتیپ‌ها و ارقام، در حدود ۱۴۴ ساعت اتفاق افتاد. همچنین در هیچیک از سرشاخه‌های آلوده‌شده، فرار از مایه‌زنی و عدم بروز علائم مشاهده نشد. همچنین در شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام و ژنوتیپ‌های شاهد، بروز آب‌گزیدگی و هیچگونه نکروز بافت بروز نکرد که بیانگر تاثیر صرف باکتری *E. amylovora* در ایجاد علائم نکروز در شاخه‌چه‌های آلوده شده بود.

مقایسه تطبیقی نتایج سرعت پیشرفت نکروز حاصل از باکتری عامل بیماری آتشک، در شاخه‌چه‌های درون شیشه دو میزبان سیب و گلابی، با سطح مقاومت مشاهده شده آنها در شرایط باغ و گلخانه، بیانگر همبستگی بالای سطح مقاومت در محیط‌های مختلف شامل محیط درون شیشه، گلخانه و باغ با یکدیگر بود (Abdollahi et al., 2015; Bell and van Der Zwet, 1987). این در حالی است که در مورد درخت به، شاخص‌های مختلف ارزیابی مقاومت به بیماری آتشک، در محیط باغ و گلخانه کارآئی نسبتاً متفاوتی داشته‌اند. بر این اساس، لازم است در جمع‌بندی نتایج حساسیت به بیماری آتشک در درخت به، از شاخص‌های گسترده‌تری برای جمع‌بندی نهائی استفاده کرد. لیکن در اینجا با توجه به اینکه صرفاً شاخه‌چه‌های درون شیشه و آبدار مورد استفاده قرار گرفته است، این بررسی صرفاً

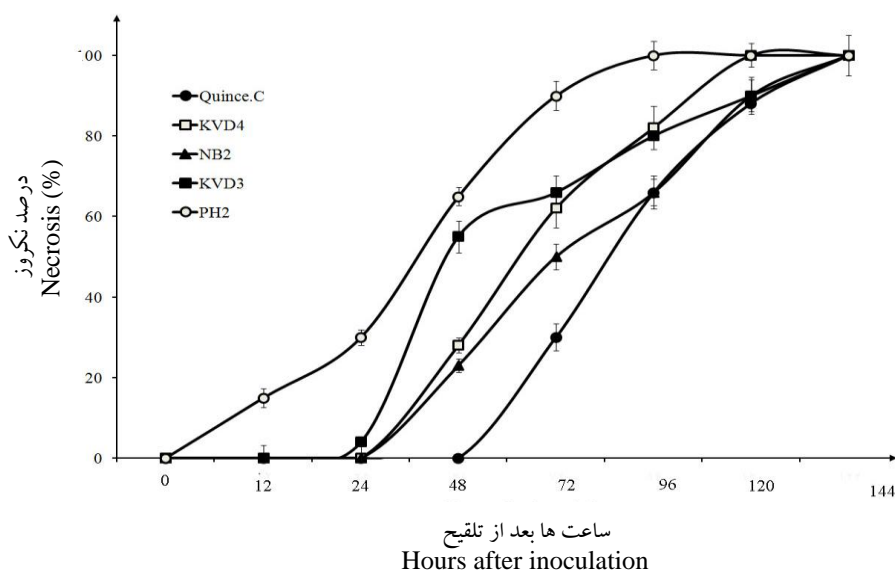
با هدف شناسائی و مقایسه ارتباط تولید گونه‌های فعال اکسیژن با سرعت پیشرفت نکروز مورد استفاده قرار گرفت.

ژنوتیپ‌های درخت به – Quince genotypes



شکل ۲- مقایسه سرعت پیشرفت نکروز در سرشاخه‌های ژنوتیپ‌های PH2 و KVD4 و KVD3 و پایه کوئینس C متعلق به گونه درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) در شرایط درون شیشه، از زمان صفر تا ۱۲۰ ساعت پس از آلوده‌سازی با سویه تیپ Ea273 باکتری *Erwinia amylovora*

Fig. 2. Comparison of necrosis progress in the *in vitro* shootlets of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes, PH2, KVD4 and KVD3 and Quince C rootstock, inoculated with *Erwinia amylovora* type-strain Ea273, from 0 to 120 hours post inoculation



شکل ۳- مقایسه سرعت پیشرفت نکروز در سرشاخه‌های ژنوتیپ‌های PH2، NB2، KVD4 و KVD3 و پایه کوئینس C متعلق به گونه درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) در شرایط درون شیشه، از زمان صفر تا ۱۲۰ ساعت پس از آلوده‌سازی با سویه تیپ Ea273 باکتری *Erwinia amylovora*. ارزش‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد می باشند

Fig. 3. Comparison of necrosis progress in the *in vitro* shootlets of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes PH2, NB2 and KVD4 and KVD3 and Quince C rootstock, inoculated with *Erwinia amylovora* type-strain Ea273, from 0 to 120 hours post-inoculation. The values are mean \pm standard error

بیانگر بیشترین میزان حضور این رادیکال در

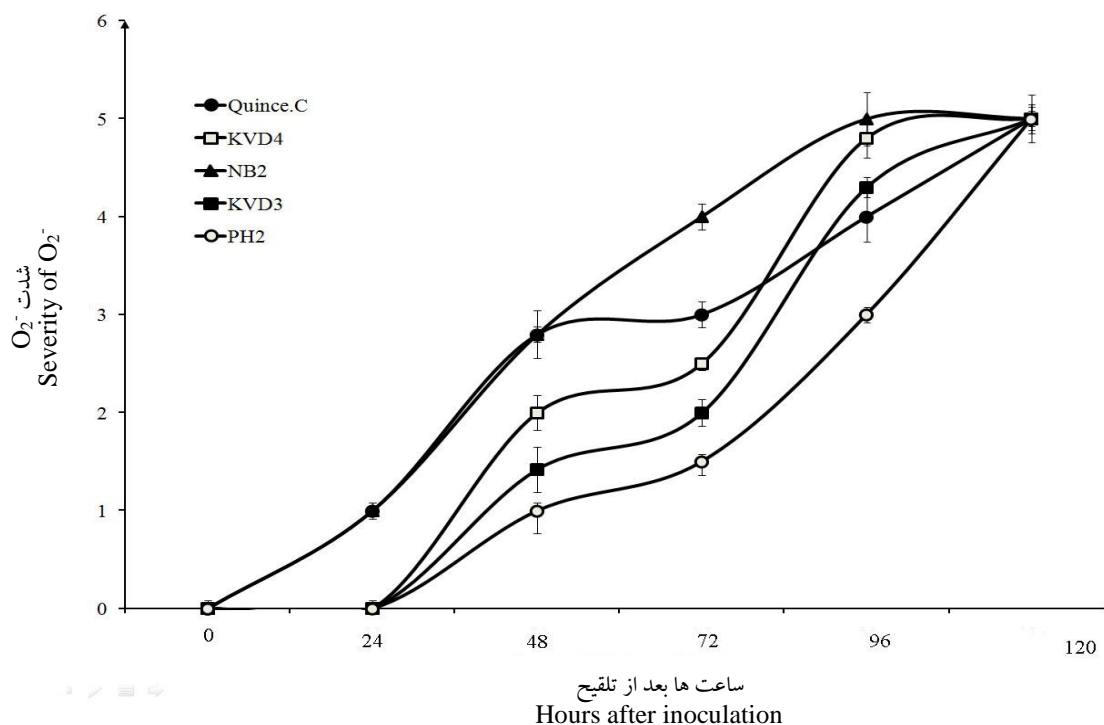
بافت‌های میزبان است، رسید (شکل ۴).

به طور کلی، رادیکال سوپراکسید در زنجیره تولید رادیکال‌ها و گونه‌های فعال اکسیژن تولیدی، در تنش‌های زیستی و از جمله تنش بیماری آتشک، اولین رادیکال تولید شده در نتیجه انتقال الکترون زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و یا میتوکندری، به مولکول اکسیژن است و گیاهان با سازکار دفاع ضد اکسایشی خود و در این مرحله، به صورت

رادیکال سوپراکسید (O_2^-)

نتایج نشان داد که تولید رادیکال سوپراکسید

(O_2^-)، در ژنوتیپ NB2 و پایه Quince C سریع‌تر آغاز و شدت یافته است (شکل ۴). از سوی دیگر در سه ژنوتیپ مورد بررسی شامل KVD3، KVD4 و PH2، اولین ظهور رادیکال سوپراکسید با حدود ۲۴ ساعت تاخیر در مقایسه با ژنوتیپ NB2 و پایه Quince C آغاز و در ژنوتیپ PH2 با کمترین سرعت و پس از گذشت ۱۲۰ ساعت، به شاخص نهائی پنج، که



شکل ۴- مقایسه ظهور و پیشرفت شدت رادیکال سوپراکسید (O_2^-) در سرشاخه‌های ژنوتیپ‌های PH2، KVD3 و KVD4، NB2 و پایه کوئینس C متعلق به گونه درخت به *Cydonia oblonga* Mill.) در شرایط درون شیشه، از زمان صفر تا ۱۲۰ ساعت پس از آلوده‌سازی با سویه تیپ Ea273 باکتری *Erwinia amylovora*. ارزش‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد می‌باشند

Fig. 4. Comparison of appearance and severity progress of superoxide radical (O_2^-) in the *in vitro* shootlets of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes PH2, NB2, KVD4 and KVD3, and Quince C rootstock, inoculated with *Erwinia amylovora* type-strain Ea273, from 0 to 120 hours post-inoculation. The values are mean \pm standard error

میزبان نشان دادند که تنش اکسیداتیو بافت‌های میزبان (Venisse *et al.*, 2002)، در اثر فعالیت دو زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی و میتوکندریایی ایجاد می‌شود (Xie and Chen, 2000; Abdollahi *et al.*, 2015) و بر اساس مقایسه‌های اخیر، این دو ارگانل نقش کم و بیش یکسانی در ایجاد این تنش اکسیداتیو دارند (Seyedi and

خاص با افزایش تولید آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase = SOD)، تلاش در تبدیل این رادیکال نسبتاً آسیب‌رسان و مضر، با دیگر انواع گونه فعال اکسیژن کم‌خطری مثل پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌نمایند (Bhattacharjee, 2011).

برهمکنش باکتری *E. amylovora* و گیاهان

با شناسائی زود هنگام تر عامل بیماری، واکنش سریع تری با تولید رادیکال سوپراکسید نشان دادند.

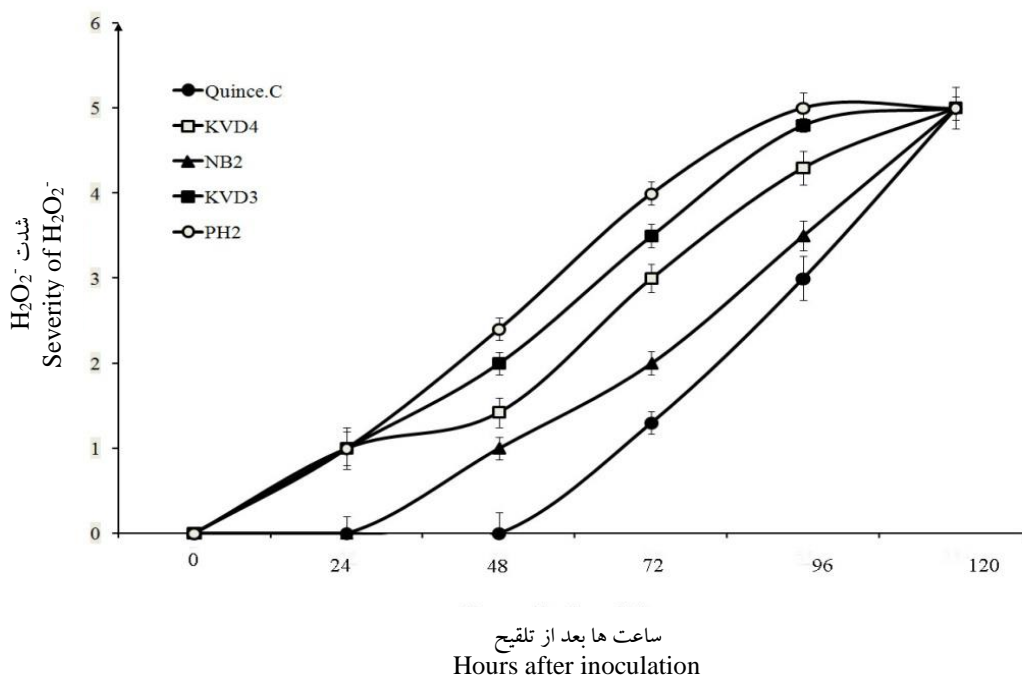
گونه فعال پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

نتایج نشان داد که ظهور اولین رد قابل مشاهده پراکسید هیدروژن در ژنوتیپ NB2 در ۲۴ ساعت و در پایه Quince C در فاصله ۴۸ ساعت پس از آلوده‌سازی شاخه‌چه‌های درون شیشه دیده شد (شکل ۵). این در حالی است که بر خلاف رادیکال سوپراکسید که در سه ژنوتیپ KVD3، KVD4 و PH2، اولین ظهور رادیکال سوپراکسید با حدود ۲۴ ساعت تاخیر در مقایسه با ژنوتیپ NB2 و پایه Quince C آغاز شده بود، در اینجا از ابتدائی‌ترین لحظه پس از آلوده‌سازی شاخه‌چه‌های درون شیشه آغاز شده و در بافت‌های میزبان به سرعت گسترش یافته است (شکل ۵).

بر این اساس به نظر می‌رسد، سه ژنوتیپ KVD3، KVD4 و PH2 با فعالیت سریع تر و بیشتر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، اولین مقادیر تولیدی رادیکال سوپراکسید را به تجمع گونه فعال اکسیژن پراکسید هیدروژن تبدیل کرده، به صورتی که در ۲۴ ساعت ابتدائی آلوده‌سازی شاخه‌چه‌های درون شیشه که میزان شدت تولید رادیکال سوپراکسید در حداقل خود قرار داشت، هیچگونه ردی از تولید این رادیکال در بافت‌های این سه ژنوتیپ مشاهده نشد و همه مقادیر رادیکال سوپراکسید، به پراکسید هیدروژن تبدیل شد (شکل ۴ و شکل ۵).

(Abdollahi, 2022). با توجه به اینکه رادیکال سوپراکسید به عنوان اولین رادیکال تولیدی نتیجه برهمکنش بین باکتری *E. amylovora* و گیاهان میزبان محسوب می‌شود و بافت‌های گیاهان میزبان با تولید و فعالیت بیش تر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، بلافاصله تلاش در مهار این رادیکال می‌نمایند، بررسی‌های قبلی نتوانسته ارتباط دقیقی بین سطح مقاومت به بیماری آتشک و تولید این رادیکال در دیگر میزبان‌ها نظیر بافت‌های درخت گلابی (*Pyrus spp.*)، برقرار نماید (Azarabadi et al., 2016).

در پژوهش حاضر پایه Quince C و ژنوتیپ NB2 با سطح مقاومت بالاتر، میزان بیشتری از رادیکال سوپراکسید تولید کردند، همچنین سطح تولید رادیکال در ژنوتیپ KVD4 متوسط و در دو ژنوتیپ با سطح پائین تحمل شاخه‌چه‌های درون شیشه، شامل ژنوتیپ‌های KVD3 و PH2، میزان تولید رادیکال سوپراکسید نیز کمتر بود (شکل ۳ و ۴). این موضوع مویید این مطالب است که غیر از ظهور اولیه رد رادیکال سوپراکسید و گسترش آن در بافت‌های میزبان، عوامل دیگری در تعیین سطح و شدت تنش اکسیداتیو و تبدیل این تنش اکسیداتیو به یک عامل نکروز کننده و از بین برنده بافت‌ها، موثر است. از سوی دیگر، یکی از عوامل موثر در سطح مقاومت ارقام و ژنوتیپ‌ها به بیماری آتشک، شناسائی سریع و واکنش زود هنگام است. به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر پایه Quince C و ژنوتیپ NB2



شکل ۵- مقایسه ظهور و پیشرفت شدت گونه فعال اکسیژن پراکسید هیدروژن (H₂O₂) در سرشاخه‌های ژنوتیپ‌های PH2، NB2، KVD4 و KVD3 و پایه کوئینس C متعلق به گونه درخت به *Cydonia oblonga* Mill.) در شرایط درون شیشه، از زمان صفر تا ۱۲۰ ساعت پس از آلوده‌سازی با سویه تیپ *Erwinia amylovora* باکتری Ea273. ارزش‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد می باشند

Fig. 5. Comparison of appearance and severity progress of active oxygen hydrogen peroxide (H₂O₂) in the *in vitro* shootlets of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes PH2, NB2, KVD4, KVD3 and Quince C rootstock, inoculated with *Erwinia amylovora* type-strain Ea273, from 0 to 120 hours post-inoculation. The values are mean ± standard error

خصوصاً تبدیل رادیکال نسبتاً خطرناک سوپراکسید به گونه فعال نسبتاً کم‌خطر پراکسید هیدروژن، نه تنها از تجمع بیش از حد رادیکال سوپراکسید جلوگیری می‌کنند، بلکه با تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن، از این گونه کم‌خطرتر، به عنوان سدی دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی استفاده می‌نمایند

نتایج بررسی‌های متعدد در زمینه زنجیره تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بافت‌ها نشان می‌دهد که گونه‌های فعال اکسیژن به صورت شمشیرهای دولبه برای بافت‌های گیاهی عمل کرده و در عین وجود مضرات و مخاطرات آنها، این بافت‌ها از تعادل انواع مختلف گونه‌های فعال اکسیژن و تبدیل آنها به یکدیگر،

رادیکال هیدروکسیل (OH⁻)

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که از نظر تولید رادیکال هیدروکسیل، ژنوتیپ NB2 و پایه Quince C در بالاترین میزان قرار گرفتند (شکل ۶). گرچه شکل ۶ نشان‌دهنده این است که پایه پایه کوئینس C، پس از یک دوره افزایش تولید رادیکال هیدروکسیل، کاهش نسبی در تولید این رادیکال را بروز داد. همچنین بر خلاف ژنوتیپ NB2 و پایه کوئینس C، ژنوتیپ‌های حساس PH2 و KVD3، کمترین سرعت افزایش در رادیکال هیدروکسیل را نشان دادند (شکل ۶). همچنین در رابطه با رادیکال سوپراکسید، گونه فعال پراکسید هیدروژن و رادیکل هیدروکسیل، رفتار ژنوتیپ KVD1، رفتار حد وسط بود (شکل ۷). در زنجیره تولید گونه‌های فعال اکسیژن، پس از رادیکال سوپراکسید، گونه فعال پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل در اثر واکنش فنتون (Fenton) و در حضور یون‌های آهن و مس تولید و می‌تواند همانند سایر گونه‌های فعال اکسیژن، برای بافت‌های گیاهی مخاطره‌انگیز باشد (Bhattacharjee, 2011).

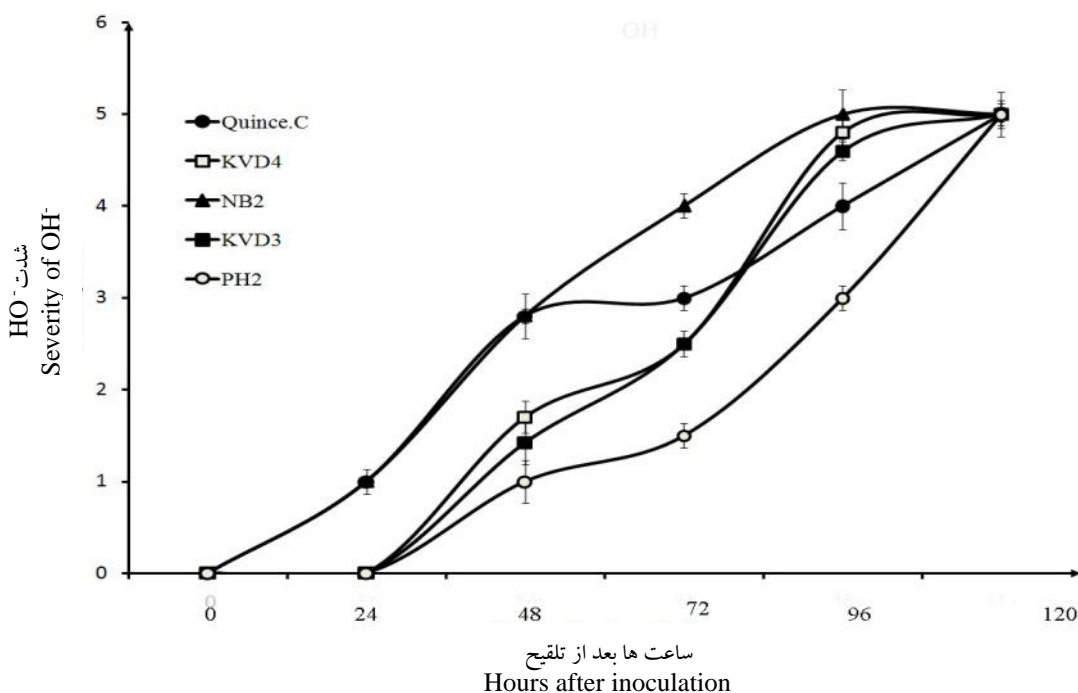
با مقایسه نتایج میزان حساسیت به بیماری آتشک و تولید سه گونه مختلف گونه فعال اکسیژن، سه رفتار متفاوت در ژنوتیپ‌ها و ارقام درخت به مورد بررسی در واکنش به حمله باکتری عامل بیماری مشاهده شد. در گروه اول ژنوتیپ‌ها، شامل ژنوتیپ NB2 و پایه کوئینس C، که سطح تحمل بالاتری از خود نشان دادند،

(Bhattacharjee, 2011). استفاده از این سازکار و تجمع پراکسید هیدروژن در برخی از ارقام گلابی با سطح تحمل متوسط به بیماری آتشک قبلاً توسط آذرآبادی و همکاران (Azarabadi et al., 2016) و عبداللهی و صالحی (Abdollahi and Salehi, 2018)، به اثبات رسیده است.

برهمکنش بین باکتری *E. amylovora* و گیاهان میزبان پس از تولید رادیکال سوپراکسید، این رادیکال در اثر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، به گونه فعال اکسیژن پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود که این امر یک فرآیند عمومی تنش اکسایشی بافت‌های گیاهی (Bhattacharjee, 2011) و از جمله تنش اکسیداتیو بیماری آتشک (Azarabadi et al., 2016) است. گرچه سازکار مشابهی حداقل در برخی از ارقام سیب نیز برای تحمل به بیماری آتشک مشاهده و گزارش شده است (Abdollahi et al., 2015)، لیکن به نظر می‌رسد این سازکار مقاومت حداقل در تمامی ارقام گلابی عمومیت نداشته و برخی از ارقام گلابی از سازکار متفاوتی برای تحمل به بیماری آتشک استفاده می‌کنند (Abdollahi and Salehi, 2018). از سوی دیگر، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که سازکار تحمل به بیماری آتشک بر اساس جلوگیری از تجمع بیش از حد پراکسید هیدروژن در پایه Quince C و ژنوتیپ NB2 عمل می‌کند.

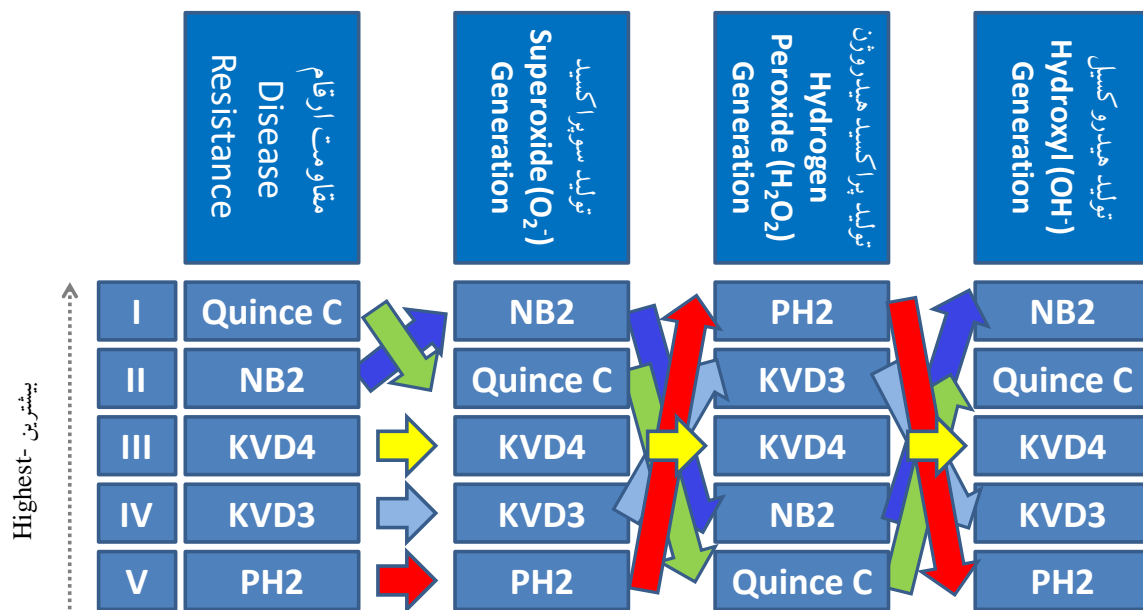
داشت و نه تنها سطح متوسطی از حساسیت به بیماری را در شاخه‌چه‌های درون شیشه نشان داد، بلکه از نظر میزان شدت پیشرفت سه گونه فعال اکسیژن مورد بررسی نیز در بین ژنوتیپ‌ها، در حد وسط قرار گرفت (شکل ۷).

افزایش سریع‌تر تولید رادیکال سوپراکسید، تاخیر در تولید گونه فعال پراکسید هیدروژن و افزایش سریع‌تر رادیکال هیدروکسیل مشاهده شد (شکل ۷). همچنین در دیگر رفتار مشاهده شده در بین ارقام و ژنوتیپ‌های به مورد بررسی، ژنوتیپ KVD4، رفتار حد وسط و میانه‌ای



شکل ۶- مقایسه ظهور و پیشرفت شدت رادیکال هیدروکسیل (OH^-) در سرشاخه‌های ژنوتیپ‌های *Cydonia oblonga* Mill.) به گونه درخت به پایه کوئینس C متعلق به گونه درخت به (Ea273 باکتری در شرایط درون شیشه، از زمان صفر تا ۱۲۰ ساعت پس از آلوده‌سازی با سویه تیپ *Erwinia amylovora*، ارزش‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد می باشند

Fig. 6. Comparison of appearance and severity progress of hydroxyl radicals (OH^-) in the *in vitro* shootlets of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes PH2, NB2, KVD4 and KVD3 and Quince C rootstock, inoculated with *Erwinia amylovora* type-strain Ea273, from 0 to 120 hours post-inoculation. The values are means \pm standard errors



شکل ۷- جمع‌بندی نتایج سرعت نکروز و شدت تولید رادیکال سوپراکسید (O_2^-), گونه فعال پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) در شاخه‌چه‌های آلوده شده پنج ژنوتیپ مورد بررسی درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) بر اساس رده‌بندی بیشترین (ردیف بالا) به کمترین (ردیف پائین). به منظور امکان ردیابی و مقایسه حساسیت به بیماری و رفتار سه گونه اکسیژن مورد بررسی، فلش‌های رنگی استفاده شده است

Fig. 7. Summarized results of the necrosis progress rate and severity of superoxide radical (O_2^-), active oxygen species, hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^-) in the inoculated shootlets of five quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes, classified as the highest (top row) to the lowest (bottom row). To track and compare the disease susceptibility with behavior of the investigated reactive oxygen species generation, colored arrows have been used

به نظر می‌رسد که بالاتر بودن سرعت تولید رادیکال سوپراکسید در ژنوتیپ‌های مقاوم‌تر NB2 و پایه کوئینس C در اثر شناسایی سریع‌تر پاتوژن توسط میزبان صورت گرفته و این شناسایی به صورت بروز واکنش اکسیداتیو، بروز داده شده است (شکل ۴ و شکل ۷). متعاقب این امر، با افزایش تولید رادیکال

در نهایت در گروه سوم ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی، دو ژنوتیپ حساس‌تر PH2 و KVD3 قرار گرفتند که ضمن پیشرفت سریع نکروز، تولید کم رادیکال سوپراکسید، افزایش سریع‌تر پراکسید هیدروژن و سپس سرعت کم‌تر در افزایش رادیکال هیدروکسیل را از خود بروز دادند (شکل ۷). بر این اساس، چنین

مورد بررسی و مقایسه قرار گیرد. همچنین این امکان وجود دارد که گونه به، فاقد سازکار دفاعی بر اساس تولید گونه‌های فعال اکسیژن بوده و همین امر و با توجه به نقش کلیدی این گونه‌ها در مقاومت به بیماری‌ها، خصوصاً باکتری عامل بیماری آتشک، سبب حساسیت بیش از حد این گونه نسبت به بیماری آتشک شده است.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که شاخه‌چه‌های درون شیشه درخت به، با بروز تفاوت در سرعت پیشرفت نکروز می‌تواند به عنوان یک سامانه درون شیشه برای بررسی تنش اکسیداتیو و رفتار بیوشیمیائی درخت به در پاسخ به عامل بیماری آتشک (*E. amylovora*)، مورد استفاده قرار گیرد. در این بررسی که برای اولین بار روی درخت به و در شرایط درون شیشه انجام شد، سه رفتار متفاوت در ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد بررسی در واکنش به حمله باکتری عامل بیماری مشاهده و طبقه‌بندی شد.

در گروه اول ژنوتیپ‌ها، شامل ژنوتیپ NB2 و پایه Quince C، با سطح تحمل بالاتر به بیماری، افزایش سریع‌تر رادیکال سوپراکسید، تاخیر در تولید پراکسید هیدروژن و افزایش سریع‌تر هیدروکسیل مشاهده شد. همچنین در ژنوتیپ KVD4، رفتار حد میانه‌ای از نظر حساسیت به بیماری و تولید سه گونه فعال اکسیژن مشاهده شد. در گروه سوم ارقام و

سوپراکسید، در این دو ژنوتیپ، افزایش فعالیت آنزیمی سبب کاهش سطح پراکسید هیدروژن و جلوگیری از تجمع آن در بافت‌ها شد. همچنین در این گروه از ارقام و ژنوتیپ‌ها، در اثر واکنش فنتون، بخش قابل توجه‌تری از پراکسید هیدروژن به رادیکال هیدروکسیل تبدیل شد.

بر اساس این نتایج، چنین به نظر می‌رسد که سازکار دفاعی درخت به در مقابل عامل بیماری آتشک بر خلاف درخت گلابی که به صورت تجمع گونه فعال اکسیژن پراکسید هیدروژن صورت می‌گیرد، کاملاً متمایز از این گونه می‌باشد. همچنین در برخی از ارقام گلابی، سازکار دفاعی میزبان به صورت تولید محدود و کمتر رادیکال سوپراکسید، جلوگیری از تجمع پراکسید هیدروژن و در نهایت محدودیت در تولید رادیکال هیدروکسیل انجام می‌گیرد. بنابراین، رفتار دفاعی ژنوتیپ‌های به مورد بررسی، از الگوی دوم رفتاری ارقام گلابی نیز تبعیت نکرده و همانگونه که میزان حساسیت درخت به، شدیدتر و غیرقابل مقایسه با ارقام درختان سیب و گلابی می‌باشد، واکنش‌های اکسیداتیو مشاهده شده در ارقام و ژنوتیپ‌های آن نیز متمایز از دو گونه دیگر میزبان است. بنابراین، به منظور بررسی و شناسائی دقیق‌تر سازکار دفاعی درخت به در مقابل حمله عامل بیماری آتشک، لازم است علاوه بر تولید گونه‌های فعال اکسیژن، رفتارهای آنزیمی و غیر آنزیمی دفاع اکسیداتیو نیز در سطح بافت‌ها

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله بدین وسیله از زحمات همکاران پژوهشگرده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی بویژه سرکارخانم مهندس زینب صالحی، کمال تشکر و قدردانی را دارند. همچنین از زحمات آقای مصطفی محمدی گرمارودی در زمینه نگهداری ژرم پلاسما درخت به مورد استفاده و همچنین پروفسور روزاریو مولئو (Professor Rosario Muleo)، استاد دانشگاه توشیا (Universita degli Studi della Tuscia) ایتالیا به خاطر در اختیار قرار دادن سویه تیپ باکتری *Erwinia amylovora* مورد استفاده در این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند.

تعارض منافع

نگارندگان اعلام می‌کنند که هیچگونه تعارض منافی ندارند.

ژنوتیپ‌های مورد بررسی، دو ژنوتیپ حساس‌تر PH2 و KVD3، ضمن پیشرفت سریع نکروز، تولید کم سوپراکسید، افزایش سریع تر پراکسید هیدروژن و سپس سرعت کمتر افزایش هیدروکسیل را داشتند.

بنابراین، چنین به نظر می‌رسد که سازکار دفاعی درخت به در مقابل عامل بیماری آتشک بر خلاف درخت گلابی که به صورت تجمع گونه فعال اکسیژن پراکسید هیدروژن می‌باشد، کاملاً متمایز از این گونه‌ها است. همچنین در برخی از ارقام گلابی، سازکار دفاعی میزبان به صورت تولید محدود و کمتر رادیکال سوپراکسید، جلوگیری از تجمع پراکسید هیدروژن و در نهایت محدودیت در تولید رادیکال هیدروکسیل انجام می‌گیرد. بنابراین، رفتار دفاعی ژنوتیپ‌های به مورد بررسی، از الگوی دوم رفتاری ارقام گلابی نیز تبعیت نمی‌کند.

References

- Abdollahi, H., 2003. Molecular biology of interaction between *Erwinia amylovora* and pear (*Pyrus communis* L.) genotypes with different susceptibility to fire blight. Ph. D. Thesis, University of Florence, Florence, Italy. 200 pp.
- Abdollahi, H., Rugini, E., Ruzzi, M. and Muleo, R., 2004. *In vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79, pp. 90-95. DOI: 10.1007/s11240-004-0661-0.
- Abdollahi, H., Alipour, M., Khorramdel Azad, M., Ghasemi, A., Adli, M., Atashkar, D., Akbari, M. and Nasiri, J., 2013. Establishment and primary evaluation of quince germplasm collection from various regions of Iran. *Acta Horticulturae*, 976, pp.199-206. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.976.25.

- Abdollahi, H., Ghahremani, Z., Erfani Nia, K. and Mehrabi, R., 2015.** Role of electron transport chain of chloroplasts in oxidative burst of interaction between *Erwinia amylovora* and host cells. *Photosynthesis Research*, 124, pp.231–242. DOI:10.1007/s11120-015-0127-8.
- Abdollahi, H., 2017.** Quince (*Cydonia oblonga*) germplasm and breeding strategies in Iran. *Acta Horticulturae*, 1315, pp.213-220. DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1315.33.
- Abdollahi, H. and Salehi, Z., 2018.** Histology of oxidative stress and generation of reactive oxygen species against progress of fire blight causal agent in pear cultivars. *Seed and Plant Journal*, 33, pp.139-162 (In Persian). DOI: 10.22092/sppj.2018.116423.
- Abdollahi, H., 2019.** A review on history, domestication and germplasm collections of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) in the world. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66, pp.1041-1058. DOI: 10.1007/s10722-019-00769-7.
- Abdollahi, H., Alipour, M. and Mohamadi Garamroudi, M., 2019.** Physicochemical attributes and their relationship with organoleptic properties of fruits of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes collected from different regions of Iran. *Seed and Plant Journal*, 35, pp.25-46 (In Persian). DOI: 10.22092/spij.2019.125806.1092
- Abdollahi, H., 2021.** Quince. Pp. 183-246. In: Mandal, D., Wermund, U., Phavaphutanon, L., Cronje, R. (eds.). *Temperate Fruits; Production, Processing, and Marketing*. CRC Press, New York, USA. DOI: 10.1201/9781003045861.
- Abdollahi, H., 2023.** Quince Cultivation; Scientific and Applied Principles. Horticultural Sciences Research Institute Publication, Karaj, Iran. 423 pp. (In Persian)
- Anonymous., 2021.** Agricultural Statistical Yearbook. Volume III: Horticultural and Glasshouse Crops. Ministry of Jihad-e-Agricultural, Tehran, Iran. 307 pp. (In Persian)
- Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., Salehi, Z. and Nasiri, J., 2016.** ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L). *European Journal of Plant Pathology*, 147, pp.279-294. DOI: 10.1007/s10658-016-1000-0
- Bell, L.R. and Leitao, M.J., 2011.,** Cydonia. Pp. 1-16. In: Chittaranjan, K. (ed.). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- Bell, R.L. and Van Der Zwet, T., 1987.** Fire blight resistance in cultivars and selections of pear and the correlations between measures of resistance. *Acta Horticulturae*, 217,

- pp.291-292. DOI: 10.17660/ActaHortic.1987.217.50.
- Bhattacharjee, S., 2011.** Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. Pp. 1-30. In: Dutta Gupta, S. (ed.). *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL. DOI: 10.1201/9781439854082-2
- FAO., 2021.** Food and Agriculture Organization Statistical Yearbook. Food and Agriculture Organization Publication, Rome, Italy. 352 pp. (In Persian)
- Leblay, C., Chevreau, E. and Robin, L.M., 1991.** Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivar (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 25, pp.99-105. DOI: 10.1007/BF00042180.
- Maroofi, A. and Mostafavi, M., 1996.** Evaluation of the resistance of apple, pear and quince varieties to fire blight. *Acta Horticulturae*, 411, pp.395-400. DOI: 10.17660/ActaHortic.1996.411.80
- Mehrabipour, S., Abdollahi, H. and Adli, M., 2012.** Response of some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes from Guilan and Khorasan provinces to fire blight disease. *Seed and Plant Journal*, 28, pp.67-84 (in Persian). DOI: 10.22092/spij.2017.111092
- Razavi, F., Arzani, K. and Vezvaei, A., 1999.** Identification of native quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes from various regions of Isfahan province. *Seed and Plant Journal*, 15, pp.354-374 (In Persian).
- Şahin, M., Mısırlı, A. and Ozaktan, H., 2020.** Determination of fire blight (*Erwinia amylovora*) susceptibility in Turkey's *Cydonia oblonga* Mill. Germplasm. *European Journal of Plant Pathology*, 157, pp.227–237 DOI: 157. 10.1007/s10658-020-01971-5
- Seyedi, M. and Abdollahi, H., 2022.** Association of resistance level to the fire blight (*Erwinia amylovora*) disease with chloroplastic and mitochondrial oxidative stress in two pear cultivars Harrow Sweet and Barteltt. *Seed and Plant Journal*, 38, pp.71-90 (In Persian). DOI: 10.22092/spj.2023.360114.1276
- van der Zwet, T. and Keil, H.L., 1979.** Fire blight. United States Department of Agriculture, Agricultural Handbook Number 510, Washington DC. 200 pp.
- Venisse, J.S., Malony, M., Faize M., Paulin J.P. and Brisset M.N., 2002.** Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 15, pp.1204-1212. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.12.1204

Xie, Z. and Chen, Z., 2000. Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 13, pp.183–190. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.2.183

RESEARCH ARTICLE

Histology of Reactive Oxygen Species Generation in Oxidative Burst of Interaction between Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotypes with Causal Bacteria of Fire Blight Disease

F. Khosravi Nejad¹ and H. Abdollahi^{2*}

1. Former M. Sc. Student, Biotechnology Department, Faculty of Agriculture and Natural Sciences, Islamic Azad University of Damghan, Damghan, Iran.
2. Associate Professor, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

ABSTARCT

Khosravi Nejad, F. and Abdollahi, H., 2023. Histology of reactive oxygen species generation in oxidative burst of interaction between quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes with causal bacteria of fire blight disease. *Seed and Plant Journal*, 39, pp.27-49 (In Persian).

This research was conducted to identify the fire blight resistance and related oxidative responses in quince genotypes. KVD4, NB2, PH2 and KVD3 genotypes and Quince C rootstock were inoculated *in vitro* with *Erwinia amylovora* Ea273 and necrosis progress and ROS generation, including O_2^- , H_2O_2 and OH^- in control and infected shootlets was compared. Results showed three types of oxidative responses in genotypes. In NB2 and Quince C rootstock, with a higher level of disease resistance, they had a fast O_2^- increase, a delay in H_2O_2 generation, and a faster increase in OH^- severity. KVD4 had a moderate susceptibility level and similarly moderate behavioral in generation of three ROS. In third group, more susceptible genotypes, PH2 and KVD3, showed low O_2^- generation, faster H_2O_2 increase and slower rate of increase of OH^- level. It seems that defensive mechanism of quince against the fire blight disease is completely different from pear tree, which mainly accumulates H_2O_2 as a barrier.

Keywords: Quince, *in vitro*, necrosis, oxygen radicals, superoxide, hydrogen Peroxide, hydroxyl.

Introduction

Fire blight (*Erwinia amylovora*) is considered the most important limiting factor for pome fruit trees such as apples, pears and quinces (Van der Zwet, and Keil, 1979). Numerous factors are effective for *E. amylovora*'s pathogenicity and molecular interaction with host plants, but the oxidative burst is the critical factor that results in host cell degradation and pathogen growth (Azarabadi *et al.*, 2016). Among various

hosts of fire blight causal agent, the quince trees are the most susceptible one and the disease usually causes large disease symptoms such as bloom blight, shoot blight, canker and trunk necrosis that leads to entire decline of the tree in the outbreak years (Van der Zwet, and Keil, 1979). Quince tree also is native to Iran and this country is among the main producers of quince fruits in the world (Abdollahi, 2023). Due to importance of quince tree in Iran and high damages of fire blight disease on it, the current research was conducted to evaluate the mechanisms of resistance to this disease in level of oxidative burst and severity of generation of various reactive oxygen species in the different quince genotypes.

Materials and Methods

Quince genotypes including KVD4, NB2, PH2 and KVD3, along with Quince C rootstock were established in *in vitro* conditions on modified QL medium and inoculated with *Erwinia amylovora* type strain Ea273. Following this step, the progress of disease necrosis and generation of reactive oxygen species (ROS), including superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^\cdot); as the main species of active oxygen during interaction of *E. amylovora* with the host plants (Venisse *et al.*, 20002), were compared in three separate experiments in control and infected *in vitro* shootlets. Severity of the generation of each reactive oxygen species evaluated by the index of red color in the tissues of quince genotypes from score 0 (without any trace of ROS) to 5 (the highest severity of each individual ROS) following the colorimetric method described by of Azarabadi *et al.* (2016). Traces of superoxide radical, hydrogen peroxide and finally hydroxyl radical were determined by nitro blue tetrazolium (NBT), 3, 3'-Diaminobenzidine-HCl (DAB)-HCl and Dimethyl sulfoxide (DMSO), respectively, Following Azarabadi *et al.* (2016). Data were collected in 120 hours time course after inoculation of *in vitro* shootlets with with *Erwinia amylovora* type strain Ea273, and the curves were depicted using Microsoft Excel.

Results and Discussion

The results showed three types of oxidative stress and ROS generation patterns in responses to fire blight disease progress in the tissues of studied quince genotypes. Quince C and NB2 genotypes, with higher levels of disease resistance, demonstrated faster increase in the superoxide generation, delay in the generation of hydrogen peroxide, and faster increase in severity of the hydroxyl radical. Also, KVD4 genotype had moderate susceptibility level to the disease and similarly moderate behavioral of the amount of the generation of three reactive oxygen species including superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl. In the third group, the more susceptible genotypes,

PH2 and KVD3, showed fast necrosis progress, low generation of superoxide, faster increase of hydrogen peroxide and slower rate of increase of hydroxyl radical level. Considering the various patterns of ROS generation in the evaluated quince genotypes, it can be concluded that the defensive mechanisms of the quince tree against fire blight is completely different from pear tree in which the accumulation of hydrogen peroxide is the main barrier for resistance to the fire blight disease (Azarabadi *et al.*, 2016).

References

- Abdollahi, H., 2023.** Quince Cultivation; Scientific and Applied Principles. Horticultural Sciences Research Institute Publication, Karaj, Iran. 423 pp. (In Persian)
- Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., Salehi, Z. and Nasiri, J., 2016.** ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L). *European Journal of Plant Pathology*, 147, pp.279-294. DOI: 10.1007/s10658-016-1000-0
- van der Zwet, T. and Keil, H.L., 1979.** Fire blight. Agricultural Handbook Number 510, United States Department of Agriculture. Washington DC. 200 pp.
- Venisse, J.S., M. Malony, Faize M., Paulin J.P. and Brisset M.N. 2002.** Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 15, pp.1204-1212. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.12.1204