بررسی تغییرات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی لاین‌های حساس و مقاوم آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) در واکنش به بیماری قارچی اسکلروتینیا

رضا درویش‌زاده[۱،۲*]، نجمه ارجمند[۳]، رقیه نجف‌زاده[۴] و رضا حیدری[۳]

[۱]ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی

[۲]ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده زیست‌فناوری

[۳]ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

[۴]میاندوآب، دانشگاه ارومیه، مرکز آموزش عالی شهید باکری، گروه گیاهان دارویی

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۵

چکیده

اسکلروتینیا از بیماری‌های قارچی مهم آفتابگردان در ایران می‌باشد که عملکرد این محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از این‌رو، بررسی واکنش فنوتیپی و مولکولی ژنوتیپ‌ها به عامل بیماری برای تولید ارقام هیبرید مقاوم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در این پژوهش تغییرات بیوشیمیایی و آنزیمی لاین‌های آفتابگردان (100 و C39) در شرایط کنترل شده طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های قارچ اسکلروتینیا (SSKH41 و SSU107) بصورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید. بدین‌منظور خصوصیاتی مانند میزان پراکسیداسیون لیپیدها و تجمع مالون دی‌آلدهید (MDA)، فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانتی مانند کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (GPX) بررسی شد. نتایج نشان داد که بیماری اسکلروتینیا باعث افزایش تغییرات بیوشیمیایی و آنزیمی در گیاهان آلوده به قارچ شد. لاین‌های حساس و مقاوم نیز پاسخ‌های متفاوتی در واکنش به این بیماری از خود نشان دادند. به‌طوری‌که میزان مالون دی‌آلدهید در لاین‌های مقاوم کاهش پیدا کرد که کمترین این میزان مربوط به لاین مقاوم C39 در مواجه با جدایه قارچی SSU107 بود. همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به‌ترتیب در لاین‌های مقاوم و حساس به دو جدایه قارچی بیشتر بود. به‌طوری‌که فعالیت آسکوربات پراکسیداز در لاین مقاوم C39 و فعالیت گایاکول پراکسیداز در لاین حساس C100 پس از آلودگی با قارچ SSU107 افزایش یافت. طبق نتایج این تحقیق، لاین C39 به دلیل داشتن کمترین میزان پراکسیداسیون لیپید و بیشترین فعالیت آنزیمی که مکانیسم‌های دفاعی گیاه را در برابر پاتوژن‌ها ایجاد می‌کند، مقاومت نسبی خوبی از خود نشان داد. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان برای تولید ارقام مقاوم به این بیماری مفید واقع گردد.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، اسکلروتینیا، پراکسیداسیون لیپید، فعالیت آنزیمی و مقاومت.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۹۷۳۴۴۵۸، پست الکترونیکی: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یکی از ۴ محصول مهم زراعی است که کشت آن به دلیل بهره‌برداری از روغن خوراکی حائز اهمیت می‌باشد. روغن آفتابگردان علاوه بر مصرف خوراکی، در مصارف صنعتی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۳). همه ساله به علت بیماری‌های گوناگونی که انواع قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا در گیاهان مختلف ایجاد می‌نمایند، خسارت فراوانی به محصولات کشاورزی وارد می‌شود (۴). به‌طوری‌که در آفتابگردان نیز تنش‌های

زیستی یکی از عوامل محدود کننده رشد محصول می‌باشند. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary یکی از عوامل بیماری گیاهی با دامنه وسیع میزبانی است که می‌تواند بیش از ۴۰۰ گونه گیاهی متعلق به بیش از ۷۰ خانواده را در مراحل مختلف آلوده کند (۳۷، ۳۸ و ۴۰). این پاتوژن در آفتابگردان باعث پوسیدگی ریشه، ساقه، طوقه و طبق شده و موجب بوته‌میری گیاه می‌گردد و در شرایط آب و هوایی مساعد، خسارت زیادی به محصول وارد می‌کند (۹، ۱۸ و ۳۵).

گیاهان در مواجه با تنش‌های غیرزنده و زنده ازجمله پاتوژن‌ها، دچار تغییرات بیوشیمیایی می‌شوند (۲، ۵ و ۷). یکی از اولین تغییرات بیوشیمیایی و سریع‌ترین پاسخ‌های دفاعی در گیاهان آلوده به پاتوژن، انفجار اکسیداتیو (Oxidative burst) می‌باشد که باعث تشکیل انواع گونه-های اکسیژن فعال (ROS, Reactive oxygen species) و رادیکال‌های آزادی مانند سوپراکسید (O^{2-}) و پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) می‌شود (۱۰ و ۳۰) که به‌دنبال آن نیز پراکسیداسیون لیپیدها و تجمع مالون دی‌آلدهید (MDA, Malon dialdehyde) رخ می‌دهد (۳۵ و ۴۵). رادیکال‌های آزاد می‌توانند نقش دوگانه‌ای داشته باشند. به‌طوری‌که از یکسو باعث تخریب سلول و از سوی دیگر به‌عنوان مولکول سیگنال باعث فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی در سلول شوند. پاکسازی محتویات سیتوپلاسم از رادیکال‌های اکسیژن در گیاهان مقاوم، به تحریک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی وابسته می‌باشند (۲۶). مکانیسم‌های حفاظتی آنتی‌اکسیدانتی در گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد اکسیژن شامل القاء چندین آنزیم آنتی‌اکسیدانتی همانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD, Superoxide dismutase)، کاتالاز (CAT, Catalase)، آسکوربات پراکسیداز (APX, Ascorbate peroxidase)، گایاکول پراکسیداز (GPX, Guaiacol peroxidase)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR, Glutathione reductase) و دیگر سیستم‌های آنتی-اکسیدانتی می‌باشد (۱۰، ۱۵، ۲۲، ۲۳، ۲۷ و ۴۲). عموماً زمانی که گیاه در معرض شرایط تنش قرار می‌گیرد، فعالیت این آنزیم‌ها افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که سوپراکسید دیسموتازها به عنوان اولین خط دفاعی در تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسیدهیدروژن عمل می‌کنند. در مرحله بعد پراکسیدهیدروژن توسط آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون و یا توسط گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در سیتوپلاسم یا دیگر بخش‌های سلول، از بین می‌رود (۱۰ و ۲۰). پژوهش‌ها نشان داده است که تغییر در بیان یا فعالیت آنزیم‌های ROS می‌تواند گام مهمی در فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاه در مواجه با پاتوژن‌های زیستی باشد. زیرا فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی باعث کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تنش اکسیداتیو شده و در نهایت موجب حفظ سلول در مواجه با نفوذ پاتوژن‌های قارچی اسکلروتینیا می‌شود (۱۱، ۱۶ و ۳۴). تاکنون مطالعاتی در رابطه با بررسی تغییرات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی به هنگام مواجه با انواع پاتوژن‌ها در گیاهان نخود، سویا، یونجه، کتان و گوجه-فرنگی (۱۲، ۱۶، ۱۷، ۲۰، ۲۶ و ۳۱) انجام شده است. در آفتابگردان نیز مطالعاتی در رابطه با بررسی این تغییرات به هنگام مواجه با بیماری اسکلروتینیا گزارش شده است (۳، ۱۴، ۱۸، ۲۵، ۳۴ و ۳۵). Davar و همکاران (۱۴) در یک تحقیق که به‌منظور بررسی تغییرات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی در لاین‌های حساس و مقاوم آفتابگردان در پاسخ به بیماری اسکلروتینیا انجام شد، گزارش کردند که میزان تجمع MDA و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی CAT، APX و GPX در لاین‌های مطالعه شده متفاوت است. به‌طوری‌که میزان این تغییرات در گیاهان مقاوم و حساس در مقایسه با شاهد افزایش یافت. Emamgholi و همکاران (۱۸) افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی را در گیاه آفتابگردان در پاسخ به قارچ اسکلروتینیا گزارش کردند. Peluffo و همکاران (۳۴) نیز گزارش کردند که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در آفتابگردان‌های آلوده به

قارچ اسکلروتینیا در مقایسه با شاهد افزایش می‌یابد.

اسکلروتینیا از بیماری‌های قارچی مهم آفتابگردان در ایران می‌باشد که عملکرد این محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). در سال‌های اخیر شیوع و توسعه این بیماری در منطقه شمال‌غرب کشور باعث کاهش سطح زیرکشت این محصول شده است. وسعت خسارت در حدی است که در بعضی از مزارع تحت کشت، عملاً محصولی برداشت نمی‌شود. با توجه به اینکه مدیریت زراعی این بیماری بسیار مشکل می‌باشد، در حال حاضر تأکید بر استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. متأسفانه تعداد ارقام آفتابگردان مقاوم به این بیماری در جهان کم می‌باشد. بنابراین، بررسی واکنش فنوتیپی و مولکولی ژنوتیپ‌ها به عامل بیماری برای تولید ارقام هیبرید مقاوم از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۳، ۶ و ۱۸). در این پژوهش تغییرات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی در لاین‌های حساس و مقاوم آفتابگردان به دو جدایه قارچی اسکلروتینیا بررسی شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی و کشت آنها: ۲ لاین آفتابگردان با واکنش متفاوت به ۲ جدایه قارچی اسکلروتینیا بر اساس نتایج پژوهش‌های پیشین (۳ و ۶) انتخاب شدند. بدین منظور از لاین C100 (به ترتیب حساس و مقاوم به جدایه قارچی SSU107 و SSKH41) و لاین C39 (به ترتیب مقاوم و حساس به SSU107 و SSKH41) استفاده شد. بذرهای لاین‌ها از مؤسسه آگرونومی فرانسه (INRA, Institut National de la Recherche Agronomique) تهیه شدند و در گلدان‌های مستطیلی شکل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۸ نمونه در محیط پیت ماس کشت گردیدند. گیاهان تا مرحله ۸ برگی در شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ٪۶۵ و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی نگه‌داری شدند (۳۷).

کشت جدایه‌های قارچی و تلقیح گیاهان: جدایه‌های قارچی در محیط آگار دکستروز سیب زمینی (PDA, Potato Dextrose Agar, 39 g L^{-1}, pH=6) کشت شده و به اتاق تاریک با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سپس دیسک‌های میسیلیومی با قطر ۳ میلی‌متر از حواشی کلنی در حال رشد (با عمر ۳ روز) بریده شدند و در مرحله ۸ برگی گیاهان در ناحیه طوقه ساقه آنها قرار گرفتند. برای حفظ رطوبت، بر اساس روش Price و Colhoun (۳۶) اطراف ساقه و دیسک میسیلیومی با پارافیلم بسته شد. نمونه‌برداری از قسمت پایه‌ای ساقه گیاهان در زمان‌های ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با قارچ انجام شد. در تیمار کنترل، آلودگی لاین‌ها با جدایه‌های قارچی انجام نشد.

اندازه‌گیری خصوصیات: پراکسیداسیون لیپیدها و میزان مالون دی‌آلدهید (MDA): برای اندازه‌گیری میزان تجمع MDA که به‌عنوان معیاری از پراکسیداسیون لیپیدها مطرح می‌باشد، از روش Heath و Packer (۲۱) استفاده شد. بدین منظور ۰/۲ گرم از بافت تر ساقه گیاه در ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) یک درصد ساییده شد. ترکیب یکنواخت حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ و بعد روی یک میلی‌لیتر از محلول رویی، ۴ میلی‌لیتر محلول حاوی TCA ٪۲۰ و تیوباربیتوریک‌اسید (TBA) ٪۰/۵ اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از آن بلافاصله در آب یخ سرد شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Biowave DAD, S2100, England) قرائت گردید. میزان MDA با ضریب خاموشی (۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$) و فرمول زیر محاسبه شد:

$$MDA\ (\mu mol\ /gFw) = [A532-A600/155] \times 1000$$

سنجش فعالیت آنزیمی: برای سنجش فعالیت آنزیمی، ابتدا عصاره گیاهی به روش Kang و Saltiveit (۲۳) استخراج شد. بدین منظور ۰/۵ گرم از بافت تر ساقه به

همراه ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج تریس–اسیدکلریدریک ۵۰ میلی‌مولار (pH=7) حاوی (۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ و یک میلی‌مولار EDTA) در هاون سرد ساییده شد. بافر استخراجی برای آنزیم آسکوربات پراکسیداز علاوه بر ترکیبات ذکر شده، محتوی ۰/۲ میلی‌مولار آسکوربیک‌اسید نیز بود. ترکیب یکنواخت حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های زیر استفاده شد.

آنزیم کاتالاز (CAT): سنجش فعالیت آنزیم CAT با استفاده از روش Aebi (۸) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت آنزیم CAT به صورت کاهش در جذب طی یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد. برای سنجش میزان فعالیت این آنزیم از ضریب خاموشی (۰/۰۴۳۶ $mM^{-1}cm^{-1}$) و فرمول زیر استفاده شد (اختلاف جذب :doD):

$$\text{Unit (mM/m)} = \frac{\text{doD/min (Slope)} \times \text{Vol. of assay (0.0003)}}{\text{Extinction cofficient (0.0436)}}$$

آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): سنجش فعالیت APX با استفاده از روش Nakano و Asada (۲۹) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7) حاوی (۰/۱ EDTA میلی‌مولار و آسکوربات سدیم یک میلی‌مولار)، ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت APX به صورت کاهش در جذب طی یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد. برای سنجش میزان فعالیت این آنزیم از ضریب خاموشی (۲/۸ $mM^{-1}cm^{-1}$) و فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Unit (mM/m)} = \frac{\text{doD/min (Slope)} \times \text{Vol. of assay (0.0001)}}{\text{Extinction cofficient (2.8)}}$$

آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX): سنجش فعالیت آنزیم GPX با استفاده از روش Upadhyaya و همکاران (۴۴) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، یک میلی‌لیتر گایاکول یک درصد، یک میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت GPX به صورت افزایش در جذب طی یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر محاسبه شد. برای سنجش فعالیت این آنزیم از ضریب خاموشی (۲۶/۶ $mM^{-1}cm^{-1}$) و فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Unit (mM/m)} = \frac{\text{doD/min (Slope)} \times \text{Vol. of assay (0.0001)}}{\text{Extinction cofficient (26.6)}}$$

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های به‌دست آمده بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار تجزیه‌وتحلیل شدند. تجزیه واریانس توسط نرم‌افزار SAS 9.2 و مقایسه میانگین اثرات معنی‌دار با آزمون LSD در نرم‌افزار MSTATC انجام شد. در مواردی که اثر متقابل عامل‌ها معنی‌دار بود، مقایسه میانگین اثرات اصلی انجام نشد. در ضمن نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر لاین (گیاه میزبان)، جدایه قارچی و زمان آلودگی با قارچ روی برخی خصوصیات بیوشیمیایی و فعالیت‌های آنزیمی معنی‌دار می‌باشد. به‌طوری‌که لاین اثر معنی‌داری بر میزان مالون دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال ۱ درصد ($P<0.01$) و اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0.05$) دارد. اثر جدایه قارچی در سطح احتمال ۱ درصد ($P<0.01$) بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار بود. در ضمن اثرات مدت زمان پس از آلودگی نیز در سطح احتمال ۱ درصد ($P<0.01$) بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0.05$) بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز معنی‌دار بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس خصوصیات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی در لاین‌های آفتابگردان طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های SSU107 و SSKH41 قارچ اسکلروتینیا

منبع تغییرات	میزان مالون دی‌آلدهید (MDA)		آنزیم کاتالاز (CAT)		آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)		آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)	
	df	Ms	df	Ms	df	Ms	df	Ms
لاین	۱	۵۵۱۵/۳۱**	۱	۵۷۱۱۱۵/۶۱^{ns}	۱	۹۲۲/۰۹**	۱	۰/۵۷*
جدایه	۲	۶۱۵/۹۲^{ns}	۲	۸۴۳۶۱۹۸/۲۷**	۲	۷۲۰/۷۵**	۲	۰/۰۲^{ns}
زمان	۴	۶۴۷/۶۸^{ns}	۴	۴۶۹۶۶۵۰/۰۵**	۴	۱۹۰/۲۳**	۴	۰/۳۲*
لاین × جدایه	۲	۱۵۰۴/۰۸**	۲	۳۵۵۸۸۶/۰۸^{ns}	۲	۸۴۳/۶۰**	۲	۰/۵۱*
لاین × زمان	۴	۲۳۳/۲۹^{ns}	۴	۹۸۹۴۳۹/۹۱^{ns}	۴	۱۸۳/۸۳**	۴	۰/۲۹*
جدایه × زمان	۸	۶۶۵/۰۵*	۸	۲۴۳۳۴۴۰/۸۰^{ns}	۸	۲۳۴/۰۷**	۸	۰/۲۷*
لاین × جدایه × زمان	۸	۳۹۳/۸۳^{ns}	۸	۱۴۹۴۸۰۴/۲۵^{ns}	۸	۲۵۵/۳۲**	۸	۰/۳۲**
اشتباه	۵۴	۲۵۶/۰۲	۵۵	۱۲۵۴۲۶۲/۷	۵۹	۵۰/۱۸	۶۰	۰/۱۱

df: درجه‌آزادی، Ms: میانگین مربعات. ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد (۰/۰۱)، * معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (۰/۰۵) و ^{ns} عدم معنی‌دار.

معنی‌دار بودن اثر متقابل بین تیمارها نشان می‌دهد که اختلاف بین لاین‌ها از سطحی به سطح دیگر جدایه قارچ و از زمانی به زمان دیگر در مواجه با قارچ متفاوت است (جدول ۱).

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که آلودگی با جدایه‌های قارچ اسکلروتینیا باعث تغییرات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی در گیاهان آلوده در مقایسه با شاهد شده است. لاین‌های حساس و مقاوم طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های قارچ اسکلروتینیا، پاسخ‌های متفاوتی به بیماری نشان دادند (جدول های ۲، ۳ و ۴).

جدول ۲- میانگین مالون دی‌آلدهید (MDA) در آفتابگردان روغنی در واکنش به بیماری قارچی اسکلروتینیا

مقایسه میانگین لاین × جدایه			
لاین/جدایه	SSU107	SSKH41	شاهد
C100	۶۸/۴۵ a	۶۱/۵۴ a	۵۸/۰۱ a
C39	۳۸/۴۱ b	۵۹/۰۳ a	۴۴/۵۶ b
مقایسه میانگین زمان × جدایه			
زمان (ساعت)/جدایه	SSU107	SSKH41	شاهد
۳	۶۰/۰۸ ab	۷۲/۳۵ a	۵۱/۲۹ bc
۶	۳۳/۴۶ c	۶۰/۹۲ ab	۵۱/۲۹ bc
۱۲	۴۳/۴۲ bc	۵۳/۶۵ b	۵۱/۲۹ bc
۲۴	۷۳/۵۲ a	۵۵/۸۵ ab	۵۱/۲۹ bc
۴۸	۷۳/۷۷ a	۵۸/۵۷ ab	۵۱/۲۹ bc

جدول ۳- میانگین آنزیم کاتالاز (CAT) در آفتابگردان روغنی در واکنش به بیماری قارچی اسکلروتینیا

مقایسه میانگین اثر اصلی جدایه				
	SSU107	SSKH41	شاهد	
میانگین آنزیم کاتالاز	۸۶۱/۵۷ b	۱۷۶۸/۶۰a	۶۵۱/۳۸b	
مقایسه میانگین اثر اصلی زمان				
	۳	۶	۱۲	۲۴	۴۸
میانگین آنزیم کاتالاز	۱۴۷۷/۷۳ ab	۷۹۶/۸۷ bc	۱۶۴۹/۴۶ a	۴۶۷/۸۹ c	۹۶۴/۵۹ abc

پراکسیداسیون لیپیدها و میزان مالون دی‌آلدهید: نتایج نشان داد که طی زمان‌های ۳، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با قارچ SSU107 و در تمامی زمان‌های پس از آلودگی با قارچ SSKH41، میزان پراکسیداسیون لیپید و تجمع مالون دی‌آلدهید گیاهان آلوده در مقایسه با شاهد افزایش یافت. کمترین میزان پراکسیداسیون لیپید و تجمع MDA در لاین مقاوم به قارچ SSU107 (لاین C39) مشاهده شد که حاکی از مقاومت نسبی بالای این لاین به بیماری اسکلروتینیا می‌باشد (جدول ۲ و نمودار ۱).

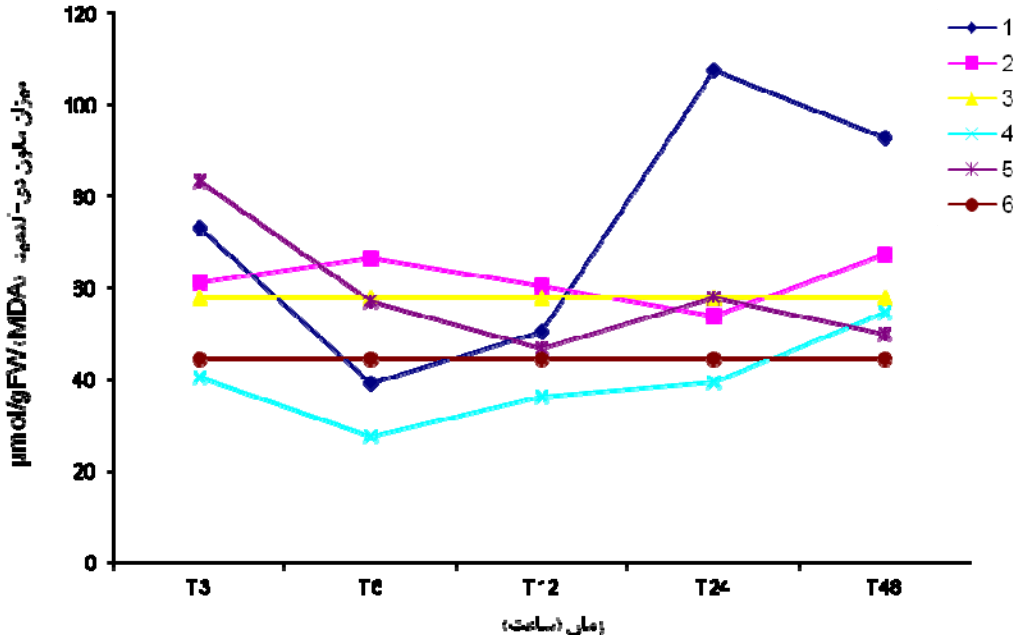
آنزیم کاتالاز: نتایج نشان داد که بیماری اسکلروتینیا باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود، به‌طوری‌که میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب در گیاهان آلوده شده با قارچ SSKH41 و SSU107 در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش داشت. طبق این نتایج، بیشترین فعالیت آنزیمی در زمان-های ۱۲ و ۳ ساعت پس از آلودگی گیاهان مشاهده شد (جدول ۳ و نمودار ۲).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز: نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بین لاین‌های مطالعه شده طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های قارچ اسکلروتینیا متفاوت بود. به‌طوری‌که لاین مقاوم C39 بیشترین فعالیت APX را به ترتیب طی ۶ و ۳ ساعت پس از آلودگی با قارچ SSU107 به خود اختصاص داد (جدول ۴).

جدول ۴- میانگین فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (GPX) در لاین‌های آفتابگردان طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های SSU107 و SSKH41 قارچ اسکلروتینیا

زمان (ساعت)	لاین	جدایه	آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) $\mu molmin^{-1}/gFW$	آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) $\mu molmin^{-1}/gFW$
۳	C100	SSU107	۰/۲۸ d	۰/۴۱ b
		SSKH41	۴/۱۹ d	۰/۳۴ b
		شاهد	۱/۰۳ d	۰/۳۶ b
	C39	SSU107	۲۷/۲۹ b	۰/۱۵ b
		SSKH41	۰/۶۰ d	۰/۳۹ b
		شاهد	۰/۶۱ d	۰/۴۰ b
۶	C100	SSU107	۰/۶۹ d	۰/۳۹ b
		SSKH41	۲/۳۲ d	۰/۳۵ b
		شاهد	۱/۰۳ d	۰/۳۶ b
	C39	SSU107	۵۱/۴۵ a	۰/۳۰ b
		SSKH41	۱/۹۹ d	۰/۳۴ b
		شاهد	۰/۶۱ d	۰/۴۰ b

۰/۲۴ b	۰/۹۲ d	SSU107		
۰/۵۶ b	۱/۳۸ d	SSKH41	C100	
۰/۳۶ b	۱/۰۳ d	شاهد		
۰/۲۲ b	۱۷/۹۴ bc	SSU107		۱۲
۰/۳۱ b	۱/۶۰ d	SSKH41	C39	
۰/۴۰ b	۰/۶۱ d	شاهد		
۰/۲۱ b	۰/۷۶ d	SSU107		
۰/۳۶ b	۰/۹۳ d	SSKH41	C100	
۰/۳۶ b	۱/۰۳ d	شاهد		
۰/۱۶ b	۰/۹۳ d	SSU107		۲۴
۰/۳۱ b	۶/۶۸ cd	SSKH41	C39	
۰/۴۰ b	۰/۶۱ d	شاهد		
۲/۰۵ a	۱/۳۶ d	SSU107		
۰/۴۳ b	۲/۶۲ d	SSKH41	C100	
۰/۳۶ b	۱/۰۳ d	شاهد		
۰/۱۷ b	۰/۷۸ d	SSU107		۴۸
۰/۴۰ b	۵/۰۸ d	SSKH41	C39	
۰/۴۰ b	۰/۶۱ d	شاهد		
۰/۵۳	۱۱/۵۷		LSD 0.05	

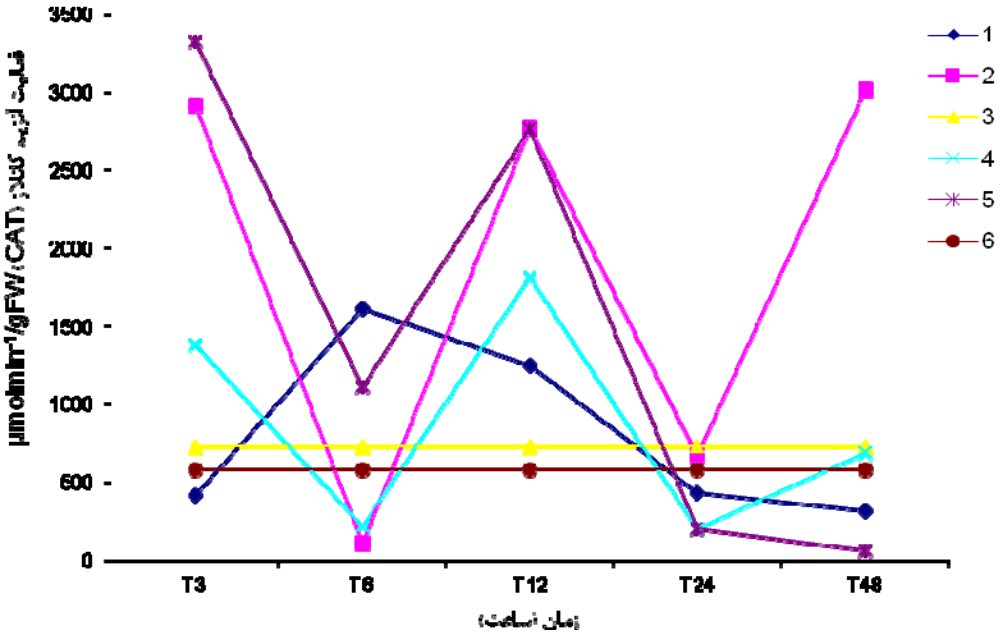


نمودار ۱- تغییرات پراکسیداسیون لیپیدها و میزان مالون دی‌آلدهید (MDA) در لاین‌های C100 و C39 آفتابگردان طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های SSU107 و SSKH41 قارچ اسکلروتینیا

1: C100/SSU107, 2: C100/SSKH41, 3: C100/Control, 4: C39/SSU107, 5: C39/SSKH41, 6: C39/Control

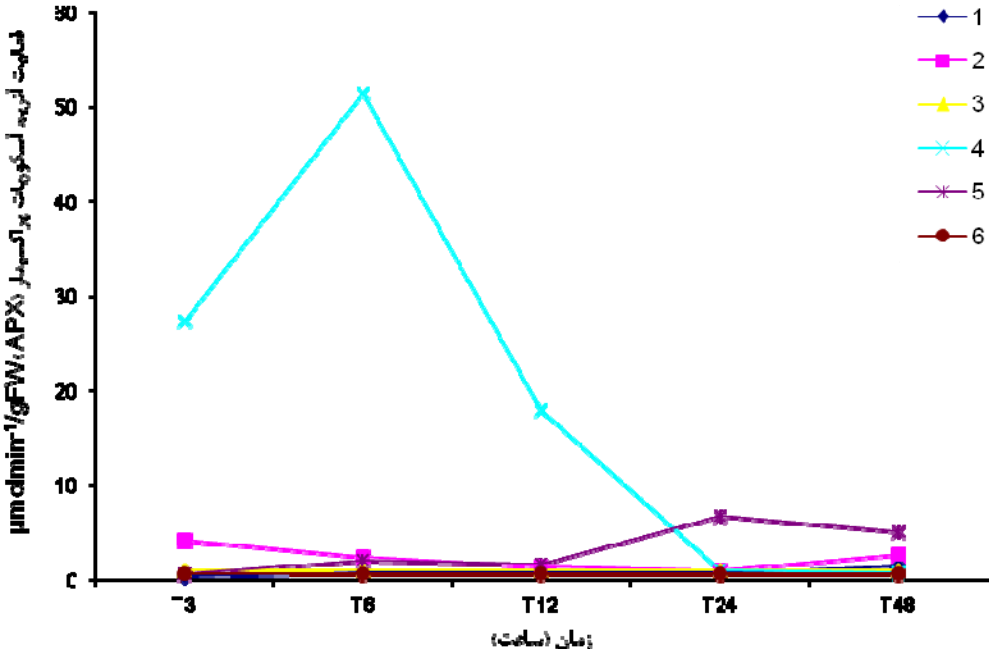
طبق نمودار ۳، اگرچه فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در لاین‌های مقاوم به ۲ قارچ در مقایسه با گیاهان شاهد بیشتر بود، اما این فعالیت طی زمان‌های پس از آلودگی کاهش یافت. با توجه به این نتایج، بیشترین فعالیت آنزیم APX مربوط به لاین مقاوم C39 در مواجه با قارچ SSU107 (گروه ۴) بود. این لاین در مقایسه با لاین حساس C100 (گروه ۱) فعالیت آنزیمی بیشتری در زمان-های ۳، ۶ و ۱۲ ساعت پس از آلودگی از خود نشان داد. در جدایه قارچی SSKH41 نیز، لاین حساس C39 در مقایسه با لاین مقاوم C100 طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی، فعالیت آنزیمی بیشتری داشت. البته میزان آنزیم در لاین حساس به ۲ جدایه قارچی تغییرات معنی-داری نسبت به شاهد نشان نداد. طبق این نتایج، بیشترین فعالیت آنزیمی در بیشتر زمان‌های آلودگی به ۲ قارچ در لاین C39 مشاهده شد که حاکی از مقاومت نسبی بالای این لاین می‌باشد.

آنزیم گایاکول پراکسیداز: میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در بین لاین‌های مطالعه شده طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های قارچ اسکلروتینیا متفاوت بود. به‌طوری‌که بیشترین فعالیت این آنزیم در لاین حساس C100 طی زمان ۴۸ ساعت پس از آلودگی با قارچ SSU107 مشاهده شد (جدول ۴). با توجه به نمودار ۴، لاین حساس C100 (گروه ۱) بیشترین و لاین مقاوم C39 (گروه ۴) کمترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز را در مواجه با قارچ SSU107 داشتند. به‌طوری‌که لاین C100 در مقایسه با C39 در تمامی زمان‌های پس از آلودگی، فعالیت آنزیمی (GPX) بیشتری داشت. در گیاهان آلوده به قارچ SSKH41 نیز، لاین مقاوم C100 (گروه ۲) در مقایسه با لاین حساس C39 (گروه ۵) بیشترین فعالیت آنزیمی را در تمامی زمان‌های پس از آلودگی با این قارچ دارا بود. بنابراین به نظر می‌رسد برخلاف نتایج آنزیم آسکوربات پراکسیداز، لاین C100 در مقایسه با C39 در تمامی زمان-های پس از آلودگی، فعالیت آنزیمی بیشتری را دارا بود.

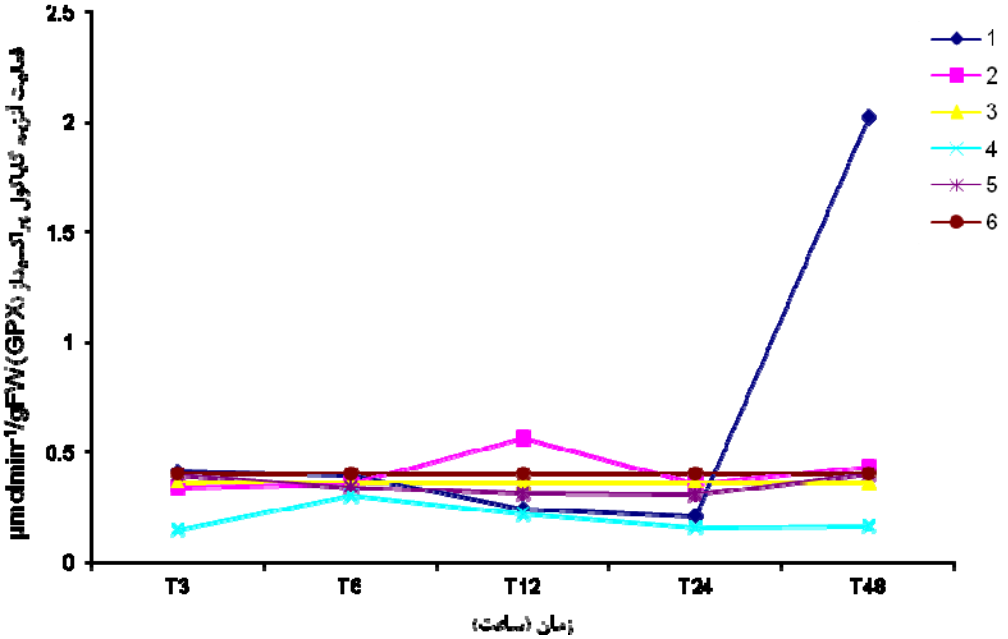


نمودار ۲- تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در لاین‌های C100 و C39 آفتابگردان طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های SSU107 و SSKH41 قارچ اسکلروتینیا

1: C100/SSU107, 2: C100/SSKH41, 3: C100/Control, 4: C39/SSU107, 5: C39/SSKH41, 6: C39/Control



نمودار ۳- تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در لاین‌های C100 و C39 آفتابگردان
طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های SSU107 و SSKH41 قارچ اسکلروتینیا
1: C100/SSU107, 2: C100/SSKH41, 3: C100/Control, 4: C39/SSU107, 5: C39/SSKH41, 6: C39/Control



نمودار ۴- تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) در لاین‌های C100 و C39 آفتابگردان
طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های SSU107 و SSKH41 قارچ اسکلروتینیا
1: C100/SSU107, 2: C100/SSKH41, 3: C100/Control, 4: C39/SSU107, 5: C39/SSKH41, 6: C39/Control

بیشترین تفاوت فعالیت آنزیم بین دو لاین C39 و C100 نیز در فاصله زمانی ۴۸ ساعت پس از آلودگی با قارچ SSU107 و ۱۲ ساعت پس از آلودگی با قارچ SSKH41 مشاهده شد.

بحث

پراکسیداسیون لیپیدها و میزان مالون دی‌آلدهید: هنگام مواجه با پاتوژن‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها رخ می‌دهد (۳۵ و ۴۵). پراکسیداسیون لیپیدها باعث تغییر در میزان مالون دی‌آلدهید می‌شود که به‌عنوان شاخصی معتبر در آفتابگردان در پاسخ به قارچ اسکلروتینیا در نظر گرفته می‌شود (۱۴ و ۳۵). در پژوهشی که Garcia-Limones و همکاران (۲۰) روی برهم‌کنش نخود با قارچ فوزاریوم (*Fusarium oxysporum*) انجام دادند، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها بر اثر واکنش‌های اکسیداتیو گزارش شد. به‌طوری‌که میزان مالون دی‌آلدهید در گیاهان حساس و مقاوم افزایش یافت. اگرچه این افزایش در گیاهان مقاوم بیشتر و سریع‌تر از گیاهان حساس رخ داد. Malencic و همکاران (۲۶) گزارش کردند که سطوح بالای ROS در سویا، باعث آسیب غشاء پلاسمایی و افزایش میزان مالون دی‌آلدهید در گیاهان آلوده به اسکلروتینیا می‌شود. Prats و همکاران (۳۵) انفجار اکسیداتیو در گیاهان آفتابگردان آلوده به اسکلروتینیا را گزارش کردند. در پژوهش آنان میزان مالون دی‌آلدهید در مواجه با قارچ اسکلروتینیا افزایش یافت که این نشان‌دهنده القاء تنش اکسیداتیو بر اثر بیماری بود. در پژوهشی دیگر، میزان مالون دی‌آلدهید به طور قابل توجهی در ریشه‌های گیاه آفتابگردان آلوده به قارچ تریکودرما (*Trichoderma harzianum*) افزایش یافت (۴۳). در این پژوهش تجمع مالون دی‌آلدهید در گیاهان آلوده به بیماری بیشتر بود. این افزایش در لاین حساس بیشتر از لاین مقاوم مشاهده شد، به‌طوری‌که کمترین میزان مالون دی‌آلدهید مربوط به لاین مقاوم C39 در مواجه با قارچ SSU107 بود. احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی برای جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی در این ترکیب لاین–جدایه کافی نبوده است. این نتیجه با پژوهش Davar و همکاران (۱۴) مبنی بر افزایش میزان مالون دی-آلدهید در هر ۲ لاین مقاوم و حساس آفتابگردان آلوده به قارچ اسکلروتینیا تطابق داشت. همچنین در گزارش آنان افزایش در لاین حساس بیشتر از لاین مقاوم بود.

فعالیت آنزیم کاتالاز: کاتالاز اولین آنزیم آنتی‌اکسیدانتی است که باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود (۱۰ و ۱۳). Djebali و همکاران (۱۶) علت تفاوت در فعالیت کاتالاز و فرایندهای بیوشیمیایی اساسی در ریشه یونجه (*Medicago truncatula*) آلوده به کپک (*Aphanomyces euteiches*) را، بیان ژن‌های دخیل در مقاومت دانستند. Peluffo و همکاران (۳۴) نیز در بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در آفتابگردان‌های آلوده به اسکلروتینیا گزارش کردند که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در لاین مقاوم به طور قابل توجهی حدود ۳ برابر در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد. افزایش آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت در مطالعه El-Khallal (۱۷) نیز در مواجه گیاه گوجه‌فرنگی با فوزاریوم گزارش شده است. همچنین Naglaa و Hebe (۳۱) گزارش کردند که فعالیت آنزیم کاتالاز به طور قابل توجهی در برگ‌های لاین‌های حساس و مقاوم کتان تحت بیماری کپک پودری افزایش می‌یابد. Davar و همکاران (۱۴) گزارش کردند که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در لاین‌های مقاوم و کمترین آن در لاین‌های حساس آفتابگردان در مواجه با اسکلروتینیا می‌باشد. همچنین در پژوهشی دیگر روی گیاه آفتابگردان توسط Emamgholi و همکاران (۱۸) فعالیت بیشتر این آنزیم گزارش شده است. طبق نتایج حاصل از این پژوهش لاین‌های حساس و مقاوم در مقایسه با گیاهان شاهد در بیشتر زمان‌های پس از آلودگی، فعالیت کاتالازی بیشتری داشتند. بیشترین فعالیت آنزیمی طی زمان‌های ۱۲ و ۳ ساعت پس از آلودگی گیاهان مشاهده شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: آسکوربات پراکسیدار یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌باشد که در فرایند تبدیل پراکسیدهیدروژن به آب نقش دارد (۱۰، ۱۹ و ۴۱). در گیاه برنج مشاهده شده است که افزایش پراکسیدهیدروژن در شرایط تنش، باعث افزایش بیان ژن-های آسکوربات پراکسیداز شده است. در گیاه آرابیدوپسیس نیز افزایش پراکسیدهیدروژن تحت تأثیر نور زیاد، سبب تغییراتی در انتقال الکترون در پلاستوکینون شد که احتمالاً این تغییر سبب القای ژن‌های مرتبط با آن می-شود (۴۱). مشخص شده است که افزایش فعالیت پراکسیدازها اغلب همراه با تشکیل تعدادی از فرم‌های جدید و از بین رفتن تعدادی از فرم‌های آنزیم آسکوربات پراکسیداز می‌باشد (۳۲). Singh و همکاران (۴۳) گزارش کردند که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه آفتابگردان آلوده به قارچ تریکودرما افزایش می‌یابد. گیاهچه‌های حساس و خیلی حساس گوجه‌فرنگی نیز در مقایسه با انواع مقاوم، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز کمتری را در مواجه با پوسیدگی باکتریایی از خود نشان دادند (۱۲). در این پژوهش، میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان مقاوم و حساس افزایش پیدا کرد، اما این افزایش در گیاهان مقاوم محسوس‌تر و بیشتر بود. این نتایج با نتایج دیگر پژوهش‌ها (۳ و ۱۴) مطابقت داشت. بیشترین فعالیت این آنزیم نیز در بیشتر زمان‌های پس از آلودگی، در لاین C39 مشاهده شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: پراکسیدازها متعلق به خانواده بزرگ آنزیم‌هایی می‌باشند که در همه موجودات وجود دارند. آنزیم گایاکول پراکسیداز یکی از مهمترین پراکسیدازها می‌باشد (۲۹). این آنزیم در واکنش‌های دفاعی به پاتوژن‌ها و در حذف پراکسیدهیدروژن نقش دارد. به‌طوری‌که حضور پاتوژن در سلول‌های پارانشیمی بافت میزبان، باعث فعال نمودن چرخه آسکوربات-گلوتاتیون و تجزیه مولکول‌های پراکسیدهیدروژن می‌شود (۲۰). Malencic و همکاران (۲۵) لاین‌های خالص آفتابگردان با حساسیت‌های متفاوت را به قارچ اسکلروتینیا با اگزالیک اسید تیمار کردند. نتایج آنان نشان داد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در لاین-های بررسی شده دیده می‌شود. به‌طوری‌که این میزان در ساقه و برگ لاین‌های مقاوم بیشتر بود. در پژوهش Singh و همکاران (۴۳) نیز میزان این آنزیم در گیاه آفتابگردان آلوده به قارچ تریکودرما افزایش یافت. در نتایج Davar و همکاران (۱۴) میزان فعالیت این آنزیم با توجه به زمان و لاین مورد مطالعه آفتابگردان متفاوت بود. به‌طوری‌که در هر ۲ لاین مقاوم و حساس میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافت. اما در بیشتر زمان‌های پس از آلودگی، میزان این فعالیت در انواع مقاوم در مقایسه با شاهد بیشتر بود. طبق نتایج حاصل از این پژوهش، بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در لاین حساس C100 در ۴۸ ساعت پس از آلودگی با قارچ SSU107 مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد مسیر تحریک ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی مختلف متفاوت است و تابع ژنتیک رقم می‌باشد، در نتیجه پیام واحدی برای تحریک کل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی صادر نمی‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که بیماری اسکلروتینیا باعث افزایش تغییرات در خصوصیات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی گیاهان آلوده می‌شود. لاین‌های حساس و مقاوم نیز پاسخ‌های متفاوتی در واکنش به این بیماری نشان دادند که این خود به علت تفاوت گیاهان مقاوم و حساس می‌باشد. طبق این نتایج، میزان پراکسیداسیون لیپیدها و تجمع مالون دی‌آلدهید در لاین‌های مقاوم کاهش یافت که کمترین این میزان در لاین مقاوم C39 در مواجه با قارچ SSU107 مشاهده شد. همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به‌ترتیب در لاین‌های مقاوم و حساس به جدایه‌های قارچی بیشتر بود. به‌طوری‌که لاین مقاوم C39 بیشترین فعالیت آسکوربات پراکسیداز را پس

از آلودگی با قارچ SSU107 به خود اختصاص داد. این در حالی است که لاین حساس C100 فعالیت گایاکول پراکسیداز بیشتری پس از آلودگی با قارچ SSU107 داشت. طبق نتایج این تحقیق، لاین C39 به دلیل دارا بودن کمترین میزان پراکسیداسیون لیپید و بیشترین فعالیت آنزیمی که ازجمله مکانیسم‌های دفاعی گیاه را در برابر پاتوژن‌ها است، مقاومت نسبی مناسبی از خود نشان داد. با بررسی تغییرات بیوشیمیایی و مکانیسم‌های مقاومت به بیماری اسکلروتینیا در لاین‌های آفتابگردان، می‌توان تحقیقات وسیع و دقیق‌تری در دیگر لاین‌های این محصول و سایر مکانیسم‌های مقاومت به این بیماری انجام داد. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی این گیاهان برای تولید ارقام مقاوم به این بیماری مفید واقع شود. امید است با تحقیقات تکمیلی در برنامه‌های به‌نژادی این محصول، به شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با مقاومت برای دستیابی به ارقام مقاوم به بیماری اسکلروتینیا دست یافت.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان از مسئولان محترم دانشکده کشاورزی، پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه و همچنین از دست اندرکاران انستیتو تحقیقات آگرونومی تولوز فرانسه به دلیل در اختیار گذاشتن بذر لاین‌های مورد مطالعه، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱- ارشاد، ج.، ۱۳۷۴. قارچ‌های ایران. انتشارات سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی. ۸۷۴ ص.

۲- امینی، ز.، معلمی، ن.، و سعادتی، ص.، ۱۳۹۳. مقایسه اثر تنش کم آبی بر تغییرات میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سه رقم زیتون (*Olea europaea* L.). مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷ (۲): ۱۶۷-۱۵۶.

۳- داور، ر.، ۱۳۸۹. برهمکنش گیاه آفتابگردان و قارچ اسکلروتینیا: بررسی مقایسه ای ساختار تشریحی، تغییرات ساختاری و تکوینی ساقه در لاین های مقاوم و حساس و ژنتیک مقاوم به بیماری. رساله دکتری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه تربیت معلم تهران.

۴- روحی، ل.، زمانی، م.ر.، و مطلبی، م.، ۱۳۹۲. انتقال ژن بتا ۱ و ۳ گلوکاناز (bgnI) از *Trichoderma virens* به گیاه کلزا جهت ایجاد مقاومت علیه قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۶ (۱): ۴۰-۲۸.

۵- عموآقایی، ر.، قربان‌نژاد نی‌ریزی، ه.، و مستاجران، ا.، ۱۳۹۳. بررسی اثر شوری بر رشد گیاهچه، میزان کلروفیل، محتوای نسبی آب و پایداری غشا در دو رقم کلزا. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷ (۲): ۲۶۸-۲۵۶.

۶- عموزاده، م.، ۱۳۹۱. شناسایی مکان ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت جزئی به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی طوقه در آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه ارومیه.

۷- محمدی، ع.، ابراهیم‌زاده، ح.، هادیان، ج.، و میرمعصومی، م.، ۱۳۹۴. واکاوی اثر تنش خشکی بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه به لیمو *Lippia citriodora* H.B.K.. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۸ (۳): ۶۲۸-۶۱۷.

8- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology, 105: 121–126.

9- Amoozadeh, M., Darvishzadeh, R., Davar, R., Abdollahi-Mandoulakani, B., Haddadi, P. and Basirnia, A. 2015. Quantitative trait loci associated with isolate specific and isolate non-specific partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. Journal of Agricultural Science and Technology, 17: 213–226.

10- Barbosa-Nascimento, J., Freitas Barrigossi, J.A. 2014. The role of antioxidant enzymes in plant defense against herbivorous insects and phytopathogens. Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer–Goiânia, 1: 234–250.

11- Burhenne, K., Gregersen L. 2001. Up-regulation of the ascorbate-dependent antioxidative system in barley leaves during powdery mildew infection. Molecular Plant Pathology, 1: 303–314.

12- Chandrashekar, S., Umesha, S. 2012. Induction of antioxidant enzymes associated with bacterial spot pathogensis in tomato. International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences, 2: 22–34.

13- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van, M.M., Inzé, D.V. and Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species durino plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences, 57: 779–795.

14- Davar, R., Darvishzadeh, R. and Majd, A. 2013. Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Biologia, 68: 821–829.

15- Deponte, M. 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. Biochimica et Biophysica Acta, 1830: 3217–3266.

16- Djebali, N., Mhadhbi, H., Lafitte, C., Dumas, B., Esquerre-Tugaye, M.T., Aouani, M.E. and Jacquet, C. 2011. Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. European Journal of Plant Pathology, 131: 559–571.

17- El-Khallal, S.M. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plants against fusarium wilt disease by bioagent fungi (*Arbuscular mycorrhiza*) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid and salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related proteins. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 1: 717–732.

18- Emamgholi, A., Zaefizadeh, M. and Imani, A. 2015. The proteomic analysis of resistance to *Sclerotinia Sclerotiorum* fungus in sunflower seedling stage. Trend in Life Science, 4: 2319–5037.

19- Foyer, C.H., Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta, 133: 21–25.

20- Garcia-Limones, C., Hervas, A., Navas-Cortes, j., Jime nes-Diaz, R. and Tena, M. 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interaction between chickrea (*Cicer arietinum* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology, 61: 325–337.

21- Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125: 850–857.

22- Jung, S., Kim, J.S., Cho, K.Y., Tae, G.S. and Kang, B.G. 2000. Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photo inhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. Plant Science, 153: 145–154.

23- Kang, H.M., Saltiveit, M.E. 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling (leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid. Physiologia Plantarum, 115: 577–576.

24- Lombardi, L., Sebastiani, L. 2005. Copper toxicity in *Prunus* cerasifera: growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. Plant Science, 168: 797–802.

25- Malencic, D.J., Vasic, D., Popovic, M. and Devic, D. 2004. Antioxidant systems in sunflower as affected by oxalic acid. Biologia Plantarum, 48: 243–247.

26- Malencic, D., Kiprovski, B., Popovic, M., Prvulovic, D. Miladinovic J. and Djordjevic, V. 2010. Changes in antioxidant systems in soybean as affected by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 903–908.

27- Masella, R., Di-Benedetto, R., Varì, R., Filesi, C. and Giovannini, C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. The Journal of Nutritional Biochemistry, 16: 577–586.

28- Milavec, M., Gruden, K., Ravnikar, M. and Kovac, M. 2008. Peroxidases in the early responses of different potato cultivars to infection by potato virus YNTN. Plant Pathology, 57: 861–869.

29- Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. Journal of Plant Cell Physiology, 22: 867–880.

30- Nanda, A.K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N. and Dunand, C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. Journal of Integrative Plant Biology, 52: 195–204.

31- Naglaa, A.A., Heba, I.M. 2011. Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to powdery mildew. World Journal of Agricultural Sciences, 7: 78–85.

32- Nagy, Z., Westerberg, H. and Klingberg, T. 2004. Maturation of white matter is associated with the development of cognitive functions during childhood. Journal of Cognitive Neuroscience, 16: 1227–1233.

33- Paniego, N., Heinz, R., Fernandez, P., Talia, P., Nishinakamasu, V. and Hopp, H.E. 2007. Oil seeds, in *Genome Mapping and Molecular Breeding in plants*, Volume 2, Kole, K. (Ed.). Heidelberg, Germany. Springer, Verlag, pp. 1–21.

34- Peluffo, L., Lia, V., Troglia, C., Maringolo, C., Norma, P., Escande, A., Hopp, H.E., Lytovchenko, A., Fernie, A.R., Heinz, R. and Carrari, F. 2010. Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. Phytochemistry, 71: 70–80.

35- Prats, E., Bazzalo, M.E., Leon, A. and Jorrin, J.V. 2003. Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Euphytica, 132: 321–329.

36- Price, K., Colhoun, J. 1975. A study of variability of isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary from different hosts. Journal of Phytopathology, 83: 159–166.

37- Rojas, E.V. 2014. Physiological, anatomical and molecular characterization of partial resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. PhD dissertation, Faculty of Agriculture, University of Guelph, Canada.

38- Saharan, G.S., Mehta, N. 2008. Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. Heidelberg, Germany. Springer, Verlag, p. 486.

39- Schneiter, A.A., Miller, J.F. 1981. Description of sunflower growth stages. Crop Science, 21: 901–903.

40- Sharma, R., Meena, P.D., Verma, P.R., Saharan, G.S., Naresh, M., Singh, D. and Arvind-Kumar, A. 2015. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causing Sclerotinia rot in oilseed Brassicas: A review. Journal of Oilseed Brassica, 6: 1–44.

41- Shigeru, S., Takahiro, I., Masahiro, T., Yoshiko, M., Toru, T., Yukinori, Y. and Kazuya, Y. 2002. Regu1ation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. Journal of Experimental Botany, 5: 1305–1319.

42- Singh, B.N., Singh, B.R., Sarma, B.K. and Singh, H.B. 2009. Potential chemoprevention of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by polyphenolics from Acacia nilotica bark. Chemico-Biological Interactions, 181: 20–28.

43- Singh, B.N., Singh, A., Singh, S.P. and Singh, H.B. 2011. Trichoderma harzianum-mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. European Journal of Plant Pathology, 131: 121–134.

44- Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, N., Sankhla, N. and Smith, B.N. 1985. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Journal of Plant Physiology, 121: 453–461.

45- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: anearly palant response to pathogen infection. Biochemical Journal, 322: 681–692.

Evaluation of biochemical changes and enzymatic activity of sunflower (*Helianthus annuus* L.) susceptible and resistant lines in response to Sclerotinia disease

Darvishzadeh R.[1,2], Arjomand N.[3], Najafzadeh R.[4] and Heydari R.[3]

[1] Plant Breeding and Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

[2] Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

[3] Biology Dept., Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

[4] Medicinal Plants Dept., Shahid Bakeri Higher Education Center, Urmia University, Miyandoab, I.R. of Iran

Abstract

Sclerotinia is important fungal disease of sunflower in Iran that affects its yield. So, evaluation of phenotypic and molecular reaction of genotypes to agent of disease is particular importance to producing resistant hybrid cultivars. In this study, biochemical and enzymatic changes of sunflower lines (C39 and C100) were studied during different times after inoculation of the lines with Sclerotinia fungal isolates (SSU107 and SSKH41) under controlled conditions as a factorial based on completely randomized design (CRD). For this purpose, characteristics such as lipids peroxidation and accumulation of malon dialdehyde (MDA), antioxidant enzymes' activity like catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX) were studied. The results showed that Sclerotinia disease increased the biochemical and enzymatic changes of the plants infected with fungal isolates. Resistant and susceptible lines also showed a different response to the disease, so that the accumulation of MDA in resistant lines decreased, the least of which was observed in resistant line C39 inoculated with SSU107. In addition ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase enzymes' activities were more in resistant and susceptible lines, respectively. So, the APX enzymatic activity increased in the line C39 and the GPX enzymatic activity increased in the line C100 after inoculation with SSU107 fungal isolate. According to the results of this study, the line C39 showed good partial resistance, because of the lowest level of lipid peroxidation and the highest enzymatic activities that causes resistance mechanism of plant against pathogens. The founding of this study can be useful in sunflower breeding programs for producing cultivars resistance to Sclerotinia disease.

Key words: Sunflower, Sclerotinia, Lipid peroxidation, Enzymatic activity and Resistance.