

## بررسی فعالیت اینورتازها و غلظت کربوهیدرات‌های محلول در مراحل رشدونموی چندگونه گل‌جالیز در گوجه‌فرنگی

زهرا فرخی<sup>۱</sup>، حسن علیزاده<sup>۲\*</sup> و هوشنگ علیزاده<sup>۳</sup>

۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استاد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۱۹)

### چکیده

گل‌جالیز یک گیاه تمام‌انگل اجباری در بسیاری از گیاهان زراعی مهم از جمله گوجه‌فرنگی است. موفقیت در مدیریت و مهار (کنترل) گل‌جالیز ناچیز بوده، بنابراین شناخت سازوکار و استفاده از ساکارز به‌عنوان یک فرآیند حیاتی برای انگل می‌تواند به توسعه راهبرد (استراتژی)‌های مدیریت و مهار اختصاصی آن کمک کند. این انگل به‌عنوان مخزن (سینک) رقابتی برای ساکارز بوده، آن را در غده تجزیه و به گلوکز و فروکتوز تبدیل می‌کند. اینورتازها مهم‌ترین آنزیم‌های تجزیه‌کننده ساکارز و تنظیم اسمزی در انگل هستند. در این نوشتار، فعالیت دو اینورتاز (*PrCWI* و *PrSAI*) درگیر در تبدیل ساکارز در مراحل مختلف رشد و نمو سه گونه انگل (مصری، راموزا و نانا) هنگام اتصال به گوجه‌فرنگی بررسی شد. مشاهدات مؤید فعالیت این دو آنزیم در همه مراحل رشدی گونه‌های مختلف انگل است. اما میزان فعالیت آنزیم *PrSAI* همواره بالاتر از *PrCWI* بود. باگذشت زمان، میزان فعالیت *PrSAI* افزایش ولی میزان فعالیت *PrCWI* کاهش یافت. فعالیت آنزیم‌ها، میزان پروتئین و قند در گونه مصری در مراحل اولیه بالاتر بوده و با ظهور سریع‌تر این گونه در میزبان ارتباط داشت ولی این فعالیت در گونه راموزا در مراحل انتهایی بیشتر بوده که با شمار شاخه و زیست‌توده (بیوماس) بالاتر همخوانی داشت. نتایج نشان داد، ژن‌های کدکننده *PrSAI* و به‌احتمال *PrCWI* می‌توانند هدف‌های خوبی برای راهبرد خاموشی ژن در جهت مدیریت و مهار این گیاه انگل باشند.

**واژه‌های کلیدی:** تنظیم اسمزی، ساکارز، فعالیت آنزیم، قندهای کاهشی، گوجه‌فرنگی.

### Study of invertases activity and soluble sugar concentration at developmental stages of some broomrape species on tomato

Zahra Farrokhi<sup>1</sup>, Hassan Alizade<sup>2</sup>, Houshang Alizadeh<sup>3</sup>

1, 2 and 3. Ph.D student, Profesor and Assistant Professor of college of agriculture and natural resources, University of Tehran

(Received: June 6, 2017 - Accepted: July 10, 2017)

### ABSTRACT

Broomrape is an obligate parasite in many economically important crops such as tomato. Success in controlling broomrape is rare hence an understanding of sucrose utilization mechanisms as a critical process for parasite provides developing specific control strategies. This parasite acts as a competitive sink for sucrose, utilizes it in the tuber and converts it to glucose and fructose. Invertases are the major enzymes in sucrose degradation and osmotic adjustment in the parasite. In this paper, the activity of two invertases (*PrSAI* and *PrCWI*) involved in different developmental stages of some broomrape species (*Phelipanche aegyptiaca*, *P. ramosa* and *P. nana*) on tomato was studied. Results showed that activity of both mentioned enzymes were detected in all of the developmental stages in the broomrape species; although the *PrSAI* activity was always higher than the *PrCWI* activity. The activities of *PrSAI* and *PrCWI* was increased and decreased, respectively, as progressing of the developmental stages of broomrape. Enzymes activity and protein and sugar amounts in Egyptian broomrape were high at the early stages and in branched broomrape in the late stages, the first case accorded to the earlier emergence of broomrape on the host and the later one accorded to more shoots and higher biomass in broomrape. In total, results suggested that *PrSAI* and, possibly, *PrCWI* are suitable targets for gene silencing strategies.

**KeyWords:** Osmotic adjustment, sucrose, enzyme activity, reducing sugars, Tomato.

\* Corresponding author E-mail: malizade@ut.ac.ir

### مقدمه

گل‌جالیز (*Orobancha* spp. or *Phelipanche* spp.) یکی از مهم‌ترین علف‌های هرز انگلی جهان و ایران است که به ریشه‌بسیاری از گیاهان زراعی مهم به‌ویژه در نواحی اطراف مدیترانه، خاورمیانه و شرق اروپا حمله کرده و آسیب و زیان سالانه آن به گیاهان زراعی خوراکی میلیاردها دلار برآورد شده است به‌طوری‌که کاهش عملکرد سالانه ناشی از این علف هرز در خاورمیانه، ۱/۳ تا ۲/۶ میلیارد دلار برآورد شده است (Aly, 2007) و سطح آسیب بسته به میزان آلودگی می‌تواند بین بدون آسیب تا نابودی کامل محصول باشد (Hershenhorg et al., 2009). عملکرد گوجه‌فرنگی، که گیاهی مهم و ارزشمند از جنبه اقتصادی است، به‌شدت توسط گل‌جالیز آسیب می‌بیند (Parker & Riches, 1993). از نظر پدیدگانی (فنتویی)، آسیب و زیان ایجادشده با نشانه‌هایی مانند پژمردگی، توقف رشد و از همه مهم‌تر کاهش عملکرد بروز می‌کند (El-Hamouch et al., 2006). به دلیل زندگی بسیار تخصصی، رشد زیرزمینی و مخفی، ارتباط نزدیک و رشد هماهنگ با میزبان، تولید حدود ۲۰۰۰۰۰ بذر در هر بوته با بیش از ۱۵ سال قابلیت زنده‌مانی در خاک (Aly, 2007) و سازوکار هوشمند جوانه‌زنی بذر (Westwood et al., 2012) مدیریت و مهار (کنترل) این انگل گیاهی با روش‌های معمول مکانیکی و شیمیایی پیچیده و حتی غیرممکن است (Goldwasser & Kleifeld, 2004). از این‌رو، باید با شناخت دقیق ویژگی‌های سوخت‌وسازی (متابولیک) و فیزیولوژیک انگل، به دنبال راهبرد (استراتژی)‌های مدیریت و مهار اختصاصی و مؤثر بود (Aly et al., 2009). تحقیقات زیادی در جهت درک بهتر فرآیندهای درگیر در تنظیم اسمزی انگل (Simier et al., 1994) جریان کربن و نیتروژن از گیاهان میزبان به علف‌های هرز انگل (Pageau et al., 1998) و سوخت‌وساز (متابولیسم) کربن و نیتروژن در انگل صورت گرفته است (Fer et al., 1993; Simier et al., 1994). به دلیل پایین بودن میزان تعرق و جریان آب گل‌جالیز در آوند چوب، حرکت آب و عنصرهای غذایی از گیاه میزبان و رشد انگل از طریق تنظیم اسمزی با تجمع بالای پتاسیم و قندهای محلول صورت می‌گیرد (Abbes et al., 2009). نتایج بررسی‌ها نشان داده است، ساکارز مهم‌ترین ترکیب گرفته‌شده از میزبان توسط گل‌جالیز بوده ولی در غده تجزیه و به منوساکاریدها تبدیل می‌شود (Aber et al.,

1983). این تبدیل در گیاهان از طریق دو نوع آنزیم صورت می‌گیرد: ساکارزسینتازها و اینورتازها. سه نوع ایزوآنزیم اینورتاز شناسایی شده است: الف- اینورتاز اسیدی محلول (SAI)، ب- اینورتاز دیواره یاخته‌ای (CWI) و ج- اینورتاز خنثی محلول (SNI). تجمع هگزوزها به‌ویژه در شاخه‌های در حال رشد، هم رشد اندام‌های زیرزمینی و هم رشد اندام‌های هوایی نشان می‌دهد که اینورتازها نقش عمده‌ای را در کل زمان رشد انگل پس از اتصال بازی می‌کنند (Abbes et al., 2002, Delavault et al., 2009). پنج ژن کدکننده این آنزیم‌ها در *P. ramosa* توسط Draie et al. (2011) شناسایی، و بیان و فعالیت آن‌ها طی مراحل مختلف رشدونمو انگل بررسی شده است. بررسی آنان نقش فعال اینورتاز واکوئلی *PrSAII* را در آماس (تورژسانس) یاخته‌ای و رشد، در کل چرخه زندگی انگل *P. ramosa* نشان داد (Draie et al., 2011). فعالیت دیگر اینورتاز مورد بررسی، *PrCWI*، در بذرهای جوانه‌زده در مقایسه با بذرهای پس از گذراندن دوره پیش‌آمدگی<sup>۱</sup> ۵ برابر افزایش یافت که نشان می‌دهد آنزیم *PrCWI* انگل می‌تواند بر توان مخزن ریشه‌های آلوده‌شده در مراحل اولیه و در فرآیند نفوذ به ریشه میزبان تأثیر بگذارد. اما نتایج بررسی‌ها نشان داده‌اند، فشار اسمزی گونه‌های مختلف گل‌جالیز متغیر بوده و به‌صورت ثابتی بیشتر یا کمتر از میزبان نیست (Whitney, 1972). به‌عنوان مثال، Kokina (1946) گزارش کرد که میزان فشار اسمزی *O. sulphurea* از فشار اسمزی توتون بیشتر ولی از گوجه کمتر، و فشار اسمزی *O. aegyptiaca* بیشتر از توتون و گوجه‌فرنگی است. نتایج بررسی دیگری نشان داد، در گل‌جالیز رشدیافته روی دو میزبان *Petunia hybrida* و *Solanum melongena* غلظت قندهای کاهش‌یافته و غیرکاهشی در ریشه‌های هر دو میزبان، برابر بوده اما این نسبت در گل‌جالیز رشد کرده روی میزبان *Petunia* حدود ۲:۱ و در گل‌جالیز رشد کرده روی *Solanum*، ۳:۱ بود (Singh et al., 1968) که نشان‌دهنده توان مخزن و فعالیت بالاتر آنزیم‌های تبدیل‌کننده ساکارز در این انگل هنگام اتصال به میزبان *Solanum* است. بررسی روابط نیتروژن و کربن بین علف‌هرز انگل *Orobancha foetida* و رگه (لاین)‌های حساس و مقاوم باقلا نشان داد، رشد انگل

حال رشد (SIV)<sup>۴</sup>، ۵) غده ساقه گل‌دار رویش یافته از خاک (Tub-FS)<sup>۵</sup>، ۶) ساقه گل‌دار در حال رشد (AP)<sup>۶</sup>، ۷) بخش پایه‌ای سنبله (BP)<sup>۷</sup> که گل نداشته و بزرگ‌تر و فیبری‌تر از ساقه گل‌دار است و ۸) ساقه گل‌دار حامل میوه‌های در حال رشد (FCDS)<sup>۸</sup>. بذرهای پیش‌آماده شده و اندام‌های گیاهی به سرعت با نیتروژن مایع فریز و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. تاریخ ظهور نخستین انگل، کل زیست‌توده (بیوماس) تولیدشده و شمار شاخه‌های هرگونه انگل یادداشت و اندازه‌گیری شد. آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی بر پایه طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد.

### استخراج اینورتازها

استخراج آنزیم‌های *PrSAI* و *PrCWI* از بافت‌های گیاهی در مراحل مختلف رشدونموی گل‌جالیز با روش *Draie et al.* (2011) با اندکی تغییر صورت گرفت. به‌طور خلاصه، بافت منجمد مربوط به اندام‌ها و مراحل مختلف نموی گل‌جالیز (۳/۰ گرم) با هاون پیش‌سردشده با نیتروژن مایع، پودر شده و بافر استخراج A شامل ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCL (pH=7)، ۵ میلی‌مولار EDTA، ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک‌اسید، ۱ میلی‌مولار بتامرکاپتواتانول، ۰/۱ میلی‌مولار PMSF می باشد که ۰/۱۵ گرم PVPP به آن اضافه و همگن‌سازی (هموژنیزه) شد. آنگاه با سرعت ۱۲۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سلسیوس و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و محلول روشناور برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم *PrSAI* استفاده شد. رسوب باقیمانده به‌منظور آماده‌سازی برای استخراج اینورتاز باندشده به دیواره یاخته‌ای (*PrCWI*) با همان بافر استخراج A منهای PVPP چندین بار شستشو و محلول روشناور پس از شستشو حذف شد. سپس بافر A حاوی NaCl ۱ مولار به رسوب اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس روی شیکر با دور آرام قرار گرفت. پس از سانتریفوژ با شرایط پیش، روشناور برای اندازه‌گیری آنزیم *PrCWI* استفاده شد. همه مراحل استخراج در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. محتوای پروتئین با آزمون Coomassie blue binding

باواسطه فعالیت اینورتاز محلول صورت گرفته و این رشد پس از اتصال به ریشه‌های رقم متحمل محدود می‌شود. تأخیر رشد غده در انگل در رگه متحمل به دلیل کاهش ظرفیت بهره‌برداری از کربوهیدرات‌های میزبان و توان مخزن (سینک) پایین‌تر ناشی از فعالیت پایین اینورتازهای محلول در غده‌ها و به‌ویژه شاخه‌ها است (Abbes *et al.*, 2009). هدف این تحقیق، شناخت تغییر و مقایسه فعالیت آنزیم‌های اینورتاز در مراحل مختلف رشدونموی و در گونه‌های مختلف انگل است. افزون بر این می‌توان ارتباط احتمالی فعالیت این آنزیم‌ها با توان مخزن یک‌گونه خاص انگل، ترجیح میزبانی یا زمان ظهور و میزان وزن خشک تولیدی انگل را بررسی کرد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی، کاشت، تیمارها و نمونه‌گیری

بذرهای گل‌جالیز مصری (*P. aegyptiaca*)، راموزا (*P. ramosa*) و نانا (*P. nana*) از سنبله‌های گل‌دهنده انگل به ترتیب از شهرستان ساوجبلاغ استان البرز، شهرستان سنج استان کردستان و شهرستان شهرکرد استان چهارمحال و بختیاری در تابستان سال ۱۳۹۳ گردآوری و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شدند. این بذرها با ترکیب خاکی ۱:۱ (خاک مزرعه-ماسه) در گلدان‌های ۶ لیتری (۱۰ میلی‌گرم بذر/لیتر خاک) کاشته شدند. کاشت بذرهای گل‌جالیز بنا بر کار *Draie et al.* (2011) صورت گرفت. پس از گذشتن دوره یک‌هفته‌ای پیش‌آمادگی برای بذرهای انگل، نشاهای ۳-۴ برگی گوجه‌فرنگی به گلدان اصلی منتقل شدند. گیاهان به‌طور هفتگی با یک محلول استریل غذایی محلول‌پاشی شده و در اتاقک رشد با شرایط ۸/۱۶ ساعت (نور/تاریکی) و در دمای ۲۰/۲۵ درجه سلسیوس (روز/شب) پرورش داده شدند. ۳ ماه پس از نشاء، ریشه گیاهان گوجه به‌آرامی از خاک خارج و بخش‌های مختلف گل‌جالیز از روی ریشه گوجه‌فرنگی برداشت و به مراحل رشد و نموی زیر تقسیم‌بندی شدند: ۱) بذرهای پیش‌آماده شده (Pre-1 - seeds)، ۲) غده در حال رشد (TubIII)<sup>۲</sup>، ۳) غده ساقه زیرزمینی در حال رشد (Tub.SIV)<sup>۳</sup>، ۴) ساقه زیرزمینی در

4.Subterranean shoot

5.Tubercle of flowering shoot

6.Apical part of flowering shoot

7.Basal part of flowering shoot

8.flowering shoots bears Fruits Containing Developing Seeds

1. Preconditioned-seeds

2. Tubercle

3.Tubercle of subterranean shoot

دستگاه پلیتری‌در در طول موج ۵۴۰ نانومتر تشخیص داده شدند. منحنی استاندارد با استفاده از گلوکز با دامنه ۵۰ تا ۵۰۰ میکروگرم رسم شد (Hacham et al., 2016).

(Bradford, 1976). و آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها

برای حذف عامل‌های کاهش‌دهنده و ترکیب‌های ثانویه‌ای که ممکن است فعالیت اینورتازها را بازدارندگی کنند، پیش از اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، عصاره‌ها با کمک ستون PD-10 Sephadex (GE Healthcare, France) نمک‌زدایی شدند. پیش از انجام نمک‌زدایی، ستون‌ها با بافر فسفات سدیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=5) همراه با ۰/۱ میلی‌مولار PMSF متعادل شدند. واکنش آنزیمی با افزودن ساکارز تا غلظت نهایی ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱-۵ میکروگرم پروتئین نمک‌زدایی به بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=5) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انجام شد. توقف واکنش با افزودن بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=7.5) و سپس گرم کردن لوله‌ها در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه صورت گرفت. پس از خنک شدن، مخلوط واکنش سانتریفوژ و لایه روشن‌آور به لوله جدید منتقل شد. سپس به هر کدام از لوله‌ها، ۱/۵ میلی‌مولار NADP، ۱/۵ میلی‌مولار ATP، ۲ میلی‌مولار  $MgCl_2$  و یک یونیت از آنزیم‌های هگزوکیناز و گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز اضافه شد. پس از قرار گرفتن مخلوط واکنش در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، تبدیل گلوکز کامل شد. فعالیت آنزیم با کمک دستگاه پلیتری‌در در طول موج ۳۴۰ نانومتر و با پلیت UV Star (Greiner) تعیین و با کمک منحنی استاندارد تهیه‌شده از سریال رقت NADPH، از میزان نانومول NADPH تولیدشده در ثانیه (nkat) محاسبه شد.

### اندازه‌گیری کل قندهای کاهشی

۵۰ میلی‌گرم پودر نمونه از هر مرحله نمونه در ۵۰۰ میکرولیتر بافر استات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=4.8-5.2) همگن‌شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری و سپس با دور ۶۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. به لایه روشن‌آور به دست آمده محلول شناساگر Sumner اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در حمام بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از خنک شدن، قندهای کاهشی با استفاده از

### محاسبه آماری

تجزیه واریانس با کمک نرم‌افزار R و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ انجام شد. نمودارها در برنامه اکسل (Excel) رسم شد.

### نتایج و بحث

#### ظهور، وزن خشک و شمار بوته‌های گل‌جالیز در گونه‌های مختلف

ظهور نخستین بوته گونه‌های مصری، راموزا و نانا در میزبان گوجه‌فرنگی به ترتیب ۵۲، ۶۶ و ۹۳ روز پس از نشای گوجه‌فرنگی رخ داد. کل زیست‌توده تولیدی انگل در طول فصل رشد در سه گونه مختلف به ترتیب ۲/۲۵، ۳۰/۹ و ۱/۵ گرم بود. میانگین شمار گل‌جالیز رویش یافته در دو گونه مصری و راموزا به ترتیب ۶/۶۳، ۸/۱۳ به ازای هر گلدان بود. از بین ۸ گلدان گوجه‌فرنگی آلوده به بذرنانا، تنها انگل در یک گلدان ظاهر شده و به‌رغم سلامت میزبان، در مراحل آغازین رشد از بین رفت. بنابراین امکان بررسی فعالیت آنزیم و دیگر آزمایش‌ها برای این انگل وجود نداشته و در ادامه، آزمایش‌ها روی دو گونه مصری و راموزا انجام شد. در نتایج بررسی‌های دیگر نیز گزارش شده است که گونه *P. nana* بیشتر به گونه‌های وحشی گیاهان حمله کرده و به‌ندرت به خانواده‌های گیاهان زراعی حمله می‌کند (Crescenzi et al., 2015). در ایران نیز این گونه تنها روی درختان بادام در باغ‌های شهرکرد و یزد گزارش شده است (Baghestani et al., 2009). اما چون یک گزارش از حمله این انگل به کرفس ارائه شده بود (Crescenzi et al., 2015) در این تحقیق احتمال آلودگی گوجه‌فرنگی به این انگل بررسی شد.

#### تغییرپذیری‌های وابسته به رشد و نمو فعالیت آنزیم

##### *PrSAI* در دو گونه گل‌جالیز مصری و راموزا

به‌طور کلی میزان فعالیت آنزیم *PrSAI* در گونه مصری به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود ( $P < 0.001$ ) (شکل ۱-الف و جدول ۱). فعالیت آنزیم در بذرها پیش‌آماده‌شده پایین و

هگزوزها به‌ویژه در شاخه‌های در حال رشد هم در مدت توسعه زیرزمینی و هم هوایی مشاهده شده است (Abbes *et al.*, 2002, Delavault *et al.*, 2009) که نشان‌دهنده نقش عمده اینورتازها در کل زمان توسعه انگل پس از اتصال به میزبان است. به‌طور کلی، گونه مصری فعالیت *PrSAI* بالاتری را به‌ویژه در مراحل اولیه اتصال روی میزبان گوجه‌فرنگی نشان داد که با نتایج به‌دست‌آمده در بخش اول یعنی ظهور سریع‌تر انگل در این میزبان همخوانی داشت. در مقابل، در گونه راموزا با نزدیک شدن به مراحل انتهایی رشد، فعالیت آنزیم به‌صورت معنی‌داری در غده شاخه گل‌دار و شاخه گل‌دار حاوی بذرهای افزایش یافت که نتایج به‌دست‌آمده در بخش اول یعنی شمار گل و زیست‌توده بالاتر انگل را تأیید می‌کرد. به‌رغم یکسان بودن همه شرایط از جمله میزبان، نوسانات میزان فعالیت آنزیم در مراحل مختلف نموی در گونه‌های مختلف انگل متفاوت بود. در بررسی‌های پیشین نیز نشان داده شده بود که میزان فشار اسمزی گونه‌های مختلف انگل گل‌جالیز *O. aegyptiaca* و *sulphurea* به‌ترتیب کمتر و بیشتر از گوجه‌فرنگی بوده است (Kokina, 1946). در بررسی *Draie et al.* (2011) نیز تفاوت فعالیت آنزیم در مراحل مختلف نموی گونه راموزا در میزبان گوجه‌فرنگی مشاهده شده بود.

پس از اتصال و تشکیل غده در گونه مصری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در ادامه و با ظهور ساقه زیرزمینی روی غده‌های انگل، سطح فعالیت *PrSAI* هم افزایش یافت، ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. فعالیت آنزیم در هر دو گونه انگل در بخش انتهایی گل‌های ظهوریافته (AP) به‌طور شایان‌توجهی بالاتر از پایه شاخه‌های گل‌دهنده (BP) بود. این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده توسط *Draie et al.* (2011) همخوانی داشت.

مشاهده *In situ* فعالیت اینورتاز اسیدی در برش عرضی بخش بالایی (AP) و پایه (BP) شاخه‌های گل‌دار در بررسی آنها نشان داد، فعالیت آنزیم در پایه شاخه گل به پارانیشیم مدولار محدود شده ولی در بخش انتهایی به پارانیشیم کورتیکال هم توسعه پیدا کرده است. همچنین گفته شده است که فعالیت بالاتر مشاهده‌شده آنزیم *PrSAI* در بخش بالایی شاخه‌های گل‌دار احتمال دارد به دلیل جای گیری اختصاصی‌تر فعالیت *PrSAI* در این بافت‌های جوان و در حال رشد باشد (*Draie et al.*, 2011). فعالیت آنزیم هم در شاخه‌های زیرزمینی و هم شاخه‌های گل‌دهنده به‌طور شایان‌توجهی افزایش یافت که البته این افزایش در شاخه زیرزمینی و غده آن بیشتر و از نظر آماری نیز معنی‌دار بود (شکل ۱-الف). در تحقیقات دیگر محققان نیز تجمع بالای

جدول ۱. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) فعالیت اینورتازها، میزان پروتئین و قند کاهشی انگل رشد کرده روی گوجه‌فرنگی تحت تأثیر گونه و مراحل نموی

Table 1. Analysis of variance (Mean square) for invertases activity, protein concentration and reducing sugars in different species and developmental stages of broomrape growing on tomato.

S.O.V.	<i>PrSAI</i> activity	<i>PrCWI</i> activity	Mean square		
			SAI protein	CWI protein	reducing sugars
Parasite species (A)	230.8***	0.027 <sup>ns</sup>	7.36***	0.52***	294.91***
Developmental stage (B)	886.9***	922.6***	0.73***	0.55***	117.16***
A*B	611.5***	75.1 <sup>ns</sup>	0.42***	0.44***	41.71*
Error	36.8	84.4	0.003	0.02	10.52
CV	11.24	44.34	2.5	8.56	33.32
R-square	0.98	0.81	0.99	0.92	0.84

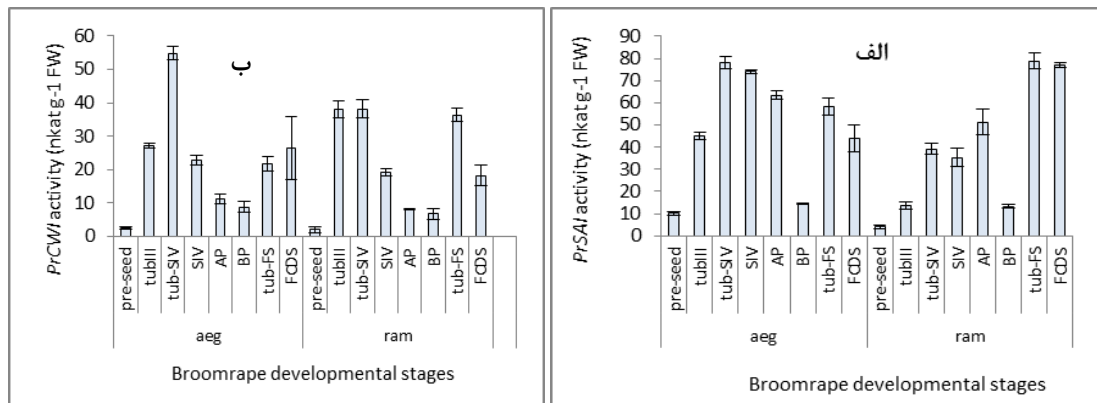
ns means non-significant. \*, \*\* and \*\*\* means significant at 0.05, 0.01 and 0.001 respectively.

میزان فعالیت این آنزیم نسبت به آنزیم *PrSAI* کمتر بود (Wakabayashi *et al.*, 2015; *Draie et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006; Nie *et al.*, 2010). اگرچه فعالیت آنزیم در گونه مصری بالاتر از گونه راموزا بود ولی تفاوت بین دو گونه از نظر آماری معنی‌دار نبود، اما

تغییرپذیری‌های وابسته به رشدونمو در فعالیت آنزیم *PrCWI* در دو گونه گل‌جالیز مصری و راموزا

فعالیت اینورتاز *PrCWI* در همه مراحل رشدی هر دو گونه انگل مشاهده شد ولی همانند بررسی‌های گذشته

مراحل مختلف رشدی در دو گونه باهم تفاوت معنی‌داری داشتند (شکل ۱-ب و جدول ۱).



شکل ۱. تغییرپذیری‌های وابسته به رشدونمو فعالیت آنزیم *PrSAI* (الف)، آنزیم *PrCWI* (ب) در دو گونه گل‌جالیز مصری و راموزا در میزبان گوجه‌فرنگی (داده‌ها شامل میانگین  $\pm$  حدود اطمینان هستند). مخفف‌ها: بذرهای پیش‌آماده‌شده (Pre-seeds)، غده در حال رشد (TubIII)، غده ساقه زیرزمینی در حال رشد (Tub-SIV)، ساقه زیرزمینی در حال رشد (SIV)، غده ساقه گل‌دار رویش یافته از خاک (Tub-FS)، بخش انتهایی ساقه گل‌دار (AP)، بخش پایه‌ای ساقه گل‌دار (BP) و ساقه گل‌دار حامل میوه‌های در حال رشد (FCDS).

Fig 1. Development-related changes in the *PrSAI*(a) and *PrCWI*activity (b) on Egyptian and branched broomrape growing on tomato (Data are means $\pm$  confidence limits). Abbreviations: Preconditioning seeds (Pre-seeds), growing tubercle (Tub.III), tubercle (Tub.SIV) bearing the growing subterranean shoot (S.IV), tubercle bearing the emerged flowering shoot (Tub-SF). Apical part (AP) and Basal part (BP) of the flowering shoot and shoot bears fruits containing developing seeds (FCDS).

مشاهده‌شده در آنزیم *PrSAI*، میزان فعالیت این آنزیم در مراحل اولیه رشد در هر دو گونه بیشتر بوده و باگذشت زمان از فعالیت آن کاسته شد. در چندین بررسی دیگر نیز این ناهم‌انگاری در میزان فعالیت دو اینورتاز (افزایش یکی همزمان با کاهش دیگری) مشاهده‌شده است (Zhang *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2005)

#### تغییرپذیری‌های وابسته به رشدونمو در غلظت

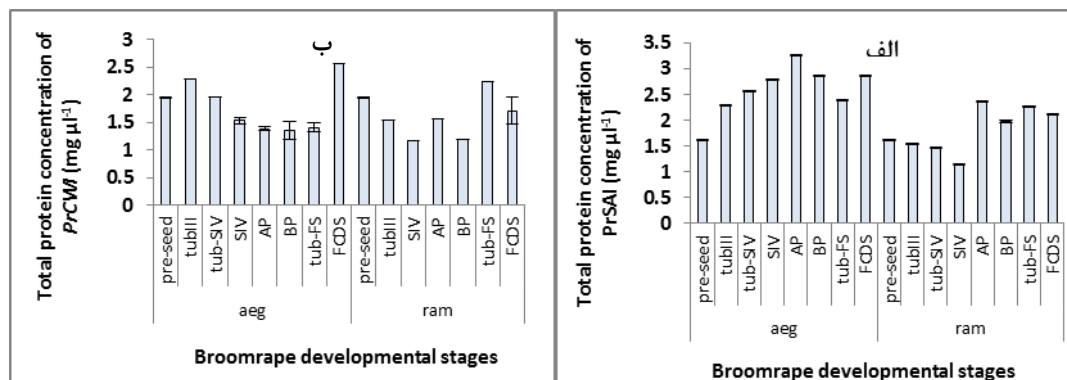
پروتئین کل در دو گونه گل‌جالیز مصری و راموزا به‌طور کلی میزان پروتئین *PrSAI* همانند فعالیت آنزیمی به‌طور معنی‌داری بالاتر از *PrCWI* بود. گونه مصری میزان پروتئین بالاتری نسبت به گونه راموزا داشته و نمودارها نشان داد، فعالیت آنزیم‌ها متناسب با میزان پروتئین‌ها تغییر یافته است (شکل ۲). در بررسی فعالیت آنزیم *M6PR* در گونه راموزا رشد کرده روی گوجه‌فرنگی نیز این هم‌انگاری بین غلظت پروتئین با فعالیت آنزیم دیده شده بود (Delavault *et al.*, 2002).

#### تغییرپذیری‌ها در غلظت قندهای کاهشی

در هر دو گونه مورد بررسی، میزان قندهای کاهشی در بذرهای پیش‌آماده‌شده پایین بوده و پس از اتصال به

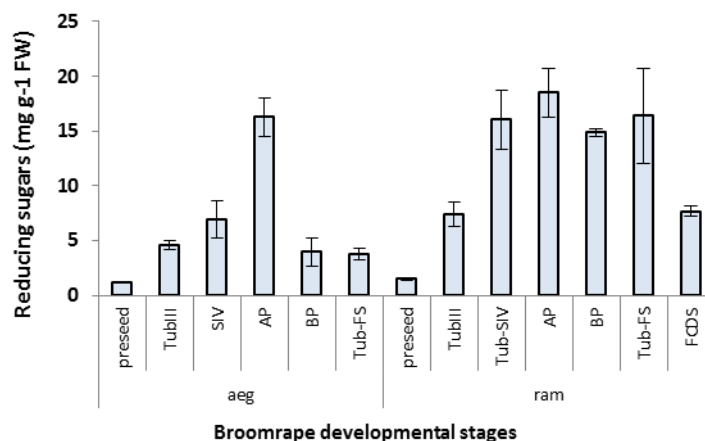
فعالیت این آنزیم در بذرهای پیش‌آماده‌شده پایین بوده و پس از اتصال به ریشه میزبان گوجه‌فرنگی در گونه‌های مصری و راموزا به ترتیب حدود ۱۱ و ۱۹ برابر افزایش یافت. بررسی (Draie *et al.*, 2011) نیز افزایش ۵ برابری فعالیت اینورتاز *PrCWI* در بذرهای جوانه‌زده نسبت به بذرهای پیش‌آماده‌شده و همچنین تأثیر بر توان مخزن ریشه‌های آلوده‌شده در مرحله اولیه نفوذ گونه راموزا به ریشه میزبان را نشان داد. بیشترین فعالیت این آنزیم در مرحله غده ساقه زیرزمینی گونه مصری رخ داده و با ظهور شاخه گل‌دهنده میزان فعالیت این آنزیم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در هر دو گونه در مرحله ظهور شاخه گل‌دهنده شاهد کاهش میزان فعالیت آنزیم بودیم، اما با تشکیل میوه‌های در حال تشکیل بذر، میزان فعالیت آنزیم دوباره افزایش یافت (شکل ۱-ب). روند مشاهده‌شده در مورد فعالیت این اینورتاز با نتایج تحقیق Zhang *et al.* (2006) روی *Grape berry*، همخوانی داشت. به‌طور کلی روند تغییرپذیری‌های فعالیت آنزیم در این دو گونه انگل به‌رغم یکسان بودن میزبان متفاوت بود. روند مشاهده‌شده در مورد آنزیم *PrSAI* که در گونه مصری فعالیت آنزیم در مراحل اولیه بیشتر و در گونه راموزا در مراحل انتهایی بیشتر بود در این آنزیم نیز مشاهده شد. برخلاف روند

ریشه‌های گوجه‌فرنگی افزایش یافت و در مرحله AP به بیشینه رسید (شکل ۳).



شکل ۲. تغییرپذیری‌های وابسته به رشد و نمو میزان پروتئین *PrSAI* (الف) و *PrCWI* (ب) در گل‌جالیز مصری و راموزا در میزبان گوجه‌فرنگی (داده‌ها شامل میانگین  $\pm$  حدود اطمینان هستند). مخفف‌ها: بذرهای پیش‌آماده‌شده (Pre-seeds)، غده در حال رشد (TubIII)، غده ساقه زیرزمینی در حال رشد (Tub-SIV)، ساقه زیرزمینی در حال رشد (SIV)، غده ساقه گل‌دار رویش یافته از خاک (Tub-FS)، بخش انتهایی ساقه گل‌دار (AP)، بخش پایه‌ای ساقه گل‌دار (BP) و ساقه گل‌دار حامل میوه‌های در حال رشد (FCDS).

Fig 2. Development-related changes in the total protein concentration in Egyptian and branched broomrape growing on tomato (Data are means  $\pm$  confidence limits). Abbreviations: Preconditioning seeds (Pre-seeds), growing tubercle (Tub.III), tubercle (Tub.SIV) bearing the growing subterranean shoot (S.IV), tubercle bearing the emerged flowering shoot (Tub-SF). Apical part (AP) and Basal part (BP) of the flowering shoot and shoot bears fruits containing developing seeds (FCDS).



شکل ۳. تغییرات وابسته به نمو غلظت قندهای کاهشی در گل‌جالیز مصری و راموزا در میزبان گوجه‌فرنگی (داده‌ها شامل میانگین  $\pm$  حدود اطمینان هستند). مخفف‌ها: بذرهای پیش‌آماده‌شده (Pre-seeds)، غده در حال رشد (TubIII)، غده ساقه زیرزمینی در حال رشد (Tub-SIV)، ساقه زیرزمینی در حال رشد (SIV)، غده ساقه گل‌دار رویش یافته از خاک (Tub-FS)، بخش انتهایی ساقه گل‌دار (AP)، بخش پایه‌ای ساقه گل‌دار (BP) و ساقه گل‌دار حامل میوه‌های در حال رشد (FCDS).

Fig 3. Development-related changes in reducing sugars on Egyptian and branched broomrape growing on tomato (Data are means  $\pm$  confidence limits). Abbreviations: Preconditioning seeds (Pre-seeds), growing tubercle (Tub.III), tubercle (Tub.SIV) bearing the growing subterranean shoot (S.IV), tubercle bearing the emerged flowering shoot (Tub-SF). Apical part (AP) and Basal part (BP) of the flowering shoot and shoot bears fruits containing developing seeds (FCDS).

ساقه زیرزمینی بود که با نتایج به‌دست‌آمده در بخش فعالیت آنزیم‌ها و همچنین ظهور گل‌جالیز و زیست‌توده و شمار آن‌ها همخوانی داشت. نتایج تحقیقات نشان داده‌اند، هگزوزها در نتیجه تبدیل ساکارز گرفته‌شده از میزبان در

پس‌از آن، بالاترین میزان قند در راموزا مربوط به غده گل‌دار بود که البته با مرحله AP تفاوت آماری معنی‌داری نداشت که این نتایج همسان کار Delavault *et al.* (2002) است. در گونه مصری پس از AP بالاترین میزان قند مربوط به

فعالیت آنزیم‌های اینورتاز مشاهده شد که نشان‌دهنده اهمیت این آنزیم‌ها در رشد انگل و روابط انگل-میزبان است. به‌رغم یکسان بودن همه شرایط از جمله میزبان، نوسان‌های میزان فعالیت آنزیم در مراحل مختلف نمو و در گونه‌های مختلف انگل متفاوت بود. فعالیت آنزیم *PrCWI* همواره کمتر از *PrSAI* بوده و با توسعه مرحله نمو میزان فعالیت آنزیم *PrSAI* افزایش اما میزان فعالیت آنزیم *PrCWI* کاهش یافت.

فعالیت آنزیم‌ها، میزان پروتئین و قندهای کاهشی در گونه مصری در مراحل اولیه بالاتر بوده و با ظهور سریع‌تر این گونه در میزبان ارتباط داشت ولی در گونه راموزا در مراحل انتهایی بیشتر بوده که با شمار شاخه بیشتر و زیست‌توده بالاتر همخوانی دارد. به‌طور کلی میزان فعالیت اینورتازها در گونه گل‌جالیز مصری بیشتر بود که با این نکته که این گونه نسبت به دیگر گونه‌های گل‌جالیز آسیب و زیان بیشتری در گوجه‌فرنگی ایجاد می‌کند همخوانی دارد. با توجه به اینکه در این آزمایش گونه راموزا نیز آسیب و زیان بالایی روی گوجه‌فرنگی ایجاد کرد لذا می‌توان نتیجه گرفت که با وجود فعالیت پایین‌تر اینورتاز به دلیل بالا بودن میزان قندهای کاهشی در این گونه نسبت به گونه مصری، احتمال دارد دیگر آنزیم‌های درگیر در فرآیند تبدیل قندها، مانند ساکارز سنتاز نقش پررنگ‌تری داشته باشند.

### سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فن‌آوران کشور (طرح شماره ۹۳۰۳۳۸۶۶) انجام گرفته است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

غده ساخته (سنتز) می‌شوند ولی با ظهور شاخه، هم پیش و هم پس از رویش به‌طور عمده در این اندام تجمع پیدا می‌کنند (Harloff & Wegmann, 1987). غلظت بالای هگزوزها در شاخه، نشانگر نقش مهم این قندها در ایجاد توان مخزن انگل برای آب و ساکارز است. در تحقیقی روی *O. hederæ* رشد کرده روی میزبان *Hedera helix* نشان داد، غلظت قندهای کاهشی و غیرکاهشی در میزبان تا حدودی مساوی بوده ولی در انگل، میانگین غلظت قندهای کاهشی سه برابر و در گل‌های انگل، سی برابر بیشتر از قندهای غیرکاهشی بود.

این پدیده نشان‌دهنده رخداد انتقال راه دور این قندها در گل‌جالیز بوده اما چیزی در مورد سازوکار و مسیر درگیر در این انتقال شناخته‌نشده است (Noiraud et al., 2001). میزان بالاتر قندهای کاهشی و از سوی دیگر فعالیت پایین‌تر اینورتازها در گونه راموزا نسبت به گونه مصری، به‌احتمال نشان‌دهنده نقش پررنگ‌تر دیگر آنزیم‌های درگیر در فرآیند تبدیل قند مانند ساکارز سنتاز است. همان‌طور که انتظار می‌رفت بیشترین میزان قندهای کاهشی در همان مرحله‌ای که بالاترین میزان فعالیت آنزیم‌های اینورتاز وجود داشت مشاهده شد. به‌عنوان مثال در گونه راموزا بیشترین میزان قندهای کاهشی در مرحله AP و غده شاخه گل‌دار مشاهده شد؛ از سوی دیگر این مرحله بالاترین میزان فعالیت اینورتازها را داشت. در گونه مصری نیز بالاترین میزان فعالیت آنزیم اینورتاز غالب (*PrSAI*) مربوط به مرحله AP و پس از آن ساقه زیرزمینی بود و میزان قندهای کاهشی نیز در همین مراحل بیشترین بود.

### نتیجه‌گیری کلی

در هر دو گونه انگل و همچنین در همه مراحل رشدی

### REFERENCES

- Abbes, Z., Kharrat, M., Delavault, P., Chaibi, W. & Simier, P. (2009). Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed *Orobanche foetida* and susceptible and tolerant faba bean lines. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 153-159.
- Aber, M., Fer, A. & Salle, G. (1983). Transfer of organic substances from the host plant *Vicia faba* to the parasite *Orobanche crenata* Forsk. *Z. Zeitschrift fur Pflanzphysiologie*, 112, 297-308.
- Aly, R. (2007). Conventional and biotechnological approaches for control of parasitic weeds. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, 304-317.
- Aly, R., Cholakh, H., Joel, D. M., Leibman, D., Steinitz, B., Zelcer, A., Naglis, A., Yarden, O. & Gal-On, A. (2009). Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant Biotechnology Journal*, 7, 487-498.
- Baghestani, M. A., Behrouzi, D., Rahimian Mashhadi, H. & Mohammad Alizadeh, H. (2009). Assessment of



- biological and phenological aspects of broomrape (*Orobancha nana*) in parasitism with Almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Crops Improvement*, 11, 19-27 (In Farsi).
6. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
  7. Crescenzi, A., Fanigliulo, A., Fontana, A. & Fascetti, S. (2015). *First Report of Orobancha nana on Celery in Italy*. (American Phytopathological Society 2015:99). Disease Notes. 1188.
  8. Delavault, P., Simier, P., Thoiron, S., Veronesi, C., Fer, A. & Thalouarn, P. (2002). Isolation of mannose 6-phosphate reductase cDNA, changes in enzyme activity and mannitol content in broomrape (*Orobancha ramosa*) parasitic on tomato roots. *Physiologia Plantarum*, 115, 48-55.
  9. Draie, R., Peron T., Pouvreau, J., Veronesi, C., Jegou, S., Delavault, P., Thoiron, S. & Simier, P. (2011). Invertases involved in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa*: Characterization of the dominant soluble acid isoform, PrSAII. *Molecular Plant Pathology*, 12, 638-652.
  10. El-Hamouch, Y., Benharrat, H. & Thalouran, P. (2006). Effect of root exudates from different tomato genotypes on broomrape (*O. aegyptiaca*) seed germination and tubercule development. *Crop Protection*, 25, 501-507.
  11. Fer, A., Russo, N., Simier, P., Arnaud, M. C., Thalouarn, P. (1993). Physiological changes in a root hemiparasitic angiosperm, *Thesium humile* (Santalaceae), before and after attachment to the host plant (*Triticum vulgare*). *Journal of Plant Physiology*, 20, 15-24.
  12. Goldwasser, Y. & Kleifeld, Y. (2004). Recent approaches to *Orobancha* management: A review. In: Inderjit (Ed), *Weed Biology and Management*. (pp. 439-566.) Kluwer Academic Publishers.
  13. Hacham, Y., Hershenhorn, J., Dor, E. & Amir, R. (2016). Primary metabolic profiling of Egyptian broomrape (*Phelipanche aegyptiaca*) compared to its host tomato roots. *Journal of Plant Physiology*, 205, 11-19.
  14. Harloff, H. J. & Wegmann, K. (1987). Mannitol pathway in *Orobancha*. In: Weber HC, Forstreuter W., eds. Parasitic Flowering Plants, Proceedings of the 4th ISFPF, pp. 295-309.
  15. Hershenhorn, J., Eizenberg, H., Dor, E., Kapulnik, Y. & Goldwasser, Y. (2009). *Phelipanche aegyptiaca* management in tomato. *Weed Research*, 49, 34-37.
  16. Kokina S.I. (1946). *Izvest. Turkm. Fil. Akad. Nauk SSSR*, 62 (314). Abstract: Information Section, Weed Research Organization, A.R.C.
  17. Nie, P., Wang, X., Hu, L., Zhang, H., Zhang, J., Zhang, Z. & Zhang L. (2010). The Predominance of the apoplasmic phloem-unloading pathway is interrupted by a symplasmic pathway during chinese jujube fruit development. *Plant Cell Physiology*, 51, 1007-1018.
  18. Noiraud, N., Maurousset, L. & Lemoine, R. M. (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 717-728.
  19. Pageau, K., Simier, P., Naulet, N., Robins, R. & Fer, A. (1998). Carbon dependency of the hemiparasite *Striga hermonthica* on *Sorghum bicolor* determined by carbon isotopic and gas exchange analyses. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25, 695-700.
  20. Pan, Q., Zou, K., Peng, C., Wang, X., & Zhang, D. (2005). Purification, biochemical and immunological characterization of acid invertases from apple fruit. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47, 50-59.
  21. Parker, C. & Riches, C. R. (1993). *Parasitic Weeds of the World. Biology and Control*. Wallingford, UK: CAB International. 332 pp.
  22. Simier, P., Renaudin, S. & Fer, A. (1994). Characteristics of the mannitol pathway in a root hemiparasitic species, *Thesium humile* Vahl. (Santalaceae). *Journal of Plant Physiology*, 143, 33-38.
  23. Singh, M., Singh, D. V., Misra, P. C., Tewari, K. K. & Krishnan, P. S. (1968). Biochemical Aspects of Parasitism by the Angiosperm Parasites: Starch Accumulation. *Physiologia Plantarum*, 21: 525-538.
  24. Wakabayashi, T., Joseph, B., Yasumoto, S., Akashi, T., Aoki, T., Harada, K., Muranaka, S., Bamba, T., Fukusaki, E., Takeuchi, Y., Yoneyama, K., Muranaka, T., Sugimoto, Y. & Okazawa, A. (2015). Planteose as a storage carbohydrate required for early stage of germination of *Orobancha minor* and its metabolism as a possible target for selective control. *Journal of Experimental Botany*, 66, 3085-3097.
  25. Westwood, J. H., de-Pamphilis, C. W., Das, M., Fernandez-Aparacio, M., Honaas, L. A., Timko, M. P., Wafula, E. K., Wickett, N. J. & Yoder, J. I. (2012). The parasitic plant genome project: New tools for understanding the biology of *Orobancha* and *Striga*. *Weed Science*, 60, 295-306.
  26. Whitney, P. J. (1972). The carbohydrate and water balance of beans (*Vicia faba*) attacked by broomrape (*Orobancha crenata*). *Annals of Applied Biology*, 70, 59-66.
  27. Zhang, X., Wang, X., Wang, X., Xia, G., Pan, Q., Fan, R., Wu, F., Yu, X. & Zhang, D. (2006). A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiology*, 142(6), 220-232.