

ردیابی و بررسی وقوع عوامل ویروسی لکه حلقوی گوجه فرنگی (ToRSV) و لکه حلقوی نکتروتیک درختان میوه هسته دار (PNRSV) در رز کاری های استان های مازندران و البرز

سیمین صباغیان^{۱*}، فرشاد رخشنده رو^۲، سعید رضائی^۳

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵، کدپستی: ۱۴۷۷۸۹۳۸۵. ۲- استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵، کدپستی: ۱۴۷۷۸۹۳۸۵.

* نویسنده مسئول مکاتبات: سیمین صباغیان: آدرس پست الکترونیکی: samin.vic@gmail.com

چکیده:

به منظور ردیابی و بررسی وقوع عوامل ویروسی PNRSV و ToRSV در گلخانه ها و پارک های کاشت رز در استان های البرز و مازندران در طول فصول رشد در سالهای ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ تعداد ۳۱۱ نمونه برگگی علائم دار رز به صورت انتخابی جمع آوری شد. نمونه ها به وسیله آزمون سرولوژیک الیزا (DAS-ELISA) با استفاده از آنتی بادی های چند همسانه ای موجود در کیت تجارتي شرکت های (Agdia, U.S.A; Bioreba, Switzerland) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد PNRSV در استان های البرز و مازندران به ترتیب به میزان ۳۱ و ۴۵ درصد و ToRSV در استان های مذکور به ترتیب به میزان ۲۶ و ۳۳ درصد در گل های رز وقوع دارد. نمونه های آلوده با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (pH= ۷/۱) حاوی بازدارنده های دی اتیل دی تیو کاربامات ۰/۱٪ به صورت مکانیکی بر روی گیاهان علفی تشخیصی و تکثیری مایه زنی شدند. با استفاده از آزمون RT-PCR و نیز آغازگرهای اختصاصی حضور آلودگی در نمونه های مایه زنی شده گل های رز تأیید شد. با توجه به پاسخ های متفاوت گیاهان محکک به جدایه های متفاوت از ویروس های مورد بررسی بعد از مایه زنی مکانیکی و نیز نحوه واکنش آغازگرها با جدایه های مذکور، حضور تنوع ژنتیکی در بین جدایه های حاضر به اثبات رسید. همچنین مشخص شد در مناطقی که گل های رز در کنار درختان میوه کشت شده اند میزان وقوع هر یک از آلودگی های ویروسی بیشتر است.

Detection and the occurrence of Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) and Tomato ring spot virus in Mazandaran and Alburz provinces

S. Sabaghian^{1*}, F. Rakhshandehroo¹ and S. Rezaee¹

1- Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Science and Research branch of Tehran. *Corresponding author: Samin.vic@gmail.com

Abstract:

During the growing seasons of the years 2011 to 2012, a survey was conducted through the greenhouses and parks where roses were planted in Mazandaran and Alburz provinces to determine the distribution and occurrence of PNRSV and ToRSV. A total numbers of 311 symptomatic leaf samples were collected from rose plants. Using with the polyclonal antisera (Agdia, U.S.A; Bioreba, Switzerland) and DAS-ELISA, samples were tested for the viral infections. Result showed that roses in surveyed regions of Alburz and Mazandaran provinces were infected to both PNRSV and ToRSV at the ratio of 31% and 45% (PNRSV) and 26% and 33% (ToRSV) respectively. Infected samples were mechanically inoculated on herbaceous propagative and indicator plants using with the potassium phosphate buffer (pH 7.1) containing 0.1% DiethyldithioCarbamate as the inhibitor. Presences of viral infections in inoculated herbaceous plants as well as the roses were confirmed by RT-PCR and specific primers. Considering different indicator plant responses to inoculation with different viral isolates and also distinct reaction of each tested viruses with the specific primers in RT-PCR test, genetic variations among the present isolates is confirmed. It is also proved that, wherever roses planted close to the stone fruits, ToRSV and PNRSV are highly occurred.

مقدمه :

گیاه رز متعلق به خانواده *Rosaceae* و جنس *Rosa* و گونه *Rosa L. hybrids* می باشد. سطح زیر کشت گل های شاخه بریده رز در ایران ۵۷۷ هکتار است. از مهمترین عوامل ویروسی بیماریزا در رز مجموعه عوامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک رز می باشد. بیماری موزائیک رز از طریق چند ویروس ایجاد می گردد که در بیشتر موارد این عوامل با یکدیگر همراه می باشند و از این جهت میزان خسارت آنها بر روی محصول در رز تشدید می گردد. خسارت بیماری موزائیک رز (در زمان آلودگی مرکب و چند تائی) در هر گلستان چیزی در حدود (۴۰-۶۵)٪ می باشد. از طریق تحقیق های گسترده در کشورهای اروپائی و آمریکائی مشخص شده است که عوامل ویروسی : لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) و لکه حلقوی گوجه فرنگی *Tomato ring spot* (ToRSV) *virus* و موزائیک آراییس *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV)، از مهمترین عوامل ایجاد کننده موزائیک رز در این کشورها می باشد. در این تحقیق تلاش شد تا علاوه بر ردیابی این دو ویروس برای نخستین بار در کشور میزان پراکندگی این دو ویروس در سطح گلخانه ها و فضای سبز موجود در استان های متفاوت کشور مشخص شود.

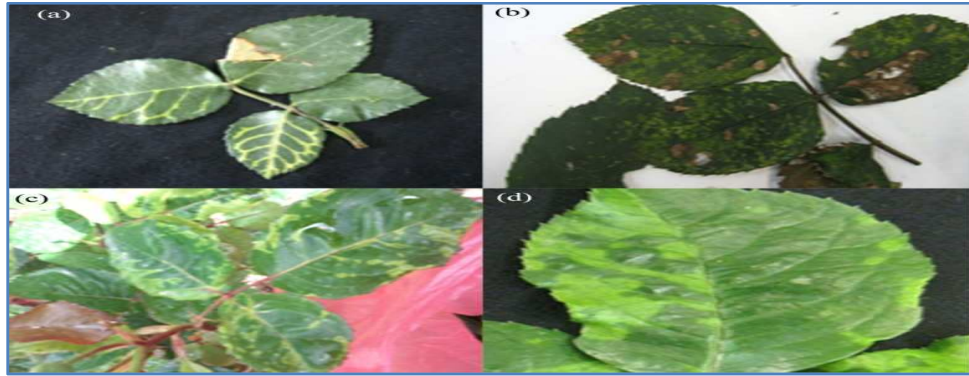
مواد و روش ها

نمونه برداری : در طی سال های زراعی ۹۱-۱۳۹۰ بازدید هایی از گلخانه ها و مناطق کشت گل رز در مناطق مختلف استان مازندران و البرز صورت گرفت و تعداد ۳۱۱ نمونه برگ از این مناطق جمع آوری شد.

آزمون الایزای غیر مستقیم (DAS-ELISA): مطابق با روش Clark & Adams (۱۹۷۷) انجام شد. میانگین جذب چاهک ها در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد و نمونه های مثبت با جذب بالاتر از ۳ برابر میانگین جذب چاهک های سالم محاسبه شد.

مطالعات گلخانه ای: عصاره گیاهان آلوده با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۷/۲ دارای مهار کننده فنلی (متابی سدیم) بر روی گیاهان محک و در مرحله ۶-۲ برگی مایه زنی گردید و علائم ۲ هفته پس از مایه زنی مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون RT-PCR: این آزمون با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن پروتئین پوششی CP ویروس PNRSV و جهت تکثیر ژن آنزیم RdRP ویروس ToRSV انجام پذیرفت (جدول ۱). پس از سنتز cDNA با استفاده از کیت تجارتي شرکت فرمنتاس، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, AG, Germany) انجام شد. پس از بهینه سازی شرایط واکنش دمای اتصال آغازگرها به توالی هدف ۵۵ °C تعیین شد. محصولات حاصل از تکثیر PCR برای بررسی اندازه و کیفیت بر روی آگاروز ۱٪ با شدت جریان ۲۵ میلی آمپر به مدت ۴۵ دقیقه تفکیک شدند. **نتایج:** پس از بررسی های نهایی و نتایج حاصل از آزمون های سرولوژیک و مولکولی در نهایت علائم لکه های نکروتیک، لکه های حلقوی، نکروز حاشیه برگ، رگبرگ روشنی، پیچیدگی برگ، غربالی و زردی از علائم مرتبط با آلودگی های ویروسی ToRSV و PNRSV به تنهایی یا در آلودگی مشترک برای بیماری موزائیک رز در ایران شناخته شد (شکل ۱). با استفاده از آزمون الایزا مشخص شد ویروس PNRSV به میزان بیشتری (۵۲٪) در مقایسه با ToRSV (۲۸٪) در استان های البرز و مازندران وقوع پیدا کرده است. همچنین مشخص شد در سال های فوق گل های رز در استان مازندران به میزان بیشتری در مقایسه با استان البرز به هر دو ویروس آلوده شده اند (جدول ۱).



شکل ۱- علائم آلودگی های ویروسی ToRSV و PNRSV در گل های رز ایران. (a) نقش زمینه ای و کلروز آوند برگ (b) لکه های نکروتیک و موزاییک برگ (c) موزاییک و کلروز حاشیه برگ ها (d) لکه حلقوی و بد شکلی برگ

تعدادی از نمونه های برگ گل های رزی که در آزمون های مولکولی و نیز الیزا واکنش مثبت نشان دادند انتخاب و جهت بررسی ویژگی های بیولوژیکی به صورت مکانیکی روی گیاهان محک مایه زنی شدند. نتایج بررسی های گلخانه ای پس از دو هفته از مایه زنی ویروس نشان داد، علائم مشاهده شده در گیاهان محک برای ToRSV و PNRSV جدا شده از بوته های گل رز با علائمی که در گذشته توسط ICTV برای ویروس گزارش شده است مطابقت دارد (شکل ۲) و علائم مشاهده شده برای جدایه های مختلف ویروس یکسان نبود (داده نشان داده نشد).

جدول ۱- میزان وقوع عوامل ویروسی ToRSV و PNRSV در مناطق مورد بررسی

| مناطق مختلف نمونه برداری | ToRSV | | PNRSV | | تعداد نمونه بررسی شده |
|--------------------------|-------|------|-------|------|-----------------------|
| | تعداد | درصد | تعداد | درصد | |
| استان البرز | ۵۵ | ٪۲۶ | ۲۱۵ | ٪۳۱ | ۲۱۵ |
| استان مازندران | ۳۱ | ٪۳۳ | ۹۶ | ٪۴۵ | ۹۶ |
| جمع کل | ۸۶ | ٪۲۸ | ۳۱۱ | ٪۵۲ | ۳۱۱ |

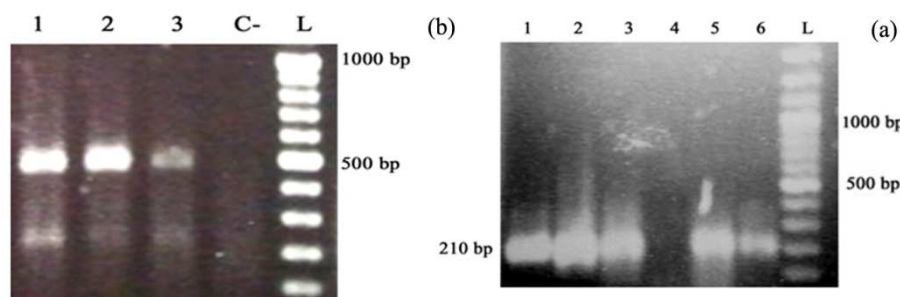


شکل ۲- علائم حاصل از مایه کوبی ویروس ToRSV و PNRSV بر روی گیاه محک در گلخانه. (a) موزاییک سیستمیک و زردی لوبیا (b) *Phaseolus vulgaris* موزاییک سیستمیک و بد شکلی برگ گوجه فرنگی (c) *Solanum esculentum* بد شکلی برگ لوبیا (d) *Vigna unguiculata* موزاییک سیستمیک در برگ خیار *Cucumis sativus*

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای مناطق ژنتیکی مختلف از توالی ژنوم ویروس PNRSV مربوط به ژن های رمز کننده پروتئین پوششی مناطق ژنتیکی مختلف از توالی ژنوم ویروس (ToRSV) مربوط به ژن های رمز کننده پروتئین پوششی و نیز پلیمراز (RdRp) نمونه های آلوده به ویروس مورد ردیابی قرار گرفتند. در تمام موارد قطعاتی با اندازه های ۲۹۰ bp و ۳۰۰ bp برای نمونه های آلوده به PNRSV توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد.

بحث:

نتایج نشان داد اکثر مناطق مورد بررسی به دو ویروس PNRSV و ToRSV آلوده هستند. مشخص شد که PNRSV و ToRSV در گلخانه ها و فضای سبز استان مازندران با درصد های پراکندگی به ترتیب ۴۵٪ و ۳۱٪ وقوع یافته است که این میزان ۱/۵٪ بیشتر از درصد وقوع آن در استان البرز است (جدول ۱). درصد بالاتر وقوع عوامل ویروسی مورد بررسی در استان مازندران در مقایسه با البرز می تواند به دلیل شرایط مساعد آب و هوایی در منطقه باشد که به حساسیت ارقام موجود، فعالیت بالاتر ناقلین احتمالی کمک کرده است. از طرفی منابع بالقوه آلودگی از جمله پوشش سبز منطقه (علف های هرز و گیاهان مرتعی) که می تواند به عنوان منابع پایدار آلودگی محسوب شوند نیز به این امر کمک نموده است. در این پژوهش مشاهده شد که جدایه های مختلف با پرایمرهای اختصاصی به صورت متنوعی واکنش می دهند و نیز گیاهان محک مختلف پاسخ های مختلفی را بعد از مایه کوبی به جدایه های مختلف هر کدام از ویروس ها نشان می دهند (شکل ۲). این امر بیانگر وجود تنوع ژنتیکی در بین نژادهای مختلف موجود تشکیل دهنده جدایه های مختلف می باشد. توصیه می شود تا تنوع ژنتیکی موجود در بین نژادهای تشکیل دهنده جمعیت ها با استفاده از تعیین توالی مناطق ژنتیکی مورد بررسی قرار گیرد.



شکل ۳- الکتروفورز محصول پی سی آر حاصل از تکثیر آنزیم پلیمراز ToRSV و پروتئین پوششی PNRSV. (a) الکتروفورز محصول پی سی آر حاصل از تکثیر ژن پروتئین پوششی PNRSV با اندازه ۲۱۰ جفت باز برای نمونه های (۱) رز البرز منطقه فردیس کرج (۲) رز منطقه زیبادشت کرج (۳) مازندران (۴) نمونه شاهد منفی- رز بدون آلودگی (۵) مازندران و (۶) کنترل مثبت. تکثیر قطعه ای از ژن آنزیم پلیمراز ToRSV با اندازه ۵۰۰ جفت باز برای نمونه های (۱) رز کرج (۲) رز کرج (۳) رز مازندران (C) نمونه کنترل منفی که در آن از total-RNA گیاه رز سالم به عنوان نمونه استفاده شده بود. (L) 100 bp DNA ladder (Fermentas, Inc).

منابع:

- 1- Al-Nsour, A., Mansour, A., Al-Banna, L., & Salem, N. (2010). Detection of Tomato Ringspot Virus on Stone Fruit Trees in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 6, 240-247.
- 2- Banttari, E.E., & Goodwin, P.H. (1985). Detection of *Potato virus X* and *Y* by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-Elisa). *Plant Disease*, 69, 202-205.
- 3- Clark, M. F., & Adams, A. N. (1977). Characterization of the microplate methods of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
- 9- Ghotbi, T., & Shahraeen, N. (2009). Natural incidence and infectivity level of three nepoviruses in ornamental crops in Iran. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1, 39-44.
- 4- Massumi, H., Shaabanian, M., Hosseini Pour, A., Heydarnejad, J., & Rahimian, H. (2009). Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant Disease*, 93, 67-72.

Functional Characterization of *RdPAR* involved in biosynthesis of 2-Phenylethanol (2PE) in Damask rose

Akbar Karami^{1*}, Ali Niazi², Gholamreza Kavosi², Amin Ramazani², Morteza Khosh-Khui¹, Hassan Salehi¹, M. Jamal Saharkhiz¹, Aliasghar Abolimoghadam²

¹Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

²Biotechnology Institute, Shiraz University, Shiraz, Iran.

*E-Mail: akarami2004@gmail.com

Abstract:

The damask rose (*Rosa damascena* Mill.) is the most important species used to produce rose water, attar of rose, and essential oils in the perfume and medicinal industry. However, despite the importance of Damask rose scent, the molecular and biochemical investigations of flower fragrance of this species are still in its primary stage. To further substantiate rose-PAR's involvement in the biosynthesis of 2PE, expression of rose-PAR transcripts and PAR enzymatic activity pattern in petals of two distinct genotypes (G1 and G2) of Damask rose at six floral developmental stages was investigated. In the petals of Damask rose the relative transcript levels of rose-PAR were higher at stages 3 and 4 in G1 and G2, respectively. In this study, enzymatic activity leading to the synthesis of phenyl ethyl alcohol from the phenyl acetaldehyde (PALd) moderately increased during flower development up to stage 5 in G1. However, high level of PAR enzymatic activity was observed in stage 3 of G2. These results indicated that the pattern activity of phenyl acetaldehyde reductase was different in the two used genotypes of Damask rose.

Key Words: *Rosa damascena*, floral scent, 2-Phenylethanol (2PE), Metabolite profiling.

Introduction

2-Phenylethanol (2PE) is one of the prominent scent compounds produced by Damask roses and in various fruits such as strawberry, tomato and grape varieties (Sakai *et al.*, 2007). It is widely applied in the cosmetics, perfumery, and food industries (Karami *et al.*, 2012). The main use of 2-PE in the world market is as a flavor ingredient to modify certain flavor compositions (Chen *et al.*, 2011). The worldwide volume of use for phenethyl alcohol is in the region of >1000 metric tons per year (Chen *et al.*, 2011). 2-PE is also used as a substrate for the synthesis of other flavors or pharmaceutical compounds such as phenyl ethyl acetate ester. 2PE is biosynthesized from l-phenylalanine (l-Phe) with pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent aromatic amino acid decarboxylases (AADC) and phenyl acetaldehyde reductases (PAR) in planta (Sakai *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2011).

Materials and methods

Plant Materials

Flowers of two distinct genotypes of Iranian *Rosa damascena* Mill. (G1 (strongly scented) and G2 (weakly scented)) were harvested from plants grown in Estahban Research Center in six stages of flower development as described by Picone *et al.*, (2004).

RNA Extraction and cDNA Synthesis

Rose petals from each stage were immediately detached and frozen in liquid nitrogen and frozen in -84°C. High-quality total RNA was successfully isolated from 100 mg of petal tissue using RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturers protocol. The purified total RNA was quantified by NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer (Wilmington, USA). DNase treatment was carried out using Fermentas (Fermentas, Hanover, MD) DNase Kit according to the manufacturer's instructions. DNase-treated RNA was used for first strand cDNA synthesis.

Real-time PCR

Real-time PCR was performed on RNA obtained from three independent experiments. All samples included equal quantities of RNA. Total RNA was extracted using RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The purified total RNA was quantified with NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer (Wilmington, USA). DNase treatment was carried out using the Fermentas DNase Kit (Fermentas, Hanover, MD) according to the manufacturer's instructions. Primer design was carried out using Allele ID 7 software for the reference gene and gene of interest (rose phenyl acetaldehyde reductase (*PAR*) (AB426519.2) Gene). The Rose Elongation factor a (*Ef α*) gene (AB370119.1) was used as the reference gene for data normalization. Relative Real-time PCR was performed in a total volume of 20 ml containing 1 μl of cDNA, 1×Syber Green buffer and 4 pmol of each primer. All amplification reactions were repeated three times under identical conditions and included a negative control and five standard samples.

Enzyme and Protein Analyses

Enzyme Assay

Activities of rose-PAR were assayed at 30 °C by measuring the decrease in absorbance of NADPH at 340nm (Larroy *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2011). The reaction mixture (200 μ L) (100mM potassium phosphate (pH 7.0), rose- PAR solution, 10mM PAld, and 2.5mM NADPH) was incubated at 30°C for 10 min. The reaction was centrifuged at 3000 \times g for 5 min. The relative activities of the rose-PAR with selected substrates were determined by measuring the decrease in absorbance of NADPH at 340 nm using 10 mM of substrate. One unit of enzyme activity was defined as the oxidation of 1 μ mol NADPHmin⁻¹ at 30°C. Specific activity described as enzyme activity divided by total protein content and was shown as unit of activity per gram of protein.

Total Protein Assay

Total protein content was determined by Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as standard (Bradford, 1976). A595 was determined using a spectrophotometer.

Statistical Analysis

All of data were analyzed as a completely randomized design with three replications. Data were expressed as means \pm standard deviation (SD). The statistical significance of differences between treatments were determined by analysis of variance (ANOVA) and then testing for differences between means was by Duncan's new multiple range test and SPSS software version 16 at $p < 0.05$.

Results

Expression of rose-PAR transcripts in petals of Damask rose at six floral developmental stages

To further substantiate rose-PAR's involvement in the biosynthesis of 2PE, expression of rose-PAR transcripts in petals of two distinct genotypes (G1 and G2) of Damask rose at six floral developmental stages were investigated by real time RT-PCR (Fig. 1). In the petals of Damask rose the relative transcript levels of rose-PAR were higher at stage 3 and 4 in G1 and G2 genotypes, respectively. As shown in Fig. 1, relative expression level of rose-PAR gene has been increased during stage 3 and 4 (full bloom) stages compared to early stage of flower development (bud stage) and during senescence. Comparison of expression level of rose-PAR indicated that in the flowers of G1, the expressions of rose-PAR were about 2.67 fold more than G2. Although expression of the gene was observed throughout floral development, rose-PAR mRNA levels decreased during senescence. This highest expression in flowers was consistent with 2-phenylethanol emissions, which were highest on a per gram tissue basis from Damask rose flowers.

Enzyme Assay

To test for changes in phenyl acetaldehyde reductase (PAR) enzymatic activities in two distinct genotypes of Damask rose petals during flower development, cell-free extracts of petals of the six flowering stages were prepared and tested for potential enzymatic reductase activity with its substrates. Enzymatic activity leading to the synthesis of phenyl ethyl alcohol from the phenyl acetaldehyde moderately increased during flower development up to stage 5 in G1. However, high level of PAR enzymatic activity was seen in stage 3 of G2. As shown in Fig. 2 the pattern activity of phenyl acetaldehyde reductase was different in two distinct genotypes of Damask rose. For G1, PAR activities were low in early stage of flower development and then gradually increased reaching its highest value at full bloom stage. However, in G2 enzyme activity remained without significant changes after stage 3.

Total Protein Assay

Total protein content was determined by Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as standard. A595 was determined using a spectrophotometer. To test for changes in total protein content in two distinct genotypes of Damask rose petals during flower development, cell-free extracts of petals of the six flowering stages were prepared and tested for total protein assay. As shown in Fig. 3 the pattern of total protein content was not different in two distinct genotypes of damask rose. In both of genotypes, the total protein content was low in early stage of flower development then gradually increased reaching its highest value at full bloom stage. Although total protein level of Damask rose has been increased during flower development up to stage 4, it was gradually decreasing during senescence in both genotypes.

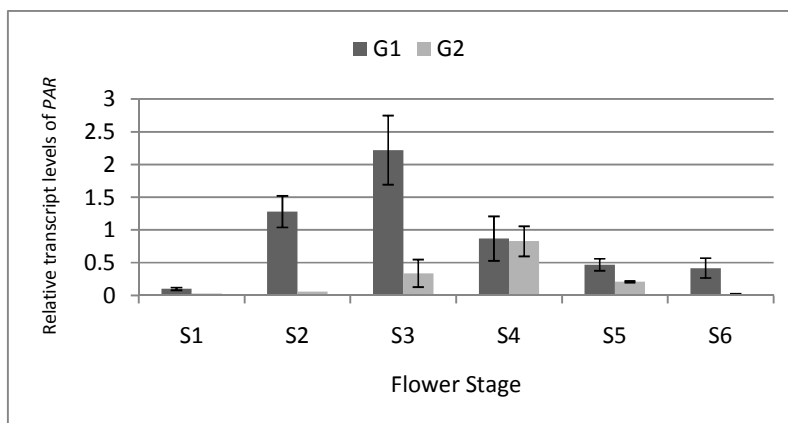


Fig. 1. Relative expression level of rose-PAR during flower developmental stages (S) from two distinct genotypes (G1 and G2) of *Rosa damascena*. Error bars are standard deviation of the mean.

Discussion

To further substantiate rose-PAR's involvement in the biosynthesis of 2PE, expression of rose-PAR transcripts in petals of two distinct genotypes (G1 and G2) of Damask rose at six floral developmental stages were investigated by real time RT-PCR. In the petals of Damask rose the relative transcript levels of rose-PAR were higher at stage 3 and 4 in G1 and G2 respectively. Also, the expression pattern of rose-PAR analyzed by real-time RT-PCR indicated a significant difference between two genotypes during flower developmental stages. The GC-MS validated functional analysis of both rose-PAR and recombinant PAR confirmed that the PARs catalyze the conversion of PAld to 2PE (Chen *et al.*, 2011). In this study, enzymatic activity leading to the synthesis of phenyl ethyl alcohol from the phenyl acetaldehyde (PAld) moderately increased during flower development up to stage 5 in G1. However, high level of PAR enzymatic activity was seen in stage 3 of G2. These results indicated that the pattern activity of phenyl acetaldehyde reductase was different in two distinct genotypes of Damask rose. For G1, PAR activities were low in early stage of flower development then gradually increased reaching its highest value at full bloom stage. However, in G2 enzyme activity remained without significant changes after stage 3. In the hybrid tea roses, petals were the major scent producing organs in the flower (Bergougnoux *et al.* 2007; Dudareva and Pichersky, 2004). In *R. damascena*, in this study it was shown that petal odors are dominated by monoterpene alcohols and 2-phenylethanol, which are known insect attractants (Shalit *et al.*, 2004). Volatile emissions in scented (G1) and weakly scented (G2) genotypes of Damask rose were investigated in present experiment. It is interesting to note that weakly scented genotype generally had a lowest amount of 2-phenylethanol, typical of heavily scented roses. This lack of scent in modern hybrids is not restricted to roses but has also been observed in other flowers such as carnation (Clery *et al.*, 1999). The major volatile of the *R. damascena* floral headspace, 2-phenylethanol (2-PE), exhibits rhythmic emission with a peak during the light period which occurs at 24-h intervals. This rhythmic emission was also observed under conditions of continuous light or darkness, suggesting regulation by the endogenous circadian clock (Picone *et al.*, 2004). In our study the inhibition of 2-phenylethanol (2-PE) accumulation and emission in early and late stage of flower development is probably determined by the level of its substrate under light. 2-PE emission from *R. damascena* flowers is regulated by the endogenous circadian oscillator but that the level of extracted 2-PE changes only slightly during the day. They also found that the increased level of emitted 2-PE coincides with a decrease in the level of glycosylated 2-PE (2-PEG) and therefore suggested that 2-PEG acts as a source for the circadian-emitted 2-PE (Picone *et al.* 2004). The diurnal accumulation and emission of 2-phenylethanol coincides with the expression of its biosynthetic gene *PAR* and, therefore, is expected to be regulated at the level of gene transcription.

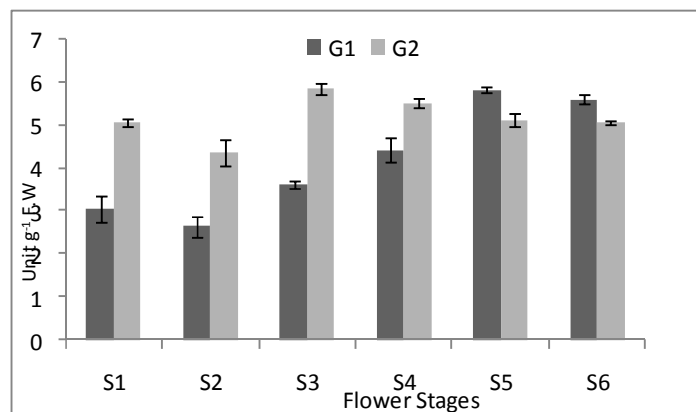


Fig. 2. Comparison of phenyl acetaldehyde reductase (PAR) enzyme activity during flower developmental stages (S) from two distinct genotypes (G1 and G2) of *Rosa damascena*. Error bars are standard deviation of the mean.

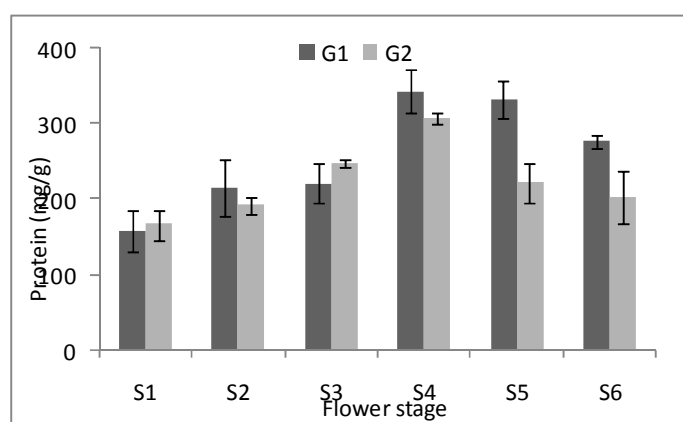


Fig. 3. Comparison of total protein during flower developmental stages (S) from two distinct genotypes (G1 and G2) of *Rosa damascena*. Error bars are standard deviation of the mean.

References

- Bergougoux V, Caissard JC, Jullien F, Magnard JL, Scalliet G, Cock JM, Huguency P, Baudino S. 2007. Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds. *Planta* 226, 853-866.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Chen XM, Kobayashi H, Sakai M, Hirata H, Asai T, Ohnishi T, Watanabe N. 2011. Functional characterization of rose phenyl acetaldehyde reductase (PAR), an enzyme involved in the biosynthesis of the scent compound 2-phenylethanol. *Journal of Plant Physiology* 168, 88-95.
- Clery RA, Owen NE, Chambers SF, Thornton-Wood SP. 1999. An investigation into the scent of carnations. *Journal of Essential Oil Research* 11, 355-359.
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology* 135, 1893-1902.
- Karami, A., Zandi, P., Khosh-Khui, M., Salehi, H., Saharkhiz, M. J. 2012. Analysis of essential oil from nine distinct genotypes of Iranian Damask rose (*Rosa damascena* Mill). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 5495-5498.
- Larroy C, Fernandez MR, Gonzalez E, Pares X, Biosca JA. 2002. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochemistry Journal* 361, 163-72.
- Picone JM, Clery RA, Watanabe N, MacTavish HS, Turnbull CGN. 2004. Rhythmic emission of floral volatiles from *Rosa damascena semperflorens* cv. 'Quatre Saisons'. *Planta* 219, 468- 478.
- Sakai M, Hirata H, Sayama H, Sekiguchi K, Itano H, Asai T, Dohra H, Hara M, Watanabe N. 2007. Production of 2-phenylethanol in roses as dominant floral scent compound from L-phenylalanine by