مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۲۸، شماره ۳، سال ۱۳۹۱

پاسخ متضاد ژنوتیپ‌های سیب و گلابی به اسید سالیسیلیک در شرایط حمله باکتری عامل بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*)

Contrast Response of Apple and Pear Genotypes to Salicylic Acid under Invasion of Causal Agent of Fire Blight (*Erwinia amylovora*)

کبری عرفانی‌نیا[۱]، حمید عبداللهی[۲]، محمود خسروشاهلی[۳] و غلامرضا صالحی‌جوزانی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران
۲- دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج (نگارنده مسئول)
۳- استاد واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران
۴- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۱۷

چکیده

عرفانی‌نیا، ک.، عبداللهی، ح.، خسروشاهلی، م. و صالحی‌جوزانی، غ. ر. ۱۳۹۱. پاسخ متضاد ژنوتیپ‌های سیب و گلابی به اسید سالیسیلیک در شرایط حمله باکتری عامل بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*). **مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۲۸ (۳):** ۳۱۲-۲۹۷.

تحقیقات نشان‌دهنده عکس‌العمل متفاوت دو گونه میزبان بیماری آتشک (Fire Blight) یعنی سیب و گلابی به تحریک نظام دفاع اکتسابی (SAR) توسط اسید سالیسیلیک بوده است. این تحقیق با هدف شناسایی علت این رفتار دوگانه با توجه به نقش اسید سالیسیلیک روی آنزیم کاتالاز و تحریک نظام دفاع اکتسابی انجام شد. به این منظور طی دو آزمایش، ابتدا اثر اسید سالیسیلیک روی فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط آنزیم استخراج شده و سپس در آزمایش دوم فعالیت کاتالازی بافت با پیش تیمارهای یک و هفت روزه روی شاخه‌چه‌های درون شیشه، سیب MM-111 (متحمل) و MM-106 (نیمه حساس) و ارقام گلابی Harrow Sweet (متحمل) و Spadona (نیمه حساس) ارزیابی شد. در آزمایش اول اسید سالیسیلیک در هر دو گونه، سبب بازدارندگی فعالیت کاتالاز شد و در آزمایش دوم، افزایش فعالیت کاتالازی بافت‌های میزبان‌های مورد بررسی مشاهده شد. با توجه به رفتار یکسان دو گونه در این سطح، رفتار میزبان‌ها در شرایط حمله عامل بیماری در گونه گلابی در غلظت‌های بسیار زیاد اسید سالیسیلیک و در سیب در غلظت‌های بسیار کم آن بررسی و نتایج متضاد آن با آزمایشات قبلی نشان‌دهنده افزایش حساسیت گلابی و کاهش حساسیت سیب در این آزمایشات بود. استخراج پروتئین کل میزبان‌ها و ارزیابی درصد فعالیت کاتالازی در عصاره‌های هم غلظت شده گیاهی نشان‌دهنده سهم قابل توجه‌تر کاتالاز در بافت‌های سیب در مقایسه با بافت‌های گلابی بود. به نظر می‌رسد علت پاسخ دوگانه سیب و گلابی به حضور اسید سالیسیلیک در شرایط حمله بیماری به تعادل بین افزایش فعالیت کاتالازی در اثر تحریک سیستم دفاع اکتسابی و بازدارندگی آن توسط اثر مستقیم این ماده روی فعالیت آنزیم کاتالاز دو گونه، صرف‌نظر از حضور عامل بیماری، باز می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم کاتالاز، پروتئین کل، فعالیت کاتالازی، نسبت کاتالاز به پروتئین کل و نظام دفاع اکتسابی.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: HamidAbdollahi@spii.ir

مقدمه

بیماری آتشک (Fire Blight) با عامل باکتریائی *Erwinia amylovora* به عنوان مهم‌ترین بیماری درختان میوه دانه‌دار، هر ساله خسارت قابل توجهی به باغداران کشورهای مختلف در مناطق عمده پرورش سیب و گلابی وارد می‌سازد (Van der Zwet and Bonn, 1999). تحقیقات در زمینه کاهش حساسیت محصولات در برابر تنش‌های محیطی بیانگر نقش عمده اسید سالیسیلیک در افزایش تحمل به هر دو گروه تنش‌های زنده و غیر زنده بوده است (Chaturvedi and Shah, 2007). اسید سالیسیلیک، القاء کننده مفید NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) اکسیداز و بازدارنده اکسیداز جایگزین است و می‌تواند وضعیت ردوکس سلول‌های گیاهی را به‌طور مستقیم کنترل کند (Holuigue *et al*., 2007). سطوح بالای اسید سالیسیلیک نه تنها رادیکال‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species = ROS) را با چند سازوکار بوجود می‌آورد، بلکه از فعالیت آنزیم‌های کلیدی موثر در سیستم آنتی‌اکسیدانی از جمله اسکوربات پراکسیداز و کاتالاز جلوگیری می‌کند و باعث تجمع بیش از حد ROS می‌شود (Durner and Klessig, 1995).

در شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده، انواع ROS پیام‌های مهمی برای شروع فرآیندهای دفاعی از جمله مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و تظاهر ژن‌های دخیل در سازوکار دفاعی گیاه ایجاد می‌کنند (Bi *et al*., 1995). شواهد مؤید اهمیت تعادل اسید سالیسیلیک با ROS در این واکنش‌های دفاعی است (Fobert and Despres, 2005). همچنین تحقیقات نشان داده که در واکنش دفاع محلی نیز در تحریک فرآیند دفاعی گیاه موثر است (Kawano, 2003). در بین روش‌های مبارزه با بیماری‌ها، تحریک نظام دفاع اکتسابی (SAR = System Acquired Resistance)، یک روش نسبتاً جدید محسوب می‌شود و در این بین اسید سالیسیلیک به عنوان یکی از مهم‌ترین مولکول‌های پیام برای تحریک SAR مطرح است. تحقیقات در زمینه مبارزه با بیماری آتشک نشان داد که عصاره گیاه عشقه (*Hedera helix*) باعث افزایش مقاومت سیب پایه M26 در مقابل این بیماری شد. عصاره این گیاه با تحریک SAR، سبب تحریک سازوکار مقاومت به آتشک در سیب شد.

تحریک SAR به عنوان عاملی مؤثر در القاء مقاومت، با چندین پاسخ دفاعی شامل: سنتز پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زائی (PR = Pathogenesis Related Proteins)، فیتوآلکسین‌ها، تجمع ROS و افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی در گیاه همراه بود (Baysal and Zeller, 2004). همچنین استفاده از ماده فعال گیاهی Acibenzolar-s-Methyl (ASM or BTH) با تحریک SAR باعث افزایش مقاومت درخت

گلابی در مقابل بیماری آتشک شد. در گونه‌های علفی توتون و گندم، تحریک SAR به بیان ژن‌های دفاعی وابسته بوده که به عنوان شاخصی برای تشخیص مقاومت حاصل از تحریک SAR از انواع دیگر مقاومت‌ها در این گیاهان استفاده شده است. در بین پاسخ‌های دفاعی گیاه، تحریک SAR احتمالاً بهترین رفتار برای افزایش تحمل به بیماری‌ها محسوب می‌شود. در این بین اسید سالیسیلیک به عنوان مهم‌ترین عامل فیزیولوژیکی تحریک سیستم SAR شناخته شده است و پس از آن ASM بهترین سیگنال درونی برای تحریک SAR به حساب می‌آید (Sparla *et al*., 2004; Shahini Sough *et al*., 2010).

احتمالاً پیام فعال‌کننده SAR در گیاهان، مولکولی از نوع لیپید است و فعال شدن این پیام می‌تواند بیان ژن‌های دفاعی را نیز افزایش دهد (Farmmer *et al*., 1998). اسید سالیسیلیک نیز قادر به جلوگیری از فعالیت کاتالاز است (Conrath *et al*., 1995; Chen *et al*., 1993; Sanchez-Cases and Klessig, 1994). واضح است که اسید سالیسیلیک، میزان H_2O_2 سلولی را از طریق نقش بازدارندگی خود روی آنزیم کاتالاز افزایش می‌دهد. H_2O_2 واسطه واکنش‌های دفاعی گیاه – عامل بیماری‌زا است و در سیگنال‌دهی در طول مقاومت سیستمیک بدست آمده، دخالت دارد با این وجود تحقیقات دیگر نتوانستند بازدارندگی اسید سالیسیلیک از فعالیت کاتالاز در توتون، *Arabidopsis thaliana*، سویا و ذرت را ثابت کنند (Guan and Scandalios, 1995; Summermatter *et al*., 1995; Tenhaken and Rubell, 1997; Willekens *et al*., 1994). تحقیقات اخیر قهرمانی (Ghahremani, 2009) در بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک در واکنش دو گونه سیب و گلابی به بیماری آتشک نشان داد که در ارقام حساس و متحمل گلابی حضور اسید سالیسیلیک باعث تأخیر بروز علائم بیماری و در پایه‌های حساس و متحمل سیب باعث تشدید علائم گردید. قهرمانی و عبداللهی (Ghahremani and Abdollahi, 2011) مشاهده کردند که این رفتار متفاوت سیب و گلابی با تولید ROS در این اثر متقابل منطبق است.

با توجه به اهمیت اسید سالیسیلیک بعنوان مولکول پیام در تحریک نظام دفاع اکتسابی گیاه و رفتار متفاوت سیب و گلابی به این مولکول در مقابل حمله بیماری آتشک، این تحقیق به‌منظور شناخت علت رفتار متفاوت این دو گونه برنامه‌ریزی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و عامل بیماری‌زا

پایه‌های سیب MM-111 (متحمل) و MM-106 (نیمه حساس) و ارقام گلابی هاروسوئیت (Harrow Sweet) (متحمل) و اسپادونا (Spadona) (نیمه حساس) بوسیله

کشت ساقه‌چه در محیط درون شیشه روی محیط حاوی نمک‌های پایه MS غنی شده ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز که با ۰/۶٪ آگار جامد شده بود منتقل و سپس در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی ایجاد شده با لامپ‌های فلئورسنت سفید با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و در دمای شبانه‌روزی ۱± ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای ارقام گلابی ترکیب محیط کشت مشابه با پایه‌های سیب لیکن با جایگزینی نمک‌های MS با QL تغییر یافته بر اساس روش لبلای و همکاران (Leblay *et al.*, 1991) استفاده شد. در آزمایش‌های بررسی اثر متقابل میزبان با عامل بیماری، باکتری *E. amylovora* استرین Ea273 (ATCC No.=49946) به صورت شب‌گذران در محیط کشت LB مایع در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت و آلوده‌سازی با اضافه کردن ۷۵ میکرولیتر مایه تلقیح دارای کدورت (OD) معادل ۲ به هر لوله آزمایش انجام شد. کشت‌های توام با باکتری در شرایط اتاق رشد ذکر شده برای رشد درون شیشه مواد گیاهی منتقل شدند (Abdollahi *et al.*, 2004).

بررسی پاسخ کاتالاز عصاره بافتی به اسید سالیسیلیک

به منظور بررسی رفتار کاتالاز استخراجی دو گونه سیب و گلابی در حضور اسید سالیسیلیک، ۰/۵ گرم از ساقه و دم‌برگ ارقام تهیه و در آون سرد، به کمک بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH= ۷) سائیده شده و عصاره یکنواخت به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شده و سپس بخش روئی جهت انجام آزمایش جدا شد. اسید سالیسیلیک در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، تهیه و بعد از سترون شدن توسط گذراندن از فیلتر ۰/۲ میکرون به عصاره استخراجی افزوده شد. فعالیت کاتالاز موجود در عصاره درحضور H_2O_2 براساس کاهش در مقدار جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز برای هر رقم و هر غلظت حداقل در چهار تکرار انجام گرفت.

بررسی فعالیت کاتالاز در بافت‌های میزبان تیمار شده با اسید سالیسیلیک

به منظور مقایسه رفتار کاتالاز استخراج شده در حضور اسید سالیسیلیک با رفتار کاتالاز درون بافتی در پاسخ به حضور این ماده از آزمایش پیش تیمار ساقه‌چه‌ها با اسید سالیسیلیک استفاده شد. به این منظور ساقه‌چه‌های درون شیشه ارقام متحمل و نیمه حساس دو گونه میزبان سیب و گلابی در دو پیش تیمار ۱ و ۷ روزه در معرض اسید سالیسیلیک در غلظت‌های صفر (شاهد) ۱، ۵ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند. پس از گذشت مدت پیش تیمار ساقه‌چه‌ها خارج و عصاره‌گیری همانند بالا از بافت‌های برگ و

ساقه‌چه انجام و بطور مشابه فعالیت آنزیم کاتالاز درحضور H_2O_2 براساس کاهش در مقدار جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی رفتار سیب به غلظت‌های کم اسید سالیسیلیک در حضور عامل بیماری

با توجه به آزمایش‌های بررسی فعالیت کاتالاز در عصاره بافت‌ها و همچنین مطالعه فعالیت کاتالاز در بافت‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک، در این مرحله بررسی رفتار پایه‌های سیب متحمل و نیمه حساس به غلظت‌های بسیار کم تا کم اسید سالیسیلیک در حضور عامل بیماری انجام گرفت. ساقه‌چه‌های پایه‌های سیب با طول تقریبی ۲/۵ سانتی‌متر در لوله‌های آزمایش حاوی غلظت‌های پایین اسید سالیسیلیک شامل ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر همراه با شاهد فاقد اسید سالیسیلیک به روش ذکر شده در بالا با باکتری *E. amylovora* کشت توام شدند. پیشرفت بیماری در زمان‌های متوالی پس از آلوده‌سازی با دو شاخص سرعت پیشرفت نکروز و درصد میانگره‌های آلوده مورد بررسی قرار گرفت. از زمان شروع کشت توام، با فواصل زمانی ۲۴ ساعت در یک دوره ۳۴۶ ساعته، تأثیراسید سالیسیلیک برسرعت پیشرفت نکروز در ساقه‌چه‌های مزبور بررسی شد. به منظور اطمینان از فعالیت و رشد باکتری در محیط، معرف برموکرزول‌گرین (Bromocresol Green) به عنوان شاخص pH و رشد باکتری در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به کلیه محیط‌های کشت توأم افزوده شد (Abdollahi *et al*., 2004).

بررسی رفتار گلابی به غلظت‌های زیاد اسید سالیسیلیک در حضور عامل بیماری

در این آزمایش نیز بررسی رفتار ارقام گلابی متحمل و نیمه حساس به غلظت‌های زیاد تا بسیار زیاد اسید سالیسیلیک در حضور عامل بیماری انجام گرفت. ارقام گلابی با طول تقریبی ۲ تا ۲/۵ سانتی‌متر در لوله‌های آزمایش حاوی غلظت‌های بالای اسید سالیسیلیک شامل ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر همراه با شاهد فاقد اسید سالیسیلیک به روش ذکر شده در بالا با باکتری *E. amylovora* کشت توام شدند. پیشرفت نکروز نیز همانند سیب در زمان‌های متوالی پس از آلوده‌سازی با دو شاخص فوق بررسی شد. سایر عوامل آزمایش نیز همانند آزمایش انجام گرفته روی پایه‌های سیب بود.

مقایسه نسبت کاتالاز به پروتئین کل در سیب و گلابی

برای استخراج پروتئین کل از بافت ساقه‌چه‌های میزبان‌ها، ۰/۵ گرم از ساقه و برگ همراه با نیتروژن مایع سائیده شد. قبل از این کار، بافر استخراج حاوی دی‌تیاتریتول (DDT) ۱ مولار، سولفات منیزیم ($MgSO_4$) ۱۰ مولار و تریس- کلرید هیدروژن (Tris- HCl) ۱۰۰ مولار تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد خنک شد. به نمونه آماده شده حجم معادلی از بافر استخراج اضافه شده و این مخلوط

۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه با دور g ۶۰۰۰ سانتریفوژ شد. حجم ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول روئی حاصل با ۵ میلی‌لیتر معرف بیورت (Biuret) مخلوط و جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری پروتئین کل از محلول ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی استفاده شد و سپس غلظت پروتئین‌ها در عصاره‌های استخراجی همسان سازی شدند. متعاقب آن میزان کاتالاز در غلظت یکسانی از پروتئین کل ارقام بررسی شد.

نتایج و بحث

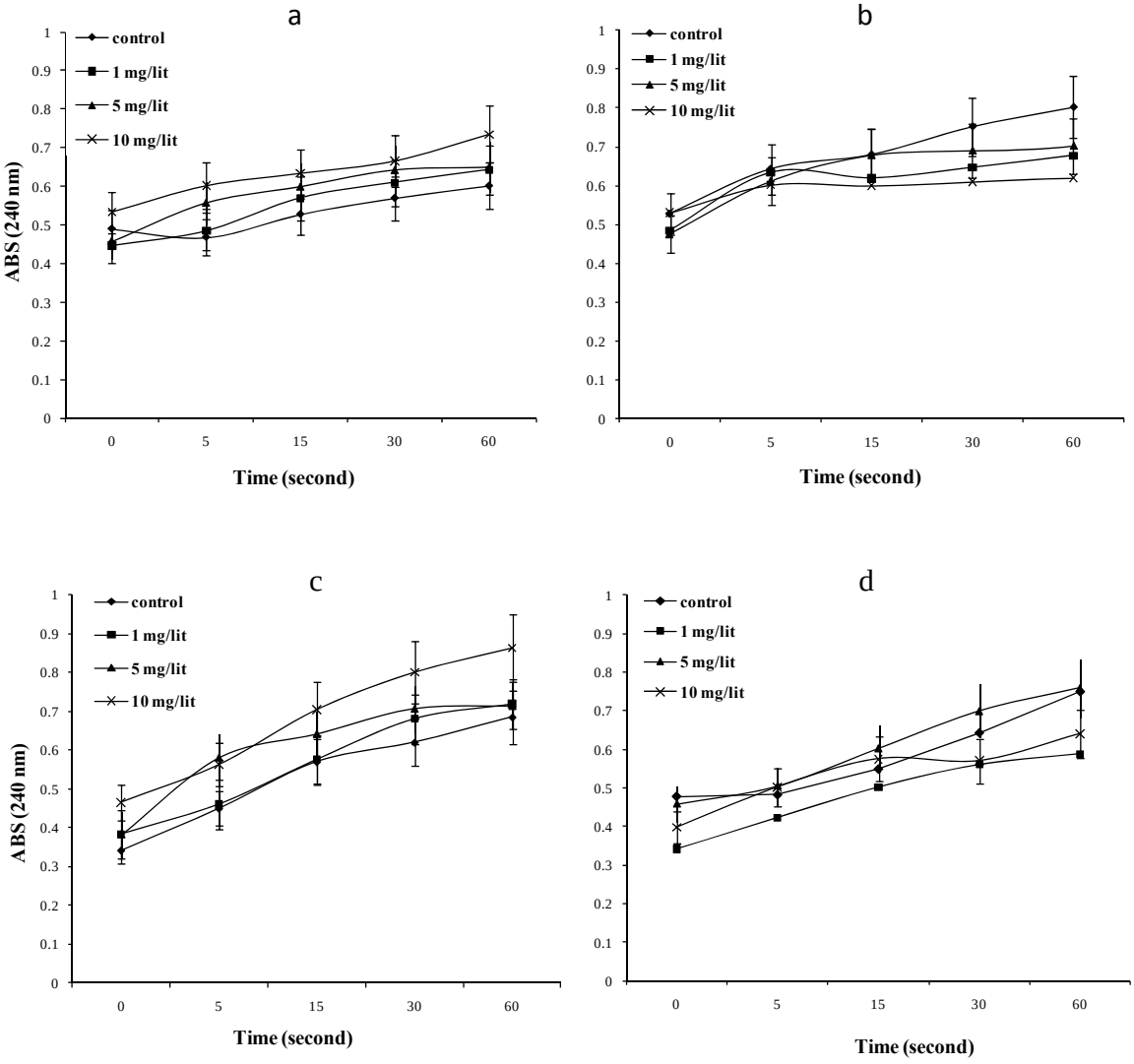
پاسخ کاتالاز استخراجی به اسید سالیسیلیک

بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز موجود در عصاره استخراجی ساقه و دمبرگ ارقام متحمل و حساس دو گونه سیب و گلابی در حضور اسید سالیسیلیک نشان داد که فعالیت کاتالاز در عصاره استخراجی هر دو گونه در حضور اسید سالیسیلیک نسبت به شاهد دارای رفتار پیچیده‌ای بود. به این صورت که در گلابی رقم هاروسوئیت رفتار مورد انتظار به صورت کاهش جذب در ۲۴۰ نانومتر در شاهد فاقد اسید سالیسیلیک که بیانگر فعالیت اندک کاتالاز بود مشاهده شد. همچنین در حضور غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک به دلیل بازدارندگی این ماده روی فعالیت کاتالاز افت جذب به حداقل رسید که به دلیل توقف فعالیت آنزیم توسط اسیدسالیسیلیک بود. در گلابی رقم اسپادونا نیز افت جذب در پائین‌ترین غلظت اسید سالیسیلیک (۱ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد و در غلظت‌های بالاتر تقریباً فعالیت کاتالازی متوقف شد (شکل ۱).

در سیب الگوی فعالیت کاتالازی نسبت به گلابی پیچیده‌تر بود و از الگوی غیر قابل پیش‌بینی طبعیت نمود که شاید به دلیل اثر متقابل اسید سالیسیلیک با سایر مواد و پروتئین‌های موجود در عصاره استخراجی گیاه بود. لیکن در این گونه نیز با افزایش غلظت‌های اسید سالیسیلیک میزان افت جذب ۲۴۰ نانومتر به حداقل رسید. چنین به نظر می‌رسد که برآیند کلی تاثیر اسید سالیسیلیک در هر دو گونه سیب و گلابی روی کاتالاز موجود یکسان و افزایش کاتالاز صرف نظر از سایر آثار آن روی افزایش تظاهر ژن‌ها و تحریک نظام دفاع اکتسابی میزبان، بطور یکسانی سبب بازدارندگی کاتالاز در هر دو گونه شد. این نتایج با رفتار مورد انتظار برای کاتالاز و نقش بازدارندگی اسید سالیسیلیک روی این آنزیم در انطباق است (Durner and Klessig, 1995).

فعالیت کاتالاز در بافت‌های تیمار شده میزبان با اسید سالیسیلیک

تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر فعالیت کاتالاز درعصاره استخراجی گیاهان پیش تیمار شده نشان داد که هر دو رقم متحمل و نیمه حساس و هر دو گونه میزبان رفتار

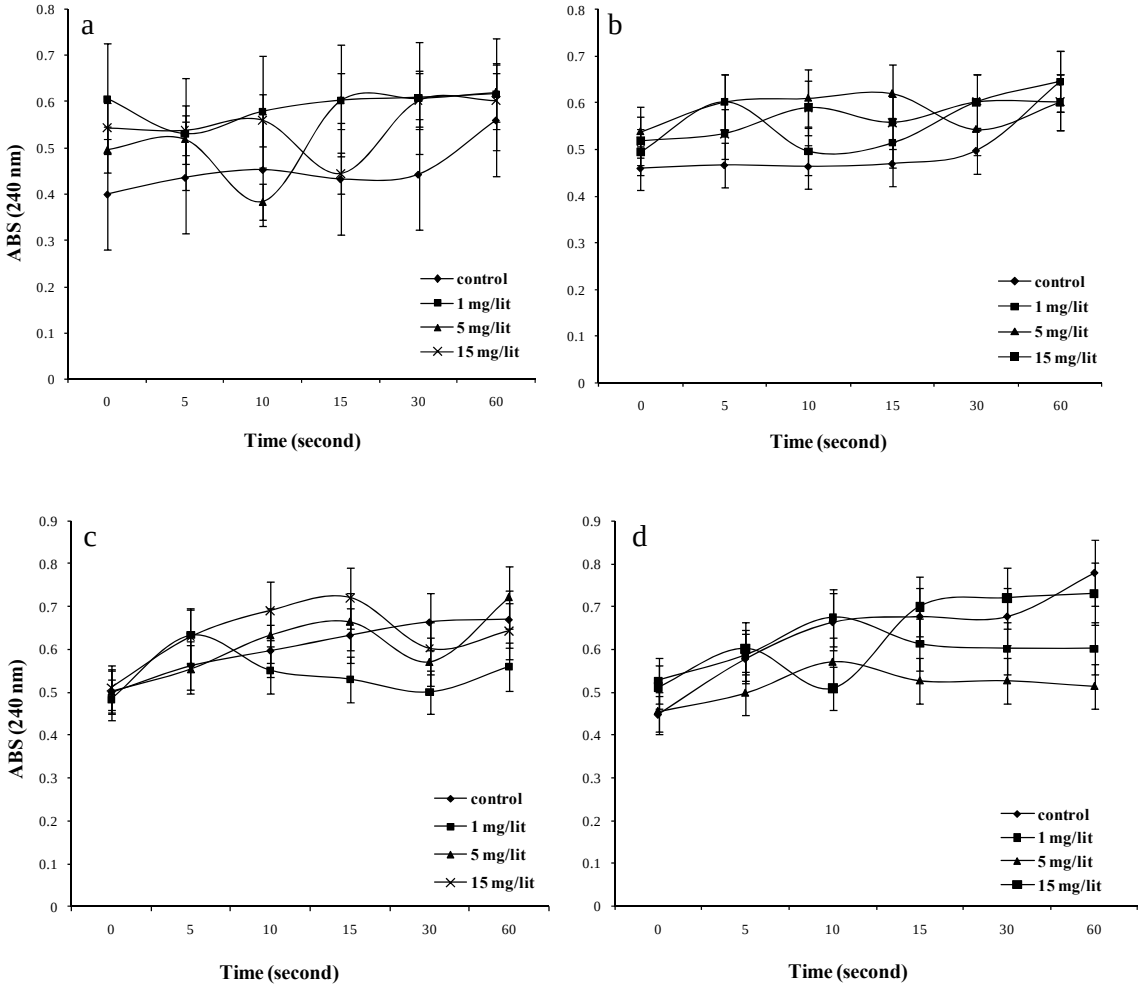


شکل ۱- فعالیت آنزیم کاتالاز در عصاره در حضور اسید سالیسیلیک در بافت‌های گلابی رقم هاروسوئیت (a) و رقم اسپادونا (b)؛ و سیب MM111 (c) و MM106 (d)

Fig.1. Catalase activity in extracted crude in the presence of salicylic acid in tissues of pears *cv.* Harrow Sweet (a) and *cv.* Spadona (b); and apple rootstocks MM-111 (c) and MM-106 (d)

کاتالازی تقریباً مشابهی داشتند. در دو رقم گلابی، پیش تیمار اسید سالیسیلیک سبب افزایش فعالیت کاتالازی در تیمارهای ۵ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر شد در صورتی که در تیمار شاهد و ۱ میلی‌گرم بر لیتر فعالیت قابل توجه کاتالازی دیده نشد (شکل ۲). در پایه‌های سیب مورد مطالعه رفتار کاتالازی مشابه با ارقام گلابی دیده شد. با این تفاوت که در گونه سیب پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک در غلظت پائین‌تر نیز سبب افزایش فعالیت کاتالاز شد.

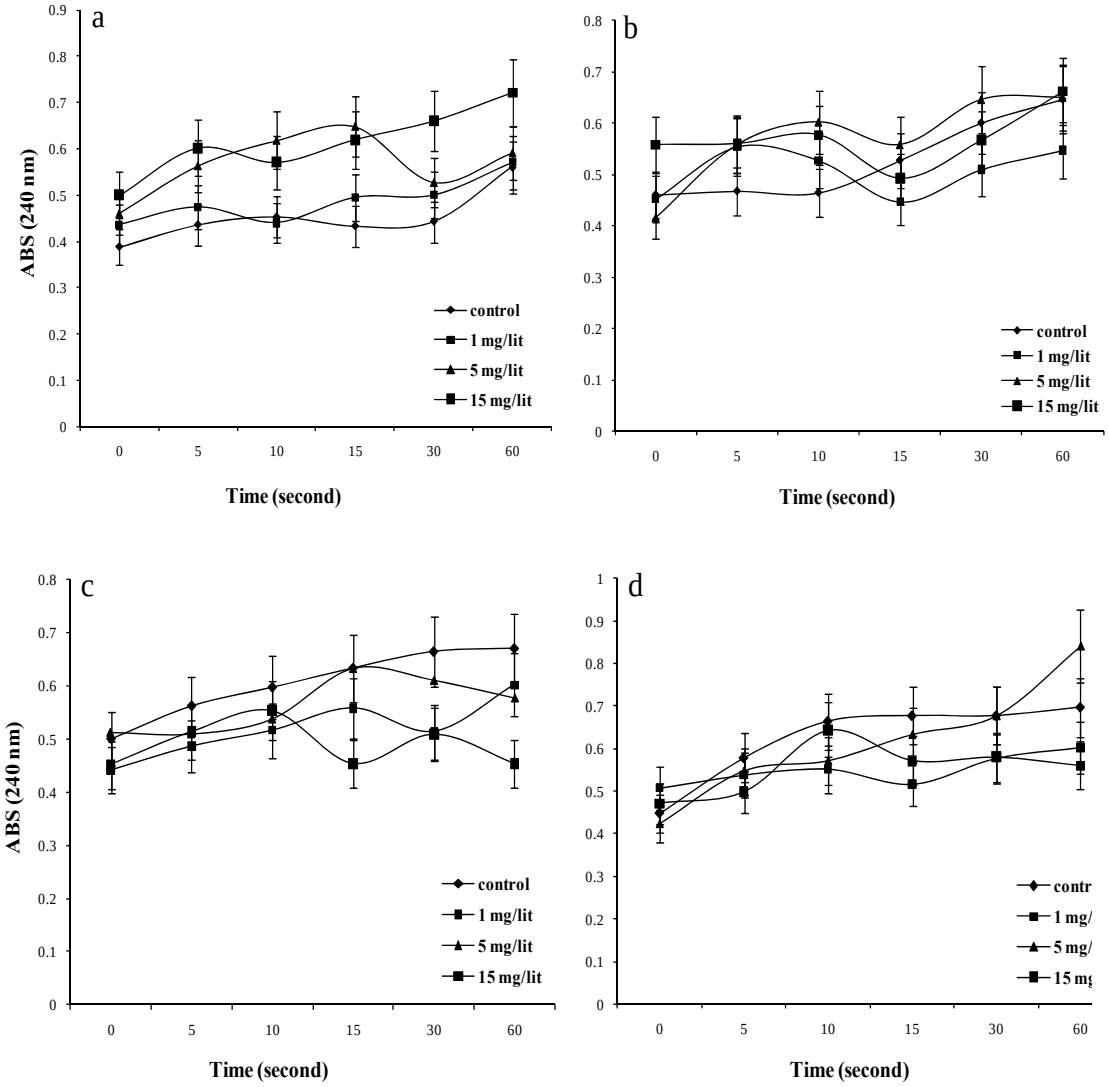
مقایسه فعالیت کاتالاز در ارقام مذکور پس از پیش تیمار یک روزه و هفت روزه این ارقام



شکل ۲- فعالیت آنزیم کاتالاز در پیش تیمار یک روزه در حضور اسید سالیسیلیک در گلابی رقم هاروسوئیت (a) و رقم اسپادونا (b)؛ و سیب MM111 (c) و MM106 (d)

Fig. 2. Catalase activity in pre-treatment of one day in the presence of salicylic acid in tissues of pears *cv.* Harrow Sweet (a) and *cv.* Spadona (b); and apple rootstocks MM-111 (c) and MM-106 (d)

نشان داد که حضور اسید سالیسیلیک در محیط کشت در هر دو پیش‌تیمار، باعث افزایش فعالیت کاتالاز شد، لیکن در پیش تیمار یک روزه افزایش بیش‌تری مشاهده شد. همچنین فعالیت کاتالازی در ارقام مقاوم گلابی نسبت به رقم حساس آن افزایش بیش‌تری نشان داد (شکل ۲ و شکل ۳). چنانچه ذکر شد، اسیدسالیسیلیک از یکسو روی فعالیت کاتالاز نقش بازدارندگی مستقیم دارد (Durner and Klessig, 1995) و از سوی دیگر با توجه به نقش تحریک کنندگی آن در نظام دفاع اکتسابی، افزایش تولید کاتالاز کل و در نتیجه افزایش فعالیت کاتالازی بافت را سبب می‌شود (Durrant and Dong, 2004). لیکن اینکه جنبه افزایش و یا کاهش فعالیت کاتالازی کل بافت در نتیجه پیش تیمار اسید سالیسیلیک



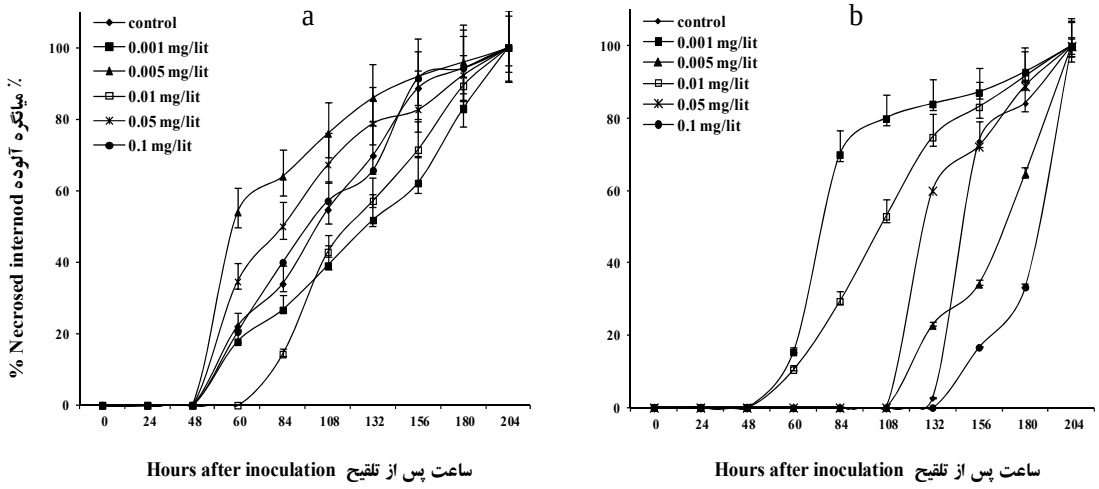
شکل ۳- فعالیت آنزیم کاتالاز پس از پیش تیمار ۷ روزه در حضور اسید سالیسیلیک در بافت‌های گلابی رقم هاروسوئیت (a) و رقم اسپادونا (b)؛ و سیب MM111 (c) و MM106 (d)

Fig.3. Catalase activity in pre-treatment of 7 days in the presence of salicylic acid in tissues of pears *cv.* Harrow Sweet (a) and Spadona (b); and apple rootstocks MM-111 (c) and MM-106 (d)

غلبه پیدا کند به تعادل نقش بازدارندگی مستقیم آن روی آنزیم کاتالاز و نقش افزایش دهندگی آن روی تولید بیش‌تر کاتالاز در بافت باز می‌گردد.

پاسخ میزبان‌ها به غلظت‌های کم اسید سالیسیلیک در حضور عامل بیماری

غلظت‌های پایین اسید سالیسیلیک در پایه‌های سیب MM-111 (متحمل) و MM-106 (حساس) در حضور باکتری، در برخی غلظت‌ها

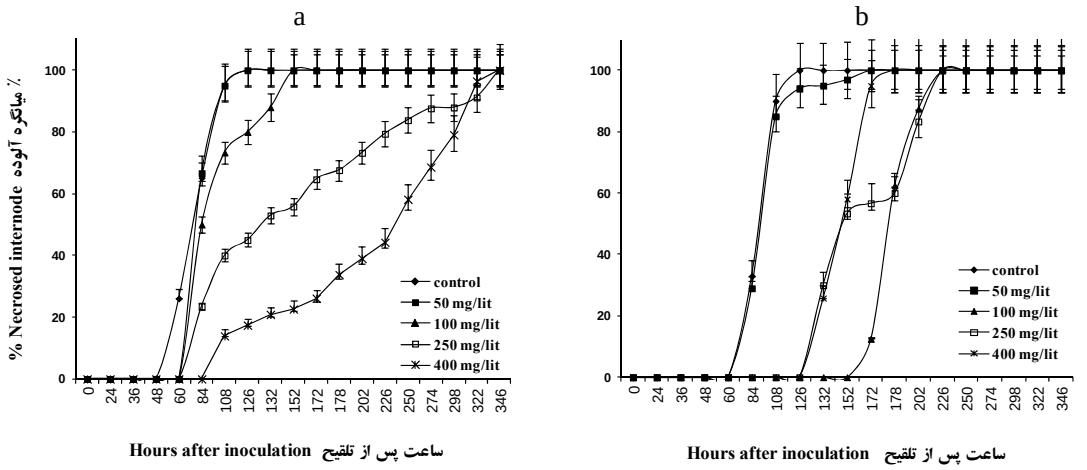


شکل ۴- اثر غلظت‌های پایین اسید سالیسلیک در بروز علائم بیماری در سیب پایه MM111 (a) و (b) MM106

Fig.6. Effect of low concentration of salicylic acid on appearance of disease symptoms in apple rootstocks MM-111 (a) and MM-106 (b)

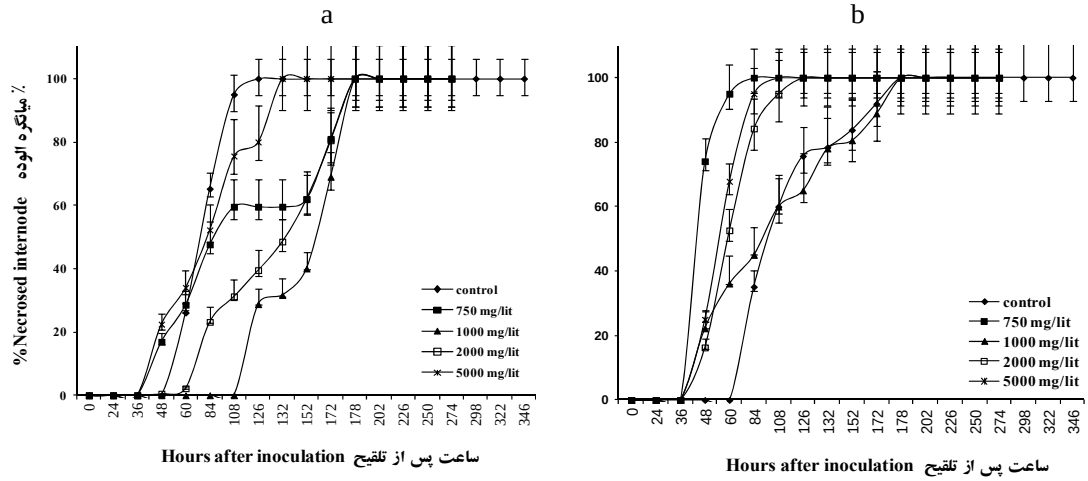
سبب تاخیر و در برخی دیگر از غلظت‌ها همانند نتایج قبلی سبب تسریع در بروز علائم بیماری شد (شکل ۴). نتایج نشان داد که در هر دو پایه مورد آزمایش، خصوصاً در پایه MM106، این روند تمایل به تاخیر در بروز علائم در غلظت‌های بسیار پائین اسید سالیسیلیک بیش‌تر و روند همگن تری به خود گرفت، درحالی که در دیگر پایه در غلظت یک هزارم میلی‌گرم بر لیتر کاهش، ولی در غلظت ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر لیتر همچنان تسریع در علائم نشان داد (شکل ۴). با وجود عدم دستیابی به یک نظم کامل، نتایج این بخش نشان دهنده آن بود که در غلظت‌های بسیار کم اسید سالیسیلیک روند تسریع در بروز علائم در بخش قابل توجهی از تیمارها (تیمارهای بسیار کم غلظت) روند معکوس در پیش گرفت و به سمت تاخیر در بروز علائم پیش رفت.

در آزمایش تکمیلی داده‌های حاصل از استفاده غلظت‌های بالای اسید سالیسیلیک در رقم حساس و متحمل گلابی نشان دادند که در هر دو رقم گلابی تا غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک روند یکنواخت تاخیر در بروز علائم از خود بروز دادند (شکل ۵). به دلیل این روند یکنواخت مشاهده شده، در آزمایش بعدی غلظت‌های ۷۵۰ تا ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک مورد استفاده قرار گرفت که نتایج نشان‌دهنده پاسخ متفاوت دو رقم به تیمارهای بسیار بالای اسید سالیسیلیک بود (شکل ۶). چنانچه مشاهده می‌شود در گلابی رقم هاروسوئیت همچنان



شکل ۵- اثر غلظت‌های بالای اسید سالیسیلیک در بروز علائم بیماری درگلابی رقم هاروسوئیت (a) و رقم اسپادونا (b)

Fig. 5. Effect of high concentration of salicylic acid on appearance of disease symptoms in pear *cv.*Harrow Sweet (a) and *cv.* Spadona (b)



شکل ۶- اثر غلظت‌های بسیار بالای اسید سالیسیلیک در بروز علائم بیماری درگلابی رقم هاروسوئیت (a) و رقم اسپادونا (b)

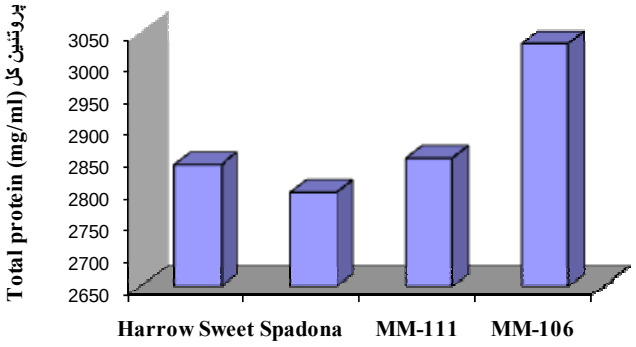
Fig. 6. Effect of very high concentration of salicylic acid on appearance of disease symptoms in pear *cv.* Harrow Sweet (a) and *cv* Spadona (b)

روند تاخیر در بروز علائم تا غلظت ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید، در حالی که در رقم اسپادونا از تیمار ۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به بالا روند تاخیر در علائم

به روند تسریع در بروز علائم تبدیل شد. همانند سیب روند متفاوتی در بین دو رقم حساس و متحمل نسبت به غلظت‌های اسید سالیسیلیک مشاهده گردید.

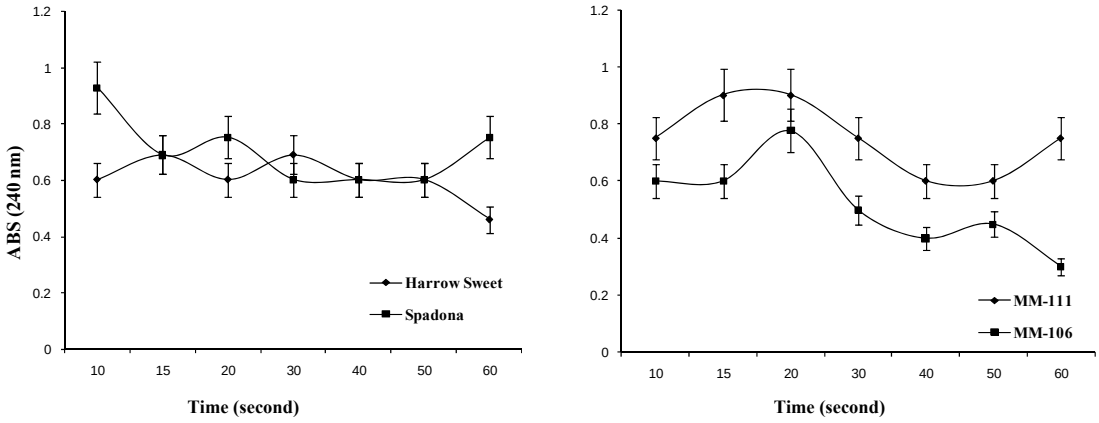
نسبت کاتالاز به پروتئین کل در سیب و گلابی

اندازه‌گیری پروتئین کل در عصاره حاصل از ساقه و دمبرگ ارقام گلابی و پایه‌های سیب نشان داد که میزان پروتئین کل در پایه‌های سیب از میزان پروتئین کل موجود در عصاره حاصل از ارقام گلابی بیش‌تر بود (شکل ۷). در ارزیابی مقدار آنزیم کاتالاز موجود در غلظت یکسانی از پروتئین کل از ارقام مذکور، داده‌ها نشان دادند که مقدار کاتالاز موجود ارزیابی شده بر اساس فعالیت آنزیمی پروتئین استخراجی در پایه‌های سیب بیش‌تر از ارقام گلابی بود (شکل ۸).



شکل ۷- مقدار پروتئین کل در ارقام گلابی و پایه‌های سیب
Fig. 7. Total protein content in pear cultivars and apple rootstocks

اسید سالیسیلیک مولکول پیام برای نظام SAR در بافت زنده گیاه است. سیستم SAR گیاه نیاز به پیام مولکول اسید سالیسیلیک دارد و این پیام همچنین با پروتئین‌های PR گیاهی در ارتباط است (Farmmer *et al.*, 1998; Durrant and Dong, 2004). هر عاملی که باعث افزایش تولید ROS در گیاه شود، این نظام را در گیاه فعال می‌کند (Kawano, 2003) و از طرفی اسید سالیسیلیک با کاهش فعالیت کاتالاز، باعث تجمع ROS (به شکل H_2O_2) در گیاه می‌شود که این افزایش به نوبه خود، پیامی برای تحریک SAR است. بر اثر تحریک SAR افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی که مهم‌ترین آنها کاتالاز است انجام می‌گیرد (Durrant and Dong, 2004). اسید سالیسیلیک دارای نقش دوگانه در تحریک نظام SAR در دو گونه سیب و گلابی است به این صورت که با اثر بازدارندگی بر کاتالاز، از



شکل ۸- مقایسه مقدار کاتالاز در ارقام گلابی و پایه‌های سیب
Fig. 8. Comparison of catalase content in pear cultivars and apple rootstocks

یکسو باعث تجمع ROS در گیاه شده و در نتیجه تجمع ROS بعنوان پیامی برای تحریک SAR عمل می‌کند. از سوی دیگر با تحریک مستقیم روی تظاهر ژن‌های درگیر در نظام دفاعی گیاه سبب افزایش فعالیت SAR می‌گردد. ولی در این بین تولید ROS در گیاه دارای نقش دوگانه‌ای است به این ترتیب که از یکسو بعنوان تحریک کننده SAR و بازدارنده فعالیت عامل بیماری در محل آلودگی عمل نموده و دارای نقش مثبت است و از سوی دیگر به خودی خود سبب مرگ اکسیداسیونی سلول‌های گیاهی و پیشرفت بیماری می‌گردد.

بر اساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان کاتالاز در غلظت یکسانی از پروتئین استخراجی و بالا بودن میزان کاتالاز در سیب نسبت به گلابی، چنین استنباط می‌شود که در گونه گلابی، به دلیل پایین بودن میزان کاتالاز (نسبت به آستانه تولید آن) تحریک SAR باعث تولید کاتالاز به میزان زیاد می‌شود. این وضعیت در گونه سیب به نحو دیگری است، به این صورت که در این گونه به دلیل بالا بودن میزان کاتالاز موجود (نسبت به آستانه تولید آن) تحریک SAR باعث تولید مقدار جزئی کاتالاز می‌شود. در گونه گلابی افزایش تولید کاتالاز نسبت به بازدارندگی آن در حضور اسید سالیسیلیک، باعث کاهش ROS و کاهش بروز علائم شد، که این کاهش در رقم حساس گلابی نسبت به متحمل، شدت بیش‌تری داشت. قهرمانی (Gahremani, 2009) نشان داد که در حضور باکتری و اسید سالیسیلیک، تولید ROS عمومی در بافت‌های مورد حمله آتشک در رقم متحمل گلابی هاروسوئیت، نسبت به رقم نیمه متحمل اسپادونا با تاخیر بیش‌تری انجام گرفت. بنابراین تولید بیش‌تر و سریع‌تر ROS در میزبان حساس، نکروز سریع‌تر و مرگ زودتری را به همراه داشت.

تسریع بروز علائم در غلظت‌های بسیار زیاد اسید سالیسیلیک در رقم حساس گلابی، و تاخیر آن در رقم متحمل نشان دهنده این است که در رقم متحمل‌تر میزان آنزیم‌های دفاع اکسیداسیونی در حالت عادی نسبت به رقم حساس‌تر در سطح اشباع‌تری وجود داشته و افزایش بسیار زیاد غلظت اسید سالیسیلیک در محیط زودتر سبب بازدارندگی فعالیت آنزیم‌های دفاع اکسیداسیونی آن از جمله کاتالاز در این رقم خواهد شد. از این نقطه نظر، رفتار دو رقم متحمل و نیمه حساس گلابی همانند ارتباط دو گونه سیب و گلابی است. به این صورت که در سیب بالاتر بودن سطح اشباع آنزیم‌های دفاع اکسیداسیونی که در اینجا با آزمایش غلظت‌های یکنواخت پروتئین و ارزیابی فعالیت کاتالازی در آن مورد تایید قرار گرفت، سبب می‌شود با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک سریع‌تر به حد بازدارندگی رسیده و این بازدارندگی سبب افزایش آلودگی بیشتر به بیماری آتشک خواهد شد.

از سوی میزان تولید کاتالاز و عکس‌العمل‌های زیستی در این دو گونه وابسته به آستانه‌های ژنتیکی تعریف شده برای هر گونه است و ممکن است از یک رابطه کاملاً تعریف شده و خطی پیروی ننمایند. بر این اساس لازم است در آینده به منظور تایید نهائی نظریه فوق ضمن جداسازی، همسانه سازی (Cloning) و تعیین توالی ژن‌های کاتالاز مهم دو گونه سیب و گلابی، نسبت به ارزیابی تظاهر این ژن‌ها در حضور غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و تعیین آستانه‌های بازدارندگی آن در سطح ترانسکریپتوم اقدام شود.

References

Abdollahi, H., Rugini, E., Ruzzi, M., and Muleo, R. 2004. *In vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 203-212.

Baysal, O., and Zeller, W. 2004. Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to Acibenzolar-S-methyl against Fire Blight (*Erwinia amylovora*). Physiological and Molecular Plant Pathology 65: 305–315.

Bi, Y., Kenton, P., Mur, L., Darby, R., and Draper, J. 1995. Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. Plant 8: 235-245.

Chaturvedi, R., and Shah, J. 2007. Salicylic acid in plant disease resistance. Pp. 379-380. In: Hayat, S., and Ahmad, A. (eds.). Salicylic Acid: A Plant Hormone. Springer, The Netherlands.

Chen, Z., Silva, I. I., and Klessig, D. E. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science 263: 1883-1886.

Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J., and Klessig, D. 1995. Two inducers of plant defense responses, 2, 6-dichloroisionicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 92: 7143-7147.

Durner, J., and Klessig, D. F. 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2, 6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 92: 11312-11316.

Durrant, W. E., and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 42: 185-209.

Farmmer, E. E., Weber, H., and Vollenweider, S. 1998. Fatty acid signaling in *Arabidopsis*. Planta 206: 167-174.

Fobert, P. R., and Després, C. 2005. Redox control of systemic acquired resistance. Currrent Opinions in Plant Biology 8: 378-382.

Ghahremani, Z. 2009. Evaluation of electron transport chain inhibitores and systemic aquired resistance (SAR) activator on fire blight development of host Plant. M. Sc. Thesis, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University of Tehran, Iran. 152 pp. (In Persian).

Ghahremani, Z., and Abdollahi, H. 2011. Induction of systemic acquired resistance by salicylic acid against fire blight in apple and pear. Acta Horticulturae 896: 155-163.

Guan, L., and Scandalios, J. 1995. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 92: 5930-5934.

Holuigue, L., Salinas, P., Blancoand, F., and Garreton, V. 2007. Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes. Pp. 197-246. In: Hayat, S., and Ahmad, A. (eds.). Salicilic Acid: A Plant Hormone. Springer, The Netherlands.

Kawano, T. 2003. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. Plant Cell Reports 21: 829-837.

Leblay, C., Chevreau E., and Robin L. M. 1991. Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivar (*Pyrus communis* L.). Plant Cell, Tissue Organ Culture 25: 99-105.

Sanchez-Casas, P., and Klessig, D. 1994. A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhabitable catalase activity are present in a variety of plant species. Plant Physiolgy 106: 1675-1679.

Shahini Sough, F., Keshavarzi, M., Hassanzade, N., Hashemi, M., Abdollahi, H., and Tawosi, M. 2010. *In vitro* evaluation of acibenzolar-s-methyl on inhibition of fire blight in apple *cv.* Golden Delicious. Iranian Journal of Plant Pathology 46: 275-278.

Sparla, F., Rotino, L., Valgimigli, C. M., Pupillo, P., and Trost, P. 2004. Systemic resistance induced by benzothiadiazole in pear inoculated with the agent of fire blight (*Erwinia amylovora*). Scientia Horticulturae 101: 269–279.

Summermatter, K., Sticher, L., and Métraux, J. 1995. Systemic responses in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudonomas syringae* pv *synringae*. Plant Physiology 108: 1379-1385.

Tenhaken, R., and Rubel, C. 1997. Salicylic acid is needed in hypersensitive cell death in soybean but does not act as a catalase inhibitor. Plant Physiology 115: 291-298.

van der Zwet, T., and Bonn, W. G. 1999. Recent spread and current worldwide distribution of fire blight. Acta Horticulturae 489: 167-168.

Willekens, H., Langebartels, C., Tire, C., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Camp, W. 1994. Differential expression of catalase in *Nicotiana plumginifolia* L. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 10450-10454.