مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۲۵ ، شماره ۲، سال ۱۳۸۸

کارآیی کاربرد اسید سالیسیلیک در تحریک نظام دفاع اکتسابی گیاه میزبان علیه بیماری آتشک در سیب و گلابی

Efficiancy of Application of Salcilic Acid on Induction of Systemic Acquired Resistance in Host Plant Against Fire Blight in Apple and Pear

زهرا قهرمانی[۱]، حمید عبدالهی[۲]، اسلام مجیدی هروان[۳] و غلامرضا صالحی جوزانی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۲- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۳- استاد، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
۴- استادیار، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۳/۲۸

چکیده

قهرمانی، ز.، عبدالهی، ح.، مجیدی هروان، ا.، صالحی جوزانی، غ. ۱۳۸۸. کارآیی کاربرد اسید سالیسیلیک در تحریک نظام دفاع اکتسابی گیاه میزبان علیه بیماری آتشک در سیب و گلابی. **مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۲۵ (۲):** ۱۶۸ - ۱۵۳.

باکتری عامل بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) به طور طبیعی نظام دفاع اکتسابی گیاه میزبان را تحریک می‌کند، لیکن تاکنون کارآیی تحریک مصنوعی این نظام دفاع اکتسابی گیاه میزبان علیه بیماری آتشک در کاهش بروز خسارت کمتر مورد توجه قرار گرفته است. این تحقیق به منظور بررسی اثر تحریک این نظام دفاع اکتسابی گیاه میزبان علیه بیماری آتشک با استفاده از اسید سالیسیلیک بر روی شدت و زمان نکروز حاصل از عامل بیماری در ژنوتیپ‌های مختلف درخت سیب (*Malus domestica* Borkh.) و گلابی (*Pyrus communis* L.) با حساسیت‌های متفاوت به بیماری انجام شد. به این منظور پایه‌های سیب MM-111 (متحمل) و MM-106 (نیمه حساس) و ارقام گلابی هاروسوئیت (Harrow Sweet) (متحمل) و اسپادونا (Spadona) (نیمه حساس) بوسیله کشت ساقه آنها در محیط درون شیشه مستقر و پرآوری شدند. ارزیابی شدت بیماری با استرین Ea273 باکتری عامل بیماری آتشک به صورت کشت توام با آلوده سازی تحتانی انجام شد. تیمارهای اسید سالیسیلیک شامل دو گروه تیمارهای غلظتی (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر و صفر بعنوان شاهد) و زمانی (۱، ۳، ۵ و ۷ روز قبل از کشت توام و تیمار همزمان بعنوان شاهد) بودند. تاثیر سالیسیلیک اسید روی بروز بیماری با شاخص‌های سرعت پیشرفت نکروز، تعداد میانگره‌های آلوده شده و تغییرات pH محیط رشد در یک دوره ۲۴۰ ساعته پس از مایه‌زنی بررسی شد. داده ها نشان داد که اسید سالیسیلیک در درخت سیب نه تنها قادر به مهار بیماری نشد، بلکه توسعه بیماری را تشدید کرد، در حالیکه در گلابی میزان آلودگی بیماری بطور معنی‌داری کاهش یافت. مقایسه نتایج تیمارهای زمانی و غلظتی نشان‌دهنده کارآیی بیشتر تیمارهای زمانی زودهنگام در کاهش آلودگی بیماری در گونه گلابی است. نتیجه‌گیری می‌شود که اثر متقابل نظام دفاع اکتسابی گیاه میزبان با باکتری در دو گونه سیب و گلابی متفاوت می‌باشند و فقط در گلابی ساز و کار نظام دفاع اکتسابی می‌تواند بعنوان راهبردی موثر در مدیریت و کاهش خسارت بیماری مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آتشک، نظام دفاع اکتسابی، سیب، گلابی، اسید سالیسیلیک.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: zghahremani@yahoo.com

مقدمه

بیماری آتشک (Fire blight) بعنوان مهمترین بیماری درختان سیب، گلابی و به در بیش از ۴۰ کشور جهان مطرح است (Van der Zwet and Keil, 1979). کلیه میزبان‌های بیماری متعلق به خانواده گلسرخیان (Rosaceae) می‌باشند (Vander Zwet and Keil, 1979; Venisea *et al.*, 2002; Oh and Beer, 2005).

این بیماری هر ساله سبب خسارت قابل توجهی به باغدارن در کشورهای مختلف و از جمله در ایران می‌شود. بیماری آتشک از امریکا به اروپا وسپس به خاورمیانه و حدود یک دهه پیش از ترکیه وارد ایران شد ودر حال پیشرفت به طرف شرق می‌باشد (Zakeri and Sharinabi, 1991; Zohour and Rahmani Moghaddam, 2004). باکتری عامل بیماری آتشک (*Erwinia Amylovora*) بعنوان اولین باکتری بیماری‌زای شناخته شده گیاهی و پایه تحقیقات در زمینه باکتری‌شناسی گیاهی می‌باشد. این باکتری گرم منفی بوده و دارای استرین‌های با خصوصیات بیوشیمیایی یکسان است (Vander Zwet and Keil, 1979).

باکتری عامل بیماری دارای دو گونه اثر متقابل با گیاهان میزبان و غیر میزبان می‌باشد. در حالت اول که به بیماری‌زایی منجر می‌شود، سطح تظاهر کمتری از ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی باکتری مشاهده شده و تولید پروتئین‌های موثر (Effector) باکتری سبب بروز بیماری می‌شود. در واکنش عامل بیماری با گیاهان غیر میزبان تظاهر بیشتر این ژن‌ها سبب تحریک نظام دفاعی گیاه و بروز واکنش فوق حساسیت می‌شود (Vanneste, 2000). بررسی‌ها نشان می‌دهد باکتری *E. amylovora* از طریق پروتئین هارپین (Harpin) سبب تحریک نظام دفاعی میزبان می‌شود (Wei *et al.*, 1992). تحقیقات بعدی نشان داد که پروتئین‌های هارپین N (HrpN) و W (HrpW) و همچنین DspA/E مسئول بیماری‌زایی این باکتری می‌باشند (Bogdanove *et al.*, 1998; Kim and Beer, 1998).

پس از آن تحقیقات در زمینه شناسایی نحوه تاثیر پروتئین‌های هارپین بر سلول‌های میزبان معطوف شد. از جمله این تحقیقات شناسایی مسیر نوع سوم ترشح (Type III Secretion System) پروتئین‌ها از سلول باکتری (Jin *et al.*, 2001)، نحوه اثر آپوپلاست میزبان روی تظاهر ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی باکتری (Wei *et al.*, 1992)، اثر متقابل پروتئین‌های هارپین با پمپ هیدروژنی غشاء سلول میزبان (Popham *et al.*, 1995) و نقش ارگانل‌های درون سلولی در اثر متقابل عامل بیماری با میزبان (Xie and Chen, 2000; Abdollahi *et al.*, 2004) قابل ذکر است.

نظام دفاع اکتسابی (Systemic Acquired Resistance=SAR)

گیاه موجب حفاظت طولانی مدت گیاه در برابر طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا می‌شود. این نظام نیاز به ملکول‌های سیگنال‌دهنده‌ای نظیر اسید سالیسیلیک دارد و تحریک آن با پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی مرتبط است. با بکارگیری گیاهان مدل مشخص شده است که در واکنش به اسید سالیسیلیک، پروتئین مثبت تنظیمی NPR1 به سمت هسته حرکت کرده و سبب تحریک نظام SAR می‌شود (Durrant and Dong, 2004). به نظر می‌رسد که اتصال اسید سالیسیلیک به آنزیم‌هائی نظیر کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز منجر به شکل‌گیری رادیکال‌های فنولی شده که در پراکسیداسیون لیپید درگیر است (Chen *et al*., 1993; Durner and Klessig, 1995). محصولات این واکنش می‌تواند بیان ژن‌های دفاعی را افزایش دهد (Farmmer *et al*., 1998; Durner *et al*., 1998). همچنین مشاهده شد که افزایش تراکم پروتئین‌های PR و مقاومت در برابر TMV با استفاده از اسید سالیسیلیک (SA)، آسپرین (استیل SA) یا اسید بنزوئیک القا می‌شود (White, 1979). در مطالعات مالامی و همکاران (Malamy *et al*., 1990) و همچنین مترئوکس و همکاران (Metraux *et al*., 1990) مشخص شد که اسید سالیسیلیک مولکول سیگنال برای تحریک SAR است.

نقش اساسی اسید سالیسیلیک بعنوان یک سیگنال درونی برای SAR به وسیله گافنی و همکاران (Gaffney *et al*., 1993) و دلانی و همکاران (Delaney *et al*., 1994) جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیقات آنها گیاهان آرابیدوپسیس و توتون توسط ژن باکتریائی *nahG*، که عامل کدکننده آنزیم سالیسیلیک هایدروکسیلات می‌باشد و این آنزیم اسید سالیسیلیک را به کاتکل تبدیل می‌نمایند. نتایج نشان داد زمانی که این گیاهان مورد حمله بیماری قرار گرفتند، تراکم بسیار کمی از اسید سالیسیلیک در بافت‌ها داشتند، بنابراین قادر به تظاهر ژن‌های *PR* نبودند. آنان نتیجه گرفتند که کمبود این اسید موجب تضعیف نظام دفاعی (SAR) در گیاهان است.

با توجه به اهمیت واکنش نظام دفاع اکتسابی گیاه میزبان به بیماری و نقش مهمی که اسید سالیسیلیک بر روی این نظام دارد در این تحقیق به بررسی نقش این مولکول سیگنال بعنوان تحریک‌کننده نظام دفاع اکتسابی بر علیه بیماری آتشک در دو گونه میزبان تجارتی مهم سیب و گلابی بررسی شد.

مواد و روش ها

استقرار مواد گیاهی در محیط درون شیشه

پایه سیب متحمل MM-111 و نیمه حساس MM-106 و رقم گلابی متحمل هاروسوئیت (Harrow Sweet) و نیمه حساس اسپادونا (Spadona) بوسیله کشت ریزقلمه در محیط درون شیشه مستقر شدند. به این منظور در

آغاز فصل بهار سرشاخه‌های نورسته ارقام فوق از درختان مورد نظر تهیه و در آزمایشگاه به قطعات تک جوانه تقسیم و بعد از شستشو و سترون کردن؛ آنها را به ظروف شیشه‌ای حاوی کشت پایه MS حاوی ۱ میلی گرم 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 متر مربع بر ثانیه و در دمای شبانه‌روزی ۱± ۲۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

ارزیابی اثر تیمار غلظتی اسید سالیسیلیک روی سرشاخه ها

اسید سالیسیلیک با نام شیمیائی ارتوهیدروکسی بنزوئیک اسید با فرمول $C_7H_6O_3$ (Merck-Cat. No. 159409) با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر سترون شده و به محیط رشد اضافه شد. به منظور تعیین غلظت موثر اسید سالیسیلیک در تحریک نظام دفاعی میزبان، تیمارهای غلظتی این ماده شامل صفر (شاهد)، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به طور همزمان در کشت توام مواد گیاهی سیب و گلابی با باکتری عامل بیماری مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تهیه مایه تلقیح مورد نیاز، باکتری در محیط LB مایع به صورت شبگذران در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد روی همزن ۱۵۰ دور در دقیقه کشت و غلظت مایه تلقیح روی کدورت ۲ (OD=2) به منظور به حداقل رسانیدن احتمال فرار سرشاخه‌ها از آلودگی تنظیم شد. به منظور کشت توام، ۷۵ میکرولیتر مایه تلقیح به لوله آزمایش حاوی محیط کشت MS افزوده و سپس ریزقلمه‌های ۲-۱/۸ سانتی‌متری را که دارای طول میانگره‌های یکنواختی بودند در محیط مستقر شدند (Abdollahi, 2003). اثر غلظت‌های اسید سالیسیلیک بر میزبان‌های تحت آزمایش با بررسی از سرعت پیشرفت نکروز، تعداد میانگره‌های آلوده و تغییرات pH محیط انجام شد. تغییرات با توجه به تفاوت سرعت پیشرفت باکتری در ریزقلمه‌های حساس و متحمل تا ظهور نکروز در تمامی طول آن‌ها در فواصل زمانی ۸ ساعت (۳ مرتبه در شبانه‌روز) و حداکثر در مدت ۲۴۰ ساعت از شروع کشت توام مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی اثر تیمار زمانی اسید سالیسیلیک روی سرشاخه ها

در این آزمایش سرشاخه‌های درون شیشه ارقام حساس و متحمل سیب و گلابی که در زمان‌های صفر،۳، ۵ و ۷ روز قبل از مایه‌زنی با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک تیمار شده بودند با باکتری عامل بیماری کشت توام شدند. روش مایه‌زنی و فاکتورهای مورد استفاده در تیمارهای غلظتی در اینجا نیز به کار برده شد.

در هر دو آزمایش تیمارهای زمانی و غلظتی، تیمارهای شاهد متعدد مشتمل بر: ریزقلمه‌ها

بدون دریافت اسید سالیسیلیک، ریزشاخه‌ها بدون دریافت باکتری، ریزشاخه‌ها بدون دریافت باکتری و اسید سالیسیلیک در کنار سایر تیمارها بررسی شد. کلیه تیمارها در ۵ تکرار انجام و محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل(Microsoft Excel-USA, 2003) انجام شد.

بررسی تغییرات pH محیط رشد

به منظور ارزیابی فعالیت باکتری در محیط رشد که سبب افت سریع pH در مقایسه با گیاه می‌گردد، محلول مادری نشانگر برموکرزول سبز (Green Bromo Cresol) با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر به محیط‌های کشت اضافه شد. تغییرات pH محیط با استفاده از محلول‌های استاندارد pH حاوی نشانگر فوق به صورت مقایسه‌ای در طول آزمایش‌ها ردیابی شد.

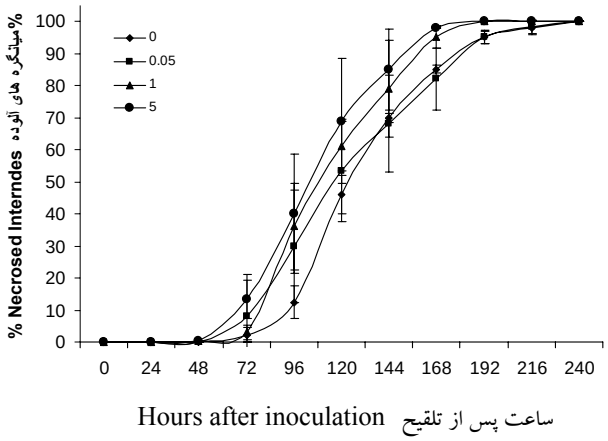
نتایج و بحث

نتایج آزمون‌های غلظتی و زمانی کاربرد اسید سالیسیلیک بر روی ریزشاخه‌های مواد گیاهی متحمل و نیمه حساس سیب و گلابی نشان داد که کارآیی کاربرد این ماده در تحریک نظام دفاعی میزبان و کاهش توسعه بیماری در بافت‌ها به گونه میزبان بستگی دارد و در سیب و گلابی کاملاً از یکدیگر متفاوت است. از طرفی مقایسه دو شاخص ارزیابی شدت بیماری در ریزشاخه‌ها نشان داد که تعداد میانگره‌های آلوده نسبت به درصد طول شاخساره آلوده شده به عنوان شاخص مناسب‌تر و یکنواخت‌تری قادر به بیان اثرات اسید سالیسیلیک روی گسترش بیماری می‌باشد.

اثر تیمار غلظتی اسید سالیسیلیک

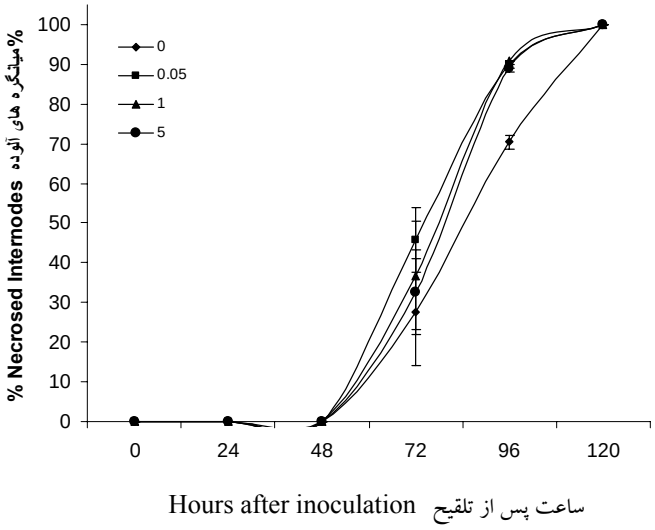
نتایج آزمایش غلظتی اسید سالیسیلیک نشان داد که تیمار کشت توام باکتری پایه‌های سیب، در شرایط بدون حضور اسید سالیسیلیک در محیط دیرترین علایم آلودگی را بروز داد. شکل‌های ۱ و ۲ نشانگر تاثیر حضور این ماده روی تسریع توسعه علایم بیماری در هر دو پایه حساس و متحمل سیب نسبت به بیماری آتشک می‌باشد. مقایسه منحنی‌های توسعه علایم دو پایه نیمه حساس و متحمل سیب در این آزمایش نشان داد که پایه حساس تر MM-106 حدوداً به مدت ۱۲۰ ساعت از آلوده‌سازی اولیه علائم کامل بیماری را نشان داد در صورتی که این زمان در پایه MM-111 به ۲۴۰ ساعت افزایش یافت. امکان استفاده از تکنیک درون شیشه با استفاده از زمان ظهور اولین علایم و سرعت پیشرفت نکروز در سرشاخه‌های درون شیشه ارقام گلابی قبلاً توسط عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al.*, 2004) تایید شده است. این نمودارها همچنین نشان دهنده اینست که حضور اسید سالیسیلیک تاثیری روی زمان بروز اولین علایم نداشت و تنها سبب تسریع در توسعه علایم پس از ظهور اولین علامت نکروز شد.

نتایج مقایسه توسعه بیماری روی ارقام نیمه حساس و متحمل گلابی نشان‌دهنده تاثیر محدود و موثر تیمار غلظتی اسید سالیسیلیک



شکل۱- مقایسه سرعت پیشرفت آتشک در میانگره‌های پایه سیب MM-111 در تیمار غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

Fig. 1. Comparison of fire blight progress in internodes of apple rootstock MM-111 in different salicylic acid concentrations



شکل۲- مقایسه سرعت پیشرفت آتشک در میانگره‌های پایه سیب MM-106 در تیمار غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

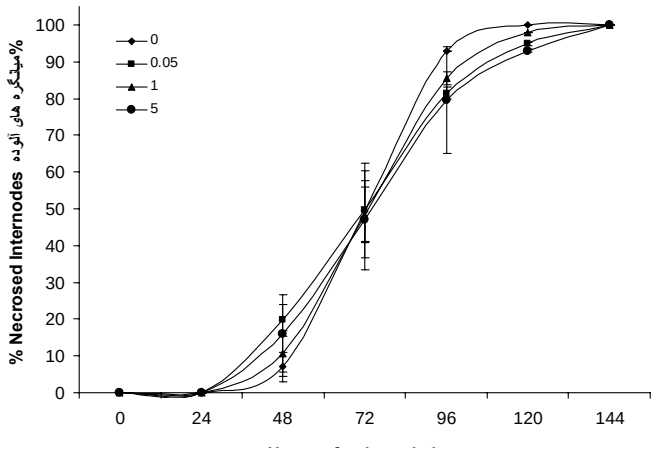
Fig. 2. Comparison of fire blight progress in internodes of apple rootstock MM-106 in different salicylic acid concentrations

روی تحریک نظام دفاعی درخت گلابی و کاهش سرعت توسعه علایم در این میزبان بود (شکل‌های ۳ و ۴). مقایسه زمان بروز اولین علایم و سرعت توسعه نکروز در شاخه‌چه‌های دو رقم گلابی نشان‌دهنده تفاوت ناچیز ایندو شاخص در رقم نیمه حساس اسپادونا با رقم متحمل هاروسوئیت بود. به نظر می‌رسد شبیه بودن نتایج پیشرفت علائم در دو رقم گلابی مورد آزمایش به نزدیک بودن آستانه تحمل دو رقم و همچنین طبیعت خاص این گونه باز می‌گردد. در تحقیقات گلخانه‌ای و باغی روی مقاومت ارقام درخت سیب (Abdollahi and Majidi Heravan, 2005)، درخت گلابی (Davoudi, 1998) و درخت به (Abdollahi *et al.*, 2008) به تدریج با حساس‌تر شدن میزبان، دامنه محدودتری در شدت علایم بین متحمل‌ترین و حساس‌ترین ارقام مشاهده شد.

مقایسه تاثیر اسید سالیسیلیک بر روی توسعه علایم بیماری آتشک در دو درخت سیب و گلابی بیانگر تاثیر مثبت آن در کاهش علایم در گونه گلابی و افزایش شدت علایم در گونه سیب بود. تاثیر این ماده در افزایش بیماری درخت سیب به نظر می‌رسد به نحوی با افزایش شدت توان بیماری‌زایی باکتری در ارتباط باشد چنانچه دبروی و همکاران (DebRoy *et al.*, 2004) نقش مثبت اسید سالیسیلیک را در افزایش توان بیماری‌زایی این باکتری در اثر متقابل بین بافت‌های درخت سیب با عامل بیماری‌زا گزارش کردند. به نظر می‌رسد بر خلاف درخت سیب حضور اسید سالیسیلیک در بافت‌های درخت گلابی نمی‌تواند سیگنال لازم برای افزایش بیماری‌زایی را فراهم نماید و بنابراین حضور اسید سالیسیلیک صرفاً سبب افزایش تحمل درخت گلابی به بیماری می‌شود.

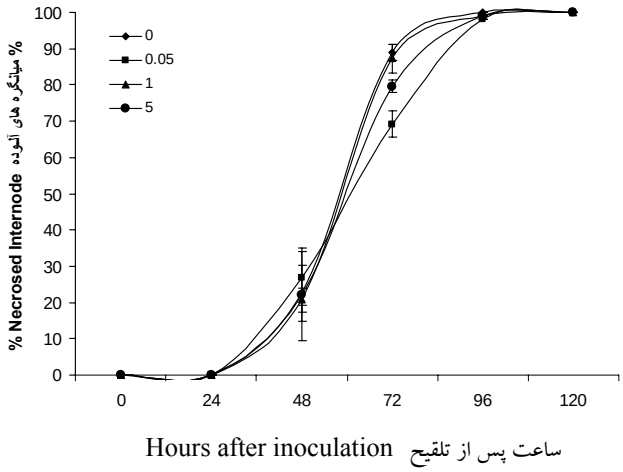
اثر تیمار زمانی اسید سالیسیلیک

نتایج این آزمایش نیز همانند آزمایش تیمارهای غلظتی بیانگر آن بود که حضور اسید سالیسیلیک سبب افزایش شدت بیماری در گونه سیب و کاهش شدت بیماری در گونه گلابی گردید. بر خلاف تیمار غلظتی اسید سالیسیلیک که در تمامی تیمارها ظهور اولین علایم بطور همزمان انجام گرفت، در این تیمارها در گونه سیب ساقه‌چه‌هایی که به مدت طولانی‌تری در معرض اسید سالیسیلیک قرار داشتند بروز علایم زود هنگام‌تر و در گونه گلابی علایم دیر هنگام‌تری را نشان دادند. مقایسه تفاوت تیمارهای مختلف غلظتی (شکل ۱ تا ۴) و زمانی (شکل‌های ۴ تا ۸) بیانگر تاثیر بیشتر تیمار زمانی اسید سالیسیلیک نسبت به تیمار غلظتی آن روی افزایش و یا کاهش شدت توسعه بیماری به ترتیب در گونه‌های سیب و گلابی می‌باشد. چنین به نظر می‌رسد تحریک نظام دفاعی میزبان در غلظت‌های کم و زیاد اسید سالیسیلیک تفاوت چندانی نداشت، در صورتی که تیمار طولانی‌تر به نحو موثرتری قادر به مهار توسعه آتشک در گونه گلابی بود. قابل ذکر است تاثیر منفی حضور اسید سالیسیلیک در افزایش توسعه



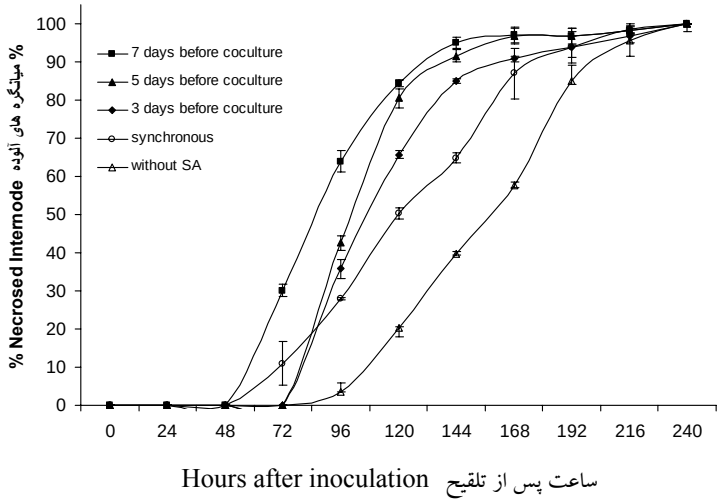
شکل۳- مقایسه سرعت پیشرفت آتشک در میانگره‌های گلابی رقم هاروسوئیت در تیمار غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

Fig. 3. Comparison of fire blight progress in internodes of pear cultivar Harrow Sweet in different salicylic acid concentrations



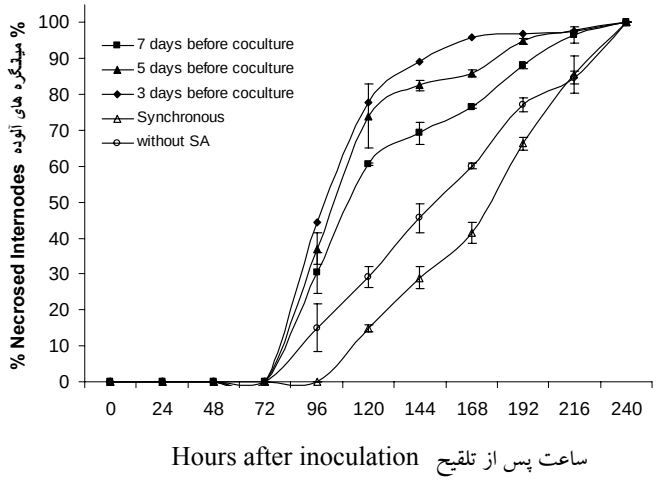
شکل ۴- مقایسه سرعت پیشرفت آتشک در میانگره‌های گلابی رقم اسپادونا در تیمار غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

Fig. 4. Comparison of fire blight progress in internodes of pear cultivar Spadona in different salicylic acid concentrations



شکل ۵- مقایسه سرعت پیشرفت آتشک در میانگره‌های سیب پایه MM-111 با پیش تیمارهای زمانی حضور اسید سالیسیلیک

Fig. 5. Comparison of fire blight progress in internodes of apple rootstock MM-111, with pretreatments of exposure time to salicylic acid



شکل ۶- مقایسه سرعت پیشرفت آتشک در میانگره‌های پایه سیب MM-106 با پیش تیمارهای زمانی حضور اسید سالیسیلیک

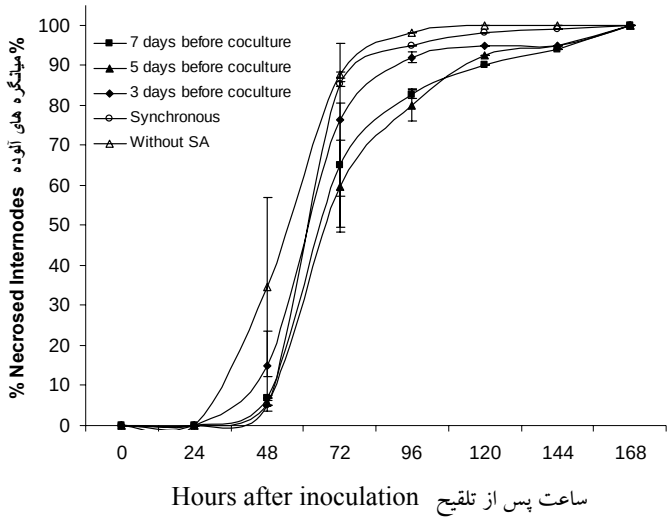
Fig. 6. Comparison of fire blight progress in internodes of apple rootstock MM-106, with pretreatments of exposure time to salicylic acid

علایم در سیب در تیمارهای زمانی تا به این حد بروز نمود که سبب حساس‌تر شدن پایه متحمل MM-111 نسبت به پایه MM-106 در برخی از تیمارها و ظهور سریعتر علائم (پس از ۴۸ساعت از مایه‌زنی) شد (شکل‌های ۵ و ۶)، در حالیکه تیمارهای زمانی اسید سالیسیلیک در هر دو رقم گلابی سبب کاهش قابل توجه علایم گردید و در رقم اسپادونا نسبت به رقم هاروسوئیت بالاخص در تیمارهای زمانی ۷ روزه تاخیر بسیار مطلوب ظهور علائم مشاهده شد. (شکل‌های ۷ و ۸).

ارزیابی تغییرات pH محیط در غلظت های اسید سالیسیلیک

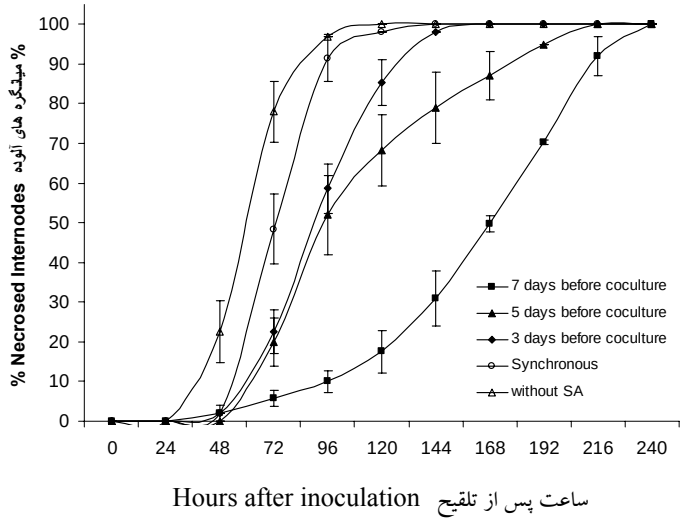
منحنی تغییرات pH محیط رشد به نحو مطلوبی بیانگر تفاوت در سرعت تغییرات pH در اثر حضور و فعالیت باکتری در محیط‌ها بود به نحوی که بالاترین سرعت کاهش pH از ۵/۲ به ۳/۷ در این شرایط مشاهده شد. سرعت کاهش pH در تیمار های فاقد باکتری و با حضور گیاه میزبان به مراتب کمتر و pH تنها تقریباً به میزان ۰/۵ واحد کاهش نشان داد. تیمارهای واجد باکتری به تنهایی در محیط و عدم وجود گیاه میزبان نیز تقریباً هیچ کاهش pH را نشان نداد (شکل‌های ۹ و ۱۰). مقایسه سرعت کاهش pH در محیط در حضور گیاه میزبان و بدون باکتری در دو شرایط حضور و عدم حضور اسید سالیسیلیک در پایه MM-111 بیانگر سرعت بیشتر کاهش pH در اثر حضور اسید سالیسیلیک در محیط می‌باشد (شکل ۹). به نظر می‌رسد حضور این ماده با افزایش متابولیسم گیاهی منجر به افزایش فعالیت پمپ هیدروژنی غشاء سلولی بافت‌های گیاهی و در نتیجه جذب سریع‌تر کاتیون‌ها و ترشح بیشتر پروتون به محیط رشد و در نتیجه افت بیشتر pH می‌گردد (Abdollahi *et al.*, 2004). مقایسه سرعت کاهش pH در کلیه تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و در حضور باکتری عامل و پایه MM-111 نشان‌دهنده یکنواختی و انطباق منحنی‌ها می‌باشد (شکل ۹). ظاهراً به لحاظ تاثیر محدودتر اسید سالیسیلیک در تیمار غلظتی تفاوت قابل توجهی در کاهش pH مشاهده نشد. در حالیکه تفاوت محدودی در کاهش pH محیط در تیمارهای زمانی اسید سالیسیلیک روی همان پایه مشاهده شد (شکل ۱۰). به این ترتیب که در تیمار ۷ روزه که سریعترین علائم نکروز در این پایه ظاهر شد، سریعترین کاهش pH محیط نیز مشاهده شد. نتایج کاهش pH محیط در حضور باکتری با نتایج عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et*al., 2004) در گونه گلابی موافقت دارد.

عبداللهی (Abdollahi *et*al., 2003) نشان داد که استفاده از نظام درون شیشه می‌تواند کارآیی مطلوبی در بررسی اثر متقابل میزبان× باکتری *(E. amylovora)* در تظاهر ژن‌ها داشته باشد. تحقیق حاضر نیز موید امکان استفاده از این نظام به منظور ارزیابی مقدماتی و اولیه مواد کنترل‌کننده خسارت بیماری، قبل از کاربرد این



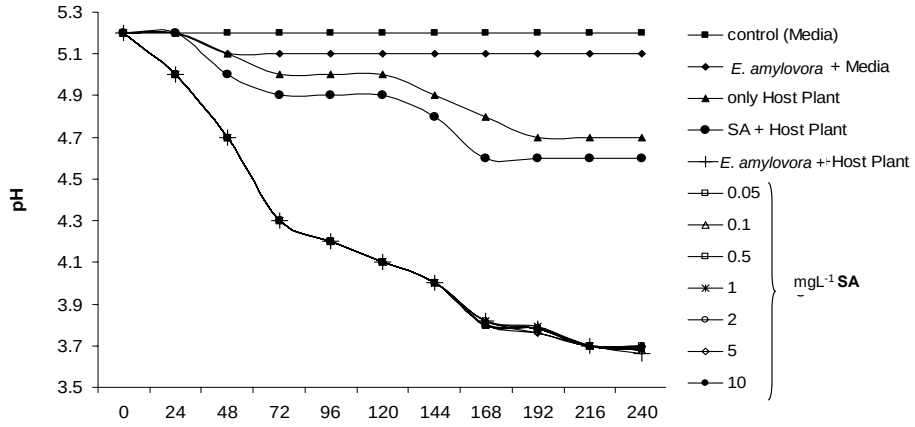
شکل ۷- مقایسه سرعت پیشرفت آتشک در میانگره‌های گلابی رقم هاروسوئیت با پیش تیمارهای زمانی حضور اسید سالیسیلیک

Fig. 7. Comparison of fire blight progress in internodes of pear cultivar Harrow Sweet, with pretreatments of exposure time to salicylic acid



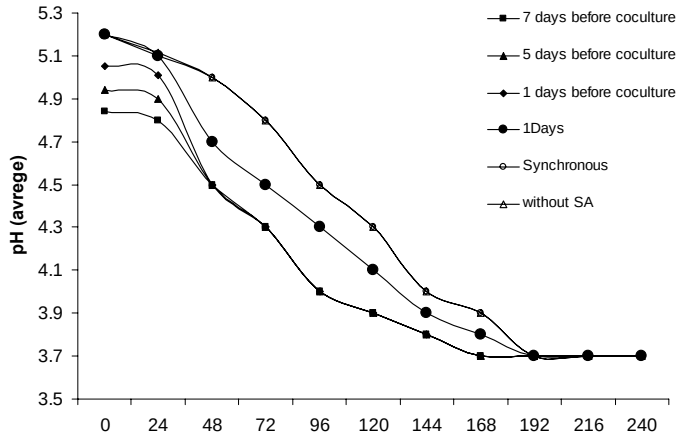
شکل ۸- مقایسه سرعت پیشرفت آتشک در میانگره‌های گلابی رقم اسپادونا با پیش تیمارهای زمانی حضور اسید سالیسیلیک

Fig. 8. Comparison of fire blight progress in internodes of pear cultivar Spadona, with pretreatments of exposure time to salicylic acid



شکل۹ – تغییرات pH در محیط کشت توام پایه سیب MM-111 با باکتری *E. amylovora* در حضور تیمارهای مختلف غلظتی اسید سالیسیلیک. (به دلیل یکنواختی تغییرات pH، انحراف استانداردها صفر است)

Fig. 9. pH variation of growth media in co-culture of apple rootstock MM-111 and *E. amylovora in* presence of different salicylic acid concentrations. (Due to homogenous variation of pH, the standard errors are Zero)



شکل ۱۰ – تغییرات pH محیط کشت توام پایه سیب MM-111 با باکتری *E. amylovora* در حضور تیمارهای مختلف زمانی اسید سالیسیلیک (به علت یکنواختی تغییرات pH، انحراف استانداردها صفر است).

Fig. 10. pH variation of growth media in co-culture of apple rootstock MM-111 and *E. amylovora* in different periods of exposure to salicylic acid.(Due to homogenous variation of pH, the standard errors are Zero)

ماده در آزمایشات گلخانه‌ای و باغی بود. مجموعه تیمارها نشان دهنده عدم امکان استفاده از اسید سالیسیلیک به منظور تحریک نظام دفاعی درخت سیب برای کاهش خسارت بیماری آتشک و امکان‌پذیر بودن استفاده از آن در درخت گلابی بود. مقایسه تیمارهای غلظتی و زمانی کاربرد اسید سالیسیلیک نشان دهنده اینست که کاربرد غلظت‌های بالای آن نمی‌تواند کارآیی تحریک نظام دفاعی را در درخت گلابی به منظور کاهش بیشتر علائم بیماری افزایش دهد، بلکه عامل موثر کاربرد به هنگام تیمار اسید سالیسیلیک قبل از طغیان بیماری روی بافت‌ها بود. در این تحقیق افزایش فاصله بین تیمار اسید سالیسیلیک و تلقیح باکتری از صفر تا ۷ روز سبب کاهش بیشتر علائم بیماری روی شاخه‌چه‌های درخت گلابی شد، لیکن تیمار اسید سالیسیلیک تا چه مدت می‌تواند نظام دفاعی میزبان را تحریک شده باقی نگاه دارد بایستی در کنار کاربرد عملی این نظام در شرایط گلخانه‌ای و باغی، مورد مطالعه قرار گیرد.

References

Abdollahi, H. 2003. Molecular biology of interaction between *Erwinia amylovora* and pear (*Pyrus communis* L.) genotypes with different susceptibility to fire blight. Ph.D Thesis, University of Florence, Florence, Italy. 200pp.

Abdollahi, H., Ghasemi, A. A., and Mehrabi Pour, S. 2008. Evaluation of fire blight resistance in some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes II. Resistance of genotypes to the disease. Seed and Plant 24: 529-541 (in Farsi).

Abdollahi, H., and Majidi Heravan, E. 2005. Relation between fire blight resistance and different characteristics of apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. Fruit Growing 17: 90-95.

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.

Bogdanove, A. J., Bauer, D. W., and Beer, S. V. 1998. *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (Type III secretion) pathway. Journal of Bacteriology 180: 2244–2247.

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.

Davoudi, A. 1998. Evaluation of fire blight resistance in some quince, apple and pear. M.Sc. Thesis, University of Tabriz, Tabriz, Iran. 200pp. (in Farsi).

DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y. B., Nomura, K., and He, S. Y. 2004. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA. 101: 9927-9932.

Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science 266: 1247-50.

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.

Durner, J., Wendehnne, D., and Klessig, D. F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP ribose. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 95: 10328-10333.

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.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. 1993. Requirement of systemic acquired resistance. Science 261: 754-756.

Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones A. L., and He, S. Y. 2001. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. Molecular Microbiology 40: 1129-1139.

Kim, J., and Beer, S. V. 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class received. Journal of Bacteriology 180: 5203-5210.

Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., Raskin, I. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science 250: 1002-1004.

Metraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., and Inverardi, B. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. Science 250: 1004-1006.

Oh, C. S., and Beer, S. V. 2005. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. FEMS Microbiology Letters 253: 185-192.

Popham, P. L., Pike, S. M., and Novacky, A. 1995. Effects of harpin from *Erwinia amylovora* on the plasma member of suspension of *E. amylovora*. Physiology and Molecular Plant Pathology 53: 39-60.

Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y. Collmer, A., and Beer, S. V. 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science 257: 85-88.

White,R.F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology 99: 410-412.

Vanneste, J. L. 2000. Fire Blight: The Disease and its Causative Agent *Erwinia amylovora*. CAB International Publisher. Wallingford, UK. 369pp.

van der Zwet, T., and Keil, H. L. 1979. Fire blight. United States Department of Agriculture, Agricultural Handbook Number 510, Washington DC. 200pp.

Venisse, J. S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J. P., and Brisset, M. N. 2002. Modulation of defense responses of *Malus* during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. Molecular Plant Microbe Interactions 15: 1204-1212.

Xie, Z., and Chen, Z. 2000. Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial function in tobacco cells. Molecular Plant Microbe Interactions 13: 183-190.

Zakeri, Z., and Sharifnabi, B. 1991. Fire blight of pear in Karaj. Proceedings of the 10th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran. page 157. (in Farsi). (Abstract).

Zohour, A., and Rahmani Moghaddam, N. 2004. Spread of fire blight in Khorasan. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran. page 42. (in Farsi). (Abstract).