بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک بر مقاومت دانه رستهای نخود *(Cicer arietinum* L.*)* به قارچ *Ascochyta rabiei*

سیده‌مهدخت مداح[۱]، احمد مجد[۲]، فتح‌الله فلاحیان[۳]،سیدحسین صباغ‌پور[۴]، فیروزه چلبیان[۲]

چکیده

اسید سالیسیلیک (*SA*) یکی ازتنظیم کننده‌های مهم القای مقاومت گیاهان نسبت به عوامل بیماری‌زا است که با تغییر فعالیت‌های متابولیکی ازجمله تغییر فعالیت آنزیم‌ها موجب افزایش مقاومت گیاهان به عوامل بیماری‌زا می‌گردد. به منظور بررسی اثرضد قارچی *SA* و تاثیر آن برفعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز، گروهی ازبذرهای نخود(*Cicer arietinum* L.)رقم بیونیج به مدت ۳۰ دقیقه درسوسپانسیون اسپورقارچ*Ascochyta rabiei* به میزان $۱۰^۶$ عدد اسپور در هر میلی‌لیتر و گروه دیگر در آب مقطر سترون قرارگرفتند، سپس بذرهای هر دو گروه درپتری‌ها کشت شدند. این بررسی به صورت آزمایش فاکتوریل درقالب یک طرح تصادفی با ۳ تکرار اجرا و تجزیه وتحلیل گردید. عامل *A* دو گروه آلودگی و عدم آلودگی به قارچ و عامل *B* غلظت‌های صفر، ۰/۱ و ۱/۵ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک بود، که سه و شش روز پس ازجوانه زنی بذرها به هر دو گروه اضافه شدند. عصاره‌های آنزیمی دانه رستهای ۸ روزه، استخراج و مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز عصاره‌ها سنجیده شد. نتایج نشان داد تعداد دانه رستهای آلوده درگیاهان تحت تیمار *SA* کاهش معنی‌دار درسطح یک درصد دارد. فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در غلظت ۱/۵*mM SA* در ریشه‌ها کاهش یافته و دراندام‌های هوایی افزایش معنی‌دار دارد. فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در ریشه دانه رستهای آلوده به قارچ، بیش‌تر از ریشه دانه رستهای بدون آلودگی است و در اندام‌های هوایی آلوده به قارچ کمتر می‌باشد. تغییر الگوهای ایزوآنزیمی پراکسیداز ریشه‌ها با الکتروفورز برروی ژل پلی اکریل آمید (سیستمPAGE) مورد بررسی قرارگرفت که نشان داد در پراکسیداز ریشه‌های آلوده به قارچ ایزوآنزیم جدیدی در ناحیه مولکول‌های سبک آشکار می‌شود. درنمونه‌های تحت تیمار ۰/۱mM SA که کم‌ترین فعالیت آنزیم را دارند، این باند حذف می‌شود. درغلظت ۱/۵***mM SA*** دو باند جدید یکی درناحیه مولکول‌های سنگین و دیگری درمحل مولکول‌های سبک به جای دو باند در ناحیه مولکول‌های سنگین به وجود آمد.

کلمه‌های کلیدی: نخود - ***Cicer arietinum L.*** - ***Ascochyta rabiei***- اسید سالیسیلیک – دانه‌رست.

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد واحد شهرری
۲- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد واحد تهران شمال
۳- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات
۴- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات دیم
تاریخ دریافت: تابستان ۸۶ تاریخ پذیرش: زمستان۸۶

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

نخود سفید *(Cicer arietinum* L.*)* در بین حبوبات مهم، مقام سوم را در جهان و مقام اول را در مدیترانه و جنوب آسیا دارد (صباغ پور، ۱۳۷۵). رقم بیونیج یکی از ارقام محلی و دانه درشت نخود در ایران است که به طور وسیعی در استان کرمانشاه کشت می‌شود. اما حساس بودن این رقم به بیماری برق‌زدگی *Ascochyta blight* همه ساله موجب کاهش عملکرد و خسارت شدید در شرایط خنک و مرطوب می‌شود. این بیماری بذر زاد است و عامل آن قارچ *Ascochyta rabiei* می‌باشد که به اندام‌های هوایی گیاه حمله می‌کند (یونسی۱۳۸۲).

اسید سالیسیلیک ترکیبی رایج در قلمرو گیاهان و تنظیم کننده فرایندهای فیزیولوژیکی است. ازجمله این فرایندها تولید گرما و دفاع گیاه در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد(Zhang 2002). تشخیص عامل بیماری‌زا توسط عصاره‌های رها شده در مکان آلودگی(elicitors) با تغییرهای سریع در جریان یون‌ها و تولید انواع اکسیژن‌های فعال دنبال می‌شود. این عمل شروع یک جریان برای فعال‌سازی نسخه‌برداری از عوامل درگیر در بروز ژن‌های مقاومت است (Metraux ,2002).

کاتالاز و پراکسیداز آنزیم‌های مرتبط با تنش‌های اکسیداتیو هستند و نقشی کلیدی در رفع پراکسیدهای هیدروژن در گیاهان دارند(Srivastava, 2001). کاتالاز به طور عمده درحذف پراکسید هیدروژن در پراکسیزوم‌ها شرکت دارد، بنابراین حمایت کننده سلول‌های فتوسنتزی در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشد (Willekens,1995). کاتالاز در مداخله سالسیلیک اسید در ترارسانی علامت در مسیر نگهداری در برابر عامل بیماری‌زا دخالت دارد *(Raskin, 1992)*.پراکسیداز اکسیداسیون گهرمایه‌های آلی متعددی را در حضور پراکسید هیدروژن انجام می‌دهد *(*Strivastava,2001). پراکسیداز در فرایندهای فیزیولوژیکی مختلفی مانند رشد (Chibbar, 1984) ، دفاع *(*Moerschbacher ,1992 & Breda ,1993*)* و تشکیل دیواره سلولی (Maheshwari,1961*)* نقش دارد.

خسارت شدید بیماری برق‌زدگی نخود و تاثیر سالیسیلیک اسید برمقاوم‌سازی گیاهان دلایلی برای انجام این تحقیق در زمینه اثر *SA* بر میزان آلودگی دانه رستهای نخود رقم بیونیج به قارچ آسکوکیتا بود و به منظور تعیین نقش آنزیم‌ها، چگونگی تغییر فعالیت کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز و فعالیت کمی کاتالاز در این دانه رستها سنجیده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

قارچ آسکوکیتا از تعدادی از غلاف‌های آلوده نخود که از مزرعه‌های مؤسسه تحقیقات دیم جمع آوری شد جداسازی و بر روی محیط‌های آب آگار (۱/۷٪) و CSPDA (سیب‌زمینی و نخود هر کدام ۵۰ گرم، آگار ۲۰ گرم در یک لیتر آب) خالص شده و پس از تشکیل پیکنیدها تکثیر و سوسپانسیون اسپور به میزان 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر از آنها تهیه شد.

گروهی از بذرهای نخود رقم بیونیج پس از سترون شدن با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون اسپور تهیه شده و گروهی دیگر در آب مقطر سترون قرار داده شدند، سپس بذرهای آلوده و سالم هر کدام به طور جداگانه در پتری‌هایی که با دو لایه گاز استریل که با کاغذ صافی پوشانده شده بودند، توزیع شدند.

بررسی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب یک طرح تصادفی اجرا، تجزیه و تحلیل شد. عامل A دو گروه بدون آلودگی به قارچ و آلوده به قارچ و عامل B غلظت‌های صفر، ۰/۱ و ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید در نظر گرفته شد که سه و شش روز پس از جوانه‌زنی بذرها به مقدار $3ml$ به هر دو گروه اضافه شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن توسط نرم افزار SPSS با ضریب اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

هشت روز پس از جوانه‌زنی ضمن ارزیابی تعداد دانه رستهای آلوده و طول ریشه و ساقه اولیه، ۰/۵ گرم وزن تر ریشه‌ها و یا اندام هوایی شاهد و تیمارهای مختلف هر دو گروه به طور جداگانه به کمک $4ml$ بافر پتاسیم فسفات $100mM$ (PH ۷/۵) به همراه ۱ گرم pvpp ، در هاون ساییده شد. عصاره‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و در $12000g$ سانتریفوژ و تمام مراحل در دمای $4^{\circ}C$ انجام شد. بخش رویی مایع (supernatant) به دست آمده برای سنجش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز مورد استفاده قرار گرفت.

مطالعات کمی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Camspec M350 uv-visible انجام شد. فعالیت پراکسیداز عصاره‌ها توسط محلول رنگ‌آمیزی شامل $4ml$ بافر استات سدیم $0/2M$، ۴۰۰ µl آب اکسیژنه ۳٪ و ۲۰۰ µl بنزیدین $0/01M$ سنجش و منحنی افزایش جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر ، به مدت ۳ دقیقه رسم شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز در $3ml$ محلول شامل بافر پتاسیم فسفات $50mM$ و $15\ mM\ H_2O_2$ سنجش شد و منحنی کاهش جذب در طول موج $240nm$ به مدت ۱ دقیقه رسم شد. مقدار پروتئین عصاره‌ها به روش *Bradford* (1976) با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد به دست آمد و فعالیت آنزیم‌ها برحسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم وزن تر $(Abs.min^{-1}.fw^{-1})$ محاسبه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

به منظور الکتروفورز آنزیم پراکسیداز ریشه، ژل پلی اکریل آمید ۷/۵ درصد براساس روش Davis (1964) تهیه شد و الکتروفورز با جریان ۳۰mA به مدت ۵ ساعت انجام شد. ژل حاصل در معرف شامل ۸۰ml بافر استات سدیم M ۰/۲ (pH ۴/۸)، ۴ml بنزیدین ۰/۲M و ۸ml آب اکسیژنه ۳٪ رنگ‌آمیزی و پس از ظهور باندها، الگوهای پراکسیدازی مورد مطالعه و عکس‌برداری قرار گرفت (علی‌احمد کروری،۱۳۷۸).

نتایج

هشت روز پس از جوانه‌زنی، تعداد دانه رستهایی که بر روی محور زیر لپه آن‌ها نشانه‌های بیماری یعنی زخم‌های قهوه‌ای رنگ دیده می‌شد شمارش شد و درصد دانه رستهای آلوده محاسبه شد. بین تیمارهای مختلف از نظر درصد آلودگی دانه رستها تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد وجود داشت(جدول۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیش‌ترین درصد آلودگی مربوط به گیاهان شاهد (۵۵٪) بود و کم‌ترین درصد آلودگی مربوط به تیمار ۰/۱ mM با SA به میزان ۲۰٪ است. بین درصد دانه رستهای آلوده تیمار شده با غلظت‌های ۰/۱ mM و ۱/۵ SA تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (جدول۴).

بین دانه رستهای آلوده و بدون آلودگی به قارچ از نظر طول ریشه اولیه تفاوت معنی‌دار وجود نداشت اما از نظر طول ساقه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد وجود داشت، به طوری‌که طول ساقه در گیاهچه‌های آلوده به قارچ (۰/۸۷۵ cm) بیشتر از گیاهچه‌های بدون آلودگی(۰/۷۵ cm) می‌باشد (جدول‌های۳و۲). پس آلودگی به قارچ، بر طول ریشه اولیه اثر نداشت در حالی که موجب کاهش طول ساقه اولیه شد.

بین تیمارها یعنی غلظت‌های مختلف SA از نظر ویژگی طول ریشه اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد و از نظر ویژگی طول ساقه اولیه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول۲). مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد بیش‌ترین میانگین طول ریشه اولیه و ساقه اولیه مربوط به گیاهچه‌های شاهد است، در حالی که غلظت$mM\ SA$ ۱/۵ موجب کاهش طول ریشه اولیه و غلظت ۰/۱ mM موجب کاهش طول ساقه اولیه شد(جدول۴).

اثر متقابل بین آزمایش‌ها و تیمارهای اسیدی از نظر طول ریشه وساقه اولیه معنی‌دار نیست (جدول۲).

مقایسه میانگین همه‌ی تیمارها در جدول ۵ نشان می‌دهد طول ریشه گیاهچه‌های شاهد سالم و آلوده نسبت به گیاهچه‌های تیمار شده با ۱/۵ $mM\ SA$ به طور معنی‌دار بیش‌تر است، همچنین بیش‌ترین طول ساقه، مربوط به دانه رستهای آلوده‌ی شاهد و کم‌ترین آن مربوط به گیاهچه‌های سالم تیمار شده باSA ۰/۱ mM می‌باشد که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

در مقایسه کلی دو گروه آلوده به قارچ و بدون آلودگی به قارچ بدون در نظر گرفتن تیمارهای اسیدی در جدول ۳ مشخص شد فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز در اندام هوایی تحت تأثیر آلودگی به قارچ به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد، اما فعالیت هر دو آنزیم در ریشه اولیه در گیاهچه‌های آلوده به قارچ بیشتر از ریشه‌های سالم بود.

بررسی کلی اثر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بدون توجه به آلودگی دانه رستها در جدول۴ نشان می‌دهد، فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز ریشه تحت تأثیر *SA* ۱/۵ *mM* کاهش یافت که این کاهش برای آنزیم پراکسیداز در سطح ۵ درصد معنی‌دار است و برعکس فعالیت آنزیم پراکسیداز وکاتالاز در اندام‌های هوایی تحت تأثیر *SA* ۱/۵ *mM* به طور معنی‌دار در سطح ۱ درصد افزایش یافت (جدول‌های۲و۴).

بر اساس جدول ۲، اثر متقابل نمونه‌های آلوده یا بدون آلودگی با غلظت اسید در مورد فعالیت پراکسیداز ریشه و ساقه و نیز کاتالاز ساقه در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

الگوهای ایزو آنزیمی حاصل از الکتروفورز آنزیم پراکسیداز ریشه‌های اولیه آلوده به قارچ آسکوکیتا و نمونه‌های سالم در شکل ۲ با یکدیگر مقایسه شده است. نمونه‌های سالم و بدون آلودگی به قارچ در سه خط سمت راست ژل و به ترتیب شاهد، *SA* ۰/۱ *mM* و *SA* ۱/۵ *mM* قرار دارند. در نمونه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت *SA* ۰/۱ *mM* دو باند باریک در ناحیه مولکول‌های سنگین در فاصله ۱ و ۱/۵ سانتی‌متری از بالای ژل مشاهده می‌شود اما در نمونه تیمار شده با *SA* ۱/۵ *mM* به جای این دو باند یک باند ضخیم و کم رنگ در فاصله *cm* ۱/۳ از بالای ژل و باند ضعیف و کم رنگی در فاصله *cm* ۲/۵ از بالای ژل دیده می‌شود. پر رنگ‌ترین باندها مربوط به تیمار *SA* ۰/۱ *mM* است.

نمونه‌های آلوده به قارچ در سه خط سمت چپ ژل و به ترتیب از راست به چپ شاهد، *SA* ۰/۱ *mM* و *SA* ۱/۵ *mM* قرار دارند. در مجموع خط‌ها پر رنگ‌تر از نمونه‌های سالم هستند. باندهای ایجاد شده نیز پر رنگ‌تر از نمونه‌های سالم هستند. در ریشه‌های آلوده به قارچ در مقایسه با نمونه‌های سالم باندی در ناحیه مولکول‌های سبک در فاصله ۳/۵ سانتی‌متری از بالای ژل دیده می‌شود که تنها در ریشه‌های آلوده تحت تیمار با *SA* ۰/۱ *mM* این باند حذف شده است. این باند در نمونه‌های شاهد و تیمار *SA* ۱/۵ *mM* باریک ولی پررنگ می‌باشد. در هر سه نمونه آلوده دو باند در ناحیه مولکول‌های سنگین در فاصله ۱ و ۱/۵ سانتی‌متری از بالای ژل وجود دارد که در تیمار *SA* ۰/۱ *mM* نسبت به دو تیمار دیگر کم رنگ‌تر است. در تیمار *mM* ۱/۵ این دو باند کمی ضخیم‌تر هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱ – نتایج تجزیه واریانس درصد دانه رستهای آلوده

	درجه آزادی	درصد دانه رست آلوده
دو آزمایش	۲	۱۵۷۷/۰۸**
خطا	۹	۴۶/۵۲
CV	-----	۲۱/۲۶
کل	۱۱	-----

* : در سطح ۵٪ معنی‌دار است. ** : در سطح ۱٪ معنی‌دار است. ns : معنی‌دار نیست

جدول ۲ - نتایج تجزیه واریانس دانه رستهای آلوده و بدون آلودگی به قارچ

	درجه آزادی	طول ریشه *Cm*	طول ساقه *Cm*	پراکسیداز ریشه	پراکسیداز ساقه	کاتالاز ریشه	کاتالاز ساقه
عامل ***A***	۱	۰/۳۰ns	۰/۰۹*	۰/۰۲ns	۰/۰۱**	۰/۰ns	۰/۲۰**
عامل ***B***	۲	۱/۹۶**	۰/۰۶*	۰/۰۸*	۰/۲**	۰/۰۱ns	۰/۳۰**
AB	۲	۰/۰۱ns	۰/۰۱ns	۰/۱۰**	۰/۰۲**	۰/۲۹ns	۰/۰۷**
خطا	۱۸	۰/۱۶	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۱	۰/۱۳	۰/۰۰۴
CV	-	۹/۵۱	۱۴/۰۸	۲۰/۷۰	۱۰/۲۹	۲۰/۳۵	۱۵/۴۷
کل	۲۳	-----	-----	-----	-----	-----	-----

A: نحوه آزمایش‌ها آلوده وبدون آلودگی یا عامل اصلی *B*: غلظت اسید یا عامل فرعی

AB:اثر متقابل نحوه آزمایش × غلظت اسید

* : در سطح ۵٪ معنی‌دار است. ** : در سطح ۱٪ معنی‌دار است. ns : معنی‌دار نیست

جدول ۳- میانگین فعالیت آنزیم‌ها وصفات در دو گروه دانه رستهای آلوده و بدون آلودگی به قارچ

دو آزمایش	طول ریشه اولیه *Cm*	طول ساقه اولیه *Cm*	پراکسیداز در ریشه	پراکسیداز در ساقه اولیه	کاتالاز در ریشه	کاتالاز در ساقه اولیه
بدون آلودگی به قارچ	*a*۴/۱۳	*b*۰/۷۵	*a*۰/۴۹	*a*۰/۳۹	*a*۱/۰۵	*a*۰/۵۱
آلوده به قارچ	*a*۴/۳۶	*a*۰/۸۷	*a*۰/۵۷	*b*۰/۳۳	*a*۱/۰۶	*b*۰/۳۰

وجود حروف متفاوت در مقایسه بین تیمارها نشان از معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین یک صفت دارد و به ترتیب حروف *a*، *b*، *c* و نظایر آن وضعیت مطلوب‌تر صفت را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۴- میانگین فعالیت آنزیم‌ها وصفات در غلظت‌های مختلف سالسیلیک اسید درمجموع دانه رستهای آلوده و بدون آلودگی به قارچ

غلظت اسید سالیسیلیک	طول ریشه اولیه *Cm*	طول ساقه اولیه *Cm*	پراکسیدز در ریشه	پراکسیدز در ساقه اولیه	کاتالاز در ریشه	کاتالاز در ساقه اولیه	درصد دانه رستهای آلوده
شاهد	*a*۴/۷۰	*a*۰/۸۷	*a*۰/۶۳	*c*۰/۲۹	*a*۱/۰۶	*c*۰/۲۱	*a*۵۵
0/1mM	*a*۴/۳۳	*b*۰/۷۱	*a*۰/۵۵	*b*۰/۳۵	*a*۱/۱۰	*b*۰/۳۵	*b*۲۰
1/5mM	*b*۳/۷۲	*a*۰/۸۵	*b*۰/۴۰	*a*۰/۴۲	*a*۰/۹۹	*a*۰/۶۵	*b*۲۱

وجود حروف متفاوت در مقایسه بین تیمارها نشان از معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین یک صفت دارد و به ترتیب حروف *a*، *b*، *c* و نظایر آن وضعیت مطلوب‌تر صفت را نشان می‌دهد.

جدول ۵- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌ها و صفات در همه تیمارها (آلوده و بدون آلودگی به قارچ × غلظت *SA*)

آلوده و بدون آلودگی به قارچ × غلظت *SA*	طول ریشه اولیه *Cm*	طول ساقه اولیه *Cm*	پراکسیداز در ریشه	پراکسیداز در ساقه اولیه	کاتالاز در ریشه	کاتالاز در ساقه اولیه
بدون قارچ×شاهد ۰*mM*	*a*۴/۶۳	*bc*۰/۷۵	*ab*۰/۵۵	*b*۰/۳۸	*a*۰/۸۹	*c*۰/۱۹
بدون قارچ×۰/۱*mM*	*abc*۴/۱۹	*c*۰/۶۸	*a*۰/۶۶	*c*۰/۳۲	*a*۱/۳۵	*b*۰/۵۰
بدون قارچ×۱/۵*mM*	*c*۳/۵۹	*abc*۰/۸۱	*c*۰/۲۶	*a*۰/۴۵	*a*۰/۹۰	*a*۰/۸۳
با قارچ×شاهد ۰*mM*	*a*۴/۷۷	*a*۰/۹۹	*a*۰/۷۱	*d*۰/۲۰	*a*۱/۲۳	*c*۰/۲۳
با قارچ×۰/۱*mM*	*ab*۴/۴۷	*bc*۰/۷۴	*bc*۰/۴۴	*b*۰/۳۹	*a*۰/۸۵	*c*۰/۱۹
با قارچ×۱/۵*mM*	*bc*۳/۸۴	*ab*۰/۸۹	*ab*۰/۵۴	*b*۰/۳۸	*a*۱/۰۸	*b*۰/۴۶

وجود حروف متفاوت در مقایسه بین تیمارها نشان از معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین یک صفت دارد و به ترتیب حروف *a*، *b*، *c* و نظایر آن وضعیت مطلوب‌تر صفت را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

نتایج به دست آمده نشان داد بین غلظت ۰/۱ و ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک از نظر کاهش میزان آلودگی تفاوت معنی‌دار وجود ندارد، اما میزان آلودگی در تیمار با *SA* ۰/۱ *mM* کم‌تر است. با توجه به این‌که، این غلظت بر افزایش جزیی طول ریشه مؤثر بوده است و تأثیر منفی بر درصد جوانه‌زنی نداشته است، پس در مرحله‌های اولیه رشد گیاه استفاده از *SA* ۰/۱ *mM* می‌تواند تأثیر مطلوبی بر ایجاد گیاهچه‌های سالم با رشد مناسب داشته باشد. البته این غلظت موجب کاهش طول ساقه اولیه شده است. شاید همین کاهش طول ساقه نیز نشان دهنده‌ی اثرمطلوب *SA* ۰/۱ *mM* باشد، زیرا مقایسه طول ساقه گیاهان آلوده با سالم، افزایش طول ساقه اولیه را در گیاهان آلوده به قارچ نشان داد. به نظر می‌رسد تنش وارد شده به گیاه در اثر آلودگی به قارچ موجب سرعت دادن به مرحله‌های رشد گیاه شده است و گیاه قبل از آن‌که سیستم ریشه‌ای خود را تقویت کرده و گسترش دهد اقدام به رشد سریع‌تر ساقه نموده است.

افزایش مقاومت دانه رستهای گوجه فرنگی به قارچ *Alternaria solani* تحت تأثیر *SA* ۲۰۰ *µM* توسط *Spletzer* (*1999*)گزارش شد. *Murphy* (*2000*) تأخیر در بروز بیماری در تنباکوی آلوده به *Botrytis cinerea* را تحت تأثیر *SA* گزارش کرد ، همچنین رشد میسلیوم قارچ Eutypa lata توسط *SA* مهار شد (Amborabe 2002) که برابر با نتایج بدست آمده در این پژوهش می‌باشد.

بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در ریشه اولیه و ساقه اولیه گیاهان آلوده و سالم تحت تیمار با *SA* نشان داد، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در ریشه گیاهچه آلوده به قارچ بیش‌تر از ریشه گیاهچه‌های سالم بوده است و با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارد. برعکس فعالیت این دو آنزیم در ساقه اولیه گیاهچه‌های آلوده به قارچ به طور معنی‌داری نسبت به گیاهچه‌های سالم کاهش می‌یابد.

در سنجش فعالیت آنزیم‌ها زمان عصاره‌گیری از گیاه مهم می‌باشد زیرا فعالیت آنزیم در زمان‌های مختلف متفاوت است. شاید افزایش کم فعالیت دو آنزیم در ریشه‌های آلوده مربوط به زمان عصاره‌گیری باشد و زمان بیشینه فعالیت آنزیم‌ها پایان یافته باشد. در این زمان نشانه‌های بیماری هنوز به طور مشخص بر روی ساقه اولیه مشاهده نمی‌شد، به طوری که فعالیت دو آنزیم در ساقه‌های دانه رستهای آلوده کمتر از نمونه‌های سالم بود. رقم بیونیج رقمی حساس نسبت به قارچ اسکوکیتا می‌باشد ممکن است عدم افزایش به موقع فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در اندام‌های هوایی دانه رستهای این رقم موجب حساسیت شدید این رقم و آسیب پذیری آن نسبت به قارچ آسکوکیتا باشد.

Patykowski (2003)نشان داد که تولید H_2O_2 در رقم نیمه حساس گوجه فرنگی نسبت به قارچ بوتریتیس سینرا بیش‌تر و زودتر از رقم حساس آن رخ می‌دهد، افزایش فعالیت اسکوربات پراکسیداز ۴۸

Archive of SID

www.SID.ir

ساعت بعد از مایه‌زنی و افزایش فعالیت کاتالاز چند ساعت پس از مایه‌زنی رخ می‌دهد. Ping Luo (2001) نشان داد افزایش H_2O_2 در گون مرتبط با مهار فعالیت کاتالاز است.

Garcia-limones (2002) نشان داد فعالیت آنزیم‌های مختلف در ریشه و ساقه نخود آلوده به قارچ فوزاریوم با یکدیگر متفاوت است، هم‌چنین بین رقم حساس و مقاوم نیز از نظر فعالیت آنزیم‌ها تفاوت وجود دارد.

نتایج پژوهش‌های یاد شده و نتایج پژوهش حاضر، کندی پاسخ ارقام حساس نسبت به عوامل بیماری‌زا و متفاوت بودن تغییر فعالیت آنزیم را در بخش‌های مختلف گیاه در ارقام مختلف و در زمان‌های متفاوت نشان می‌دهند.

بررسی نتایج غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید نشان داد فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز ریشه تحت تأثیر *SA* ۱/۵ *mM* کاهش می‌یابد. این کاهش تنها برای آنزیم پراکسیداز معنی‌دار است، برعکس فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در ساقه اولیه تحت تأثیر *SA* ۱/۵ mM افزایش معنی‌دار دارد. پس غلظت ۱/۵ میلی‌مولار *SA* اثرات متفاوتی در ریشه و ساقه داشته و در ریشه باعث مهار فعالیت دو آنزیم شده است. این نتایج با گزارش *Srivastava* (2001) در مورد کاهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در گیاه سس تحت تأثیر *SA* همسو می‌باشد. اکسین‌ها به عنوان مهار کننده‌ی فعالیت پراکسیداز در تنباکو و سس(Klotz 1996,Srivastava 2001) معرفی شده‌اند. این احتمال وجود دارد که *SA* با مکانیزیمی مشابه اکسین‌ها عمل کند.

Shim (2003) نشان داد بین کاهش فعالیت کاتالاز و افزایش *SA* درونی گیاهان ارتباط وجود دارد. بررسی‌ها نشان داده است *SA* با اتصال به آهن موجود در آنزیم کاتالاز فعالیت آن را مهار می‌کند و یا به عبارتی از آن به عنوان عامل دهنده الکترون برای اکسیداسیون خود استفاده می‌کند و موجب مهار فعالیت آن می‌شود. به نظر می‌رسد *SA* در غلظت پایین پراکسید هیدروژن ، فعالیت کاتالاز را مهار می‌کند، اما در غلظت‌های زیاد آن توان مهار کاتالاز را ندارد. در واقع *SA* با کاهش فعالیت کاتالاز، تنش را در گیاهان کاهش می‌دهد و برای غلبه بر تخریب ناشی از تنش ضروری است(Durner ,1996, Ruffer 1995).

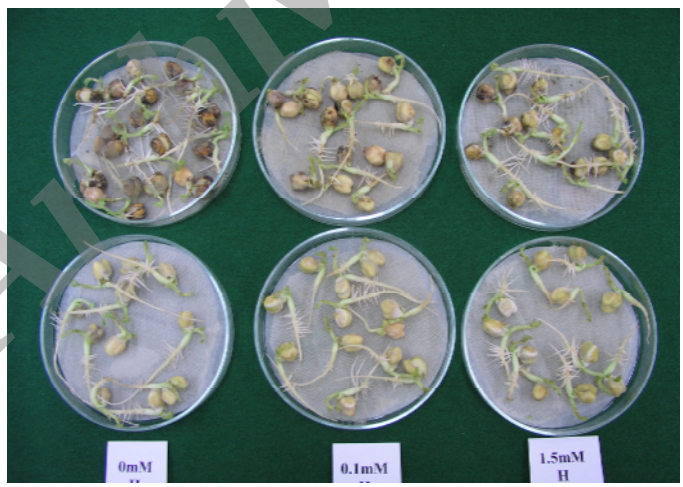
افزایش فعالیت پراکسیداز در دانه رستهای موز تحت تیمار با *SA* و استرس سرما توسط kang (2003) گزارش شده است. به طور کلی غلظت اسید و اندام گیاه تحت تأثیر اسید، بر چگونگی تغییر فعالیت آنزیم‌ها اثر می‌گذارد. در این پژوهش غلظت بالای *SA* در ساقه همانند عامل تنش‌زا عمل نموده است و در نتیجه‌ی آن فعالیت آنزیم‌های ضد تنش اکسیداتیو مانند پراکسیداز و کاتالاز افزایش یافته است. این آنزیم‌ها با از بین بردن پراکسید هیدروژن و اکسیژن‌های فعال دیگر موجب حمایت از گیاه در برابر آثار تخریبی و سمی اکسیژن‌های فعال می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

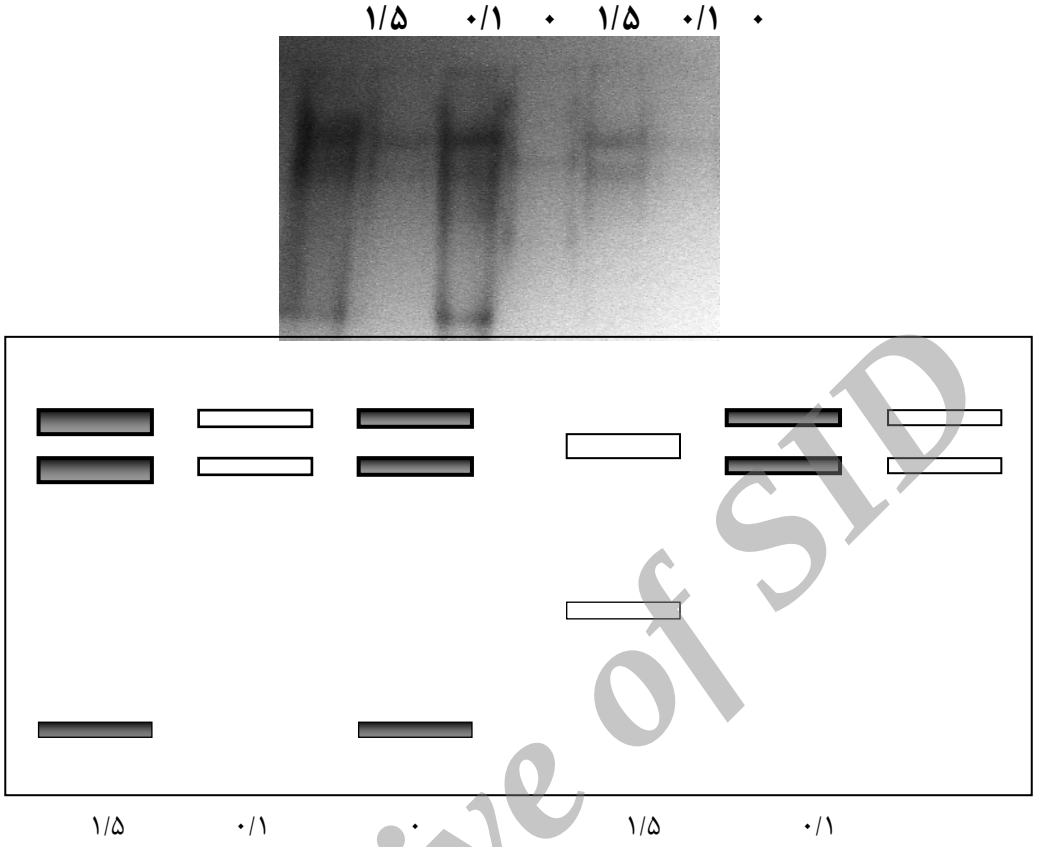
بررسی ایزوآنزیم‌های پراکسیداز ریشه با سیستم PAGE نشان داد در دانه رستهای آلوده به قارچ، ایزوآنزیمی جدید در ناحیه مولکول‌های سبک ژل ظاهر می‌شود که تحت تیمار ۰/۱ mM *SA* این باند حذف می‌شود. بین شاهد و دو تیمار *SA* آلوده به قارچ، ریشه دانه رستهای آلوده تیمار شده با ۰/۱ mM SA کم‌ترین میزان فعالیت را دارند که می‌تواند در اثر حذف این باند ضعیف باشد، با توجه به این‌که کم‌ترین شدت بیماری نیز مربوط به همین گیاهان می‌باشد به نظر می‌رسد تغییر کمی و کیفی فعالیت آنزیم پراکسیداز در کاهش شدت بیماری مؤثر باشد. در مجموع فعالیت آنزیم در دانه رستهای آلوده به قارچ بیش‌تر از دانه رستهای سالم است که شدت رنگ بیش‌تر آن‌ها بر روی ژل این امر را تأیید می‌کند.

تحت تأثیر سالیسیلیک اسید در نمونه‌های سالم و بدون آلودگی در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار ۲ باند جدید یکی در ناحیه مولکول‌های سنگین و دیگری در ناحیه مولکول‌های سبک به جای ۲ باند موجود در ناحیه مولکول‌های سنگین دیده می‌شود، کم‌ترین فعالیت کمی آنزیم نیز در همین غلظت است به این ترتیب ۲ باند جدید به وجود آمده فعالیت کم‌تری نسبت به باندهای موجود درنمونه‌های شاهد و تیمار ۰/۱ *mM* دارند. ایزوآنزیم‌هایی که در ناحیه مولکول‌های سبک‌تر هستند دارای بار منفی‌تر بوده، به طور احتمالی اسیدی‌تر هستند و در ساخت چوب نقش دارند (Gaspar 1985 , Liman 1998).



تصویر۲- دانه رستهای هشت روزه ،پتری‌های ردیف بالا نمونه‌های آلوده به قارچ و پتری‌های ردیف پایین نمونه‌های سالم می‌باشند.

Archive of SID
www.SID.ir



تصویر۱- ایزو آنزیم‌های پراکسیداز ریشه برروی ژل پلی اکریل آمید.

از سمت راست بدون آلودگی شاهد، ۰/۱، ۱/۵ و آلوده به قارچ شاهد، ۰/۱، ۱/۵ میلی مولار *SA*

Archive of SID

سپاس‌گزاری

از مسئولین محترم مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی که ما را در انجام این پژوهش یاری داده‌اند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

www.SID.ir

منابع

- صباغ پور، س. ح.۱۳۷۵.ژنتیک نخود، مرکز نشر آموزش، ۵۴ صفحه.
- علی احمد کروری، س. ۱۳۷۸. مجموعه مقالات بررسی پاسخ آنزیم‌ها در درختان جنگلی به تغییرات عواملی زیست محیطی ، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.
- یونسی، ح.۱۳۸۲. تنوع بیماری‌زایی جرایدهای Ascochyta rabiei روی ارقام نخود در استان کرمانشاه مجله بیماری‌های گیاهی، ۳۹: ۲۲۸-۲۱۳.

- Amborabe B.E.2002. Antifungal effects of salicylic acid and benzoic acid derivatives towards Eutypa lata: Structure- activity relationship . Plant physiol. Biochem. 40:1051-1060.
- Bradford , M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Anal. Biochem. 72,248-254.
- Breda B. .1993. Differential expression of two peanut peroxidase cDNA clones in peanut plants and cells in suspension culture in response to stress. Plant Cell Rep.12:268-272
- Chibbar R.N.1984. The growth of and peroxidase synthesis by two carrot cell lines. J. Exp.Bot. 35:1846-1852.
- Davis B.J, 1964. Disc electrophoresis- II method and application to human serum proteins, Ann. N.Y. Acad. Sci.121:404-427.
- Durner J. 1996. SA is a modulator of tobacco and mammalian catalases, J. Biol-chem. 271:28492-28501.
- Garcia-Limones, C. 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea and Fusarium oxysporum sp. Ciceris. Physiological and Molecular plant pathology 61:325-337.
- Gaspar, T. & Penel, C. 1985. A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. Physiol. Plant. 64:418-423.

Archive of SID

www.SID.ir

- Kang G.2003. Salicylic acid changes activities of H_2O_2 metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana Seedlings. Environmental and Experimental Botany. 50:9-15.
- Klotz K.L. 1996. Phytohormone Control of the tobacco anionic peroxidase poromoter. Plant Mol. Biol. 31:565-573.
- Liman F. 1998. Phytohormone regulation of isoperoxidase in Catharanthus roseus suspension cultures. Phytochemistry. 49:1219-1225.
- Maheshwari P. 1961. Artificial production of buds from the embryos of Cuscuta reflexa. Nature. 191:197-198.
- Metraux J.P.2002.Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. Trends in Plant Science.internet.1-3.
- Moerschbacher B.M.1992. Plant peroxidases: involvement in response to pathogen, in: Panel C., Gasper the plant peroxidases, University of Geneva, Switzerland, 91-99.
- Murphy A. 2000. Characteristic of salicylic acid- induced delay in disease caused by a necrotrophic Fungal.pathogen in tobacco. Physiological and Molecular Plant Pathology.57:47-54
- Patykowski. J. 2003. Activity of enzymes related to H2O2 generation and Metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with Botrytis cinerea. J.Phytopathology. 151:153-161.
- Ping-Luo J. 2001. Enhanced Somatic embryogenesis by Salicylic acid of Astragalus adsurgens pall.: relationship with H2O2 .Production and H2O2 – metabolizing enzyme activities. 161:125-132.
- Raskin I. 1992.Role of salicylic acid in plant. Annu. Rev. plant physiol. Plant Mol.Biol.43:439-463.
- Ruffer M. & Steipe B. 1995. Evidence against specific binding of SA to plant catalase. FEBS lett. 377:175-180.
- Shim, I.s. 2003. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to Salicylic acid accumulation in plants. Plant Growth Regulation 39:285-292.

Archive of SID

www.SID.ir

- Spletzer M.E. 1999. Salicylic acid induces resistance to Alternaria solani in Hydroponically Grown Tomato. Phytopathology 89:722-727.
- Srivastava. S. 2001. Plant regeneration from callus of Cuscuta reflexa – an angiospermic parasite- and modulation of catalase and peroxidas activity by Salicylic acid and naphthalene acetic acid. Plant physiol. Biochem. 39:529-538
- Willekens H. 1995. Catalases in plants, No 1. Breeding 1. 207-228.
- Zhang. Sh. 2002. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. Biological Control. 25:288-296.

Archive of SID

www.SID.ir