

إستحثات المقاومة المكتسبة الجهازية ضد الفطر *Alternaria solani* المسبب لمرض اللفحة المبكرة على نبات الطماطم/البندورة

راند رؤوف العاني¹ وكونر عبد الوهاب شاكر²

(1) مركز بحوث التقنيات الأحيائية، جامعة النهرين، العراق، البريد الإلكتروني: raed_r1961@yahoo.com

(2) مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي، جامعة بغداد، العراق.

المخلص

العاني، راند رؤوف وكونر عبد الوهاب شاكر. 2013. إستحثات المقاومة المكتسبة الجهازية ضد الفطر *Alternaria solani* المسبب لمرض اللفحة المبكرة على نبات الطماطم/البندورة. مجلة وقاية النبات العربية، 31(1): 46-50.

درس دور حامض الساليسيليك Salicylic acid في تحفيز مورثات المقاومة R-genes لمقاومة مرض اللفحة المبكرة المتسبب عن الفطر *Alternaria solani* على الطماطم/البندورة. رشت المعاملة لأولى من شتلات نباتات طماطم بمعلق بوعي من الأبواغ الكونيدية تركيز 2×10^5 مل، ورشت المعاملة الثانية بحامض الساليسيليك تركيز 1 ميكرومول/لتر لثلاثة أيام متتالية، ثم رشت بالتركيز نفسه من المعلق البوعي للأبواغ الكونيدية بعد 24 ساعة، أما المعاملة الثالثة فرشت بحامض الساليسيليك فقط تركيز 1 ميكرومول/لتر لثلاثة أيام متتالية في حين تركت المعاملة الرابعة من شتلات الطماطم/البندورة بدون أي معاملة للمقارنة. أظهرت النتائج، بعد 14 يوماً، ارتفاعاً في شدة الإصابة بالمرض إلى أكثر من 22.5% في المعاملة الأولى بينما كانت شدة الإصابة في المعاملة الثانية قد وصلت إلى حدود 17.5% قياساً بمعاملة المقارنة. وبعد 28 يوماً، أظهرت النتائج ارتفاعاً في شدة الإصابة في المعاملة الأولى إذ وصلت إلى ما يقرب من 50% في حين استقرت شدة الإصابة عند 17.5% في المعاملة الثانية، وهذا يشير إلى أن هناك عاملاً أستحث في نباتات الطماطم/البندورة عند رشها بحامض الساليسيليك قد أوقف المسبب المرضي عن النمو وتطور أعراض الإصابة. ولغرض التحري عن السبب، فقد أستخلصت البروتينات من نباتات الطماطم المرشوشة بحامض الساليسيليك ورحلت كهربائياً على هلام متعدد الأكريلاميد 15%. وأظهرت النتائج ظهور حزمتين بروتينيتين حددت أوزانها الجزيئية بـ 23 و 44 كيلودالتون في حين لم تظهر مثل هذه الحزم البروتينية لعينات بروتينات طماطم غير مرشوشة بالحامض. ومن النتائج التي تم الحصول عليها يلاحظ أن هذه البروتينات المستحثة في نباتات الطماطم مسؤولة بشكل رئيسي عن استحثات مقاومة مكتسبة جهازية في نباتات الطماطم/البندورة وتحفيز مورثات المقاومة R-genes لإنتاج بروتينات ذات علاقة بالإمراضية لمقاومة الفطر.

كلمات مفتاحية: بروتينات ذات علاقة بالإمراضية، حامض الساليسيليك، *Alternaria solani*، طماطم/بندورة.

المقدمة

الإنزيمات (18). أشار Vidhyasekaran (18) بأن البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية تتميز بصفتين مهمتين وفريدتين ألا وهي القابلية العالية للذوبان في وسط حامضي، ومقاومتها العالية لأنواع مختلفة من الإنزيمات المحطمة للبروتينات. تتحفز البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية بواسطة عوامل عدة مثل إصابتها بمسببات مرضية مختلفة كالفطور والفيروسات والبكتريا والتي تسبب تراكم كميات كبيرة من البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية فضلاً عن أن هذه البروتينات يمكن أن تصنع وتتراكم بالتحفيز بواسطة المواد الكيميائية أو الأحياء غير الممرضة بل وحتى الظروف البيئية (1). ولوحظ إن استحثات البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية في النبات ممكن أن يتمتحت أي ظروف إجهاد مختلفة على النبات مثل الجروح والهورمونات النباتية والإيثيلين وحامض الساليسيليك والمعادن الثقيلة والحرارة والبرودة والأشعة فوق البنفسجية (7). ولاحظ Fu وآخرون (5) بأن سيانيد البوتاسيوم يقوم باستحثات مقاومة جهازية في بعض النباتات ولكن بألية

يعتبر محصول الطماطم/البندورة *Lycopersicon esculentum* (Mill) من محاصيل الخضر المهمة في العالم نظر لقيمتها الغذائية العالية واستخداماتها المختلفة. تصاب الطماطم بالعديد من المسببات المرضية وبالأخص الفطرية منها ويعتبر مرض اللفحة المبكرة المتسبب عن الفطر *Alternaria solani* من أهمها (2). تتعرض الكثير من النباتات للإصابة بالأمراض وعند غزو المسببات المرضية للأنسجة النباتية فإن عدداً من المورثات يقوم بتصنيع عدد قليل من البروتينات المتخصصة تدعى بالبروتينات ذات العلاقة بالإمراضية التي تلعب دوراً مهماً في مقاومة المرض (13، 14). وأشار إلى أن العديد من البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية قد عرفت على أنها عبارة عن بروتينات ذات طبيعة إنزيمية أو إنزيمات (12، 16، 17، 18) وأن عدم وجود المادة الأساس (Substrate) لعمل هذه الإنزيمات قد يعمل على التقليل من فاعلية هذه

1 ميكرومول/لتر لثلاثة أيام متتالية ثم أعدت بالفطر بالتركيز نفسها لمشار إليه أعلاه، في حين رشت المعاملة الثالثة بحامض الساليسيليك لثلاثة أيام متتالية فقط وتركت المعاملة الرابعة للمقارنة. أخذت القراءات بعد 14 و 28 يوماً. جلبت عينات أوراق من المعاملة الأولى والثانية من الأجزاء النباتية المجاورة للبقع وظهرت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 1.2% ثم غسلت بالماء المقطر ونقلت على الوسط الغذائي (PDA) وحضنت عند 25°س.

الدليل المرضي

سجلت النسبة المئوية لشدة الإصابة وفقاً للدليل المرضي المكون من خمسة درجات (15) وكما يلي: 0 = لا توجد إصابة، 1 = ظهور البقع على الأوراق بنسبة 1-25%، 2 = ظهور بقع على الأوراق بنسبة 26-50%، 3 = ظهور بقع على الأوراق بنسبة 51-75%، 4 = ظهور بقع على الأوراق بنسبة 76-100%.

وحسبت شدة الإصابة بموجب معادلة الدليل المرضي:

$$\text{الدليل المرضي} = \frac{\text{مجموع (النباتات المصابة} \times \text{درجة الإصابة)}}{\text{عدد النباتات الكلي من جميع الدرجات} \times \text{أعلى درجة إصابة}} \times 100$$

إستخلاص البروتينات من الأنسجة النباتية

أُتبعَت طريقة DaRocha وآخرون (3) في إستخلاص البروتينات من الأنسجة النباتية من نباتات الطماطم/البندورة المعاملة بحامض الساليسيليك كما استخلصت البروتينات من الأنسجة النباتية لنباتات طماطم سليمة وغير معاملة للمقارنة وقدر تركيزها اعتماداً على المعادلة التي أشار إليها Givan و Leech (6):

$$\text{تركيز البروتين مغ/مللتر} = \frac{\text{الكثافة الضوئية عند موجة 280} - \text{الكثافة الضوئية عند موجة 235}}{2.51}$$

تقدير الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية

قدر الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية بطريقة الرحلان الكهربائي في هلام متعدد الأكريلاميد polyacrylamide gel electrophoresis (Resolution gel) و 4% لهلام الرص SDS-15% (Stacking gel) في أنابيب عمودية حسب طريقة Hames و Rickwood (7)، حيث سخنت النماذج إلى 100°س في محلول منظم Tris-HCl يحوي 2% SDS و 2% B-mercaptoethanol و 15% Glycerol و 0.05% صبغة البروموفينول الزرقاء (Bromophenol blue). وضعت النماذج على سطح الهلام وأجريت عملية الرحلان على قدرة 100 فولت لمدة 5 ساعات. غطس الهلام في

مختلفة، إذ تتم العملية دون تكوين البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية، كما أن الانثوسيانين الذي يستحث مقاومة جهازية بالنبات عن طريق تثبيط إنتقال الإلكترونات دون تكوين البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية (9). يعتبر حامض الساليسيليك من أهم المركبات الكيميائية القادرة على ستحثات مقاومة مكتسبة جهازية في النبات عن طريق تحفيز مورثات المقاومة R-genes وإنتاج البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية (8) وعند إضافته للنبات، تتضاعف كمياته داخل النبات إلى عشرات الأضعاف التي تساعد على تعزيز الحافز لمورثات المقاومة بالنبات لإنتاج بروتينات ذات طبيعة إنزيمية أو إنزيمات مثل Chitinase و Glucanase والتي لها آليات دفاعية ضد مختلف مسببات المرضية مثل الفطور والفيروسات والبكتيريا (14) وأن حامض الساليسيليك لا يلبث أن يتحول إلى مركب الكاتيكول داخل النبات التي هي مركبات نباتية طبيعية (11). إن حامض الساليسيليك ومشتقاته تعتبر من المركبات الرئيسية القادرة على استحثات مقاومة مكتسبة جهازية في النبات وإنتاج البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية القادرة على الحد من فاعلية مسببات المرضية وإيقاف تطورها داخل النبات (10).

ونظراً لما للمبيدات الكيميائية من أثر سلبي في البيئة والنظام البيئي والنبات وارتفاع ثمنها فقد بات من الضروري إيجاد وسائل بديلة لها لغرض حمايتها من الإصابة بالأمراض.

مواد البحث وطرائقه

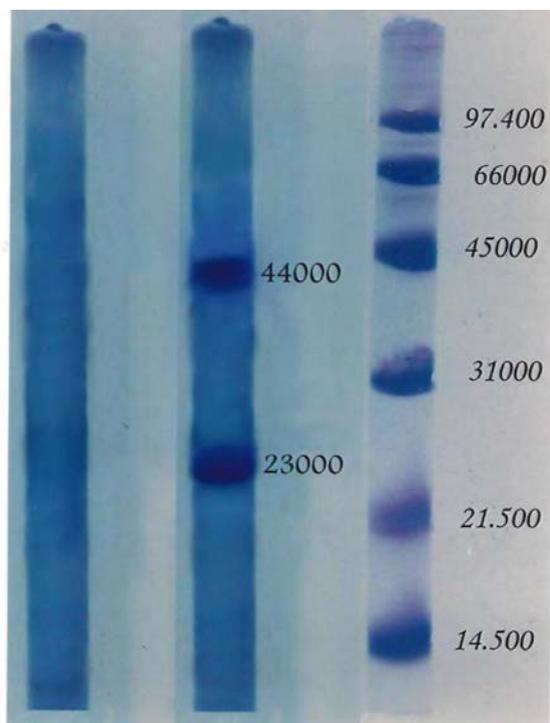
جمع العينات

جمعت عينات من أوراق وسوق وثمار نباتات طماطم/بندورة تظهر أعراضاً لمرض اللفحة المبكرة من الدفيئات البلاستيكية في كلية الزراعة، جامعة بغداد، وشخصت في مركز بحوث متحف التاريخ الطبيعي بموجب المفاتيح التشخيصية المعتمدة (4). غسلت العينات بالماء وأخذت قطع بحجم 2-5 مم وظهرت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 1.2% ثم غسلت بالماء المقطر وجففت على أوراق ترشيح ثم نقلت على الوسط الغذائي (PDA) وتركت في الحاضنة عند 25°س لحين ظهور النموات.

تحضير شتلات الطماطم/البندورة

زرعت شتلات الطماطم/البندورة السليمة في أصص بلاستيكية داخل دفيئة بلاستيكية بأربع معاملات وخمسة مكررات حيث أعدت المعاملة الأولى بمعلق بوغي للأبواغ الكونيدية تركيزه $10^5 \times 2$ بوغة كونيدية/مل أما المعاملة الثانية فرشت بحامض الساليسيليك تركيزه

إنتاج بروتينات جديدة في نباتات الطماطم المعاملة بحامض الساليسيليك غير موجودة في معاملة المقارنة. كما أظهر تحليل مستخلص بروتينات نباتات طماطم/البندورة معاملة بحامض الساليسيليك في هلام متعدد الأكريلاميد SDS-Polyacryamide gel electrophoresis 15% ظهور حزمتين بروتينيتين غير موجودتين في مستخلص بروتينات نباتات طماطم سليمة وغير معاملة بالحامض وقدرت أوزانها الجزيئية بـ 23 و 44 كيلودالتون (شكل 1) باستخدام منحنى المعايرة القياسي للبروتينات القياسية ذات الأوزان الجزيئية 14500، 21500، 31000، 44000، 66000، 97400 دالتون.



شكل 1. نمط الرحلان الكهربائي في هلام متعدد الأكريلاميد من اليمين للييسار أ: البروتينات القياسية، ب: بروتينات نباتات طماطم/بندورة مرشوشة بحامض الساليسيليك، ج: بروتينات نباتات طماطم/بندورة سليمة

Figure 1. SDS-PAGE profile from the right to the left: standard proteins, proteins of tomato plants sprayed by SA, proteins of healthy tomato plants

ومن الممكن أن تكون هذه البروتينات المحفزة إنزيمات أو بروتينات ذات طبيعة إنزيمية قامت بتنشيط الغزل الفطري وبالتالي أدى إلى وقف نمو الفطر المهاجم والتي أثبتتها النتائج بعد 28 يوماً من الإعداء بالفطر، إذ لوحظ استقرار شدة الإصابة عند نسبة 17.5% في نباتات الطماطم المرشوشة بحامض الساليسيليك ثم المعاملة بالمعلق البوغي للفطر، في حين كانت شدة الإصابة قد ارتفعت من 22.5%

صبغة الكوماسي الزرقاء بتركيز 0.25% في مزيج من 5 أحجام ميثانول، 5 أحجام ماء مقطر، حجم واحد حامض الخليك و 5% ميثانول عند 37°س مع الرج للتسريع في عملية إزالة الصبغة.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الدليل المرضي بعد 14 يوماً من إجراء العدوى بالمعلق البوغي الفطري فقط بأن شدة الإصابة قد وصلت إلى 22.5% في حين كانت شدة الإصابة في معاملة الرش بحامض الساليسيليك والمعلق البوغي للفطر 17.5%، بينما أظهرت نتائج شدة الإصابة بعد 28 يوماً ارتفاعاً في شدة الإصابة في النباتات المعده بالمعلق البوغي للفطر إذ وصلت إلى 50% في حين استقرت شدة الإصابة في النباتات المعاملة بحامض الساليسيليك والمعدة بالمعلق البوغي للفطر على 17.5% (جدول 1).

جدول 1. شدة الإصابة في نبات الطماطم/البندورة بعد 14 و 28 يوماً من المعاملة.

Table 1. Disease intensity 14 and 28 days after treatment.

شدة الإصابة %		المعاملة
Disease intensity (%)		
بعد 28 يوم After 28 days	بعد 14 يوم After 14 days	Treatment
0.00	0.00	Control شاهد
50.00	22.50	Fungal spores أبواغ كونيدية
3.73	3.73	Salicylic acid حمض الساليسيليك
17.50	27.5	أبواغ كونيدية + حمض الساليسيليك Fungal spores + Salicylic acid

إن النتائج التي تم الحصول عليها تدل على توقف الفطر عن النمو والتطور. وللتأكد من ذلك، فقد أظهرت نتائج زراعة العينات المأخوذة من نباتات الطماطم المعاملة بالمعلق البوغي الفطري على الوسط الغذائي (PDA) ظهور نموات فطرية بعد 48 ساعة في حين لم يلاحظ ظهور أي نمو فطري على الوسط الغذائي في العينات المأخوذة من نباتات الطماطم المرشوشة بحامض الساليسيليك والمعلق البوغي للفطر، وهذه دلالة واضحة تشير بأن رش حامض الساليسيليك على نباتات الطماطم كان قد استحث عاملاً معيناً أدى إلى وقف نمو الفطر حيث أظهرت نتائج حساب تركيز البروتينات في معاملة المقارنة بـ 187.4 مايكروغرام/مل في حين كانت نتائج حساب تركيز البروتينات المعاملة بحامض الساليسيليك بـ 199.7 ميكروغرام/مل وهذا يدل على

وإستحثاث بروتينات ذات علاقة بالإمراضية Pathogenesis Related Protein في نباتات الطماطم لمقاومة الفطر. وهذه النتائج تنطبق مع ما أشار إليه Vidhyasekaran (18) إذ تقوم هذه البروتينات المستحثة في النبات بمهاجمة الجدار الخلوي للفطر ووقف نموه. وقد أشارت العديد من الأبحاث إلى آليات دور البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية في مقاومة الفطر المهاجم.

بعد 12 يوماً إلى 50% بعد 28 يوماً من التلقيح بالمعلق البوغي للفطر (جدول 1) فضلاً عن أن العينات الورقية التي أخذت من نباتات الطماطم المرشوشة بالحامض والمعدة بالفطر لم تظهر أي نمو للغزل الفطري عند زراعتها على الوسط الغذائي PDA، في حين أظهرت العينات الورقية المأخوذة من نباتات الطماطم المعدة بالفطر نمواً للغزل الفطري عند زراعتها على الوسط الغذائي PDA وهذا يدل على أنه كان لحامض الساليسيليك دوراً في تحفيز مورثات المقاومة (R-genes)

Abstract

Al-Ani, R.R. and G.A. Shaker. 2013. Induction of systemic acquired resistance against *Alternaria solani* which caused early blight in tomato plants. Arab Journal of Plant Protection, 31(1): 46-50.

This study was carried out to determine the role of salicylic acid in inducing resistance genes in tomato to control early blight disease caused by *Alternaria solani*. In the first treatment tomato seedlings were sprayed with a suspension of fungal conidio spores at concentration 2×10^5 spore/ml, in the second treatment seedlings were sprayed with salicylic acid at the concentration of 1.0 micromole/L, for three successive days. 24 hours later, they were then sprayed with the same mentioned concentration of fungal spores. In the third treatment, seedlings were sprayed by salicylic acid only at conc. of 1.0 micromole/L for three successive days. The fourth treatment was the untreated control. Disease intensity reached 22.5%, 14 days after the first treatment. Whereas, the disease intensity in the second treatment reached 17.5% when compared with the untreated control. Disease intensity in the first treatment reached 50% while in the second treatment it was stabilized at 17.5%, 28 days after treatment. When the proteins of tomato plants sprayed with salicylic acid were extracted, the gel electrophoresis profile showed the presence of two novel protein bands of 44 and 23 KDa in size, while such bands were absent in the unsprayed tomato plants. It can be concluded from this study that salicylic acid induced the production of proteins associated with reducing early blight disease intensity in tomato plants.

Keywords: Pathogenesis related proteins, salicylic acid, *Alternaria solani*, tomato

Corresponding author: Raed Raouf Al-Ani, Biotechnology Research Center, Al-Nahrain University, Iraq, Email: raed_r1961@yahoo.com

References

المراجع

1. **Al-Ani, R.R.** 2006. Induction of systemic acquired resistance in tomato plants against ToMV. PhD Dissertation, College of Agriculture, Baghdad University, Iraq.
2. **Brederode, F.Th., H.J.M. Linthorst and J.F. Bol.** 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Molecular Biology*, 17: 1117-1125.
3. **DaRocha, A., S.T. Ohki and C. Hiruki.** 1986. Detection of Mycoplasma-like organisms in situ by indirect immunofluorescence microscopy. *Phytopathology* 76: 864-868.
4. **Ellis, M.B.** 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 608 p.
5. **Fu, L-J., K. Shi, M. Gu, Y-H. Zhou, D-K. Dong, W-S. Liang, F-M. Song and J-Q. Yu.** 2010. Systemic induction and role of mitochondrial alternative oxidase and nitric oxide in a compatible tomato-tobacco mosaic virus interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23: 39-48.
6. **Givan, C.V. and R.M. Leech.** 1971. Biochemical anatomy of higher plant chloroplast and their synthesis of small molecule. *Biological Reviews*, 46: 409-428.
7. **Hames, B.D. and D. Rickwood.** 1984. Gel electrophoresis of proteins, a practical approach. IRL Press, Oxford. Washington DC. 288pp.
8. **Heil, M. and R.M. Bostock.** 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, 89: 503-512.
9. **Iriti, M., M. Rossoni, M. Borgo and F.Faoro.** 2004. Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine meanwhile inducing resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4406-4413.
10. **Lawton, K.A., L. Friedrich, M. Hunt, K. Weymann, T. Delaney, H. Kessmann, T. Staub and J. Ryals.** 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal*, 10:71-82.
11. **Metraux, J.P., H. Singer, J. Ryals, E. Ward, M. Wyss-Benz, J. Gaudin, K. Raschdorf, E. Schmid, W. Blum and B. Inveradi.** 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250:1004-1006.
12. **Muthukrishnan, S., G.H. Liang, H.N. Trick and B.S.Gill.** 2001. Pathogenesis-related protein and their genes in cereals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 93-114.

13. **Paulitz, T.C., C. Chen, R.R. Belanger and N. Benhamou.**2001. Induced systemic resistance by *Pseudomonas* spp. against *Pythium* root rot. In: Proceedings of the 5th International PGPR Workshop, Cordoba, Argentina.
14. **Radhajeyalakshmi, R., R. Velazhahan, R. Samiyappan and S. Doraiswamy.** 2009. Systemic induction of pathogenesis related proteins (PRs) in *Alternaria solani* elicitor sensitized tomato cells as resistance response. Scientific Research and Essays, 4: 685-689.
15. **Tatagiba, J.d.S., L.A. Maffia, R.W. Barreto, A.C. Alfenas and J.C. Sutton.**1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). Phytoparasitica, 26:8-19
16. **Van Loon, L.C., W.S. Pierpoint, T. Boller and V. Conejero.** 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Molecular Biology Reporter, 12: 245-264.
17. **Veronese, P., M.T. Ruiz, M.A. Coca, A. Hernandez-Lopez, H. Lee, J.I. Ibeas, B. Damsz, J.M. Pardo, P.M. Hasegawa, R.A. Bressan and M.L. Narasimhan.** 2003. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. Plant Physiology, 131: 1580-1590.
18. **Vidhyasekaran, P.** 1997. Fungal pathogenesis in plant crops, molecular biology and host defense mechanism, Marcel Dekker, New York, USA. 553 pp.

Received: April 26, 2011; Accepted: March 19, 2012

تاريخ الاستلام: 2011/4/26؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2012/3/19