فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۲
صص ۴۶-۳۵

بررسی تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روی علایم بیماری سپتوریای برگی *Mycospharella graminicola*

جلال غلام نژاد*[۱]، ابراهیم محمدی گل تپه[۲]، فروغ سنجریان[۳]، ناصر صفایی[۴]، خدیجه رضوی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۶

چکیده

در این پژوهش تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روی علایم بیماری سپتوریای برگی در ارقام گندم حساس (اترک و کویر) و مقاوم (دریا و زاگرس) در شرایط گلخانه بررسی شد. تیمار اسید سالیسیلیک به دو صورت پاشش بر روی برگ‌های گندم و خیساندن بذور در غلظت‌های متفاوت این ماده انجام شد. در این بررسی از دو جدایهٔ بیماری زای S_1 و K_8 از قارچ *Mycospharella graminicola* استفاده شد، که بر اساس نتایج آزمون بیماری زایی جدایهٔ S_1 بیماری زاتر بود و در آزمون‌های بعدی از این جدایه استفاده شد. در آزمون ارزیابی بیماری در تیمار با اسیدسالیسیلیک بر روی گیاه نتایج نشان داد که بین اثر سطوح ارقام و اثر اسیدسالیسیلیک بر روی علایم بیماری اختلاف معنی دار وجود دارد. رقم زاگرس در سطح ۴ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک با ۴۱/۰۶ درصدکمترین شدت بیماری، و رقم اترک در سطح ۰/۵ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک با ۸۱/۶۳ درصد بیش‌ترین شدت بیماری را در این تست نشان دادند. در آزمون تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روی علایم بیماری به صورت تیمار خیساندن بذر از میان چهار غلظت اسید سالیسیلیک مورد استفاده در این آزمون (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار) غلظت ۱ میلی-مولار بهترین سطح کنترل کنندگی را داشت. بر اساس نتایج این تحقیق بهترین غلظت پیشنهادی برای پاشش بر روی برگ-های گندم ۲ میلی‌مولار، و برای تیمار بذور ۱ میلی مولار است.

واژه‌های کلیدی: *Mycospharella graminicola*، اسیدسالیسیلیک، ارزیابی بیماری، تیمار بذور

[۱]- دانشجوی دورهٔ دکتری بیماری¬شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲]- استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران
[۳]- دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران
[۴]- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
*- نویسنده مسئول مقاله: jalalgholamnejad2006@gmail.com

مقدمه

در طبیعت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده مختلفی مانند بیماری‌ها و خشکی قراردارند که رشد آنها را محدود می‌کند. گیاهان برای حفظ بقای خود، مکانیسم‌های مختلفی را برای سازش با این تغییرات دارند که از آن جمله می‌توان به مکانیسم‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و تغییرات مولکولی اشاره کرد (Bohnert *et al*., 1995).

اسیدسالیسیلیک جزء مواد فنلی است که به صورت طبیعی در گیاهان وجود دارد و می‌تواند باعث القاء مقاومت سیستمیک در گیاهان شود (Malamy *et al*., 1992). اسید سالیسیلیک در مسیر انتقال سیگنال در مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) و مقاومت اکتسابی موضعی (LAR) مشارکت دارد. میزان اسید سالسیلیک طی مقاومت اکتسابی سیستمیک SAR افزایش می‌یابد و بنابراین این ماده را برای SAR لازم دانسته‌اند (Redman *et al*., 1994). مهمترین مسیر سنتز سالیسیلیک اسید درگیاهان، مسیری است که SA از فنیل آلانین تولید می‌شود. در این مسیر فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید و ترانس سینامیک اسید به بنزوئیک اسید تبدیل می‌شود و نهایتاً بنزوئیک اسید به SA تبدیل می‌شود (Kawano *et al*., 2004).

بیماری لکه‌برگی سپتوریایی گندم (Septoria leaf blotch) با عامل (Fuckel) *Mycosphaerella graminicola* با آنامورف *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous, 2011 از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در جهان می‌باشد که سالیانه خسارات فراوانی را به محصول گندم وارد می‌سازد (Goodwin *et al*., 2003). این بیماری از جمله عوامل محدود کننده این محصول به ویژه در سال‌های اخیر بوده است. استفاده از ارقام مقاوم مؤثرترین، اقتصادی‌ترین و سالم‌ترین روش از نظر زیست‌محیطی برای کنترل این بیماری به شمار می‌رود (Gilchrist *et al*., 1999). درکشورهای هلند، سوئیس و انگلستان مقاومت ۷۱ رقم و لاین گندم نان نسبت به شش جدایه *M. graminicola* در شرایط مزرعه مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه لاین‌هایی از اروپا (به خصوص سوئیس) و آمریکای لاتین مقاومت خوبی داشتند و ۲۷ رقم از منابع مختلف به جدایه IPO۳۲۳ از این بیمارگر مقاوم بودند (Brown *et al*., 1999). *برادینگ و همکاران* در سال ۲۰۰۲ (Brading *et al*., 2002) با بررسی مقاومت اختصاصی چند رقم گندم حساس و مقاوم و ژن‌های کنترل کننده مقاومت آنها در مقابل جدایه‌های عامل بیماری لکه برگی سپتوریایی، رابطه ژن برای ژن را بین مقاومت اختصاصی گندم و بیماریزایی *M. graminicola* مورد تأکید قرار دادند.

در سال‌های اخیر ۱۲ژن با اثر زیاد (Major gene) برای مقاومت به *M. graminicola*، به نام‌های Stb_1 تا Stb_{12} شناسایی شده‌اند. در سال۲۰۰۷ نیز یک ژن مقاومت دیگر به نام Stb_{15} در رقم Arina بر روی کروموزوم 6AS شناسایی شد (Arraiano *et al*., 2007).

این بیماری در مناطق مختلف ایران به خصوص استان‌های گلستان، خوزستان، کرمانشاه و اردبیل وجود دارد (Torabi and Nazari, 1998). میزان خسارت این بیماری در خوزستان با توجه به نوع رقم، مرحله آلودگی ۶/۹ تا ۳۸/۲ درصد گزارش شده است (Dadrezaei *et al*.,2003).

اسید سالیسیلیک نقش مهمی، در ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی دارد. *راسکین* در سال ۱۹۹۲ بیان کرد که اسید سالیسیلیک باید در زمرهٔ هورمون‌های گیاهی دسته‌بندی شود. اسید سالیسیلیک یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید، یک تنظیم کنندهٔ رشد درونی از گروه ترکیب اتفنی طبیعی می‌باشد که در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه نقش دارد (Raskin, 1992).

در واقع اسید سالیسیلیک یک ترکیب طبیعی است و غلظت آن در بافت‌های گیاهی بعد از آلودگی ویروسی، باکتریایی و یا بیمارگرهای قارچی تا ۵۰ برابر افزایش می‌یابد به عنوان مثال در گیاه *Solanum tuberosurn* آلوده شده با ویروس PVY (Heninig, 1996)، گیاه *Nicotiana* آلوده شده با TMV (Malamy *et al*., 1992) و خیارسبز *Cucumis sativus* آلوده شده با *Pseudomonas syringae* (Rasmussen *et al*., 1991) میزان غلظت اسیدسالیسیلیک افزایش می‌یابد.

با توجه به اینکه بهترین روش کنترل بیماری لکه برگی سپتوریایی گندم استفاده از ارقام مقاوم است، و از طرفی مادهٔ اسیدسالیسیلیک باعث القای واکنش‌های دفاعی علیه بیمارگرها در گیاهان می‌شود در نتیجه این مطالعه در جهت ارزیابی نوع واکنش (القای یا عدم القای) رقم‌های گندم (متفاوت از نظر حساسیت یا مقاوم بودن نسبت به بیماری لکه برگی) در برهمکنش با اسیدسالیسیلیک، و درنتیجه تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روی شدت این بیماری به دو صورت پاشش بر روی برگ‌های گندم و تیمار بذور در غلظت‌های متفاوت این ماده محرک در شرایط گلخانه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه زادمایه

برای تهیه زادمایهٔ بیمارگر، ارلن مایرهای YMDA (۴ گرم عصارهٔ مخمر، ۴ گرم عصارهٔ مالت، ۴ گرم دکستروز و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) ۲۵۰ میلی‌لیتری محتوی محیط مایع سترون با اسپورهای کشت جوان قارچ، که روی محیط جامد تشکیل شده است، مایه‌زنی شدند. سپس ارلن‌مایرها به شیکر انکوباتور انتقال داده شده و به مدت ۴ تا ۷ روز در دمای ۲۰ تا ۲۵ سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به کمک لام گلبول شمار، شمارش شده و به تعداد $۱۰^{۷}$ میلی‌لیتر تنظیم شد.

ارقام گندم

ارقام گندمی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت شامل دو رقم حساس اترک و کویر، و دو رقم مقاوم دریا و زاگرس بودند. در سال ۱۳۹۲ مطالعه‌ای به‌وسیلهٔ اصلاحی انجام شد، در این مطالعه واکنش ارقام مختلف در شرایط مزرعه و گلخانه به قارچ بیمارگر *M. graminicola* انجام گرفت. بر اساس نتایج کار اصلاحی و همکاران ارقام اترک و کویر حساس، و ارقام دریا و زاگرس مقاوم تشخیص داده شدند (اصلاحی، ۱۳۹۲).

آزمایش بیماریزایی جدایه‌ها

آزمون بیماریزایی جدایه‌های بیمارگر با استفاده از دو جدایهٔ S_1 و K_8 از قارچ *M. graminicola* انجام پذیرفت. این دو جدایه از آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت‌مدرس دریافت شدند. آزمایش بیماریزایی جدایه‌ها با پاشش سوسپانسیون اسپورهر جدایه با غلظت $۱۰^{۷}$ روی گیاهچه‌های مرحلهٔ دو برگی (۱۲ روزه) دو رقم حساس کویر و اترک انجام شد. ارزیابی شدت بیماری ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی، بر روی برگ اول گیاهچه‌ها انجام گرفت و به این منظور، درصد پوشش پیکنیدیومی برگ اول یادداشت برداری شد (Kema *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1999; Chartrain *et al.*, 2004). این آزمایش به صورت آزمون فاکتوریل با دو فاکتور A و B در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. فاکتور A دارای دو سطح (شامل دو جدایه بیمارگر) و فاکتور B نیز دارای ۲ سطح (شامل دو رقم) بود.

کشت بذورگندم درگلخانه جهت آزمون تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روی علایم بیماری

ارقام حساس شامل رقم کویر و اترک و ارقام مقاوم شامل دریا و زاگرس هستند. برای خاک گلدان‌ها پرلیت، خاک و خاکبرگ سترون استفاده شد که با نسبت ۱:۱:۱ مخلوط و در گلدان‌های کوچک ۵۰۰ گرمی ریخته شدند. بعد از آماده‌سازی خاک گلدان‌ها، بذور را در داخل ظرف محتوی الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه ریخته و سپس الکل را تخلیه و دوبار با آب مقطرسترون، بذرها شسته شدند. بعد از ضدعفونی سطحی، سه بذر در داخل هرگلدان قرار داده شد و روی بذرها به ضخامت یک سانتی‌متر از همان خاک ریخته شد.

ارزیابی بیماری در تقابل با اسیدسالیسیلیک بر روی گیاه

به منظور ارزیابی واکنش چهار رقم تجاری گندم نسبت به سپتوریوز برگی در شرایط گلخانه‌ای از فیتوترون دانشکده کشاورزی تربیت‌مدرس استفاده شد. زمانی‌که گیاهچه‌ها به مرحلهٔ دوبرگی (۱۲روزه‌گی) رسیدند، محلول اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های صفر (بدون اسیدسالیسیلیک) ۰/۵، ۱، ۲ ، ۳ و ۴ میلی‌مولار تهیه گردید. pH این محلول در حد ۶/۵ تنظیم شد.

ابتدا این غلظت‌ها از اسیدسالیسیلیک بر روی گیاهان در مرحلهٔ دو برگی با آب فشان دستی اسپری شدند و سپس ۲۴ ساعت بعد سوسپانسیون قارچ بیمارگر از جدایه بیماری‌زاتر S_1 بر روی این گیاهان اسپری گردیدند.

برای تهیهٔ سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر یک قطره توئین۲۰ درصد به سوسپانسیون اسپور، که با لام گلبول شمار غلظت آن در حد 10^7 اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شده بود، اضافه گردید و مایه‌زنی مانند آزمون قبل با استفاده ازآب‌فشان دستی انجام شد. پس از مایه‌زنی، گلدان‌های حاوی گیاهچه‌ها به مدت۹۶ ساعت با کیسه‌های پلاستیکی شفاف پوشانیده شد و کیسه‌ها با آب‌فشان دستی مرطوب، و در ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داشته شد. دمای گلخانه در روز در حدود ۲۰ تا ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در شب به طور میانگین ۱۸ درج سانتی‌گراد بود. بعد از این مدت، کیسه‌ها از سطح گلدان‌ها برداشته شدند و آبیاری این گیاهان یک روز در میان انجام شد.

تیمارها در این آزمون از گیاهانی که فقط با آب مقطر سترون به عنوان شاهد، گیاهانی که فقط با اسید سالیسیلیک (غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌مولار)، گیاهانی که فقط با قارچ بیمارگر و گیاهانی که توأماً با قارچ بیمارگر و اسیدسالیسیلیک مایه زنی شده بودند، تشکیل شده بود. ارزیابی شدت بیماری ۲۱ روز بعد از مایه زنی، بر روی برگ اول گیاهچه‌ها انجام گرفت و به این منظور، درصد پوشش پیکنیدیومی برگ اول یادداشت برداری شد (Kema *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1999; Chartrain *et al.*, 2004). این آزمایش به صورت آزمون فاکتوریل با دو فاکتور A و B در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. فاکتور A دارای چهار سطح (شامل چهار رقم) و فاکتور B نیز دارای ۵ سطح (شامل ۵ سطح غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک) بود.

آزمون تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روی علایم بیماری به صورت تیمار خیساندن بذر

بذور ارقام حساس کویر و اترک و همین طور ارقام مقاوم زاگرس و دریا بعد از ضد عفونی، در غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار از اسیدسالیسیلیک به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. بعد از ۲۴ ساعت این بذور در شرایط آزمون قبلی کشت شدند و درست زمانی که به مرحلهٔ دو برگی رسیدند به وسیلهٔ سوسپانسیون اسپور بیمارگر مانند آزمون‌های قبلی اسپورپاشی شدند.

نرم افزار آماری

داده‌های حاصل از این آزمون‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS 9.0 مورد ارزیابی قرار گرفت و میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ارزیابی شدند.

نتایج

بررسی بیماریزایی جدایه

علائم بیماری بر روی هر دو رقم حساس اترک و کویر ۱۲ روز بعد از مایه‌زنی مشاهده گردید. علایم بیماری حدود ۱۲-۱۰ روز پس از مایه زنی به صورت لکه‌های کلروز روی سطح برگ مشاهده شدند. سپس این لکه‌ها به تدریج نکروز شده و گسترش یافتند به صورتیکه ۳ تا ۵ روز بعد از ظهور علایم بیماری، پیکنیدیوم‌های قارچ عامل بیماری به‌صورت نقاط سیاهرنگ در دو سطح برگ بر روی لکه‌های نکروز وگاهی کلروز تشکیل شدند. سپس قارچ عامل بیماری مجدداً از برگ‌های آلوده جداسازی شد. تجزیه واریانس بیماری زایی جدایه‌ها در سطح یک درصد، در مورد دو رقم حساس اترک و کویر تفاوت معنی-داری نشان دادند. تجزیه واریانس صفت مورد بررسی در شرایط گلخانه (مرحله گیاهچه‌ای) نشان داد که دو جدایه از نظر درصد سطح نکروز برگ و پوشش پیکنیدیومی در سطح احتمال ۱٪ با هم اختلاف معنی دار داشتند که بیانگر تفاوت در پرآزاری (Virulence) این دو جدایه است (جدول ۱). مقایسه میانگین سطح نکروز برگ در جدایه‌های مورد بررسی، آنها را در گروه‌های مختلف قرار داد. بر اساس جدول ۲ بیش‌ترین شدت بیماریزایی مربوط به جدایه S_1، با شدت بیماری‌زایی ۷۸/۵ و بر روی رقم اترک بود.

جدول۱- تجزیه واریانس درصد سطح نکروز برگ و پوشش پیکنید در ژنوتیپ های گندم درگلخانه

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
جدایه قارچ (فاکتور A)	۱	۴۰۶/۶۴	۴۰۶/۶۴	۱۵/۵۸**
ارقام(فاکتور B)	۱	۱۲/۴	۱۲/۴	۰/۴۸**
رقم× جدایه (فاکتور A×B)	۱	۸	۸	۰/۳۱^{ns}
خطای آزمایش	۸	۲۰۸/۴۲	۲۶/۰۵	
کل	۱۱	۶۳۴/۸۳		

** به احتمال ۹۹/۹۹ درصد ($P\leq0.01$) اختلاف معنی دار است

n.s اختلاف معنی دار وجود ندارد.

C.V= ٪ ۶/۶

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد شدت بیماری ناشی از دو جدایه S1 و K8 قارچ *Zymoseptoria tritici* بر روی ارقام حساس گندم

رقم	درصد پوشش پیکنیدیومی سطح برگ اول		درصد پوشش پیکنیدیومی سطح برگ اول	
	S1	K8	S1	K8
کویر	A۷۵ a	B۶۵a	A۳۲a	B۲۴a
اترک	A ۷۸/۵a	B۶۵/۴a	A۳۳a	B۲۴a

هر عدد میانگین سه تکرار است. میانگین‌هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف کوچک مشخص شده اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P\leq0.01$) ارائه شده اند.

ارزیابی بیماری در تقابل با اسیدسالیسیلیک بر روی گیاه

در این آزمون علایم بیماری برروی دو رقم حساس ۳ تا ۴ روز زودتر از ارقام مقاوم بعد از مایه‌زنی با قارچ بیمارگر مشاهده شد. علایم بیماری ابتدا به‌صورت لکه‌های زرد رنگ در روی برگ‌ها ظاهرگردید. میزان آلودگی در رقم حساس اترک ۲۱ روز پس از مایه زنی به حداکثر میزان خود رسید و به همین دلیل یادداشت برداری در این روز انجام گرفت. در این آزمون‌ها به علت اینکه تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر روی علایم و شدت بیماری در ارقام مختلف صورت گرفته است در نتیجه در جدول زیر مقایسه میانگین‌هایی شامل، سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک در یک رقم، واکنش رقم‌های مختلف در یک سطح اسیدسالیسیلیک مورد بررسی قرار گرفتند.

همانطوری که جدول۳ نشان می‌دهد به احتمال ۹۹ درصد بین اثر سطوح ارقام واثر اسیدسالیسیلیک بر روی علایم بیماری اختلاف معنی دار وجود دارد، ولی بین اثرات متقابل کنترل کنندگی سطوح اسیدسالیسیلیک و ارقام اختلاف معنی دار وجود ندارد. در این آزمون، رقم زاگرس در سطح ۴ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک با ۴۱/۰۶ درصد کمترین شدت بیماری و رقم اترک در سطح ۰/۵ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک با ۸۱/۶۳ درصد بیش‌ترین شدت بیماری را نشان دادند (جدول ۴).

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود در سطح صفر اسیدسالیسیلیک بین ارقام حساس اترک و کویر و همینطور بین ارقام مقاوم از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود ندارد، اما بین این ارقام حساس (اترک و کویر) و ارقام مقاوم (دریا و زاگرس) تفاوت معنی دار وجود دارد، و این موضوع نشان دهندهٔ فعال شدن زود هنگام ژن‌های دفاعی در این دو رقم مقاوم زاگرس و دریا است، و به صورت ضمنی مقاوم بودن این دو رقم را اثبات می‌کند، زیرا در این سطح هیچ اسیدسالیسیلیکی وجود نداشته و القایی از طرف این مادهٔ محرک صورت نگرفته است.

در سطح ۰/۵ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک، نیز دقیقاً روند قبلی (سطح صفر میلی‌مولار) دیده می‌شود، ولی با این تفاوت که مقدار عددی شدت بیماری در این سطح از غلظت اسیدسالیسیلیک نسبت به سطح صفر در دو رقم مقاوم کاهش پیدا کرده است ولی از نظر آماری این کاهش در دو رقم مقاوم بین این دو سطح معنی‌دار نیست.

در سطح یک میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک، نسبت به سطح ۰/۵ میلی‌مولار، روند شدت بیماری تغییر پیدا کرد. در این سطح بین دو رقم حساس از نظر شدت بیماری اختلاف معنی دار وجود دارد و مانند دو سطح قبلی بیش‌ترین شدت بیماری در رقم حساس اترک با شدت بیماری ۷۹/۲۳ بود و اختلاف معنی‌دار با رقم حساس کویر داشت و این موضوع نشان می‌دهد که غلظت‌های بالاتر اسیدسالیسیلیک قادر به القای ژنهای دفاعی حتی در ارقام حساس نیز هست. دو رقم مقاوم مانند دو سطح قبلی اسیدسالیسیلیک اختلاف معنی‌دار با ارقام حساس در این سطح داشتند، ولی بین خود دو رقم مقاوم اختلافی معنی‌داری نبود. از طرف دیگر بین سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک در سه رقم اترک، کویر و دریا تا اینجا اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی در رقم زاگرس بین سطح صفر و یک میلی‌مولار اختلاف معنی‌دار وجود دارد و این موضوع به این معنی است که غلظت یک میلی‌مولار توانسته ژنهای دفاعی را نسبت به غلظت صفر میلی‌مولار در رقم زاگرس بیان کند و باعث کم شدن شدت بیماری در این غلظت شود.

در غلظت ۲ میلی‌مولار از نظر اختلاف بین شدت بیماری بین ارقام مختلف دقیقاً همان روند قبلی تکرار شد؛ از نظر اختلاف معنی‌دار بین سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک در هر رقم، اگرچه شدت بیماری در این غلظت در ارقام اترک، کویر و دریا از نظر عددی نسبت به سطوح قبلی کاهش پیدا کرد ولی این مقدار به غیر از سطح صفر میلی‌مولار اسید سالیسیلیک اختلاف معنی‌داری با بقیه سطوح نداشت. در رقم مقاوم زاگرس بین سطح ۲ میلی مولار و سطوح پایین تر یعنی یک، نیم و صفر میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک اختلاف معنی دار وجود داشت.

در غلظت ۴ میلی‌مولار از نظر اختلاف بین شدت بیماری بین ارقام مختلف نیز همان روند قبلی تکرار شد؛ از نظر اختلاف معنی‌دار بین سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک در هر رقم، شدت بیماری در غلظت ۴ میلی‌مولار در همهٔ ارقام به غیر از رقم اترک از نظر عددی نسبت به سطح قبلی کاهش پیدا کرد، و این مقدار در همهٔ ارقام در غلظت ۴ میلی‌مولار، به غیر از سطح ۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک، با بقیهٔ سطوح اختلاف معنی‌دار داشت این موضوع نشان می‌دهد که کاربرد غلظت ۴ میلی‌مولار اگر چه بیماری شدت بیماری را در رقم حساس کویر و ارقام مقاوم دریا و زاگرس کاهش می‌دهد ولی این مقدار کاهش در شدت بیماری نسبت به سطح ۲ درصد معنی دار نیست.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک بر روی ارقام مختلف گندم

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
رقم (فاکتور A)	۳	۵۶۲۶/۹۳	۱۸۷۵/۶۴	۸۷/۰۵ **
سطوح اسیدسالیسیلیک (فاکتور B)	۴	۱۸۲۱/۳۴	۴۵۵/۳۳	۲۱/۱۳ **
رقم× سطوح اسیدسالیسیلیک (فاکتور A×B)	۱۲	۴۶۲/۰۷	۳۸/۵	۱/۷۹ ns
خطای آزمایش	۴۰	۸۶۱/۸۵	۲۱/۵۴	
کل	۵۹	۶۴/۹۰		

** به احتمال ۹۹/۹۹ درصد ($P\leq0.01$) اختلاف معنی دار است

n.s اختلاف معنی دار وجود ندارد.

C.V= ٪ ۷/۰۲

جدول ۴- مقایسه میانگین درصد تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر روی شدت بیماری بر روی برگ ارقام مختلف گندم ناشی از قارچ *Zymoseptoria tritici*

غلظت / رقم	۰mM	۰/۵mM	۱mM	۲mM	۴mM
اترک	A ۸۰/۱۶a	A۸۱/۶۳a	A۷۹/۲۳a	A۷۶a	A۷۷/۱۶a
کویر	A۷۸/۱۹ a	AB۷۷a	AB۷۲/۲b	BC۶۹b	C۶۳/۰۶b
دریا	A۶۵/۴۳b	AB۶۱b	AB۶۲c	BC۵۴/۲۶c	C۴۹/۱۶c
زاگرس	A۶۶/۴۳ b	AB۶۲/۲b	B۵۸/۴c	C۴۸/۴c	C۴۱/۰۶c

- هر عدد میانگین سه تکرار است. میانگین‌هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف کوچک و میانگین‌هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف بزرگ مشخص شده اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P\leq0.01$) ارائه شده اند.
- اعداد درصد پوشش پیکنیدیومی سطح برگ اول هستند.

آزمون تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روی علایم بیماری به صورت تیمار خیساندن بذر (Seed treatment)

هدف از این آزمون در مرحلهٔ اول بررسی تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روی القای مکانیسم‌های دفاعی در بذر است و در مرحلهٔ بعدی رسیدن به غلظت احتمالی است که اسیدسالیسیلیک می‌تواند اثر کنترلی بر روی شدت بیماری بدون اینکه تأثیر بر روی جوانه زنی بذر داشته باشد، است. نتایج حاصل از تیمار بذور گندم با اسیدسالیسیلیک به صورت جدول زیر بود.

جدول ۵- مقایسه میانگین درصد تأثیر سطوح مختلف اسیدسالیسیلیک بر روی شدت بیماری بر روی بذور ارقام مختلف گندم ناشی از قارچ *Zymoseptoria tritici*

غلظت / رقم	۰mM	۰/۵ mM	۱ mM	۲ mM
اترک	A۸۲/۶۵a	A۷۸/۳۳a	A۷۷/۷۸a	A۷۵a
کویر	A۸۰/۸۷a	AB۷۹/۱۲a	AB۷۸b	C۷۲b
دریا	A۶۸/۱۲b	AB۶۳/۵۶b	B۵۹c	BC۶۰/۲۷c
زاگرس	A۶۴/۱۵c	AB۵۸/۳۲bc	B۵۲/۳۲c	C۴۵/۱۲d

- هر عدد میانگین سه تکرار است. میانگین‌هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف کوچک و میانگین‌هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف بزرگ مشخص شده اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P\leq0.01$) ارائه شده اند.
- اعداد درصد پوشش پیکنیدیومی سطح برگ اول هستند.

در اینجا در سطح غلظت صفر اسیدسالیسیلیک ارقام مقاوم شدت بیماری کمتری را نسبت به ارقام حساس نشان دادند که این امر منطقی است. در تیمار بذور گندم با سطح ۰/۵میلی مولار اسیدسالیسیلیک، همانطوری‌که جدول ۵ نشان می‌دهد این تیمار بر روی بذور تأثیر گذاشته و باعث کاهش شدت بیماری در ارقام مقاوم و حتی حساس شده است، و مقدار عددی شدت بیماری در این سطح در دو رقم حساس کمتر از سطح غلظت صفر و یک اسیدسالیسیلیک است و این تفاوت برای دو رقم مقاوم در این سطح نسبت به سطح صفرمعنی دار بود.

در تیمار بذور گندم با سطح ۱میلی مولار اسیدسالیسیلیک، همانطوری‌که جدول ۵ نشان می‌دهد این تیمار بر روی بذور تأثیر گذاشته و باعث کاهش شدت بیماری در ارقام مقاوم و حساس شده است، و مقدار عددی شدت بیماری در این سطح در دو رقم حساس کمتر از سطح غلظت صفر و ۰/۵ اسیدسالیسیلیک است و این تفاوت برای دو رقم مقاوم در این سطح نسبت به سطح صفرمعنی دار است.

در تیمار بذور گندم با سطح ۲ میلی مولار اسیدسالیسیلیک، همانطوری‌که جدول ۵ نشان می‌دهد این تیمار بر روی بذور تأثیر گذاشته و باعث کاهش شدت بیماری در ارقام مقاوم و حساس شده است، و مقدار عددی شدت بیماری در این سطح در رقم حساس اترک کمتر از همهٔ سطوح غلظت اسیدسالیسیلیک، و این مقدار در مورد رقم حساس کویر و رقم مقاوم زاگرس

نسبت به تمام سطوح اسیدسالیسیلیک دارای تفاوت معنی‌داری بود و کمترین مقدار را داشت، ولی در مورد رقم مقاوم دریا شدت بیماری نسبت به سطح ۱ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک مقداری افزایش پیدا کرد، که این افزایش معنی‌دار نبود.
لازم به ذکر است که در غلظت ۲ میلی‌مولار از اسید سالیسیلیک نزدیک به ۵۰ درصد از بذور در هر رقم موفق به جوانه زنی نشدند، ولی بذور که جوانه زدند در مورد دو رقم مقاوم زاگرس و حساس کویر شدت بیماری نسبت به سایر غلظت‌های به کارگرفته شدهٔ اسیدسالیسیلیک کاهش معنی داری پیدا کردند.

بحث

گیاهان در زمان آلودگی به‌وسیلهٔ بیمارگرها با تغییر واکنش‌های بیوشیمیایی که در مجموع پاسخ‌های دفاعی نامیده می‌شوند، به این آلودگی پاسخ می‌دهند. گیاهان در برابر بیمارگرها، با تولید موادی از قبیل فیتوالکسین‌ها، پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی، ترکیبات فنلی اکسیده و آنزیم‌های مرتبط با این ترکیبات دفاع می‌نمایند (Bera and Purkayastha., 1999).
بر اساس نتایج *آتی تالا و همکاران* در سال ۲۰۰۱حضور یا عدم وجود ژن های مقاومت عامل تعیین کننده درمقاومت حاصله نسبت به عوامل بیماریزا نیست، بلکه سرعت و مقدار بیان این ژن‌ها و میزان تأثیر این ترکیب بر روی بیمارگر هدف است که سبب واکنش سازگاری یا ناسازگاری می‌شود (Attitalla, 2004).
ژن‌های مرتبط با مقاومت و واکنش‌های دفاعی گیاهان به طور معمول بیان نمی‌شوند مگر اینکه یک القا کننده مقاومت آنها را فعال کرده و یا بیان آنها را افزایش دهد و یا تغییراتی که در متابولیسم گیاه ایجاد می‌کند، اثرات این ژن‌ها را افزایش دهد. در این تحقیق از ترکیب شیمیایی اسیدسالیسیلیک به عنوان عامل القا کننده مقاومت در گیاه گندم علیه سپتوریا استفاده شد. تیمارهای مختلف جهت معرفی بهترین تیمار اعمال شد.

در آزمون ارزیابی بیماری در تقابل با اسیدسالیسیلیک، اثر غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک بر شدت بیماری به دو روش پاشش بر روی برگ‌های گیاه دو برگی و تیمار بذر قبل از کشت، بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت ۲ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک موجب کاهش معنی دار شدت بیماری در مقایسه با شاهد و غلظت‌های یک و ۰/۵ شد. البته میزان عددی شدت بیماری در غلظت ۴ کمتر از غلظت ۲ در همهٔ ارقام بود، ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. این کاهش شدت بیماری در غلظت‌های بالاتر اسیدسالیسیلیک را می‌توان به القا ژن‌های دفاعی گیاه گندم به وسیلهٔ این ماده نسبت داد. البته این القا در ارقام حساس گیاه گندم هم صورت می‌گیرد ولی در ارقام مقاوم این القا با سرعت بیش‌تری و در مراحل ابتدایی بیماری صورت می‌گیرد، در نتیجه بیان شدن ژن‌های دفاعی ژن‌هایی که از نفوذ و توسعه عامل بیماری به بقیه قسمت‌های گیاه جلوگیری می‌کنند و هم‌چنین میزان بعضی آنزیم‌ها مانند کیتیناز، پراکسیداز، کاتالاز و ترکیبات فنلی در گیاه افزایش می‌یابد و باعث ایجاد مقاومت در گیاه می‌گردند. در پاتوسیستم‌های دیگری هم تأثیر اسید سالسیلیک مورد ارزیابی قرار گرفته است به طور مثال میزان فنل کل درگوجه فرنگی زمانیکه گیاه با اسیدسالیسیلیک تیمار شود افزایش پیدا می‌کند و این افزایش موجب ایجاد مقاومت القایی بر علیه باکتری بیمارگر *Xanthomonas vasicatoria* می‌شود (Cavalcanti *et al*., 2006). تجمع لکتین‌ها در گندم نیز به اسیدسالیسیلیک نسبت داده می‌شود که تجمع این مواد خواص دور کنندهٔ آفات و خاصیت ضدقارچی دارد (Shakirova and Bezrukova, 1997). کاربرد خارجی اسیدسالیسیلیک سبب ایجاد تحمل به گرما، سرمازدگی و تنش شوری در دولپه‌ای‌ها (Janda *et al*., 2007) و نیز مقاومت غده‌های سیب‌زمینی به قارچ *Rhizoctonia solani* می‌گردد (Borsani *et al*., 2007). هم‌چنین در ذرت اسیدسالیسیلیک سبب تغییراتی در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در زمان حملهٔ بیمارگر می‌شود. به‌طورکلی اسیدسالیسیلیک اثرات کلیدی درگیاهان از جمله تأثیر در جذب عناصر غذائی، پایداری غشا، روابط آبی (Glass, 1975)، عملکرد روزنه‌ها (Aldesuquy *et al*., 1998)، بازدارندگی سنتز اتیلن و افزایش رشد دارد (Srivastava and Dwivedi, 2000).

در این مطالعه از ۵ سطح اسیدسالیسیلیک استفاده شد بر اساس جدول ۴ بهترین غلظت پیشنهادی غلظت ۲ میلی‌مولار است، زیرا غلظت‌های بالاتر از این غلظت در بعضی از گیاهان باعث گیاهسوزی می‌شوند و از طرفی دیگر تأثیر معنی‌داری در کنترل بیماری ندارند.

در تیمار بذور گندم با استفاده از غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک، بر اساس جدول ۵ بهترین کنترل کنندگی را سطح ۲ میلی‌مولار از اسیدسالیسیلیک داشت، اما این سطح از اسید سالیسیلیک باعث می‌شد که نزدیک به ۵۰٪ بذور از هر تیمار جوانه نزنند. این یافته‌ها با نتایج کار *راجاسکاران و همکاران* در سال ۲۰۰۲ مطابقت دارد (Rajasekaran *et al*., 2002). تحقیق آنها مربوط به افزایش درصد جوانه زنی در تیمار با اسیدسالیسیلیک بود که تیمارهای بالاتر از ۱ میلی-مولار درصد جوانه زنی را کاهش می‌داد. این نکته نشان می‌دهد که بهترین غلظت اسیدسالیسیلیک که می‌توان آن را در تیمار به کار برد غلظت ۱ میلی‌مولار است. نتایج حاصل از تحقیقی که به وسیلهٔ Wisniewska و Chetkowski در سال ۱۹۹۹ انجام شد برهمکنش غیر اختصاصی اسیدسالیسیلیک را در نهال‌های جو، وقتی بذور با اسیدسالیسیلیک تیمار شدند، نشان داد که بعد از تیمار اسیدسالیسیلیک کاهش خسارت قابل توجهی در ریشه و برگ گیاه جو در پاسخ به آلودگی با قارچ فوزاریوم مشاهده شد. می‌توان این طور نتیجه گرفت که اسیدسالیسیلیک باعث فعال شدن پاسخ‌های دفاعی گیاه جو به آلودگی با فوزاریوم می‌شود، این نوع القای پاسخ در یک روش مشابه در سایر گونه‌های گیاهی و بیمارگر مشاهده شده است (Wisniewska and Chetkowski, 1999).

References

1. Aldesuquy HS, Mankarios AT and Awad HA. 1998. Effect of some antitranspirants on growth, metabolism and productivity of saline treated wheat plants. Induction of stomatal closure, inhibition of transpiration and improvement of leaf turgidity. Acta Botanica Hungarica 41:1–10.
2. Arraiano LS, Chartrain L, Bossoini E, Slatter HN, Keller B and Brown JKM. 2007. A gene in European wheat cultivars for resistance to an African isolate of *Mycosphaerella graminicola*. Plant Pathology 56: 73–78.
3. Attitalla IH. 2004. Biological and molecular characteristics of microorganism stimulated defense response in *Lycopersicone sculentum* L. [PhD]. [Uppsala]: Acta Universitatis Upsaliensis, Sweden.
4. Bera S and Purkayastha RP. 1999. Multicomponent coordinated defence response of rice to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight. Current Science 76: 1376–1384.
5. Bohnert HJ, Nelson DE and Jensen RG. 1995. Adaptation to environmental stresses. Plant Cell 7: 1099–1111.
6. Borsani O, Valpuesta V and Botella MA. 2007. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiology 126:1024–1030.
7. Brown JKM, Kema GHJ, Forrer HR, Verstappen ECP, Arraiano LS, Brading PA, Foster EM, Hecker A and Jenny E. 1999. Field resistance of wheat to *Septoria tritici* leaf blotch and interactions with *Mycosphaerella graminicola* isolates. pp. 148–149, *In* M Van Ginkel, A McNab and J Krupinsky (eds.), *Septoria* and *Stagonospora* Diseases of Cereals. A Compilation of Global Research. Mexico: CIMMYT Publication.
8. Cavalcanti CV, Ferreira M, Carvalho MC, Veras ASC, Lima LE and Silva FM. 2006. Forage cactus (*Opuntiaficus indica* Mill) and urea in replacement of tifton hay (*Cynodon* spp.) in lactating Holstein cows diet. 1. Digestibility. Acta Scientiarum - Animal Sciences 28: 145–152.
9. Chartrain L, Berry ST and Brown JKM. 2004: Resistance of wheat line Kavkaz-K4500 L.6.A.4 to *Septoria tritici* blotch controlled by isolate-specific resistance genes. Phytopathology 95: 664–671.
10. Dadrezaei ST, Minasian V, Torabi M and LotfaliAeineh G. 2003. Effect of *Septoria tritici* infections at different growth stages on yield and yield components of three wheat cultivars. Seed and Plant 19: 101–116 (in Persian).
11. Eslahi MR. 2013. Study on defense related genes expression of wheat in response to *Mycosphaerella graminicola* using cDNA- AFLP [PhD]. [Tehran (Iran)]: Tarbiat Modares University.
12. Gilchrist L, Gomez B, Gonzalez R, Fuentes S, Mujeeb-Kazi A, Pfeiffer W, Rajaram S, Rodriguez R, Skovmand B, van Ginkel M and Valezquez C. 1999. *Septoria tritici* resistance sources and breeding progress at CIMMYT, 1970-99. pp. 134–139, *In* M. Van Ginkel, A McNab and J Krupinsky (eds.), *Septoria* and *Stagonospora* Diseases of Cereals. A Compilation of Global Research. Mexico: CIMMYT Publication.
13. Glass ADM. 1975. Inhibition of phosphate uptake in barley roots by hydroxy-benzoic acids. Phytochemistry 14:2127–2130.
14. Goodwin SB, McDonald BA and Kema GHJ. 2003. The *Mycosphaerella* sequencing initiative. pp. 149–151. *In* GHJ Kema, M van Ginkel and M Harrabi, M. (eds.), Global Insights into the *Septoria* and *Stagonospora* Diseases of Cereals: Proceedings of the Sixth International Symposium on *Septoria* and *Stagonospora* Diseases of Cereals, Tunis, Tunisia.
15. Heninig W. 1996. Conventional protein coding genes in the *Drosophila* Y chromosome: is the puzzle of the fertility gene function solved? Proceeding of the National Academy of Science USA (PNAS) 90: 10904–10906.
16. Janda T, Szalai G, Tari I and Paldi E. 2007. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. Planta 208:175–180.

17. Kawano T, Furuichi T and Shoshi Muto L. 2004. Controlled Salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants. Plant Biotechnology 21:319 – 335.
18. Kema GHJ, Yu DZ, Rijkenberg FHJ, Shaw MW and Baayen RP. 1996. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Phytopathology 86:777–786.
19. Malamy J, Carr JP, Klessing DF and Raskin I. 1992. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science 250: 1002 – 1004
20. Quaedvlieg W, Kema GHJ, Groenewald JZ, Verkley GJM, Seifbarghi S, Razavi M, Gohari AM and Mehrabi R. 2011. *Zymoseptoria* gen. Nov.: A new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 26: 57–69.
21. Rajasekaran LR, Stiles A and Caldwell CD. 2002. Stand establishment in processing carrots: Effects of various temperature regimes on germination and the role of salicylates in promoting germination at low temperatures. Canadian Journal Plant Science, 82: 443–450.
22. Redman R, Freeman S, Clifton DR, Morrel J, Brown G and Rutsy J. 1994. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna* . Plant Physiology 119: 795–804.
23. Raskin I. 1992. Role of salicylic acid in plants. Annual Review Plant Physiology-Plant Molecular Biology 43: 439–463.
24. Rasmussen JB, Hammerschmidt R and Zook MN. 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. Plant Physiology 97: 1342–1347.
25. Shakirova FM and Bezrukova MV. 1997. Induction of wheat resistance against environmental salinization by salicylic acid. Biology Bulletin 24: 109–112.
26. Srivastava MK and Dwivedi UN. 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. Plant Science 158: 87–96.
27. Torabi M and Nazari K. 1998. Seedling and adult plant resistance to yellow rust in Iranian bread wheat. Euphytica 100: 51–54.
28. Wisniewska H and Chetkowski J. 1999. Influence of exogenic salicylic acid on *Fusarium* seedling blight reduction in barley. Acta Physiologia Plantarum 21: 63–66.