استحثاث المقاومة المكتسبة الجهازية في نبات البندورة/الطماطم إزاء مرض اللفحة المبكرة المتسبب عن الفطر *Alternaria solani* Sorauer (Ellis & Martin) باستخدام حمض الساليسيليك

أحمد عبد الله أبو السل[1]، جودة توفيق فضول[2] وعبد النبي محمد بشير[1،2]

(1) مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: ahmadabualsel@gmail.com

(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية

الملخص

أبو السل، أحمد عبد الله، جودة توفيق فضول وعبد النبي محمد بشير. 2020. استحثاث المقاومة المكتسبة الجهازية في نبات البندورة/الطماطم إزاء مرض اللفحة المبكرة المتسبب عن الفطر *Alternaria solani* Sorauer (Ellis & Martin) باستخدام حمض الساليسيليك. مجلة وقاية النبات العربية، 38(3): 232–240.

يُعد مرض اللفحة المبكرة المتسبب عن الفطر *Alternaria solani* Sorauer (Ellis & Martin) أحد الأمراض الفطرية المهمة التي تصيب نبات البندورة/الطماطم مسبباً خسائر كبيرة في الانتاج كماً ونوعاً. نُفذ البحث في مختبرات مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق لدراسة دور حمض الساليسيليك في تحفيز نبات البندورة لمقاومة مرض اللفحة المبكرة. درس تأثير حمض الساليسيليك مختبرياً في تثبيط نمو هيفات الفطر الممرض على المستنبت المغذي أكار دكستروز مستخلص البطاطا PDA بثلاثة تراكيز 0.5، 1.0 و1.5 ميكرومول في الليتر، بينما اختبر حقلياً من خلال رش نباتات البندورة بحمض الساليسيليك تركيز 1.5 ميكرومول قبل رش هذه النباتات بمعلق بوغي من الأبواغ الكونيدية للفطر الممرض بتركيز 5×10^6 بوغاً كونيدياً/مل. أظهرت النتائج المختبرية كفاءة عالية لحمض الساليسيليك في تثبيط هيفات الفطر وصلت إلى 100% عند استخدام التركيز 1.5%، أما حقلياً فقد أظهرت النتائج انخفاضاً واضحاً في شدة الإصابة على أوراق وثمار النباتات المعاملة بالمعلق البوغي وحمض الساليسيليك مقارنة بالنباتات المعاملة بالمعلق البوغي فقط. لوحظ بعد 7 أيام من المعاملة أن شدة الإصابة على الأوراق بالنسبة لمعاملة حمض الساليسيليك على الصنف شروق بلغت 4.89%، بينما ارتفعت شدة الإصابة إلى 13.44% للصنف نفسه عند معاملة النباتات بالمعلق البوغي، بينما سُجلت أعلى شدة للإصابة على الصنف بلد بنسبة قدرها 24.01%، وانخفضت إلى 10.34% عند المعاملة بحمض الساليسيليك. بالنسبة للثمار كانت شدة الإصابة الأعلى أيضاً لدى الصنف بلد بنسبة قدرها 4.17% وانخفضت إلى 1.58% عند المعاملة بحمض الساليسيليك. وبعد 28 يوماً أظهرت النتائج ارتفاعاً في شدة الإصابة لكلتا المعاملتين مع وجود انخفاض واضح في معاملة حمض الساليسيليك بالنسبة للأوراق والثمار ولجميع الأصناف مقارنة بالمعاملة بالمعلق البوغي، وهذا يشير إلى أن هناك عاملاً أستحث في نباتات البندورة عند رشها بحمض الساليسيليك قد خفّض من شدة الإصابة. ولغرض التحري عن السبب قمنا باستخلاص البروتينات من نباتات البندورة المعاملة بحمض الساليسيليك ومن النباتات غير المعاملة للمقارنة ورحلت كهربائياً على هلام متعدد الأكريلاميد. أظهرت النتائج ظهور تضخم بالحزم البروتينية وظهور حزم بروتينية جديدة في النباتات المرشوشة بالحمض في حين لم تظهر هذه الحزم في عينات نباتات البندورة غير المعاملة بالحمض، وبالتالي تعد هذه البروتينات المستحثة في نباتات البندورة مسؤولة بصورة مباشرة عن استحثاث مقاومة مكتسبة جهازية (SAR) في نباتات البندورة وتحفيز مورثات المقاومة R- genes لإنتاج بروتينات ذات علاقة بالإمراضية (RP) لمقاومة الفطر.

كلمات مفتاحية: بندورة، اللفحة المبكرة، *Alternaria solani*، حمض الساليسيليك، بروتينات ذات علاقة بالإمراضية.

المقدمة

يُعدّ محصول البندورة/الطماطم (Mill) *Lycopersicon esculentum* من محاصيل الخضر المهمة في العالم نظراً لقيمته الغذائية العالية واستخداماته المختلفة حيث يزرع عالمياً بظروف الزراعة المكشوفة والمحمية. تصاب البندورة بالعديد من المسببات المرضية التي تؤثر في الانتاج كماً ونوعاً وبخاصة الفطرية منها مثل مرض اللفحة المبكرة المتسبب عن الفطر *Alternaria solani* Sorauer (Ellis & Martin) (Balanchard, 1992). تتعرض النباتات لتغيرات كثيرة تتراوح ما بين الإجهادات البيئية (الجفاف، تقلبات درجة الحرارة ... الخ)، وغزو الحشرات والمسببات المرضية المختلفة للأنسجة النباتية (War *et al*., 2011)، مما دفع النباتات لتطوير استراتيجيات معقدة لمواجهتها ومقاومتها بطرائق فيزيائية وكيميائية مختلفة. يتم تنظيم هذه العملية بوساطة مجموعة واسعة من جزيئات الاشارة ومنظمات النسخ (Ragiba *et al*., 2012 ؛Benhamou & Bélanger, 1998)،

https://doi.org/10.22268/AJPP-38.3.232240
© 2020 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

بالإضافة إلى التغيرات المورفولوجية وتراكم أنواع الأوكسجين الفعّالة وانتاج مجموعة واسعة من الجزيئات الدفاعية مثل البروتينات المضادة للميكروبات (Daniel *et al*., 2008)، حيث تقوم بعض المورثات بتصنيع البروتينات المتخصصة ذات العلاقة بالإمراضية التي تسهم بدور مهم في مقاومة المرض (Paulitz *et al*., 2000؛ Radhajeyalakshmi *et al*., 2009). عرّفت العديد من البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية على أنها عبارة عن بروتينات ذات طبيعة أنزيمية أو أنزيمات (Muthukrishnan *et al*., 2001؛ Van Loon *et al*., 1994؛ Veronese *et al*., 2003؛ Vidhyasekaran, 1997). لذلك استخدم عدد من المحفزات ذات الأصل الكيميائي أو البيولوجي لتحريض النبات على تشكيل آلياته الدفاعية، وقد عُرف مركب حمض الساليسيليك وهو من المحفزات الكيميائية بأن له القدرة على تحفيز آليات المقاومة في العديد من النباتات (Metraux, 2001)، حيث تعد الهرمونات النباتية مثل حمض الساليسيليك (SA) وحمض الياسمين (JA) وحمض الأبسيسيك والإيثيلين من المكونات المهمة لمسارات الإشارة المختلفة المشاركة في الدفاع عن النبات. ويعالج التطبيق الخارجي لـ SA و JA مختلف العمليات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية والجزيئية في النباتات (War *et al*., 2011)، فيسهم SA بدور رئيس في نمو النبات وتطويره واستجاباته الدفاعية، ويشارك في بعض أنظمة نقل الإشارة للحث على إنتاج انزيمات معينة (Chen *et al*., 2006). وقد ثبت بأن أحد الطرائق التي يستحث بها النبات على مقاومة مسببات الأمراض هي زيادة نشاط أنزيم فينيل آلانين أمونيالياز phenylalanine ammonia-lyase enzyme (Mandal *et al*., 2009). وبالتالي يعد حمض الساليسيليك جزيئة اشارة مهمة تسهم بدور بارز في دفاع النبات ضد غزو المسبب المرضي (Spletzer & Enyedi, 1999) وهو من أهم المركبات الكيميائية القادرة على استحثاث مقاومة مكتسبة جهازية في النبات عن طريق تحفيز مورثات المقاومة R-genes وانتاج البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية (Heil & Bostock, 2002)، وعند إضافته للنبات تتضاعف كميات البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية داخل النبات إلى عشرات الأضعاف مما يساعد على تعزيز الحافز لمورثات المقاومة بالنبات لإنتاج بروتينات ذات طبيعة إنزيمية أو إنزيمات مثل Glucanase و Chitinase والتي لها آليات دفاعية ضد مختلف المسببات المرضية مثل الفطور والفيروسات والبكتيريا (Radhajeyalakshmi *et al*., 2009). يتراكم حمض الساليسيليك في النبات المصاب كإشارة تنتقل إلى أجزاء النبات الأخرى غير المصابة وتقوم بتنشيط الجينات المرتبطة بالمقاومة (pathogenesis-related genes: PRs) (Ryals *et al*., 1996)، ثم لا يلبث أن يتحول إلى مركب الكاتيكول داخل النبات التي هي مركبات نباتية طبيعية (Metraux *et al*., 1990). ويعد حمض الساليسيليك ومشتقاته من المركبات الرئيسة القادرة على استحثاث مقاومة مكتسبة جهازية في النبات وإنتاج البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية القادرة على الحد من فاعلية المسببات المرضية وإيقاف تطورها داخل النبات (Lawton *et al*., 1996). وبما أن المقاومة المستحثة تعتمد على دفع النبات لتكوين المواد المسؤولة عن المقاومة وتحسين القدرة الدفاعية للنبات قبل حدوث الإصابة وسرعة رد الفعل عند حدوث الإصابة وهي حالة فيزيولوجية يتم اثارتها بمحفزات معينة، فقد اعتبرت من الطرائق الآمنة التي اتجهت إليها الأنظار في السنوات الأخيرة كأحد الاتجاهات الحديثة في مقاومة الأمراض النباتية في الزراعات النظيفة للتقليل من الآثار السلبية للمبيدات. لذا هدف هذا البحث إلى مقاومة مرض اللفحة المبكرة في نبات البندورة عن طريق تحفيز المقاومة المكتسبة الجهازية بوساطة حمض الساليسيليك.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات

جمعت عينات من أوراق نباتات بندورة تظهر عليها أعراض مرض اللفحة المبكرة من حقل قمنا بزراعته بمحصول البندورة في كلية الزراعة – مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية – جامعة دمشق، وشخصت في المركز نفسه بحسب المفاتيح التشخيصية المعتمدة (Ellis, 1971). غُسلت أوراق البندورة بالماء وأخذت قطع بطول 0.5–1 سم وطهرت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 1% لمدة 3 دقائق ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم وجففت على أوراق ترشيح ثم نُقلت إلى المستنبت المغذي (PDA) المضاف إليه المضاد الحيوي الستربتومايسين (250 مغ/ ليتر) وحُضّنت عند درجة حرارة 25±2 °س لحين ظهور النموات الفطرية.

اختبار التأثير المباشر لحمض الساليسيليك في تثبيط نمو مشيجة الفطر الممرض *A. solani* مختبرياً

تم اختبار عدة تركيزات من حمض الساليسيليك (0.5، 1.0 و1.5 ميلي مول/ليتر) لمعرفة تأثيرها في نمو هيفات الفطر في المختبر، حيث وضع قرص من مزرعة الفطر الممرض بقطر 5 مم في مركز كل طبق بتري يحتوي على حمض الساليسيليك ضمن المستنبت المغذي وبمعدل خمسة مكررات لكل منها بالإضافة إلى خمسة مكررات من المستنبت المغذي كشاهد (لا يحتوي على حمض الساليسيليك) وحضنت الأطباق الملقحة عند درجة حرارة 25±2 °س لمدة 10 أيام لحين تغطية مزرعة الفطر لكامل مساحة الطبق البتري.

استُخدم التصميم العشوائي الكامل لجميع المعاملات، وتم حساب النسبة المئوية لمنع النمو وذلك بقياس متوسط قطر المزارع الفطرية في اليوم العاشر من التحضين ومن ثم تطبيق معادلة Henderson & Tilton (1955) كمايلي:

$$\text{نسبة منع النمو \%} = \frac{\text{قطر المزرعة الفطرية للشاهد} - \text{قطر المزرعة الفطرية للمعاملة}}{\text{قطر المزرعة الفطرية للشاهد}} \times 100$$

تحضير شتلات البندورة/الطماطم

زُرع أربعة أصناف من شتلات البندورة السليمة (شروق، جاكلين، يرموك، بلد) في الأرض الدائمة بأربع معاملات وثلاثة مكررات لكل صنف وهي من الأصناف الرائجة بين المزارعين، حيث أُعديت المعاملة الأولى بمعلق بوغي للأبواغ الكونيدية للفطر *Alternaria solani* تركيزه 5×10^6 بوغاً كونيدياً/مل أما المعاملة الثانية فرشت بحمض الساليسيليك تركيزه 1.5 ميكرومول/ليتر ليومين متتالين ثم أُعديت بالفطر بالتركيز نفسه المُشار إليه أعلاه، في حين رشت المعاملة الثالثة بحمض الساليسيليك ليومين متتالين فقط وتركت المعاملة الرابعة للمقارنة، وطبق الاجراء نفسه على جميع الأصناف وأخذت القراءات بشكل أسبوعي. جلبت عينات من الأوراق المصابة وطهرت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 1% ثم غُسلت بالماء المقطر ونقلت إلى المستنبت المغذي PDA وحضنت عند حرارة 25±2 °س (تطبيق فرضية كوخ).

حساب شدة الإصابة

تم حساب شدة الإصابة على الأوراق والثمار بعد فحص النباتات الملقحة بعزلة الفطر والمعاملة بحمض الساليسيليك ومن ثم اختيار عشرة أوراق وخمسين ثمرة لكل مكرر بعد 7، 14، 21 و28 يوماً من المعاملات حيث تم تحديد درجة الإصابة بالاعتماد على درجة اصابة الأوراق وذلك حسب الدليل المرضي المكون من ست درجات، من صفر حتى 5 (Mayee & Datar, 1986) بالنسبة للأوراق كما يلي: 0 = لا توجد إصابة، 1= ظهور بقع على الأوراق بنسبة 1–5% من سطح الورقة، 2= ظهور بقع على الأوراق بنسبة 6–20% من سطح الورقة، 3= ظهور بقع على الأوراق بنسبة 21–40% من سطح الورقة، 4= ظهور بقع على الأوراق بنسبة 41–70% من سطح الورقة، 5= ظهور بقع على الأوراق بنسبة أكبر من 70% من سطح الورقة.

حسب الدليل المرضي المكون من ثماني درجات بالنسبة للثمار (Dillard, 1989) كما يلي: 0= لا توجد إصابة، 1= 1–12.5%، 2= 12.5–25%، 3= 25.1–37.5%، 4= 37.6–50%، 5= 50.1–62.5%، 6= 62.6–75%، 7= 75.1–87.5%، 8= 87.6–100%.

ومن درجة الإصابة حُسبت شدة الإصابة على الأوراق والثمار لكل معاملة، فعلى الأوراق تم حسابها حسب معادلة McKinney (1923) كما يلي:

$$\text{شدة الإصابة} = \frac{\text{(عدد الوريقات في الدرجة 0×0) + (عدد الوريقات في الدرجة 1×1) + (عدد الوريقات في الدرجة 2×2) + ... + (عدد الوريقات في الدرجة 5×5)}}{\text{عدد الوريقات المفحوصة} \times 5} \times 100$$

في حين حُسبت شدة الإصابة على الثمار كما يلي:

$$\text{شدة الإصابة} = \frac{\text{(عدد الثمار في الدرجة 0×0) + (عدد الثمار في الدرجة 1×1) + (عدد الثمار في الدرجة 2×2) + ... + (عدد الثمار في الدرجة 8×8)}}{\text{عدد الثمار الكلية} \times 8} \times 100$$

استخلاص البروتينات من الأنسجة النباتية

اتبعت طريقة Jedelská *et al.* (2019) المعدلة في استخلاص البروتينات من الأنسجة النباتية من نبات البندورة المعاملة بحمض الساليسيليك كما استخلصت البروتينات من الأنسجة النباتية لنباتات بندورة سليمة وغير معاملة للمقارنة، حيث أضيف إلى كل 1 غ من الأوراق مقدار 2 مل من محلول الاستخلاص البارد (50mM Tris base، 50mM NaCl، 5mM Mercaptoethanol، 1% PVP، 0.01% Triton 100X) ثم طحنت في جفنات مبردة مسبقاً. بعد ذلك جمعت العينات في أنابيب تثقيل ليتم تثقيلها بجهاز الطرد المركزي على سرعة 16,000 g مدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 4 °س لفصل مستخلص البروتينات عن باقي المكونات، بعد ذلك نُقل المحلول الطافي الحاوي على البروتينات إلى أنبوب جديد، ليحفظ عند درجة حرارة 4 °س لحين الاستعمال.

اتبعت طريقة Laemmli (1970) لإجراء الرحلان الكهربائي للبروتينات المستخلصة من أنسجة أوراق أصناف البندورة، المعاملة وغير المعاملة، وتم تلوين الهلامة بمحلول أزرق الكومسي في الميتانول كما صوّرت الهلامة باستخدام الماسح الضوئي Bio-6000 Scanner Microtek.

التحليل الاحصائي

صممت التجارب وفقاً للتصميم العشوائي الكامل (CRD)، وحللت النتائج احصائياً باستخدام برنامج التحليل الاحصائي SPSS version 22 بمستوى احتمال 0.01 للتجارب المخبرية و0.05 للتجارب الحقلية.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الدراسة المختبرية (جدول 1) أن التراكيز الثلاثة المختبرة لحمض الساليسيليك (0.5، 1.0 و 1.5 ميلي مول/ليتر) أدت إلى تثبيط واضح لنمو المشائج الفطرية في مزارع الفطر *A. solani* على المستنبت المغذي PDA وتناسب ذلك طرداً مع تركيز الحمض، حيث بلغ متوسط نمو قطر المزرعة 2.06 سم عند التركيز 0.5 ميلي مول بنسبة تثبيط 77.11% في حين كان متوسط النمو 1 سم عند التركيز 1 ميلي مول بنسبة تثبيط 88.89 % أما التركيز 1.5 ميلي مول فقد ثبط نمو مشيجة الفطر بنسبة 100% ، ولم يلاحظ أي نمو للمشيجة الفطرية، وكان الفارق معنوياً بين التراكيز الثلاثة للحمض ومع الشاهد أيضاً عند مستوى احتمال 1% وهذا يتعارض مع ما توصل إليه عتيق وآخرون (2013) الذين أشاروا إلى أن حمض الساليسيليك لا يؤثر بشكل مباشر في نمو مشيجة الفطر الممرض.

جدول 1. متوسطات أقطار المزارع الفطرية (سم ± الخطأ المعياري) على مستنبت PDA والمعاملة بحمض الساليسيليك مع الشاهد.

Table 1. Diameter average of fungal colonies (cm ± standard error) on PDA culture treated with salicylic acid and the control.

تركيز حمض الساليسيليك (ميلي مول/ ليتر) Concentration of salicylic acid (m.mol/L)	متوسطات أقطار المزارع الفطرية (سم ± الخطأ المعياري) Diameter average of fungal colonies (cm ± SE)
0.0 (شاهد Control)	9.00±0.00 D
0.5	2.06±0.02 C
1.0	1.00±0.00 B
1.5	0.00±0.00 A
$LSD_{0.01}$	0.01

المتوسطات التي يتبعها الحرف الكبير نفسه لا تختلف عن بعضها معنوياً (اختبار ANOVA ONE-WAY عند مستوى احتمال 0.01).

Means followed by the same large letter are not significantly different (using ANOVA ONE-WAY test) at P= 0.01.

أما حقلياً، شهدت شدة الإصابة التي أُخذت قراءاتها بشكل أسبوعي على أوراق وثمار نباتات البندورة وللأصناف الأربعة المعاملة بحمض الساليسيليك مع المعلق البوغي انخفاضاً ملحوظاً مقارنة بتلك المعاملة بالمعلق البوغي فقط وذلك على الأوراق والثمار معاً (الجدولين 2 و 3)، فكان أقلها شدة على صنف شروق يليه جاكلين ثم يرموك وآخرها صنف بلد الذي كان أكثرها قابلية للإصابة، حيث بلغت شدة الإصابة في اليوم السابع على أوراق الأصناف المدروسة في حالة المعاملة بحمض الساليسيليك 4.89، 7.24، 9.26 و 10.34% لتصل إلى 16.92، 24.26، 27.17 و 30.89% في اليوم 28، على التوالي. أما على الثمار فقد بلغت 0.83، 1.08، 1.42 و1.58% في اليوم السابع من المعاملة لتصل في اليوم 28 إلى 7.08، 8.58، 10.75 و14.08%، على التوالي، حيث كانت الفروقات معنوية بين جميع الأصناف وفي جميع القراءات ماعدا شدة الإصابة على الثمار لصنفي يرموك وبلد في اليوم السابع فكانت الفروقات ظاهرية بينهما. أما شدة الإصابة على الأصناف المعاملة بالمعلق البوغي فقط فقد بلغت على الأوراق في اليوم السابع 13.44، 18.14، 21.73 و24.01%، على التوالي، ومع مرور الوقت ارتفعت هذه الشدة بشكل كبير حيث وصلت في اليوم 28 إلى 51.42، 68.15، 74.22 و78.30% مع ملاحظة أن الفروقات كانت معنوية بين الأصناف في جميع القراءات. بينما بلغت 2.25، 2.83، 3.75 و4.17% في اليوم السابع وقد وصلت إلى 21.92، 26.08، 32.50 و41.58% في اليوم 28 بالنسبة للثمار على الترتيب، وبفروق معنوية بين الأصناف في جميع القراءات أيضاً، وبالتالي فإن المعاملة بحمض الساليسيليك قد خفضت شدة الإصابة بالفطر الممرض بالنسبة لجميع الأصناف على الأوراق والثمار ولكن اختلفت النسبة حسب درجة قابلية كل صنف للإصابة بهذا الفطر، وهذا يتوافق مع نتائج العاني وكونر (2013).

كما أظهر الرحلان الكهربائي للبروتينات (شكل 1) المستخلصة من أوراق أصناف البندورة، المعاملة أو غير المعاملة، حزماً لبروتينات تراوح أوزانها التقريبية في حدود 14–175 كيلودالتون، مع زيادة ملحوظة في إجمالي محتوى البروتين للنباتات المعاملة بحمض الساليسيليك، وهذا يتوافق مع ما نشر سابقاً (Agamy *et al*, 2013). أمكن أيضاً تمييز فارق في بصمة البروتين بين النباتات الشاهد وتلك المعاملة بالحمض، واختلف هذا الفارق باختلاف الصنف، بالنسبة للصنف شروق اختلف النبات المعامل عن الشاهد بظهور خمس حزم جديدة بحجم تقريبي 80، 60، 55، 32 و 26 كيلو دالتون وغياب حزمتين بحجم تقريبي 28، 20 كيلو دالتون، علاوة على اختلاف واضح في كمية بعض الحزم، إما زيادة مثل الحزم بحجم تقريبي 175، 32 كيلو دالتون، أو نقصاناً مثل الحزمة 70 كيلو دالتون، الذي يمكن أن يعزى إلى تغير في معدل اصطناع البروتين أو تخليق بروتينات جديدة مقاربة في الحجم، مما يمكن أن يشير إلى حدوث تغيرات في التعبير الجيني، كمية ونوعية، خلال المراحل اللاحقة للرش بحمض الساليسيليك، إذ يعتقد أن لحمض الساليسيليك دور في تنشيط مورثات مرتبطة بإسكات RNA silencing RNA في النباتات المعداة (Pilar López-Gresa *et al.*, 2016).

جدول 2. متوسط شدة اصابة أوراق البندورة/الطماطم (± الخطأ المعياري) المعاملة بحمض الساليسيليك بعد فترات مختلفة من المعاملة بالمعلق البوغي.

Table 2. Mean disease intensity (± standard error) on tomato leaves treated with salicylic acid following different periods (days) after treatment with spore suspension.

المعاملة/الصنف		الفترة (أيام) بعد المعاملة Period (days) after treatment				
Treatment/Variety		7	14	21	28	$LSD_{0.05}$
حمض الساليسيليك Salicylic acid						
شروق	Shorouk	4.89±0.21 Aa	7.81±0.11 Ba	12.34±0.08 Ca	16.92±0.37 Da	0.73
جاكلين	Jackline	7.24±0.13 Ab	11.11±0.21 Bb	18.75±0.14 Cb	24.26±0.15 Db	0.52
يرموك	Yarmouk	9.26±0.18 Ac	14.26± 0.03 Bc	20.44±0.08 Cc	27.17±0.28 Dc	0.56
بلد	Balad	10.34±0.09 Ad	15.82±0.16 Bd	25.26±0.14 Cd	30.89±0.11 Dd	0.42
LSD		0.53	0.47	0.38	0.81	
الشاهد (المعلق البوغي) Control						
شروق	Shorouk	13.44±0.15 Aa	22.06±0.06 Ba	35.10±0.17 Ca	51.42±0.01 Da	0.39
جاكلين	Jackline	18.14±0.01 Ab	29.08±0.01 Bb	50.20±0.06 Cb	68.15±0.04 Db	0.12
يرموك	Yarmouk	21.73±0.28 Ac	34.11±0.11 Bc	53.41±0.11 Cc	74.22±0.09 Dc	0.54
بلد	Balad	24.01±0.05 Ad	38.46±0.15 Bd	61.71±0.06 Cd	78.30±0.21 Dd	0.44
$LSD_{0.05}$		0.52	0.32	0.36	0.38	

المتوسطات في كل عمود التي يتبعها الحرف الصغير نفسه لا تختلف عن بعضها معنوياً (اختبار ONE-WAY ANOVA) عند مستوى احتمال 0.05. المتوسطات في كل صف والتي يتبعها الحرف الكبير نفسه لا تختلف عن بعضها معنوياً (اختبار ONE-WAY ANOVA) عند مستوى احتمال 0.05.

Means in each row followed by the same large letter are not significantly different (using ANOVA test) at P= 0.05.
Means in each row followed by the same small letter are not significantly different (using ANOVA test) at P= 0.05.

جدول 3. معدل شدة اصابة ثمار البندورة (± الخطأ المعياري) بعد فترات مختلفة من المعاملة بحمض الساليسيليك والمعلق البوغي.

Table 3. Mean disease intensity (± standard error) on fruits of tomato plants treated with salicylic acid and spore suspension.

المعاملة/الصنف		الفترة (أيام) بعد المعاملة Period (days) after treatment				
Treatment/Variety		7	14	21	28	$LSD_{0.05}$
حمض الساليسيليك Salicylic acid						
شروق	Shorouk	0.83±0.07 Aa	1.75±0.06 Ba	3.50±0.11 Ca	7.08±0.15 Da	0.34
جاكلين	Jackline	1.08±0.03 Ab	2.25±0.14 Bb	5.83±0.03 Cb	8.58±0.05 Db	0.26
يرموك	Yarmouk	1.42±0.02 Ac	2.75±0.05 Bc	6.67±0.15 Cc	10.75±0.10 Dc	0.31
بلد	Balad	1.58±0.09 Ac	3.42±0.10 Bd	8.83±0.03 Cd	14.08±0.01 Dd	0.22
LSD		0.19	0.31	0.32	0.31	
الشاهد (المعلق البوغي) Control						
شروق	Shorouk	2.25±0.03 Aa	5.00±0.00 Ba	10.50±0.14 Ca	21.92±0.04 Da	0.25
جاكلين	Jackline	2.83±0.08 Ab	6.17±0.07 Bb	17.00±0.00 Cb	26.08±0.02 Db	0.18
يرموك	Yarmouk	3.75±0.14 Ac	7.67±0.22 Bc	19.00±0.00 Cc	32.50±0.28 Dc	0.64
بلد	Balad	4.17±0.07 Ad	9.42±0.17 Bd	25.33±0.16 Cd	41.58±0.02 Dd	0.40
$LSD_{0.05}$		0.03	0.46	0.36	0.48	

المتوسطات في كل عمود التي يتبعها الحرف الصغير نفسه لا تختلف عن بعضها معنوياً (اختبار ONE-WAY ANOVA) عند مستوى احتمال 0.05. المتوسطات في كل صف والتي يتبعها الحرف الكبير نفسه لا تختلف عن بعضها معنوياً (اختبار ONE-WAY ANOVA) عند مستوى احتمال 0.05.

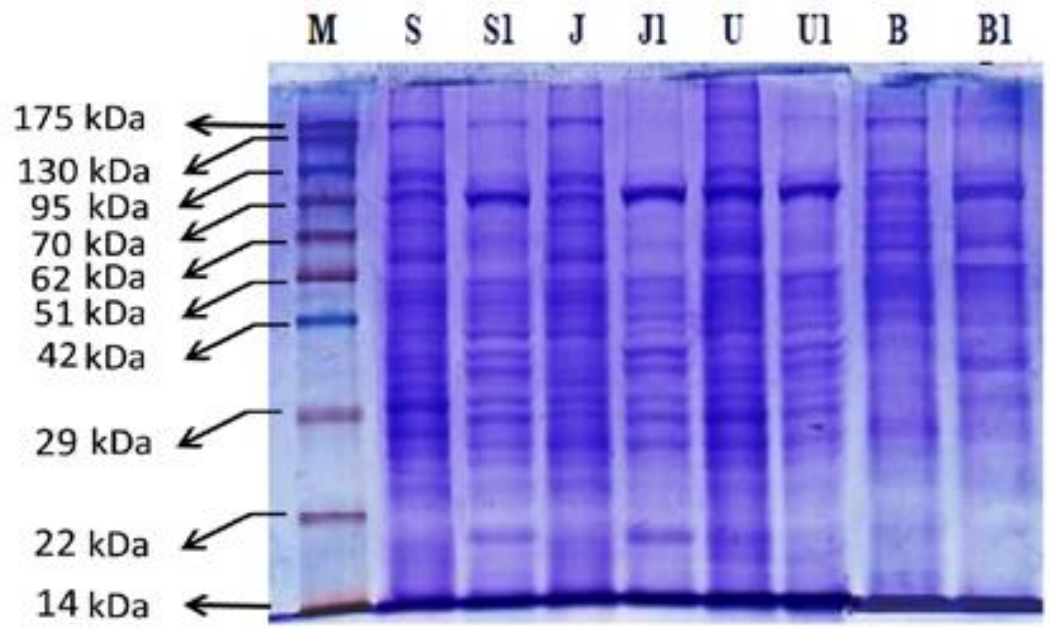
Means in each row followed by the same large letter are not significantly different (using ANOVA test) at P= 0.05.
Means in each row followed by the same small letter are not significantly different (using ANOVA test) at P= 0.05.

وعلى نحو مشابه، فقد ظهرت في النبات المعامل للصنف جاكلين ست حزم جديدة بحجم تقريبي 175، 80، 60، 55، 40، 32 كيلو دالتون، وغابت عنه عدة حزم منها الحزم بحجم تقريبي 42، 37، 35 و 20 كيلو دالتون، وظهر جلياً نقصان كمية الحزمة بحجم 70 كيلو دالتون، أما بالنسبة للصنف يرموك فقد ظهرت في النبات المعامل أربع حزم جديدة بحجم تقريبي 130، 80، 60 و 55 كيلو دالتون، ترافق مع زيادة واضحة في كمية الحزمتين بحجم تقريبي 28 و 25 كيلو دالتون، واقتصر التباين عند النبات المعامل للصنف بلد على ظهور حزمتين جديدتين بحجم تقريبي 80 و 62 كيلو دالتون، وغياب

أخريين بحجم تقريبي 35 و 32 كيلو دالتون، إضافة إلى انخفاض واضح في كمية الحزمة 70 كيلو دالتون.

يمكن أن تعزى هذه الاستجابة المتعلقة بحمض الساليسيليك إلى تأثيره في آلية تركيب البروتين على مستوى النسخ أو مستوى الترجمة كما ذكر El-Bahay & Moursy (2003)، مما يؤدي إلى ظهور بروتينات جديدة يمكن أن يكون لها طبيعة أنزيمية أو هرمونية. أيضاً، كشفت نتائج SDS PAGE عن أن التغير في مقاومة النبات للفطر رافقه تغير في محتوى النبات من البروتين كماً ونوعاً، وهذا يتفق مع دراسات سابقة ذكرت أن مقاومة الفطور في النباتات تعتمد في الواقع على التعديلات في بروتين الخلايا النباتية (Bashir *et al*., 2016)، وأن البروتينات نفسها أكثر أسلحة الدفاع نشاطاً للخلايا النباتية، بل قد تقود أيضاً الاستجابات الدفاعية الأخرى للنباتات (Cândido Ede *et al*., 2011؛ Zhu *et al*., 2010) مثل تقوية جدار الخلية من خلال زيادة تراكم الليغنين بما يعزز دفاع النبات ضد الممرضات.

من ناحية أخرى، بينت النتائج ظهوراً واضحاً لحزمة من البروتين بحجم 70 كيلو دالتون في جميع النباتات، وفي النباتات الشاهد بدرجة أكبر مما هي عليه عند تلك المعاملة بالحمض. وهنا تجدر الإشارة إلى احتمالية أن تدل هذه الحزمة على الأنزيم سيرين بروتياز من عائلة subtilase (70 كيلو دالتون) مع نظيريه isoforms؛ P69B وP69C، وهي بروتينات ذات علاقة بالإمراضية pathogenesis-related proteins (Jordá *et al*., 1999؛ Van Loon & Van Strien, 1999). فقد أشارت دراسات سابقة إلى أن حمض الساليسيليك يمكن له تنسيق العديد من الأنشطة الخلوية المرتبطة بالتمثيل الضوئي والغذائي بما يضمن تيسير استجابة الدفاع عند النبات واسترجاع حيويته (Linlin *et al*., 2016)، وبالتالي تخفيف شدة الإصابة بما لا يستدعي أن تترافق الاستجابة الدفاعية للنبات مع تحفيز إنتاج البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية بدرجة كبيرة. وتشترك بعض الأصناف في عدد من العصابات الجديدة أو في غياب أخرى، ومن ذلك يمكن الاقتراح أن هناك تشابهاً في بعض أليات المقاومة بين الأصناف المختلفة.



شكل 1. نمط الرحلان الكهربائي في هلام متعدد الأكريلاميد لأصناف البندورة المدروسة. من اليسار لليمين: M= البروتينات القياسية، S= بروتينات صنف شروق مرشوش بحمض الساليسيليك، S1= بروتينات صنف شروق شاهد، J= بروتينات صنف جاكلين مرشوش بحمض الساليسيليك، J1= بروتينات صنف جاكلين شاهد، U= بروتينات صنف يرموك مرشوش بحمض الساليسيليك، U1= بروتينات صنف يرموك شاهد، B= بروتينات صنف بلد مرشوش بحمض الساليسيليك، B1= بروتينات صنف بلد شاهد.

Figure 1. SDS-PAGE profile for proteins extracted from tomato cultivars. From left to right: M= Protein markers, S= proteins of shorouk cultivar sprayed with SA, S1= proteins of shorouk cultivars (control, J= proteins of Jackline cultivar sprayed with SA, J1= proteins of Jackline cultivar (control), U= proteins of Yarmouk cultivar sprayed with SA, U1= proteins of Yarmouk cultivars (control). B= proteins of Balad cultivar sprayed with SA, B1= proteins of Balad cultivar (control).

Abstract

Abu Al-Sel, A.A., J.T. Faddoul and A. Basheer. 2020. Induction of systemic acquired resistance in tomato plants against early blight disease caused by fungal pathogen *Alternaria solani* Sorauer (Ellis & Martin) by Salicylic acid. Arab Journal of Plant Protection, 38(3): 232-240.

Early blight (EB) caused by *Alternaria solani* Sorauer (Ellis & Martin) fungus is one of the important fungal diseases on tomato plants causing significant losses in yield and quality. This research was carried out in the laboratories of the Biological Control Studies and Research Center, Faculty of Agriculture, Damascus University to study the role of salicylic acid in stimulating tomato plant to resist the early blight disease. The effect of salicylic acid was studied in vitro to inhibiting the growth of fungal pathogen's mycelium on the PDA culture medium using three concentrations (0.5, 1.0, 1.5 micromole/liter). Field tests by spraying tomato plants with salicylic acid concentration of 1.5 micromole/liter before spraying these plants with conidial suspension of the pathogenic fungus at a concentration of 5×10^6 conidia/ml. Laboratory results showed high efficiency of salicylic acid in the inhibition of fungal mycelium, reaching 100% at a concentration of 1.5 micromole/liter, whereas in the field, the results showed a clear decrease in the disease severity on the leaves and fruits of plants treated with a conidial suspension and salicylic acid compared to plants treated with a conidial suspension only. Seven days after treatment, disease severity on leaves treated with salicylic acid of the Shorouk variety reached 4.89%, whereas disease severity increased to 13.44% for the same variety when treated with conidial suspension only. Highest disease severity of 24.01% was recorded on the tomato variety Balad and decreased to 10.34 % when treated with salicylic acid. Disease severity on tomato fruits was also higher on Balad variety which reached 4.17% and decreased to 1.58% when treated with salicylic acid. 28 days after treatment, results showed an increase in disease severity for both treatments, with a clear decrease in the treatment with salicylic acid on leaves and fruits and for all varieties. Results suggest that there is a factor that induced tomato plants sprayed with SA which reduced disease severity. In an effort to find out why, proteins were extracted from tomato plants treated with salicylic acid and from non-treated plants and separated by electrophoresis in polyacrylamide gel. The results obtained showed an increase in the size of protein bands and the appearance of new protein bands in plants sprayed with salicilic acid, whereas these bands did not appear in samples of tomato plants not treated with salicylic acid. Thus, these proteins induced in tomato plants are likely responsible for inducing systemic acquired resistance (SAR) in tomato plants and stimulated resistance R-genes to produce pathogenesis-related proteins (PRP) responsible for fungal resistance.

Keywords: Tomato, early blight, *Alternaria solani*, salicylic acid, pathogenesis related proteins.

Corresponding author: Ahmed Abdallah Abu El-Sel, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria, Email: ahmadabualsel@gmail.com

References

Cândido Ede, S., M.F.S. Pinto, P.B. Pelegrini, T.B. Lima, O.N. Silva and R. Pogue. 2011. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. FASEB Journal, 25: 3290-3305. https://doi.org/10.1096/fj.11-184291

Chen, J.Y., P.F. Wen, W.F. Kong, Q.H. Pan, J.C. Zhan, J.M. Li, S.B. Wan and W.D. Huang. 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonialyase in harvested grape berries. Postharvest Biology and Technology, 40: 64-72. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.12.017

Daniel, O.J.A., M.A.L. Marleide, V. R. Luciane and V. S. Márcia. 2008. Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* infection, in tomato. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 43: 1017-1023. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000800010

Dillard, H.R. 1989. Effect of temperature, wetness duration and inoculum density on infection and lesion development of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. Ecological Epidemiology, 79: 1063-1066. https://doi.org/10.1094/Phyto-79-1063

El-Bahay M.M. and S.M. Moursy. 2003. Certain physiological, biochemical and molecular aspects of lupin seedlings as influenced by seed treatment with salicylic acid and gallic acid prior to sowing. Egyptian Journal of Biotechnology, 13: 157-175.

المراجع

العاني، رائد رؤوف وعبد الوهاب شاكر كونر. 2013. إستحثاث المقاومة المكتسبة الجهازية ضد الفطر *Alternaria solani* المسبب لمرض اللفحة المبكرة على نبات الطماطم/البندورة. مجلة وقاية النبات العربية، 31: 46-50.

عتيق، عمر، أحمد الأحمد، محمد أبو شعر، محمد موفق يبرق ومصطفى خطيب. 2013. تحريض المقاومة الجهازية المكتسبة في نبات البندورة/ الطماطم إزاء الأمراض التي تحدثها بعض الأنواع من الفطر *Alternaria*. مجلة وقاية النبات العربية، 31: 168-176.

Agamy, R., S. Alamri, M.F.M. Moustafa and M. Hashem. 2013. Management of tomato leaf spot Caused by *Alternaria tenuissima* (Kunze ex Pers.) Wiltshire using salicylic acid and Agrileen. International Journal of Agricultural Biology, 15: 266–272.

Balanchard, D. 1992. A colour atlas of tomato diseases. Wolfe Pub. Ltd., Brook House, London, England. Pages 212

Bashir, Z., S. Shafique, A. Ahmad, S. Shafique, N.A. Yasin, Y. Ashraf, A. Ibrahim, W. Akram and S. Noreen 2016. Tomato plant proteins actively responding to fungal applications and their role in cell physiology. Frontiers in Physiology, 7: 257-301. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00257

Benhamou, N. and R. Bélanger. 1998. Benzothiadiazole-Mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. Plant Physiology, 118: 1203-1212. https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1203

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. https://doi.org/10.1023/A:1010763506802

Paulitz, T.C., C. Chen, R.R. Belanger and N. Benhamou. 2000. Induced systemic resistance by *Pseudomonas* spp. against Pythium root rot. Pages 108-113. In: Proceedings of the 5th International PGPR Workshop, 30 October - 3 November 2000, Cordoba, Argentina.

Pilar López-Gresa, M., P. Lisón, L. Yenush, V. Conejero, I. Rodrigo and J. Bellés. 2016. Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to citrus exocortis viroid and tomato spotted wilt virus. PloS One. 11: 0166938. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166938

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.

Ragiba, M., J.N. Vamsi, L. Hyeonju, N.T. Harold, D. Yanhong and S. Jyoti 2012. Salicylic acid regulates basal resistance to fusarium head blight in wheat. Molecular Plant-Microbe Interactions, 25: 431-439. https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0232

Ryals, J.A., U.H. Neunschwander, M.G. Willits, A. Molina, H.Y. Steiner and M.D. Hunt. 1996. Systemic acquired resistance. Plant Cell, 8: 1809-1819. https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1809

Spletzer, M.E. and A.J. Enyedi. 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. Phytopathology, 89: 722-727. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.9.722

Van Loon L.C. and E.A. Van Strien 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1type proteins. Physiology and Molecular Plant Pathology, 55: 85-97. https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0213

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. https://doi.org/10.1007/BF02668748

Veronese, P., M.T. Ruiz, M.A. Coca, A. Hernadez-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. https://doi.org/10.1104/pp.102.013417

Vidhyasekaran, P. 1997. Fungal pathogenesis in plant crops, molecular biology and host defense mechanism, Marcel Dekker, New York, USA. 553 pp.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 608 pp.

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. https://doi.org/10.1093/aob/mcf076

Henderson, C.F. and E.W. Tilton. 1955. Tests with acaricides against brown wheat mite. Journal of Economic Entomology, 48: 157-161.

Jedelská T., V.Š. Kraiczová, L. Berčíková, L. Činčalová, L. Luhová and M. Petřivalský. 2019. Tomato root growth inhibition by salinity and cadmium is mediated by S-nitrosative modifications of ROS metabolic enzymes controlled by S-nitrosoglutathione reductase. Biomolecules, 9: 393-415. https://doi.org/10.3390/biom9090393

Jordá, L., A. Coego, V. Conejero and P. Vera 1999. A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. Journal of Biological Chemistry, 274: 2360-2365. https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2360

Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685. https://doi.org/10.1038/227680a0

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. The Plant Journal, 10: 71-82. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010071.x

Linlin, L., G. Peng, J. Hua and L. Tianlai. 2016. Different proteomics of Ca^{2+} on SA-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. Horticultural Plant Journal, 2: 154-162. https://doi.org/10.1016/j.hpj.2016.08.004

Mandal, S., N. Mallick and A. Mitra. 2009. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. Plant Physiology and Biochemistry, 47: 642-649. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.03.001

Mayee, C.D. and V.V. Datar. 1986. Phytopathometry Technical Bulletin-1, University Press, Marathwada Agricultural University, Parbhani. 186 pp.

McKinney, H.H. 1923. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research, 26: 195-218.

Metraux, J.P. 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid; current state of knowledge. European Journal of Plant Pathology, 107: 13-18. https://doi.org/10.1023/A:1008763817367

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. https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1004

War, AR., M.G. Paulraj and M.Y. War. 2011**.** Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Signaling & Behavior, 6: 1787-1792. https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17685

Zhu, Y., W. Qian. and J. Hua. 2010. Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. PLoS Pathogens, 6: e1000844. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000844

تاريخ الاستلام: 2020/4/22؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2020/8/24

Received: April 22, 2020; Accepted: August 24, 2020