Archive of SID

تأثیر نمک‌های سیلیسیوم بر تغییرات فیزیولوژیک باقلای آلوده به *Rhizoctonia solani*

آمنه محمدی[۱]، رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا[۲*] و فاطمه سلمانی‌نژاد[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲- ***نویسنده مسوول:** استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران (rmostofi@shirazu.ac.ir)

۳- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۱۸

چکیده

سیلیسیوم دومین عنصر رایج در خاک است که اثرات مفیدی به صورت مستقیم یا غیرمستقیم در افزایش تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاهان دارد. در این مطالعه، فعالیت درون زیوه‌ای سیلیکات سدیم و پتاسیم در مهار *Rhizoctonia solani* در گیاه باقلا مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و اعمال سه تیمار شاهد، دریافت نمک قبل و بعد از مایه‌زنی، در سه تکرار در گلخانه اجرا شد. محتوای کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز، پرولین، پروتئین کلوکربوهیدارت گیاه، همچنین اسیدیته (pH) و هدایت الکتریکی خاک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش‌ها نشان داد که نمک‌های سیلیسیوم با افزایش آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و پروتئین کل باعث افزایش معنی‌دار تحمل باقلا نسبت به *R. solani* می‌شود و برعکس میزان پرولین کاهش می‌یابد. کاربرد نمک‌های سیلیکاتی موجب کاهش بیماری از طریق کاهش درصد استقرار در ریشه، کاهش مرگ و میر گیاهان و کاهش پوسیدگی ریشه‌ی گیاه باقلا نسبت به شاهد شد. هیچ‌کدام از این نمک‌ها تأثیری روی میزان کربوهیدرات گیاه، pH و هدایت الکتریکی خاک نداشتند. با توجه به این شواهد می‌توان استنباط کرد که نقش نمک‌های سیلیسیوم در افزایش تحمل به بیماری در باقلا به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های ضداکسایش بوده است.

کلیدواژه‌ها: فعالیت ضد اکسایشی، بیمارگر ریشه، تنش زیستی، سیلیکات‌ها

مقدمه

استفاده از نمک‌های معدنی از جمله نمک‌های آمونیوم، آلومینیوم، سدیم، پتاسیم، مس، سیلیسیوم و کلسیم از روش‌های نسبتاً جدید مهار بیماری‌های گیاهی و جایگزینی برای قارچ‌کش‌های آلی محسوب می‌شود (Mills et al., 2004). از میان نمک‌های معدنی، نحوه‌ی اثرگذاری سیلیکات‌ها درکاهش بیماری‌های قارچی مورد پژوهش قرار گرفته است. با این حال هنوز مشخص نشده است که نقش سیلیکات‌ها در مهار بیماری‌های گیاهی مربوط به حفاظت‌های مکانیکی فعال یا غیرفعال یا مربوط به

www.SID.ir

Archive of SID

هر دو این‌هاست (Mohammadi and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, 2018). آزمایش‌ها نشان داده که نمک‌های سیلیسیوم موجب افزایش استحکام دیواره‌ی یاخته‌ای گیاهان می‌شود. سیلیسیوم نقشی مشابه لیگنین دارد که به عنوان جزئی از ساختار مقاوم برای فشرده‌سازی دیواره‌های یاخته‌ای عمل می‌کند. وجود این عنصر در گیاه موجب افقی شدن موقعیت برگ‌ها و بهبود جذب نور در فرایند فتوسنتز می‌شود. مقدار کلروفیل در برگ‌هایی که میزان سیلیسیوم آن‌ها بالاست ۵۰ درصد بیش‌تر از گیاهان شاهد است. بنابراین احتمالاً بسیاری از اثرات مثبت سیلیسیوم بر رشد گیاه به دلیل افزایش جذب کل انرژی از طریق مناسب شدن موقعیت برگ‌هاست (Jones and Handreck, 1967; Yoshida et al., 1969; Raven, 1983; Adatia and Besford, 1986).

از نمک‌های معدنی برای مهار برخی بیمارگرهای گیاهی استفاده شده است. یکی از مؤثرترین گزارش‌های مرتبط با مهار بیماری توسط نمک‌های معدنی (عمدتاً بی‌کربنات‌ها، سیلیکات‌ها) مربوط به مهار عامل بیماری سفیدک پودری خیار (*Erysiphe cichoracearum* DC.) با اثر گذاری ۹۹ درصد، سفیدک پودری گندم (*Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* (DC) Speer.) و سفیدک پودری انگور (*Erysiphe necator* (Schwein) Burrill.) است (Deliopoulos et al., 2010). شاهد دیگر برای مهار بیماری‌های گیاهی با استفاده از نمک‌های معدنی (شامل بی‌کربنات‌ها، سیلیکات‌ها، فسفات‌ها، فسفیت‌ها، سولفات‌ها و کلریدها)، مهار بیمارگرهای سپتوریایی گندم (*Septoria tritici* Desm.)، بلاست برنج (TT) *Magnaporthe grisea* (Hebert) ME Barr.)، بادزدگی سیب‌زمینی (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary.) و چندین گونه‌ی دیگر از جنس *Phytophthora* مانند *P. pistaciae* (Deliopoulos et al., 2010) Mostowfizadeh-Ghalamfarsa) Mirabolfathy et al., 2018) است.

با توجه به تعدد پژوهش‌های انجام شده می‌توان این‌گونه استنباط کرد که ترکیبات سیلیسیوم برای مدیریت مهار بیمارگرهای گیاهی مؤثر باشد. در گیاهان تیمار شده با سیلیسیوم مقدار زیادی سیلیسیوم و ترکیبات فنولی در دیواره‌ی یاخته‌های برگ و در یک نقطه تجمع پیدا می‌کنند (Deliopoulos et al., 2010). مشخص شده است که اصلاح و تغییر میزان یون‌های سیلیسیوم در خاک می‌تواند در مهار چندین بیماری گیاهی مهم به خصوص بیماری بلاست برنج مؤثر واقع شود. چون سیلیسیوم می‌تواند چندین بیماری برنج (*Oryza sativa* L.) را تقریباً به اندازه قارچ‌کش‌ها مهار کند، امکان دارد استفاده از آن دفعات و مقدار مصرف قارچ‌کش‌ها را کاهش دهد (Datnoff et al., 2001). سیلیسیوم به طور کلی یک عنصر غذایی ضروری برای گیاهان به شمار نمی‌رود (Guntzer et al., 2011). غلظت سیلیسیوم در محلول خاک بین ۰/۱ تا ۰/۶ میلی‌مولار است، در حالی که معمولاً این مقدار در بافت بیش‌تر گیاهان تقریباً یک درصد وزن خشک آن‌هاست. جذب سیلیسیوم به وسیله ریشه‌ی گیاه به مقدار زیادی به گونه‌ی گیاه و سازوکار جذب و انتقال سیلیسیوم بستگی دارد (Mohaghegh et al., 2011). با این حال هنور ضرورت سیلیسیوم برای رشد و نمو گیاه مورد بحث است.

تأثیر سودمند سیلیسیوم، به طور مستقیم یا غیرمستقیم و در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی روی گیاهان زراعی مختلفی مانند برنج، یولاف (*Avena sativa* L.)، گندم (*Tritichum aestivum* L.)، خیار (*Cucumis sativus* L.) و نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) گزارش شده است (Datnoff et al., 2001). سیلیسیوم در گیاه برنج علاوه بر ایجاد مقاومت به خوابیدگی و خشکی، باعث افزایش وزن خشک آن می‌شود. در گیاه خیار نیز این

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیب سبب افزایش وزن خشک آن می‌شود (Savant et al., 1997a). همچنین سیلیسیوم روی برخی از آنزیم‌های فتوسنتز برنج و چمن (*Poa* sp.) تأثیر مثبت دارد (Savant et al., 1997b). همچنین این عنصر می‌تواند پیری برگ برنج را کاهش دهد (Savant et al., 1997b).

افزودن سیلیسیوم به محلول غذایی گیاهان باعث کاهش غلظت سدیم (Bradbury and Ahmad, 1990)، افزایش رشد گیاه (Hossain et al., 2002; Khoshgoftarmanesh et al., 2012)، اثرات مثبت بر تولیدمثل گیاهی (Gali and Smith 1992) و افزایش مقاومت مکانیکی (Jones and Handreck, 1967; Yoshida, et al., 1969; Raven, 1983; Adatia and Besford, 1986) می‌شود. سیلیسیوم همچنین بر جذب و انتقال چندین عنصر کم‌مصرف و پرمصرف اثر می‌گذارد (Marschner et al., 1990; Khoshgoftarmanesh et al., 2012) و با تشکیل رسوب سیلیسیوم زیر کوتیکول، تعرق گیاه کاهش می‌یابد و موجب مقاومت به تنش‌ها از جمله عوارض جانبی ناشی از غلظت بیش از حد فسفر و فلزات سنگین (غلظت بالای منگنز و آلومینیوم) یا شوری می‌شود (Williams and Vlamis, 1957; Horiguchi, 1988; Marschner et al., 1990; Ahmad et al., 1992; Iwasaki et al., 2002; Wang et al., 2004; Khoshgoftarmanesh et al., 2012).

گیاهان در معرض تنش‌های زنده و محیطی گونه‌هایی از اکسیژن فعال مانند رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH^-) و اکسیژن منفرد (O_2) را تولید می کند (Mohaghegh et al., 2011). اکسیژن‌های فعال به طور قابل ملاحظه‌ای به غشای سلولی و دیگر مولکول‌های ضروری مانند رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها آسیب می‌زند. سامانه‌های ضداُکسایش به طور معمول میزان اکسیژن فعال را در سلول گیاهی در حد متعادل نگه می‌دارد. کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) آنزیم‌های ضداُکسایش هستند که در سم‌زدایی اکسیژن‌های فعال شرکت دارند (Mohaghegh et al., 2011). از طرفی میزان پروتئین کل گیاه و پرولین در تنش‌های غیرزیستی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Claussen, 2005; Veeranagamallaiah et al., 2008). کربوهیدرات‌ها نیز در حکم بلوک‌های سازنده‌ی اساسی برای ساختن مواد شیمیایی دفاعی نظیر فیتوالکسین‌ها، مواد فنولی و لیگنین هستند و در نتیجه میزان آن در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تغییر خواهد کرد (Vidhyasekaran and Kandasamy, 1972). بنابراین میزان این آنزیم‌ها به همراه بررسی میزان پروتئین کل و پرولین می‌تواند شاخصی قابل اعتماد برای بررسی امکان وجود تنش‌های فیزیولوژیکی در گیاه باشد.

گیاه باقلا (*Visa faba* L.) با سطح کشت ۳۶۰۰۰ مترمربع در کشور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است همچنین استان گلستان با تولید بیش از ۱۸۰۰۰ کیلوگرم در هکتار، بالاترین میزان تولید باقلا در کشور را دارد (Sabbaghpour, 2004) با این حال این گیاه به انواع بیماری‌های پوسیدگی ریشه و اندام‌های هوایی حساس است. قارچ *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ گیاهچه، پژمردگی و پوسیدگی ریشه‌ی باقلا است که از مناطق مختلفی گزارش شده و بیماری‌زایی آن روی این گیاه به اثبات رسیده است (Azimi et al., 2005). با توجه به اهمیت بیماری‌زایی *R. solani* روی گیاه باقلا، بررسی اثر کاربرد نمک‌های سیلیسیوم (سیلیکات سدیم و پتاسیم) بر فیزیولوژی گیاه از طریق تغییرات در سطح برخی متابولیت‌های زیستی، به ویژه آنزیم‌های اُکسایشی ناشی از فعالیت *R. solani* در این گیاه به درک بهتر سازوکار تأثیر کاربرد سیلیسیوم در شرایط تنش‌های زیستی کمک خواهد کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

جدایه‌ی بیمارگر

جدایه‌ی Dov_1 از *R. solani* مربوط به AG4 موجود در مجموعه‌ی بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز استفاده شد.

تهیه مایه‌ی بیمارگر

برای تهیه مایه‌ی ریزوکتونیا، ۵۰ میلی‌گرم بذر گندم درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و با آب شست‌وشو داده شد. دانه‌های گندم به مدت یک شب در آب خیس شده، روز بعد آب رویی خالی و سپس بذرها با آب مقطر چندین بار شست‌وشو شد. ارلن‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس (سه مرتبه، یک روز در میان) سترون‌سازی شدند. چهار تا پنج بلوک ۰/۵ × ۰/۵ میلی‌متر از حاشیه‌ی پرگنه‌ی سه روزه قارچ بیمارگر روی محیط‌کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی-آگار (Potato dextrose agar = PDA)، عصاره‌ی ۳۰۰ گرم سیب‌زمینی خرد شده، ۲۰ گرم دکستروز و ۱۵ گرم آگار در لیتر) به این ارلن‌ها اضافه و به مدت سه هفته در دمای اتاق نگه‌داری شد (Sabahi and Banihashemi, 2015). در این مدت هر دو روز یک مرتبه به منظور توزیع یک‌نواخت زادمایه‌ی بیمارگر در داخل ارلن و جلوگیری از منعقد شدن محتویات آن، تکان داده شدند.

مایه‌زنی گیاه آزمونه

بذرهای باقلا (*Vicia faba* L. cv. Barkat) ابتدا با محلول هیپوکلریت‌سدیم ۰/۵ درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی سطحی شد، بذرهای ضدعفونی شده، برای جوانه‌زنی در پارچه‌ی ململ مرطوب و در انکوباتور ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. پس از جوانه زنی، ۱۰ عدد بذر در گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی مخلوط خاک و ماسه‌ی (۱:۱) سترون، کاشته شد. گلدان‌ها در گل‌خانه با بیشینه‌ی ۳۰ و کمینه‌ی ۲۰ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفته و هفته‌ای دو مرتبه آبیاری شدند. پس از سه هفته و بالغ شدن گیاهان، گیاهچه‌ها در هر گلدان به پنج عدد کاهش داده شد. برای مایه‌زنی گیاهان با ریزوکتونیا، ۳۰ گرم مایه‌ی قارچ کنار طوقه‌ی گیاهان قرار داده شد (Sabahi and Banihashemi, 2015).

تیمار با نمک‌های سیلیسیوم

در این قسمت از دو تیمار نمک قبل مایه‌زنی گیاه با بیمارگر و تیمار نمک بعد از مایه‌زنی گیاه با بیمارگر استفاده شد. تیمارها شامل گیاهان سالم، گیاهان بیمار، گیاهان سالم تیمار شده با نمک‌های سیلیسیوم و گیاهان آلوده تیمار شده با نمک‌های سیلیسیوم بود. برای هر یک از حالت‌های مختلف سه تکرار در نظر گرفته شد. در تیمار نمک قبل از مایه‌زنی، گیاهان تا سه هفته پس از کشت تیمار شدند (ر.ک. ادامه‌ی مطلب) و مایه‌زنی در انتهای هفته‌ی سوم انجام شد و یک هفته بعد نمونه‌برداری از گیاهان انجام گرفت. در آزمایش تیمار نمک بعد از مایه‌زنی، گیاهان سه‌هفته‌ای مایه‌زنی شده و تا سه هفته پس از مایه‌زنی تیمار شدند (ر.ک. ادامه‌ی مطلب) و نمونه برداری یک هفته بعد از آخرین تیمار انجام گردید.

در هر دو تیمار گیاهان سه بار در هفته با ۲۵۰ میلی‌لیتر (ظرفیت مزرعه‌ای گلدان‌ها) آب مقطر و یک بار در هفته با آب مقطر حاوی غلظت نیم میلی‌مولار سیلیکات سدیم (حاوی ۱۰ درصد سیلیسیوم) و غلظت‌های دو میلی‌مولار برای سیلیکات پتاسیم (با ۱۳ درصد سیلیسیوم)، تیمار شدند (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al., 2017; Mohammadi and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, 2018).

اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی

برای عصاره‌گیری از گیاه، ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگ، با نیتروژن مایع پودر شد. دو میلی‌لیتر بافر استخراج (۰/۶۰۷ گرم تریس، ۰/۰۵ گرم پی‌وی‌پی[1] (PVP)، ۴۰ میلی‌لیتر آب

1- Polyvinylpyrrolidone

www.SID.ir

Archive of SID

مقطر تا حجم نهایی ۵۰ میلی‌لیتر و ، pH هشت) به آن اضافه و مخلوط حاصل به خوبی در هاون چینی همگون گردید. مخلوط همگون شده توسط کاغذ صافی واتمن شماره دو صاف شده، عصاره‌ی به دست آمده در ریزلوله‌ی اپندروف در منفی ۲۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش دهیندسا Dhindsa et al., (1981) استفاده شد. پنجاه میکرولیتر از عصاره‌ی استخراجی با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری کاتالاز حاوی ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم (pH = ۷) و ۱۵ میلی‌مول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) مخلوط شد. سپس جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه و با فواصل ۱۰ ثانیه با اسپکتروفتومتر خوانده شد و با فرمول زیر محاسبه گردید (C= کاتالاز، A= عدد خوانده شده از اسپکتروفتومتر و X= جواب به دست آمده):

$$C = (A \times 1000) \div 39.2 = X \times 2$$

برای اندازه‌گیری غلظت آنزیم پراکسیداز از روش Chance and Maehly (1955) استفاده شد. اندازه‌گیری بر اساس میزان اکسید شدن گوایکل[1] توسط این آنزیم انجام گرفت. بدین صورت که ۳۳ میکرولیتر از عصاره‌ی برگ گیاه با یک میلی‌لیتر از محلول پراکسیداز (حاوی ۱۳ میلی‌مول گوایکول، پنج میلی‌مول پراکسید هیدروژن و ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم) مخلوط نموده، به مدت یک دقیقه و با فواصل ۱۰ ثانیه در طول موج ۴۷۰ نانومتر جذب آن با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت پراکسیداز از فرمول زیر به دست می‌آید (P = پراکسیداز، A = عدد خوانده شده از اسپکتروفتومتر و X = جواب به دست آمده):

$$P = (A \times 1000) \div 26.6 = X \times 2$$

برای سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز از روش Ghanati et al. (2002) استفاده شد. مقدار ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ در نیتروژن مایع و در بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۲ مولار (pH = ۶/۸) در چهار درجه‌ی سلسیوس ساییده و عصاره‌گیری شد. عصاره‌ی حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دو تا چهار درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت پلی‌فنول اکسیداز استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی آنزیمی، ۵۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن پنج میلی‌مولار و ۵۰۰ میکرولیتر متیل کاتکول[2] ۰/۰۲ مولار در ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم با pH = ۶/۱ بود. سپس جذب آن‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

برای استخراج و اندازه‌گیری پرولین از روش Bates (1973) استفاده شد. برای اندازه‌گیری پرولین، از معرف نین‌هیدرین (۱/۲۵ گرم نین‌هیدرین حل شده در مخلوط ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک خالص و ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک شش مولار) استفاده شد. از عصاره‌ی گیاهی صاف شده، دو میلی‌لیتر در یک لوله ریخته و به آن دو میلی‌لیتر اسید استیک و دو میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین اضافه و سپس در ۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب یخ قرار داده شد. به هر لوله آزمایش مقدار چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه، به مدت ۱۵ تا۲۰ ثانیه به هم زده شد تا کاملاً یک‌نواخت شوند. بعد از ۵ دقیقه قرار گرفتن در دمای محیط، میزان جذب نوری لوله‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این مدت دو فاز رویی و زیرین از هم جدا شدند. فاز رویی حاوی کمپلکس رنگی (قرمز) است که از آن با استفاده از فرمول زیر برای تعیین غلظت پرولین استفاده شد. در این فرمول M عدد خوانده شده توسط اسپکتروفتومتر، T حجم تولوئن مورد استفاده و W وزن تر نمونه‌ی برگی مورد استفاده است:

$$\text{پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر)} = \frac{M \times T \times W}{۱۱۵/۵} \times ۱۰۰۰$$

1- Guaiacol

2- Methylcatechol

www.SID.ir

Archive of SID

برای تعیین غلظت پروتئین از روش استاندارد Bradford (1976) استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد از سرم آلبومن گاوی (BSA) استفاده شد. بدین صورت که ۱۰ میلی‌گرم سرم آلبومن گاوی در ۱۰ میلی‌لیتر از بافر استخراج حل و غلظت‌های ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ درصد ساخته شد. در داخل هر یک از لوله‌ها پنج میلی‌لیتر معرف رنگی (۰/۰۱ گرم کومازی برلیانت بلو در پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد حل و به آن ۱۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد اضافه گردید. پس از هم زدن، حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) ریخته و به مدت دو دقیقه در ورتکس به هم زده شد. بعد از پنج دقیقه میزان جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

برای اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول از روش استاندارد Dubois et al. (1956) استفاده شد. مقدار ۰/۱ گرم از بافت خشک شده‌ی گیاه (در ۸۰ درجه‌ی سلسیوس) درون لوله فالکون ریخته و به آن ۱۳ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۸۰ درصد اضافه شد. پس از سانتریفوژ به ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه، رونشین به درون لوله‌ی آزمایش انتقال داده شد. مقدار ۱۳ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۸۰ درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رونشین به محلول قبلی اضافه شد. یک میلی‌لیتر از عصاره با یک میلی‌لیتر محلول فنول پنج درصد مخلوط و پس از اضافه کردن پنج میلی‌لیتر اسید سولفوریک خالص، با دستگاه لرزا هم‌زده و روی یخ قرار داده شد. جذب نور توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه قند از فرمول زیر استفاده شد. در این فرمول X عدد اسپکتوفتومتر و Y مقدار قند است.

$$Y=۰/۰۹۱۴\ X + ۰/۰۶۸۳$$

تمامی اندازه‌گیری‌ها از بافت شاخساره گیاه انجام شد.

آنالیز آماری

میزان متابولیت‌ها در گیاه سالم، گیاه بیمار، گیاهان سالم تیمار شده با نمک‌های سیلیسیوم (سیلیکات سدیم و پتاسیم)، گیاهان آلوده تیمار شده با نمک‌های سیلیسیوم (قبل از مایه‌زنی)، گیاهان آلوده تیمار شده با نمک‌های سیلیسیوم (بعد از مایه‌زنی) اندازه‌گیری شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل ۳×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. فاکتور اول نمک سیلیکاتی بود که سه سطح داشت، سطح نیم میلی‌مولار سیلیکات سدیم، سطح دو میلی‌مول سیلیکات پتاسیم و یک سطح بدون استفاده از نمک سیلیکاتی بود. فاکتور دوم روش استفاده از نمک‌های سیلیکاتی بود که سه سطح داشت: استفاده از نمک‌های سیلیکاتی در گیاهان سالم، استفاده از نمک‌های سیلیکاتی در گیاهان بیمار پیش و پس از مایه‌زنی. کلیه‌ی داده‌ها با نرم‌افزار SAS VER 9.1 (SAS Institute, 1999) واکاوی شد. مقایسه‌ی میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و درسطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

اندازه‌گیری pH و هدایت الکتریکی خاک

مقدار ۲۰ گرم از خاک را در یک بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری قرار و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. از این مخلوط برای اندازه‌گیری pH و هدایت الکتریکی خاک استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری pH خاک این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه به طور متناوب در هر بار ۱۰ دقیقه به آرامی به هم زده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه سنجش pH[1]، مقدار pH اندازه‌گیری گردید. به منظور اندازه‌گیری هدایت الکتریکی خاک، مخلوط اصلی ۳۰ دقیقه به طور متناوب به هم زده و یک ساعت به حالت سکون قرار گرفت. سپس با استفاده از یک دستگاه سنجش هدایت الکتریکی[2]، میزان هدایت الکتریکی سوسپانسیون بلافاصله تعیین شد (Rhoades, 1996).

1- pH meter
2- Conductometer

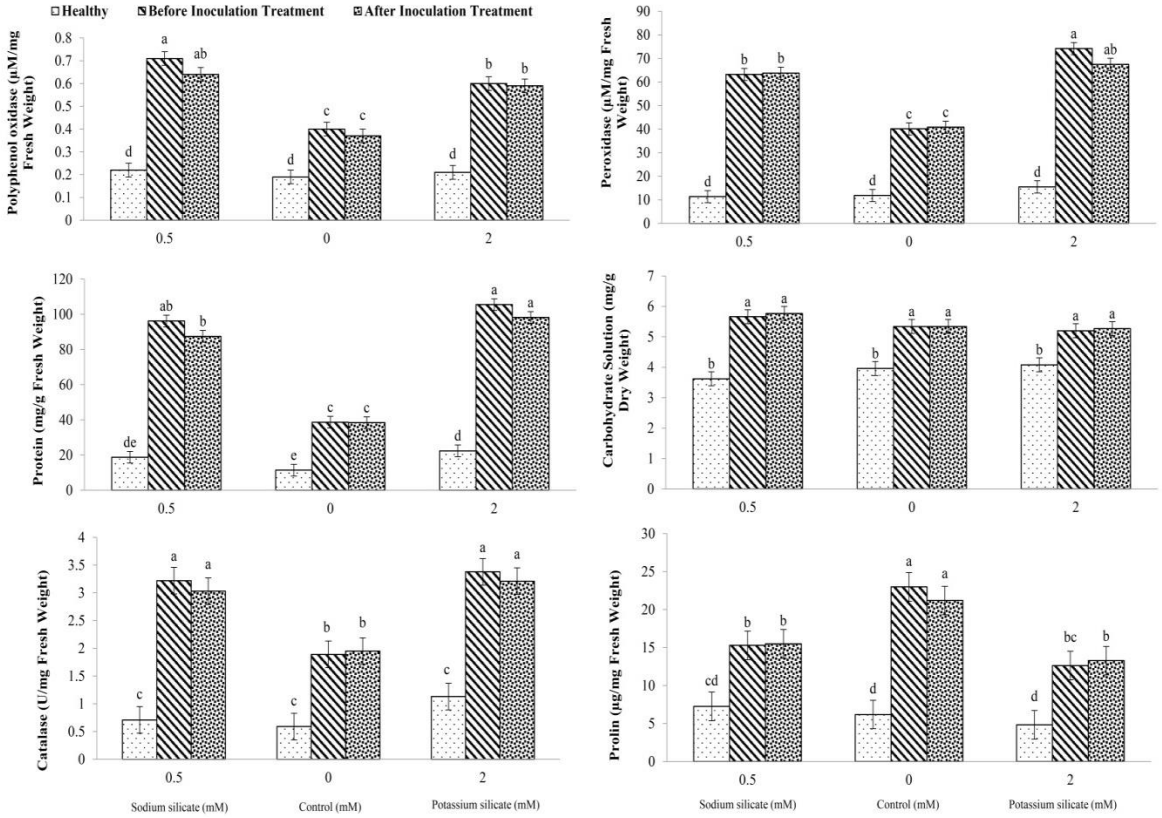
www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری pH و هدایت الکتریکی خاک پس از برداشت باقلا در کلیه‌ی تیمارهای سیلیکات سدیم و سیلیکات پتاسیم قبل و بعد از مایه‌زنی با *Rhizoctonia solani* صورت گرفت.

نتایج

نتایج این آزمایش نشان داد که مقدار آنزیم کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و مقدار پروتئین کل در گیاهان بیماری که هیچ‌گونه نمکی دریافت نکرده‌اند نسبت به گیاهان سالم بدون نمک به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. همچنین مشاهده شده است که مقدار این آنزیم‌ها و پروتئین کل در گیاهان بیماری که با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سیلیکات سدیم و غلظت ۲ میلی‌مولار سیلیکات پتاسیم تیمار شده‌اند به صورت معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد بیماری که نمک دریافت نکرده‌اند، افزایش یافته است (شکل ۱).



شکل ۱- اثر سیلیکات سدیم (۰/۵میلی مولار) و سیلیکات پتاسیم (۲ میلی مولار) بر تغییرات فیزیولوژیک باقلای مایه‌زنی شده با *Rhizoctonia solani* Dov_1، در تیمارهای قبل و بعد از مایه‌زنی در مقایسه با گیاهان سالم در شرایط گلخانه. حروف نامتشابه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است.

Figure 1. The effect of sodium silicate (0.5 mM) and potassium silicate (2 mM) on physiological changes in broad bean before and after inoculation with *Rhizoctonia solani* Dov_1 compared with uninoculated plants in greenhouse. Mean values at the column peaks followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$ by Duncan's test.

www.SID.ir

Archive of SID

از طرفی مقدار پرولین در گیاهان بیماری که هیچ‌گونه نمکی دریافت نکرده‌اند نسبت به گیاهان سالم بدون نمک به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. اما برخلاف سایر آنزیم‌ها مشاهده شد که مقدار پرولین در گیاهان بیماری که با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سیلیکات سدیم و غلظت ۲ میلی‌مولار سیلیکات پتاسیم تیمار شده‌اند به صورت معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد بیماری که نمک دریافت نکرده‌اند، کاهش یافته است (شکل ۱).

مقدار کربوهیدرات در گیاهان بیماری که هیچ‌گونه نمکی دریافت نکرده‌اند نسبت به گیاهان سالم بدون نمک به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. اما تفاوت معنی‌داری بین سایر تیمارها مشاهده نشد (شکل ۱).

از طرفی مشخص شد که مقدار pH بین تیمارهای نمک‌های سیلیکات سدیم و پتاسیم در خاک مایه‌زنی شده با *R. solani* تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱). همچنین هدایت الکتریکی این خاک بین تیمارهای نمک‌های سیلیکات سدیم و پتاسیم تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۱- میزان pH خاک پس از برداشت باقلا در تیمارهای ۰/۵ میلی‌مولار سیلیکات سدیم و ۲ میلی‌مولار سیلیکات پتاسیم قبل و بعد از مایه‌زنی با *Rhizoctonia solani*

Table 1. Soil pH after harvesting broad bean in the treatments of 0.5 mM sodium silicate and 2 mM potassium silicate before and after inoculation with *Rhizoctonia solani*

Salt (mM)	pH			
	Before Inoculation		After Inoculation	
	-*R*	+*R*	-*R*	+*R*
Zero	7.83[*a]	7.81[a]	7.83[a]	7.79[a]
Sodium silicate (0.5)	7.89[a]	7.86[a]	7.89[a]	7.79[a]
Potassium silicate (2)	7.92[a]	8.07[a]	7.92[a]	7.99[a]

[a]-*R*: healthy plants; +*R*: inoculated plants with *R. solani;* *: Standard error = 0.08. Values marked with the same letters are not statistically different at $P \leq 0.05$, according to the Duncan's Multiple Range test.

جدول ۲- هدایت الکتریکی خاک پس از برداشت باقلا در تیمارهای ۰/۵ میلی‌مولار سیلیکات سدیم و ۲ میلی‌مولار سیلیکات پتاسیم قبل و بعد از مایه‌زنی با *Rhizoctonia solani*

Table 2. Soil electrical conductivity after harvesting broad bean in the treatments of 0.5 mM sodium silicate and 2 mM potassium silicate before and after inoculation with *Rhizoctonia solani*

Salt (mM)	Soil Electrical Conductivity (dS/m)			
	Before Inoculation		After Inoculation	
	-*R*	+*R*	-*R*	+*R*
Zero	0.72[*a]	0.81[a]	0.72[a]	0.91[a]
Sodium silicate (0.5)	0.80[a]	0.73[a]	0.80[a]	0.73[a]
Potassium silicate (2)	0.85[a]	0.81[a]	0.85[a]	0.75[a]

[a]-*R*: healthy plants; +*R*: inoculated plants with *R. solani;* *: Standard error = 0.1. Values marked with the same letters are not statistically different at $P \leq 0.05$, according to the Duncan's Multiple Range test.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

تأثیر سودمند سیلیسیوم، به طور مستقیم یا غیرمستقیم و در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی روی گیاهان زراعی مختلفی گزارش شده است. با این حال هنوز ضرورت یون‌های سیلیسیوم برای رشد و نمو گیاه و نقش آن در دفاع گیاه، مورد بحث است. بدین منظور محتوای کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز، پرولین، پروتئین کل و کربوهیدارت گیاه و همچنین اسیدیته و هدایت الکتریکی خاک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش‌ها نشان داد که نمک‌های سیلیسیوم با افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و پروتئین کل باعث افزایش مقاومت باقلا نسبت به *R. solani* می‌شود، اما میزان پرولین کاهش می‌یابد. هیچ‌کدام از این نمک‌ها تأثیری روی میزان کربوهیدرات گیاه، اسیدیته و هدایت الکتریکی خاک نداشتند. بنابراین مهار بیمارگر در اثر تأثیر مستقیم روی pH خاک نبوده است. بررسی‌های پیشین نشان داده که غلظت‌های مختلف سیلیکات‌های سدیم و پتاسیم به صورت تدریجی باعث افزایش میزان pH محیط‌کشت‌ها و در نتیجه کاهش میزان رشد بیمارگر می‌شود (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al., 2017)، اما احتمالاً خاصیت قوی بافری خاک از تغییر pH در نتیجه‌ی افزودن نمک‌های معدنی جلوگیری می‌کند.

به طور کلی در این پژوهش گیاهان باقلایی که توسط قارچ *R. solani* مایه‌زنی شده و با نمک‌های سیلیکاتی تیمار شده‌اند، نسبت به گیاهانی که تنها با قارچ مایه‌زنی شده‌اند، مقدار کاتالاز بیش‌تری تولید کردند. این موضوع نشان می‌دهد که مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری به عنوان یک تنش زنده‌ی خارجی و تیمار گیاه با نمک‌های سیلیکاتی موجب تحریک گیاهان به فعال شدن یا افزایش سازوکارهای دفاعی روی گیاه باقلا می‌شود. این سازوکار در این مورد مربوط به فعالیت کاتالاز است که می‌تواند سطح هیدروژن پراکسید را در سلول گیاهی مهار کند (Khelifa et al., 2011). گونه‌های اکسیژن فعال از جمله پراکسید هیدروژن، در پاسخ به حمله‌ی بیمارگرها به سرعت در گیاه تولید می‌شود (Bolwell et al., 2002) و برای از بین بردن آن‌ها، در هنگام حمله‌ی بیمارگرها آنزیم کاتالاز افزایش می‌یابد (Cherif et al., 1994). مقدار کاتالاز افزون بر تنش‌های زیستی در اثر تنش‌های غیرزیستی نیز افزایش می‌یابد، مثلاً مشخص شده که در کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش شوری میزان این آنزیم افزایش یافته است (Abili and Zare, 2014).

در مطالعه‌ی حاضر تنش گیاهان به بیماری موجب افزایش آنزیم پراکسیداز شده و به کار بردن تیمار سیلیکات سدیم و سیلیکات پتاسیم در گیاهان تحت تنش بیمارگر باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم گردید. این موضوع نشان دهنده‌ی افزایش این آنزیم تحت شرایط مذکور است و احتمالاً از این طریق می‌تواند در کاهش مرگ‌ومیر ناشی از بیمارگر اثر داشته باشد. آنزیم پراکسیداز در قسمت‌های مختلف سلول از جمله هسته، میتوکندری، ریبوزوم، دیواره سلولی و غشای سلولی یافت می‌شود. فعالیت پراکسیداز با مقاومت در برابر بیماری در گیاهان مرتبط است (Hammerschmidt and Kuć, 1982).

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی یا PRPs، پروتئین‌های هستند که توسط گیاه در مقابل عامل بیماری‌زا تولید می‌شود و در فعال شدن سامانه‌ی دفاعی فعال گیاه نقش تعیین‌کننده‌ای دارند. این پروتئین‌ها می‌توانند باعث محدود کردن گسترش بیمارگر در داخل گیاه شوند (Liu and Ekramoddoullah, 2006). از جمله پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، می توان به پراکسیداز خانواده (PR-9) اشاره کرد. دخالت آنزیم پراکسیداز در واکنش‌های دفاعی و اثر بازدارندگی آن روی رشد عوامل

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری‌زا اثبات شده است (Macko et al., 1968; Lehrer, 1969).

ارزیابی فعالیت پراکسیداز نشان داد که *R. solani* به تنهایی باعث افزایش فعالیت این آنزیم و در نتیجه القای مقاومت در گیاه باقلا می‌شود. اما میزان این آنزیم از نظر آماری در تیمار سیلیکات سدیم و سیلیکات پتاسیم و بیمارگر به صورت توام نسبت به زمانی که فقط بیمارگر وجود دارد، از میزان بالاتری برخوردار است. آنزیم پراکسیداز با دخالت در مرحله‌ی نهایی تولید لیگنین موجب افزایش مقاومت به بیماری می‌شود (Murthy et al., 2014). غده‌های سیب‌زمینی مقاوم نسبت به ارقام حساس وقتی که در معرض *Phytophthora infestans* de Bary قرار می‌گیرند لیگنین در آن‌ها با سرعت بیش‌تری رسوب می‌کند (Bekker, 2007). این فرایند ممکن است منجر به شکست قارچ در رخنه کردن به بافت سیب‌زمینی شود. بنابراین این احتمال وجود دارد که تیمار سیلیسیوم در حضور بیمارگر منجر به تولید مقدار بیشتر آنزیم پراکسیداز و در نتیجه رسوب مقدار بیش‌تری لیگنین در بافت گیاه باقلا شود و از این راه‌ها از نفوذ بیمارگر به بافت گیاه جلوگیری کند. از طرفی مشخص شده است که آنزیم‌های ضد اُکسایش کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز بیش‌ترین سهم را برای مقاومت به تنش در اثر حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاهان بر عهده دارند (Bergmann et al., 1999).

بسیاری از آنزیم‌ها از جمله پلی‌فنول اکسیداز، پراکسیداز، کیتیناز و محتویات فنولی در ارتباط با مقاومت القایی سیستمیک هستند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مقدار آنزیم پلی‌فنول اکسیداز در گیاهان بیماری که با *R. solani* مایه‌زنی شده بودند و هیچ‌گونه نمکی دریافت نکرده‌اند نسبت به گیاهان سالم بدون نمک به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد. هم‌سو با مطالعه‌ی حاضر، Cherif et al. (1994) نشان دادند که در خیار آلوده به *Pythium ultimum* Trow و *Py. aphanidermatum* (Edson) Fitzp. که با سیلیسیوم تیمار شده، باعث فعال‌سازی سازوکار دفاعی با افزایش فعالیت پلی‌فنول اکسیداز می‌شود. همچنین آن‌ها نشان دادند که میزان آنزیم پلی‌فنول اکسیداز در گیاهان سالم تیمار شده با نمک و گیاهان سالمی که نمک دریافت نکرده‌اند، تفاوتی نداشت. اما تفاوت بین گیاهان مایه‌زنی شده و مایه‌زنی نشده مشاهده شد که با مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد. همان‌طور که از نتایج بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز قابل مشاهده است، القای فعالیت این آنزیم توسط *R. solani* انجام گرفت. القای فعالیت پلی‌فنول اکسیداز به واسطه‌ی حمله‌ی بیمارگرها در گیاهان مختلف تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای گزارش شده است (Chen et al., 2000). در پژوهش حاضر میزان پلی‌فنول اکسیداز در حضور بیمارگر و پس از تیمار با سیلیکات سدیم و سیلیکات پتاسیم به صورت معنی‌داری در قیاس با گیاهان بیماری که با *R. solani* مایه‌زنی شده بودند و هیچ‌گونه نمکی دریافت نکرده بودند افزایش یافت. ارتباط بین افزایش آنزیم‌های دفاعی و مقاومت بیش‌تر به عوامل بیماری‌زا توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (Raj et al., 2006; Van Loon, 2007). مقایسه‌ی میزان فعالیت پلی‌فنول اکسیداز در گیاهان بیمار بدون تیمار نمک و گیاهان بیماری که با نمک‌های سیلیکات سدیم و سیلیکات پتاسیم تیمار شده بودند، اختلاف قابل توجهی را نشان داد.

پلی‌فنول اکسیداز سبب اکسیده شدن پلی‌فنول‌ها به کینون‌ها (ترکیبات ضد میکروبی) و لیگنینی شدن دیواره‌ی سلولی گیاهی طی آلودگی میکروبی می‌شود. همچنین در واکنش تدافعی و فوق حساسیت که سبب مقاومت به قارچ می‌شود، شرکت دارد (Kosuge, 1969; Retig, 1974). گیاهان همواره از طریق طیف وسیعی از ترکیبات دفاعی در

www.SID.ir

Archive of SID

برابر عوامل بیماری‌زا گیاهی و آفات مقاومت می‌کنند. پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز از جمله آنزیم‌های مرتبط با دفاع در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا گیاهی هستند. این آنزیم‌ها اُکسایشی هستند و در ساخت و استفاده از اکسیژن‌های فعال، تشکیل لیگنین و دیگر فنول‌های اکسید شده به شکل سدهای دفاعی برای استحکام ساختار سلولی دخیل هستند (Chen et al., 2000) و آنزیم پلی‌فنول اکسیداز ممکن از این طریق موجب کاهش خسارت ناشی از بیمارگرها شود.

از آن‌جایی که مقدار پرولین در گیاه به عنوان یک شاخص تنش محسوب می‌شود می‌توان گفت که در تیمارهای که مقدار این آمینواسید کاهش پیدا کرده، تنش هم کم‌تر شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که در گیاهان بیماری که هیچ‌گونه نمکی دریافت نکرده‌اند نسبت به گیاهان سالم بدون نمک مقدار پرولین به صورت معنی‌داری افزایش یافته است. بررسی‌ها نشان داده است که میزان پرولین برگ در گیاهان عالی در پاسخ به تنش‌های زیستی افزایش می‌یابد (Fabro et al., 2004;). پرولین در بسیاری از گیاهان در اثر شرایط مختلف تنش‌های محیطی مانند کمبود آب، شوری، دمای زیاد و شدت نور زیاد تجمع پیدا می‌کند (Claussen, 2005). هر عاملی که باعث کاهش پتانسیل آبی شود، باعث تجمع پرولین می گردد (Kuznetsov and Shevyakova, 1999). هم‌سو با مطالعه‌ی حاضر، نشان داده شده است که مقدار پرولین در برگ گیاه گوجه‌ی آلوده به *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan افزایش می‌یابد (Grote et al., 2006). به طور مشابه در درختان کاکائو (*Theobroma cacao* L.) آلوده شده با *Phytophthora megakarya* Brasier & MJ Griffin پرولین در شرایط آلودگی ظاهر می‌شود (Djocgoue et al., 2011). اما نتایج این آزمایش نشان داد که گیاهان بیماری که نمک دریافت کرده‌اند درمقایسه با گیاهان بیمار بدون نمک مقدار پرولین به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد. سیلیسیوم در گوجه و اسفناج باعث کاهش چشم‌گیر مالون‌دی‌آلدئید، نفوذپذیری غشا، پرولین و پراکسید هیدروژن می‌شود (Hsieh et al., 2002). همچنین گزارش شده است که استفاده از سیلیکات سدیم و سیلیکات پتاسیم باعث کاهش پرولین در گل داوودی شده است (Hajipour and Jabbarzadeh, 2015). دلیل کاهش پرولین این است که سیلیسیوم، اثرات تنش را کاهش و سازوکارهای سامانه‌ی آنتی‌اکسیدانی را در گیاه فعال می‌کند. بطور مثال، سیلیسیوم می‌تواند مقدار پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید را کم کند که این موضوع متقابلاً باعث کاهش پرولین می‌شود (Hajipour and Jabbarzadeh, 2015).

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در اثر حمله‌ی بیمارگر یا تغذیه‌ی حشرات، زخم، تنش‌های محیطی و هورمون‌هایی مانند اتیلن و اسید سالیسیلیک در گیاه پدید می‌آیند و در مقاومت علیه بیمارگرها نقش دارند. این پروتئین‌ها به ۱۷ خانواده تقسیم‌بندی شده‌اند (Hacquard et al., 2016). از طرفی سیلیسیوم در القای مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها دخالت دارد (Bekker, 2007). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پروتئین کل در گیاهان بیماری که توسط *R. solani* مایه‌زنی شده بودند و هیچ‌گونه نمکی دریافت نکرده‌اند نسبت به گیاهان سالم بدون نمک به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. افزایش میزان پروتئین در گیاهان در معرض تنش نسبت به شاهد می‌تواند به این علت باشد که گیاهان نسبت به تنش‌های زیستی با تولید پروتئین‌های مرتبط با بیمارهای گیاهی و پروتئین‌های دیگر پاسخ می‌دهند (Veeranagamallaiah et al., 2008). نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار سیلیسیوم در گیاهان بیمار باعث

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش معنی‌دار مقدار پروتئین کل در مقایسه با گیاهان بیماری بود که سیلیسیوم دریافت نکرده بودند. سیلیسیوم با افزایش پروتئین محلول در گندم باعث جبران خسارت ناشی از تنش خشکی می‌شود (Tale Ahmad and Haddad, 2011). همچنین اضافه کردن سیلیسیوم به محلول غذایی باعث افزایش پروتئین کل در ذرت تحت تنش کم‌آبی می‌شود (Moussa, 2006). گزارش شده است که سیلیسیوم در عملکرد آرایِ پیک (mRNA) و دی‌اِیِ (DNA) نقش دارد و باعث اتصال آمینواسیدها به هم و تشکیل پروتئین‌های خاص می‌شود. سیلیسیوم بر میزان بیان ژن و تغییر بیان ژن اثرگذار است (Abbas et al., 2015).

به نظر می‌رسد که افزایش در میزان پروتئین محلول در تیمار سیلیسیوم در مقایسه با تیمار بدون سیلیسیوم به دلیل سنتز پروتئین‌های جدید و یا افزایش سطح پروتئین‌های مرتبط با سازگاری و تطابق گیاه به شرایط بیماری است که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های ضد اُکسایش اشاره کرد که در تیمار سیلیسیوم به میزان زیادی افزایش پیدا کردند.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مقدار کربوهیدرات در گیاهان بیمار که هیچ‌گونه نمکی دریافت نکرده‌اند نسبت به گیاهان سالم بدون نمک به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. اما هیچ‌گونه تفاوتی بین گیاهان بیماری که نمک‌های سیلیکات سدیم و سیلیکات پتاسیم تیمار شده بودند، نسبت به شاهد بیمار مشاهده نشد. به این معنی که یون سیلیسیوم هیچ‌گونه تأثیری بر مقدار تولید کربوهیدرات نداشته است. مشخص شده است که کربوهیدرات در بافت آواکادو آلوده به *Phytophthora cinnamomi* Rands افزایش می‌یابد (Bishop et al., 2002). در گیاه باقلا آلوده شده با (Sass & Magnus) Briosi & Cavara. *Colletotrichum lindemuthianum* نیز مقدار کربوهیدرات کل افزایش پیدا کرده است (Lobato et al., 2008) که با آزمایش حاضر مطابقت دارد. کربوهیدرات‌ها بلوک‌های سازنده‌ی اساسی برای ساختن مواد شیمیایی دفاعی مانند مواد فنولی، فیتوالکسین‌ها و لیگنین محسوب می‌شوند. بنابراین کمیت و کیفیت قندها نقش مهمی در مقاومت به بیماری‌ها بازی می‌کند (Vidhyasekaran and Kandasamy, 1972). کربوهیدارت‌های خاصی مثل ساکاروز، گلوکز و گالاکتوز در بعضی از واکنش بیماری با مقاومت نسبت به بیماری مرتبط هستند. نشان داده شده که تغییر مقدار قند در برگ‌ها می‌تواند یک راه احتمالی برای مهار بیماری باشد (Mohammadi and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, 2018).

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار با نمک‌های سیلیسیوم به احتمال زیاد با افزایش بیان ژن‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز تحت تنش بیماری ناشی از *R. solani* و افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اُکسایش و کاهش محتوای رادیکال‌های آزاد در سلول، مانع از خسارت اُکسایشی به سلول گیاهی می‌شود. در نتیجه‌ی این کاهش تنش، مقدار پرولین هم در گیاهان بیماری که تیمار سیلیسیوم دریافت کرده‌اند کاهش پیدا می‌کند. همچنین سیلیسیوم باعث افزایش پروتئین کل شد که در مقاومت علیه بیمارگر نقش دارد. در نتیجه یون‌های سیلیسیوم می‌توانند در بهبود تحمل گیاه باقلا نسبت به بیماری‌های ناشی از *R. solani* نقش داشته باشند.

با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، پیشنهاد می‌شود که میزان تغییرات این متابولیت‌ها روی سایر میزبان‌های طبیعی و چندساله هم اندازه‌گیری شود. همچنین به نظر می‌رسد که علاوه بر این متابولیت‌ها میزان سوپراکسید دیسموتاز و مقدار فنول کل را، که از شاخص‌های واکنش به تنش‌های زیستی هستند، می‌توان اندازه‌گیری کرد. همچنین آزمون تیمار نمک‌های سیلیسیوم در محیط مزرعه به شکل کود شیمیایی ممکن است یافته‌های دقیق‌تری به دست دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

Abbas, T., Balal, R.M., Shahid, M.A., Pervez, M.A., Ayyub, C.M., Aqueel, M.A., and Javaid, M.M. 2015. Silicon-induced alleviation of NaCl toxicity in okra (*Abelmoschus esculentus*) is associated with enhanced photosynthesis, osmoprotectants and antioxidant metabolism. Acta Physiologiae Plantarum, 37: 1-15.

Abili, J., and Zare, S. 2014. Evaluation of antioxidant enzymes activity in canola under salt stress. International Journal of Farming and Allied Sciences, 3: 767-771.

Adatia, M.H., and Besford, R. T. 1986. The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. Annals of Botany, 58: 343-351.

Ahmad, R., Zaheer, S.H., and Ismail, S. 1992. Role of silicon in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Science, 85: 43-50.

Azimi, S., Farokhinezhad, R., and Mosavijaraf, A. 2005. Isolation and pathogenicity of some anastomosis groups of *Rhizoctonia* associated with faba bean root and crown in Khuzestan province. Iranian Journal of Plant Pathology, 41: 329-343.

Bates, L.S. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.

Bekker, T.F. 2007. Efficacy of water-soluble silicon for control of *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocado. Doctoral dissertation, University of Pretoria, Pretoria, South Africa.

Bergmann, H., Lippmann, B., Leinhos, V., Tiroke, S., and Machelett, B. 1999. Activation of stress resistance in plants and consequences for product quality. *Angewandte Botanik*, 73: 153-161.

Bishop, D.L., Chatterton, N.J., Harrison, P.A., and Hatfield, R.D. 2002. Changes in carbohydrate partitioning and cell wall remodeling with stress-induced pathogenesis in wheat sheets. Physiological and Plant Pathology, 61: 53-63.

Bolwell, P., Bindschedler, L., Blee, V., Butt, A., Dwei, R., Gardner, S., Gerrish, C., and Minibayeva, F. 2002. The apoplastic oxidative berst in response to biotic stress in plants: a three-component system. Journal of Experimental Botany, 53: 1367-1376.

Bradbury, M., and Ahmad, R. 1990. The effect of silicon on the growth of *Prosopis juliflora* growing in saline soil. Plant and Soil, 125: 71-74.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

www.SID.ir

Archive of SID

Chance, B., and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymologist, 11: 764-755.

Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N., and Paulitz, T.C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56: 13-23.

Cherif, M., Asselin, A., and Belanger, R. 1994. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. Phytopathology, 84: 236-242.

Claussen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. Plant Science, 168: 241-248.

Datnoff, L.E., Seebold, K.W., and Correa-Victoria, F.J. 2001. The use of silicon for integrated disease management: Reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. In Datnoff, L.E., Snyder, G., and Korndorfer, G.H. (Eds.). Silicon in agriculture. Elsevier Science, The Netherlands. Pp. 171-184.

Deliopoulos, T., Kettlewell, P.S., and Hare, M.C. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts. Crop Protection, 29: 1059-1075.

Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., and Thorpe, T.A. 1981. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany, 32: 93-101.

Djocgoue, P.F., Mbouobda, H.D., Boudjeko, T.H., Effa, P.O., and Omokolo, D.N. 2011. Amino acids, carbohydrates and heritability of resistance in the *Theobroma cacao*/*Phythophthora megakarya* interaction. Phytopathologia Mediterranea, 50: 370-383.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.

Fabro, G., Kovács, I., Pavet, V., Szabados, L., and Alvarez, M.E. 2004. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in arabidopsis. The American Phytopathological Society, 17: 343-350.

Fauteuxet, F., Rémus-Borel, W., Menzies, J.G., and Bélanger, R.R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. FEMS Microbiology Letters, 249: 1-6.

www.SID.ir

Archive of SID

Gali, H.V., and Smith, C.C. 1992. Effect of silicon on growth, fertility, and mineral composition of an annual brome, *Bromus secalinus* L. (Gramineae). American Journal of Botany, 79: 1259-1263.

Ghanati, F., Morita, A., and Yokota, H. 2002. Induction of suberin and increase of liginin content by exess Boron in Tabacco cell. Soil Science and Plant Nutrition, 48: 357-364.

Grote, D., Schmidt, R., and Claussen, W. 2006. Water uptake and proline index as indicators of predisposition in tomato plants to *Phytophthora nicotianae* infection as influenced by abiotic stresses. Physiological and Molecular Plant Pathology, 69: 121-130.

Guntzer, F., Keller, C., and Meunier, J.D. 2011. Benefits of plant silicon for crops. Agronomy for Sustainable Agriculture, 32: 201-213.

Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Münch, P.C., Garrido-Oter, R., Thon, M.R., and Henrissat, B. 2016. Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. Nature communications, 7(1): 1-13.

Hajipour, H., and Jabbarzadeh, Z. 2016. Effect of foliar application of silicon on physiological responses of chrysanthemum (*Dendranthema* × *grandiflorum*) at two different growth stages. Journal of Ornamental Plants, 6(1): 39-47.

Hammerschmidt, R., and Kuć, J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. Physiological Plant Pathology, 20: 61-71.

Horiguchi, T. 1988. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants. IV. Effects of silicon on alleviation of manganese toxicity of rice plants. Soil Science and Plant Nutrition, 34: 65-73.

Hossain, M.T., Mori, R., Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Fujii, S., Yamamoto, R., and Hoson, T. 2002. Growth promotion and an increase in cell wall extensibility by silicon in rice and some other *Poaceae* seedlings. Plant Research, 115: 23-27.

Hsieh, T.H., Lee, J.T., Charng, Y.Y., and Chan, M.T. 2002. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. Plant Physiology, 130: 618-626.

Iwasaki, K., Maier, P., Fecht, M., and Horst, W.J. 2002. Leaf apoplastic silicon enhances manganese tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata*). Plant Physiology, 159: 167-173.

Jones, L., and Handreck, K. 1967. Silica in soils, plants, and animals. Advances in Agronomy, 19: 107-149.

www.SID.ir

Archive of SID

Khelifa, S., M'Hamdi, M., Rejeb, H., Belbahri, L., and Souayeh, N. 2011. Relation between catalase activity, salt stress and urban environment in *Citrus aurantium* L. Journal of Agriculture and Forestry, 3: 186-189.

Khoshgoftarmanesh, A.H., Mohaghegh, P., Sharifnabi, B., Shirvani, M., and Khalili, B. 2012. Silicon nutrition and *Phytophthora drechsleri* infection effects on growth and mineral nutrients concentration, uptake, and relative translocation in hydroponic-grown cucumber. Plant Nutrition, 35: 1168-1179.

Kosuge, T. 1969. The role of phenolics in host response to infection. Annual Review of Phytopathology, 7: 195-222.

Kuznetsov, V.L.V., and Shevyakova, N.I. 1999. Proline under stress: Biological role, metabolism, and regulation. Russian Journal of Plant Physiology, 46: 274-286.

Lehrer, R.I. 1969. Antifungal effects of peroxidase systems. Journal of Bacteriology, 99: 361-365.

Liu, J.J., and Ekramoddoullah, A.K. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. Physiological and Molecular Plant Pathology, 68: 3-13.

Lobato, A.K.S., Gonçalves-Vidigal, M.C., Filho, P.S.V., Costa, R.C.L., Cruz, F.J.R., Santos, D.G.C., Silva, C.R., Silva, L.I., and Sousa, L.L. 2008. Changes in photosynthetic pigment and carbohydrate content in common bean cultivars infected by *Colletotrichum lindemuthianum.* Plant, Soil and Environment, 55: 58-61.

Macko, V., Woodbury, W., and Stahmann, M.A. 1968. Effect of peroxidase on germination and growth of mycelium of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology, 58: 1250.

Marschner, H., Oberle, H., Cakmak, I., and Romheld, V. 1990. Growth enhancement by silicon in cucumber plants (*Cucumis sativus*) depends on imbalance on phosphorus and zinc supply. Plant and Soil, 124: 211-219.

Mills, A.A.S., Platt, H.W., and Hurta, R.A.R. 2004. Effect of salt compounds on mycelial growth, sporulation and spore germination of various potato pathogens. Postharvest Biology and Technology, 34: 341-350.

Mohaghegh, P., Khoshgoftarmanesh, A.H., and Shirvani, M. 2011. Effect of silicon nutrition on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in cucumber. Plant Disease, 95: 455-460.

www.SID.ir

Archive of SID

Mohammadi, A., and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. 2018. Effect of silicon salts on physiological changes in broad bean infected by *Phytophthora pistaciae*. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 41:61-73.

Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Hussaini, K., and Ghasemi-Fasaei, R. 2017. Activity of two silicon salts in controlling the pistachio gummosis-inducing pathogen, *Phytophthora pistaciae*. Australasian Plant Pathology, 46: 323–332.

Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Hussaini, K., and Ghasemi-Fasaei, R. 2018. Effects of calcium salts in controlling *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis. European Journal of Plant Pathology, 151: 475-485.

Moussa, H.R. 2006. Influence of exogenous application of silicon on physiological response of salt-stressed maize (*Zea mays* L.). International Journal of Agriculture and Biology, 8: 293-297.

Murthy, K.N., Uzma, F., and Srinivas, C.C. 2014. Induction of systemic resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. American Journal of Plant Sciences, 5: 1799-1811.

Raj, S.N., Sarosh, B.R., and Shetty, H.S. 2006. Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. Functional Plant Biology, 33: 563-571.

Raven, J.A. 1983. The transport and function of silicon in plants. Biological Reviews, 58: 179-207.

Retig, N. 1974. Changes in peroxidase and polyphenoloxidase associated with natural and induced resistance of tomato to Fusarium wilt. Physiological Plant Pathology, 4: 145-150.

Rhoades, J.D. 1996. Salinity: electrical conductivity and total dissolved solids. In Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnston, C.T., and Sumner, M.E. (Eds.). Methods of soil analyses. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy. USA. Pp. 417-435.

Sabahi, F., and Banihashemi, Z. 2015. Identification of anastomosis groups of *Rhizoctonia* sp. from soil and organic materials in ornamental landscapes in Shiraz. Iranian Journal of Plant Pathology, 51: 555-561.

Sabbaghpour, S.H. 2004. Determination of suitable sowing date for faba bean c.v. Barakat for double cropping of cotton and faba bean. Iranian Journal of Crop Sciences, 6: 1-3.
SAS Institute. 1999. SAS Users Guide. SAS institute Inc., Cary, NC. USA.

www.SID.ir

Archive of SID

Savant, N.K., Datnoff, L.E., and Snyder, G.H. 1997a. Depletion of plant-available silicon in soils: A possible cause of declining rice yields. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 28: 1245-1252 .

Savant, N.K., Snyder, C.H., and Datnoff, L.E. 1997b. Silicon management and sustainable rice production. Advances in Agronomy, 58: 151-199.

Tale Ahmad, S., and Haddad, R. 2011. Study of silicon effects on antioxidant enzyme activities and osmotic adjustment of wheat under drought stress. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 47: 17-27.

Van Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology, 119: 243-254.

Veeranagamallaiah, G., Jyothsnakumari, G., Thippeswamy, M., Reddy, P.C.O., Surabhi, G.K., Sriranganayakulu, G., Mahesh, Y., Rajasekhar, B., Madhurarekha, C., and Sudhakar, C. 2008. Proteomic analysis of salt stress responses in foxtail millet (*Setaria italica* L. cv. Prasad) seedlings. Plant Science, 175: 631-641.

Vidhyasekaran, P., and Kandasamy, D. 1972. Carbohydrate metabolism of Phaseolus aureus infected with obligate and facultative parasites. Indian Phytopathology, 25: 48.

Wang, Y., Stass, A., and Horst, W.J. 2004. Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. Plant Physiology, 136: 3762-3770.

Williams, D.E., and Vlamis, J. 1957. The effect of silicon on yield and manganese-54 uptake and distribution in the leaves of barley grown in culture solutions. Plant Physiology, 32: 404-409.

Yoshida, S., Nasavero, S.A., and Ramirez, E.A. 1969. Effect of silica and nitrogen supply on some leaf characters of the rice plant. Plant and Soil, 31: 48-56.

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of silicon salts on physiological changes in broad bean infected by *Rhizoctonia solani*

A. Mohammadi[1], R. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa[2*] and F. Salmaninezhad[3]

1. M.Sc. graduate of Plant Pathology, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. ***Corresponding Author:** Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran (rmostofi@shirazu.ac.ir)
3. Ph.D. candidate of Plant Pathology, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

(DOI): 10.22055/PPR.2020.16047

Received: 18 August 2020 Accepted: 8 November 2020

Abstract

Background and Objectives

Silicon is the most common soil element which has beneficial effects to enhance the tolerance to biotic and abiotic stresses in plants. The addition of silicon to plant nutrient solution decreases sodium concentration, increases plant growth, has positive effects on plant reproduction, and increases mechanical resistance. Also, silicon affects absorption and translocation of several macro- as well as micronutrient elements and imposes the formation of precipitates under cuticle reduces plant transpiration, and causes resistance to stresses such as side effects of excessive phosphorus and heavy metals (high concentration of manganese and aluminum) or salinity. Furthermore, silicon salts can significantly reduce the diseases in broad bean by reducing the percentage of root colonization and plant death, as well as decreasing root rot compared to controls. Silicon salts such as sodium and potassium silicate cause significant reduction in growth, asexual organ reproduction, and dry weight of hyphae, and prevent cysts' germination in some plant pathogens such as *Phytophthora* species. The application of silicon salts before and after inoculation of sterilized soil with *Phytophthora pistaciae* significantly reduces the disease by reducing the percentage of colonized roots and the broad bean's mortality. In this study, *in vivo* activities of sodium and potassium silicate in controlling *Rhizoctonia solani* were evaluated.

Material and Methods

Studying the effect of sodium silicate (0.5 mM) and potassium silicate (2 mM) to increase the resistance of broad bean against *R. solani* a factorial experiment in a completely randomized design with salt treatments before and after inoculation was conducted. The level of catalase, peroxidase, polyphenol oxidase, proline, total protein, and carbohydrates in plants, as well as pH and the electrical conductivity of soil were examined.

www.SID.ir

Archive of SID

Results

The results showed that silicon salts might enhance broad bean resistance to *R. solani* by increasing the level of catalase, peroxidase, polyphenol oxidase, and total protein and decreasing proline. None of the salts had any effects on the level of the plants' carbohydrate content and pH, and the electrical conductivity of soil. As a result, controlling the pathogen is not directly affected by soil pH.

Discussion

Due to the results, it can be concluded that the role of silicon salts in promoting broad been tolerance could be due to increasing the activities of the antioxidant enzymes which in turn reduced the oxidative damages of reactive oxygen species produced under disease stress.

Keywords: Antioxidant activity, Biotic stress, Root pathogen, Silicates

www.SID.ir