فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال دوم، شماره سوم، بهار ۱۳۹۳
صص ۲۶-۱۳

مدیریت بیماری پژمردگی گوجه فرنگی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* با استفاده از تلفیق سیلیکون و *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) و بررسی فعالیت آنزیم PAL (فنیل آلانین آمونیالیاز)

مریم توکل نورآبادی*[۱]، نوازاله صاحبانی[۲]، حسن رضا اعتباریان[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۲۱

چکیده

در این تحقیق اثر کاربرد سیلیکون و باکتری *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) روی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* و القای مقاومت میزبان در مقابل پاتوژن مورد بررسی قرار گرفت. اثر غلظت‌های مختلف سیلیکون (۷-۱ میلی مولار) بر رشد *Pseudomonas fluorescens* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* آزمایش شد. نتایج نشان داد که همه غلظت‌های سیلیکون روی رشد باکتری اثر منفی داشتند، اما تا غلظت ۵ میلی مولار بر روی قارچ تاثیر منفی نداشت ولی در غلظت ۶ و ۷ میلی مولار با شاهد اختلاف معنی داری داشتند. بر اساس تاثیر سیلیکون بر روی رشد باکتری، غلظت ۳ میلی مولار برای کارهای گلخانه ای انتخاب شد. این آزمایش به روش کاربرد باکتری و سیلیکون قبل از آلودگی با قارچ عامل بیماری صورت گرفت. نتایج آزمایشات گلخانه ای نشان داد که تیمار خاک با باکتری و سیلیکون به صورت هوایی بیش‌ترین تاثیر را بر روی کاهش شاخص‌های بیماری و افزایش رشد گیاه داشت. هم‌چنین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در تیمار کاربرد تلفیقی باکتری و سیلیکون به صورت هوایی در مقایسه با کاربرد هر کدام به تنهایی و نیز گیاه شاهد سالم و آلوده افزایش پیدا کرده بود. بالاترین مقدار فعالیت این آنزیم ۵ روز بعد از کاربرد سیلیکون و باکتری بود. استفاده از سیلیکون به عنوان محرک شیمیایی و باکتری *Pseudomonas fluorescens* به عنوان عامل کنترل بیولوژیک و نیز افزایش دهنده‌ی رشد گیاه، می‌توان یک اقدام مفید و امید بخش برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی از قبیل *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* باشد.

واژه‌های کلیدی: سیلیکون، *Pseudomonas fluorescens* (CHAO)، *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

[۱]- دانشجوی کارشناسی ارشد، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۲]- دانشیار گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۳]- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر ری، شهر ری، ایران.
*- نویسنده مسئول مقاله: maryam.tavakol65@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گیاه گوجه فرنگی یک محصول مهم در جیره غذایی انسان می باشد که توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* عامل پژمردگی فوزاریومی مورد حمله قرار می‌گیرد. کنترل شیمیائی عوامل بیماری زا سبب عدم تعادل در جمعیت میکروبی خاک شده و ممکن است تاثیر سوء بر فعالیت میکرواورگانیسم‌های مفید داشته و باعث ایجاد و افزایش نژادهای مقاوم عوامل بیماری‌زا بشود. کنترل بیولوژیک با استفاده از باکتری‌های بهبود دهنده‌ی رشد گیاهان (PGPR)[1] به عنوان یک راه حل جایگزین برای مدیریت بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Jetiyanon and Kloepper, 2002). بین میکرواورگانیسم‌های مفید، سودوموناس‌های فلورسنت علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌های گیاهی شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها در گیاهانی مثل خیار، لوبیا، تنباکو تاثیر بسیار خوبی داشته‌اند (van Loon *et al*., 1998). هم‌چنین باکتری‌های تولید کننده‌ی اسپور مثل گونه‌های باکتری *Bacillus* در کنترل بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Kloepper *et al*., 2004). با این حال، کاربرد این میکروارگانیسم‌ها به تنهائی نتوانسته نتایج رضایت بخشی را بدهد (Raupach and Kloepper, 1998). کاربرد دو یا چند مورد از عوامل کنترلی می‌تواند تاثیر بسزایی در کنترل این عوامل بیماری زا داشته باشد (de Boer *et al*., 1999). کاهش مستقیم بیماری توسط میکرواورگانیسم‌های مفید از طریق رقابت بر سر غذا، فضا و نیچ اکولوژیکی و هم-چنین تولید ترکیبات ضد میکروبی می‌باشد. از بین این متابولیت‌ها ۲و۴- دی استیل فلورگلوسینول (2,4-DAPG) توسط طیف وسیعی از باکتری‌های سودوموناس تولید می‌شود (Dowling and O'Gara, 1994; Keel *et al*., 1996). ۲و۴-دی استیل فلور گلوسینول از ترکیبات فنلی می‌باشد که دارای خاصیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد نماتدی و خاصیت گیاهسوزی می‌باشد (Dowling and O'Gara, 1994). تاثیر غیر مستقیم آنها از راه القای مقاومت سیستمیک می‌باشد (Kloepper and Beauchamp 1992; Liu *et al*., 1995). مقاومت القائی یک بخش از توان دفاعی گیاه می‌باشد که در گیاه در پاسخ به حضور موجودات زنده و ترکیبات شیمیائی محرک تولید می‌شود (van Loon *et al*., 1998). کاهش میزان بیماری از طریق القاء مقاومت، از طریق آنزیم‌های دفاعی زیادی از جمله پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز انجام می‌گیرد که این آنزیم‌ها باعث کاتالیز شدن لیگنین و فنیل آلانین آمونیالیاز در مسیر تولید فیتوالکسین‌ها و ترکیبات فنلی شوند. تاثیر مقاومت القاء شده توسط استرین‌های باکتری-های بهبود دهنده رشد به خوبی نشان داده شده است (Ramanathan *et al*., 2002; Ramamoorthy *et al*., 2002; Nandakumar *et al*., 2001). سیلیکون یکی از مهم‌ترین عناصر ساختمانی در گیاهان می‌باشد. اگر چه سیلیکون به عنوان عنصر ضروری برای گیاه بشمار نمی‌رود، ولی دارای اثرات زیادی بر رشد محصولات و نیز مقاومت به بیماری‌ها در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی است. شواهد نشان داده که سیلیکون می‌تواند سبب فعال شدن پاسخ‌های دفاعی گیاه شده و القای مقاومت سیستمیک را باعث گردد. مطالعات مولکولی نشان داده است که سیلیکون می‌تواند سبب بیان ژن‌های مربوط به دفاع بشود و نقش مهمی در انتقال سیگنال مانند سالیسیلیک اسید، اتیلن و جاسمونیک اسید را دارد و این سیگنال‌ها (القاء کننده) باعث فعال شدن پاسخ‌های دفاعی می‌شود (Cai *et al*., 2009). کاهش شدت بیماری از طریق سیلیکون از طریق افزایش ترکیبات فنلی، لیگنین، فیتوالکسین‌ها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌باشد (Liang *et al*., 2005).

هدف از انجام این پژوهش استفاده از سیلیکون و باکتری *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) به تنهایی و در تلفیق با یکدیگر جهت کنترل بیماری پژمردگی گیاه گوجه فرنگی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* بوده است. در

[1]- Plant growth-promoting rhizobacteria

Archive of SID

www.SID.ir

این پژوهش هم‌چنین القای مقاومت در گیاهان از جنبه‌ی بیوشیمیایی با بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز مورد مطالعه واقع شد.

مواد و روش‌ها

کاشت گوجه فرنگی و شرایط نگهداری

به‌منظور کشت گیاه گوجه فرنگی از مخلوط کمپوست برگ، ماسه، پیتوپرلیت و خاک مزرعه به نسبت ۱:۲:۱:۱ و سترون شده در اتوکلاو استفاده شد و سپس سه عدد بذر رقم ارلی اوربانای Y در گلدان‌های کوچک با دهانه‌ی ۸ سانتی متری کاشته شد. در مرحله‌ی گیاهچه‌ای گلدانها تنک شدند به‌طوری که در هر گلدان یک گیاه باقی ماند و در شرایط یکنواخت (دمای ۲۵±۲°C و نور طبیعی اردیبهشت ماه) تا مرحله‌ی چهار تا شش برگی برای انجام آزمایش نگهداری شدند.

تهیه قارچ عامل بیماری

جدایه خالص قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* از کلکسیون آزمایشگاه بیماری شناسی گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان تهیه شد.

تهیه زاد مایه خاک آلوده به قارچ

برای تهیه سوسپانسیون اسپور، قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* را در محیط کشت PDA به مدت ۱۰ روز کشت داده، سپس قارچ رشد کرده را در شرایط استریل در داخل آب مقطر ریخته و سوسپانسیون حاصل را از پارچه ململ عبور داده شد تا میسلیوم‌های قارچ جدا شده و اسپورهای قارچ عبور بکنند. سپس غلظت مورد نیاز اسپور با استفاده از لام هموسیتومتری و شمارش تعداد اسپورها در زیر میکروسکوپ محاسبه گردید.

تهیه سوسپانسیون باکتری

سوش خالص باکتری *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) از کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی پردیس ابوریحان تهیه شد. پس از کشت باکتری در داخل پتری‌های حاوی محیط Nutrient Agar و نگهداری آنها به مدت ۴۸ ساعت، سوسپانسیونی از باکتری در شرایط استریل در داخل آب مقطر استریل تهیه و با کمک دستگاه اسپکتروفتومتری جمعیت آن تعیین شد. برای تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری با غلظت مورد نظر در این مطالعه (10^9CFU/ml) از طول موج ۵۹۰nm (OD=0.5) استفاده شد.

نگهداری جدایه باکتری

جهت نگهداری طولانی مدت باکتری بعد از اطمینان از خلوص آن یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری درون شیشه-های درب دار حاوی ۳-۲ میلی لیتر آب مقطر سترون منتقل و درب آنها با نوار پارافیلم مسدود شد. با این روش باکتری تا یکسال در دمای ۴ درجه سانتیگراد در یخچال قابل نگهداری خواهد بود.

نگهداری جدایه قارچ

قارچ مورد استفاده از گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تهیه شد. درون لوله‌های آزمایش مقدار مشخصی محیط کشت PDA ریخته و پس از اتوکلاو، محیط درون لوله‌ها به صورت مورب جامد شد. قارچ آنتاگونیست به این لوله‌ها منتقل شد و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شد. پس از ۳ روز به یخچال منتقل شدند و هر دو ماه یک بار تجدید کشت شد (Fradkin, 1985).

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه محلول سیلیکون (SiO_2)

برای تهیه غلظت ۱ تا ۷ میلی مولار از پودر سیلیکون شرکت مرک (Merck) استفاده شد. در این روش مقادیر لازم از پودر سیلیکون در آب مقطر حل شد و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد. جرم مولکولی سیلیکون ۶۰/۸ گرم می‌باشد که برای تهیه‌ی ۳ میلی مولار آن میزان ۰/۱۸ گرم پودر سیلیکون در ۱ لیتر آب مقطر حل شد (Oka *et al*., 1999).

بررسی تاثیر سیلیکون بر روی *Pseudomonas fluorescens* (CHAO)

در این آزمایش مقدار یک سی سی باکتری *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) با غلظت (10^9CFU/ml) در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ سی سی محیط کشت NB با غلظت‌های گوناگون سیلیکون (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ میلی مولار) ریخته شد و پس از ۲۴ ساعت میزان رشد باکتری در طول موج ۵۹۰nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد.

بررسی تاثیر سیلیکون بر روی رشد قارچ عامل بیماری

غلظت‌های گوناگون سیلیکون (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ میلی مولار) هر کدام در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت PDA ترکیب و در ظروف کشت‌های ۹ سانتی‌متری ریخته شد. سپس یک قطعه ۵ میلی متری از کشت ۷ روزه قارچ در وسط هر کدام از پتری‌های کشت قرار داده شد. تهیه محیط کشت حاوی سیلیکون به این صورت بود که در هر لیتر آب مقطر مقداری از سیلیکون مورد نیاز را محاسبه کرده و ریخته شد و سپس پودر PDA به میزان توصیه شده به داخل بطری مدرج ریخته شده و اتوکلاو گردید. نتیجه‌ی آزمایش زمانی که کلنی قارچ تمام سطح پتری شاهد را فرا گرفت مورد ارزیابی قرار گرفت و در صد بازدارندگی سیلیکون روی قارچ از فرمول N=A-B/A * 100 محاسبه گردید.

A= قطر یا شعاع رشد کلنی شاهد، B= قطر یا شعاع رشد کلنی تیمار، N= درصد بازدارندگی (Etebarian *et al*., 2005).

آزمایش با ۸ تیمار و ۴ تکرار در قالب طرح کامل تصادفی انجام گرفت.

اثر سیلیکون و *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) بر روی رشد گیاه و شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی

ابتدا گیاه با محرک‌ها تیمار و بعد از ۴۸ ساعت با عامل بیماری آلوده سازی گردیدند. تیمارها شامل۱- گیاه سالم (شاهد سالم)، ۲- گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری (شاهد آلوده)، ۳-گیاه سالم به همراه سیلیکون (به روش خیساندن)، ۴- گیاه سالم به همراه سیلیکون (اسپری هوایی)، ۵- گیاه سالم به همراه باکتری، ۶- گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری و ریختن باکتری به پای گیاه (خیساندن خاک)، ۷- گیاه آلوده به عامل بیماری و افزودن محلول ۳ میلی مولار سیلیکون به پای گیاه (خیساندن خاک)، ۸ -گیاه آلوده به عامل بیماری و افزودن محلول ۳ میلی مولار سیلیکون (SiO_2) به صورت هوایی (اسپری هوایی) ۹ و۱۰- گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری و تیمار شده با هر دو نوع محرک زنده *Pseudomonas fluorescens* و غیر زنده (سیلیکون)، کاربرد هر دو به صورت زمینی (خیساندن خاک) و یا کاربرد باکتری به صورت زمینی و سیلیکون به صورت اسپری برگها بود. طبق بررسی‌های انجام گرفته در آزمایشگاه سیلیکون به غلظت ۳ میلی مولار در این آزمایش مورد استفاده قرارگرفت. برای آلوده‌سازی گیاهان از زاد مایه تهیه شده‌ی جدایه قارچ عامل بیماری که قبلا در تحقیقات همسو با این پایان نامه توسط تست بیماری زایی در گلخانه درجه‌ی بالای بیماری زایی آن به اثبات رسیده بود استفاده شد. آلوده سازی به روش خیساندن خاک با سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^6 به میزان ۲۵ سی سی (Sahebani, 2004) در اطراف ریشه‌ی گیاه انجام گرفت. ۸ هفته بعد از مایع زنی و ظهور کامل علائم، شاخص شدت بیماری (جدول ۱) و فاکتورهای رشد شامل وزن تازه ریشه و اندام‌های هوایی بوته اندازه گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۰ تیمار و چهار تکرار انجام شد. آنالیزهای آماری نیز با استفاده از نرم افزار SAS (9.0) و مقایسه‌ی میانگین‌ها به روش دانکن انجام گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- شاخص علائم برگ (زردی و پژمردگی برگها) در گیاهان مایه زنی شده با قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

مقیاس شاخص علائم برگ‌ها	علائم
۰	صفر تا ۱۰ درصد زردی یا پژمردگی برگ‌ها
۱	۱۰ تا ۲۰ درصد زردی یا پژمردگی برگ‌ها
۲	۲۰ تا ۳۰ درصد زردی یا پژمردگی برگ‌ها
۳	۳۰ تا ۴۰ درصد زردی یا پژمردگی برگ‌ها
۴	۴۰ تا ۵۰ درصد زردی یا پژمردگی برگ‌ها
۵	۵۰ تا ۶۰ درصد زردی یا پژمردگی برگ‌ها
۶	۶۰ تا ۷۰ درصد زردی یا پژمردگی برگ‌ها
۷	۷۰ تا ۸۰ درصد زردی یا پژمردگی برگ‌ها
۸	۸۰ تا ۹۰ درصد زردی یا پژمردگی برگ‌ها
۹	۹۰ تا ۱۰۰ درصد زردی یا پژمردگی برگ‌ها
۱۰	مرگ گیاه

در این ارزیابی میزان زردی و پژمردگی برگ‌ها با اعداد استاندارد ۱۰-۰ مشخص شده‌اند.

بررسی تغییرات بیو شیمیایی

پس از انجام آزمایشات گلخانه‌ای و تعیین موثرترین روش یعنی کاربرد همزمان هر دو نوع القاء کننده با همدیگر، جهت بررسی تغییرات بیوشیمیایی از ۶ تیمار شامل: ۱- گیاه سالم. ۲- گیاه سالم همراه عامل بیماری. ۳- گیاه سالم همراه باکتری. ۴- گیاه سالم همراه سیلیکون. ۵ و ۶- گیاه مایه زنی شده با عامل بیماری همراه با باکتری و سیلیکون هم به روش خیساندن خاک و اسپری هوایی سیلیکون. در همه‌ی تیمارها سیلیکون با غلظت ۳ میلی مولار و باکتری باغلظت (10^9CFU/ml) مورد استفاده قرار گرفت. این طرح در قالب فاکتوریل ۶×۸ بر پایه‌ی کاملا تصادفی که شامل ۶ تیمار و ۴ روز نمونه برداری به فاصله‌ی یک روز در میان بعد از کاربرد محرک‌ها انجام گرفت.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

دو میلی لیتر مخلوط واکنش شامل ۱۸۰۰میکرولتیر محلول بافر تریس اسیدی ۰/۵ مول با pH ۶/۸ و فنیل آلانین ۶ میکرومول که به آن ۲۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی گیاهی اضافه شده بود، تهیه شد. سپس این مخلوط به مدت ۷۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه‌ی سلسیوس تیمار شد. بعد از گذشت زمان آزمایش، واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۵ نرمال به لوله‌ها متوقف شد. مقدار جذب نور برای هر لوله توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت شد (Sahebani, 2004).

تهیه منحنی استاندارد و معادله رگرسیون آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

برای رسم منحنی استاندارد این آنزیم از ماده‌ی خالص ترانس سینامیک اسید استفاده شد. غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۱، ۲، ۷ و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر از این ماده در بافر تریس فاقد فنیل آلانین تهیه و میزان جذب نور آن با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. حجم محلول هر لوله با افزودن تریس اسیدی به دو میلی لیتر رسانده شد. میزان جذب نور در هر لوله در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت شد. برای هر غلظتی چهار تکرار در نظر گرفته شد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

بررسی اثر سیلیکون بر روی *Pseudomonas fluorescens* (CHAO)

میزان بازداری از رشد باکتری تا ۳ میلی مولار اختلاف خیلی ناچیزی با شاهد داشت ولی بعد از ۳ میلی مولار اختلاف با شاهد به شدت معنی دار بود و به این دلیل از غلظت ۳ میلی مولار برای کارهای گلخانه‌ای استفاده شد (جدول ۲و ۳).

جدول۲- میزان بازداری از رشد باکتری *Pseudomonas fluorescens* در محیط حاوی غلظت‌های مختلف سیلیکون (mM)

غلظت SiO_2 ((mM)	OD*
۰	A۱/۳۱
۱	B۱/۲۶
۲	C۱/۱۴
۳	D۱/۱۲
۴	E۰/۷
۵	G۰/۶۵
۶	G۰/۵۶
۷	H۰/۴۹
اعداد با حروف یکسان در سطح ۱ ٪ معنی دار نمی باشند.	۵ /۳۲Cv=

*OD= عدد جذب دستگاه اسپکتروفتومتری

جدول ۳- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف سیلیکون بر روی رشد باکتری *Pseudomonas fluorescens* (CHAO)

منبع تغییرات (SOV)	درجه ی آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
تیمار	۷	۲۲ /۱۲۵	۳ /۱۶۰	۱۳/۶۲**
خطا	۲۴	۵ /۵۷	۰/۲۳۲	
کل	۳۱	۲۷ /۶۹۵		
		CV=6.49		

**** در سطح ۱ ٪ اختلاف معنی دار است**

بررسی اثرسیلیکون بر رشد *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

بر اساس نتایج بدست آمده درصد بازدارندگی سیلیکون از رشد قارچ تا غلظت ۵ میلی مولار اختلاف معنی داری از خود نشان نداد. اما در غلظت ۶ و۷ میلی مولار اختلاف معنی داری با شاهد از خود نشان داد (جدول۴ و ۵).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴- درصد بازداری از رشد قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* در محیط حاوی غلظت‌های مختلف سیلیکون (mM).

غلظت SiO_2 (mM))	میزان رشد
شاهد	0 A
۱	۰/۰۳ A
۲	./۹۳ A
۳	۱ /۲۵ A
۴	۱ /۲۵ A
۵	۷ /۸ AB
۶	۱۵ /۹ B
۷	۳۱ /۲ C
اعداد با حروف یکسان در سطح ۱ ٪ معنی دار نمی باشند	Cv=۶/۷۱

جدول ۵-تجزیه واریانس بررسی تاثیر غلظتهای مختلف سیلیکون بر روی رشد قارچ *Fusarium oxysporoum lycopersci*

منبع تغییرات (SOV)	درجه ی آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
تیمار	۷	۲ /۴۳۴۳	۰/۳۴۷۷	۹۴/۷۱**
خطا	۲۴	۰/۸۸۱	۰/۰۰۳۶	
کل	۳۱	۲ /۵۲۲۳		
		CV=۷/۰۳		

** در سطح ۱ ٪ اختلاف معنی دار است

تاثیر باکتری (CHAO) *Pseudomonas fluorescens* و سیلیکون بر میزان بیماری (شاخص برگ) و فاکتورهای مختلف رشد در روش کاربرد آنها قبل از مایه زنی با عامل بیماری

تیمارها از نظر میزان بیماری (شاخص برگ) پس از ۸ هفته در سطح ۵ ٪ با شاهد مثبت (گیاه آلوده به قارچ) و با یکدیگر اختلاف معنی داری داشتند. بیش‌ترین میزان بیماری مربوط به شاهد مثبت و کمترین میزان بیماری مربوط به تیمار (Si F+B = سیلیکون هوایی+ باکتری + قارچ) می‌باشد. از نظر وزن هوایی (از منطقه‌ی طوقه به بالاتر) نیز بین همه‌ی تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده شد. بیش‌ترین میزان بخش هوایی و زمینی مربوط به تیمار باکتری تنها و به دنبال آن سیلیکون به صورت هوایی بود و کمترین میزان در تیمار شاهد مثبت (گیاه آلوده به فوزاریوم) و به دنبال آن تیمار فوزاریوم به همراه سیلیکون زمینی مشاهده شد (جدول۶).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٦- تاثیر سیلیکون و *Pseudomonas fluorescens* بر شاخص بیماری، وزن تر ریشه، وزن تر هوایی در روش استفاده‌ی آنها قبل از عامل بیماری

تیمار	شاخص بیماری	وزن تر ریشه	وزن تر هوایی
F	A۶/۵	I۴/۲۲	J۱۶
F+B	D۵	H۴/۵	G۱۸
F+Si	B۵	H۴/۵	I۱۶/۵
F+SiSP	C۵/۵	G۴/۷۲	H۱۷/۵
F+B+Si	E۴/۶	E۶/۳۵	FI۲۱
F+B+SiSP	F۴/۳	D۶/۷	D۲۳
P	G۱/۴	F۶/۰۵	E۲۲
Si	-----	C۸	C۲۴
SiSP	-----	B۸/۰۵	B۲۵
B	-----	A۸/۳	A۲۷

اعداد هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۱٪ بر اساس آزمون دانکن باهم اختلاف معنی داری ندارند (هر عدد میانگین چها تکرار است). P= گیاه، شاهد F= عامل بیماری پژمردگی، B= باکتری، Si= سیلیکون به صورت خیساندن خاک، SiSP=سیلیکون به صورت اسپری برگی.

بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در گیاه گوجه فرنگی تیمار شده با سیلیکون و *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) و سپس مایه زنی شده با قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici*

بین تیمارهای مختلف کمترین میزان مربوط به گیاه شاهد منفی بود. در همه‌ی تیمارها میزان آنزیم تا روز پنجم افزایش پیدا کرد و بعد از آن رو به کاهش نهاد. بیش‌ترین میزان آنزیم مربوط به تیمار فوزاریوم همراه با باکتری و سیلیکون به صورت هوایی بود. در هر دو تیمار باکتری و سیلیکون همراه با عامل بیماری چه به صورت اسپری هوایی و چه به صورت زمینی میزان تولید آنزیم در روز اول اختلاف معنی داری نداشتند، ولی از روز سوم تا روز هفتم میزان تولید آنزیم در سیلیکون به صورت هوایی بیش‌تر از تیمار سیلیکون به صورن زمینی بود. میزان تولید آنزیم در تیمار باکتری بیش‌تر از تیمار سیلیکون و کمتر از قارچ به تنهایی بود. میزان آنزیم در تیمار قارچ به تنهایی در روز سوم نسبت به روز اول کاهش پیدا کرده ولی در روز پنجم دوباره افزایش یافت. میزان تولید آنزیم در روز اول در تیمار قارچ تنها نسبت به تیمار باکتری بیش‌تر بود، ولی در روز سوم میزان تولید آنزیم در تیمار قارچ کمتر از تیمار باکتری مشاهده گردید. به جز تیمارهای قارچ با کاربرد تلفیقی باکتری و سیلیکون اختلاف روزهای اول و سوم اختلاف زیادی را از خود نشان دادند (شکل۱ و جدول ۷).

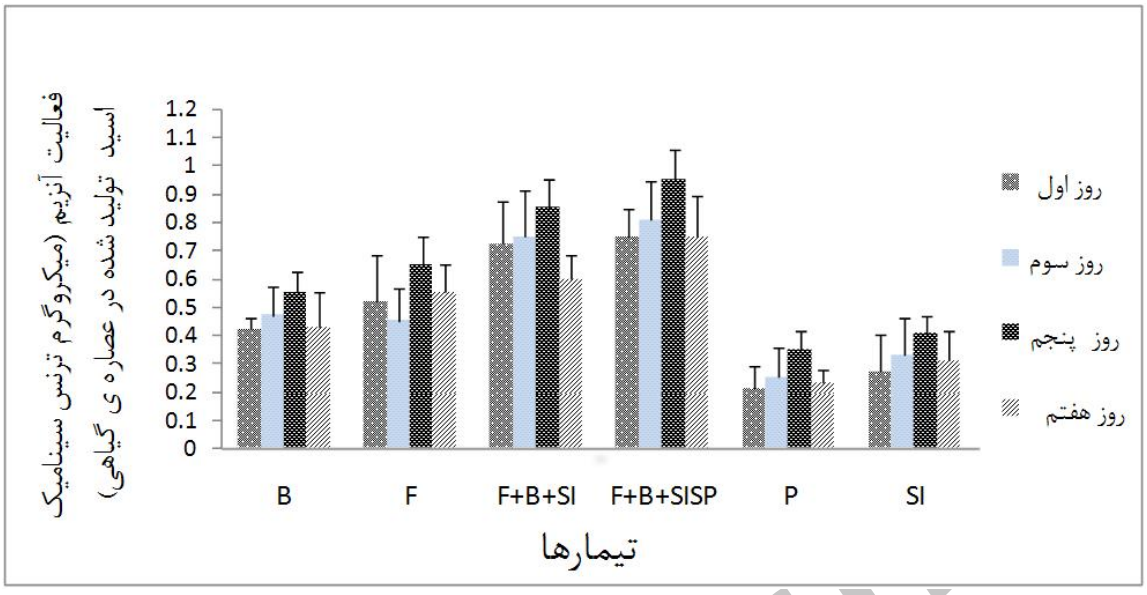
جدول ۷- تجزیه واریانس مربوط به تغییرات آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در ریشه‌ی گوجه فرنگی مایع زنی شده با سیلیکون و باکتری (chao) *Pseudomonas fluorescens* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی *F.oxysporum f.sp. lycopersici*.

منبع تغییرات (SOV)	درجه ی آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
روزهای نمونه برداری (A)	۳	۲/۱۳۹	۰/۷۱۳	۱۶۰۸**
تیمار(B)	۵	۲/۰۱۶	۱/۴۰۳	۹۰۹**
A×B	۱۵	۰/۳۹۵	۰/۰۲۶۳	۵۹**
خطای آزمایش	۷۲	۰/۰۳۱	۰/۰۱۹۷	
کل	۹۵	۴/۵۸۳		
CV= 4. 78				

**** در سطح ۱ ٪ اختلاف معنی دار است**

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- اثر سیلیکون، باکتری *Pseudomonas fluorescens* و قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* روی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در ریشه ی گیاه گوجه فرنگی.

اعداد هر ستون میانگین چهار تکرار ± خطای استاندارد می‌باشند. میزان فعالیت آنزیم به صورت میکروگرم ترنس سینامیک اسید تولید شده در عصاره‌ی گیاه نشان داده شده است. (B= گیاه تیمار شده با باکتری قبل از مایه زنی با عامل بیماری، F= گیاه تیمار شده با عامل بیماری، Si= گیاه تیمار شده با سیلیکون به صورت هوایی،

P = گیاه سالم

F+B+Si= گیاه القاء شده با هر دو نوع عامل باکتری و سیلیکون به صورت خیساندن خاک،

F+B+SiSP= گیاه القاء شده با هر دو نوع عامل باکتری و سیلیکون به صورت اسپری هوایی.

بحث

بیماری پژمردگی گوجه فرنگی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* یکی از بیماری‌های مهم گلخانه‌ای در کشور بشمار می‌رود، که خسارت قابل توجهی را به محصولات سبزی و صیفی از جمله گوجه فرنگی وارد می‌کند. امروز استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک و القاء کننده‌های مقاومت به عنوان روش‌های جایگزین سالم به شدت مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش از روش تلفیقی القاء مقاومت بوسیله سیلیکون و کنترل بیولوژیک بوسیله‌ی باکتری*Pseudomonas fluorescens* جهت مبارزه با این بیماری استفاده گردید. هدف از این کار پیدا کردن راه حل کارآمدتری برای کنترل این بیماری بود. علاوه بر توانایی یک گیاه برای بیان مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) که پس از آلودگی اولیه در گیاه تولید می‌شود، باکتری‌های مفید اطراف ریشه قادر به ایجاد نوع دیگری از مقاومت به نام مقاومت سیستمیک القاء شده (ISR) در گیاه می‌شوند (Van Loon *et al.*, 1998). این میکرواورگانیسم‌ها باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند که این افزایش گیاه در نتیجه افزایش جذب مواد غذایی و تحریکات هورمونی می‌باشد. ریزوباکترهای زیادی باعث تحریک رشد و مقاومت سیستمیک القائی و افزایش رشد گیاه شده‌اند (Van Loon, 2007). برای بررسی تاثیر سیلیکون بر روی رشد باکتری آزمایشی طراحی شد که نتایج آن نشان دهنده‌ی تاثیر سوء سیلیکون بر روی باکتری بود. به طوری که بعد از غلظت ۳ میلی مولار سیلیکون رشد باکتری به شدت کاهش یافت و بنابراین از غلظت ۳ میلی مولار برای آزمایشات گلخانه‌ای استفاده شد. هم-

Archive of SID

www.SID.ir

چنین نتایج این پژوهش نشان از تاثیر منفی سیلیکون بر روی رشد میسلیومی قارچ در غلظت ۶ و ۷ میلی مولار داشت. در آزمایشات گلخانه‌ای اثر سیلیکون و باکتری روی عامل بیماری با استفاده از شاخص‌های شدت بیماری، وزن تر ریشه و وزن‌تر اندام هوایی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمایش مایه‌زنی گیاه با عامل بیماری ۴۸ ساعت بعد از سیلیکون و باکتری آنتاگونیست صورت گرفت. اکثر تیمارها با گیاه شاهد تفاوت معنی داری را از خود نشان دادند. از نظر شدت بیماری (شاخص برگ) تمامی تیمارها با گیاه شاهد تفاوت معنی داری داشتند. هم‌چنین از نظر وزن تر هوایی و ریشه همه‌ی تیمارها با گیاه شاهد اختلاف معنی‌داری را از خود نشان دادند. پس می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد عوامل محرک قبل از عامل بیماری می‌تواند باعث کنترل بهتر بیماری بشود. دفاع شیمیایی گیاه و واکنش‌های مربوط به آن از جنبه‌های مهم دفاع گیاه در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌باشد. یکی از مکانیسم‌های احتمالی فعالیت باکتری *Pseudomonas fluorescens* تحریک مقاومت سیستمیک می‌باشد و سیلیکون نیز به عنوان محرک مقاومت سیستمیک اکتسابی شناخته شده است ، پس با ارزیابی میزان فعالیت آنزیم PAL اثر این دو محرک در مکانیسم مقاومت مورد بررسی قرار گرفت. این آنزیم یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر فنیل پروپانوئیدها و فلاونوئیدها، در واکنش‌های سازگار و ناسازگار میزبان و عامل بیماری زا افزایش می‌دهد. بررسی تغییرات فعالیت این آنزیم نشان داد که بین تیمارها و بین روزها تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ وجود دارد به‌گونه‌ای که القاء مقاومت گیاهان با استفاده از هر دو نوع القاء گر سبب افزایش فعالیت این آنزیم به میزان بالاتری نسبت به گیاهان تیمار شده با هر کدام از القاء کننده‌ها به تنهایی شد و القاء با باکتری میزان فعالیت این آنزیم را بیش از تیمار با سیلیکون افزایش داد. نتایج نشان داد که در همه‌ی تیمارها از روز سوم به بعد میزان آنزیم با اختلاف معنی داری نسبت به روز اول افزایش پیدا کرد و از روز پنجم به بعد با شیب کمتری کاهش پیدا نمود. در تیمار قارچ به تنهایی پس از روز سوم میزان آنزیم افزایش پیدا کرد که می‌توان نتیجه گرفت این قارچ می‌تواند باعث تحریک این آنزیم و القاء مقاومت گیاه بشود. نتایج مطالعات Silva و همکاران (۲۰۱۰) نشان می‌دهد که سیلیکون (سیلیکات کلسیم) میزان فعالیت آنزیم PAL، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز را در گیاه قهوه علیه نماتد *Meloidogyne exigua* افزایش می‌دهد که میزان این افزایش در گیاهان مقاوم نسبت به حساس بیش‌تر است. آنها هم‌چنین بیان کردند که کاربرد سیلیکون سبب افزایش مقاومت ریشه‌های گیاه قهوه علیه نماتد *M.exigua* می‌شود. برا و همکاران (Bera *et al.*, 1999) با بررسی روی گیاه برنج و عامل شیت بلایت *Rhizoctonia solani* افزایش ۵ برابری فعالیت PAL در غلاف‌های برگ مایه زنی شده برنج را پس از ۲۴ساعت بعد از مایه زنی مشاهده نمودند که با افزایش زمان مایه زنی میزان آن کاهش یافت. فعالیت PAL پس از مایه زنی، احتمال دخالت PAL در کاهش بیماری را نشان می‌دهد. *لی و همکاران* بیان کردند که کاربرد سیلیکات سدیم موجب کاهش شدت پوسیدگی خشک سیب زمینی ناشی از قارچ *Fusarium sulphureum* گشته و این کنترل کنندگی را ناشی از القای واکنش‌های دفاعی عنوان کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد به دنبال استفاده از سیلیکون در بافت غده‌های آلوده به قارچ فعالیت آنزیم های پراکسیداز، PAL، بتا آمینو ۱و۳ گلو کاناز و محتوای فنل کل به طور معنی داری افزایش می‌یابد (Li *et al.*, 2009). *لیمان* بیان کرد است که ایزوله‌های خاصی از *Pseudomonas fluorescens* باعث سرکوب هر دو بیماری نماتدی (*Meloidogyne incognita*) و قارچ *Fusarium oxysporoum f.sp.lycopersici* می‌شوند (leeman *et al.*, 1995). *Pseudomonas fluorescens* T58، *P .putida* 53 و *Bacillus sphearicus* B43 از عوامل بیو کنترل قارچ پژمردگی فوزاریومی شناخته شده اند و مکانیسم عمل این باکتری‌ها القای مقاومت سیستمیک در گیاه می‌باشد (Mwangi, 2003). Vandenbergh *و همکاران* (۱۹۸۳) بیان کردند که *Pseudomonas fluorescens* مکانیسم‌های دفاعی را در گیاهان تحریک می‌کند و باعث افزایش مقاومت گیاه در مقابل قارچ *Fusarium oxysporoum* f.sp. *lycopersici* می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق و نتایج حاصل از کار دیگر محققین

Archive of SID

www.SID.ir

می‌توان نتیجه گرفت که باکتری و سیلیکون، هم‌چنین قارچ عامل بیماری توانستند میزان فعالیت این آنزیم را نسبت بـه شـاهد افزایش دهند و نتایج به دست آمده بیانگر توجه بیش‌تر به بحث کنترل بیولوژیک همراه با سایر روش‌ها به صورت تلفیقـی در جهت کاهش خسارت بیماری قارچی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Bera S and Purkayastha RP. 1999. Multicomponent coordinated defence respons of rice to *Rhizoctonia solani* causing sheat blight. Current Science 76: 1376–1384.
2. Cai KZ, Gao D, Chen J and Luo S. 2009. Probing the mechanism of silicon mediated pathogen resistance. Plant Signal and Behavior 4: 1–3.
3. De Boer M., vander Sluis I, van Loon LC and Bakker PAHM. 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strain to enhance suppression of fusarium wilt of radish. European Journal of Plant Pathology 105: 201–210.
4. Dowling DN and O'Gara F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. Trends in Biotechnology 12: 133–144.
5. Etebarian HR, Sholberg PL, Eastwell KC and Sayler R. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. Canadian Journal of Microbiology 51: 591–598.
6. Jetiyanon K and Kloepper JW. 2002. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Biological Control 24: 285–291.
7. Keel C, Weller DM, Natsch A, De´fago G, Cook RJ and Thomashow LS. 1996. Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent Pseudomonas strains from diverse geographic locations. Applied and Environmental Microbiology 62: 552–563.
8. Kloepper JW and Beauchamp CJ. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Canadian Journal of Microbiology 38: 1219–1232.
9. Kloepper JW, Ryu CM and Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94: 1259–1266.
10. Leeman M, Vanpelt JA, Hendrick MJ, Scheffer RJ, Bakker PAHM and Schippers B. 1995. Biocontrol of *fusarium* wilt of raddish in commercial green house triales by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* wcs347. Phytopathology 85: 1301–1305.
11. Li YC, Bi Y, Ge YH, Sun XJ and Wang Y. 2009. Antifungal activity of sodium silicate on *Fusarium sulphureum* and its effect on dry rot potato tubers. Journal of Food Science 74: 213–218.
12. Liang YC, Sun WC, Si J and Romheld V. 2005. Effects if Foliar- and root- applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. Plant Pathology 54: 678–685.
13. Liu L, Kloepper JW and Tuzun S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology 85: 843–847.
14. Mwangi M. 2003. Mechanisms of action in biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* in tomato using rhizobacteria [PhD]. [Bonn (Germany)]: University of Bonn.
15. Nandakumar R, Viswanathan R, Babu S, Sheela J, Raghuchander T and Samiyappan R. 2001. A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. Biological Control 46: 493–510.
16. Oka Y, Cohen Y and Speigel Y. 1999. Local and systemic induced resistance to the root knot tomato by DL– O-amino-n-butyric acid. Phytopathology 89: 1138–1143.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Ramamoorthy V, Raguchander T and Samiyappan R. 2002. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. European Journal of Plant Pathology 108: 429–441.
18. Ramanathan A, Shanmugam V, Raguchander T and Samiyappan R. 2002. Induction of systemic resistance in ragi against blast disease by *Pseudomonas* fluorescens. Annals of Plant Protection Sciences 10: 313–318.
19. Raupach GS and Kloepper JW. 1998. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology 88: 1158–1164.
20. Sahebani N. 2004. Interaction *M. javanica* with *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* and evaluation some defence biochemical mechanisms [PhD]. [Tehran (Iran)]: University of Tehran.
21. Silva RV, Oliveira RDL, Nascimento KJT and Rodrigues FA. 2010. Biochem Mical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicon. Plant Pathology 59: 586–593.
22. Van Loon LC. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology 119: 243–254.
23. Van Loon LC, Bakker PAHM and Pierterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36: 453–483.
24. Vandenbergh PA, Gonzalez CF, Wright AM, and Kunka BS. 1983. Iron- chelating compounds produced by soil pseudomanads: correlation with fungal growth inhibition. Applied and Environmental Microbiology 46: 128–132.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Management of tomato wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* with Silicon and *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) and assaying activity of Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

M. Tavakol Norabadi*[1], N. Sahebani[2], H. R. Etebarian[3]

Abstract

In this research combined application of *Pseudomonas fluorescens* and Silicon against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and induction of resistance in tomato against pathogen was studied. Effect of different concentrations of silicon (1-7 mM) on growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *P. flourescens* was measured. The results showed that all concentrations of silicon had adverse effect on growth of *P. fluorescens*. Silicon upto 5mM concentration had no effect on the growth of *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, but at concentrations of 6 and 7 mM, growth of the fungus was significantly affected compared with control. Due to the negative effect of silicon on growth of *P. fluorescens*, 3mM concentration of silicon was selected for greenhouse studies. Greenhouse experiments showed that treatment with *P. fluorescens* as soil application and silicon as aerial application had the greatest effect on reducing disease indexes and increasing plant growth. Also maximum activity of Phenyl Alanin Amonialyase occurred on the 5th day after combined applications of silicon (as aerial) and *P. fluorescens* (as soil drench). Use of silicon as an inducer of resistance and *P. fluorescens* as biocontrol agent and plant growth enhancer can be effective method for control of soil borne plant pathogens such as *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici.*

Keyword: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pseudomonas fluorescens* (CHAO), silicon

Archive of SID

[1]- MSc student, Campus of Aboureihan, University of Tehran, Tehran, Iran.
[2]- Associate professor, Campus of Aboureihan, University of Tehran, Tehran, Iran.
[3]- Professor, Shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
*Corresponding author: maryam.tavakol65@yahoo.com

www.SID.ir