نشریه علمی زراعت و اصلاح نباتات ایران
جلد ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸، صفحات۷۷-۶۵

ISSN NO: 2008-8485

پاسخ گیاه گوجه فرنگی در شرایط القای مقاومت به رایزوکتونیا سولانی با استفاده از عوامل بیوکنترل باکتریایی جهش یافته با پرتو گاما

Tomato Plant Response to Induction of Resistance to R. solani Using Gamma irradiated Bacterial Biocontrol mutants

فاطمه ساعدی دیزجیکان[۱]، پیمان فروزش[۲] و سمیرا شهبازی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۱۸

چکیده

پژوهش حاضر با هدف مطالعه گیاه گوجه فرنگی در شرایط القای مقاومت به رایزوکتونیا سولانی با استفاده از عوامل بیوکنترل باکتریایی جهش یافته با پرتو گاما صورت گرفت. در این تحقیق ازسه گونه باکتری باسیلوس شامل B600 B1 B419 استفاده شد. جهش تصادفی با استفاده از اشعه گاما انجام گرفت. نتایج نشان داد بالاترین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاه آلوده به عامل بیمارگر مشاهده گردید. این افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ناشی از پاسخ گیاه به عامل بیمارگر می باشد که منجر به افزایش فعالیت این آنزیم گردید است که نشان دهنده افزایش اکسیداسیون در گیاه است. کلیه تیمارها به استثنای تیمار B1+P سطوح فعالیت آنزیم پراکسیداز پایین تری را نسبت به گیاه آلوده به بیمارگر نشان دادند.کلیه تیمارهای بیوکنترل باکتریایی نسبت به نمونه شاهد افزایش قابل توجهی در میزان کلروفیل a نشان دادند. در گیاهان تیمارشده با عامل بیوکنترل، بالاترین میزان کلروفیل b در تیمارهای B1+P وB600+P محاسبه شد. بالاترین درصد وقوع بیماری در گیاه آلوده به عامل بیمارگر و کمترین درصد وقوع در تیمار B419 + P مشاهده گردید. هم چنین تیمار با عامل بیوکنترل موتانت باعث افزایش عملکرد در گوجه فرنگی شده و حتی درتیمار با بیمارگر و جدایه موتانت B419 بالاترین میزان عملکرد ثبت شد.

واژه های کلیدی : گوجه فرنگی، پرتو گاما، رایزوکتونیا سولانی، باسیلوس سوبتیلیس.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج، البرز، ایران.
۲- هیات علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد کرج، البرز، ایران.
۳- هیات علمی پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج، البرز، ایران.

مقدمه

بسیاری از مواد موثره گیاهان دارای جنبه دفاعی مستقیم یا غیرمستقیم هستند. با این حال تأثیر آسیب‌های مکانیکی وشیمیایی مثل زخم‌ها، آلودگی‌های ناشی از حیوانات شکارگر و علف کش‌ها برعملکرد و اجزای متابولیت‌های ثانوی کمتر بررسی شده است. در شرایط طبیعی گیاهان متابولیت‌های خاصی تولید می‌کنند و زمانی که تحت تأثیر یک آسیب شیمیایی یا مکانیکی قرارگیرند تولید متابولیکی گیاه تغییر می‌کند و ممکن است ترکیبات جدیدی تولید کنند که نقش محافظتی در برابر آسیب وارده داشته باشند و به عنوان یک تولید القاء شده بررسی می شود. (فیگوئریدو و همکاران، ۲۰۰۸).(*Figueroido et al.,2007*) . امروزه امنیت غذایی یکی از مسائل مهم زندگی بشری است. به موازات این مسئله موضوع سلامت غذا نیز مورد توجه مصرف کنندگان محصولات کشاورزی قرار گرفته است. از طرفی تامین غذا برای ساکنین زمین، حفظ تولیدات کشاورزی از نابودی در اثر خسارات طبیعی و همین طور آفات و بیماری ها بیش از پیش ضروری به نظر می رسد. مزرعه داران در تمام دنیا برای مبارزه با عوامل زنده کاهش دهنده تولید ناچارند از انواع آفت کش ها استفاده کنند، ولی این سموم نه تنها روی سطح محصولات بلکه حتی درون آن ها نیز نفوذ می کند. ضمن این که اغلب محصولات کشاورزی که در معرض آفت کش ها قرار گرفته اند و مدت زمان کوتاهی بعد از سم پاشی به بازار مصرف ارائه می شوند، حاوی مقادیری از باقیمانده آفت کش ها می باشند. استفاده بیش از حد از آفت کش ها در تولید محصولات کشاورزی باعث بروز پدیده ای به نام "بقایای سموم" می گردد که این پدیده به عنوان یک عامل خطر برای سلامتی انسان و آلودگی محیط زیست مطرح می باشد. محیط گلخانه به دلیل بسته بودن و وجود رطوبت بالا محل مناسبی برای رشد انواع قارچ هاوآفات گیاهی است، به همین دلیل انواع مختلفی از سموم با غلظت بالا در گلخانه مصرف می شود. برداشت اغلب محصولات گلخانه ای به فاصله کوتاهی بعد از سم پاشی صورت می گیرد و اغلب مقادیر زیادی از انواع باقیمانده آفت کش در این محصولات باقی می ماند. سم پاشی های مکرر در گلخانه ها، برداشت زود هنگام محصولات بعد از سم پاشی و ارایه آن ها به بازار و مصرف این محصولات به صورت خام و تازه، سلامت مصرف کنندگان را به طور جدی تهدید می کند. این موضوع باعث شده است تا سازمان بهداشت جهانی در مورد بقایای آفت کش ها یک حد آستانه قابل تحمل از باقیمانده سموم را به عنوان یک معیار ارائه کند. استفاده ناآگاهانه، بی رویه، بی مورد و بی اندازه از این سموم باعث ایجاد ناهنجاری ها و نابسامانی هایی در چرخه زیست موجودات و کنش طبیعی طبیعت شده است. نگاهی به آمار مصرف سموم ضد آفات نباتی در جهان، نشان دهنده گوشه ای از وخامت اوضاع است. اگر بشر توجه داشته باشد که این سموم از ترکیبات پیچیده شیمیایی به وجود آمده اند که در طبیعت به آسانی تجزیه نمی شوندپوسیدگی طوقه و ریشه و مرگ گیاهچه ناشی از(*Rhizoctonia solani*) از مهم ترین بیماری های گوجه فرنگی است که هر ساله منجر به خسارت زیادی در مزارع و گلخانه های گوجه فرنگی می‌شود. در سال های اخیر به دلیل خطرات زیست محیطی کاربرد قارچ کش ها، محققان به دنبال روش های کنترل تلفیقی و نیز استفاده از روش های مقاومتی گیاه، برای کاهش خسارت ناشی از بیماری مرگ گیاهچه می‌باشند. گوجه فرنگی یکی از مهمترین محصولات ارزشمند دسته سبزیجات و صیفی در خاورمیانه به شمار می آید که پس از سیب زمینی از نظر اقتصادی در مقام دوم جهان قرار دارد. گوجه فرنگی یکی از مهمترین محصولات سبزی و صیفی در ایران است، که در صنایع تبدیلی از اهمیت بالایی

برخوردار است. در ایران سطح زیر کشت مزرعه ای گوجه فرنگی بالغ بر ۱۵۱ هزار هکتار معادل ۲۹/۳٪ از مجموع ۵۱۸ هزار هکتار کشت صیفی جات در کشور می باشد و بعد از سیب زمینی دومین محصول مهم صیفی است. تولید سال ۱۳۹۴ آن بالغ بر ۶/۳۴۰ میلیون تن اعلام شده است (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۶). در تولیدات گلخانه ای نیز از تولید ۱/۷۳ میلیون تن محصول، ۱۵۰/۵۱ هزارتن معادل ۸/۷٪ مربوط به تولید ارقام مختلف گوجه فرنگی گلخانه ای اعلام شده در سطح بیش از ۶۵۰ هکتار بعد از خیار (۱/۸۴٪)، دومین محصول صیفی مهم بخصوص در فصول پاییز و زمستان می باشد(آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۶) . مرگ گیاهچه ی گوجه فرنگی یکی از شایعترین بیماری هایی است که به وسیله ی(*Rhizoctonia solani*)در سراسر جهان ایجاد میشود. قارچ (*R.solani*)دارای دامنه‌ی میزبانی وسیعی است که گروه‌های آناموستوزی AG-1 و AG-4 به همراه گروه‌های آناموستوزی دوهسته‌ای (AG-K, AG-I, AG-E, AG-C, AG-A) به عنوان عامل مرگ گیاهچه‌ای معرفی شده اند(*Sneh et al., 1991*). مرگ گیاهچه (بوته میری) به دلیل بروز خسارت در ابتدای فصل رشد باعث خسارت شدید وافت جبران ناپذیرعملکردمی شود وبه دلیل وجود دامنه ی میزبانی وسیع و نرخ بالای زمستان گذرانی ، کنترل بیولوژیک یک راه حل مناسب برای حفاظت گیاهان در برابر این بیمارگر می باشد .استفاده از روش های شیمیایی در کنترل این بیمارگر خاکبرد چندان موفق نمی باشد. هم چنین ارقام کاملا مقاومی به این بیماری وجود ندارد لذا توسعه روش های بیوکنترلی با استفاده از عوامل بیولوژیک خاکزاد راهکار موثری در مدیریت این بیماری خواهد بود. محققان متعددی توانایی بیوکنترلی از باکتری *Bacillus subtilis*علیه بیمارگرهای گیاهی گزارش کرده اند *(Kumar et al 2012;) Erlacher et al 2014; Solanki et al 2014*) با توجه به ابعاد وسیع و اهمیت کاهش مصرف سم به ویژه در محصولات تازه خوری مانند گوجه فرنگی در کشور ما و وجود آلودگی درونی به *R. solani* در کلیه مناطق کشت گوجه فرنگی در ایران و بروز خسارت هنگفت به این محصول در کشور، یافتن راه کارهای سازگار با محیط زیست مانند بیوکنترل با استفاده از عوامل باکتریایی آنتاگونیست و ارتقا و بهبود این عوامل بیوکنترل از اهمیت ویژه ای برخوردار است که موضوع اصلی و هدف نهایی این مطالعه به شمار می رود Kumar . et al 2012;)

اثرات آنتاگونیستی جدایه هایی از باکتری *Bacillus subtilis*علیه قارچ عامل بوته میری گوجه فرنگی *(Rhizoctonia solani)* تحت شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای توسط عراقی و همکاران منتشر شده است .در آن مطالعه جدایه B4 با ۵۰/۳درصد و جدایه B18 با ۵۸/۶ به ترتیب بیشترین درصدمیزان بازدارندگی را در آزمون تاثیر مواد فرار و غیرفرار از خود نشان دادند. (عراقی و همکاران ۱۳۸۸).

نتایج آزمون نشان داد که جدایه های مزبور اثرات آنتاگونیستی متفاوتی دارند و در شرایط گلخانه ای جدایه B2 در هر دو روش آغشته سازی بهتر از بقیه جدایه ها عمل کرد و باعث کاهش معنی دار در میزان بیماری و افزایش معنی دار در فاکتورهای رشدی مورد بررسی گردید.در این مطالعه توانایی ممانعت از رشد باکتری آنتاگونیست باسیلوس شامل(*B. subtilis UTB1*)جدا شده از پوست سبز میوه پسته علیه بیمارگر(*Rhizoctonia solani*) بررسی شده و برای افزایش کارایی آنها از روش القای جهش در باکتری مذکور استفاده شده است. سپس توانایی ممانعت از رشدبیمارگر توسط این

باکتری و دو جدایه موتانت منتخب آن مقایسه شده و کارایی آنها در کاهش وقوع بیماری در شرایط گلخانه ای بر روی میزان گوجه فرنگی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. (عراقی و همکاران ۱۳۸۸). هدف از انجام این تحقیق، بررسی نقش باکتری آنتاگونیست *B. subtilis* در کنترل بیمارگر R.solani در گوجه فرمگی از دو مکانیسم ممانعت از بیمارگر و لقای مقاومت در گیاه (از طرق اندازه گیری برخی آنزیم های دخیل در مقاومت و برخی شاخص های بیوشیمیایی منعکس کننده) است. همچنین این فرضیه که آیا موتانت هایی از این باکتری که قدرت آنتاگونیستی بالاتر از جدایه والد خود دارند، قادرند بیشتر از باکتری والد خود می توانند در القای مقاومت عمومی در گوجه فرنگی نیز موثر باشند نیز بررسی شده است.

مواد و روش ها

باکتری آنتاگونیست باسیلوس شامل (B. subtilis *UTB1*)جدا شده از پوست سبز میوه پسته که توانایی آنها در جلوگیری از رشد قارچ(*Rhizoctonia solani*) اثبات شده است (افشار منش،۱۳۹۲) از گروه گیاه پزشکی دانشگاه تهران تهیه شد.

جهش تصادفی با استفاده از اشعه گاما انجام گرفت. بدین منظور ویال‌های شیشه‌ای پنج میلی‌لیتری که حاوی استوک یخ زده باکتری همراه با گلیسرول است، در معرض اشعه گاما با ده مقدار مختلف (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ گری۲) قرار گرفت. تعیین مقدار و عملیات پرتوتابی برای ایجاد جهش یافته‌ها با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰ اکتیویته ۲۵۰۰ کوری مستقر در پژوهشکده تحقیقات کشاورزی هسته ای کرج- سازمان انرژی اتمی ایران انجام گرفت(افشار منش،۱۳۹۲) . از بین ۵۰۰ جهش یافته حاصله دوسویه ی جهش یافته برای اندازه گیری فعالیت آنتاگونیستی علیه(*Rhizoctonia solani*) بررسی و ارزیابی های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. برای نگهداری طولانی مدت باکتری، کشت ۱۶ ساعته باکتری در محیط غذایی مایع لوریا برتانی۳ (شامل ۱۰ گرم تریپتون۴، ۵ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم کلریدسدیم و یک لیتر آب مقطر) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور، با گلیسرول ۳۰ درصد سترون در درون ویال های اپندورف مخلوط شده و سپس به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شد.

به منظور تهیه زادمایه از قارچ بیمارگر از کشت تازه *(Rhizoctonia solani)*بر روی محیط کشت potato dexteose agar قطعات نه میلی متری از حاشیه میسلیوم فعال جدا نموده و به داخل ظروف محتوی دانه های شلتوک برنج که به مدت دو روز به طور متوالی و به فاصله ۲۴ ساعت اتوکلاو شده اند، منتقل شد. پس از سه هفته نگهداری در دمای اتاق به مدت ۷۲ ساعت در شرایط استریل و با دستگاه آسیاب برقی کاملا آسیاب شدند و قبل از کاشت نشاء گوه فرنگی به هر گلدان پنج گرم ماده خشک بیمارگر به ازای هر کیلوگرم خاک گلدان اضافه شد. نشاء گوجه فرنگی رقم نورا (زودرس) کشت گردیده

و در گلخانه در دمای $25\pm5^{\circ}C$ نگه داری شدند. تیمار های ارزیابی گلخانه ای در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای انجام مطالعات گلخانه ای، گلدان هایی به قطر دهانه ۱۷ سانتی متر انتخاب و با مخلوط خاک استریل، پرلیت و پیت ماس (به نسبت ۱:۱:۱) پر شده وگلدان ها در گلخانه در دمای $25\pm5^{\circ}C$ نگه داری شد. تیمارها به صورت یک روز در میان آبیاری شدند. در تیمار هایی که قارچ بیمارگرو باکتری آنتاگونیست حضور دارند، زادمایه مربوط به قارچ بیمارگر با کل خاک گلدان مخلوط و مایه زنی شده و شش روز پس از مایه زنی عامل آنتاگونیست به یک سوم فوقانی سطح خاک گلدان ها اضافه شد .گیاهان کشت شده در گلدان ها بطور دقیق آبیاری شده و شاخص هایی از جمله وزن تر وخشک ارتفاع بوته و عملکرد گیاه اندازه گیری شد.

روش تهیه عصاره پروتینی و آنزیمی

1-در ابتدا بافت برگها در حضور ازت مایع در درون هاون به خوبی خرد شدند.

2-به میزان 1گرم از بافت خرد شده 5سی سی بافر استخراج اضافه شد

3-برای مدت 20دقیقه در شتاب 100000دور در دقیقه تیوپ های حاوی نمونه ها سانترفیوژ شدند.

4-رو نشین به درون تیوپ های تمیز وجدید ریخته شد وباقی محتویات تیوپ به دور ریخته شدند

5-رونشین در درون یخچال ودمای 4درجه سانتیگراد تا زمان ارزیابی قرار داده شد.از عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیم ها استفاده گردید .

آنزیم پلی فنل اکسیداز: مخلوط واکنش شامل بافر مولار 0/02پیروگالول و pH=7/6با مولار 0/2تریس بود. واکنش با افزودن 100 میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع شد. در حضور آنزیم پلی فنل اکسیداز، پیروگالول موجود در مخلوط واکنش، به پورپوروگالین تبدیل می شود. کاهش در جذب پیروگالول در 420 نانومتر،پس از 5دقیقه در دما ی 25درجه سانتیگراد نسبت به زمان شروع واکنش، محاسبه گردید. تغییرات جذب در مدت 1دقیقه محاسبه شد. با استفاده از ضریب خاموشی پیروگالول(1- mM 2/6 1-cm)مقدار برجای مانده پیروگالول در مخلوط واکنش به دست می آید. یک واحد آنزیمی پلی فنل اکسیداز شامل مقدار پیروگالولی است که در مدت 1دقیقه به پورپوروگالین تبدیل می شود(*Kar and Mishra 1976*)فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل) میلی گرم(موجود در 100میکرولیتر عصاره محاسبه گردید.

آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکول و اندازه گیری میزان جذب تتراگایا ول تشکیل شده در نتیجه فعالیت پراکسیداز، در 470نانومتر انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات 50میلی 10 مولار pH7، پراکسیدهیدروژن0/3 (درصد(و گایاکول (1درصد20) میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان جذب تتراگایاکول)حاصل از اکسید شدن گایاکول(در 470نانومتر در لحظه شروع واکنش پس از اضافه نمودن عصاره آنزیمی و پس از یک دقیقه خوانده شد . با استفاده از تغییرات جذب در 470 نانومتر در مدت زمان یک دقیقه، ضریب خاموشی تتراگایاکول 5/25mM) (1 cm-1مقدار تتراگایاکول تشکیل شده محاسبه شد. این مقدار از تتراگایاکول معادل فعالیت یک واحد آنزیم پراکسیداز می باشد(*Plewa et al 1991*).فعالیت

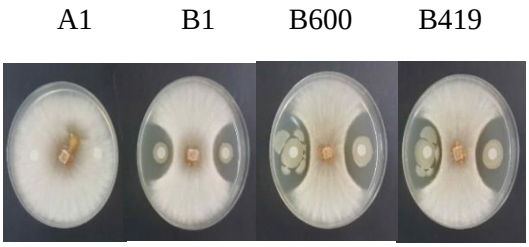
آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل)میلی گرم موجود در 20میکرولیتر عصاره گزارش شد.

آنالیز آماری

نرمال بودن داده ها بررسی شده و سپس کلیه نتایج آزمایشات با استفاده از تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین ها به روش دانکن در سطح آماری ۰/۰۵ >P در مورد هر یک از داده ها انجام گرفت.تجزیه آماری با استفاده از نرم افزارهای SPSS، SAS و EXCEL انجام گرفت و کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

نتایج وبحث

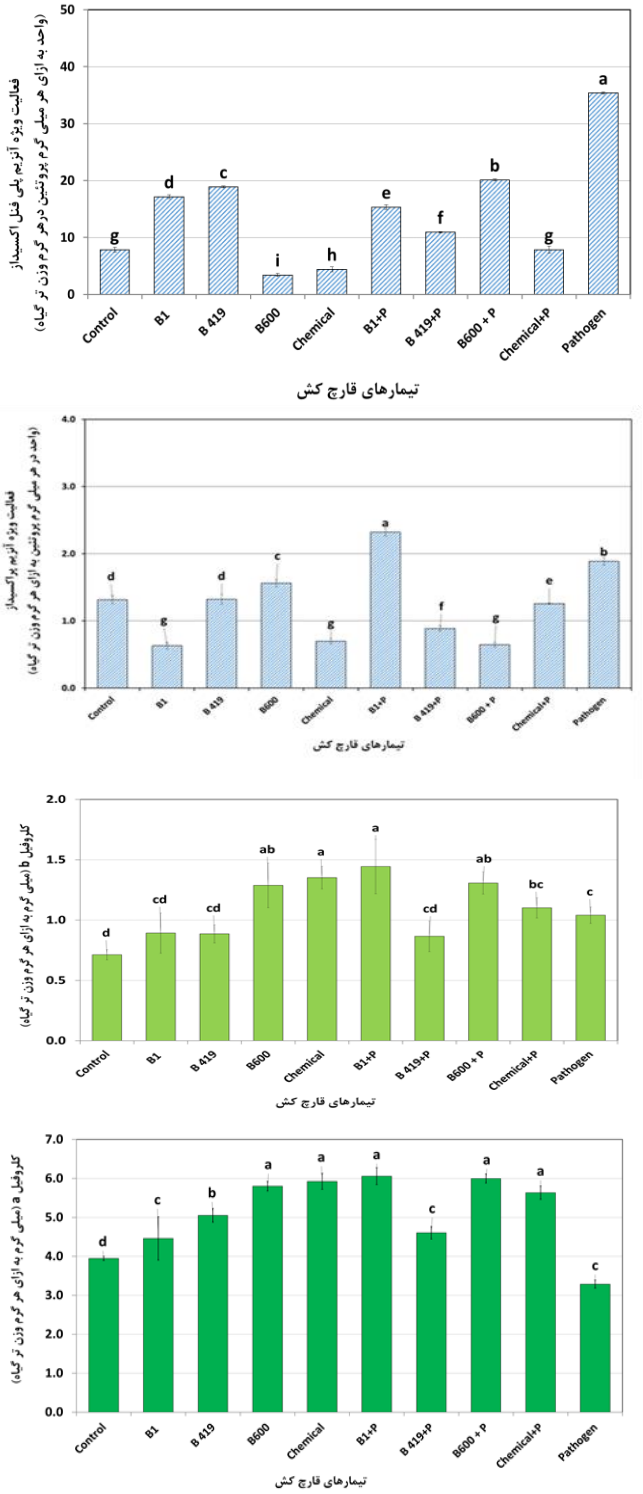
۱)تاثیرجهش بر قدرت ممانعت از رشد بیمارگردر باکتری : مقایسه میانگین میزان ممانعت از رشد قارچ پاتوژن*R. solani* بعد در اثر کشت متقابل با جدایه های موتانت و سویه والد (پرتوندیده) باکتری(*B. subtilis*)نشان دادند که میزان ممانعت از رشد بیمارگر توسط جدایه های والد و موتانت در سطح آماری ۰/۰۵ > P دارای اختلاف معنی دار آماری بود.بالاترین درصد بازدارندگی در جدایه موتانت B419 مشاهده شد(شکل۱) . هرچند میزان ممانعت از رشد بیمارگر بین دو جدایه موتانت از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشت اما کمترین میزان بازدارندگی از رشد در جدایه والد مشاهده شد که نشان میدهد القای جهش در بهبود قدرت آنتاگونیستی این عامل بیوکنترل تاثیر معنی داری داشته است.(افشارمنش وهمکاران)



شکل ۱-میزان ممانعت از رشد رایزاکتونیا درآزمون کشت متقابلA) بیمارگر شاهدB1پرتو دهی شده B419وB600
Figure 1 - Rate of inhibition of risactonia in cross-culture test A) B ۴۱۹and B ۶۰۰irradiated control pathogen

۲)تاثیر استفاده از عوامل بیو کنترل موتانت بر خصوصیات مورفولوژیکی وفیزیولوژیکی یک گیاه در گلخانه:بین مقادیر فعالیت غلظت کلروفیل a در برگ گوجه فرنگی تیمارشده با عوامل باکتریایی بیوکنترل در مقایسه با گیاه شاهد و گیاه آلوده به بیماری R. solani تفاوت معناداری وجود دارد. نتایج نشان داد که تفاوت بین مقادیر فعالیت غلظت کلروفیل a در برگ گوجه فرنگی تیمارشده در مقایسه با گیاه شاهد و گیاه آلوده به بیماری *R. solani* از لحاظ آماری معنادار است.در همین راستا کلیه تیمارهای بیوکنترل باکتریایی نسبت به نمونه شاهد افزایش قابل توجهی در میزان کلروفیل a نشان دادند. بین

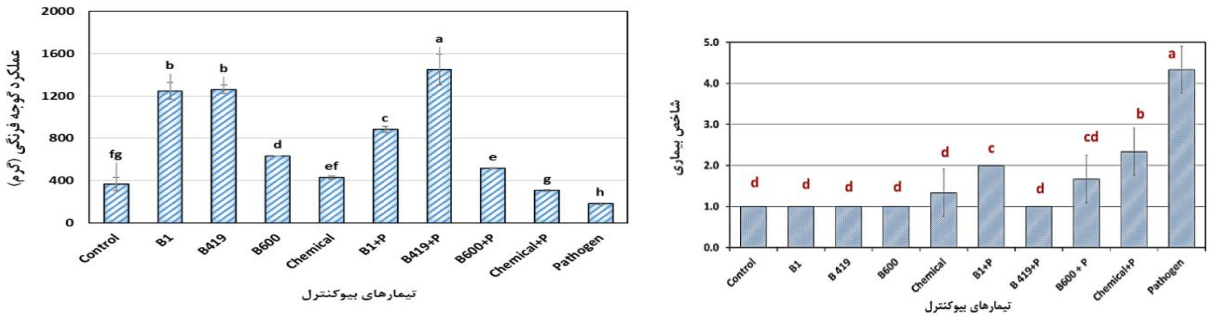
مقادیر فعالیت غلظت کلروفیل b در برگ گوجه فرنگی تیمارشده با عوامل باکتریایی بیوکنترل در مقایسه با گیاه شاهد و گیاه آلوده به بیماری *R. solani* تفاوت معناداری وجود دارد. نتایج نشان داد که تفاوت بین مقادیر فعالیت غلظت کلروفیل b در برگ گوجه فرنگی تیمارشده با عوامل باکتریایی بیوکنترل در مقایسه با گیاه شاهد و گیاه آلوده به بیماری *R. solani* از لحاظ آماری معنادار است. در این جدول بالاترین میزان کلروفیل b در تیمار B1+P و B600+P در بین تیمارهای عامل بیوکنترل و تیمار سم شیمیایی و B600 در بین تیمارهای بدون عامل بیمارگر مشاهده گردید. بین مقادیر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در برگ گوجه تفاوت بین مقادیر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در برگ گوجه فرنگی تیمارشده در مقایسه با گیاه شاهد و گیاه آلوده به بیماری *R. solani* سطح آنزیم پلی فنول اکسیداز در گیاه آلوده به بیماری *R. solani* بیشتر است. با این حال علیرغم افزایش سطح آنزیم پلی فنول اکسیداز در تیمارهای بیوکنترل هیچ گونه عامل بیماری در گیاه مشاهده نگردید. تیمار قارچ کش شیمیایی در حضور عامل بیمارگر اختلاف معنی دار آماری با نمونه شاهد از خود نشان نداد. بین مقادیر فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ گوجه فرنگی تیمارشده در مقایسه با گیاه شاهد و گیاه آلوده به بیماری *R. solani* تفاوت معناداری وجود دارد. نتایج نشان داد که تفاوت بین مقادیر فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ گوجه فرنگی تیمارشده با عوامل باکتریایی بیوکنترل در مقایسه با گیاه شاهد و گیاه آلوده به بیماری *R. solani* از لحاظ آماری معنادار است. نتایج نشان داد که کلیه تیمارهای بیوکنترل به استثنای تیمار B1+P سطوح فعالیت آنزیم پراکسیداز پایین تری را نسبت به گیاه آلوده به بیمارگر دارند.نتایج این پژوهش با تحقیقات زیارتی(۱۳۸۷) همسو می باشد . زیارتی(۱۳۸۷) در بخشی از تحقیقات خود دریافت که آنزیم های دفاعی نظیر پراکسیداز منجر به افزایش مقاومت فیزیکی و بیوشیمیایی گیاه میزبان بر علیه بیمارگر در محل آلودگی و یا به صورت سیستمیک در قسمت های مختلف گیاه می گردد.



شکل ۲-نمودار های آنزیمی و کلروفیل در گیاه

Figure 2- Enzymatic and chlorophyll diagrams in the plant

۳) تاثیر استفاده از عوامل بیو کنترل موتانت بر کاهش وقوع بیماری میزان عملکرد یک گیاه در گلخانه: مقایسه میانگین درصد وقوع بیماری نشان داد که کارایی جدایه های باسیلوس با یکدیگر متفاوت بوده و تفاوت معنی داری بین برخی جدایه های موتانت با والد مشاهده شد. همانطور که در شکل مشاهده می شود در گیاه شاهد و گیاهان تحت تیمار با جدایه های باسیلوس (والد و موتانت) عدم وجود بیماری مشاهده شده است. این نتایج نشان می دهد القای جهش در باسیلوس موجب تغییرات نامطلوب در ژنوم آنها و بروز اختلال در گیاهان تیمار شده با باکتری موتانت نمی گردد .از سوی دیگر در تیمار هایی که بیمارگردر خاک وجود داشته است میانگین ۴/۲ به دست آمده که نشان می دهد پرگنه بیمارگر استفاده شده در ارزیابی گلخانه ای کاملا فعال وبیماریزا بوده است. عدم وقوع بیماری در گیاهان تیمار شده با باسیلوس (موتانت و والد) و بیمارگر نشان دهنده فعال بودن عامل بیوکنترل در خاک و توانایی جلوگیری از بروز بیماری در گیاه توسط آن بوده است. همچنین میزان وقوع بیماری در تیمار شیمیایی نشان می دهد که استفاده از قارچکش نتوانسته است در مقایسه با باکتری آنتاگونیست توفیقی در مدیریت وقوع بیماری داشته باشد و حتی استفاده از قارچ کش بر روی گیاه در خاک فاقد بیمار به بروز کلروز در گیاه نیز منجر شده است که ممکن است نشان دهنده وجود ناخالصی و یا مشکلات در فرمولاسیون قارچ کش (مانند دستکاری در تاریخ مصرف قارچ کش های موجود در بازار یا آلودگی آنها با سایر مواد شیمیایی و ...) باشد. در حالیکه در گیاهان تیمار شده با باکتری، بروز بیماری به شکل معنی داری کاهش نشان داده و به کمتر از نصف در شاهد رسیده است. کاهش بیش از ۵۰٪ از وقوع بیماری می تواند حتی به کاهش بیشتر از خسارت هم منجر شود که ادامه مطالعات و بررسی عملکرد گیاهان در تیمارهای مختلف با شاهد این موضوع را روشن خواهد ساخت. بین مقادیر درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر *R. solani* توسط عوامل آنتاگونیست والد و موتانت باسیلوس سوبتیلیس را نشان می دهد. بالاترین درصد ممانعت از رشد در جدایه های موتانت B600 و B419 بدست آمد. جدایه های موتانت فاقد اختلاف معنی دار آماری با یکدیگر بودند و تفاوتی از لحاظ درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر در آنها مشاهده نشد. جدایه والد مقادیر درصد ممانعت از رشد کمتری را نسبت به جدایه های موتانت خود نشان داد و این مقدار دارای اختلاف معنی دار آماری در سطح $p < ۰/۰۵$ بود. جدایه والد B1 مقدار درصد بازدارندگی از خود نشان داد شاخص عملکرد در گیاه گوجه فرنگی تیمارشده در مقایسه با گیاه شاهد و گیاه آلوده به بیماری *R. solani* تفاوت معناداری وجود دارد. نتایج نشان داد که تفاوت بین مقادیر شاخص عملکرد در گوجه فرنگی تیمارشده با عوامل باکتریایی بیوکنترل در مقایسه با گیاه شاهد و گیاه آلوده به بیماری *R. solani* از لحاظ آماری معنادار است. مقادیر تولید گوجه فرنگی بواسطه استفاده از فرمولاسیون های بیوکنترل افزایش قابل توجهی را از خود نشان دادند. کمترین میزان تولید در گیاه آلوده به قارچ پاتوژن مشاهده گردید که بواسطه بیمارشدن گیاه از میزان عملکرد آن کاسته شد. تیمارهای B1 و B419 اختلاف معنی دار آماری نداشتند اما با این حال مقادیر تولید بالاتری را نسبت با گیاه شاهد دارا بودند. این دو تیمار در گیاهان آلوده به عامل بیمارگر نیز مقادیر بالاتری از تولید را دارا بودند و بالاترین میزان عملکرد در تیمار B419+P مشاهده گردید.



شکل۳- نمودار عملکرد و شاخص بیماری در گیاه
Figure 3- Diagram of Plant Performance and Disease Index

نتیجه گیری:

استفاده ناآگاهانه، بی رویه، بی مورد و بی اندازه از این سموم باعث ایجاد ناهنجاری ها و نابسامانی هایی در چرخه زیست موجودات و کنش طبیعی طبیعت شده است. نگاهی به آمار مصرف سموم ضد آفات نباتی در جهان، نشان دهنده گوشه ای از وخامت وضع است. اگر بشر توجه داشته باشد که این سموم از ترکیبات پیچیده شیمیایی بوجود آمده اند که در طبیعت به آسانی تجزیه نمی شوند، از بین نمی روند و به اندازه کم یا زیاد در خاک و آب و محصولات کشاورزی و گوشت و شیر حیوانات سپس در بدن انسان ذخیره می شوند تا به تدریج چرخه زیست را به نابودی بکشند، چنین بی باک به مصرف گسترده آن نمی پرداخت. مصرف سم ممکن است گاهی و فقط به عنوان آخرین راه چاره و آخرین حربه لازم باشد، اما واقعیت تلخ این است که متاسفانه کشاورزان ما با دیدن هر آفتی مبارزه شیمیایی را بعنوان اولین اقدام خود در نظر میگیرند بدون آنکه روش های دیگر مبارزه را نیز مد نظر قرار دهند. نتایج این تحقیق نشان داد که در بین جدایه های باکتریایی شناخته شده به عنوان عامل بیوکنترل، باکتری جدایه (*B. subtilis UTB1*) قادر به مهار رشد عامل بیمارگر (*R. solani*) می شود و کارایی آن در مهار بیماری در گلخانه حتی بهتر از سموم قارچ کش مرسوم است. همچنین بررسی های بیشتر نشان داد که القای جهش در جدایه (*B. subtilis UTB1*) منجر به بهبود قدرت ممانعت از رشد بیمارگر (*R. solani*) در شرایط درون شیشه ای و گلخانه ای می شود و تا ۵۰٪ از وقوع بیماری جلوگیری خواهد کرد و هم چنین باعث افزایش قدرت آنتاگونیستی و افزایش میزان عملکرد در گیاه شده است. با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش مشخص گردید که القای عامل بیو کنترلی به گیاه که منجر به افزایش میزان آنزیم هایی نظیر پلی فنل اکسیداز،پراکسیداز وکلروفیل های نوع a و b در گیاه شود ، میتواند مقاومت گیاه در برابر عوامل و شاخص های بیماری را افزایش دهدبررسی دقیق تر واکنش گیاه گوجه فرنگی به تیمار با باکتری باسیلوس مذکور و جدایه های موتانت آن می تواند تصویر واقعی تری از نحوه تعامل عامل بیوکنترل با بیمارگر بر روی این میزبان را ایجاد کند که در گام های بعدی این مطالعه انجام خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این طرح با همکاری دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای اجرا شده که بدینوسیله تشکر و قدردانی می شود.

References فهرست منابع

Afshar manesh ,H. 2013. Evaluation of the effect of two Bacillus strain mutants from radiation and targeted mutation against *Aspergillus flavus* and aflatoxin levels, PhD Thesis in Plant Pathology.

-raqi, M., K. Rahnama; M. Taqi. 2009. Biocontrol study of Bacillus subtilis (Rhizoctonia solani Kuhn) plant growth factor, Journal of Crop Production Research in Agriculture and Natural Resources, Volume 16, Number 3, Page 187-191.

Ahmadzadeh, M., Sharifi Tehrani, A. 2007. Biocontrol of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of common bean damping - off by fluorescent pseudomonads. Communications in agricultural and applied biological sciences, (71)1.

Erlacher, A., Massimiliano Cardinale, Rita Grosch, Martin Grube, and Gabriele Berg. "The impact of the pathogen Rhizoctonia solani and its beneficial counterpart Bacillus amyloliquefaciens on the indigenous lettuce microbiome." Frontiers in microbiology 5 (2014): 175

Kumar, Pankaj, R. C. Dubey, and D. K. Maheshwari. "Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens." Microbiological research 167, no. 8(2012): 493-499.

Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi A. 1991. Identification of Rhizoctonia species. Minnesota: APS Press.

Solanki, Manoj Kumar, Amrita Shalini Robert, Rajesh Kumar Singh, Sudheer Kumar, Akhilesh Kumar Pandey, Alok K. Srivastava, and Dilip K. Arora. "Characterization of mycolytic enzymes of Bacillus strains and their bio-protection role against Rhizoctonia solani in tomato." Current microbiology 65, no. 3 (2012): 330-336.

Solanki, Manoj Kumar, Sudheer Kumar, Akhilesh Kumar Pandey, Supriya Srivastava, Rajesh Kumar Singh, Prem L. Kashyap, Alok K. Srivastava, and Dilip K. Arora. "Diversity and antagonistic potential of Bacillus spp. associated to the rhizosphere of tomato for the management of Rhizoctonia solani." Biocontrol Science and Technology 22, no. 2 (2012): 203-217.

Tomato Plant Response to Induction of Resistance to R. solani Using Gamma irradiated Bacterial Biocontrol mutants

F. Saedi Dizjikan[1], P. Foroozesh[2] and S. Shahbazi[3]

Received date: 10 January 2020 Accepted date: 8 September 2020

Abstract

The aim of this study was to evaluate the tomato plant induced resistance to *Rhizoctonia solani* using bio-control bacteria of *Bacillus subtilis*. Three bacterial isolates including B1 (un-irradiated *B. subtilis*), B600 and B419 (gamma-irradiated *B. subtilis* mutants) were used in this study. Results showed the highest activity of polyphenol oxidase enzyme in plant infected with pathogen. This increase in polyphenol oxidase activity was due to the response of the plant to the pathogen, which led to an increase in the activity of the enzyme, indicating an increase in oxidation in the plant. All treatments except B1 + Pathogen showed lower levels of peroxidase enzyme activity than the pathogen infected plant. All the plants treated with bio-control bacterial showed a significant increase in chlorophyll a compared to control. In plants treated with bio-control agents, the highest level of chlorophyll b in B600 + Pathogen and B1 + Pathogen were measured. The highest Disease Incidence percentage (DI%) was observed in plant pathogen (negative control) and the lowest DI was observed in plants treated with B419 + Pathogen. In plants treated with bio-control agent, the highest amount of chlorophyll b was calculated in B1 + Pathogen and B600 + Pathogen treatments. The highest percentage of Disease Incidence percentage (DI%) was observed in the pathogen-infected plant and the lowest in the B419 + Pathogen treatment. The treatment with bio-control agent increased tomato yield and even the highest yield was recorded in the B419 + Pathogen treatment.

Keywords: Tomato, Gamma irradiation, *Rhizoctonia solani*, *Bacillus subtilis.*

[1]- M. Sc. Student of Islamic Azad university, Karaj Branch, Department of Agronomy and plant Breeding, Karaj, Alborz, Iran.
2- Department of Agronomy and plant Breeding, Karaj Branch, Islamic Azad university, Karaj, Iran.
3-