

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

آمونیا لیا ز)

مریم توکل نورآبادی^{1*}، نوازاله صاحبانی²، حسن رضا اعتباریان³

تاریخ دریافت: 92/5/10 تاریخ پذیرش: 92/10/21

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 (7-1 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 5 میلی مولار بر روی قارچ تاثیر منفی نداشت ولی در غلظت 6 و 7 میلی مولار با شاهد اختلاف معنی داری داشتند. بر اساس تاثیر سیلیکون بر روی رشد باکتری، غلظت 3 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 آمونیا لیا ز 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 5 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، می‌تواند 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*

¹ - دانشجوی کارشناسی ارشد، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

² - دانشیار گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

³ - استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر ری، شهر ری، ایران.

* - نویسنده مسئول مقاله: maryam.tavakol65@yahoo.com

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 می گیرد. کنترل شیمیائی عوامل بیماری زا سبب عدم تعادل در جمعیت میکروبی خاک شده و ممکن است تاثیر سوء بر فعالیت میکرواورگانیزم های مفید داشته و باعث ایجاد و افزایش نژادهای مقاوم عوامل بیماری زا بشود. کنترل بیولوژیک با استفاده از باکتری های بهبود دهنده ی رشد گیاهان (PGPR)¹ به عنوان یک راه حل جایگزین برای مدیریت بیماری های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Jetyanon and Klopper, 2002). بین میکرواورگانیزم های مفید، سودوموناس های فلورسنت علیه طیف وسیعی از پاتوژن های گیاهی شامل قارچ ها، باکتری ها و ویروس ها در گیاهانی مثل خیار، لوبیا، تنباکو تاثیر بسیار خوبی داشته اند (van Loon et al., 1998). هم چنین باکتری های تولید کننده اسپور مثل گونه های باکتری *Bacillus* در کنترل بیماری های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته اند (Klopper et al., 2004). با این حال، کاربرد این میکرواورگانیزم ها به تنهایی نتوانسته نتایج رضایت بخشی را بدهد (Raupach and Klopper, 1998). کاربرد دو یا چند مورد از عوامل کنترلی می تواند تاثیر بسزایی در کنترل این عوامل بیماری زا داشته باشد (de Boer et al., 1999). کاهش مستقیم بیماری توسط میکرواورگانیزم های مفید از طریق رقابت بر سر غذا، فضا و نیچ اکولوژیکی و هم-چنین تولید ترکیبات ضد میکروبی می باشد. از بین این متابولیت ها 2 و 4-دی استیل فلورگلوکوسینول (2,4-DAPG) توسط طیف وسیعی از باکتری های سودوموناس تولید می شود (Dowling and O'Gara, 1994; Keel et al., 1996). 2 و 4-دی استیل فلورگلوکوسینول از ترکیبات فنلی می باشد که دارای خاصیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد نماتدی و خاصیت گیاهسوزی می باشد (Dowling and O'Gara, 1994). تاثیر غیر مستقیم آنها از راه القای مقاومت سیستمیک می باشد (Klopper and Beauchamp, 1995; Liu et al., 1992). مقاومت القائی یک بخش از توان دفاعی گیاه می باشد که در گیاه در پاسخ به حضور موجودات زنده و ترکیبات شیمیائی محرک تولید می شود (van Loon et al., 1998). کاهش میزان بیماری از طریق القاء مقاومت، از طریق آنزیم های دفاعی زیادی از جمله پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز انجام می گیرد که این آنزیم ها باعث کاتالیز شدن لیگنین و فنیل آلانین آمونیلایز در مسیر تولید فیتوالکسین ها و ترکیبات فنلی شوند. تاثیر مقاومت القاء شده توسط استرین های 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 مهم ترین عناصر ساختمانی در گیاهان می باشد. اگر چه سیلیکون به عنوان عنصر ضروری برای گیاه بشمار نمی رود، ولی دارای اثرات زیادی بر رشد محصولات و نیز مقاومت به بیماری ها در تعداد زیادی از گونه های گیاهی است. شواهد نشان داده که سیلیکون می تواند سبب فعال شدن پاسخ های دفاعی گیاه شده و القای مقاومت سیستمیک را باعث گردد. مطالعات مولکولی نشان داده است که سیلیکون می تواند سبب بیان ژن های مربوط به دفاع بشود و نقش مهمی در انتقال سیگنال مانند سالیسیلیک اسید، اتیلن و جاسمونیک اسید را دارد و این سیگنال ها (القاء کننده) باعث فعال شدن پاسخ های دفاعی می شود (Cai et al., 2009). کاهش شدت بیماری از طریق سیلیکون از طریق افزایش ترکیبات فنلی، لیگنین، فیتوالکسین ها و پروتئین های مرتبط با بیماری زایی می باشد (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

این پژوهش هم‌چنین القای مقاومت در گیاهان از جنبه‌ی بیوشیمیایی با بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز 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 1:2:1:1 و سترون شده در اتوکلاو استفاده شد و سپس سه عدد بذر رقم ارلی اوربانای Y در گلدان‌های کوچک با دهانه‌ی 8 سانتی متری کاشته شد. در مرحله‌ی گیاهچه‌ای گلدانها تنک شدند به‌طوری که در هر گلدان یک گیاه باقی ماند و در شرایط یکنواخت (دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 10 روز کشت داده، سپس قارچ رشد کرده را در شرایط استریل در داخل آب مقطر ریخته و سوسپانسیون حاصل را از پارچه لمل عبور داده شد تا میسلیم‌های قارچ جدا شده و اسپورهای قارچ عبور نکنند. 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 48 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 (10^9 CFU/ml) از طول موج 590nm (OD=0.5) استفاده شد.

نگهداری جدایه باکتری

جهت نگهداری طولانی مدت باکتری بعد از اطمینان از خلوص آن یک لوپ از کشت 24 ساعته‌ی باکتری درون شیشه‌های درب دار حاوی 2-3 میلی لیتر آب مقطر سترون منتقل و درب آنها با نوار پارافیلیم مسدود شد. با این روش باکتری تا یکسال در دمای 4 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 25 درجه‌ی سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شد. پس از 3 روز به یخچال منتقل شدند و هر دو ماه یک بار تجدید کشت شد (Fradkin, 1985).

تهیه محلول سیلیکون (SiO_2)

برای تهیه غلظت 1 تا 7 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 60/8 گرم می باشد که برای تهیه 3 میلی مولار آن میزان 0/18 گرم پودر سیلیکون در 1 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 (10^9 CFU/ml) در لوله های آزمایش حاوی 9 سی سی محیط کشت NB با غلظت های گوناگون سیلیکون (1، 2، 3، 4، 5، 6 و 7 میلی مولار) ریخته شد و پس از 24 ساعت میزان رشد باکتری در طول موج 590nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد.

بررسی تاثیر سیلیکون بر روی رشد قارچ عامل بیماری

غلظت های گوناگون سیلیکون (1، 2، 3، 4، 5، 6 و 7 میلی مولار) هر کدام در 100 میلی لیتر محیط کشت PDA ترکیب و در ظروف کشت های 9 سانتی متری ریخته شد. سپس یک قطعه 5 میلی متری از کشت 7 روزه قارچ در وسط هر کدام از پتری های 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. نتیجه ای 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 8 تیمار و 4 تکرار در قالب طرح کامل تصادفی انجام گرفت.

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

ابتدا گیاه با محرک ها تیمار و بعد از 48 ساعت با عامل بیماری آلوده سازی گردیدند. تیمارها شامل 1- گیاه سالم (شاهد سالم)، 2- گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری (شاهد آلوده)، 3- گیاه سالم به همراه سیلیکون (به روش خیساندن)، 4- گیاه سالم به همراه سیلیکون (اسپری هوایی)، 5- گیاه سالم به همراه باکتری، 6- گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری و ریختن باکتری به پای گیاه (خیساندن خاک)، 7- گیاه آلوده به عامل بیماری و افزودن محلول 3 میلی مولار سیلیکون به پای گیاه (خیساندن خاک)، 8- گیاه آلوده به عامل بیماری و افزودن محلول 3 میلی مولار سیلیکون (SiO_2) به صورت هوایی (اسپری هوایی) 9 و 10- 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 بررسی های انجام گرفته در آزمایشگاه سیلیکون به غلظت 3 میلی مولار در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. برای آلوده سازی گیاهان از زاد مایه تهیه شده ی قارچ عامل بیماری که قبلا در تحقیقات همسو با این پایان نامه توسط تست بیماری زایی در گلخانه درجه ی 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 25 سی سی (Sahebani, 2004) در اطراف ریشه ی گیاه انجام گرفت. 8 هفته بعد از مایع زنی و ظهور کامل علائم، شاخص شدت بیماری (جدول 1) و فاکتورهای رشد شامل وزن تازه ریشه و اندام های هوایی بوته اندازه گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با 10 تیمار و چهار تکرار انجام شد. آنالیزهای آماری نیز با استفاده از نرم افزار SAS (9.0) و مقایسه ی میانگین ها به روش دانکن انجام گرفت.

جدول 1- شاخص علائم برگ (زردی و پژمردگی برگها) در گیاهان مایه زنی شده با قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

مقیاس شاخص علائم برگها	علائم
0	صفر تا 10 درصد زردی یا پژمردگی برگها
1	10 تا 20 درصد زردی یا پژمردگی برگها
2	20 تا 30 درصد زردی یا پژمردگی برگها
3	30 تا 40 درصد زردی یا پژمردگی برگها
4	40 تا 50 درصد زردی یا پژمردگی برگها
5	50 تا 60 درصد زردی یا پژمردگی برگها
6	60 تا 70 درصد زردی یا پژمردگی برگها
7	70 تا 80 درصد زردی یا پژمردگی برگها
8	80 تا 90 درصد زردی یا پژمردگی برگها
9	90 تا 100 درصد زردی یا پژمردگی برگها
10	مرگ گیاه

در این ارزیابی میزان زردی و پژمردگی برگها با اعداد استاندارد 0-10 مشخص شده‌اند.

بررسی تغییرات بیوشیمیایی

پس از انجام آزمایشات گلخانه‌ای و تعیین موثرترین روش یعنی کاربرد همزمان هر دو نوع القاء کننده با همدیگر، جهت بررسی تغییرات بیوشیمیایی از 6 تیمار شامل: 1- گیاه سالم، 2- گیاه سالم همراه عامل بیماری، 3- گیاه سالم همراه باکتری، 4- گیاه سالم همراه سیلیکون، 5 و 6- گیاه مایه زنی شده با عامل بیماری همراه با باکتری و سیلیکون هم به روش خیساندن خاک و اسپری هوایی سیلیکون، در همه تیمارها سیلیکون با غلظت 3 میلی مولار و باکتری با غلظت (10^9 CFU/ml) مورد استفاده قرار گرفت. این طرح در قالب فاکتوریل 8×6 بر پایه‌ی کاملاً تصادفی که شامل 6 تیمار و 4 روز نمونه برداری به فاصله‌ی یک روز در میان بعد از کاربرد محرکها انجام گرفت.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)

دو میلی لیتر مخلوط واکنش شامل 1800 میکرولیتر محلول بافر تریس اسیدی 0/5 مول با pH 6/8 و فنیل آلانین 6 میکرومول که به آن 200 میکرولیتر عصاره‌ی گیاهی اضافه شده بود، تهیه شد. سپس این مخلوط به مدت 70 دقیقه در حمام آب گرم 37 درجه‌ی سلسیوس تیمار شد. بعد از گذشت زمان آزمایش، واکنش با افزودن 50 میکرولیتر اسید کلریدریک 5 نرمال به لوله‌ها متوقف شد. مقدار جذب نور برای هر لوله توسط اسپکتروفتومتری در طول موج 290 نانومتر قرائت شد (Sahebani, 2004).

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

برای رسم منحنی استاندارد این آنزیم از ماده‌ی خالص ترانس سینامیک اسید استفاده شد. غلظت‌های 0/1، 0/2، 0/4، 1، 2، 7 و 10 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 290 نانومتر قرائت شد. برای هر غلظتی چهار تکرار در نظر گرفته شد.

نتایج

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

میزان بازداری از رشد باکتری تا 3 میلی مولار اختلاف خیلی ناچیزی با شاهد داشت ولی بعد از 3 میلی مولار اختلاف با شاهد به شدت معنی دار بود و به این دلیل از غلظت 3 میلی مولار برای کارهای گلخانه‌ای استفاده شد (جدول 2 و 3).

جدول 2- میزان بازداری از رشد باکتری *Pseudomonas fluorescens* در محیط حاوی غلظت‌های مختلف سیلیکون (mM)

OD*	غلظت SiO ₂ (mM)
A1/31	0
B1/26	1
C1/14	2
D1/12	3
E0/7	4
G0/65	5
G0/56	6
H0/49	7

اعداد با حروف یکسان در سطح 1% معنی دار نمی باشند.
 OD* = عدد جذب دستگاه اسپکتروفتومتری

جدول 3- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف سیلیکون بر روی رشد باکتری *Pseudomonas fluorescens* (CHAO)

F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه ی آزادی (df)	منبع تغییرات (SOV)
13/62**	3 /160	22 /125	7	تیمار
	0/232	5 /57	24	خطا
		27 /695	31	کل
		CV=6.49		

** در سطح 1% اختلاف معنی دار است

بررسی اثر سیلیکون بر رشد *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

بر اساس نتایج بدست آمده درصد بازدارندگی سیلیکون از رشد قارچ تا غلظت 5 میلی مولار اختلاف معنی داری از خود نشان نداد. اما در غلظت 6 و 7 میلی مولار اختلاف معنی داری با شاهد از خود نشان داد (جدول 4 و 5).

جدول 4- درصد بازداری از رشد قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* در محیط حاوی غلظت‌های مختلف سیلیکون (mM).

میزان رشد	غلظت SiO ₂ (mM)
0 A	شاهد
A 0/03	1
A .93	2
A 1 /25	3
A 1 /25	4
AB7 /8	5
B15 /9	6
C31 /2	7

اعداد با حروف یکسان در سطح 1% معنی دار نمی باشند Cv=6/71

جدول 5- تجزیه واریانس بررسی تاثیر غلظتهای مختلف سیلیکون بر روی رشد قارچ *Fusarium oxysporum lycopersici*

F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه ی آزادی (df)	منبع تغییرات (SOV)
94/71**	0/3477	2 /4343	7	تیمار
	0/0036	0/881	24	خطا
		2 /5223	31	کل
		CV=7/03		

** در سطح 1% اختلاف معنی دار است

تاثیر باکتری *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) 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 8 هفته در سطح 5% 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) می باشد. 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 (جدول 6).

جدول 6- 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	A6/5	I4/22	J16
F+B	D5	H4/5	G18
F+Si	B5	H4/5	I16/5
F+SiSP	C5/5	G4/72	H17/5
F+B+Si	E4/6	E6/35	FI21
F+B+SiSP	F4/3	D6/7	D23
P	G1/4	F6/05	E22
Si	-----	C8	C24
SiSP	-----	B8/05	B25
B	-----	A8/3	A27

اعداد هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح 1% بر اساس آزمون دانکن باهم اختلاف معنی داری ندارند (هر عدد میانگین چهار تکرار است). P= گیاه، F= شاهد عامل بیماری پژمردگی، B= باکتری، Si= سیلیکون به صورت خیساندن خاک، SiSP= سیلیکون به صورت اسپری برگی.

بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در گیاه گوجه فرنگی تیمار شده با سیلیکون و *Pseudomonas*

fluorescens (CHAO) و سپس مایه زنی شده با قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

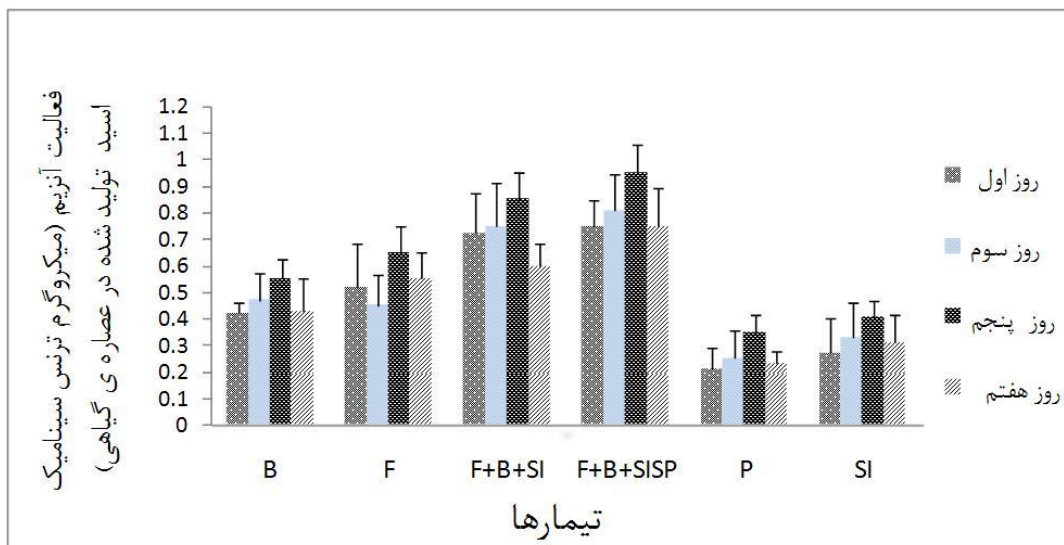
بین تیمارهای مختلف کمترین میزان مربوط به گیاه شاهد منفی بود. در همه‌ی تیمارها میزان آنزیم تا روز پنجم افزایش پیدا کرد و بعد از آن رو به کاهش نهاد. بیش‌ترین میزان آنزیم مربوط به تیمار فوزاریوم همراه با باکتری و سیلیکون به صورت هوایی بود. در هر دو تیمار باکتری و سیلیکون همراه با عامل بیماری چه به صورت 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 صورت زمینی بود. میزان تولید آنزیم در تیمار قارچ به تنهایی در روز سوم نسبت به روز اول کاهش پیدا کرده ولی در روز کمتر از قارچ به تنهایی بود. میزان آنزیم در تیمار قارچ به تنهایی در روز سوم نسبت به تیمار باکتری بیش‌تر بود، 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 (شکل 1 و جدول 7).

جدول 7- تجزیه واریانس مربوط به تغییرات آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در ریشه‌ی گوجه فرنگی مایع زنی شده با سیلیکون و

باکتری *Pseudomonas fluorescens* (chao) در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی *F.oxysporum f.sp. lycopersici*

F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه ی آزادی (df)	منبع تغییرات (SOV)
1608**	0/713	2/139	3	روزهای نمونه برداری (A)
909**	1/403	2/016	5	تیمار (B)
59**	0/0263	0/395	15	A×B
	0/0197	0/031	72	خطای آزمایش
		4/583	95	کل
		CV= 4. 78		

** در سطح 1% اختلاف معنی دار است



شکل 1- اثر سیلیکون، باکتری *Pseudomonas fluorescens* و قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* روی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در ریشه ی گیاه گوجه فرنگی.

اعداد هر ستون میانگین چهار تکرار \pm 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 بوسیله 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 میکرواورگانیزم‌ها 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 3 میلی مولار سیلیکون رشد باکتری به شدت کاهش یافت و بنابراین از غلظت 3 میلی مولار برای آزمایشات گلخانه‌ای استفاده شد. هم-

چنین نتایج این پژوهش نشان از تاثیر منفی سیلیکون بر روی رشد میسلومی قارچ در غلظت 6 و 7 میلی مولار داشت. در آزمایشات گلخانه‌ای اثر سیلیکون و باکتری روی عامل بیماری با استفاده از شاخص‌های شدت بیماری، وزن تر ریشه و وزن تر اندام هوایی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمایش مایه‌زنی گیاه با عامل بیماری 48 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 همگی تیمارها با گیاه شاهد اختلاف معنی داری 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 بیماری‌زا افزایش می‌دهد. بررسی تغییرات فعالیت این آنزیم نشان داد که بین تیمارها و بین روزها تفاوت معنی دار در سطح 5% وجود دارد به گونه‌ای 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 همگی 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 (2010) 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 بیش تر 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 5 برابری فعالیت PAL در غلاف‌های برگ مایه زنی شده برنج را پس از 24 ساعت 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 آنزیم‌های پراکسیداز، PAL، بتا آمینو 1 و 3 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 oxysporum 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 (1983) بیان کردند که *Pseudomonas fluorescens* مکانیسم‌های دفاعی را در گیاهان تحریک می‌کند و باعث افزایش مقاومت گیاه در مقابل قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق و نتایج حاصل از کار دیگر محققین

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

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.

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 Pieterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453–483.
24. Vandenberg PA, Gonzalez CF, Wright AM, and Kunka BS. 1983. Iron- chelating compounds produced by soil pseudomonads: correlation with fungal growth inhibition. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 128–132.

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 Norabadi¹, N. Sahebani², H. R. Etebarian³

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. fluorescens* 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

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