کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۴، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴ (۸۸-۷۷)

بررسی قابلیت مهارکنندگی تعدادی از سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* روی بیماری بوته‌میری خیار

۱. الهام اکبری‌مقدم*؛ ۲. روح‌الله صابری ریسه؛ ۳. پژمان خدایگان؛ ۴. حسین علایی
۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج)، رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۱۹)

چکیده

در این مطالعه، اثر بیوکنترلی برخی سودوموناد‌های فلورسنت در برابر *Pythium aphanidermatum* عامل بیماری بوته‌میری خیار بررسی شد. در ابتدا، توانایی آنتاگونیستی سویه‌های باکتریایی علیه قارچ بیمارگر با استفاده از روش کشت متقابل ارزیابی شد. نتایج نشان داد که هالهٔ بازدارندگی سویهٔ T17-4 (۷/۵ میلی‌متر) بیشتر از سایر سویه‌ها بود. هفت سویه شامل سویهٔ T17-4، CHA0، CHA89، VUPf52، VUPf506، VUPf760 و VUPf5 که بهترین اثر را روی کنترل چندین بیماری داشته‌اند برای مرحلهٔ گلخانه انتخاب شدند. همچنین، سویه‌های مذکور پارامترهای رشدی گیاه شامل ارتفاع و وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه را افزایش دادند. نتایج تغییرات دفاعی نشان داد که بیشترین میزان افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان فنل کل و پلی‌فنل‌اکسیداز، نه روز پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری، مشاهده شدند و سپس، کاهش یافتند. میزان افزایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان فنل کل و پلی‌فنل‌اکسیداز در تیمارهای حاوی باکتری و قارچ به‌صورت توأم، در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار بود.

کلیدواژگان: پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز، فنل کل، کنترل بیولوژیک، Pythium.

مقدمه

خیار، گیاهی یک‌ساله، با نام علمی *Cucumis sativus* یکی از گیاهان مهم خانوادهٔ کدوییان (Cucurbitaceae) است که همه‌ساله به‌طور وسیع در کشور کشت می‌شود. تقریباً خیار در تمام کشورهای مناطق معتدل و نیمه‌گرم کشت می‌شود و چهارمین سبزی مهم جهان پس از گوجه‌فرنگی، کلم و پیاز است (Eifediyi and Remison 2010).

با توجه به اینکه خیار در گلخانه، مزرعه و نیز در اقلیم‌های مختلف کشت می‌شود، شرایط برای حملهٔ تعداد زیادی از عوامل بیماریزا فراهم است. بیماری بوته‌میری[1] خیار نیز یکی از بیماری‌های مهم است که هر ساله خسارت زیادی به این محصول و به گلخانه‌داران وارد می‌کند.

Pythium aphanidermatum یکی از عوامل مهم

* تلفن: ۰۹۱۳۱۹۳۲۸۶۲
E-mail: elham.am1986@Yahoo.com

1. Damping-off

پوسیدگی ریشه و طوقهٔ خیار است. برای جلوگیری از کاهش محصول ناشی از بیماری، روش‌های کنترل متنوعی استفاده می‌شود. روش‌های فیزیکی مثل آفتاب‌دهی، استفاده از ترکیبات شیمیایی سمّی برای قارچ‌ها رایج‌ترین روش برای کنترل بیماری‌های قارچی در مزرعه و گلخانه است (Spadaro and Gullino 2005). هرچند این روش‌ها برای کنترل بیماری قارچی خیلی مؤثر هستند، بعضی مشکلات اصلی، استفاده از قارچ‌کش‌ها را محدود می‌کنند. همچنین، بعضی از قارچ‌ها نسبت به مواد شیمیایی مقاومت پیدا می‌کنند و از طرف دیگر گروهی از قارچ‌کش‌ها به‌طور سریع تجزیهٔ زیستی نمی‌شوند و مدت طولانی در محیط باقی می‌مانند که این خود به تأثیرات زیان‌بار مواد شیمیایی روی موجودات به جز قارچ هدف منجر می‌شود. اخیراً، به‌علت وجود این مشکلات، پتانسیل کاربرد میکروب‌ها بر پایهٔ عوامل بیوکنترل به‌عنوان جایگزین‌ها یا مکمل مواد شیمیایی در بسیاری از گزارش‌های علمی آورده شده است. میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیهٔ ریزوسفر زندگی می‌کنند، گزینه‌ای مناسب برای استفاده در برنامه‌های کنترل بیولوژیکی هستند، زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه علیه بیمارگرهای خاکزی است (Weller 1988, Salman *et al.* 2013).

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)[1] به انواع باکتری‌های مفید مستقر در این ناحیه اطلاق می‌شود. در بین باکتری‌های افزایش‌دهندهٔ رشد گیاه و مؤثر در کنترل بیولوژیک، باکتری‌هایی که به جنس *Pseudomonas* تعلق دارند، به‌خصوص سودوموناس‌های فلورسنت به‌دلیل توزیع گسترده در خاک، توانایی کلنیزه‌کردن ریزوسفر بسیاری از گیاهان و تولید طیف متنوعی از متابولیت‌ها اهمیت ویژه‌ای دارند، به‌گونه‌ای که کلنیزاسیون ریشهٔ گیاهان با باکتری‌های مفید مثل *P. fluorscens* سبب ایجاد نوعی از القای مقاومت بیولوژیکی می‌شود که به آن مقاومت القایی سیستمیک (ISR)[2] می‌گویند (Salman *et al.* 2013, Picard *et al.* 2000).

بسیاری از آنزیم‌ها از جمله پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO)[3]، پراکسیداز (POX)[4]، کیتیناز و محتویات فنلی در ارتباط با مقاومت القایی سیستمیک هستند. پراکسیدازها از جمله پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی، به خانوادهٔ PR-9 تعلق دارند (Odjakova and Hadjiivanova 2001). در سال ۱۹۶۸، اولین‌بار مکو[5] دخالت آنزیم پراکسیداز را در واکنش‌های دفاعی و در سال ۱۹۶۹، لهرر[6] اثر بازدارندگی پراکسیداز از رشد عوامل بیماریزا را اثبات کردند. پراکسیدازها اثر مستقیم در مقاومت دارند و از طریق تولید رادیکال آزاد و پراکسیدهیدروژن که برای بعضی بیمارگرها سمی هستند، به دفاع در برابر بیمارگرها منجر می‌شوند. آنزیم پراکسیداز در قسمت‌های مختلف سلول از جمله هسته، میتوکندری، ریبوزوم، دیوارهٔ سلولی و غشای سلولی یافت می‌شود (Fric 1976).

در سال ۱۹۲۹، اولین‌بار نیوتن و اندرسون[7] فرضیهٔ سنتز ترکیبات فنلی را برای توجیه مقاومت گیاهان در برابر بیماری‌ها پیشنهاد کردند؛ سپس، محققان مختلف تغییر ترکیبات فنلی و نقش آن‌ها در ایجاد مقاومت در گیاهان بیمار را مطالعه کردند و گزارش‌های این محققان نشان می‌دهد که تجمع مواد فنلی بیشتر در ارتباط با واکنش مقاومت است. برخی از این ترکیبات فنلی مانند اسید کلروژنیک و اسید کافئیک در انواع مختلف گیاهان وجود دارند (Goodman *et al.* 1986). مطابق با نتایج Matern and Kneusel (1988) اولین مرحله از فعالیت‌های دفاعی گیاه شامل تجمع سریع ترکیبات فنلی در سایت آلودگی است که رشد بیمارگر را کند یا محدود می‌کند.

آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در اکسیداسیون فنل‌ها به کوئینون‌ها و تشکیل لیگنین[8] در سلول‌های گیاهی نقش مؤثری دارد. در فرآیند اکسیداسیون فنل‌ها و تبدیل آن‌ها به کوئینون از مولکول اکسیژن به‌عنوان گیرندهٔ الکترون استفاده می‌شود. مطالعات متعددی دربارهٔ آنزیم‌های فنل اکسیداز بیانگر این موضوع است که آنزیم‌هایی نظیر پلی‌فنل‌اکسیداز یا Polyphenol-POX- H_2O ممکن است در فعالیت‌های دفاعی و همچنین،

1. Plant growth-promoting rhizobacteria
2. Induced Systemic resistance
3. Polyphenol Oxidase
4. Peroxidase
5. Meco
6. Lehrer
7. Newton and Anderson
8. Lignification

واکنش فوق حساسیت در مقابل ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها دخالت داشته باشند (El-Khallal 2007).

هدف از انجام این پژوهش استفاده از سویه‌های T17-4، CHA0، CHA89، VUPf52، VUPf506، VUPf760 و VUPf5 در کنترل بیماری بوته‌میری پیتیومی خیار است. همچنین، در این تحقیق القای مقاومت سیستمیک در گیاهان از جنبهٔ بیوشیمیایی با بررسی محتوای فنل کل، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز، ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ باکتری‌های سودوموناس فلورسنت و قارچ مورد استفاده

باکتری‌های مورد استفاده که شامل تعدادی از سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* هستند از باکتری‌های موجود در کلکسیون بیماری‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر (عج) و شبه قارچ *P. aphanidermatum* از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان تهیه شد. کد و منبع سویه‌های *Pseudomonas* spp. در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. کد و منبع سویه‌های *Pseudomonas* spp. استفاده‌شده در گلخانه

کد	منبع	سویه
CHA0	ریزوسفر توتون (سوئیس)	*Pseudomonas fluorescens*
CHA89	ریزوسفر توتون (سوئیس)	*Pseudomonas fluorescens*
VUPf506	ریزوسفر سیب‌زمینی (اردبیل، ایران)	*Pseudomonas fluorescens*
VUPf52	ریزوسفر درخت هلو (شمال ایران)	*Pseudomonas fluorescens*
VUPf5	ریزوسفر درخت هلو (شمال ایران)	*Pseudomonas fluorescens*
T17-4	ریزوسفر بارهنگ (تهران، ایران)	*Pseudomonas* sp.
VUPf760	ریزوسفر درخت کاج (تهران، ایران)	*Pseudomonas* sp.

بررسی تأثیر سویه‌های باکتری علیه قارچ‌های بیمارگر خاکزی در مرحلهٔ آزمایشگاهی

تعداد بیست جدایهٔ باکتری برای بررسی تأثیر آن‌ها علیه جدایه‌های قارچی انتخاب شدند. ابتدا، باکتری‌ها به‌صورت نقطه‌ای روی محیط کشت PDA[1] به فاصلهٔ ۰/۵ سانتی‌متر از لبهٔ پتری‌دیش کشت داده‌شدند و هم‌زمان با آن قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ مورد نظر در وسط پتری‌دیش قرار گرفت. در سمت شاهد، فقط نوک لوپ سترون با نقطه تماس داده شد. پتری‌ها به‌مدت یک الی دو روز در دمای ۲۴ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از رسیدن حاشیهٔ کلونی قارچ به فاصلهٔ ۰/۵ سانتی‌متری از لبهٔ پتری شاهد، وجود هالهٔ بازدارندگی از رشد قارچ به‌عنوان واکنش مثبت تلقی شد. برای مقایسهٔ قدرت بازدارندگی، فاصلهٔ کلونی باکتری تا میسیلیوم قارچ اندازه‌گیری شد (Hagedorn *et al.* 1989, Keel *et al.* 1996).

بررسی‌های گلخانه‌ای

روش آغشته‌سازی بذر با باکتری‌های آنتاگونیست

در این مرحله از کشت ۲۴ ساعته هر سویهٔ آنتاگونیست باکتری روی محیط کینگ‌براث (KB) آگار سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^9 سلول باکتری در میلی‌لیتر تهیه شد.

برای آغشته‌سازی بذرهای خیار به باکتری‌های آنتاگونیست، کربوکسی متیل سلولز به نسبت ۰/۰۵ درصد به سوسپانسیون‌ها افزوده شد (Ownley *et al.* 2003). سپس، به‌مدت ۲ ساعت روی شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس در سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^9 سلول باکتری قرار گرفتند و در نهایت، در معرض جریان هوای هود خشک شدند (Raupach and Kloepper 1998).

برای تهیهٔ بذرهای مورد استفاده به‌عنوان شاهد مثبت همهٔ مراحل آغشته‌سازی بدون حضور باکتری انجام شد.

تهیهٔ مایهٔ تلقیح قارچ بیمارگر

ابتدا، قارچ روی محیط کشت آگار آرد ذرت (CMA)[2]

1. Potato dextrose agar

2. Corn Meal Agar

قرار داده شد و تشتک‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. سپس، در زیر جریان هود ۲۰ عدد بذر شاهدانه استریل‌شده درون هر تشتک کشت قرار داده شد و تشتک‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت.

آماده‌سازی گلخانه

بذرهای خیار مورد استفاده در این پژوهش، رقم محلی یزد بود که با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. سپس، بذرهای آغشته‌شده به باکتری با پنس در عمق ۰/۵ سانتی‌متری از سطح خاک سترون گلدان‌ها کاشته شدند، به‌گونه‌ای که برای هر تیمار ۴ تکرار (۴ گلدان) و برای هر تکرار ۳ زیر تکرار (در هر گلدان ۳ بذر) در نظر گرفته شد و گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲±۲۵ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. براساس حجم و وضعیت رطوبتی گلدان‌ها، مقدار آب متناسب برای آن‌ها (روزانه ۳۰ میلی‌لیتر) مشخص شد به نحوی که پس از افزودن این مقدار آب، از زیر گلدان بیش از چند قطره خارج نشود.

آلوده‌سازی خاک

پس از چهار برگی‌شدن گیاهچه‌ها، آلوده‌سازی به روش Rostami *et al.* (2010) انجام شد، به‌گونه‌ای که در اطراف طوقهٔ هر گیاهچه در عمق ۱ سانتی‌متری از خاک، سه بذر شاهدانه قرار داده شد. پس از غرقاب‌کردن گلدان‌ها، به‌منظور افزایش رطوبت محیط، روی گیاهچه‌ها با آب مقطر مه‌پاشی انجام شد و پوشش پلاستیکی روی آن‌ها کشیده شد. پس از ۷۲ ساعت، پوشش پلاستیکی برداشته شد و دما و رطوبت طبیعی در اختیار گیاهچه‌ها قرار گرفت. در گلدان‌های شاهد، به جای بذر شاهدانهٔ آلوده، بذر شاهدانهٔ سترون استفاده شد.

برای ارزش‌گذاری شدت آلودگی و ارزیابی عکس‌العمل گیاهان در مقابل قارچ عامل بیماری از ارزش‌های ۰ تا ۵ (۰: بدون علایم بیماری، ۱. پژمردگی اندک برگ‌های گیاهچه و ظهور لکه‌های قهوه‌ای و نکروزه در ناحیهٔ ساقه و طوقه، ۲. بیمارشدن ۳۰ تا ۵۰ درصد از گیاهچه، ۳. بیمارشدن ۵۰ تا ۷۰ درصد از گیاهچه، ۴. بیمارشدن ۷۰ تا ۹۰ درصد از گیاهچه، ۵. ازبین‌رفتن کامل گیاهچه) استفاده شد (Ozgonen and Erkilic 2007). با استفاده از نمره‌دهی آلودگی در واکنش قابل مشاهده بین میزبان و بیمارگر، درصد شدت بیماریزایی بعد از ۴ هفته برای هر تکرار به کمک معادلهٔ (۱) محاسبه شد.

$$\text{شدت بیماری} = \frac{(0\times n_0 + 1\times n_1 + 2\times n_2 + 3\times n_3 + 4\times n_4 + 5\times n_5)}{(n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5)\times 5}\times 100 \quad (1)$$

n_i تعداد گیاهچه‌های آلوده مورد ارزیابی در نمره‌دهی i است.

مطالعات بیوشیمیایی

جمع‌آوری نمونه و طرح آزمایشی

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی تنظیم شد که شامل ۱۶ تیمار و ۳ نوبت زمانی نمونه‌برداری بود. نمونه‌برداری در روزهای ۳، ۹ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی انجام شد. به‌دلیل زمانبربودن هر نوبت نمونه‌برداری، در هر نوبت برگ‌ها پس از چیده‌شدن در پاکت‌هایی قرار داده شدند و بلافاصله به یخچال با دمای ۴ درجهٔ سلسیوس منتقل شدند. مدت نگه‌داری برگ‌ها در یخچال فقط تا پایان هر نوبت نمونه‌برداری بود (کمتر از ۸ ساعت) که پس از اتمام نمونه‌برداری، برگ‌ها برای آزمایش‌های مورد نظر در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند.

استخراج پروتئین از برگ

۰/۵گرم از بافت تازهٔ گیاهی در ۳ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۵) که حاوی پلی‌وینیل‌پیرولیدین[1] (PVP) ۱ درصد و EDTA[2] ۱ میلی‌مولار بود، ساییده شد. تمام مراحل استخراج در یخ انجام شد. سپس، عصاره‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰×g و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شدند. از محلول شفاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها و پروتئین کل استفاده و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شد (Reuveni 1995).

1. Poly vinyl pyrrolidone
2 .Ethylen ediaminet etraacetic acid

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی کل

اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش فولین ـ سیاکالتیو[1] انجام شد (Soland and Laima 1999). ۰/۰۵ گرم از بافت در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده و مخلوط حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگه‌داری شد. پس از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰×g به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته شد و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و حجم محلول با آب مقطر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به محلول حاصل ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد اضافه و شدت جذب نمونه‌ها پس از ۱ ساعت نگه‌داری در تاریکی با اسپکتروفتومتر[2] در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی، در نمونهٔ شاهد و تیمار با ۴ تکرار انجام شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO)

مخلوط واکنش شامل ۲/۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ و ۰/۶ میلی‌لیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی‌مولار بود که در بن‌ماری با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شد. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی شروع شد و میزان جذب در ۴۲۵ نانومتر، پس از ۱۰ دقیقه نسبت به زمان شروع واکنش، محاسبه شد (Fujita *et al.* 1995).

فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصارهٔ به‌دست‌آمده از روش Bradford (1976) محاسبه شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)

برای این منظور از روش MacAdam *et al.* (1992) استفاده شد. به این ترتیب که به ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، ۵۰ میکرولیتر مایع گایاکول ۰/۲ مولار، ۴۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید (H_2O_2) ۰/۰۳ مولار و سپس، ۲۰ میکرولیتر عصاره اضافه شد و بعد از ورتکس، بلافاصله تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۳۶ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در فواصل زمانی ۱۵ ثانیه، به‌مدت ۳ دقیقه، ثبت شد. بعد از اضافه‌کردن آب اکسیژنه و ترکیب گایاکول رنگ محلول، قرمز مایل به قهوه‌ای شد (MacAdam *et al.* 1992).

شکل ۱. فعالیت آنزیم پراکسیداز (نمونهٔ سمت راست نمونهٔ بدون عصارهٔ آنزیمی و نمونهٔ سمت چپ نمونهٔ همراه با عصارهٔ آنزیمی)

پروتئین کل

سنجش مقدار پروتئین کل با روش Bradford (1976) انجام شد. به این منظور به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصارهٔ پروتئینی و ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و بلافاصله ورتکس شد. پس از ۲ دقیقه و قبل از ۱ ساعت، جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین‌ها با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد. اندازه‌گیری میزان پروتئین در نمونهٔ شاهد و تیمار با ۴ تکرار انجام شد (Bradford 1976).

تهیهٔ معرف برادفورد

به‌منظور تهیهٔ معرف بیوره، ۰/۱ گرم کوماسی‌بریلیانت‌بلو G250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به‌مدت ۱ ساعت حل و سپس، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد قطره‌قطره به آن افزوده شد. در پایان، حجم کل محلول به کمک آب مقطر به ۱ لیتر رسانده و محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۱ صاف شد.

روش محاسبه‌های آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

همهٔ آزمایش‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۴ تکرار (هر تکرار یک گلدان) و هر تکرار حاوی سه گیاهچهٔ خیار بود. تجزیهٔ آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری پارامترها، با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسهٔ میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح

1. Folin-Ciocalteau
2. Spectrophotometry

احتمال ۵ درصد انجام و برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد.

نتایج

تأثیر سویه‌های باکتریایی علیه قارچ بیمارگر درون پتری‌دیش

از بین ۲۰ سویهٔ باکتریایی، سویهٔ T17-4 هالهٔ بازدارنده‌ای به‌اندازهٔ ۷/۵ میلی‌متر ایجاد کرد و بقیهٔ سویه‌ها بدون هالهٔ بازدارندگی بودند. سویهٔ مذکور به همراه CHA0، CHA89، VUPf52، VUPf506، VUPf760 و VUPf5 که بهترین اثر را روی کنترل چندین بیماری (از قبیل پاخورهٔ غلات، پوسیدگی خشک فوزاریومی سیب‌زمینی، نماتد ریشهٔ گرهی پسته و ...) داشته‌اند (Khatamidoost Shekarsaraee 2014) برای مرحلهٔ گلخانه انتخاب شدند.

بررسی اثر جدایه‌های باکتریایی در کنترل بیماری بوته‌میری خیار در شرایط گلخانه

با بررسی شدت آلودگی مشخص شد در مقایسه با شاهد آلوده بهترین تأثیر مربوط به سویه‌های VUPf52، VUPf5 و T17-4 با کاهش به‌ترتیب ۵۰، ۴۹ و ۴۳ درصد بیماری است.

شکل ۲. بررسی اثر سویه‌های *P. fluorescens* در کاهش میزان بیماری ناشی از قارچ *P. aphanidermatum* (P.a مخفف *Pythium aphanidermatum* است.)

نتایج تأثیر سویه‌های باکتریایی بر شاخص‌های رشدی گیاه

بررسی اثر سویه‌های باکتری روی شاخص‌های رشدی گیاه از جمله ارتفاع ریشه و ساقه، وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی (شکل ۳ تا ۵) نشان داد که تیمارهای مختلف باکتری تأثیرهای متفاوتی داشتند؛ به‌گونه‌ای که سویه‌های VUPf52، T17-4 و VUPf5 بیشترین تأثیر را در افزایش فاکتورهای رشدی داشتند (در تمامی شکل‌ها P.a مخفف *Pythium aphanidermatum* است).

تغییرات ترکیبات فنلی در برابر تلقیح قارچ *P. aphanidermatum*

مقایسهٔ میانگین مقادیر فنل کل در شکل ۶ نشان داده شده است. هم‌چنانکه از این نمودار استنباط می‌شود، مقدار ترکیبات فنلی تا روز نهم بعد از تلقیح به‌صورت افزایشی بود و پس از آن، کاهش می‌یابد؛ بیشترین افزایش در روز نهم بعد از تلقیح مربوط به تیمار VUPf52 است که موجب افزایش ترکیبات فنلی به‌اندازهٔ ۲/۴۳ برابر نسبت به شاهد سالم شده است.

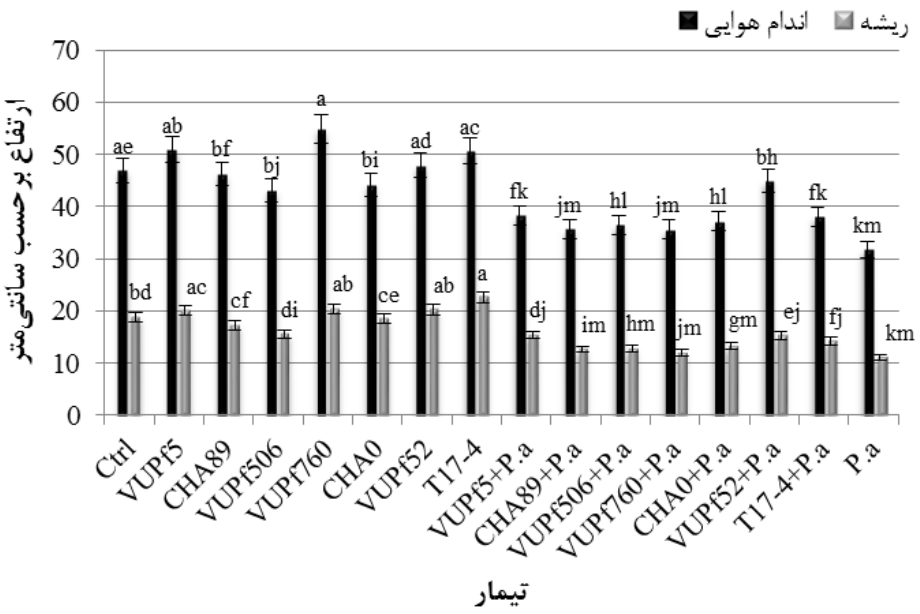
تغییرات پراکسیداز در برابر تلقیح قارچ *P. aphanidermatum*

مقایسهٔ میانگین مقادیر پراکسیداز در نمودار شکل ۷ نشان داده شده است (P.a مخفف *Pythium aphanidermatum* است). هم‌چنانکه از این نمودار استنباط می‌شود، مقدار آنزیم پراکسیداز تا روز نهم بعد از تلقیح به‌صورت افزایشی

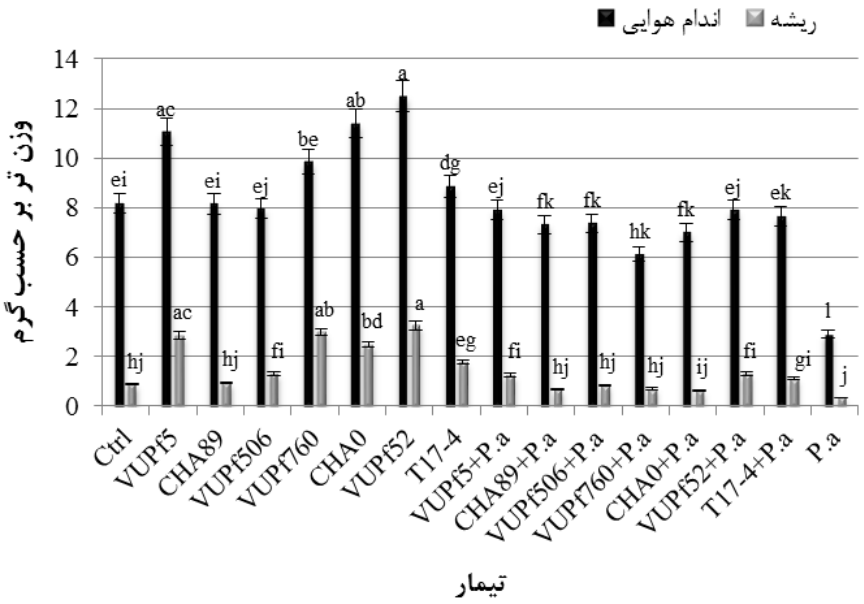
بود و پس از آن کاهش می‌یابد؛ بیشترین افزایش مربوط به تیمار VUPf52 است که موجب افزایش پراکسیداز به‌اندازهٔ بیش از ۲/۵ برابر نسبت به شاهد سالم شده است.

تغییرات پلی‌فنل‌اکسیداز در برابر تلقیح قارچ *P. aphanidermatum*

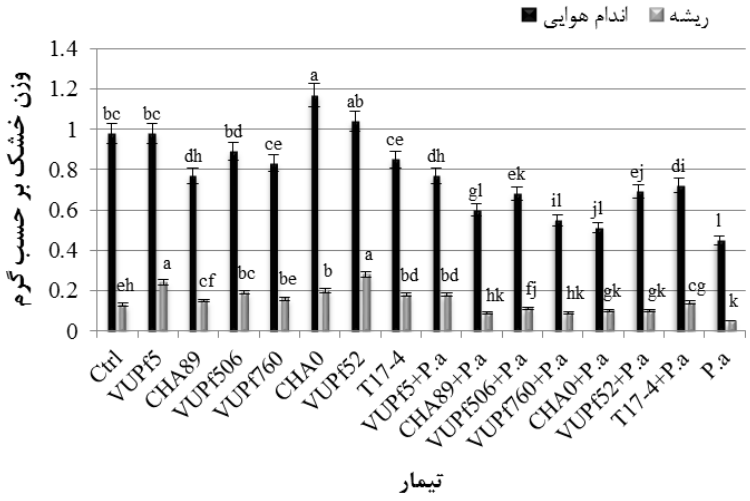
مقایسهٔ میانگین مقادیر پلی‌فنل‌اکسیداز در نمودار شکل ۸ نشان داده شده است (P.a مخفف *Pythium aphanidermatum* است). هم‌چنانکه از این نمودار استنباط می‌شود، مقدار پلی‌فنل‌اکسیداز تا روز نهم بعد از تلقیح به‌صورت افزایشی بود و پس از آن کاهش می‌یابد؛ بیشترین افزایش مربوط به تیمار VUPf52 است که موجب افزایش پراکسیداز به‌اندازهٔ ۱/۵ برابر نسبت به شاهد سالم شده است.



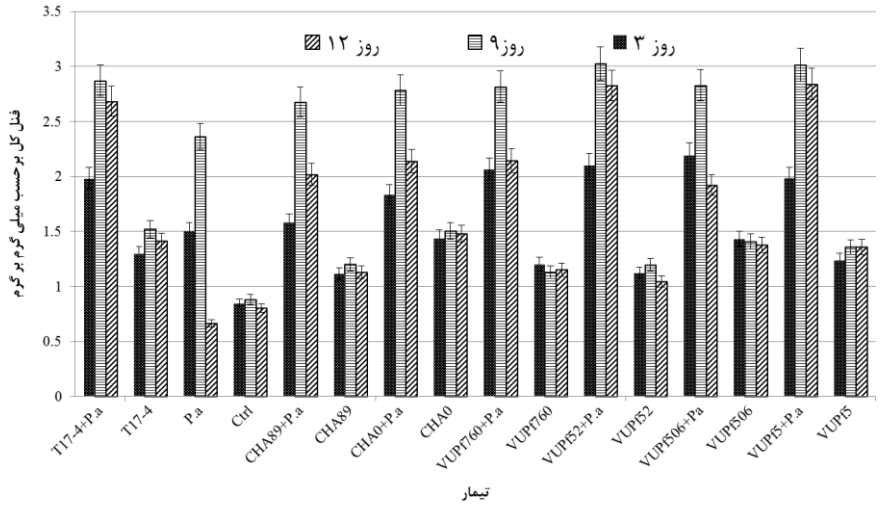
شکل ۳. میانگین ارتفاع اندام هوایی و ریشه تیمارهای تلقیح‌شده با قارچ *P. aphanidermatum*



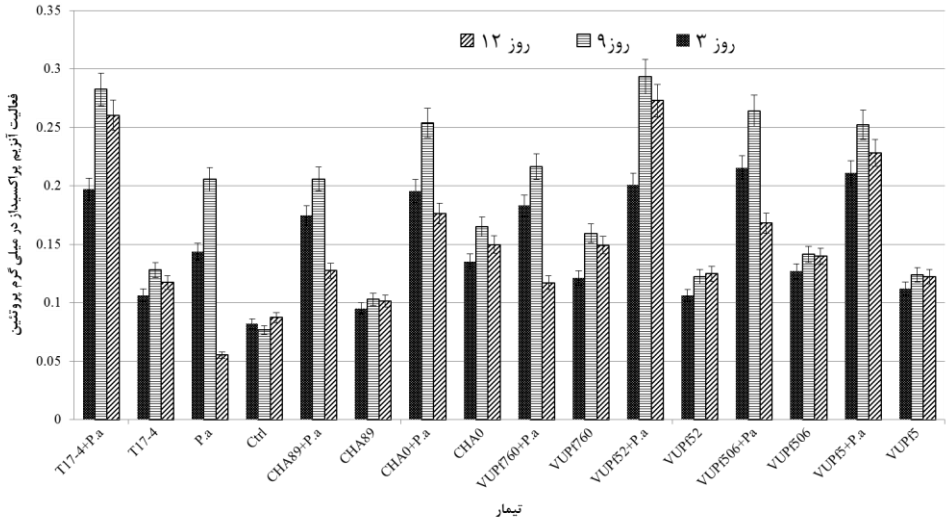
شکل ۴. میانگین وزن تر اندام هوایی و ریشهٔ تیمارهای تلقیح‌شده با قارچ *P. aphanidermatum*



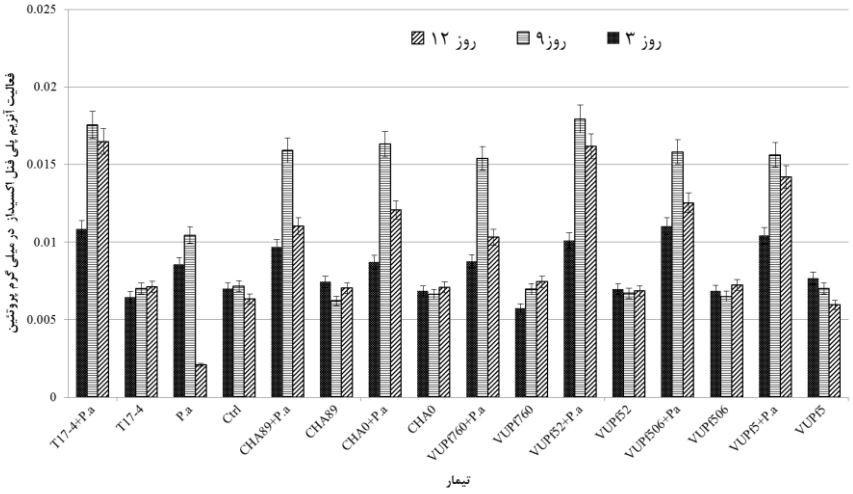
شکل ۵. میانگین وزن خشک اندام هوایی و ریشهٔ تیمارهای تلقیح‌شده با قارچ *P. aphanidermatum*



شکل۶. تغییرات فنل کل در گیاهچه‌های خیار بر اثر تلقیح با قارچ *P. aphanidermatum*



شکل ۷. تغییرات پراکسیداز در گیاهچه‌های خیار بر اثر تلقیح با قارچ *P. aphanidermatum*



شکل ۸. تغییرات پلی‌فنل‌اکسیداز در گیاهچه‌های خیار بر اثر تلقیح با قارچ *P. aphanidermatum*

بحث

در این پژوهش، نتایج حاصل از تست هالهٔ بازدارندگی و بررسی سطح بازدارندگی در شرایط گلخانه‌ای حاکی از آن بود که سویه‌های VUPf52 و VUPf5 که درون پتری‌دیش نتوانستند از رشد قارچ *P. aphanidermatum* جلوگیری کنند، در شرایط گلخانه قابلیت بیوکنترلی از خود نشان دادند.

با وجود اینکه در مواردی شاخص‌های آزمایشگاهی به‌خصوص شاخص «هالهٔ بازدارندگی» در انتخاب سویه‌هایی با قابلیت بیوکنترلی بیشتر استفاده می‌شوند، ولی باید پذیرفت که رفتار سویه‌ها روی محیط‌های کشت در شرایط آزمایشگاهی با شرایط گلخانه‌ای متفاوت است. به‌طور کلی محیط PDA برای کشت متقابل باکتری و قارچ، یک محیط استاندارد است که در کارهای انجام‌شده در دنیا نیز از این محیط استفاده می‌شود. در محیط آزمایشگاه مکانیسم‌های مهم بیوکنترلی از جمله کلنیزاسیون، رقابت و مقاومت القایی درگیر نخواهند بود. بنابراین، نمی‌توان انتظار داشت یک باکتری موفق در محیط آزمایشگاه در محیط گلخانه نیز موفق باشد. تست هالهٔ بازدارندگی فقط یک تست اولیه است و برای غربال‌گیری اولیه انجام می‌شود و شاخص‌های آزمایش هالهٔ بازدارندگی تنها می‌توانند اطلاعاتی کلی دربارهٔ توان بالقوهٔ آنتاگونیست‌ها در شرایط تعریف‌شده‌ای به ما بدهند (Fravel 1988) و نمی‌توانند معیار مطمئنی برای ارزیابی قابلیت بیوکنترلی آن‌ها در شرایط طبیعی باشند. در این‌گونه موارد بهتر است کارایی هر استرین در شرایط مزرعه و حتی در شرایط مزارع مختلف ارزیابی شود تا بتوان با اطمینان بیشتری نسبت به کاربرد آن‌ها اقدام کرد.

با بررسی شدت آلودگی مشخص شد که سویه‌های سودوموناس فلورسنت توانستند در مقایسه با شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری در کاهش شدت آلودگی نشان دهند.

باکتری‌های ریزوسفری از مسیرهای مختلف موجب القای مقاومت می‌شوند. بسیاری از آنزیم‌ها از جمله پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز، کیتیناز و محتویات فنلی در ارتباط با مقاومت القایی سیستمیک هستند (Chen *et al.* 2000, Jung *et al.* 2007).

مقاومت القایی یک روش محافظت بیولوژیک محسوب می‌شود که هدف آن محدودکردن بیمارگر نیست؛ بلکه فعال‌کردن مقاومت در گیاه است. کلنیزه‌شدن ریشه با بعضی باکتری‌های تحریک‌کنندهٔ رشد گیاه در تحریک مقاومت سیستمیک در برابر عوامل بیماریزای قارچی و حتی باکتریایی، ویروسی و نماتدها مؤثر است (Murthy *et al.* 2014).

در این تحقیق مقدار کل ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز به‌عنوان سه عامل اساسی دفاع بیوشیمیایی، در برهم‌کنش خیار با عامل پیتیومی عامل بوته‌میری، از طریق اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد.

نتایج تغییرات آنزیم‌های دفاعی نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و میزان فنل کل در گیاهچه‌های خیار تیمارشده با تیمار باکتری و قارچ به‌صورت توأم، در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت. 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).

در این آزمایش بیشترین میزان افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان فنل کل و پلی‌فنل‌اکسیداز در روز نهم پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد. نتایج این بررسی نشان داد که افزایش در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و ترکیبات فنلی و پلی‌فنل‌اکسیداز می‌تواند دلیلی بر القای این ترکیبات دفاعی در گیاهچهٔ خیار توسط سویه‌های *P. fluorescens* باشد که با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (Chen *et al*. 2000, Nandakumar *et al*. 2001, Harish *et al*. 2008).

به‌طور کلی گیاهچه‌های خیار تیمارشده با باکتری و قارچ، نسبت به گیاهانی که تنها با قارچ تیمار شده بودند، روند پایدارتری را در بالا نگاه‌داشتن میزان آنزیم نشان دادند که این نشان از کنترل چشمگیر بیماری دارد. وجود مقاومت القایی در گیاهچه‌ها می‌تواند بیانگر همزیستی و استقرار عامل آنتاگونیست روی ریشه باشد که موجب تحریک گیاهچه‌ها شده است. همچنین، این موضوع نشان می‌دهد که مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری به‌عنوان یک تنش زندهٔ خارجی موجب تحریک گیاه به فعال‌شدن یا افزایش مکانیسم‌های دفاعی روی گیاهچه‌ها خیار می‌شود.

این روند مشابه با روند فعالیت پراکسیداز در گیاهچه‌های خیار مایه‌کوبی‌شده با جدایهٔ CH33 از ریزوباکتری *Pseudomonas corrugate* در مقابل *P. aphanidermatum* در تحقیق Chen *et al*. (2000) است. از نظر مورفولوژی نیز این گیاهان سلامت بیشتری دارند و تا روز آخر علایم بیماری در اندام‌های هوایی کمتر دیده شد.

همچنین، مشخص شده است که آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در گیاهان گوجه‌فرنگی به مقدار بسیار زیادی بیان می‌شود و بیان زیاد این آنزیم با افزایش مقاومت به بیمارگر همراه است (Li and Steffens 2002).

از طرف دیگر، در گیاهچه‌های تیمارشده با باکتری و قارچ توأم، کاهش مشاهده‌شده در میزان فعالیت ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز که البته همچنان دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار گیاهان با باکتری به تنهایی بود، به نظر می‌رسد نشان از شروع زوال در القای انجام‌شده در این تیمار دارد. معمولاً روند القای مقاومت یا همان سطح آنزیم‌ها حالت صعودی مشخصی ندارد و بعد از چند روز این میزان افزایش، کاهش پیدا می‌کند، زیرا ابتدا پاتوژن و باکتری توأماً موجب ایجاد مقاومت می‌شوند و با گذشت زمان با حملهٔ قارچ مقاومت گیاه تحلیل می‌رود و روند آنزیمی کاهش می‌یابد.

افزایش پراکسیدازها در واکنش میزبان- پارازیت ممکن است با مقاومت میزبان در برابر بیماری همراه باشد (Yamamoto 1995). آنزیم پراکسیداز با دخالت در مرحلهٔ نهایی تولید لیگنین موجب افزایش مقاومت به بیماری می‌شود (Murthy *et al*. 2014).

ترکیبات فنلی نقش فعال در مقاومت دارند و تجمع مواد فنلی در مراحل اولیهٔ آلودگی در محل‌های آلوده موجب مرگ سریع سلول و در نتیجه توقف رشد عامل بیماریزا می‌شود.

مهم‌ترین برتری عوامل بیوکنترلی که از مکانیزم القای مقاومت بهره می‌برند، این است که برخلاف مکانیزم‌های دیگر که تنها در حضور آنتاگونیست فعال امکان‌پذیرند، در این نوع حفاظت هنگامی که در گیاه میزبان القاشده، جمعیت عامل آنتاگونیست در خاک به آستانهٔ خاصی رسید، مکانیزم‌های مقاومت می‌توانند حتی بعد از کاهش جمعیت آنتاگونیست تا مدت طولانی دوام داشته باشد (Van Loon and Van Strien 1999).

در پایان، پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی برای بررسی بیشتر مقاومت القایی از سیستم دونیم‌شدهٔ ریشه[1] استفاده شود، به‌طوری که هر نیمه در یک گلدان مجزا گذاشته شوند (Akram *et al*. 2013).

1. Split-root system

REFERENCES

Akram W, Anjum T, Ali B, Ahmad A (2013) Screening of native bacillus strains to induce systemic resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt in split root system and its field applications. International Journal of Agriculture and Biology 15: 1289-1294.

Alabouvette C, Olivain C, Steinberg C (2006) Biological control of plant diseases: the European situation. European journal of plant pathology 114: 329-341.

Bakker AW, Schippers B (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* sp. mediated plant growth stimulation. Soil Biology and Biochemistry 19(4): 451-457.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.

Chen C, Belanger RR, Benhamou N, Paulitz TC (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.

Cummings SP (2009) The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems. Environmental Biotechnology 5(2): 43-50.

Eifediyi EK, Remison SU (2010) Growth and yield of cucumber (*Cucumis sativus* L.) as influenced by farmyard manure and inorganic fertilizer. Journal of Plant Breeding and Crop Science 2: 216-220

El-Khallal SM (2007) Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid and salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 1: 717-732.

Fravel DR (1988) Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. Annual Review of Phytopathology 26: 75-91.

Fric F (1976) Oxidative enzymes, *In*: Heitefuss R, Williams PH (eds.), Encyclopedia of plant physiology. Springer, Berlin Hidelberg New York, 4: 617 - 631.

Fujita S, Saari NB, Maegawa M, Tetsuka T, Hayashi N, Tono T (1995) Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 43: 1138-1142.

Goodman RN, Király Z, Wood KR (1986) The biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press.

Jung W J, Mabood F, Kim TH, Smith DL (2007) Induction of pathogenesis-related proteins during biocontrol of Rhizoctonia solani with Pseudomonas aureofaciens in soybean (*Glycine max* L. Merr.). Biological Control of Plant Pathogens 52: 895-904.

Hagedorn C, Gould WD, Bardinelli TR (1989) Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied and Environmental Microbiology 55: 2793-2797.

Harish S, Kavino M, Kumar N, Saravana Kumar D, Soorianathasundaram K, Samiyappan R (2008) Bio hardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against banana bunchy top virus. Applied Soil Ecology 39: 187-200.

Keel C, Défago G (1997) Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. Multitrophic interactions in terrestrial systems: 27-46.

Keel C, Weller DM, Natsch A, Défago G, Cook RJ, 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.

Khatamidoost Shekarsaraee Z (2014) Effect of *Pseudomonas fluorescens* in control of pistachio root knot nematode in green house conditions. M.Sc., University of Guilan, Guilan, Iran. (in Persian)

Li L, Steffens JC (2002) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Planta 215: 239-247.

MacAdam JW, Nelson CJ, Sharp RE (1992) Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. Plant Physiology 99: 872-878.

Matern U, Kneusel RE (1988) Phenolic compounds in plant disease resistance. Phytoparasitica 16: 153-170.

Murthy KN, Uzma F, Srinivas CC (2014) Induction of systemic resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. American Journal of Plant Sciences 5: 1799.

Nandakumar R, Babu S, Viswanathan R, Raguchander T, Samiyappan R (2001) Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biology & Biochemistry 33: 603-612.

Odjakova M, Hadjiivanova C (2001) The complexity of pathogen defense in plants. Bulgarian Journal of Plant Physiology 27: 101-109.

Ownley BH, Duffy BK, Weller DM (2003) Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens*. Applied and Environmental Microbiology 69: 3333-3343.

Ozgonen H, Erkilic A (2007) Growth enhancement and Phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. Crop Protection 26: 1682-1688.

Raj SN, Sarosh BR, Shetty HS (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.

Rostami F, Alaei H, Karimi, HR (2010) Control off cucumber daming off (*Phytophthora drechsleri* Tucker) using cucumber transplan on pumpkin. Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress, 31 July- 3 August, Tehran, Iran. (in Persian)

Picard C, Cello I, Ventura M, Fani R, Guckert A (2000) Frequency and biodiversity of 2,4-diacetyphloroglucinol production bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. Applied and Environmental Microbiology 66: 948-955.

Raupach, GS, Kloepper JW, (1998) Mixtures of plant growth- promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple excumber pathogens. Journal of Phytopatholoy 88: 1158- 1164.

Reuveni, R (1995) Biochemical marker for disease resistance, *In*: Singh RP, Singh US (eds), Molecular methods in plant pathology. CRC Press, Boca Raton, FL: 99-144.

Salman M, Abuamsha R, Barghouthi, S (2013) Interaction of fluorescent pseudomonads with *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* in cucumber roots. American Journal of Experimental Agriculture 3(1): 240-251.

Schippers B, Bakker AW, Bakker PAHM (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology 25: 339-358.

Soland SF, Laima SK (1999) Phenolics and cold tolerance of Brassica napus. Plant Agric 1: 1-5.

Spadaro D, Gullino ML (2005) Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. Crop Protection 24: 601-613.

Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology 119: 243-254.

Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55: 85-97.

Weller DM (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology 26: 379-407.

Yamamoto H (1995) Pathogenesis and host-parasite specificity in rusts, *In*: Kohmoto K, Singh V, Singh RP (eds.), Plant disease histopathological. Biochemical, genetic and molecular bases. Vol. II. Eukaryots. Pergam.

Biological Control of Pests and Plant Diseases
Vol. 4, No. 2, Autumn & Winter 2015/ 2016

Evaluate the control ability of *Pseudomonas fluorescens* strains on cucumber root rot disease

Elham Akbari-Moghadam[1*], Rohallah Saberi-Riseh[2], Pejman Khodaygan[3] and Hossein Alaei[4]
1, 2, 3, 4. M. Sc. Student and Assistance Professors, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran
(Received: Jan. 22, 2015 - Accepted: Nov. 10, 2015)

ABSTRACT

In this study, biocontrol effect of some strains *Pseudomonas fluorescent* survey against *Pythium aphanidermatum* the causal agent of cucumber root rot disease. First biocontrol ability of bacteria against the fungal pathogen evaluated by cross-culture method. Results showed that inhibition zone of strain T17-4 (7.5 mm) was more than others. Seven strains including T17-4, CHA0, CHA89, VUPf52, VUPf506, VUPf760 and VUPf5 that had the best effect on control of some disease were selected for greenhouse conditions. The result of this experiment showed VUPf52, VUPf5 and T17-4 strains with 50, 49 and 43% (toward infected treatment) had the highest inhibition of cucumber root rot disease, respectively. These strains promote plant growth parameters such as height, dry and wet weight of shoot and root, too. The defense changes showed the highest increasing in peroxidase activity, total phenolic content and polyphenol oxidase after nine days inoculation and then decreased. The rate of increase in peroxidase activity, total phenolic content and polyphenol oxidase in treatments combined with bacteria and fungi compared with control treatment was significant.

Keywords: biological control, peroxidase, polyphenol oxidase, *Pythium aphanidermatum*, total phenol.

* Corresponding author E-mail: Elham.Am1986@Yahoo.com Tel: +98 913 1932862