

بررسی تأثیر تعدادی از سویه‌های باکتریایی بر واکنش‌های دفاعی خیار نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه

الهام اکبری مقدم، روح‌اله صابری ریشه، پژمان خدایگان، حسین علایی

گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

مسئول مکاتبات: روح‌اله صابری ریشه، پست الکترونیک: r.saberi@vru.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۹

۴۲-۲۹(۱)۶

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۰

چکیده

خیار یکی از مهم‌ترین محصولات جالیزی ایران است که آفات و عوامل بیماری‌زا محدودکننده کشت این محصول بوده و منجر به کاهش عملکرد می‌شوند. مبارزه بیولوژیک بهترین روش مبارزه با بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه است. در این تحقیق اثرات آنتاگونیستی سویه‌های سودوموناس فلورسنت روی قارچ‌های مهم پوسیدگی ریشه خیار در آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. از میان جدایه‌های مورد بررسی، جدایه‌ی VUPf760 بیشترین میزان هاله بازدارندگی را علیه قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *Fusarium solani* به ترتیب با ۹ و ۷ میلی‌متر نشان داد. همچنین در شرایط گلخانه اثرات بازدارندگی این جدایه‌ها بر بومه‌میری ارزیابی شد. بررسی‌ها نشان داد که تیمار بذرها با جدایه‌های T17-4 و VUPf5 به ترتیب ۵۸ و ۶۰ درصد شدت بیماری حاصل از قارچ‌های *F. solani* و *F. oxysporum* را کاهش دادند. ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز، فنل کل و پلی‌فنل اکسیداز نشان داد که هر دو جدایه قارچ به تنهایی باعث افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهچه خیار شدند. اما فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار باکتری و قارچ به صورت توأم، از میزان بالاتری برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: فوزاریوم، بیوکنترل، آنزیم، فاکتورهای رشدی

مقدمه

این بیماری ابتدا در طی سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۸۹ در جزیره کرت (Crete) یونان با خسارت شدید روی کشت‌های گلخانه‌ای مشاهده و گزارش گردید (Vakalounakis, 1996). پس از آن در سال ۱۹۹۲ قارچ *F. cucumerinum* به‌عنوان عامل پژمردگی خیار و *F. solani* f.sp *cucurbitacearum* عامل پوسیدگی قاعده ساقه و گاهی پوسیدگی میوه در کانادا گزارش شد (Jarvis, 1992). بیماری پوسیدگی ساقه و ریشه در اثر *F. oxysporum* f.sp *radicis-cucumerinum* (FORC) در سال ۱۹۹۴ در کانادا مشاهده و ثبت گردید (Cerkauskas et al., 2001). در ایران در طی سال‌های ۱۳۸۱-۱۳۸۰ این بیماری در گلخانه‌های جیرفت، یزد و بعد از آن در گلخانه‌های ورامین مشاهده و گزارش شد و اکنون به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خیار گلخانه‌ای درآمده است براساس مشاهدات و بررسی‌های انجام شده در کشور میزان آلودگی در برخی گلخانه‌ها تا حدود صد درصد روی ارقام حساس دیده شده است ولی به‌طورمعمول میزان آلودگی بین

خیار نسبت به گیاهان دیگر تیره کدوئیان در سطح وسیع‌تری کشت می‌شود و ایران از نظر میزان تولید با ۱,۶۰۰,۰۰۰ تن پس از چین و ترکیه سومین تولیدکننده این محصول در دنیا می‌باشد و از لحاظ سطح زیر کشت با ۷۰,۰۰۰ هکتار بعد از کشورهای چین و کامرون جایگاه سوم جهان را در اختیار دارد (Food and Agriculture Organization, 2012). پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد خیار است که خسارت زیادی به محصول در گلخانه‌ها وارد می‌آورد.

گونه‌های مختلفی از فوزاریوم از جمله فرم‌های اختصاصی *Fusarium solani* (Mart.) Sacc و برخی فرم‌های اختصاصی *Fusarium oxysporum* پوسیدگی ریشه، قسمت‌های پائینی ساقه و طوقه و پوسیدگی بذرها و گیاهچه‌ها (مرگ گیاهچه) را باعث می‌شوند (Agrios, 2005).

سیستمیک در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدها مؤثر است (Murthy et al., 2014). هدف از انجام این تحقیق استفاده از جدایه‌های سودوموناس فلورسنت در کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه خیار بود. در این تحقیق همچنین القای گیاهان از جنبه بیوشیمیایی با بررسی محتوی فنل کل (Total Phenol)، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (Peroxidase (POX)) و پلی فنل اکسیداز (Polyphenol Oxidase (PPO)) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

عوامل بیوکنترل باکتریایی

تعداد ۲۰ باکتری موجود در کلکسیون بیماری‌شناسی دانشگاه ولی عصر (عج) که شامل تعدادی از سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* جداسازی شده از سراسر ایران بود، در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱)

قارچ‌های بیمارگر

قارچ‌های *F. solani* با کد c35 و *F. oxysporum* با کد c57 از بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شد.

آزمون کشت متقابل

ابتدا باکتری‌ها به صورت نقطه‌ای روی محیط کشت PDA (potato dextrose agar) به فاصله ۰/۵ سانتی‌متر از لبه ظرف پتری کشت داده شده و هم‌زمان با آن قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ مورد نظر با قطر ۱ سانتی‌متر در وسط ظرف پتری قرار گرفت. در سمت شاهد، فقط نوک لوپ سترون با نقطه مرکز پتری تماس داده شد. ظروف پتری به مدت ۷-۱۰ روز در دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از رسیدن حاشیه پرگنه قارچ به فاصله ۰/۵ سانتی‌متری از لبه پتری شاهد، وجود هاله بازدارندگی از رشد قارچ به عنوان واکنش مثبت تلقی شد. برای مقایسه قدرت بازدارندگی، فاصله کلنی باکتری تا میسلیم قارچ اندازه‌گیری گردید (Keel et al., 1996؛ Hagedorn et al., 1989).

این آزمایش برای ۲۰ جدایه باکتریایی به صورت مجزا در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و

۲۰ تا ۶۰ درصد است (Shahriyari et al., 2006).

در بوته‌میری فوزاریومی بافت‌های داخلی طوقه متمایل به زرد می‌شوند. در رطوبت بالا، روی لکه‌های مرده به وسیله توده‌های اسپوری صورتی‌رنگ فوزاریوم پوشیده می‌شوند. مرگ تدریجی گیاه و زرد شدن یک‌طرف گیاه سبب تمایز علائم ایجاد شده توسط این بیمارگر از نشانه‌های سبز خشک شدن پی‌تیومی و فیتوفتورایی می‌شود (Etebarian, 2002).

برای جلوگیری از کاهش محصول به علت بیماری گیاه، روش‌های کنترل متنوعی استفاده می‌شود. استفاده از ترکیبات شیمیایی رایج‌ترین روش برای کنترل بیماری‌های قارچی در مزرعه و گلخانه است (Spadaro & Gullino, 2005). اگرچه این روش‌ها برای کنترل بیماری قارچی، خیلی مؤثر هستند، اما بعضی مشکلات اصلی استفاده از قارچ‌کش‌ها را محدود می‌کنند، از یک‌طرف بعضی از قارچ‌ها نسبت به مواد شیمیایی مقاومت پیدا می‌کنند، و از طرف دیگر گروهی از قارچ‌کش‌ها به‌طور سریع تجزیه نمی‌شوند و مدت طولانی در محیط باقی می‌مانند که این خود منجر به اثرات زیان‌بار مواد شیمیایی روی موجودات به جز قارچ هدف می‌شود. به علت وجود این مشکلات، پتانسیل کاربرد میکروب‌ها در قالب عوامل بیوکنترل به عنوان جایگزین‌ها و یا مکمل مواد شیمیایی در بسیاری از گزارش‌های اخیر آورده شده است. میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه ریزوسفر زندگی می‌کنند گزینه‌ای مناسب برای استفاده در برنامه‌های کنترل بیولوژیک هستند، زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه علیه بیمارگرهای خاکزی می‌باشد (Weller, 1988; Salman et al., 2013).

یکی از گروه‌های میکروبی ریزوسفر که ریشه را کلونیزه می‌کند و اثرات مفیدی روی آن دارند باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه یا plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) هستند. این باکتری‌ها از مسیرهای مختلف باعث القاء مقاومت می‌شوند. مقاومت القایی یک روش محافظت بیولوژیک محسوب می‌شود که هدف آن محدود کردن بیمارگر نیست، بلکه فعال کردن مقاومت گیاه می‌باشد. کلونیزه شدن ریشه توسط بعضی باکتری‌های تحریک‌کننده رشد گیاه در تحریک مقاومت

هوای هود خشک شدند (Raupach & Kloepper, 1998). جهت تهیه بذرهاى مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت کلیه مراحل آغشته سازی بدون حضور باکتری انجام گرفت.

آماده سازی گلخانه

بذرهاى خیار محلی یزد با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه ضد عفونی سطحی شدند، سپس بذرهاى آغشته شده به باکتری با پنس در عمق ۰/۵ سانتی متری از سطح خاک سترون گلدان ها کاشته شد (۱۰ عدد بذر کاشته شد و بعد از تنک نمودن گیاهچه های اضافه در نهایت سه گیاهچه در هر گلدان باقی ماند). گلدان ها در گلخانه در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس قرار داده شدند. براساس حجم و وضعیت رطوبتی گلدان ها، مقدار آب متناسب برای آن ها (روزانه ۳۰ میلی لیتر) مشخص شد به نحوی که پس از افزودن این مقدار آب، از زیر گلدان بیش از چند قطره خارج نشود.

میانگین هاله ی بازدارندگی آن ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 و براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شد.

روش آغشته سازی بذر با باکتری های آنتاگونیست

یک لوپ کامل از کشت ۲۴ ساعته هر جدایه آنتاگونیست باکتریایی روی محیط Kings B به فلاسک های حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون منتقل و سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^9 سلول باکتری تهیه گردید (جمعیت باکتری با استفاده از روش Serial Dilution و اسپکتروفتومتر تعیین شد).

جهت آغشته سازی بذرهاى خیار به باکتری های آنتاگونیست، کربوکسی متیل سلولز به نسبت ۰/۰۵ درصد به سوسپانسیون ها افزوده شد (Ownley et al., 2003). سپس بذور به مدت دو ساعت روی شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه در دمای 25°C در سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^9 سلول باکتری قرار گرفتند و در نهایت در معرض جریان

جدول ۱- کد و منبع سویه های *Pseudomonas spp.* مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Code and source of *Pseudomonas spp.* strains used in this research

Strain	Source	Code
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tobacco Rhizosphere (Switzerland)	CHA0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tobacco Rhizosphere (Switzerland)	CHA89
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Berries tree Rhizosphere (Northern Iran)	VUPf93
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Potato Rhizosphere (Ardebil, Iran)	VUPf506
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Wheat Rhizosphere (Washington, USA)	2-79
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Peach tree Rhizosphere (north of Iran)	VUPf52
<i>Pseudomonas sp.</i>	Wheat Rhizosphere (Baft, Iran)	VUPf44
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Peach tree Rhizosphere (Northern Iran)	VUPf5
<i>Pseudomonas</i>	Wheat Rhizosphere (Northern Iran)	VUPf205
<i>Pseudomonas spp.</i>	Plantain Rhizosphere (Tehran, Iran)	T17-4
<i>Pseudomonas spp.</i>	Alfalfa Rhizosphere (Shahdad, Iran)	VUPf759
<i>Pseudomonas spp.</i>	Orange tree Rhizosphere (Bandar Abbas, Iran)	VUPf407
<i>Pseudomonas spp.</i>	Pine tree Rhizosphere (Tehran, Iran)	VUPf760
<i>Pseudomonas spp.</i>	Orange tree Rhizosphere (Bandar Abbas, Iran)	VUPf409
<i>Pseudomonas spp.</i>	Cherry Tree Rhizosphere (Jiroft, Iran)	VUPf60
<i>Pseudomonas spp.</i>	Plantain Rhizosphere (Isfahan, Iran)	VUPf680
<i>Pseudomonas spp.</i>	Peach tree Rhizosphere (Northern Iran)	VUPf58
<i>Pseudomonas spp.</i>	Wheat Rhizosphere (Baft, Iran)	VUPf50
<i>Pseudomonas spp.</i>	Wheat Rhizosphere (Baft, Iran)	VUPf49
<i>Pseudomonas spp.</i>	Wheat Rhizosphere (Tehran, Iran)	F140

با پژمردگی یا کوتولگی و تغییر رنگ آوندی در ساقه ۴- مرگ گیاهچه) صورت گرفت (Vakalounakis et al., 1996). با استفاده از نمره‌دهی آلودگی در واکنش قابل مشاهده بین میزبان و بیمارگر، شاخص بیماری برای هر تکرار از معادله (۱) محاسبه شد.

معادله ۱:

$$\text{شاخص بیماری} = \frac{1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4}{(n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4) \times 4} \times 100$$

n_0 تعداد گیاهچه‌های آلوده با نمره صفر، n_1 تعداد گیاهچه‌های آلوده با نمره ۱، n_2 تعداد گیاهچه‌های آلوده با نمره ۲، n_3 تعداد گیاهچه‌های آلوده با نمره ۳ و n_4 تعداد گیاهچه‌های آلوده با نمره ۴.

همچنین شاخص‌های رشدی گیاه به شرح زیر اندازه‌گیری شد.

- ۱- ارتفاع ساقه و ریشه: به وسیله خط کش.
- ۲- وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه: ابتدا گیاه را از ناحیه طوقه جدا و به دو قسمت ساقه و ریشه تقسیم و پس از شستشو و خشک کردن به طور جداگانه وزن شدند.
- ۳- وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه: نمونه‌ها را به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده و سپس وزن شدند.

مطالعات بیوشیمیایی

جمع‌آوری نمونه و طرح آزمایش

آزمایش برای هر قارچ بیمارگر مجزا و به صورت فاکتوریل ۳×۱۶ در قالب طرح کاملاً تصادفی تنظیم شد که شامل ۱۶ تیمار و ۳ نوبت زمانی نمونه‌برداری بود. تیمارها شامل ۷ جدایه باکتریایی تنها، ۷ جدایه باکتریایی به همراه قارچ (*F. solani* و *F. oxysporum* به صورت جداگانه)، شاهد سالم (فاقد قارچ و باکتری) و شاهد آلوده (فاقد باکتری) بوده و نمونه‌برداری در روزهای ۳، ۹ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی جمع‌آوری شد. برگ‌ها در پاکت‌هایی گذاشته شد و پس از درج نام تیمار روی پاکت به دمای چهار درجه سانتی‌گراد در یخچال تا اتمام نمونه‌برداری منتقل شد. این نگهداری کمتر از یک ساعت (مدت زمان لازم جهت آماده‌سازی دستگاه‌ها) بوده است.

ارزیابی خاصیت بیوکنترل باکتری‌های آنتاگونیست علیه قارچ‌های بیمارگر در گلخانه

برای تهیه مایه تلقیح قارچ عامل بیماری ۵۰۰ گرم گندم به مدت ۱۶ ساعت داخل آب خیسانده، سپس آب اضافی گرفته شد و بذره‌های خیس خورده تا یک سوم درون ظرف ارلن‌مایر ریخته و پس از مسدود کردن درب آن به فاصله‌ی یک روز، دومرتبه در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سترون شد. پس از سرد شدن، تحت شرایط سترون و در کنار شعله به هر کدام چهار قطعه ۵ میلی‌متری از حاشیه کشت چهارروزه قارچ‌های بیمارگر به طور جداگانه که قبلاً روی محیط کشت PDA کشت داده شده بودند اضافه و ظروف ارلن‌مایر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت ۳-۴ هفته نگهداری شدند. هر روز یک بار، با تکان دادن ظروف، محتویات آن‌ها به هم زده شد تا رشد قارچ به طور یکنواخت و غیر فشرده صورت گیرد (Wildermuth & McNamara, 1987؛ Banihashemi & Moradi, 2004). پس از چهار برگی شدن گیاهچه‌ها (۲ برگ حقیقی)، آلوده سازی به روش Thomashow & Weller (1988) با کمی تغییرات انجام شد بدین گونه که اینوکولوم به نسبت ۰/۵ درصد با خاک گلدان‌ها مخلوط گردید (با خاک گلدان‌های ۱۰۰۰ گرمی، ۵ گرم اینوکولوم مخلوط شد).

برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۳۲ تیمار [برای هر قارچ ۱۶ تیمار: ۷ جدایه باکتریایی به همراه قارچ، ۷ شاهد باکتریایی، شاهد سالم (فاقد قارچ و باکتری) و شاهد آلوده (فاقد باکتری)] اجرا شد.

پس از چهار هفته و با ظهور علائم بیماری، ارزیابی شدت بیماری جدایه‌ها بر اساس مقیاس صفر تا چهار (۰- بدون علائم، ۱- پوسیدگی ابتدایی روی ریشه اصلی، ریشه‌های ثانویه و طوقه و کمی تغییر رنگ آوندی در ساقه، ۲- پوسیدگی متوسط روی ریشه اصلی، ریشه‌های ثانویه و طوقه به همراه کمی تغییر رنگ آوندی در ساقه، ۳- پوسیدگی شدید ریشه اصلی، ریشه‌های ثانویه و طوقه همراه

استخراج پروتئین از برگ

۰/۵ گرم از بافت تازه گیاهی در ۳ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷/۵) که حاوی پلی وینیل پیرولیدین ((Poly vinyl pyrrolidone (PVP) ۱ درصد و EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) ۱ میلی مولار بود، سائیده شد. تمام مراحل استخراج در یخ انجام گرفت. سپس عصاره‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در $4000 \times g$ و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. از محلول شفاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها و پروتئین کل استفاده شد (Reuveni, 1995).

اندازه گیری فنل کل

اندازه گیری محتوای ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش Folin-Ciocalteu انجام شد (Soland & Laima, 1999). ۰/۰۵ گرم از بافت در ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ در $4000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه، ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی برداشته و به آن ۰/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و حجم محلول با آب مقطر به ۲/۵ میلی لیتر رسانده شد. به محلول حاصل ۰/۲۵ میلی لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۰/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۵ درصد اضافه و شدت جذب نمونه‌ها پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی با اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. اندازه گیری میزان ترکیبات فنلی، در نمونه شاهد و تیمار با ۴ تکرار انجام گرفت.

سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز (Polyphenol Oxidase= PPO)

مخلوط واکنش شامل ۲/۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH=۷ و ۰/۶ میلی لیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی مولار بود که در حمام بن ماری با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری می شد. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی شروع شد که میزان جذب در ۴۲۵ نانومتر، پس از ۱۰ دقیقه نسبت به زمان شروع واکنش، محاسبه شد (Fujita et al., 1995).

فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرو لیتر به دست آمده

از روش Bradford (1976) عصاره محاسبه گردید.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (Peroxide= POX)

برای این منظور از روش Mac Adam et al. (1992) استفاده شد. برای این کار، به ۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، ۵۰ میکرو لیتر مایع گایاکول ۰/۲ مولار، ۴۰ میکرو لیتر هیدروژن پراکسید (H₂O₂) ۰/۰۳ مولار و سپس ۲۰ میکرو لیتر 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 به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید. بعد از اضافه کردن آب اکسیژنه و ترکیب گایاکول محلول به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای درآمد.

تعیین پروتئین کل گیاه

برای سنجش مقدار پروتئین کل از روش Bradford (1976) انجام گرفت. به منظور تهیه معرف بیوره، ۰/۱ گرم کوماسی بریلینت بلو G250 در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد به مدت یک ساعت حل و سپس ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد قطره قطره به آن افزوده شد. در پایان حجم کل محلول به کمک آب مقطر به یک لیتر رسانده و محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد. به این منظور به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی لیتر عصاره پروتئینی و ۵ میلی لیتر معرف بیوره افزوده و بی درنگ ورتکس شد. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده و غلظت پروتئین‌ها با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد. اندازه گیری میزان پروتئین در نمونه شاهد و تیمار با چهار تکرار انجام گرفت.

آنالیز آماری

این پژوهش بر اساس طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. تجزیه آماری داده‌های حاصل از اندازه گیری پارامترها، با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت و برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد.

نتایج

تأثیر جدایه‌های باکتریایی علیه قارچ‌های بیمارگر درون ظروف پتری

جدایه‌های VUPf 760، T17-4 و VUPf5 به ترتیب هاله‌ی بازدارنده‌ای به اندازه ۹، ۷ و ۳ میلی‌متر در مقابل قارچ *F. oxysporum* ایجاد نمودند و بقیه جدایه‌ها فاقد هاله‌ی بازدارندگی بودند.

جدایه‌های VUPf 760 و T17-4 به ترتیب هاله‌ی بازدارنده‌ای به اندازه ۷ و ۶ میلی‌متر در مقابل قارچ *F. solani* ایجاد نمودند و بقیه جدایه‌ها فاقد هاله‌ی بازدارندگی بودند.

باکتری‌های مذکور به همراه باکتری‌های CHA0 و CHA89، VUPf 52، VUPf 506 که فاقد هاله بازدارنده بودند اما در تحقیقات گذشته توسط دیگر محققین، بهترین اثر را روی کنترل چندین بیماری (از قبیل پاخوره غلات و نماتد ریشه گرهی پسته) داشته‌اند (Khatamidoost, 2014) برای مرحله گلخانه انتخاب شدند.

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

۳۰ روز پس از آلوده سازی گیاهچه‌های خیار در مرحله ۱ تا ۲ برگ حقیقی، با دو جدایه قارچ عامل بیماری، آلودگی با درصد‌های متفاوت بروز کرد.

جدول ۲- اثر بازدارندگی سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* بر روی قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *Fusarium solani* در شرایط آزمایشگاهی

Table 2. Inhibitory effect of *Pseudomonas fluorescens* strains against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*, in vitro

Inhibiting zone (mm)		Bacterial strains
<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	
9.33 ^a	7.30 ^{**a}	VUPf760
7 ^b	6.00 ^a	T17-4
2.67 ^c	0 ^b	VUPf5
0 ^d	0 ^b	VUPf52
0 ^d	0 ^b	VUPf506
0 ^d	0 ^b	CHA0
0 ^d	0 ^b	CHA89
0 ^d	0 ^b	Control

* Numbers at table are means of replications

** Numbers with similar letters do not have meaning difference

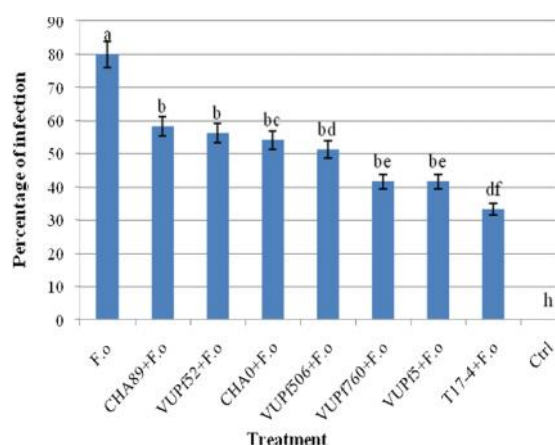
هرچند که هیچ‌یک از جدایه‌های سودوموناس در خاک آلوده به قارچ‌های بیمارگر نتوانستند به‌طور کامل از ایجاد بیماری ممانعت نمایند ولی با بررسی شدت آلودگی در مقایسه با شاهد آلوده بهترین تأثیر در برابر قارچ‌ها به شرح ذیل مشخص گردید:

در تیمار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* جدایه‌های T17-4، VUPf5 و VUPf760 با کاهش شدت بیماری به ترتیب ۵۸، ۴۸ و ۴۸ درصد نسبت به شاهد آلوده.

در تیمار تلقیح شده با قارچ *F. solani* جدایه‌های VUPf5، T17-4 و VUPf760 با کاهش شدت بیماری به ترتیب ۶۰، ۵۵ و ۴۳ درصد نسبت به شاهد آلوده.

نتایج تأثیر جدایه‌های باکتریایی بر شاخص‌های رشدی گیاه

بررسی اثر جدایه‌های باکتری روی فاکتورهای رشدی گیاه از جمله ارتفاع ریشه و ساقه، وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی در جدول (۳) نشان داد که تیمارهای مختلف باکتری تأثیرهای متفاوتی روی این فاکتورهای رشدی داشته که کاربرد جدایه‌های VUPf52، T17-4، VUPf5 و VUPf760 بیشترین تأثیر را در افزایش فاکتورهای رشدی نشان داد.



شکل ۱- بررسی اثر جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* در کاهش میزان بیماری ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum*

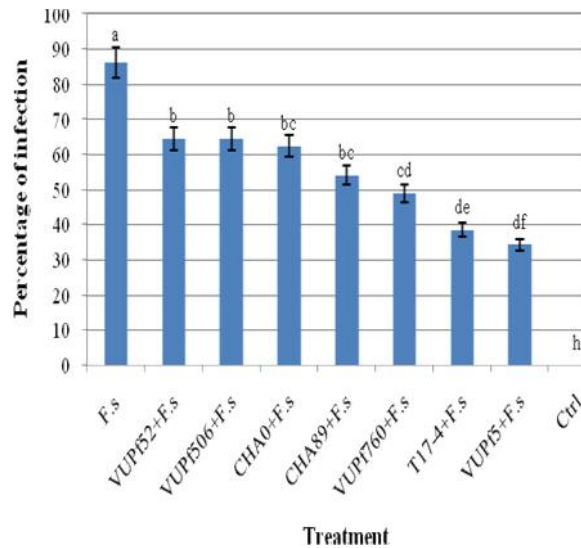
Fig. 1. Effect of *Pseudomonas fluorescens* strains on the disease reduction of fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum*

تغییرات ترکیبات فنلی در برابر تلقیح قارچ *F. oxysporum*

مقایسه میانگین مقادیر فنل کل در جدول (۴) نشان داده شده است. هم چنانکه از این جدول استنباط می گردد، مقدار ترکیبات فنلی تا روز نهم بعد از تلقیح به صورت افزایشی بوده و پس از آن کاهش می یابد. بیشترین افزایش مربوط به تیمار T17-4 بود که باعث افزایش ترکیبات فنلی به اندازه ۲۶۵ درصد نسبت به شاهد سالم شد.

تغییرات ترکیبات فنلی در برابر تلقیح قارچ *F. solani*

مقایسه میانگین مقادیر فنل کل در جدول (۵) نشان داده شده است. هم چنانکه از این جدول استنباط می گردد، مقدار ترکیبات فنلی تا روز نهم بعد از تلقیح به صورت افزایشی بوده و پس از آن کاهش می یابد. بیشترین افزایش مربوط به تیمار VUPf5 بود که باعث افزایش ترکیبات فنلی به اندازه ۲۱۳ درصد نسبت به شاهد سالم شد.



شکل ۲- بررسی اثر جدایه های *Pseudomonas fluorescens* در کاهش میزان بیماری ناشی از قارچ *Fusarium solani*

Fig. 2. Effect of *Pseudomonas fluorescens* strains on the disease reduction of fusarium wilt caused by *Fusarium solani*

جدول ۳- تأثیر جدایه های *Pseudomonas fluorescens* بر شاخص های رشدی گیاهچه های خیار.

Table 3. Effect of *Pseudomonas fluorescens* strains on growth parameters in cucumber plants.

Treatment	Shoot height (cm)	Root length (cm)	Shoot wet weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root wet weight (g)	Root dry weight (g)		
Ctrl	46.95 ^{***} (ae)	18.82 (bd)	8.18 (ei)	0.98 (bc)	0.88 (hj)	0.13 (eh)		
No fungi	VUPf5	50.91 (ab)	20.06 (ac)	11.04 (ac)	0.98 (bc)	2.85 (ac)	0.24 (a)	
	VUPf52	47.87 (ad)	20.23 (ab)	12.5 (a)	1.04 (ab)	3.24 (a)	0.28 (a)	
	VUPf506	43.18 (bj)	15.56 (di)	7.95 (ej)	0.89 (bd)	1.3 (fi)	0.19 (bc)	
	VUPf760	54.88 (a)	20.37 (ab)	9.84 (be)	0.83 (ce)	2.98 (ab)	0.16 (be)	
	CHA0	44.23 (bi)	18.43 (ce)	11.39 (ab)	1.17 (a)	2.48 (bd)	0.20 (b)	
	CHA89	46.27 (bf)	17.27 (cf)	8.16 (ei)	0.77 (dh)	0.94 (hj)	0.15 (cf)	
	T17-4	50.66 (ac)	22.54 (a)	8.86 (dg)	0.85 (ce)	1.76 (eg)	0.18 (bd)	
	F. o	29.57 (lm)	9.9 (m)	5.82 (jk)	0.5 (jl)	0.62 (ij)	0.06 (jk)	
<i>F. oxysporum</i>	VUPf5+ ^{****} F.o	48.19 (ad)	16.3 (dh)	7.51 (fk)	0.73 (di)	0.93 (hj)	0.13 (eh)	
	VUPf52+F.o	37.58 (gl)	14.2 (fj)	7.39 (fk)	0.67 (ek)	0.9 (hj)	0.11 (fj)	
	VUPf506+F.o	42.32 (cj)	15.62 (di)	7.79 (ek)	0.68 (ek)	1.04 (hj)	0.12 (eh)	
	VUPf760+F.o	45.92 (bg)	16.02 (di)	9.12 (cf)	0.79 (dg)	1.41 (fh)	0.14 (dh)	
	CHA0+F.o	39.89 (dk)	14.3 (fj)	6.78 (gk)	0.59 (hl)	0.73 (hj)	0.1 (gk)	
	CHA89+F.o	33.03 (km)	13.88 (fl)	6.7 (gk)	0.51 (jl)	1.02 (hj)	0.09 (hk)	
	T17-4+F.o	48.85 (ac)	18.22 (be)	7.63 (ek)	0.7 (dj)	0.93 (hj)	0.11 (fi)	
	F. o	29.57 (lm)	9.9 (m)	5.82 (jk)	0.5 (jl)	0.62 (ij)	0.06 (jk)	
	<i>F. solani</i>	VUPf5+ ^{****} F.s	50.57 (ac)	18.44 (be)	10.8 (ad)	0.98 (bc)	2.58 (ac)	0.19 (bc)
		VUPf52+F.s	38.72 (ek)	16.7 (cg)	8.24 (eh)	0.78 (dh)	2.27 (ce)	0.18 (bd)
VUPf506+F.s		37.67 (gl)	14.25 (fj)	5.92 (ik)	0.52 (jl)	0.68 (hj)	0.07 (ik)	
VUPf760+F.s		40.17 (dk)	17.10 (cf)	8.16 (ei)	0.81 (cf)	1.89 (df)	0.16 (be)	
CHA0+F.s		39.32 (ek)	15.46 (dj)	6.8 (gk)	0.59 (hl)	0.77 (hj)	0.1 (gk)	
CHA89+F.s		36.15 (im)	13.91 (fl)	7.38 (fk)	0.62 (fl)	0.8 (hj)	0.1 (gk)	
T17-4+F.s		47.06 (ae)	17.15 (cf)	7.86 (ek)	0.74 (di)	1.3 (fi)	0.14 (dh)	
F. s		28.32 (m)	10.75 (lm)	5.62 (k)	0.49 (kl)	0.61 (ij)	0.06 (k)	

* Numbers of table are means of four replication.

** Numbers with similar letters don't have meaning difference each other at 5% level (or =0.05).

*** *F. oxysporum*

**** *F. solani*

تغییرات پراکسیداز در برابر تلقیح قارچ

F. oxysporum

مقایسه میانگین مقادیر پراکسیداز در جدول (۶) نشان داده شده است. هم‌چنانکه از این جدول استنباط می‌گردد، مقدار آنزیم پراکسیداز تا روز نهم بعد از تلقیح به صورت افزایشی بوده و پس از آن کاهش می‌یابد. بیشترین افزایش مربوط به تیمار T17-4 بود که باعث افزایش پراکسیداز به اندازه ۴۴۸ درصد نسبت به شاهد سالم شد.

تغییرات پراکسیداز در برابر تلقیح قارچ *F. solani*

مقایسه میانگین مقادیر پراکسیداز در جدول (۷) نشان داده شده است. هم‌چنانکه از این جدول استنباط می‌گردد، آنزیم پراکسیداز تا روز نهم بعد از تلقیح به صورت افزایشی بوده و پس از آن کاهش می‌یابد. بیشترین افزایش مربوط به تیمار VUPf5 بود که باعث افزایش پراکسیداز به اندازه ۵۷۸ درصد نسبت به شاهد سالم شد.

جدول ۶- تغییرات پراکسیداز در گیاهچه‌های خیار بر اثر

تلقیح با قارچ *Fusarium oxysporum*

Table 6. Peroxidase activity in cucumber plants after inoculation with *Fusarium oxysporum*

Treatment	3 rd day (Units/mg)	9 th day (Units/mg)	12 th day (Units/mg)
VUPf5	*0.112 **in	0.124 hn	0.122 hn
VUPf 5+***F.O	0.288 aj	0.415 a	0.387 a
VUPf 506	0.127 gn	0.141 dn	0.14 en
VUPf 506+F.O	0.263 am	0.327 ad	0.248 an
VUPf 52	0.106 in	0.122 hn	0.125 hn
VUPf 52+F.O	0.263 am	0.39 a	0.311 ag
VUPf 760	0.121 hn	0.159 dn	0.149 dn
VUPf 760+F.O	0.319 af	0.358 ab	0.344 ac
CHA0	0.135 fn	0.165 cn	0.15 dn
CHA0+F.O	0.305 ah	0.384 a	0.294 ai
CHA89	0.095 kn	0.103 jn	0.101 jn
CHA89+F.O	0.269 al	0.322 ae	0.253 an
Ctrl	0.082 ln	0.077 mn	0.087 ln
F. O	0.182 bn	0.281 ak	0.065 n
T17-4	0.106 in	0.128 gn	0.117 in
T17-4+F.O	0.268 al	0.419 a	0.387 a

* Numbers of table are means of four replication.

** Numbers with similar letters don't have meaning difference each other at 5% level(or =0.05).

*** *F. oxysporum*

جدول ۴- تغییرات فنل کل در گیاهچه‌های خیار بر اثر تلقیح

با قارچ *Fusarium oxysporum*

Table 4. Total phenol content in cucumber plants after inoculation with *Fusarium oxysporum*

Treatment	3 rd day (mg/g)	9 th day (mg/g)	12 th day (mg/g)
VUPf5	*1.239 **kp	1.356 jp	1.361 jp
VUPf 5+***F.O	1.741 gl	2.875 ad	2.531 be
VUPf 506	1.432 ip	1.406 ip	1.379 jp
VUPf 506+F.O	1.878 kj	2.986 ac	2.182 eh
VUPf 52	1.121 lp	1.196 lp	1.047 mp
VUPf 52+F.O	1.739 gl	3.206 a	3.053 ab
VUPf 760	1.203 lp	1.13 lp	1.151 lp
VUPf 760+F.O	2.151 eh	3.138 ab	2.927 ad
CHA0	1.439 ip	1.502 on	1.481 io
CHA0+F.O	2.006 ej	2.845 ad	2.397 cf
CHA89	1.116 lp	1.199 lp	1.129 lp
CHA89+F.O	1.638 hm	3.06 ab	2.197 eh
Ctrl	0.843 op	0.882 np	0.803 p
F. O	1.659 hm	2.364 dg	0.777 p
T17-4	1.299 kp	1.52 in	1.416 ip
T17-4+F.O	2.035 ei	3.218 a	2.833 ad

* Numbers of table are means of four replication.

** Numbers with similar letters don't have meaning difference each other at 5% level(or =0.05).

*** *F. oxysporum*

جدول ۵- تغییرات فنل کل در گیاهچه‌های خیار بر اثر تلقیح

با قارچ *Fusarium solani*

Table 5. Total phenol content in cucumber plants after inoculation with *Fusarium solani*

Treatment	3 rd day (mg/g)	9 th day (mg/g)	12 th day (mg/g)
VUPf5	*1.239 **nt	1.356 ls	1.361 ls
VUPf5+***F.S	1.986 dl	2.759 a	2.618 ab
VUPf506	1.432 ks	1.406 ks	1.379 ks
VUPf506+F.S	1.978 dl	2.597 ac	2.1 bi
VUPf52	1.121 ot	1.196 nt	1.047 pt
VUPf52+F.S	2.055 bj	2.51 ae	1.88 fm
VUPf760	1.203 nt	1.13 ot	1.151 nt
VUPf760+F.S	1.614 hp	2.558 ad	2.371 ag
CHA0	1.439 jr	1.502 iq	1.481 iq
CHA0+F.S	1.7 ho	2.444 af	1.917 em
CHA89	1.116 ot	1.199 nt	1.129 ot
CHA89+F.S	1.406 ks	2.217 ah	1.617 hp
Ctrl	0.843 rt	0.882 qt	0.803 st
F. S	1.485 iq	2.006 ck	0.627 t
T17-4	1.299 ms	1.52 ip	1.416 ks
T17-4+F.S	1.986 dl	2.759 a	2.618 ab

* Numbers of table are means of four replication.

** Numbers with similar letters don't have meaning difference each other at 5% level(or =0.05).

*** *F. solani*

جدول ۸- تغییرات پلی فنل اکسیداز در گیاهچه‌های خیار بر اثر

تلقیح با قارچ *Fusarium oxysporum*

Table 8. Polyphenoloxidase activity in cucumber plants after inoculation with *Fusarium oxysporum*.

Treatment	3 rd day (Units/mg)	9 th day (Units/mg)	12 th day (Units/mg)
VUPf5	*0.008 ** gm	0.007 hm	0.006 lm
VUPf5+***F.O	0.012 ch	0.016 ad	0.015 ae
VUPf506	0.007 im	0.007 km	0.007 hm
VUPf506+F.O	0.012 bg	0.017 ac	0.013 af
VUPf52	0.007 hm	0.007 jm	0.007 im
VUPf52+F.O	0.012 cj	0.016 ad	0.013 bf
VUPf760	0.006 lm	0.007 hm	0.007 gm
VUPf760+F.O	0.011 el	0.016 ad	0.015 ae
CHA0	0.007 im	0.007 jm	0.007 hm
CHA0+F.O	0.012 ci	0.017 ac	0.014 af
CHA89	0.007 gm	0.006 lm	0.007 hm
CHA89+F.O	0.012 dk	0.015 ae	0.012 ch
Ctrl	0.007 hm	0.007 hm	0.006 lm
F. O	0.009 fl	0.014 af	0.004 m
T17-4	0.006 km	0.007 hm	0.007 hm
T17-4+F.O	0.013 bf	0.018 a	0.017 ab

* Numbers of table are means of four replication.

** Numbers with similar letters don't have meaning difference each other at 5% level(or =0.05).

*** *F. oxysporum*

جدول ۹- تغییرات پلی فنل اکسیداز در گیاهچه‌های خیار

بر اثر تلقیح با قارچ *Fusarium solani*

Table 9- Polyphenoloxidase activity in cucumber plants after inoculation with *Fusarium solani*.

Treatment	3 rd day (Units/mg)	9 th day (Units/mg)	12 th day (Units/mg)
VUPf5	*0.008 ** jl	0.007 jl	0.006 l
VUPf5+***F.S	0.017 eh	0.026 a	0.024 ac
VUPf506	0.007 jl	0.007 kl	0.007 jl
VUPf506+F.S	0.014 gi	0.02 cf	0.013 hi
VUPf52	0.007 jl	0.007 jl	0.007 jl
VUPf52+F.S	0.015 fi	0.024 ac	0.017 eh
VUPf760	0.006 l	0.007 jl	0.007 jl
VUPf760+F.S	0.012 ij	0.025 ab	0.024 ac
CHA0	0.007 jl	0.007 kl	0.007 jl
CHA0+F.S	0.015 gi	0.02 be	0.017 eh
CHA89	0.007 jl	0.006 l	0.007 jl
CHA89+F.S	0.013 hi	0.021 be	0.015 fi
Ctrl	0.007 jl	0.007 jl	0.006 kl
F. S	0.011 ik	0.019 dg	0.005 l
T17-4	0.006 kl	0.007 jl	0.007 jl
T17-4+F.S	0.015 gi	0.023 ad	0.022 ae

*Numbers of table are means of four replication.

** Numbers with similar letters don't have meaning difference each other at 5% level (or =0.05).

*** *F. solani*

جدول ۷- تغییرات پراکسیداز در گیاهچه‌های خیار بر اثر

تلقیح با قارچ *Fusarium solani*

Table 7. Peroxidase activity in cucumber plants after inoculation with *Fusarium solani*

Treatment	3 rd day (Units/mg)	9 th day (Units/mg)	12 th day (Units/mg)
VUPf5	*0.112 ** l	0.124 jl	0.122 jl
VUPf5+***F.S	0.297 eg	0.519 a	0.478 ab
VUPf506	0.127 jl	0.141 il	0.14 il
VUPf506+F.S	0.311 dg	0.397 be	0.259 fh
VUPf52	0.106 l	0.122 jl	0.125 jl
VUPf52+F.S	0.237 gj	0.484 ab	0.352 cf
VUPf760	0.121 jl	0.159 hl	0.149 hl
VUPf760+F.S	0.289 eg	0.468 ab	0.438 ac
CHA0	0.135 il	0.165 hl	0.15 hl
CHA0+F.S	0.286 eg	0.46 ac	0.31 dg
CHA89	0.095 l	0.103 l	0.101 l
CHA89+F.S	0.248 fi	0.415 ad	0.327 dg
Ctrl	0.082 l	0.077 l	0.087 l
F. S	0.231 gk	0.374 be	0.064 l
T17-4	0.106 l	0.128 jl	0.117 kl
T17-4+F.S	0.26 fh	0.456 ac	0.42 ad

* Numbers of table are means of four replication.

**Numbers with similar letters don't have meaning difference each other at 5% level(or =0.05).

*** *F. solani*

تغییرات پلی فنل اکسیداز در برابر تلقیح قارچ

F. oxysporum

مقایسه میانگین مقادیر پلی فنل اکسیداز در جدول (۸) نشان

داده شده است. هم چنانکه از این جدول استنباط می گردد،

مقدار پلی فنل اکسیداز تا روز نهم بعد از تلقیح به صورت

افزایشی بوده و پس از آن کاهش می یابد. بیشترین افزایش

مربوط به تیمار T17-4 بود که باعث افزایش پراکسیداز به اندازه

۱۵۲ درصد نسبت به شاهد سالم شد.

تغییرات پلی فنل اکسیداز در برابر تلقیح قارچ

F. solani

مقایسه میانگین مقادیر پلی فنل اکسیداز در جدول (۹) نشان

داده شده است. هم چنانکه از این جدول استنباط می گردد،

آنزیم پلی فنل اکسیداز تا روز نهم بعد از تلقیح به صورت

افزایشی بوده و پس از آن کاهش می یابد. بیشترین افزایش

مربوط به تیمار VUPf5 بود که باعث افزایش پراکسیداز

به اندازه ۲۶۰ درصد نسبت به شاهد سالم شد.

بحث

در این پژوهش، نتایج حاصل از آزمون کشت متقابل و بررسی سطح بازدارندگی در شرایط گلخانه حاکی از آن بود که میان نتایج تست هاله بازدارندگی و نتایج به‌دست آمده از بررسی بازدارندگی در شرایط گلخانه تا حدودی همبستگی وجود داشت. به‌طور مثال جدایه باکتریایی T17-4 که در آزمایشگاه بیشترین هاله بازدارندگی را علیه قارچ *F. solani* ایجاد کرده بود در شرایط گلخانه نیز توانست به میزان ۵۵ درصد باعث کاهش بیماری شود اما قابل ذکر است بهترین اثر مربوط به جدایه VUPf5 بوده است که در تست کشت فاقد هاله بازدارندگی بود. در واقع مکانیسم‌های متعددی در قابلیت بیوکنترل آنتاگونیست‌ها از جمله باکتری‌ها دخالت دارند، از جمله می‌توان به تولید ترکیبات ضد قارچی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، سیدروفورها، سیانید هیدروژن، اتیلن و همچنین ترکیبات رشدی (فیتوهورمون‌ها) اشاره کرد. این ترکیبات در حقیقت متابولیت‌هایی به‌شمار می‌روند که به‌صورت ترشحات مایع خارج سلولی و یا ترکیبات فرار وارد محیط اطراف باکتری می‌شوند (Kamilova et al., 2005). با بررسی شدت آلودگی مشخص گردید که هرچند هیچ‌یک از جدایه‌های سودوموناس فلورسنت در خاک آلوده به قارچ‌های بیمارگر نتوانستند به‌طور کامل از ایجاد بیماری ممانعت نمایند ولی در مقایسه با شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری ایجاد نمودند.

طبق محاسبات انجام شده در رابطه با شدت بیماری و شاخص‌های رشدی مشخص شد که با کاهش شدت بیماری شاخص‌های رشدی گیاه افزایش یافت که این بیانگر همبستگی منفی بین شدت بیماری و شاخص‌های رشدی گیاه می‌باشد. در این تحقیق مقدار کل ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز به‌عنوان سه عامل اساسی دفاع بیوشیمیایی، در برهم‌کنش خیار با عوامل فوزاریومی، از طریق اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. نتایج تغییرات دفاعی نشان داد بیشترین میزان افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان فنل کل و پلی فنل اکسیداز در روز نهم پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد و بعد کاهش یافت. نتایج این بررسی نشان داد که افزایش در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و ترکیبات فنلی و

پلی فنل اکسیداز می‌تواند دلیلی بر القای این ترکیبات دفاعی در گیاهچه خیار توسط جدایه‌های *P. fluorescens* باشد که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (Chen et al., 2000; Nandakumar et al., 2001; Harish et al., 2008). میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان فنل کل و پلی فنل اکسیداز در گیاهچه‌های خیار تیمار شده 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 محققین دیگر نیز گزارش شده است (Raj et al., 2006; Van Loon, 2007). سطوح بالا از محتوای POX، PPO و فنل کل در گیاهان تیمار شده با عوامل بیوکنترلی و تلقیح شده با عوامل بیماری‌زای مختلف گزارش شده است (Chen et al., 2000).

گزارش‌های متعدد وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت پراکسیداز باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شود و در واکنش ناسازگار فعالیت پراکسیداز چند برابر واکنش سازگار است. البته در بعضی موارد افزایش فعالیت پراکسیداز در واکنش سازگار بیش از واکنش ناسازگار بوده است (Wood & Barbara, 1971).

Chen et al. (2000) افزایش آنزیم پراکسیداز در ریشه‌های خیار بعد از مایه‌زنی با باکتری سودوموناس را علیه قارچ *Pythium aphanidermatum* مورد مشاهده قرار دادند. ترکیبات فنلی ترکیبات ضد قارچی هستند و تجمع آن‌ها در گیاهان تیمار شده به‌وسیله عوامل آنتاگونیست، می‌تواند دلیل کاهش حمله بیمارگرها باشد (M'piga et al., 1997). همچنین مشخص شده است که آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاهان گوجه‌فرنگی به مقدار زیادی بیان می‌شود و بیان زیاد این آنزیم‌ها با افزایش مقاومت به بیمارگرها همراه است (Li & Steffens, 2002). آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در اکسیداسیون فنل‌ها به کوئینون‌ها و تشکیل لیگنین (lignification) در سلول‌های گیاهی نقش مؤثری دارد. در زمینه ارزیابی فعالیت پلی فنل اکسیداز در اندام‌های گیاهان آلوده به بیمارگرها تحقیقات متعددی انجام گرفته است. برخی محققین تجمع فیتوالکسین‌ها و افزایش پلیمرهای موجود در دیواره سلولی را در اثر ازدیاد مشتقات لیگنین از پیامدهای افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز می‌دانند

(Mayer & Staples, 2002)

References

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology (5rd ed.). Academic Press, New York, USA.
- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological research, 163: 173–181.
- Anderws, J.H. 1992. Biological control soil born pathogen agents. Agriculture Training Publication.
- Banihashemi, Z. & Moradi, M. 2004. The frequency of isolation of *Phytophthora* spp. from crown and root of pistachio nut tree and reaction of the crown and root to the casual agent. Iranian Journal of Plant Pathology, 40: 57–75. (In Farsi)
- Bradford, M.M. 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.
- Cerkauskas, R., Brown, J. & Ferguson, G. 2001. First report of Fusarium stem and root rot of greenhouse cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in Ontario. Plant Disease, 85: 1028–1028.
- Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N. & Paulitz, T.C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56: 13–23.
- Etebarian, H.R. 2002. Vegetable diseases and ways to counter them (2nd ed.). Publication of Tehran University.
- Food and Agriculture Organization. 2012. Statistics Division. from <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/>.
- Fujita, S., Saari, N.b., 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.
- Hagedorn, C., Gould, W.D. & Bardinelli, T.R. 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.
- Jarvis, W.R. 1992. Cucumber Diseases. Reaserch station Harrow, Ontario. Agriculture Canada Publication.
- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. & Lugtenberg, B. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. Environmental Microbiology, 7: 1809–1817.
- Keel, C., Weller, D.M., Natsch, A., Défago, G., Cook, R.J. & Thomashow, L.S. 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. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science (MSc) in Plant Pathology, University of Guilan, Rasht, Iran. (In Farsi)

- Kidoglu, F., Gül, A., Ozaktan, H. & Tüzel, Y. 2007. Effect of rhizobacteria on plant growth of different vegetables. In: Proceedings of International Symposium on High Technology for Greenhouse System Management: Greensys2007, Naples, Italy.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. & Zablutowicz, R.M. 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7: 39–44.
- Li, L. & Steffens, J.C. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215: 239–247.
- MacAdam, J.W., Nelson, C.J. & Sharp, R.E. 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.
- Mayer, A.M. & Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60: 551–565.
- Moreno, A., Alferez, A., Aviles, M., Dianez, F., Blanco, R., Santos, M. & Tello, J.C. 2001. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* on cucumber in Spain. *Plant Disease*, 85: 1206–1206.
- M'piga, P., Belanger, R.R., Paulitz, T.C. & Benhamou, N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50: 301–320.
- Murthy, K.N., Uzma, F. & Srinivas, C.C. 2014. Induction of systemic resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 1799–1811.
- Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Raguchander, T. and Samiyappan, R. 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 603–612.
- Ownley, B.H., Duffy, B.K. & Weller, D.M. 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.
- Raj, S.N., Sarosh, B.R. & Shetty, H. S. 2006. Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. *Functional Plant Biology*, 33: 563–571.
- Raupach, G.S. & Kloepper, J.W. 1998. Mixtures of plant growth- promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Journal of Phytopathology*, 88: 1158- 1164.
- Reuveni, R. 1995. Biochemical marker for disease resistance. In: R. P., Singh and U. S., Singh (Eds), *Molecular Methods in Plant Pathology*. (pp. 99-144). CRC Press, Boca Raton.
- Reverchon, S., Monnet, Y., Beliard, E. & Alabouvette, C. 2000. Du nouveau sur les fusarioses du concombre: *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (FORC) isolé pour la première fois en France. *Phytoma-La Défense des végétaux*, 36–38.
- 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.

- Shaharoon, B., Arshad, M., Zahir, Z.A. & Khalid, A. 2006. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-Deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9): 2971–2975.
- Shahriyari, D., Zare, R., Hafez, Kh. & Kherkhani, H. 2006. Fusarium root and stem rot of cucumber. In: Proceedings of the 17th Iranian Plant Protection Congress, 2-5 Sep, University of Tehran, Karaj, Iran. (In Farsi)
- Soland, S.F. & Laima, S.K. 1999. Phenolics and cold tolerance of Brassica napus. *Plant Agriculture*, 1:1-5.
- Spadaro, D. & Gullino, M.L. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection*, 24: 601–613.
- Steiner, U. & Schönbeck, F. 1995. Induced disease resistance in monocots. In: R., Hammerschmidt & J., Kuc (Eds.), *Induced resistance to disease in plants*. Springer.
- Thomashow, L.S. & Weller, D.M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of bacteriology*, 170: 3499–3508.
- Vakalounakis, D.J. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease*: 313–316.
- Van Loon, L.C. & Van Strien, E.A. 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, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 379–407.
- Wildermuth, G. & McNamara, R. 1987. Susceptibility of winter and summer crops to root and crown infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Plant pathology*, 36: 481–491.
- Wood, K.R., & Barbara, D.J. 1971. Virus multiplication and peroxidase activity in leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivar systemically infected with W strain of cucumber mosaic virus. *Physiological Plant Pathology*, 1: 73–81.
- Zahir, Z.A., Arshad, M. & Frankenberger, W.T. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: Application and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*, 81: 97–168.

The effect of some bacteria strains on cucumber defense reactions for controlling of *Fusarium* stem and root rot disease

Elham Akbari Moghadam, Rohollah Saberi-Riseh, Pezhman Khodaygan, Hossein Alaei

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

Corresponding author: Rohollah Saberi-Riseh, email: r.saberi@vru.ac.ir

Received: Jan., 09, 2017

6(1) 29-42

Accepted: Apr., 29, 2018

Abstract

Cucumber is one of the most important crop in Iran. Pests and pathogens are the most important factors limiting its cultivation and lead to reduced yields. Biological control is considered as the best control method for soil-borne disease including *Fusarium* stem and root rot. In this study, antagonistic effects of *Pseudomonas fluorescens* strains on the important root rot pathogens of cucumber with dual culture method was examined *in vitro*. Strain VUPf760 showed the highest inhibition zone against *Fusarium oxysporium* and *Fusarium solani* with 9 and 7 mm, respectively. Inhibitory effects of these isolates on the disease was evaluated in the greenhouse. The results showed that seeds treatment with T17-4 and VUPf5 isolates reduced the severity of disease caused by *F. oxysporum* and *F. solani* by 58 and 60%, respectively. In addition, all three isolates alone increased peroxidase activity, total phenols and polyphenol oxidase in cucumber seedlings. However, the activity of these enzymes were higher in treatments with combination of antagonist and pathogen.

Keywords: *Fusarium* spp., biocontrol, enzyme, growth factors
