تاثیر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی در خیار تحت تنش قارچ پیتیوم

مریم مفیدنخعی[1*]، وحید عبدوسی[2]، علی دهستانی کلاگر[3]، همت الله پیردشتی[4]، ولی الله بابایی‌زاده [5]

۱- دانشجوی دکتری مهندسی کشاورزی گرایش باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران. ۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران. ۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری. ۴- دانشیار گروه زراعت، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری. ۵- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری.

* نویسنده مسئول: mofid.nakhaei@yahoo.com

چکیده

بوته‌میری ناشی از پیتیوم باعث خسارت به خیار می‌شود. فسفیت‌ها سبب مقاومت گیاه از طریق مهار رشد قارچ و فعال‌کردن مکانیسم‌های مقاومت به بیماری (تولید فایتوالکسین‌ها، پروتئین‌های مقاومتی و تقویت دیواره سلولی) می‌شوند. به دلیل حداقل آسیب به سلامتی انسان و محیط زیست توسط فسفیت‌ها و کنترل تعدادی از پاتوژنهای خانواده اوومیست، استفاده از آنها مورد توجه قرار گرفته است. در تحقیق حاضر، تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز و وزن تر گیاه خیار تیمار با فسفیت پتاسیم تحت تنش پیتیوم بررسی شدند. طرح پژوهش کاملا تصادفی، شامل ۳ تیمار و ۳ تکرار بود. با ظهور دومین برگ حقیقی خیار، محلول‌پاشی برگی فسفیت پتاسیم (غلظتهای ۰ و ۴ گرم بر لیتر) انجام گرفت. پنج روز بعد، آلوده‌سازی با قارچ پیتیوم انجام گردید. وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شدند. همچنین ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح، نمونه‌گیری جهت استخراج و اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز صورت گرفت. وزن تر تیمار فسفیت پتاسیم (غلظت ۴ گرم بر لیتر) نسبت به دو تیمار دیگر، به طور معنی‌داری ($P<0,01$) بیشتر بود. میزان آنزیم پراکسیداز در تیمار فسفیت پتاسیم(غلظت ۴ گرم بر لیتر)، به طور معنی‌داری ($P<0,01$) نسبت به دو تیمار دیگر، ۴۸ ساعت پس از تلقیح، بالاتر بود.

کلمات کلیدی: پراکسیداز، پیتیوم، پتاسیم فایتوالکسین و فسفیت.

مقدمه

در پی گسترش روزافزون کشت خیار گلخانه ای، بیماری‌های آن به ویژه بوته‌میری گسترش یافته است که باعث از بین رفتن مقدار زیادی از این محصول می‌شود. بوته‌میری توسط قارچ پیتیوم از خانواده‌ی اوومایستها ایجاد می‌شود. این قارچ در آب و هوای گرم و مرطوب سبب پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی خانواده‌ی کدوئیان مخصوصا خیار می‌شود (سماواتیان و شهریاری، ۱۳۸۹). از جمله راههای مبارزه با این بیماری، روشهای بیولوژیک، القاء مقاومت گیاه به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌ها، ترکیبات شیمیایی و قارچ‌کش‌ها می‌باشد. قارچ‌کش‌ها نه تنها باعث افزایش هزینه‌های تولید، بلکه سبب به خطرانداختن سلامت انسانها و ایجاد آسیب-های زیست محیطی می‌شود. بنابراین باید به دنبال راهکارهای استفاده از ترکیبات بی‌ضرر به جای مواد سمی و قارچ‌کش بود (Nguyen et al., 2012). مقاومت القایی، مکانیسمی است که گیاه می‌تواند در برابر محرک‌های زیستی و غیر زیستی سطح مقاومت خود را بالا ببرد که به طور گسترده در گیاه خیار مورد مطالعه قرار گرفته است. این مقاومت می‌تواند در گیاهان، در برابر یک پاتوژن تحریک شود که در پاسخ به پاتوژن، سبب تولید لیگنین‌ها، فایتوالکسین‌ها و القاء آنزیم‌های گیاهی می‌شود. در میان مواد مختلف، ترکیباتی به نام فسفیت‌ها (نمکهای معدنی اسید فسفرو) وجود دارند که برای کنترل بیماری‌های ناشی از گونه های فایتوفتورا، پیتیوم و بیماری‌های دیگر قارچی و باکتریایی شناخته شده‌اند. فرمولاسیون‌های نمکهای مختلف اسیدفسفرو به عنوان

قارچ‌کش‌های کشاورزی استفاده شده است. تحقیقات نشان دادند که فسفیت‌ها می‌توانند اثرات مستقیم شامل مهار کردن رشد قارچ و تغییرات در سوخت و ساز آن شوند و یا به طور غیر مستقیم با فعال کردن مکانیسم‌های مقاومتی بیماری مانند تولید فایتوالکسین‌ها، القاء پروتئین‌های مقاومتی و تقویت دیواره سلولی نقش خود را در جهت مقاومت گیاه ایفا کنند (جیحونی، ۱۳۹۱). همان‌طورکه گفته شد، آنزیمهای گیاهی مانند کیتیناز، پراکسیداز و ... در برابر پاتوژن‌های گیاهی درگیر هستند. در این تحقیق ما تغییرات در فعالیت‌های آنزیم پراکسیداز و وزن تر را در گیاه خیار تحت محلول‌پاشی با فسفیت پتاسیم، در حضور قارچ پیتیوم را توضیح دادیم. خلاصه‌ای از گزارش این کار آماده شده است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در گلخانه و آزمایشگاه پژوهشکده‌ی برنج و مرکبات واقع در دانشگاه کشاورزی ساری در سال ۱۳۹۳ انجام شد. پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی شامل ۳ تیمار و ۳ تکرار به صورت گلدانی به اجرا درآمد. تیمارها شامل: تیمار فسفیت پتاسیم (غلظت ۰ و ۴ گرم بر لیتر) و شاهد بود. بذور خیار رقم بومی اصفهان در خاک استریل، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۲-۲۸ درجه سانتیگراد کشت شدند. با ظهور دومین برگ حقیقی، محلول‌پاشی برگی تیمار فسفیت پتاسیم (غلظت۴ گرم بر لیتر) انجام گرفت. ۵ روز بعد، آلوده سازی به وسیله اینوکولوم قارچ پیتیوم انجام گردید. قارچ پیتیوم جدا شده از خیار، از بخش گیاهپزشکی مؤسسه تحقیقات کشاورزی تهران تهیه گردید. جهت تهیه مایه تلقیح از روش رامرتی و همکاران با کمی تغییرات استفاده شد. در این روش ۲۰۰ سانتی متر مکعب از خاک باغچه، ۲۰۰ سانتی متر مکعب ماسه بادی شسته شده، ۴۰ گرم آرد ذرت و ۸۰ میلی لیتر آب مقطر، در یک ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری به خوبی مخلوط شدند و دو مرتبه به فاصله ۲۴ ساعت، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۳۰ دقیقه استریل شدند. سپس چهار قطعه محیط کشت حاوی کشت سه روزه *Pythium ultimum* روی محیط کشت PDA به قطر دو سانتی متر به ارلن مایر اضافه و به مدت سه هفته در دمای ۲±۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از رشد کامل قارچ، محتوی ارلن، به نسبت پنج در صد به عنوان اینوکولوم با خاک گلدان‌ها مخلوط گردید (Ramoorthy et al., 2002). ریشه و اندام‌های هوایی به طور جداگانه بر روی ترازو، توزین و وزن ترشان یادداشت گردید. ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح قارچ، نمونه‌گیری جهت استخراج آنزیم پراکسیداز، ۰/۲ گرم از نمونه برگی با ازت مایع سائیده و با ۱/۵ میلیلیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (PH=7)، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی به عنوان عصاره‌ی آنزیمی درنظر گرفته شد. ترکیب نهایی واکنش شامل ۱۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، ۶۰۰ میکرولیتر گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، ۶۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱۰ میلی‌مولار بود. جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر دو بار با فاصله زمانی دو دقیقه خوانده شد. (Chance & Maehly, 1955).تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

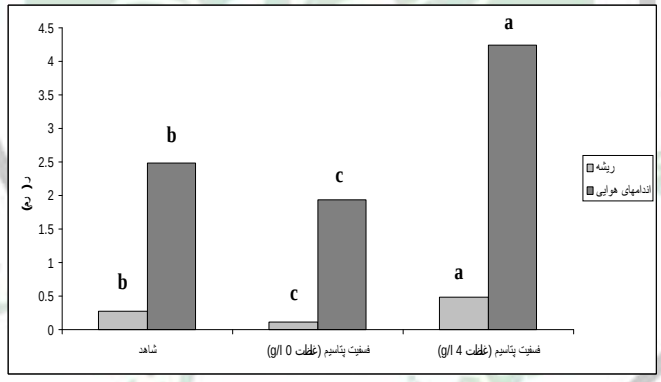
همانطور که ملاحظه می‌شود (شکل ۱)، بین تیمار شاهد که در شرایط عادی گلخانه قرار داشت و تیمارهای فسفیت پتاسیم با غلظتهای ۰ و ۴ گرم در لیتر، اختلاف معنی‌داری وجود دارد. وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی گیاه در اثر فسفیت پتاسیم (غلظت ۴ گرم در لیتر) تحریک شد و نسبت به دو گروه دیگر در مرتبه ی بالاتری قرار گرفت (جدول ۱). با معرفی ترکیبات متنوع فسفیت پتاسیم در اواسط دهه ۱۹۹۰ میلادی، محققین پی بردند که این ترکیبات موجب پیدایش تاثیرات چشمگیر کمی و کیفی در محصولات کشاورزی مانند افزایش وزن و گسترش ریشه و افزایش وزن و اندازه اندام‌های هوایی گیاه می‌شوند (جیحونی، ۱۳۹۱). تحقیقی که تحت عنوان تاثیر فسفیت بر گیاه خیار تحت قارچ پیتیوم انجام شد، نیز با نتایج این پروژه مطابقت داشت. نشان

داد که فسفیت توانست وزن تر در این گیاه را افزایش دهد و اختلاف معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر نشان داد (Abbasi & Lazarovits, 2006). طبق شکل ۱ اختلاف معنی‌داری در سه تیمار مشاهده می‌شود. میزان آنزیم پراکسیداز در تیمار فسفیت پتاسیم با غلظت ۴ گرم در لیتر، بیشتر از دو تیمار دیگر بوده است (شکل ۲). تحقیقاتی که انجام شد، نشان داد که فسفیت می‌تواند خود سبب افزایش در آنزیمهای گیاهی شود که از این طریق مقاومت را در گیاه سبب شود. در آزمایشی تاثیر فسفیت بر میزان آنزیم پراکسیداز در گیاه خیار مورد مطالعه قرار داده شد. طبق نتایج، فسفیت سبب افزایش در این آنزیم شد (Helen et al., 1990). محققین دیگر، با به کار بردن فسفیت به عنوان یک قارچکش، توانستند رشد قارچ را مهار کنند. فسفیت سبب بالا رفتن آنزیم‌های گیاهی در گیاه شده بود (Jackson et al., 2000). گروهی از محققین، واکنش دفاعی سیب زمینی توسط فسفیت پتاسیم در برابر قارچ فایتوفتورا را مورد تحقیق قرار دادند. آنها دریافتند که فسفیت برای حفاظت گیاهان در مقابل قارچهای گروه اوومایستها به کار می‌رود. در این پژوهش، تجمع پراکسیداز در گیاهانی که با فسفیت تیمار شده بودند، بیشتر از گیاهان دیگر بود (Machinan et al., 2012).

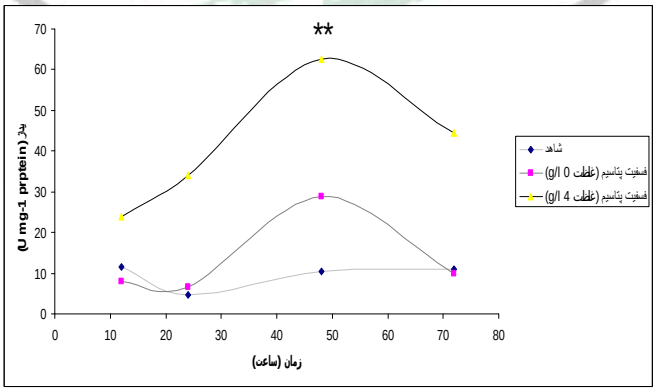
جدول ۱- میانگین مربعات صفات مورد آزمایش

منابع تغییرات	درجه آزادی	پراکسیداز	وزن تر ریشه	وزن تر اندام‌های هوایی
تیمار	۱۷	۶۵۵,۵۵۴ **	۰,۳۴۲**	۹,۳۲۱**
خطا	۱۸	۰,۰۳۳	۱,۵۹۴	۰,۹۳۶
ضریب تغییرات (درصد)		۱۵,۷۶۱	۲۴,۶۷۲	۱۹,۹۵۵

** معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد.



شکل ۱- وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی



شکل ۲- میزان آنزیم پراکسیداز

منابع

۱. جیحونی، م. ۱۳۹۱. بررسی نقش فسفیت پتاسیم در تغذیه گیاهی و کنترل عوامل بیماریزا. نشریه فنی. ۱۷-۲ :۴.

۲. سماواتیان، م.، ع.، شهریاری. ۱۳۸۹. ارزیابی استفاده از قارچ آنتاگونیست تریکودرما برای کنترل بیماری مرگ گیاهچه ناشی از قارچ پیتیوم در گلخانه. اولین همایش ملی کشاورزی پایدار و تولید محصول سالم. ۶۲-۵۹ :۱.

3. Abbasi, P. A and G. Lazarovits. 2006. Seed treatment with phosphonate (AG3) suppresses pythium damping-off of cucumber seedlings. Physiological and Molecular Plant Pathology. 10: 90-459.

4. Chance, B and A. C. Maehly. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Academic Press. 2: 764-775.

5. Helen, R. T. Irving and A. Joseph. 1990. Local and systemic induction of peroxidase, chitinase and resistance in cucumber plants by K 2 H P04. Plant Pathology. 37: 355-366.

6. Jackson, T. T. Burgess. I. Colquhoun and G. Hardy. 2000. Action of the fungicide phosphate on eucalyptus marginata inoculated with *phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology. 15: 235-238.

7. Machinan, D. M.C. Lobato. M.L. Feldman. G. Rauldaleo and A.B. Andrex. 2012. Potassium phosphate primes defense responses in potato against phytophthora infestans. Plant Physiology. 70: 120-123.

8. Nguyen, V. T. W. Lester. B. Burgessb and C. Y. Edward. 2012. Greenhouse and field evaluations of potassium phosphonate. Phytopathology and Plant Protection. 6: 724–739.

9. Ramoorthy, V. T. raguchander and R. Samiyappan. 2002. Enhancing Resistance of tomato and hot peper to Pythium disease by seed treatment with fluorescent Pseudomonas. European Journal of Plant Pathology. 108: 429-441.

Effect of Potassium Phosphite on Enzyme Peroxidase, Fresh weight of roots and shoots of Cucumber Inoculated with *Pythium ultimum*

M. Mofid nakhaei[1]*, V. Abdossi[2], A. Dehestani kolagar[3], H. Pirdashti[4], V. Babaeizad[5]

1- Ph. D Student of Horticultural Science, Olom Tahghighat University of Tehran. 2- Associate Professor, Dep. of Horticultural Science, Olom Tahghighat University of Tehran. 3- Associate Professor, Dep. of Biotechnology Science, Agricultural and Natural Resources University of Sari. 4- Associate Professor, Dep. of Biotechnology Science, Agricultural and Natural Resources University of Sari. 5- Associate Professor, Dep. of Phytopathology Science, Agricultural and Natural Resources University of Sari.

*Corresponding author: mofid.nakhaei@yahoo.com

Abstract

Damping-off caused by *Pythium* damage to the cucumber plant. Phosphites, increase plant tolerance to disease via both inhibition of fungi growth and activation of plant internal mechanisms (phytoalexin production, protein resistance and strengthens the cell walls). This group of pesticides has been considered due to the ability of phosphates to control some oomycete family pathogens and least damaging to human health and to the environment. In the present study, cucumber plants treated by potassium phosphite were inoculated with the fungi *Pythium* and changes in antioxidant enzymes activity including peroxidase and fresh weight of shoot and root were studied. We were used completely randomized design (CRD) experiment, including 3 treatments and 3 repeats. With the emergence of the second true leaves of cucumbers, various concentrations of potassium phosphite solution (0 and 4 grams per liter) were sprayed on the aerial parts of the plant. Five days later, infection with the fungi *Pythium* was performed. fresh weight of root and shoot were measured in different treatments. Furthermore, sampling was performed in 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation in order to extract and measure peroxidase. fresh weight of shoot and root was significantly higher in treatments containing 4 grams per liter potassium phosphite compared to other treatments ($P<0.01$). The amount of peroxidase, was significantly higher in the treatment containing 4 grams per liter potassium phosphite compared to other treatments, at 48 h after inoculation.

Key word: Peroxidase, *Pythium*, phytoalexin and Potassium Phosphite.