تأثیر سالیسیلیک اسید و کیتوزان بر القای مقاومت در نخود علیه عامل بیماری‌های پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی*

EFFECT OF SALICYLIC ACID & CHITOSAN ON INDUCTION OF RESISTANCE IN CHICKPEA AGAINST FUSARIAL WILT & ROOT ROT

ساهره ولادی[۱**]، محمد جواد سلیمانی پری[۱]، غلام خداکرمیان[۱] و طیبه قیاسوند[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۳)

چکیده

قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*) و قارچ عامل پوسیدگی ریشه (*Fusarium solani*) از عوامل کاهنده عملکرد نخود هستند. از آنجا که مبارزه شیمیایی علیه این قارچ‌ها چندان مؤثر نیست، کاربرد موادی با قابلیت تحریک مکانیسم‌های دفاعی گیاهان که خطرات زیست محیطی نداشته باشند مطلوب به‌نظر می رسد. بر همین اساس امکان القای مقاومت میزبانی در نخود علیه این بیماری‌ها با محلول‌های ۰ ، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام سالیسیلیک اسید (SA) و کیتوزان به‌صورت اسپری برگی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور گیاهان تیمار شده در شرایط دمائی ۲۴ درجه سانتیگراد و نور ۱۶ ساعته در اتاقک رشد به مدت ۴۰ روز نگه‌داری شدند. نتایج نشان داد که غلظت ۲۰۰ پی پی ام کیتوزان باعث کاهش نسبی پوسیدگی ریشه و غلظت ۴۰۰ پی پی ام آن باعث کنترل پژمردگی گردیدند. غلظت ۴۰۰ پی پی ام SA در کاهش جزئی علائم پژمردگی مؤثر بود، اما غلظت‌های مختلف SA تأثیری در کاهش شدت پوسیدگی ریشه ایجاد نکردند. نتایج آزمایش‌ها انجام شده در شرایط آزمایشگاه حاکی از تأثیر مستقیم سالیسیلیک اسید به میزان ۲۴,۴۷ درصد و ۳۹ درصد به ترتیب روی رشد *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* و *Fusarium solani* و کیتوزان به میزان ۵۶,۳۸ درصد و ۵۰,۷۹ درصد به ترتیب روی رشد *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* و *Fusarium solani*) در محیط کشت PDA بود. میزان SA آزاد داخل بافت گیاهان تیمار شده با SA با استفاده از روش HPLC اندازه‌گیری شد. در این تیمار، SA آزاد داخل بافت تا ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی کاهش یافته و در نتیجه علائم پژمردگی به تدریج ظاهر گردید. فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و β-۱و۴گلوکاناز و مقدار ترکیبات فنولی کل موجود در برگ‌های نخود تیمار شده با SA و کیتوزان در چهار زمان مختلف پس از مایه‌زنی بررسی شد. طبق نتایج افزایش میزان این شاخص‌ها در تیمار ۲۰۰ پی پی ام SA دیده شد، اما SA نتوانست نقش مهمی در افزایش مقاومت نخود در برابر قارچ عامل پوسیدگی سیاه ریشه ایفا کند، هرچند موجب کاهش علائم پژمردگی فوزاریومی به میزان ۲۶,۵ درصد در مقایسه با شاهد آلوده گردید. غلظت‌های مختلف کیتوزان باعث القای جزئی این شاخص‌ها شده اما اثر کنترلی مؤثری بر بیماری پوسیدگی ریشه نداشتند. بیشترین میزان این شاخص‌ها در تیمار ۴۰۰ پی پی ام کیتوزان و در ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی دیده شد. نتایج نشان می‌دهد کاربرد کیتوزان می‌تواند نقش مهمی در افزایش مقاومت گیاه نخود در برابر این بیماری ایفا کند.

واژه‌های کلیدی: کیتیناز، β-۱و۴-گلوکاناز، مقدار ترکیبات فنولی کل، HPLC، نخود

---

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sahereh_veladi@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی همدان ، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum*) به دلیل دارا بودن پروتئین بالا و اهمیت در تناوب زراعی با غلات، همه ساله در سطح قابل توجهی از مناطق کشور به روش دیم کشت می شود. یکی از بیماری‌های مهم و خسارت زای نخود در ایران وجهان بیماری زردی و پژمردگی فوزاریومی است و در سال ۱۳۴۲ از مناطق مختلف کشور (کرج، اهر، قزوین) گزارش شده است. پژمرده و زرد شدن برگ ها، ضعف بوته، کاهش تعداد غلاف، کوچک ماندن دانه‌ها و در نتیجه کاهش محصول از نشانه‌های این بیماری هستند. عامل بیماری قارچ خاکزاد *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* است. خسارت این بیماری در بعضی از مزارع اطراف مراغه تا ۸۰% گزارش شده است (Saremi 2000). نخود به‌عنوان یکی از میزبان‌های *Fusarium solani* در سال ۱۹۶۹ معرفی شد.*گرلاخ و ارشاد* (Gerlach & Ershad 1970) از ریشه‌های نخود مبتلا به پوسیدگی سیاه در منطقه خرم آباد این قارچ را جدا کردند. علائم بیماری به صورت پوسیدگی خشک (قهوه ای تا سیاه شدن) ریشه‌ها و هیپوکوتیل دیده می‌شود که سر انجام باعث زردی و پژمردگی گیاهچه‌ها می‌شود. در ایران درصد آلودگی مزارع بین ۳ تا ۱۹/۵ درصد گزارش شده است (Safaei & Mansoori 2007).

تیمار گیاهان با محرک‌های زنده و غیر زنده اختصاصی باعث تقویت مقاومت حقیقی آنها می شود که به عنوان مقاومت القایی تعریف می‌شود. مقاومت به‌طور موضعی در محل آلودگی القاء می‌شود اما به طور سیستمیک نیز در سایر بخش‌های سالم القاء شده که اصطلاحاً مقاومت سیستمیک اکتسابی(Systemic Acquired Resistance) SAR یا مقاومت سیستمیک القایی نامیده می‌شود. این نوع مقاومت اکتسابی اثر طولانی مدت داشته و گاهی در تمام طول عمر گیاه پایدار باقی می‌ماند (HammerSchmidt *et al*. 2001). فرضیه استفاده از مواد شیمیایی به عنوان فعال کننده‌های سیستم دفاعی گیاهان بعد از آزمایش *وایت* (White1979) در سال ۱۹۷۹ که نشان‌دهنده تأثیر کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید روی گیاه توتون علیه ویروس موزائیک توتون بود، شدت گرفت. کیتوزان یک پلیمر پلی کاتیونی از β-۱و۴-D گلوکوز آمین است که امروزه به‌عنوان ماده افزایش دهنده قدرت دفاعی گیاهان علیه آلودگی‌های قارچی به‌کار می رود. این ماده از پوسته‌ی سخت پوستان، حشرات و بسیاری ازقارچ‌ها و جلبک‌ها و مخمرها به‌دست می‌آید. این ماده خطر زیست محیطی ندارد چرا که اثر سمیت روی پستانداران و محیط زیست ندارد و از طرف دیگر فراوانی بالایی درطبیعت دارد. سالیسیلیک اسید در پوست درخت بید وجود دارد و β هیدروکسی بنزوئیک اسید نامیده می‌شود. این ماده به عنوان القاگر مقاومت در واکنش‌های دفاعی گیاهان دخیل است. پیش تیمار گیاهان با الیسیتورهای مختلف باعث تحریک پاسخ‌های دفاعی و در نتیجه کاهش علائم بیماری در پاتوسیستم‌های مختلف شده است. گزارش‌های متعددی از موفقیت در کنترل بیماری یا کاهش علائم آن به وسیله‌ی تیمار گیاهان با کیتوزان توسط *ناندیش کومار* و همکاران، (Nandeeshkumar *et al*. 2008)، بن- *شالوم* و *فالیک* (Ben-Shalom & Fallik 2003) و سالیسیلیک اسید توسط *جایاراج* و *همکاران* (Jayaraj *et al*. 2008)، *ماندال* و *همکاران* (Mandal *et al*. 2009) و سایر الیسیتور ها ارائه شده است.

طبق نظر *یدیدیا* و *همکاران* (Yedidia *et al*. 2000) بیان ژن‌های دفاعی مثل ژن‌های کد کننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی به عنوان یکی از شاخص‌های مقاومت به‌کار می‌رود. از جمله این نوع پروتئین‌ها کیتیناز

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

و β-۱و۳- گلوکاناز هستند که همراه با سایر آنزیم‌های دفاعی مثل β-۱و۴- گلوکاناز و پراکسیداز و غیره در فعالیت‌های دفاعی مؤثرند. هم‌چنین *باتاچاریا* و همکاران (Bhattacharya *et al*. 2010) بیان کردند ترکیبات فنولی نیز از نشانگرهای مهم دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده آن محسوب می‌شوند. از آنجایی‌که مقاومت میزبان‌های گیاهی توسط نژادهای مختلف قارچ‌های بیمارگر شکسته می‌شود، استفاده از روش‌های دیگر مانند فعال کننده‌های مصنوعی مقاومت که کم خطر و کم هزینه تر هستند ضروری به‌نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر القای مقاومت از طریق تیمار گیاهان با عوامل زنده و غیر زنده به‌طور وسیعی تبدیل به یکی از روش‌های با پتانسیل قوی جهت کنترل بیماری‌های گیاهی شده است. بنابراین القاء مقاومت به عنوان یک تکنولوژی جدید جهت کنترل بیماری‌های گیاهی جایگاه خود را پیدا کرده و تأثیر آن در شرایط آزمایشگاه و برخی از مزارع به اثبات رسیده است. مواد شیمیایی القا کننده مقاومت که قادرند مقاومت را علیه طیف وسیعی از بیماری‌ها القاء کنند، یک فرصت و ابزار مناسب برای کشاورزان را ایجاد کرده و کامل کننده مقاومت ژنتیکی گیاهان به بیماری‌ها هستند. از آنجا که کنترل عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد به دلیل شرایط پیچیده موجود در خاک و ریزوسفر و تبادلات بیوشیمیایی و بیولوژیک گیاه و محیط اطراف آن، همواره با مشکلاتی مضاعف توام بوده است، لذا بررسی امکان استفاده از روش‌های تلفیقی و القای مقاومت در کنترل بیماری‌های خاکزاد به نحوی که افزایش عملکرد و کاهش خسارات زیست محیطی را در بر داشته باشد، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Reignault & Walters 2007) از آنجاکه روش مؤثر و قطعی برای معالجه بیماری‌های خاکزاد فوزاریومی در طول دوره رشد وجود ندارد، در تحقیق حاضر آزمایش‌هایی به‌منظور تعیین اثر کاربرد غلظت‌های ۰،۲۰۰،۴۰۰ پی پی ام از سالیسیلیک اسید و کیتوزان بر کاهش شدت بیماری‌های پژمردگی و پوسیدگی سیاه ریشه، ناشی از القای مقاومت در گیاهان نخود انجام شد.

روش بررسی

جداسازی و شناسایی قارچ های فوزاریومی عامل بیماری‌ها

جمع آوری نمونه‌های گیاهی در دو نوبت از مناطق مختلف استان کردستان در اواخر بهار و اوایل تابستان ۱۳۸۸صورت گرفت. بوته‌های نخود مشکوک به آلودگی به بیماری‌های پوسیدگی و پژمردگی جهت بررسی، داخل پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند. برای شناسایی جدایه‌های فوزاریومی پس از خالص سازی، تمامی آنها به روی محیط کشت برگ میخک- آگار انتقال داده شدند. پس از گذشت ده روز از رشد پرگنه قارچ در محیط ذکر شده و اسپورزایی آن، پارامترهای لازم برای شناسایی قارچ‌ها مثل: شکل ماکروکنیدیوم، میکروکنیدیوم، اسپورودوشیوم، شکل یاخته‌های مولد کنیدیوم و نوع فیالید، دارا بودن سرهای دروغین، رنگ پرگنه قارچ (به ویژه سطح زیرین پرگنه) و وجود کلامیدوسپور با استفاده از کلید شناسایی *نلسون* و همکاران (Nelson *et al*. 1983) بررسی شد.

تعیین اثر مستقیم SA و کیتوزان روی رشد میسلیومی قارچ های بیمارگر

به منظور بررسی تأثیر مستقیم سالیسیلیک اسید و کیتوزان روی رشد عوامل بیمارگر، محیط کشت PDA به همراه این محلول ها با غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام به‌طور

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جداگانه تهیه شد. پتری‌های شاهد حاوی محیط PDA تهیه شد. بر روی تمام پتری‌ها دیسک هایی از محیط کشت حاوی قارچ های بیمارگر قرار داده شد. پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و ۷۲ ساعت بعد قطر پرگنه قارچ های بیمارگر اندازه گیری شد. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم در تیمارها طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

تفاوت رشد میسلیوم در تیمار شاهد و هر تیمار را بر رشد میسلیوم در تیمار شاهد تقسیم و در عدد ۱۰۰ ضرب شد. این آزمایش‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر غلظت، انجام و ارزیابی گردید. میانگین داده های هر تیمار به وسیله نرم افزار SAS 9.1 در سطح ۰/۰۱ با استفاده از آزمون دانکن تجزیه و تحلیل و محاسبه شد.

بررسی‌های گلخانه‌ای

آزمایش های گلخانه‌ای دراتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۵-۲۰ سانتی‌گراد درجه با رطوبت ۸۰% انجام گرفت. ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی نیز با لامپ‌های ساخت شرکت سیگما آلدریچ (۴۰۰۰ لوکس) ایجاد شد.

جهت پاستوریزه کردن خاک، پس از سرند کردن، خاک‌ها به‌مدت دو ساعت در حرارت ۷۰-۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. گلدان‌های پلاستیکی که با محلول هیپوکلریت سدیم ۱% ضد عفونی شده بودند با خاک پاستوریزه پر شدند. مایه تلقیح جدایه هر قارچ با استفاده از دانه‌های گندم تهیه و از هرکدام به نسبت ۱۰ درصد وزنی با خاک پاستوریزه مخلوط و به یک سوم فوقانی گلدان‌های حاوی گیاهچه های دو هفته ای نخود افزوده شدند. در تمامی آزمایش‌های گلخانه ای از بذور نخود رقم ILC482 حساس به بیماری زردی و پژمردگی نخود (Gopalakrishnan 2000) و از بذرهای رقم هاشم حساس به بیماری پوسیدگی سیاه ریشه (Safaei & Mansoori 2007) استفاده شد. آزمایش‌ها به‌منظور تعیین اثر کاربرد غلظت‌های ۰،۲۰۰ و۴۰۰ پی پی ام سالیسیلیک اسید و کیتوزان بر کاهش شدت بیماری ها، ناشی از القای مقاومت در گیاهان نخود انجام شد. این آزمایش‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر غلظت، انجام گردید. مقایسه میانگین داده ها به وسیله نرم افزار SAS 9.1 در سطح ۰/۰۱ با استفاده از آزمون دانکن تجزیه و تحلیل و محاسبه شد.

تعیین میزان شاخص‌های دفاعی

طبق روش *ماندال* و همکاران (۲۰۰۹) گیاهچه‌های دو هفته‌ای ارقام سه بار به‌صورت یک روز در میان با محلول‌های سالیسیلیک اسید تا قبل از جاری شدن آب از سطح برگ‌ها اسپری شدند. ۴۸ ساعت بعد از آخرین اسپری مایه‌زنی با قارچ ها انجام گرفت. هم‌چنین در آزمایش جداگانه ای طی دو روز گیاهچه‌های دو هفته‌ای هر دو رقم با محلول‌های کیتوزان تا قبل از جاری شدن آب از سطح برگ‌ها اسپری شدند. در روز دوم علاوه بر اسپری برگی مقدار ۱۰۰ میلی لیتر محلول پای بوته‌های هر گلدان ریخته شد(Soil drench). سپس از بافت ساقه و برگ گیاهچه‌های ارقام جهت تعیین مقدار آنزیم‌ها و مواد فنولی و پروتئین کل در فواصل زمانی ۰، ۴۸، ۹۶، ۱۶۸ ساعت بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری نمونه برداری انجام شد.

جهت تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در بافت، میزان پروتئین تام موجود در نمونه‌ها به روش بردفورد (Bradford 1976) تعیین شد. بررسی فعالیت آنزیم β-۱و۴ گلوکاناز و کیتیناز به ترتیب طبق روش

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

یدیـــدیا و همکـــاران (۲۰۰۰) و بنـــسود و باجکـــال (Bansode & Bajkal 2006) انجام شد. هم‌چنین از روش مالیک و سینگ (Malick & Singh 1980) جهت اندازه گیری مقدار ترکیبات فنولی استفاده شد. این آزمایش ها به‌صورت آزمون فاکتوریل در قالب یک طرح کاملا تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام و به صورت آزمون فاکتوریل آنالیز گردید. مقایسه میانگین داده ها به وسیله نرم افزار SAS 9.1 در سطح ۰/۰۱ با استفاده از آزمون دانکن تجزیه و تحلیل و محاسبه شد.

تعیین مقدار SA آزاد داخل بافت با روش HPLC

آزمایش ها گلخانه ای جهت تعیین مقدار SA آزاد داخل بافت گیاهچه‌های رقم ILC482 تیمار شده با SA، انجام شد. در فاصله زمانی صفر (قبل از مایه‌زنی) و ۱۶۸ ساعت بعد از مایه‌زنی قارچ (*F. oxysporum* f. sp. *ciceri*)، از هر گلدان یک بوته خارج شده و جهت بررسی با روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) هوا خشک گردیدند. عصاره‌گیری از بافت گیاهی جهت تعیین مقدار سالیسیلیک اسید آزاد داخل بافت نمونه‌ها، طبق روش *مالامی و همکاران* (Malamy *et al*. 1992) انجام شد.

با استفاده از روش HPLC اندازه‌گیری کمی و کیفی سالیسیلیک اسید در نمونه‌ها انجام شد. شرایط دستگاه (,Watersمدل ۲۴۸۷ ساخت ماساچوست آمریکا) برای انجام این کار از این قرار بود: دستگاه به‌صورت سیستم ایزوکراتیک و با یک پمپ با فشار حداکثر psi ۱۵۵۰ کار می‌کرد. فاز متحرک شامل استونیتریل و تری فلوئورو استیک اسید (۰/۰۷۵ درصد) که با نسبت ۵۸% و ۴۲% تهیه شده بود با سرعت یک میلی لیتر در دقیقه در سیستم استفاده شد. از شناساگر UV با طول موج ۲۱۰ نانومتر استفاده شد. سرعت چارت در ۱۲ دقیقه تنظیم گردید. نوع ستون مورد استفاده برای جداسازی SA، C_{18} (Waters, USA) به طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی متر بود. برای ارزیابی کمی و کیفی SA آزاد موجود در نمونه‌های استخراج شده، محلول استاندارد آن با غلظت‌های مختلف در متانول حل شد. برای هر غلظت دو تزریق به حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد و اطلاعات مربوط به زمان نگه‌داری و سطح زیر پیک SA ثبت گردید و برای تهیه منحنی استاندارد SA مورد استفاده قرار گرفت. از هر نمونه استخراج شده نیز دو تزریق به حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد و اطلاعات مربوط به هر پیک اعم از زمان نگه‌داری، سطح زیر پیک و ارتفاع آن توسط کروماتوپک ثبت گردید. منحنی مربوط به SA در نمونه‌ها با توجه به استاندارد آن تشخیص و میزان آن تعیین گردید.

تعیین شدت بیماری در گیاهچه‌های نخود

دو هفته بعد از مایه‌زنی قارچ *F. solani* و هفده روز بعد از مایه‌زنی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* علائم هر بیماری با مقیاس ۰ تا ۵ مطابق جدول ۱ مورد ارزیابی قرار گرفت (Gong *et al*. 2011). برای هر تیمار سه بوته از گلدان‌ها خارج گردید و میزان پوسیدگی و نکروز ریشه در گیاهچه‌های آلوده به قارچ *F. solani* و زردی، پژمردگی و خشکیدگی اندام های هوایی در گیاهچه های آلوده به قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* بررسی شد. این آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده ها به وسیله نرم افزار SAS 9.1 در سطح ۰/۰۱ با استفاده از آزمون دانکن تجزیه و تحلیل و محاسبه شد.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول 1. مقیاس ارزیابی بیماری‌های پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی ریشه نخود

Table. 1. Scale for evaluation of fusarial wilt & root rot diseases (Gong *et al*. 2011).

Disease index	Description
0	No necrosis or wilt, roots & leaves are completely healthy
1	20% of the roots or leaves are brown or wilt
2	21-40% of the roots or leaves are brown or wilt
3	41-60% of the roots or leaves are brown & necrosis or wilt
4	61-75% of the roots or leaves are brown & necrosis or wilt
5	75%< of the roots or leaves are brown & necrosis or wilt & dead bush

نتایج

شناسایی مورفولوژیکی عوامل بیمارگر

پس از جمع‌آوری نمونه‌ها و انتقال آنها به آزمایشگاه، عملیات جداسازی قارچ‌های مورد نظر از ریشه و طوقه گیاهان مشکوک صورت گرفت. مراحل خالص‌سازی و شناسایی جدایه‌های به دست آمده مطابق با مطالب ذکر شده در بند اول بخش مواد و روش‌ها انجام شد. قارچ‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* و *Fusarium solani* شناسایی شدند.

نتایج تعیین اثر مستقیم SA و کیتوزان روی رشد میسلیومی قارچ های بیمارگر

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف محلول ها در محیط کشت و تعیین درصد بازدارندگی آن بر میزان رشد پرگنه قارچ های بیمارگر در ظروف پتری انجام گرفت. نتایج آزمایش‌ها نشان داد بین اثرغلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید و کیتوزان در بازدارندگی رشد میسلیومی هر دو قارچ بیمارگر، در مقایسه با شاهد آن قارچ در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی دار وجود دارد. اما میانگین قطر رشد پرگنه‌ها با افزایش غلظت‌ها کاهش معنی دار نشان نداد (جداول ۲ و ۳).

تأثیر سالیسیلیک اسید به‌صورت کند شدن رشد قارچ‌ها ۷۲ ساعت بعد از کشت در محیط PDA-SA دیده شد. پس از آن با افزایش زمان انکوباسیون به تدریج میسلیوم قارچ های بیمارگر، رشد خود را با میزان کمتری نسبت به شاهد از سر گرفتند. نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر با نتایج مطالعه *ماندال* و همکاران (۲۰۰۹) مشابه بود. اثرات ضدقارچی سالیسیلیک اسید شامل تغییر دادن بسیاری از اجزای میکروسکوپی سلول خصوصا میتوکندری است (Amborabe *et al.* 2002).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول 2. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم ***Fusarium oxysporum*** **f. sp.** ***ciceri*** و ***F. solani*** توسط سالیسیلیک اسید

Table 2. Percentage of inhibitory of mycellial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* & *F. solani* by salicylic acid

Treatment	Average of radial growth of *Fusarium oxysporum* (mm)	Percentage of inhibitory	Average of radial growth of *Fusarium solani* (mm)	Percentage of inhibitory
Control	12.8	0^{b}	14.5	0^{b}
SA(200ppm)	9.8	23.17^{a}	9	37.78^{a}
SA(400ppm)	9.5	25.77^{a}	8.6	40.31^{a}

Cv: 28.91 --Cv: 30.02

- SA = Salicylic Acid ,Values in columns with different letter indicates significant differences (P < 0.01) according to Duncan's multiple-range test
- Average of radial growth was evaluated 72h after inoculation with pathogens

جدول 3. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم ***Fusarium oxysporum*** **f. sp.** ***ciceri*** و ***F. solani*** توسط کیتوزان

Table. 3. Percentage of inhibitory of mycellial growth of *F. oxysporum* f.sp. *ciceri* & *F. solani* with by chitosan

Treatment	Average of radial growth of *Fusarium oxysporum* (mm)	Percentage of inhibitory	Average of radial growth of *Fusarium solani* (mm)	Percentage of inhibitory
Control	12.8	0^{b}	14.5	0^{b}
Chitosan (200ppm)	6.41	49.87^{a}	8	44.82^{a}
Chitosan (400ppm)	4.75	62.89^{a}	6.25	56.76^{a}

Cv: 30.68 --Cv: 30.13

- Values in columns with different letter indicates significant differences (P < 0.01) according to Duncan's multiple-range test
- Average of radial growth was evaluated 72h after inoculation with pathogens

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

هم‌چنین کند شدن رشد قارچ‌ها ۷۲ ساعت بعد از کشت آنها در محیط PDA-Chitosan مشاهده شد. با افزایش زمان انکوباسیون این تأثیر بر قارچ *F. oxysporum* همچنان پایدار ماند اما قارچ *F. solani* رشد خود را با میزان کمتری نسبت به شاهد از سر گرفت. *آمبوراب* و *همکاران* (Amborabe *et al.* 2008) بیان کردند کیتوزان باعث تخریب ساختمان سلولی و تراوش الکترولیت‌ها و پروتئین‌ها می‌شود که این به‌دلیل ماهیت پلی‌کاتیونی آن است. این ماده باعث تشکیل روزنه و سوراخ‌هایی در غشاء سلولی و تأثیر برآن از طریق اثر مستقیم بر H^+-ATPase می‌شود.

تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید و کیتوزان روی بیماری‌ها در شرایط گلخانه

مطابق نتایج به‌دست آمده، هر دو غلظت به‌کار رفته سالیسیلیک اسید در مقایسه با شاهد آلوده به‌طور معنی‌داری باعث کاهش شدت علائم بیماری زردی و پژمردگی شدند. به نظر می رسد ظهور علائم در این تیمارها ناشی از عدم کنترل کامل این قارچ خاکزی با تیمار سالیسیلیک اسید بود هرچند وجود تفاوت معنی‌دار در شدت بیماری بین تیمارهای همراه این ماده با شاهد آلوده نشانگر تأثیر سالیسیلیک اسید در کاهش نسبی این بیماری بود (جدول ۴). اما هیچ یک از غلظت‌های به‌کار رفته سالیسیلیک اسید در مقایسه با شاهد آلوده به‌طور معنی‌داری باعث کاهش شدت بیماری پوسیدگی ریشه نشدند. در مجموع ظهور علائم در این تیمارها نشانگر عدم کنترل کامل این قارچ خاکزی با تیمار سالیسیلیک اسید بود (جدول ۴).

مطابق نتایج به‌دست آمده، هر دو غلظت به‌کار رفته کیتوزان در مقایسه با شاهد آلوده به‌طور معنی‌داری باعث کاهش شدت بیماری زردی شدند. غلظت ۴۰۰ پی پی ام این ماده بیشترین تأثیر را در کنترل این بیماری نشان داد. با وجود حساس بودن رقم ILC482 به این بیماری می‌توان گفت کنترل موفق این قارچ با کاربرد کیتوزان۴۰۰ پی پی ام حاصل شده است (جدول۵). هم‌چنین هر دو غلظت به‌کار رفته کیتوزان باعث کاهش جزئی شدت بیماری پوسیدگی سیاه ریشه شدند اما این کاهش در مقایسه با شاهد آلوده معنی‌دار نبود. میزان کاهش علائم در تیمار ۲۰۰ پی پی ام بیشتر از سایر تیمارهای همراه قارچ عامل بیماری بود (جدول ۵)

عواملی مانند نوع بیمارگر و پاتوتیپ آن، گونه گیاه میزبان و رقم آن و ساختار گیاهی مورد حمله بیمارگر ممکن است کارایی روش‌های غیر شیمیایی مثل القای مقاومت را در کنترل بیمارگر تحت تأثیر قرار دهد (Elad & Freeman 2002). به نظر می‌رسد متفاوت بودن پاتوسیستم در هریک از آزمایش‌های این تحقیق از نظر رقم مورد استفاده و میزان قدرت تهاجمی بیمارگر باعث تفاوت در میزان مقاومت القا شده و کاهش علائم بیماری‌ها باشد. *راجو* و همکارانش(Raju et al. 2008) نیز حساس بودن رقم مورد استفاده را به بیماری زردی نخود، عامل ظهور علائم بیماری می‌دانند. چرا که در این رقم میزان القاء پاسخ‌های دفاعی در گیاهچه‌ها بعد از تیمار بذور با سالسیلیک اسید در مقایسه با رقم مقاوم مورد بررسی بسیار پایین‌تر بود. *رودریگز* و *همکاران* (Rodriguez *et al.* 2007) ظهور علائم بیماری بلاست در گیاهچه‌های برنج را ناشی از کافی نبودن میزان مقاومت القا شده با غلظت‌های به‌کار رفته کیتوزان می‌دانند. هرچند این تیمار تأثیر مثبتی در به تأخیر انداختن ظهور علائم بیماری داشت.

با این وجود این روش‌ها همواره به تنهایی برای کنترل موفق بیمارگرها کافی نیستند و باید در تلفیق با روش‌های

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول 4. بازداری از شدت بیماری‌های پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی ریشه نخود توسط کاربرد سالیسیلیک اسید

Table 4. Chickpea wilt and root rot fusarial diseases reduction by application of salicylic acid

Treatment	Wilt disease severity (%)*	Root rot disease severity (%)*
Infected control	50[a]	10.6[a]
SA(200ppm)	30.3[b]	20.3[a]
SA(400ppm)	20[c]	20.3[a]
Cv:16.17	Cv:21.57	

- SA = Salicylic Acid ,Values in columns with different letter indicates significant differences (P < 0.01) according to Duncan's multiple-range test

* Mean of three replicates of disease severity percentage.

جدول 5. بازداری از شدت بیماری‌های پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی ریشه نخود توسط کاربرد کیتوزان

Table. 5. Chickpea wilt and root rot fusarial diseases reduction by application of chitosan

Treatment	Wilt disease severity (%)*	Root rot disease severity (%)*
Infected control	30[a]	20.6[a]
Chitosan(200ppm)	20.3[b]	10.6[a]
Chitosan(400ppm)	10[c]	20[a]
Cv: 18.23	Cv: 24.57	

-Values in columns with different letter indicates significant differences (P < 0.01) according to Duncan's multiple-range test

*Mean of three replicates of disease severity percentage.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

دیگر بوده و نیاز به مطالعات گسترده دارند.

نتایج بررسی فعالیت آنزیم β-۱و۴ – گلوکاناز

نتایج بررسی فعالیت آنزیم β-۱و۴-گلوکاناز در گیاهچه‌های رقم هاشم تیمار شده با SA در جدول ۶ مشاهده می‌شود. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم β-۱و۴-گلوکاناز در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد آلوده و سالم بود. گیاهان تیمار شده با غلظت ۲۰۰ پی پی ام این ماده بیشترین میزان فعالیت آنزیم را نشان دادند.

در جدول ۷ نتایج بررسی فعالیت آنزیم β-۱ و ۴-گلوکاناز در گیاهچه های رقم هاشم تیمار شده با کیتوزان مشاهده می‌شود. طبق نتایج، در همه تیمارها جز شاهد سالم ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافته و پس از کاهش نسبی در ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی، روند افزایشی را تا روز هفتم بعد از مایه‌زنی نشان داد. تیمار ۲۰۰ پی پی ام کیتوزان بیشترین تأثیر را در افزایش میزان فعالیت این آنزیم نسبت به سایر تیمارها ایجاد نمود. تیمار ۴۰۰ پی پی ام کیتوزان نیز باعث افزایش میزان فعالیت این آنزیم گردید اما اختلاف معنی داری با شاهد آلوده ایجاد نکرد.

نتایج بررسی فعالیت آنزیم β-۱و۴-گلوکاناز در گیاهچه‌های رقم ILC482 تیمار شده با کیتوزان در جدول ۸ دیده می‌شود. میزان فعالیت این آنزیم در ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری به بالاترین میزان خود رسید. هر دو غلظت به‌کار رفته کیتوزان تأثیر قابل ملاحظه‌ای در افزایش میزان فعالیت این آنزیم داشتند اما تأثیر غلظت ۴۰۰ پی پی ام به‌طور معنی‌داری بیشتر بود.

نتایج بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز

نتایج بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهچه های رقم هاشم تیمار شده با SA در جدول ۹ مشاهده می‌شود. بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد. نتایج نشان داد بین تیمارهای مختلف سالیسیلیک اسید و شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری از نظر میزان فعالیت آنزیم کیتیناز وجود دارد. بین تیمارهای مختلف سالیسیلیک اسید غلظت ۲۰۰ پی پی ام میزان بیشتری از آنزیم را نشان داد.

در جدول ۱۰ نتایج بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهچه های رقم هاشم تیمار شده با کیتوزان مشاهده می‌شود. به‌طور کلی طرح مشابهی از فعالیت آنزیم کیتیناز در هر دو رقم تحت تیمار کیتوزان مشاهده شد. طبق نتایج به‌دست آمده تفاوت معنی‌داری مابین دو غلظت به‌کار رفته مشاهده نشد هر چند در تیمار ۲۰۰ پی پی ام به‌طور نسبی میزان این آنزیم بیشتر از مقدار آن در گیاهچه‌های تحت تیمار ۴۰۰ پی پی ام کیتوزان بود. در بین روزهای مختلف نمونه برداری نیز روز هفتم پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز را نشان داد.

نتایج بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهچه های رقم ILC482 تیمار شده با کیتوزان در جدول ۱۱ مشاهده می‌شود. مقدار فعالیت کیتیناز در برگ‌های تیمار شده، متناسب با غلظت کیتوزان به‌کار رفته بود. بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز القاء شده، در تیمار ۴۰۰ پی پی ام کیتوزان و پس از آن در تیمار ۲۰۰ پی پی ام کیتوزان مشاهده شد. در طول دوره مورد بررسی میزان فعالیت آنزیم کیتیناز روند افزایشی داشت و در همه تیمارها جز تیمار شاهد سالم، ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول 6. تغییرات فعالیت آنزیم بتا 1 و 4 گلوکاناز در برگهای نخود آلوده به ***Fusarium solani*** و تیمار شده با سالیسیلیک اسید

Table 6. Changes in ß-1,4 glucanase levels in chickpea leaves infested with *Fusarium solani* and treated with salicylic acid

Treatment	Hours after pathogen inoculation			
	0	48	96	168
Healthy control	0.0042^{h}	0.0048^{h}	0.0050^{h}	0.0049^{h}
Infected control	0.0037^{hi}	0.0135^{e}	0.0105^{g}	0.0129^{e}
SA (200ppm)	0.0027^{i}	0.0215^{b}	0.0118^{f}	0.0227^{a}
SA (400ppm)	0.0026^{i}	0.0183^{d}	0.0109^{gf}	0.0197^{c}

Cv:6.32

- SA = Salicylic Acid ,Values in columns with different letter indicates significant differences ($P < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test

***Numbers shows mg glucose min^{-1} mg^{-1}**

جدول 7. تغییرات فعالیت آنزیم بتا 1 و 4 گلوکاناز در برگهای نخود آلوده به ***Fusarium solani*** و تیمار شده با کیتوزان

Table 7. Changes in ß-1,4 glucanase levels in chickpea leaves infested with *Fusarium solani* and treated with chitosan

Treatment	Hours after pathogen inoculation			
	0	48	96	168
Healthy control	0.0034^{d}	0.0041^{cd}	0.0043^{cd}	0.0040^{cd}
Infected control	0.0037^{cd}	0.0052^{c}	0.0049^{cd}	0.0070^{b}
Chitosan (200ppm)	0.0046^{cd}	0.0054^{c}	0.0048^{cd}	0.0100^{a}
Chitosan (400ppm)	0.0038^{cd}	0.0051^{c}	0.0049^{cd}	0.0099^{a}

- ***Numbers shows mg glucose min^{-1} mg^{-1}**
- Values in columns with different letter indicates significant differences ($P < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول 8. تغییرات فعالیت آنزیم بتا 1 و 4 گلوکاناز در برگ‌های نخود آلوده به ***Fusarium oxysporum*** **f. sp.** ***ciceri*** و تیمار شده با کیتوزان

Table 8. Changes in ß-1,4 glucanase levels in chickpea leaves infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and treated with chitosan

Treatment	Hours after pathogen inoculation			
	0	48	96	168
Healthy control	0.0080^{gf}	0.0087^{gf}	0.0098^{gf}	0.0105^{f}
Infected control	0.0072^{g}	0.0171^{abcd}	0.0140^{e}	0.0158^{cde}
Chitosan (200 ppm)	0.0101^{f}	0.0172^{abcd}	0.0155^{de}	0.0162^{bcde}
Chitosan (400 ppm)	0.0094^{gf}	0.0182^{abc}	0.0171^{abcd}	0.0189^{a}

- Cv:10.48
- Values in columns with different letter indicates significant differences ($P < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test

- ***Numbers shows mg glucose min^{-1} mg^{-1}**

جدول 9. تغییرات فعالیت آنزیم کیتیناز در برگهای نخود آلوده به ***Fusarium solani*** و تیمار شده با سالیسیلیک اسید

- **Table. 9. Changes in chitinase levels in chickpea leaves infested with *Fusarium solani* and treated with salicylic acid**

Treatment	Hours after pathogen inoculation			
	0	48	96	168
Healthy control	0.0028^{def}	0.0022^{gf}	0.0018^{gf}	0.0023^{efg}
Infected control	0.0032^{bcde}	0.0043^{a}	0.0019^{gf}	0.0034^{abcd}
SA (200ppm)	0.0030^{def}	0.0041^{ab}	0.0020^{gf}	0.0036^{abcd}
SA (400ppm)	0.0021^{gf}	0.0040^{abc}	0.0019^{gf}	0.0030^{cdef}

- Cv:17.91

- SA = Salicylic Acid ,Values in columns with different letter indicates significant differences ($P < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test

***Numbers shows mg glucose min^{-1} mg^{-1}**

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول 10. تغییرات فعالیت آنزیم کیتیناز در برگهای نخود آلوده به *Fusarium solani* و تیمار شده با کیتوزان

- Table 10. Changes in chitinase levels in chickpea leaves infested with *Fusarium solani* and treated with chitosan

Treatment	Hours after pathogen inoculation			
	0	48	96	168
Healthy control	0.00120^{f}	0.00135^{f}	0.00147^{f}	0.00158^{ef}
Infected control	0.00119^{f}	0.0020^{de}	0.0024^{cd}	0.0026^{bc}
Chitosan (200ppm)	0.00127^{f}	0.0025^{bc}	0.0029^{ab}	0.0032^{a}
Chitosan (400ppm)	0.00122^{f}	0.0023^{cd}	0.0026^{bc}	0.0029^{ab}

- Cv:13.26
- Values in columns with different letter indicates significant differences ($P < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test

جدول 11. تغییرات فعالیت آنزیم کیتیناز در برگ‌های نخود آلوده بـه *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* و تیمـار شـده بـا کیتوزان

- Table 11. Changes in chitinase levels in chickpea leaves infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and treated with chitosan

Treatment	Hours after pathogen inoculation			
	0	48	96	168
Healthy control	0.0014^{f}	0.0017^{f}	0.0019^{f}	0.0016^{f}
Infected control	0.0013^{f}	0.0030^{e}	0.0033^{de}	0.0040^{cd}
Chitosan (200ppm)	0.0018^{f}	0.0032^{de}	0.0037^{de}	0.0047^{bc}
Chitosan (400ppm)	0.0017^{f}	0.0040^{cd}	0.0048^{b}	0.0059^{a}

- Cv:15.52
- Values in columns with different letter indicates significant differences ($P < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test
- ***Numbers shows mg glucose min^{-1} mg^{-1}**

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

بیماری افزایش یافته و به بالاترین میزان فعالیت خود در ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی رسید.

تعیین محتوای ترکیبات فنلی کل

نتایج ارزیابی مقدار ترکیبات فنولی در برگ‌های رقم هاشم تیمار شده با سالیسیلیک اسید در جدول ۱۲ مشاهده می‌شود. ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری در تیمارهای همراه با سالیسیلیک اسید، مقدار ترکیبات فنولی افزایش یافته و به بالاترین میزان خود رسید و پس از آن روند کاهشی در پیش گرفت. اما در شاهد آلوده مقدار ترکیبات فنولی تا ۹۶ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری افزایش یافته و به بالاترین حد خود رسید و پس از آن کاهش یافت. بین غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید تفاوت معنی‌داری از نظر میزان ترکیبات فنولی مشاهده نشد. هم‌چنین میزان این ترکیبات در شاهد آلوده بطور معنی داری بیشتر از میزان آن در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید بود.

در جدول ۱۳ نتایج ارزیابی مقدار ترکیبات فنولی در برگ‌های رقم هاشم تیمار شده با کیتوزان مشاهده می‌شود. بالاترین میزان ترکیبات فنولی در تیمار ۲۰۰ پی پی ام کیتوزان و در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد. میزان این ترکیبات در همه تیمارها جز تیمار شاهد سالم، ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری افزایش یافته و به بالاترین میزان خود رسید و پس از آن روند کاهشی در پیش گرفت. میزان این ترکیبات در گیاهان تیمار شده با کیتوزان بطور معنی‌داری بیشتر از میزان آن در شاهد آلوده بود.

نتایج ارزیابی مقدار ترکیبات فنولی در برگ‌های رقم ILC482 تیمار شده با کیتوزان در جدول ۱۴ مشاهده می‌شود. بالاترین میزان ترکیبات فنولی در تیمار ۴۰۰ پی پی ام کیتوزان و در ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری دیده شد. در این تیمار میزان ترکیبات فنولی از اولین روز دوره مورد بررسی تا روز هفتم پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری روند افزایشی داشت. روند افزایشی در تیمار ۲۰۰ پی پی ام کیتوزان نیز تا روز هفتم مشاهده شد فقط در روز چهارم پس مایه‌زنی کاهش جزئی نشان داد. بالاترین میزان ترکیبات فنولی در شاهد آلوده در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد.

بررسی اثر کاربرد سالیسیلیک اسید بر میزان سالیسیلیک اسید آزاد داخل بافت ساقه و برگ

نتایج بررسی اثر کاربرد غلظت ۴۰۰ پی پی ام سالیسیلیک اسید بر میزان سالیسیلیک اسید آزاد داخل بافت ساقه و برگ رقم ILC482 در شرایط گلخانه با روش HPLC نشان داد بین تیمارها و نیز میان روزهای مختلف نمونه برداری و اثر متقابل آنها در میزان سالیسیلیک اسید آزاد داخل بافت در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی دار وجود دارد (جدول ۱۵). طبق نتایج به‌دست آمده، در روز اول نمونه‌برداری شاهد سالم بالاترین میزان این ماده را نشان داد. اختلاف معنی‌داری بین شاهد سالم و گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید از نظر میزان سالیسیلیک اسید آزاد داخل بافت مشاهده شد. میزان این ماده در شاهد آلوده بیشتر از گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید بود اما این اختلاف معنی‌دار نبود. میزان این ماده در شاهد آلوده و گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید در ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری کاهش معنی‌داری نسبت به روز اول نمونه‌برداری نشان داد. در حالیکه در شاهد سالم میزان این ماده افزایش یافته و به بالاترین حد خود رسید. در روز هفتم پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای همراه قارچ با شاهد سالم مشاهده

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول 12. تغییرات فنل کل در برگ‌های نخود آلوده به *Fusarium solani* و تیمار شده با سالیسیلیک اسید

-Table 12. Changes in total phenol levels in chickpea leaves infested with *Fusarium solani* and treated with salicylic acid

Treatment	Hours after pathogen inoculation			
	0	48	96	168
Healthy control	0.84^{defg}	0.79^{efg}	0.80^{defg}	0.83^{defg}
Infected control	0.93^{bcde}	0.95^{bcd}	1.12^{a}	0.91^{bcdef}
SA (200ppm)	0.71^{g}	0.99^{abc}	0.93^{bcde}	0.87^{cdef}
SA (400ppm)	0.78^{efg}	1.04^{ab}	0.87^{cdef}	0.81^{defg}

- Cv:9.02
- ***Numbers shows mg caffeic acid g^{-1} PFW**
- Values in columns with different letter indicates significant differences ($P < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test

شد. میزان سالیسیلیک اسید آزاد داخل بافت در شاهد آلوده به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید بود. نمونه‌ای از کروماتوگرام حاصل از روش HPLC در شکل ۱ نشان داده شده است.

با آزمایش ها نشان‌دار کردن معلوم شده که سالیسیلیک اسید یک مولکول متحرک در طول SAR بوده و یک سیگنال داخلی درگیر در مکانیزم‌های دفاعی است (Mauch-mani & Metraux 1998). هرچند دمپسی و همکاران (Dempsey *et al*. 1999) معتقدند این مولکول یک سیگنال با پایداری طولانی مدت در SAR نیست. فنیل آلانین آمونیا- لیاز (Phenylalanin ammonia-lyase)(PAL) در سنتز مواد فنولی از طریق مسیر فنیل پروپانوئید مشارکت دارد. PAL آنزیم کلیدی در بیوسنتز واحد فنیل پروپان است. این واحد از اجزای اصلی اسیدهای فنولی (SA)، فلاونوئیدها و لیگنین است (Hahlbrock & Scheel 1989). *راجو* و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند در گیاهچه‌های بذرهای نخود حساس به بیماری زردی تیمار شده با سالیسیلیک اسید، مورد تهاجم قرار گرفتن ریشه‌ها با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* باعث کاهش فعالیت این آنزیم در مقایسه با رقم مقاوم آلوده به این قارچ شده است. رودریگز و همکاران (۲۰۰۷) عامل کاهش (PAL) در گیاهچه‌های برنج تحت تیمار کیتوزان را ناشی از فعالیت خود تنظیمی منفی برخی از محصولات آن مثل سینامیک اسید می‌دانند. از طرف دیگر تجمع سالیسیلیک اسید در گیاه برای آن مضر است و گیاه از تجمع مقادیر مضر آن

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول 13. تغییرات فنل کل در برگهای نخود آلوده به *Fusarium solani* و تیمار شده با کیتوزان

-Table 13. Changes in total phenol levels in chickpea leaves infested with *Fusarium solani* and treated with chitosan

Treatment	Hours after pathogen inoculation			
	0	48	96	168
Healthy control	0.25^{hi}	0.32^{ghi}	0.34^{fghi}	0.31^{ghi}
Infected control	0.23^{i}	0.51^{bcd}	0.40^{defg}	0.37^{efgh}
Chitosan (200ppm)	0.48^{bcde}	0.68^{a}	0.61^{ab}	0.54^{bc}
Chitosan (400ppm)	0.34^{fghi}	0.57^{abc}	0.50^{bcd}	0.45^{cdef}

- Cv:16.25
- ***Numbers shows mg caffeic acid g^{-1} PFW**
- Values in columns with different letter indicates significant differences ($P < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test

جلوگیری می‌کند (Durrant & Dong 2004).

بحث و نتیجه‌گیری کلی

حفاظت از گیاه حاصل تحریک پاسخ‌های مختلف دفاعی است. سیستم یکپارچه دفاعی با تحریک همزمان چندین آنزیم دفاعی توسط الیسیتور به‌کار رفته، آغاز می‌شود. البته طبیعت تحریک و تولید ترکیبات و آنزیم‌های دفاعی جهت مقاومت به بیماری‌ها و آفات گیاهی است اما در مورد نتیجه حاصل از تولید یا افزایش این ترکیبات در میزبان‌های آلوده، نتایج متفاوتی از تحقیقات مختلف به‌دست آمده است (Agrawal *et al.* 2002).

نتایج تحقیق حاضر در توافق با نتایج *راجو* و همکاران (۲۰۰۸) و *جایاراج* و همکاران (۲۰۰۸) و هم‌چنین الگوی نمودار نوسانات میزان فعالیت آنزیم‌های شاخص SAR، در توافق با نتایج *رودریگز* و همکاران (۲۰۰۷) است.

ظهور علائم بیماری پوسیدگی ریشه در گیاهچه‌های رقم هاشم تیمار شده با سالیسیلیک اسید و کیتوزان ، نشانگر این موضوع بود که غلظت‌های به‌کار رفته نتوانستند مکانیسم‌های دفاعی را به حدی که برای توقف آلودگی لازم است، تحریک کنند. احتمالاً شدت بالای تهاجم قارچ *F. solani* و پایین بودن میزان شاخص‌های دفاعی باعث گسترش سریع آلودگی در گیاهچه‌های این رقم شده و احتمالاً گیاه نتوانسته به موقع و به حد کافی

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول 14. تغییرات فنل کل در برگ‌های نخود آلوده به ***Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*** و تیمار شده با کیتوزان

Table 14. Changes in total phenol levels in chickpea leaves infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and treated with chitosan

Treatment	Hours after pathogen inoculation			
	0	48	96	168
Healthy control	0.30^{f}	0.32^{ef}	0.34^{cdef}	0.36^{bcdef}
Infected control	0.33^{def}	0.44^{bc}	0.36^{bcdef}	0.41^{bcde}
Chitosan (200ppm)	0.33^{def}	0.43^{bcd}	0.38^{bcdef}	0.60^{a}
Chitosan (400ppm)	0.37^{bcdef}	0.44^{bc}	0.46^{b}	0.67^{a}

- Cv:13.11
- ***Numbers shows mg caffeic acid g^{-1} PFW**
- Values in columns with different letter indicates significant differences ($P < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test

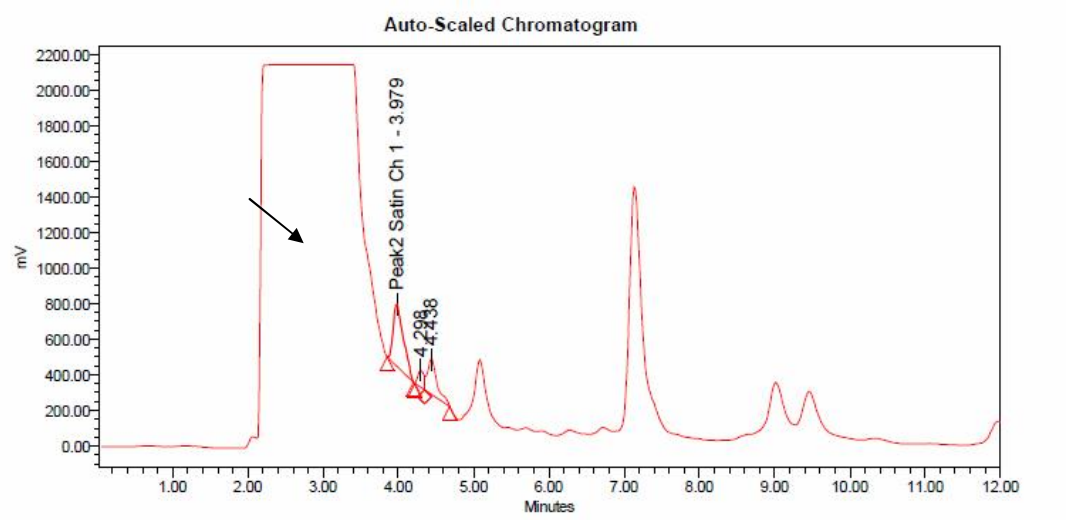
جدول 15. اسید سالیسیلیک آزاد در نخود رقم **ILC482** پس از تیمار با این ماده که توسط **HPLC** اندازه گیری شده است.

Table 15. Free salicylic acid content in chickpea cultivar ILC482 treated by this compound measured by HPLC

Treatment	Free SA (µg g^{-1} DW)	
Hours after pathogen inoculation	0	168
Healthy control	40^{b}	64^{a}
Infected control	38^{bc}	27.5^{d}
SA (400ppm)	36^{c}	21.5^{e}

Cv:5.44

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل 1. گراف HPLC که بیانگر تجمع سالیسیلیک اسید در برگ و ریشه نخود رقم ILC482 ، 168 ساعت پس از پاشیدن این ماده روی برگ‌ها و آلودگی با قارچ است (پیک دوم)

Fig. 1. HPLC chromatogram showing accumulation of salicylic acid detected at 210 nm, in leaves & stem of chickpea ILC482 cultivar treated with 400 ppm SA through foliar spray 168h after pathogen inoculation (peak 2)

واکنش‌های دفاعی را بروز داده و از شدت بیماری بکاهد.

در گیاهچه‌های رقم ILC482 تیمار شده با سالیسیلیک اسید، میزان سالیسیلیک اسید آزاد داخل بافت تا انتهای دوره مورد بررسی کاهش یافت و احتمالاً این مقدار از ماده القاگر جهت توقف آلودگی ناشی از قارچ بیمارگر *F. oxysporum* کافی نبود و در نتیجه علائم بیماری زردی به تدریج ظاهر شد. حساس بودن ارقام به قارچ های بیمارگر مذکور نیز در شدت ظهور علائم بیماری‌ها تأثیر بسزایی داشت. مطابق نتایج به‌دست آمده، بیشترین اثر کیتوزان بر القای مقاومت در رقم ILC482 حساس به بیماری زردی و پژمردگی نخود به‌دست آمد. در هر دو غلظت به‌کار رفته القای مقاومت در برگ‌های نخود مشاهده شد. بالاترین حد القا در برگ‌های تیمار شده با غلظت ۴۰۰ پی پی ام کیتوزان مشاهده شد که نشانگر تأثیر کیتوزان در تحریک پاسخ‌های دفاعی است. اثر ضد قارچی غلظت‌های به‌کار رفته کیتوزان روی قارچ *F. oxysporum* در شرایط آزمایشگاهی مشاهده شد که احتمالا این امر نیز در کنترل قارچ مذکور در شرایط گلخانه مؤثر بوده است. با توجه به فراوانی بالای کیتوزان در طبیعت و غیرسمی بودن آن و هم‌چنین قدرت القای مؤثر واکنش‌های دفاعی علیه قارچ مذکور، کاربرد این ماده با غلظت ۴۰۰ پی پی ام روش مؤثر و قابل توصیه‌ای در کنترل خسارت ناشی از بیماری زردی نخود محسوب می‌گردد.

به نظر می‌رسد متفاوت بودن پاتوسیستم در هریک از آزمایش‌های این تحقیق از نظر رقم مورد استفاده، تفاوت در میزان قدرت تهاجمی بیمارگرها و نوع ماده القاگر باعث تفاوت در میزان مقاومت القاء شده و تفاوت پاسخ های دفاعی در ارقام مورد آزمایش شده است. تنوع بالای پاسخ‌های دفاعی، پیچیدگی و ابهامات دفاع گیاهی از

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

نظـر فیزیولـوژیکی و بیوشـیمیایی باعـث شـده همچنـان بسیاری از زوایای پاسخ‌های دفاعی تاریـک و مـبهم بـاقی بماند. در نتیجه مطالعه و تحقیقات گسترده در ایـن زمینـه باعث رفع ابهامات و در نتیجه بهبود روش‌های مبتنـی بـر کنترل غیرشیمیایی به‌خـصوص در زمینـه القـای مقاومـت خواهد شد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات معاونت پژوهشی دانـشگاه بـوعلی سینا همدان که با تأمین هزینه‌های مالی این تحقیق ما را در انجام آزمایش‌ها یاری نمودند، کمال قدردانی و سپاس بـه عمل می‌آید.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (61-59) متن انگلیسی مراجعـه شود.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com