جنگل و فرآورده‌های چوب، مجلهٔ منابع طبیعی ایران
دورهٔ ۷۵، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۴۰۱
ص ۲۵۵-۲۶۵ (پژوهشی)

دانشکده منابع طبیعی
دانشگاه تهران

DOI: 10.22059/jfwp.2022.335805.1199

تأثیر برخی محرک‌های شیمیایی و عصارهٔ درخت چریش (*Azadirachta indica* Jussieu) در القای مقاومت سیستمیک درختان بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) به عوامل بیماری‌زا

ساسان کمال‌پور[۱]، حمید جلیل مصیر[۱]، پیام فیاض[۲*]، رقیه ذوالفقاری[۲*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد جنگلداری دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یاسوج، یاسوج
۲. دانشیار گروه جنگلداری دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یاسوج، یاسوج

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰

چکیده

مقاومت سیستمیک یکی از راه‌های افزایش مقاومت به آفات و بیماری‌ها در گیاهان است. سازوکارهای دفاعی گیاهان را می‌توان با برخی محرک‌های شیمیایی در برابر تنش‌های محیطی تقویت کرد. بدین منظور در این تحقیق از غلظت‌های مختلف محرک‌هایی مانند اسید سالیسیلیک، فسفیت پتاسیم، عصارهٔ گیاه چریش، دو سویه باکتری محرک رشد و سم آفت‌کش ایمیداکلوپراید استفاده گردید و میزان بازدارندگی آنها در شرایط آزمایشگاهی بر روی دو عامل بیماری‌زای قارچ زغالی بلوط و باکتری *Breneria sp.* در محیط کشت بررسی شد. همچنین تأثیر این محرک‌ها بر درختان بلوط ایرانی با خشکیدگی تاج در شرایط عرصهٔ جنگلی نیز بررسی شد و پس از سه هفته برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی درختان مانند محتوای نسبی آب و نرخ نشت الکترولیت برگ، کلروفیل و عملکرد فتوسیستم اندازه‌گیری شد. نتایج مقایسهٔ میانگین دانکن نشان داد که با افزایش غلظت محرک‌های یادشده، بازدارندگی آنها در برابر قارچ و باکتری بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و کمترین تأثیر بازدارندگی را دو سویه باکتری محرک رشد نشان داد. همچنین درختان تیمارشده با عصارهٔ چریش، فسفیت پتاسیم و ایمیداکلوپراید توانستند آسیب غشای سیتوپلاسمی خود را به‌طور معنی‌داری نسبت به کنترل (آب مقطر) کاهش دهند و همچنین عملکرد بیشینهٔ فتوسیستم در این تیمارها و اسید سالیسیلیک افزایش نشان داد. نتایج بیانگر تأثیرات مثبت همهٔ ترکیبات طبیعی به‌کار رفته در تحقیق برای کنترل خشکیدگی درختان بلوط ایرانی است و می‌توان از آنها برای مبارزه با آفات و بیماری‌ها و به‌جای سموم شیمیایی مانند ایمیداکلوپراید استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اسید سالیسیلیک، باکتری محرک رشد، زوال بلوط، فسفیت پتاسیم، قارچ زغالی بلوط.

مقدمه

امروزه افزایش بحران‌های محیطی، رویشگاه‌های وسیعی از گونه‌های چوبی را در بوم‌سازگان زاگرس محدود کرده است، به‌طوری که حتی درختان بردباری نظیر بلوط نیز دچار زوال (Decline) و خشکیدگی (Dieback) شده‌اند. این پدیده در مراحل ابتدایی سبب ریزش شاخ‌وبرگ، ضعف بنیه و در نهایت مرگ درختان بلوط می‌شود. تشدید بحران‌های محیطی (مانند کمبود بارندگی، خشکسالی، فقر مواد غذایی و ریزگردها)، موجب تهاجم و کلونیزه شدن قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا در آوندها می‌شود [۱]. از جمله عوامل بیماری‌زای شناخته‌شدهٔ مؤثر در خشکیدگی گونه‌های جنس بلوط، قارچ زغالی بلوط

* نویسندگان مسئول، تلفن: ۰۹۳۸۶۸۳۹۳۰۵، و تلفن: ۰۹۱۱۳۳۸۴۰۷۵
Email: pfayyaz@yu.ac.iry; Email: zolfaghari@yu.ac.ir

(*Biscogniauxia mediterranea*) [۲] و باکتری *Brenneria sp.* [۱، ۳] است.

تحقیقات مختلف نشان می دهد که ترکیبات هورمونی مانند اسید سالیسیلیک [٤-٦]، عصارهٔ گیاهانی مانند چریش (*Azadirachta indica* Jussieu) [۷] و نمک‌های محلولی مانند فسفات پتاسیم به‌عنوان مواد القاکنندهٔ مقاومت سیستمیک، با تولید مواد دفاعی فیتوالکسین (Pytoalxsin) بر عوامل بیماری‌زا و آفات مؤثرند و می‌توانند موجب فعال شدن سلسله فرایندهای دفاعی یا مقاومت سیستمیک در گیاهان برای مقابله با آفات و بیماری های مختلف شوند [۸، ۹]. همچنین باکتری‌های محرک رشد PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria) در افزایش مقاومت سیستمیک گیاهان در مقابل بیماری های قارچی، باکتریایی و ویروسی به‌طور مؤثر به‌کار گرفته شده است. این باکتری‌ها به‌طور مستقیم با تحریک رشد گیاه یا به‌طور غیرمستقیم با افزایش دسترسی عناصر غذایی و کنترل زیستی آفات و بیمارگرهای گیاهی از طریق تولید سیدروفورهای کمپلکس‌کنندهٔ آهن، سیانید هیدروژن، تولید هورمون‌های گیاهی مانند اسید اندول استیک، تولید آنتی‌بیوتیک ها و ترکیبات قارچ‌کش، رشد گیاهان را بهبود می‌بخشند و به‌عنوان میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست نیز مورد توجه‌اند [۱۲-۱۰]. استفاده از سموم سیستمیکی مانند ایمیداکلوپراید نیز ممکن است سبب افزایش مقاومت سیستمیک در درختان شود [۱۳]، اما کاربرد این سموم تأثیرات مخرب زیست‌محیطی دارد و ممکن است به مقاومت آفات به سموم بینجامد [١٤]. در مجموع شناسایی به‌موقع بیمارگر و فعال سازی سریع سازوکارهای دفاعی از مشخصات افزایش مقاومت سیستمیک است که از دیگر اثرهای جانبی القاکننده های مقاومت سیستمیک نظیر مسمومیت متمایز است [۱۵]. تاکنون ترکیبات مختلفی برای افزایش مقاومت سیستمیک درختان بلوط در کشورهای دیگر استفاده شده است. برای مثال از فسفونات‌ها به‌طور مؤثر برای کنترل زوال بلوط جنگل‌های اسپانیا (*Quercus suber* و *Q.ilex*) استفاده شده است [١٦]؛ اما در برخی موارد پاشیدن فسفونات‌ها روی برگ بلوط موجب بروز علائم مسمومیت گیاهی می شود، درحالی که پاشیدن روی پوست تنه یا تزریق در تنه، گذشته از اینکه هیچ‌گونه اثر مسمومیتی نشان نداد، موجب کنترل مؤثر زوال بلوط (*Q. agrifolia*) در جنگل های کالیفرنیای آمریکا شد [۱۷]. در تحقیق دیگری از اسید سالیسیلیک و فسفیت پتاسیم برای کنترل عامل بیماری‌زای سفیدک سطحی (*Microsphaera alphitoides*) در گونهٔ بلوط انگلیسی (*Q. robur*) استفاده شد و مشخص شد که این دو مادهٔ شیمیایی تأثیر طولانی‌مدت چندانی در مقاومت این گونه به این عامل بیماری زا نداشتند [۱۸]. Domenech و همکاران [۱۱] نیز در تحقیق خود با عنوان تأثیر تلقیح باکتری های محرک رشد جنس *Bacillus licheniformis* و قارچ میکوریز *Pisolithus tinctorius* بر کنترل بیماری قارچی گونهٔ بلوط همیشه‌سبز (*Q. ilex*) بیان کردند که سویهٔ باکتری محرک رشد افزون‌بر بهبود رشد نهال‌ها، مانع رشد قارچ های بیماری‌زا در این گونه می شود. پژوهش Kurth و همکاران [۱۰] نیز نشان داد که سویهٔ باکتری محرک رشد *Streptomyces sp.* می تواند در کنترل بیماری قارچ زغالی بلوط در گونهٔ *Q. robur* به‌دلیل افزایش مقاومت سیستمیک مؤثر باشد. از طرف دیگر برخی محققان دربارهٔ استفاده از چریش به‌دلیل وجود مادهٔ آزادراختین که نوعی حشره‌کش طبیعی است و سبب افزایش مقاومت سیستمیک در برابر آفات و بیماری ها می‌شود [۱۹] و اثرهای مثبت آن در کنترل آفات در گونه های جنگلی مانند گونهٔ توس (*Betula papyrifera*) [۱۹] و دو گونه بلوط (*Q. robur* و *Q. rubra*) گزارش داده‌اند؛ به‌طوری‌که با افزایش غلظت از ۰/۳ درصد به ۰/۵ و ۱ درصد در محیط آزمایشگاهی، مرگ ومیر لارو حشرات افزایش یافت [۲۰]. تاکنون پژوهشی در زمینهٔ افزایش مقاومت سیستمیک برای کنترل خشکیدگی درختان بلوط ایرانی با استفاده از این

ترکیبات گزارش نشده است و با توجه به اینکه می توان تغییرات درخت در اثر استفاده از این ترکیبات را در سطح فیزیولوژیکی با اندازه گیری پارامترهایی مانند کلروفیل و عملکرد فتوسیستم بررسی کرد [۲۱، ۲۲]، در این پژوهش تأثیر برخی مواد شامل محلول فسفیت پتاسیم، اسید سالیسیلیک، عصارهٔ گیاه چریش، سم ایمیداکلوپراید و باکتری های PGPR بر عوامل بیماری زای بلوط ایرانی در شرایط آزمایشگاهی برون‌تنی (محیط کشت) و میدانی (درختان بلوط ایرانی دارای علائم خشکیدگی واقع در تودهٔ جنگلی) ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی تیمارهای مختلف

برای تهیهٔ عصارهٔ آبی درخت چریش از برگ آن استفاده شد. برگ‌ها از درختان چریش کاشته‌شده در محوطهٔ دانشگاه یاسوج و در فصل بهار جمع آوری شد. برگ‌ها ابتدا خشک و سپس آسیاب شدند. عصارهٔ ۱۰ درصد وزنی حجمی (۱۰ گرم برگ درخت در ۱۰۰cc آب مقطر) تهیه شد که پس از خیساندن به‌مدت ۲٤ ساعت با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و عصارهٔ آبی تهیه شد. عصارهٔ حاصل (۱۰ درصد وزنی حجمی) به‌عنوان محلول پایه در نظر گرفته شد و با رقیق کردن محلول پایه غلظت‌های ۵ و ۲/۵ درصد وزنی حجمی به دست آمد [۷]. محلول فسفیت پتاسیم نیز از غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد [۸]. از غلظت ۲، ٤ و ۸ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک برای آزمایش در محیط کشت و از غلظت ۲ میلی‌مولار برای تزریق درختان بلوط ایرانی در عرصه استفاده شد. غلظت محلول ایمیداکلوپراید تجاری ۳۵ درصد بود که با رقیق‌سازی غلظت‌های ۱۷/۵ و ۸/۷۵ درصد تهیه و برای محیط کشت استفاده شد، اما در عرصه و برای درختان بلوط ایرانی از غلظت ۱۰ درصد استفاده شد [۱۳].

تیمار دیگر باکتری محرک رشد بود که برای کشت دو سویه باکتری محرک رشد از محیط کشت جامد پایهٔ پیکوواسکای استفاده شد. بدین منظور دو سویه باکتری محرک رشد *Streptomyces sp.* و *Microbacterium sp.* تهیه شد که در پژوهش‌های قبل اثرهای مثبت آنها بر رشد نهال های بلوط ایرانی ثابت شده بود [۱۲]. پس از کشت در محیط جامد، باکتری های محرک رشد به محیط کشت مایع منتقل شدند. سپس از باکتری با رقت 10^7 cfu/ml برای آزمایش‌های بعدی (آزمایش‌های در محیط کشت و تزریق درخت در شرایط میدانی) استفاده شد.

کشت عوامل بیماری‌زای بلوط برای آزمایش‌های در محیط کشت یا برون‌تنی (in vitro)

برای تعیین اثر تیمارهای مختلف در محیط آزمایشگاهی، ابتدا باکتری و قارچ بیماری‌زای بلوط ایرانی در پتری‌دیش کشت داده شدند. باکتری بیماری‌زای *Breneria sp.* از باکتری جداسازی و خالص‌شده در تحقیق قبلی (جنگل های بلوط ایرانی واقع در منطقهٔ خائیز در استان کهگیلویه و بویراحمد) که بیماری‌زایی آن نیز ثابت شده بود به‌دست آمد [۱]. برای این کار ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری بیماری زا با رقت 10^7 cfu/ml در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. قارچ بیماری‌زای زغالی بلوط (*Biscogniauxia mediterranea*) نیز در پتری‌دیش حاوی محیط کشت سیب‌زمینی/ دکستروز/ آگار (PDA) کشت شد [۲].

بررسی میزان بازدارندگی تیمارهای مختلف در برابر عوامل بیماری‌زا

برای بررسی تأثیر دو سویه باکتری محرک رشد بر باکتری بیماری‌زا، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از دو سویه باکتری محرک رشد (*Streptomyces sp.* و *Microbacterium sp.*) سوسپانسیونی با غلظت 10^7 CFU/mL تهیه و در پلیت های حاوی مولر هینتون آگار به‌صورت جداگانه کشت سفره‌ای شد. پس از ۱۵ دقیقه که باکتری محرک رشد جذب محیط

شد، یک کلنی از باکتری بیماری‌زا به‌وسیلهٔ لوپ استریل برداشته و در مرکز پلیت به‌صورت دایره‌ای به قطر ۲ میلی‌متر کشت شد و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ٤٨ ساعت قرار گرفت. پس از دو روز قطر هالهٔ اطراف باکتری بیماری‌زا با کولیس اندازه‌گیری شد.

همچنین از باکتری بیماری‌زای کشت داده‌شده در محیط کشت NA برای تأثیر دیگر تیمارها یا مواد بازدارنده استفاده شد، به‌نحوی که پس از خشک شدن سطح پتری‌ها و جذب باکتری به محیط کشت، چاهک‌هایی در گوشهٔ پلیت با ته پیپت پاستور ایجاد شد و ۵۰ میکرولیتر از هر یک از مواد بازدارندهٔ رشد (سم ایمیداکلوپراید، اسید سالیسیلیک و عصارهٔ برگی چریش) استریل‌شده با غلظت های مختلف در چاهک ها ریخته و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد به‌مدت ٤٨ ساعت قرار داده شد. سپس قطر هاله ها با کولیس اندازه گیری شد. برای هر تیمار و هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد و در تیمار شاهد نیز از آب مقطر استریل استفاده شد.

از مواد بازدارنده یادشده برای تعیین اثرشان بر درصد بازدارندگی رشد میسیلیوم قارچ زغالی بلوط نیز استفاده شد. کشت هفت‌روزهٔ قارچ زغالی بلوط روی محیط کشت PDA برای این آزمایش به‌کار گرفته شد.

درصد بازدارندگی هر یک از تیمارها (شامل عصارهٔ درخت چریش، سم ایمیداکلوپراید و اسید سالیسیلیک با غلظت های مختلف و همچنین دو سویه باکتری محرک رشد) با استفاده از رابطهٔ ۱ محاسبه شد [۷].

$$I = \left((C-T)/C\right)\times 100 \qquad (۱)$$

C قطر کلنی عامل بیماری‌زا در شاهد (استفاده از آب مقطر) و T قطر کلنی با استفاده از هر یک از تیمارهاست.

آزمایش‌ها روی درختان بلوط ایرانی در عرصهٔ جنگلی

جنگل‌های بلوط ایرانی در منطقهٔ ده‌برآفتاب (عرض جغرافیایی "۳۹ '۰۵ °۳٤ و طول جغرافیایی "۲٤ '۵۵ °۵٤) واقع در شهرستان بویراحمد از استان کهگیلویه و بویراحمد در ۱۵ کیلومتری شمال غربی یاسوج برای این تحقیق انتخاب شد.

درختان دارای علائم وجود عامل بیماری‌زا (وجود شیرابه در تنهٔ درخت) یا درجاتی از خشکیدگی تاج به فاصلهٔ ۱۰۰ متر از یکدیگر مشخص شدند و به‌ازای هر تیمار ذکرشده در بالا (فسفیت پتاسیم، عصارهٔ درخت چریش، سم ایمیداکلوپراید، اسید سالیسیلیک، دوسویه از باکتری محرک رشد و آب مقطر به‌عنوان کنترل)، ده درخت بلوط ایرانی تک‌پایه با قطر متوسط ۳۰ سانتی‌متر انتخاب شد. سپس با استفاده از میخ ٤ سانتی متری، به‌ازای هر ۲۵ سانتی متر محیط درخت در ارتفاع برابرسینه یک سوراخ در درخت ایجاد و ۰/۲ میلی لیتر از هر یک از تیمارهای آماده شده به ازای هر سانتی متر محیط درخت به آنها تزریق شد [۸، ۱٦، ۱۷]. بعد از تزریق، محل سوراخ به‌منظور جلوگیری از حمله آفات و بیماری‌ها با چسب مخصوص باغبانی مسدود شد. زمان تزریق این مواد در خردادماه قبل از تنش خشکی تابستانه و مصادف با حداکثر رویش درختان برای اثرگذاری بیشتر انتخاب شد. پس از گذشت سه هفته، از هر درخت هشت برگ از قسمت جنوبی تاج آن برداشت و در دمای کم به آزمایشگاه منتقل شدند و سپس ویژگی‌های فیزیولوژیکی درختان اندازه‌گیری شد.

اندازه گیری ویژگی های فیزیولوژیک درختان بلوط ایرانی

محتوای نسبی آب (RWC) برگ درختان برحسب درصد و میزان نشت الکترولیت برگ (EL) به‌عنوان شاخص آسیب غشای سیتوپلاسمی با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج (EC متر مدل Inolab، آلمان) اندازه‌گیری شد [۱۲]. محتوای کلروفیل برگ درختان نیز توسط کلروفیل‌متر دستی (SPAD-502) برحسب اسپاد اندازه‌گیری شد.

متغیرهای فلورسانس کلروفیل برگ درختان توسط

دستگاه فلورومتر (Optic-Sciences، ایالات متحدهٔ آمریکا) اندازه‌گیری شد. متغیرها شامل عملکرد بهینهٔ فتوسیستم II (Fv/Fm) و عملکرد بیشینهٔ فتوسیستم سازگارشده در تاریکی (ΦPSII) بودند [۲۱].

آنالیزهای آماری

به‌منظور بررسی اثر تیمارهای مختلف بر میزان بازدارندگی عوامل بیماری‌زا در محیط آزمایشگاهی و نیز بر ویژگی های فیزیولوژیکی درختان بلوط ایرانی در شرایط عرصه، از آنالیز واریانس یکطرفه در نرم‌افزار SPSS استفاده شد. در آزمایش اول، اثر نه تیمار بر درصد بازدارندگی رشد باکتری بیماری‌زا و اثر یازده تیمار بر درصد بازدارندگی رشد قارچ بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی محیط کشت با سه تکرار بررسی شد. در آزمایش دوم اثر تزریق هفت تیمار بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی درختان بلوط ایرانی با ده تکرار بررسی شد. پیش از تجزیه‌وتحلیل واریانس مفروضات اولیه شامل کنترل داده‌های پرت، بررسی همگنی واریانس‌ها و نرمال بودن توزیع فراوانی داده ها به کمک باکس پلات و آزمون های لون و کولموگروف- اسمیرنوف انجام گرفت. برای مقایسهٔ میانگین درصد بازدارندگی بین تیمارهای مختلف در شرایط آزمایشگاهی از آزمون دانکن و نیز مقایسهٔ تیمارهای به‌کاررفته برای درختان بلوط ایرانی نسبت به کنترل (تیمار آب مقطر) از آزمون LSD در سطح احتمال خطای ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

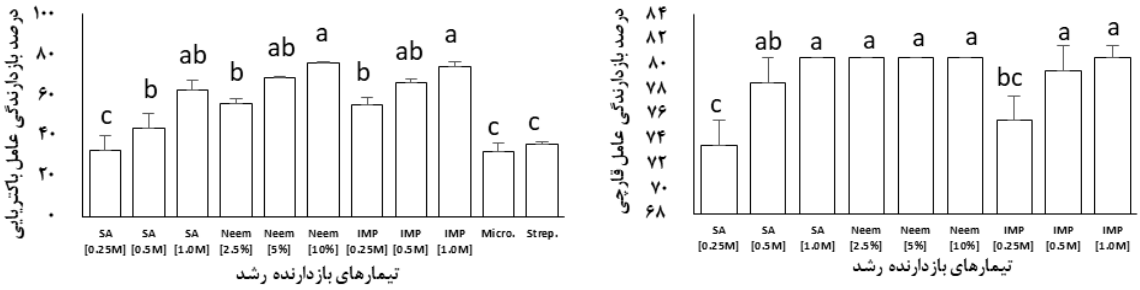
نتایج تجزیهٔ واریانس یکطرفه نشان داد که تیمارهای استفاده‌شده در آزمایش محیط کشت، اثرهای متفاوتی بر میزان بازدارندگی رشد عامل بیماری زای قارچی و باکتریایی (در سطح احتمال خطای ۵ درصد) دارند (جدول ۱). نتایج مقایسهٔ میانگین درصد بازدارندگی عامل بیماری‌زای باکتریایی *Brenereia sp.* و قارچی (قارچ زغالی بلوط) نشان داد که بین غلظت‌های تیمارهای استفاده‌شده نیز تفاوت معنی‌داری وجود دارد، به‌طوری که با افزایش غلظت تیمارهای اسید سالیسیلیک، ایمیداکلروپراید و چریش (تنها برای بازدارندگی باکتریایی)، درصد بازدارندگی از رشد باکتری و قارچ بیماری‌زای در محیط پتری‌دیش زیاد شد. همچنین از بین تیمارهای موجود، تیمار عصارهٔ گیاه چریش به‌همراه سم آفت‌کش تجاری ایمیداکلوپراید با غلظت زیاد دارای بیشترین درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری‌زای باکتریایی بودند (حدود ۷۵ درصد) و کمترین درصد بازدارندگی نیز مربوط به دو سویه باکتری محرک رشد و اسید سالیسیلیک با غلظت کم ۰/۲۵ بود (حدود ۳۵ درصد). از طرف دیگر بازدارندگی از رشد عامل بیماری‌زای قارچی در همهٔ تیمارها به‌جز تیمار اسید سالیسیلیک و ایمیداکلوپراید با غلظت کم (به‌ترتیب ۲ میلی مولار و ۸/۷۵ درصد)، مشابه بود و همهٔ آنها دارای حداکثر بازدارندگی از رشد بودند (حدود ۸۰ درصد) (شکل ۱).

نتایج آزمایشگاهی در محیط کشت (برون تنی) نشان داد که همهٔ تیمارها اثرهای مثبت بر بازدارندگی رشد قارچ زغالی بلوط و باکتری بیماری‌زای *Breneria sp.* داشتند و استفاده از این تیمارها مانع رشد عامل بیماری‌زا شد. ارزیابی میزان بازدارندگی ترکیبات مختلف نشان داد که عصارهٔ گیاه چریش دارای بیشترین تأثیر علیه فعالیت هر دو عامل بیماری‌زای باکتریایی و قارچی بود و عملکرد آن با سم ایمیداکلوپراید در غلظت زیاد یکسان بود. در تحقیقات دیگر دربارهٔ اثر ضدقارچی و باکتریایی عصارهٔ چریش نیز افزودن عصارهٔ این گیاه به محیط کشت موجب کاهش قطر هاله [٦] و کاهش تعداد لارو حشرات دو گونه بلوط اروپا در محیط آزمایشگاهی شد [۱۸]. پس از عصارهٔ چریش، اسید سالیسیلیک به‌ویژه در غلظت زیاد دارای اثر بازدارندگی خوب بر فعالیت هر دو عامل بیماری زا بود (حدود ۸۰ درصد) که با نتایج تحقیقات دیگر مطابقت داشت. این یافته حاکی از اثربخشی اسید

سالیسیلیک در القای مقاومت علیه عوامل بیماری زا در غلظت‌های زیاد بود، به‌طوری که مقادیر بیشتر از ۲ میلی مولار اسید سالیسیلیک مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا را افزایش می‌دهد [٦]. در این تحقیق از باکتری محرک رشد تنها برای بررسی بازدارندگی عامل بیماری‌زای باکتریایی استفاده شد که هرچند دارای کمترین درصد بازدارندگی بود، توانست حدود ۳۰ درصد از فعالیت باکتری بیماری‌زا در محیط کشت جلوگیری کند. در واقع اثرهای آنتاگونیستی این باکتری‌ها می‌تواند ناشی از تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک و سیانید هیدروژن باشد که در سویه‌های باکتری مثل *Streptomyces sp.* و *Bacillus licheniformis* نیز گزارش شده است [۱۰،۱۱].

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس اثر تیمارهای مختلف بر درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری‌زای باکتریایی و قارچی

فاکتورها	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	خطا	F	معنی‌داری
عامل بیماری‌زای باکتریایی	۱۰	۷۱۶/۳۱	۱۴۶۰/۳۷	۱۰/۷۹	۰/۰۰**
عامل بیماری‌زای قارچی	۸	۲۳	۸۸/۴۹	۴/۶۷	۰/۰۳**



شکل ۱. مقایسهٔ میانگین (± اشتباه معیار) تیمارهای مختلف بر درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری‌زای باکتریایی و قارچی

حروف متفاوت در هر شکل نشان دهندهٔ اختلاف معنی‌دار آماری در سطح خطای احتمال ۵ درصد است.

SA: اسید سالیسیلیک، Neem: عصارهٔ چریش، IMP: ایمیداکلوپراید، .Micro: سویهٔ باکتری محرک رشد *Microbacterium sp.*، .Strep: سویهٔ باکتری محرک رشد *Streptomyces sp.*

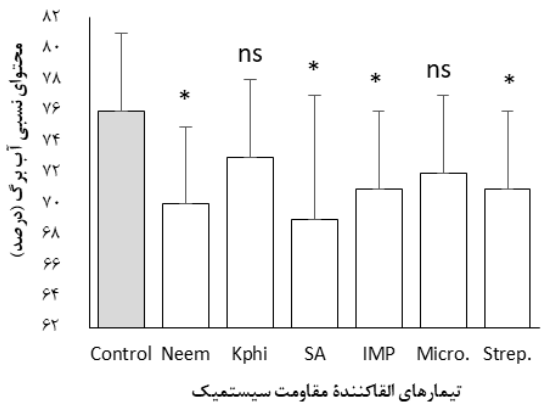
بررسی آنالیز واریانس تأثیر تیمارهای مختلف اعمال‌شده بر پارامترهای فیزیولوژیک اندازه‌گیری‌شدهٔ درختان بلوط ایرانی نیز نشان داد که اثر تیمارها بر همهٔ پارامترها به‌جز کلروفیل و عملکرد بهینهٔ فتوسیستم (Fv/Fm) معنی‌دار است (جدول ۲). نتایج مقایسهٔ میانگین محتوای نسبی آب برگ نشان داد که محتوای نسبی آب برگ درختان تیمارشده با عصارهٔ چریش، اسید سالیسیلیک، سم ایمیداکلوپراید و سویهٔ باکتری *Streptomyces sp.* نسبت به درختان شاهد (تزریق‌شده با آب) کاهش معنی داری داشت (شکل ۲). نتایج مقایسهٔ میانگین نرخ نشت برگ درختان نیز نشان داد که تیمارهای عصارهٔ چریش، فسفیت پتاسیم و سم ایمیداکلوپراید اثر مطلوبی داشتند و نرخ نشت الکترولیت در آنها نسبت به کنترل کاهش معنی دار داشت؛ اما در درختان تلقیح شده با سویهٔ باکتری *Streptomyces sp.* نرخ نشت نسبت به شاهد افزایش معنی دار نشان داد (شکل ۲). نتایج عملکرد بیشینهٔ فتوسیستم نشان داد که این صفت در همهٔ تیمارهای اعمال‌شده به‌جز درختان تلقیح‌شده با باکتری‌های محرک رشد افزایش معنی‌دار نسبت به کنترل داشت.

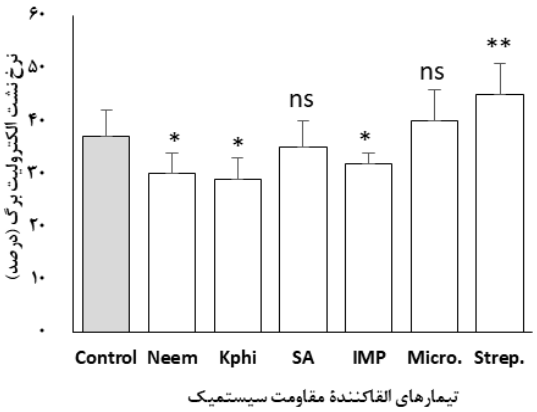
اثر تیمارهای به کاررفته در این تحقیق بر درختان بلوط ایرانی دارای علائم بیماری‌زایی روی تنه و تاج با پژوهش های آزمایشگاهی همخوانی داشت، به‌طوری که استفاده از همهٔ ترکیبات شیمیایی و گیاهی به‌جز اسید سالیسیلیک موجب کاهش نرخ نشت الکترولیت برگ

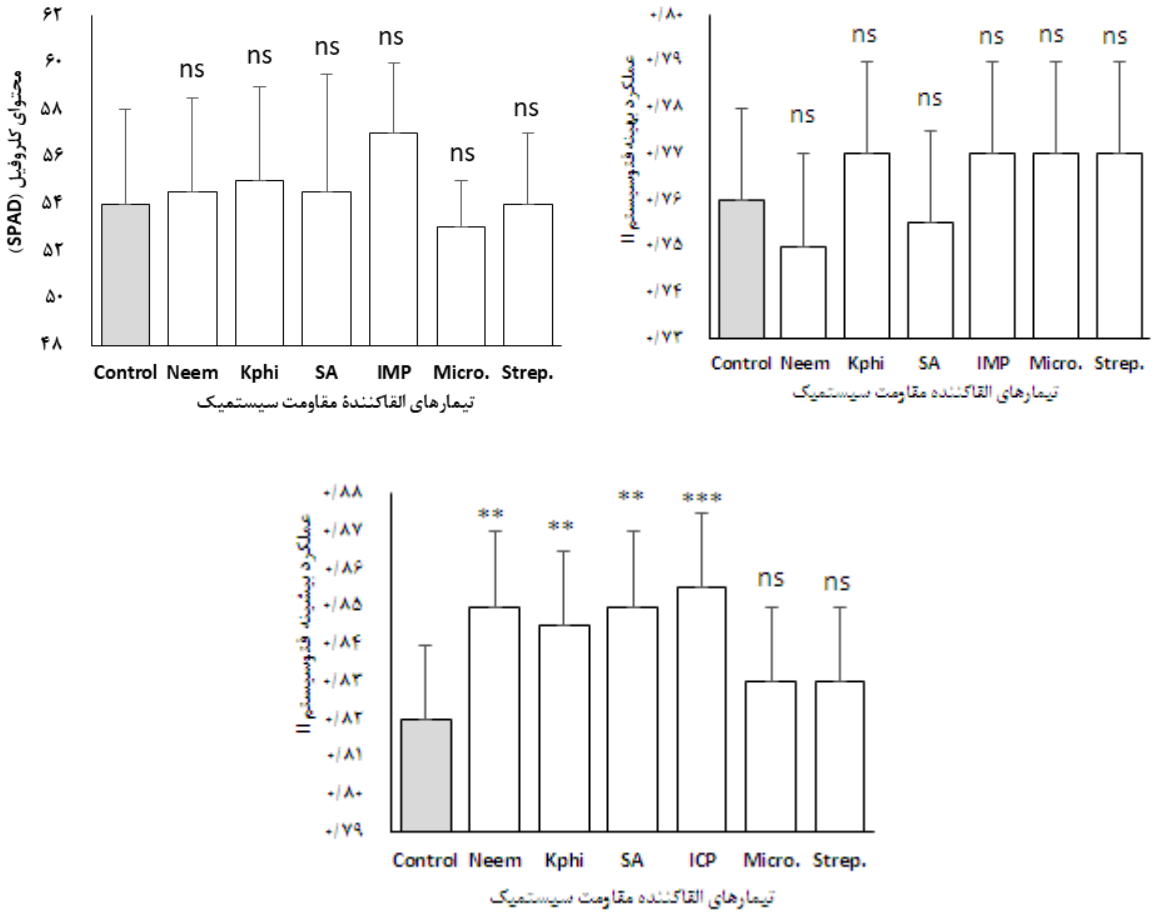
درختان بلوط ایرانی نسبت به کنترل شدند. افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی مانند عوامل بیماری‌زا از طریق افزایش توانایی دفاع با فرایندهای فیزیولوژیکی همراه است و از طریق اندازه‌گیری نرخ نشت الکترولیت که نشان‌دهندهٔ آسیب غشای سیتوپلاسمی است، می‌توان به فعال بودن سیستم‌های دفاعی که با افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همراه است پی برد [۱۲]. کاهش نیافتن نرخ نشت الکترولیت در درختان بلوط ایرانی تیمارشده با اسید سالیسیلیک ممکن است به این دلیل باشد که تجمع اسید سالیسیلیک موجب کم شدن فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو مانند کاتالاز و پراکسیداز می‌شود و در نتیجه افزایش محتوای پراکسید هیدروژن به‌منزلهٔ سیگنال عمل می‌کند و موجب افزایش مقاومت سیستمیک گیاهان به عوامل بیماری‌زا می‌شود [۵، ۱۷]. بنابراین با وجود کاهش نیافتن نرخ نشت الکترولیت در تیمار اسید سالیسیلیک، عملکرد فتوسیستم آنها در تاریکی بهبود یافت که با یافته‌های Kurth و همکاران [۱۰] مطابقت دارد. عوامل تنش‌زا مانند عوامل بیماری‌زا با تخریب غشای سیتوپلاسمی سبب اختلال در زنجیرهٔ انتقال الکترون و در نتیجه عملکرد فتوسیستم می‌شوند [۲۱]، اما محرک‌های شیمیایی مانند اسید سالیسیلیک، فسفیت پتاسیم و چریش با القای مقاومت سیستمیک موجب افزایش تعداد کلروپلاست در سلول، تعداد سلول در برگ و در نهایت بهبود عملکرد فتوسیستم می‌شوند [۲۲]. بنابراین اگرچه محتوای کلروفیل افزایش معنی دار نداشت، عملکرد بیشینهٔ فتوسیستم افزایش یافت و تحقیقات دیگر هم افزایش عملکرد فتوسیستم را در گیاهان تیمارشده با برخی مواد مانند فسفیت پتاسیم [۲۱] گزارش کردند.

جدول ۲. تجزیهٔ واریانس اثر تیمارهای مختلف بر پارامترهای فیزیولوژیک درختان بلوط ایرانی در عرصه

پارامترهای اندازه‌گیری‌شده	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	F	معنی‌داری
محتوای نسبی آب برگ (٪)	۷	۲۱۰/۳۹۹	۲۴۰/۳	۰/۰۰۵**
نرخ نشت الکترولیت (٪)	۷	۳۳۷/۵۲۵	۷/۲۳	۰/۰۰۰**
کلروفیل	۷	۹۱/۵۸۵	۰/۷۹۷	۰/۵۹۵
عملکرد بهینهٔ فتوسیستم	۷	۰/۰۰۸	۱/۴۶۹	۰/۱۹۳
عملکرد بیشینهٔ فتوسیستم	۷	۰/۰۰۷	۳/۷۴۴	۰/۰۰۲**







شکل ۲. مقایسهٔ میانگین (± اشتباه معیار) تیمارهای مختلف با کنترل (آب مقطر) برای پارامترهای مختلف فیزیولوژیک درختان بلوط ایرانی (ns : نبود اختلاف معنی‌دار آماری، *:اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵ درصد؛ **: اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۱ درصد، Water: آب مقطر (کنترل)، Neem: عصارهٔ چریش، Kphi: فسفیت پتاسیم، SA: اسید سالیسیلیک، IMP: ایمیداکلوپراید، .Micro: سویهٔ باکتری محرک رشد .Microbacterium sp.، Strep.: سویهٔ باکتری محرک رشد .Streptomyces sp)

نتیجه‌گیری

ترکیبات گیاهی و طبیعی افزون‌بر بی‌خطر بودن از نظر زیست‌محیطی، با ایجاد مقاومت سیستمیک و فعال کردن سازوکارهای دفاعی در گیاهان می توانند برای مبارزه با آفات و عوامل بیماری زای قارچی و باکتریایی مؤثر باشند. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که تیمارهای عصارهٔ گیاه چریش، فسفیت پتاسیم و اسید سالیسیلیک اثرهای مثبتی بر بهبود فرایندهای فیزیولوژیک (مانند کاهش نرخ نشت الکترولیت و افزایش عملکرد بیشینهٔ فتوسیستم II) درختان آسیب‌دیدهٔ بلوط ایرانی داشتند و می‌توان از این ترکیبات برای کنترل خشکیدگی درختان بلوط ایرانی در زاگرس به‌جای سمومی مانند ایمیداکلوپراید استفاده کرد. البته باید پژوهش‌های دیگری برای پایش میزان مقاومت سیستمیک درختان در مدت زمان بیشتر یا استفاده از چند محرک شیمیایی مؤثر به‌طور همزمان اجرا شود تا بتوان از نتایج آنها برای مبارزه با خشکیدگی درختان جنگلی مانند بلوط ایرانی استفاده کرد.

References

[1]. Zolfaghari, R., Karimi, Z., Dalvand, F., Abdollahi, M., and Fayyaz, P. (2018). Interactive effect of water deficit and bacterial pathogen *Brenneria quercinia* pathogen on leaf and stomata morphology in offspring of healthy and declined trees of *Quercus brantii* Lindl. Journal of Wood and Forest Science and Technology, 25(1): 133-148.

[2]. Mir Abolfathi, M. (2013). Outbreak of charcoal disease on *Quercus spp* and *Zelkova carpinifolia* trees in forests of Zagros and Alborz mountains in Iran. Iranian journal of plant pathology, 49(2): 257-263.

[3]. Moradi-Amirabad, Y., Rahimian, H., Babaeizad, V., and Denman, S. (2019). *Brenneria spp.* and *Rahnella victoriana* associated with acute oak decline symptoms on oak and hornbeam in Iran. Forest Pathology, 49, e12535.

[4]. Buonaurio, R., Iriti, M., and Romanazzi, G. (2009). Induced resistance to plant diseases caused by Oomycetes and Fungi. Petria, 19: 130-148.

[5]. Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D.F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science, 262: 1883–1886.

[6]. Koo, Y.M., Heo, A.Y., and Choi, H.W. (2020). Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. Plant Patholology Journal, 36(1): 1-10.

[7]. Tahir, H.A.S., Sahi, Sh.T. Habib, A., Haq, I.U., Ahmad, A., and Ashraf, W. (2016). Evaluation of plant extracts as biocontrol agents against *Xanthomonas axonopodis* pv. citri the cause of citrus canker. Pakistan Journal of Phytopathology, 28(1): 35-43.

[8]. Shearer, B.L., Fairman, R.G., and Grant, M. J. (2006). Effective concentration of phosphite in controlling *Phytophthora cinnamomi* following stem injection of *Banksia* species and *Eucalyptus marginata*. Forest Pathology, 36(2): 119-135.

[9]. Eshraghi, L.E., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., McComb, J., Hardy, G. S., and O'Brien, P.A. (2011). Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology, 60(6): 1086-1095.

[10]. Kurth, F., Mailänder, S., Bönn, M., Feldhahn, L., Herrmann, S., Große, I., Buscot, F., Schrey, S.D., and Tarkka, M.T. (2014). Streptomyces-induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defense, photosynthesis, and secondary metabolism pathways. Molecular Plant-Microbe Interactions, 27(9): 891-900.

[11]. Domenech, J., Ramos-Solano, B., and Probanza, A. (2003). (*Bacillus spp.*) and *Pisolithus tinctorius* effects on (*Quercus ilex* ssp). ballota: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. Forest Ecology and Management, 194: 293-303.

[12]. Zolfaghari, R., Rezaei, K., Fayyaz, P., Naghiha, R., and Namvar, Z. (2021). The effect of indigenous phosphate-solubilizing bacteria on *Quercus brantii* seedlings under water stress. Journal of Sustainable Forestry, 40(7): 733-747.

[13]. Harrell, M. (2006). Imidacloprid concentrations in green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) following treatments with two trunk-injection methods. Arboriculture and Urban Forestry, 32(3): 126.

[14]. Gerami, Sh., Heidari, A., Talebi Jahrom, K., Ashori, A., and Rasoulian, Gh. (1386). Sublethal effects of imidacloprid on the life-table parameters of *Aphis gossypii* (Hom: Aphididae). Iranian Research Institute of Plant Protection, 75(1): 67-80.

[15]. Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi goltapeh, E., Safaei, N., Safaie, N., and Razavi, K. (2016). Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by Mycosphaerella graminicola, Iranian Journal of Plant Biology, 8(30): 43-55.

[16]. Fernandez-Escobar, R., Gallego, F.J., Benlloch, M., Membrillo, J., Infante, J., and De Algaba, A.P. (1999). Treatment of oak decline using pressurized injection capsules of antifungal materials. European Journal of Forest Pathology, 29(1): 29-38.

[17]. Garbelotto, M., Schmidt, D.J., and Harnik, T.Y. (2007). Phosphite injections and bark application of phosphite+ Pentrabark™ control sudden oak death in coast live oak. Arboriculture and Urban Forestry, 33(5): 309-317.

[18]. Percival, G.C., and Haynes, I. (2008). The influence of systemic inducing resistance chemicals for the control of oak powdery mildew (*Microsphaera alphitoides*) applied as a therapeutic treatment. Urban Forest, 34: 271-279.

[19]. Marion, D.F., Larew, H.G., Knodel, J.J., and Natoli, W. (1990). Systemic activity of neem extract against the birch leafminer. Journal of Arboriculture, 16: 12-16.

[20]. Breuer, M., and Loof, A.D. (1998). Meliaceous plant preparations as potential insecticides for control of the oak processionary, *Thaumetopoea processionea* (L.)(Lepidoptera: Thaumetopoeidae). 50th international symposium on crop protection, Gent, Belgium, 5 May.

[21]. Ramezani, M., Karimi Abdolmaleki, M., Shabani, S., and Dehestani, A. (2017). The role of potassium phosphite in chlorophyll fluorescence and photosynthetic parameters of downy mildew-challenged cucumber *Cucumis sativus* plants. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 50(17-18): 927-940.

[22]. Possingham, J.V. (1980). Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. Annual Review of Plant Physiology, 31: 113–129.

The effect of some chemical elicitors and neem tree (*Azadirachta indica* Jussieu) extract application on systemic induce resistance of oak trees (*Quercus brantii* Lindl.) to pathogens

S. Kamalpour; MSc. Student of Forestry, Faculty of Agricultural and Natural resources, Yasouj University, I. R. Iran

H. Jalil Masir; MSc. Student of Forestry, Faculty of Agricultural and Natural resources, Yasouj University, I. R. Iran

P. Fayyaz[*]; Assoc., Prof., Department of Forestry, Faculty of Agricultural and Natural resources, Yasouj University, I. R. Iran

R. Zolfaghari[*]; Assoc., Prof., Department of Forestry, Faculty of Agricultural and Natural resources, Yasouj University, I. R. Iran

(Received: 18 December 2022, Accepted: 30 April 2022)

ABSTRACT

Systemic induce resistance (SIR) is one of the mechanisms for increasing resistance to pests and pathogens in plants. The plant defense system against environmental stress can increase by some chemical elicitors. For this purpose, we used different concentrations of elicitors including salicylic acid, phosphite potassium, leaf extract of neem, two isolates of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), imidacloprid pesticide. Then, growth inhibition of all treatments were investigated on both fungal (*Biscogniauxia mediterranea*) and bacterial (*Brenneria* sp.) pathogens under in vitro conditions. Also, the effect of these elicitors was examined on *Quercus brantii* trees with declined crown in the forest. After three weeks, some physiological traits of trees such as relative water content and membrane leakage of leaf, chlorophyll and photosystem efficiency were measured. Results of Duncan's mean comparison showed that by increasing elicitors' concentration, their growth inhibition against fungal and bacterial pathogens was significantly increased. The lowest effect of the growth inhibition was observed for two isolates of plant growth-promoting rhizobacteria. Trees treated with neem extract, phosphite potassium, and imidacloprid pesticides could significantly reduce membrane leakage compared with the control (treated with water), and also the maximum photosystem efficiency of these treatments and salicylic acid were increased. The results indicate that the positive effects of all used natural chemicals in this study in controlling oak decline which can be used against pest and pathogen instead of chemical pesticides such as imidacloprid.

Keywords: oak charcoal disease, oak decline, phosphit potassium, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), salicylic acid.

[*] Corresponding author, Email: pfayyaz@yu.ac.ir, Tel: +98 9386839305; Email: zolfaghari@yu.ac.ir, Tel: +98 9113384075.