تحقیقات آفات‌گیاهی
۱۴۰۳-۱۴(۱): ۴۵-۶۰

Open access
doi: 10.22124/iprj.2024.26991.1565
pISSN:2322-2409
eISSN: 2538-6123

علمی پژوهشی

ریزپوشانی باکتری *Pseudomonas fluorescens* همراه با نانوذرات اکسید روی/سیلیس و تاثیر آن بر گیاه گوجه‌فرنگی و برخی از فراسنجه‌های زیستی *Tuta absoluta*

الهه تمنادار[۱]، شهناز شهیدی نوقابی*[۲] و روح‌الله صابری ریسه[۳]

گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، ایران

1. 0009-0006-2761-3650, 2. 0000-0002-3492-8355 , 3. 0000-0002-8791-7756

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۲۹)

چکیده

استفاده از ریزپوشانی در فرموله‌کردن عوامل زیستی مانند باکتری‌های آنتاگونیست نقش مهمی در افزایش کارایی و ماندگاری این عوامل در شرایط نامساعد محیطی دارد. در این تحقیق، تاثیر کپسوله کردن باکتری *Pseudomonas fluorescens* UPF5 با آلژینات-وی پروتئین به همراه نانوذرات اکسید سیلیس و روی بر بعضی عناصر مهم گیاه گوجه‌فرنگی، تعداد و طول دوره تخم‌گذاری و طول دوره زندگی شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechidae) بررسی شد. آزمایش‌های گلخانه‌ای در شرایط دمایی ۲±۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی صورت گرفت. تعیین مقدار برخی عناصرمهم در گیاه گوجه فرنگی در چهار تیمار شامل: ۱) گیاه تیمار شده با باکتری کپسوله‌شده، ۲) گیاه تیمار شده با نانوذرات اکسید روی+سیلیس، ۳) گیاه تیمار شده با باکتری فاقد پوشش و ۴) گیاه تیمار شده با آب + آلژینات + وی پروتئین (شاهد) انجام شد. نتایج نشان داد که تیمار گیاه با باکتری کپسوله‌شده باعث افزایش به‌ترتیب ۱۰/۲، ۱۳/۸ و ۱/۶ برابری میزان عناصر فسفر، پتاسیم و آهن نسبت به میزان این عناصر در گیاه شاهد شد. علاوه بر این، طول دوره قبل از تخمگذاری بالغ (APOP)، کل دوره قبل از تخمگذاری (TPOP) و طول عمر در حشراتی که روی گیاهان تیمار شده با باکتری کپسوله‌شده تغذیه شدند بیشتر بود؛ اما تعداد تخم ها در مقایسه با حشرات تغذیه شده از گیاهان شاهد کمتر بود. نتایج نشان داد استفاده از باکتری باعث بهبود رشد گیاه و افزایش مقاومت آن در برابر *T. absoluta* شد.

واژه‌های کلیدی: باکتری کپسوله‌شده، آفت، عناصر ضروری گیاه، مقاومت گیاه گوجه فرنگی

* نویسنده مسئول: Shahidi@vru.ac.ir

CC BY

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Miller) (Solanaceae)، از مهم‌ترین محصولات کشاورزی با مصرف تازه‌خوری و یا فرآوری‌شده می‌باشد (Sheard, 1966). عوامل بسیار زیادی از جمله آفات و بیماری‌های گیاهی عملکرد گیاه گوجه‌فرنگی را در مزرعه و گلخانه‌ها کاهش می‌دهند. یکی از آفات مهم و خسارت‌زای این گیاه، شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta* (Meyrick است (Ingegno *et al*., 2017). تشخیص خسارت مینوز گوجه‌فرنگی روی گیاه به‌طور معمول آسان است. لاروهای این آفت روی برگ‌ها، از بافت مزوفیل تغذیه کرده و مسیر تغذیه آن‌ها به صورت لکه‌های نامنظم شکل می‌گیرد و فضولات سیاه رنگ لاروها درون دالان‌ها دیده می‌شود که این لکه‌ها ممکن است به مرور نکروزه شوند. همچنین لاروها ممکن است تونل‌هایی در ساقه ایجاد نمایند که شکل ظاهری گیاه را تغییر می‌دهد. میوه‌ها به‌محض ظهور روی بوته‌ها در معرض هجوم این آفت قرار خواهند گرفت. دالان‌های ناشی از حمله این آفت درون میوه ممکن است محل ورود عوامل بیماری‌زای ثانویه باشند که سبب فساد و پوسیدگی میوه می‌شود (Han *et al*., 2019).

گیاهان توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه متفاوتی را دارند که گروهی از عوامل زنده و غیرزنده قادر به تولید آن متابولیت‌های ثانویه هستند که بسیاری از آن‌ها برای آفات سمی بوده و می‌توانند به‌عنوان دفاع مستقیم از طریق تأثیر روی رشد و نمو حشرات عمل کنند. همچنین، گروهی از متابولیت‌های ثانویه از طریق جذب دشمنان طبیعی در دفاع مستقیم گیاه نقش بسزایی دارند (Yuan *et al*., 2008).

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد یا (Plant growth promoting rhizobacteria = PGPR) عملکردهای متفاوتی از قبیل سنتز ترکیبات خاص برای گیاهان، تسهیل جذب برخی مواد غذایی از محیط اطراف و کاهش یا ممانعت از آفات و بیماری‌های گیاهی دارند (Beneduzi *et al*., 2012). همچنین، این باکتری‌ها قابلیت کلونیزه کردن ریشه را دارند و باعث تحریک رشد گیاه شده می‌شوند. از میان باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاهان، گونه‌های متعلق به دو جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* بیشترین جمعیت باکتریایی خاک اطراف ریشه را تشکیل می‌دهند (Podile & Kishore, 2006). باکتری‌های گروه *Pseudomonas* به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک و افزایش‌دهنده رشد گیاهان بسیار مناسب هستند. ویژگی‌های این باکتری شامل رشد سریع در شرایط آزمایشگاه، کلونیزاسیون و تکثیر در محیط ریزوسفر و توانایی تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های فعال می‌باشند (Ahmad *et al*., 2008; Weller, 2007; & Subashri *et al*., 2013). تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک (Picard *et al*., 2000)، سیانید هیدروژن (Picard *et al*., 2000)، سیدروفور (Leong, 1986) و آنزیم پروتئاز (Keel & Défago, 1997) از مهم‌ترین مکانیسم‌های مؤثر در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی توسط این باکتری‌ها هستند. همچنین، تأثیر مثبت این باکتری‌ها روی سایر میکروارگانیسم‌های مفید خاک و میکوریزا و نیز کمک به قدرت جذب مواد معدنی (به‌ویژه فسفر و ازت) توسط گیاه از دیگر مکانیسم‌های مؤثر در افزایش رشد گیاهان می‌باشند (Keel & Défago, 1997).

یکی از مهم‌ترین نوآوری‌های امروزه ریزپوشانی می‌باشد که به عنوان یک تکنولوژی برای قرار دادن مواد مایع، جامد و گاز در کپسول‌های کوچک مطرح است. این کپسول‌ها می‌توانند محتویات خود را به صورت کنترل‌شده و در شرایط خاصی آزاد کنند. کپسول‌ها را می‌توان به طور شیمیایی یا با خشک کردن توسط جریان هوا و یا اسپری کردن تهیه کرد (Ta *et al*., 2021). کپسوله کردن روشی است که در آن ترکیبات مورد نظر، توسط ترکیبات دیواره پوشش داده شده تا ذرات ریزکپسول‌ها به وجود بیایند. در این روش انواع آنزیم‌ها، میکروارگانیسم‌ها، روغن‌ها، طعم‌ها، اسانس‌ها و... می‌توانند توسط بیوپلیمرهایی مانند پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها پوشش داده شوند. از مهم‌ترین ویژگی ریزپوشانی، حفاظت از محتویات درونی خود در برابر شرایط نامساعد محیط نظیر pH، دما، اکسایش و در نهایت، قابلیت رهایش هوشمندانه آن‌ها در نقطه هدف است (Olabisi, 2015). زنده‌مانی عوامل بیوکنترل و میزان

اثرگذاری آن‌ها در کنترل آفات و بیماری‌ها به صورت گسترده تحت تأثیر ماده به کار رفته در فرموله کردن آن‌ها می‌باشد. کپسوله کردن در مقایسه با حالت مایع و جامد می‌تواند در افزایش عمر مفید از طریق کاهش نفوذ عوامل محیطی، افزایش زنده‌مانی به دلیل رهایش تدریجی میکروارگانیسم به محیط، دسترسی آسان مواد غذایی و اکسیژن با روش انتشار ساده، کاهش آلودگی به علت وجود پوسته محافظ خارجی و کاهش هزینه در تولید بسیار موثر باشد (John *et al*., 2011). نتایج پژوهش‌های قبلی نشان داده است که کپسوله‌کردن باکتری باعث کاهش حساسیت آن نسبت به گرما شده و جمعیت بیشتری از باکتری زنده می‌ماند (Olga *et al*., 2015). روش‌های اسپری‌دراینیگ، امولسیون و اکستروژن روش‌های معمول در کپسوله کردن پروبیوتیک‌ها هستند. در روش اکستروژن به دلیل پایین بودن سرعت تهیه کپسول‌ها زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها طی فرایند کپسوله کردن افزایش می‌یابد. در این روش اندازه کپسول‌های تهیه شده بزرگ‌تر است، اما روشی کم‌هزینه، راحت و در دسترس‌تر می‌باشد که علاوه بر آن شانس زنده ماندن باکتری‌ها در این روش به‌دلیل به‌کار نبردن موادی که باکتری نسبت به آن‌ها حساس است، بسیار بالاتر می‌باشد.

امروزه استفاده از کپسوله کردن باکتری‌های پروبیوتیک جایگاه ویژه‌ای در علوم کشاورزی به‌دست آورده است. در این فرایند از پلیمرهای مختلف در پوشش کپسول استفاده شده و نتایج قابل قبولی به‌دست آمده است. ریزپوشانی می‌تواند به میکروارگانیسم‌های مفید در رشد گیاه، افزایش عملکرد محصول و تقویت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا کمک کند. ریزپوشانی باکتری‌های PGPR از قبیل *Bacillus* و *Pseudomonas* با پوشش‌های پلیمری از جمله آلژینات که برای مبارزه با آفات و بیماری‌های مختلف گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است، توانسته نتایج چشمگیری به دنبال داشته باشد (Saberi *et al*., 2021).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که نانوذرات اکسید روی علاوه بر این که به عنوان حشره‌کش کارامد تایید شده است (Ishwarya *et al*., 2018)، راه را برای توسعه نانومواد مقرون به صرفه، سازگار با محیط زیست و توانمند برای کاربردهای آن در زمینه علوم زیستی هموار می‌کند (Jameel *et al*., 2020). عنصر سیلیس باعث ضخیم شدن دیواره سلولی گیاه می‌شود. همچنین، در فرموله‌کردن خاصیت چسبندگی سیلیس باعث چسبندگی بهتر ترکیبات دیواره کپسول به یکدیگر می‌شود. پروتئین آب‌پنیر (وی پروتئین) غنی از اسیدهای آمینه می‌باشد که برای رشد و متابولیسم گیاه ضروری هستند (Khan *et al*., 2019). اسیدهای آمینه منبعی مهم برای سنتز پروتئین‌های دفاعی هستند، بنابراین، نقش مهمی در القای مقاومت در گیاهان دارند. پروتئین آب‌پنیر به عنوان یک محصول جانبی در تولید پنیر است در نتیجه از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه بوده و ترکیبی بی‌خطر برای محیط زیست است که پس از رهایش باکتری می‌تواند مورد استفاده گیاه قرار بگیرد. آلژینات، صمغ، کیتوزان، نشاسته و ژلاتین از جمله پوشش‌های مورد استفاده در ریزپوشانی باکتری می‌باشند (Burgain *et al*., 2011).

تاکنون بررسی‌های زیادی در مورد کپسوله کردن باکتری *Peudomonas fluorescens UPF5* علیه آفات انجام نشده است و اغلب پژوهش‌ها در زمینه کنترل عوامل بیماریزا می‌باشد. تحقیق حاضر می‌تواند به عنوان آغازگر گامی برای جلب توجه بیشتر پژوهشگران حشره‌شناسی کشاورزی باشد که به عنوان روشی با پتانسیل مناسب و قابل جایگزین برای ترکیبات شیمیایی در مدیریت کنترل حشرات آفت در نظر گرفته شود. در این تحقیق، ویژگی‌های باکتری *P. fluorescens* کپسوله شده به همراه نانوذرات اکسید روی و سیلیس مورد آزمایش قرار گرفت و سپس تاثیر آن بر عملکرد برخی از عناصر مهم موجود در گیاه گوجه فرنگی شامل فسفر، پتاسیم و آهن و همچنین، برخی فراسنجه‌های زیستی شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

باکتری *P. fluorescens* VUPF5

باکتری از کلکسیون موجود در گروه کنترل بیولوژیک دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان تهیه شد. از سدیم آلژینات (Alg) (ویسکوزیته = ۴۳ دسی

زیمنس، مولاریته گرم/مول $۱۰^{۵} \times ۱/۳۹$، آلمان)، وی پروتئین (WPC ٪۸۰، یونان) (Fathi *et al.*, 2021)، نانوذره نیترات روی (Zn) (۰/۲ مولار) با قطر ۵۰-۹۴ نانومتر و نانوذره سیلیکات سدیم (SiO_2) (گرم/مول ۱۲۲/۰۶) با قطر ۳۵۰-۴۰۰ نانومتر در فرموله کردن باکتری استفاده شد.

تیمارها

تیمارهای به‌کار رفته در این پژوهش شامل: ۱- باکتری *P. fluorescens* VUPF5 کپسوله‌شده همراه با نانوذرات روی و سیلیس، ۲- نانوذرات روی و سیلیس (بدون باکتری کپسوله‌شده)، ۳- باکتری بدون پوشش و ۴- شاهد (آب + آلژ ینات + وی پروتئین) می‌باشند. تیمارها با غلظت یک گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب تهیه و برای آبیاری گیاهان استفاده شدند.

آزمون‌های کنترل زیستی

بررسی توان تولید سیدروفور توسط استرین باکتری

به منظور بررسی توان تولید سیدروفور توسط استرین های باکتریایی، از محیط کشت CAS-Agar استفاده شد. این محیط بر اساس روش الکساندر و زوبرر (Alexander & Zuberer, 1991) تهیه شد. سپس باکتری به صورت نقطه‌ای روی محیط، کشت داده شد و پس از گذشت ۷۲ ساعت ظهور هاله نارنجی‌رنگ اطراف کلنی باکتری مورد بررسی قرار گرفت. این آزمون و سایر آزمون‌های مربوط به کنترل زیستی با سه تکرار انجام شدند.

بررسی توان تولید آنزیم لیپاز توسط استرین باکتریایی

برای انجام این آزمون، ۱۰ میلی‌لیتر توئین ۸۰ استریل به محیط کشت اتوکلاو شده حاوی ۱۰ گرم پپتون، ۰/۱ گرم کلسیم‌کلراید، پنج گرم سدیم‌کلرید و ۱۵ گرم آگار به ازای یک لیتر محیط کشت اضافه و از کشت ۲۴ ساعته باکتری به صورت نقطه‌ای روی آن کشت داده شد (Omidvari, 2015).

بررسی توان تولید آنزیم پروتئاز توسط استرین باکتریایی

این آزمون بر اساس روش ماورهوفر و همکاران (Maurhofer *et al.*, 1995) انجام گرفت. قطر هاله بی‌رنگ اطراف کلنی باکتری به عنوان یک شاخص برای ارزیابی توانایی تولید پروتئاز توسط استرین باکتری در نظر گرفته شد

بررسی توان تولید سیانید هیدروژن توسط استرین باکتریایی

در این آزمون از روش آلسترووم (Alstrom, 1987) با اندکی تغییرات استفاده شد. سپس پتری‌های حاوی کشت باکتری به صورت وارونه در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت پنج روز نگهداری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی از زرد به نارنجی، تولید سیانید هیدروژن استرین باکتری را نشان می‌دهد.

بررسی توان تولید اکسین توسط استرین باکتریایی

پس از گذشت ۷۲ ساعت از رشد باکتری در محیط NB حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم/لیتر ال-تریپتوفان، سوسپانسیون با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. دو میلی‌لیتر از فاز رویی با چهار میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی (۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب ، ۷/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن شش آبه ۰/۵ مولار) مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط تاریکی قرار گرفت. سپس میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Patten & Glick, 1996)

اندازه‌گیری حل‌کنندگی فسفات معدنی توسط استرین باکتریایی روی محیط کشت Pikovskayas Agar

باکتری به صورت نقطه‌ای روی ظرف پتری حاوی محیط رشد قرار داده شد. سپس پتری‌ها در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از گذشت پنج روز توانایی باکتریی در انحلال فسفات بررسی شد (Son *et al.*, 2006).

تهیه ریزکپسول

فرآیند کپسوله‌سازی استرین باکتری با روش اکستروژن انجام شد. تعداد باکتری مورد نظر در همه ترکیبات ۴×۱۰^{۱۱} واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی لیتر (CFU/ml) و غلظت‌های استفاده شده پس از آزمون و خطا به دست آمد:

ترکیب سدیم آلژینات–وی پروتئین کنسانتره (Alg-WPC): این ترکیب بر اساس روش راجام (Rajam, 2012) با اندکی تغییرات انجام شد. محلول آلژینات سدیم استریل (٪ ۱/۵) با مقدار ۰/۰۰۵ گرم نانوذره سیلیس و ۰/۰۰۴ گرم نانوذره روی به وی پروتئین (٪ ۹/۵) اضافه شد. در نهایت محلول در حمام آب گرم در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت نگهداری شد.

در روش اکستروژن مخلوط پلیمر–باکتری با سرنگ به محلول سدیم کلراید ($CaCl_2$) ۲٪ تزریق شد. کپسول‌های تشکیل‌شده به منظور سخت شدن، ۳۰ دقیقه در محلول $CaCl_2$ نگهداری شدند و سپس با استفاده از سرم فیزیولوژیک استریل (٪ ۰/۹) شسته شده و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی رهایش و میزان زنده‌مانی باکتری در خاک

این آزمون بر اساس روش وو و همکاران (Wu *et al.*, 2012) با اندکی تغییرات انجام شد. به منظور حفظ رطوبت خاک و رهایش باکتری از نانوکپسول‌ها روزانه مقداری آب استریل روی آن اسپری شد. در بازه‌های زمانی مختلف ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ روز یک گرم از خاک به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده شد.

مقایسه زنده‌مانی باکتری بدون پوشش و کپسوله شده

برای انجام این آزمایش، از هریک از موتانت استرین باکتریایی سوسپانسیونی با جمعیت 10^{11} واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر (CFU/ml) تهیه شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون به ۱۰۰ گرم خاک استریل اضافه شد و طی بازه زمانی مشخص تا دوماه پس از تهیه سری رقت روی محیط NAحاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد وسپس شمارش کلنی انجام گرفت.

آزمایش گلخانه‌ای

پرورش گیاه میزبان شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی

به‌منظور پرورش *T. absoluta*، از گلدان‌های نیم کیلویی حاوی گیاه گوجه‌فرنگی رقم دافنیس که در اتاقک رشد در دمای ۲±۲۷ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند، استفاده شد. برگ‌های دارای تونل‌های مارپیچ لاروی و حشرات بالغ شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی از محل پرورش دائمی آن‌ها در گلخانه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان جمع‌آوری شدند و برای انجام آزمایش‌های حاضر به قفسه‌های چوبی حاوی گلدان‌های گوجه‌فرنگی انتقال داده شدند. برای تغذیه حشرات بالغ از محلول آب و عسل ۱۰٪ استفاده شد. به منظور همسن‌سازی، بعد از تخم‌ریزی حشرات ماده بالغ، گلدان‌های حاوی تخم به قفسه دیگری منتقل شده و گلدان‌های بدون تخم جایگزین آن‌ها شدند.

اندازه‌گیری عناصر بافت‌های گیاه گوجه‌فرنگی

برای اندازه‌گیری فسفر، ابتدا بوته‌ها از کف بریده شده (بدون ریشه) و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون آون با دمای ۷۵ درجه سلسیوس قرار گرفته تا خشک شوند. فسفر به روش کالیمتری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و سپس منحنی استاندارد رسم و غلظت فسفر در نمونه‌ها محاسبه شد (Kazadi *et al.*, 2016).

غلظت پتاسیم پس از رقیق ساختن عصاره اصلی نمونه‌های هضم شده با اسید نیتریک غلیظ (۶۵ درصد) بر اساس روش جونز و همکاران (Jones *et al.*, 1982)، با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری غلظت از نیم گرم بافت گیاهی خشک‌شده استفاده شد.

برای اندازه‌گیری آهن ابتدا دو گرم نمونه گیاه خشک-شده را وزن کرده و در هاون چینی ریخته، سپس در آون با دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت چهار ساعت قرار داده شد و خاکستر حاصل را با آب مقطر کمی خیس کرده و ۱۰ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک دو مول به آن اضافه شد. بعد از اتمام برهمکنش‌ها، محتویات از کاغذ صافی ریز به داخل بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتر صاف شده و در آخر عصاره نهایی به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. اندازه‌گیری عصاره حاصل به روش هضم به طریق سوزاندن خشک و استفاده از HCl انجام گرفت و سپس غلظت در طول موج ۲۴۸ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Sharma *et al.*,

2002).

بررسی اثر باکتری کپسوله‌شده بر فراسنجه‌های زیستی *T. absoluta*

برای انجام این آزمایش، تخم‌های همسن مینوز روی برگ‌های بوته گوجه‌فرنگی رقم دافنیس دارای ۲۰ برگ که سه ماه از زمان کشت آنها می‌گذشت و داخل گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی بستر پایه (کوکوپیت-پرلایت-ماسه به نسبت ۲:۲:۳ بودند، استفاده شدند. گلدان‌ها داخل قفسه‌های چوبی به ارتفاع یک و نیم متر محصور شده و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲± ۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵± ۶۰ درصد در گلخانه گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان قرار گرفتند. برای انجام این آزمایش به ازای هر تیمار هفت گلدان حاوی یک گیاه در نظر گرفته شد که روی هر گیاه پنج برگ انتخاب شده و روی هر برگ یک عدد تخم قرار گرفت و سپس برگ‌ها توسط قفسه‌های کوچک محصور شدند. باکتری با غلظت ۴×۱۰^{۱۱} CFU/g در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب و عناصر روی و سیلیس با غلظت ۳ میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب به خاک گلدان اضافه شدند (این غلظت‌ها بر اساس آزمون اولیه با مرگ و میر حدود ۲۰ درصد انتخاب شدند). گیاهان هر یک روز در میان هر بار به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آبیاری و در طول مدت آزمایش ۲۲ بار گیاهان آبیاری شدند. دوره لاروی، دوره شفیرگی و مرگ و میر تا زمان ظهور حشره کامل در تیمارها (شامل باکتری کپسوله‌شده، باکتری بدون پوشش و بدون نانوذرات، فقط نانوذرات و گیاه شاهد) به‌صورت روزانه ثبت شدند. بعد از ظهور حشرات بالغ و شناسایی جنسیت در هر یک از تکرارها با حشره بالغ همسن جفت و سپس نرها به وسیله آسپیراتور از ماده‌ها جدا شده و تعداد تخم‌های حشرات بالغ ماده به‌صورت روزانه شمارش و ثبت شدند.

تجزیه آماری داده‌ها

مقایسه میانگین تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد و همچنین نرمال‌کردن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶) انجام گرفت. برای به دست آوردن و تجزیه وتحلیل فراسنجه‌های زیستی مربوط به جدول زندگی حشره از نرم‌افزار (Chi, 1988) TWOSEX-MSchart استفاده شد. واریانس و برآورد خطای معیار پارامترها با روش بوت‌استرپ (۱۰۰۰۰۰ نمونه) انجام شد (Huang & Chi, 2012) و مقایسه‌های چندگانه بین تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون بوت-استرپ جفت‌شده صورت گرفت. همچنین، نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2013 رسم شدند.

نتایج

بررسی توان کنترل زیستی *P. fluorescens* VUPF

بررسی توان تولید سیدروفور، لیپاز، پروتئاز، سیانید هیدروژن، هورمون اکسین و انحلال فسفات معدنی

استرین VUPF5 توانایی تولید سیدروفور داشته و رنگ محیط را به نارنجی تغییر داد و قطر هاله ۰/۲± ۶/۲ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. VUPF5 با قطر هاله ۰/۴± ۴/۶ سانتی‌متر تولید آنزیم پروتئاز را نشان داد. تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتری یکی از مکانیسم‌های مهم و موثر در کنترل آفات و بیمارگرهای گیاهی به شمار می‌آید. نتایج این آزمون نشان داد که استرین VUPF5 توانایی بسیار بالایی در تولید آنزیم لیپاز دارد و رسوبات بسیاری اطراف کلنی تشکیل شد. لیپاز یکی از آنزیم‌های محلول در آب بوده که سبب هیدرولیز پیوندهای استری در سوبستراهای لیپیدی می‌شود (Ugras & Uzmes, 2016).

نتایج نشان داد که استرین VUPF5 توانایی تولید مقدار زیادی HCN را دارد. سیانید هیدروژن به‌طور مستقیم روی فعالیت سلول اثر می‌کند و در چرخه تنفس با بلوکه کردن سیتوکروم اکسیداز C سبب سرکوب عوامل بیمارگر می‌شود (Schippers, 1988).

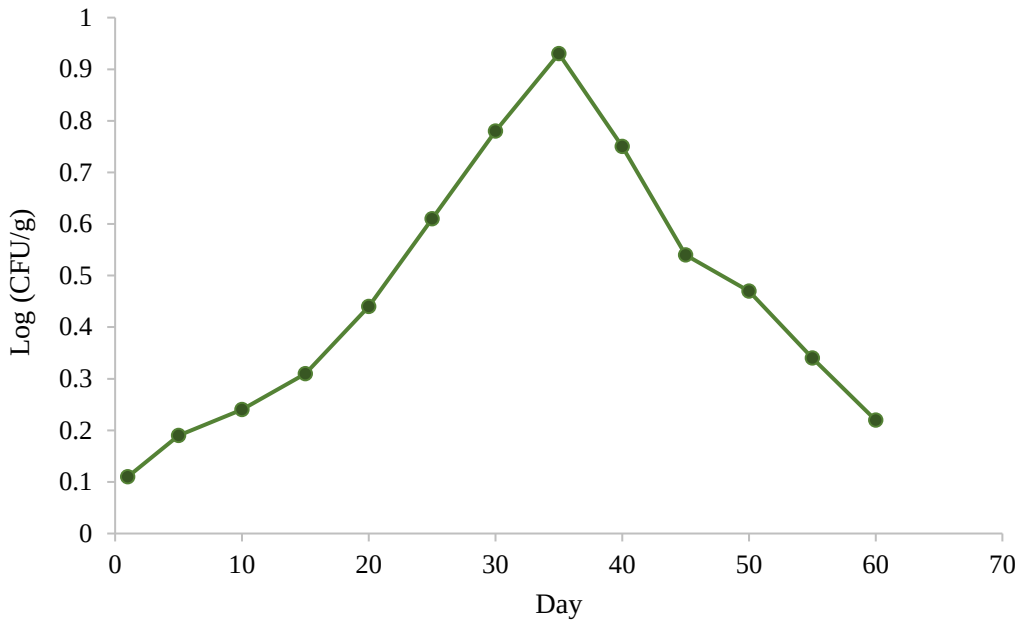
بر اساس نتایج بررسی تولید اکسین (اندول استیک اسید) استرین VUPF5 در محیط TSB حاوی ال-تریپتوفان مشاهده شده و مقدار تولید آن ۱/۱ ±۳/۲۲ میکروگرم/میلی‌لیتر ثبت شد.

نتایج بررسی انحلال فسفات استرین باکتری مورد نظر پس از گذشت پنج روز با حضور هاله بی‌رنگ با قطر cm

۰/۳ ±۶/۵ اطراف کلنی نشان‌دهنده مثبت بودن این آزمون در استرین VUPF5 می‌باشد. باکتری‌های حل کننده فسفات موجود در ناحیه ریزوسفری می‌توانند با ترشح اسیدهای آلی و فسفاتازها، ترکیبات فسفاتی کم محلول را به فرم قابل جذب برای گیاه تبدیل کنند.

رهایش باکتری از ریزکپسول

رهایش باکتری از ریزکپسول‌ها در محیط بافر فسفات در شکل ۱ نشان داده شده است. رهایش به‌تدریج با گذشت زمان افزایش یافت و در روز ۳۵ به بیشترین میزان خود رسید و سپس، به تدریج رو به کاهش رفت. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که ریزکپسول‌ها توانایی محصورسازی بالای سلول‌های باکتری و رهایش آن‌ها را در یک روند پایدار تا ۶۰ روز در محیط خاک دارند.

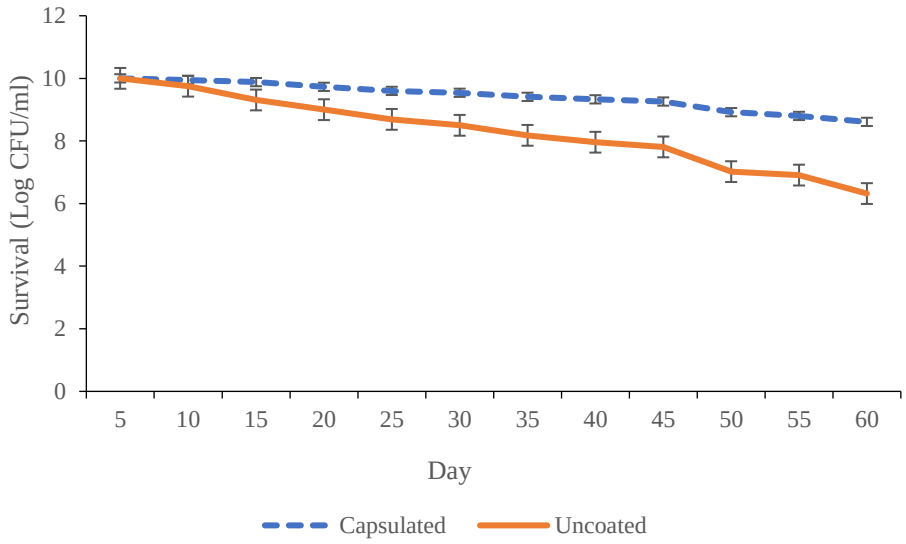


شکل ۱- میزان رهایش باکتری *Peudomonas fluorescens* VUPF5 از ریزکپسول تهیه شده طی بازه زمانی ۶۰ روز

Figure 1. Diffusion of microencapsulated *Peudomonas fluorescens* VUPF5 in a period of 60 days

مقایسه میزان زنده‌مانی باکتری بدون پوشش و کپسوله‌شده

نتایج نشان داد که میزان زنده‌مانی باکتری که در شکل ۲ نمایش داده شده است، با گذر زمان به‌تدریج کاهش یافته، اما این روند کاهش در باکتری‌های محصورشده در کپسول کمتر بود. از روز پنجاهم به بعد جمعیت باکتری‌ها با سرعت بیشتری رو به کاهش رفت. میزان زنده‌مانی استرین VUPF5 کپسوله‌شده و بدون پوشش، پس از گذشت ۶۰ روز به‌ترتیب $۱/۵ \times ۱۰^{۹}$ CFU/ml و $۲/۳ \times ۱۰^{۴}$ بود. در نتیجه می‌توان گفت که کپسوله کردن استرین‌های باکتریایی به طور قابل توجهی میزان زنده‌مانی آن‌ها را در مقایسه با باکتری بدون پوشش افزایش می‌دهد.



شکل ۲- مقایسه زنده مانی باکتری *Peudomonas fluorescens* VUPF5 کپسوله شده و باکتری بدون پوشش در دوره ۶۰ روزه

Figure 2. Comparison of the survival of *Peudomonas fluorescens* VUPF5 encapsulated and non-encapsulated bacteria during 60 days

میزان عناصر در گیاه گوجه‌فرنگی

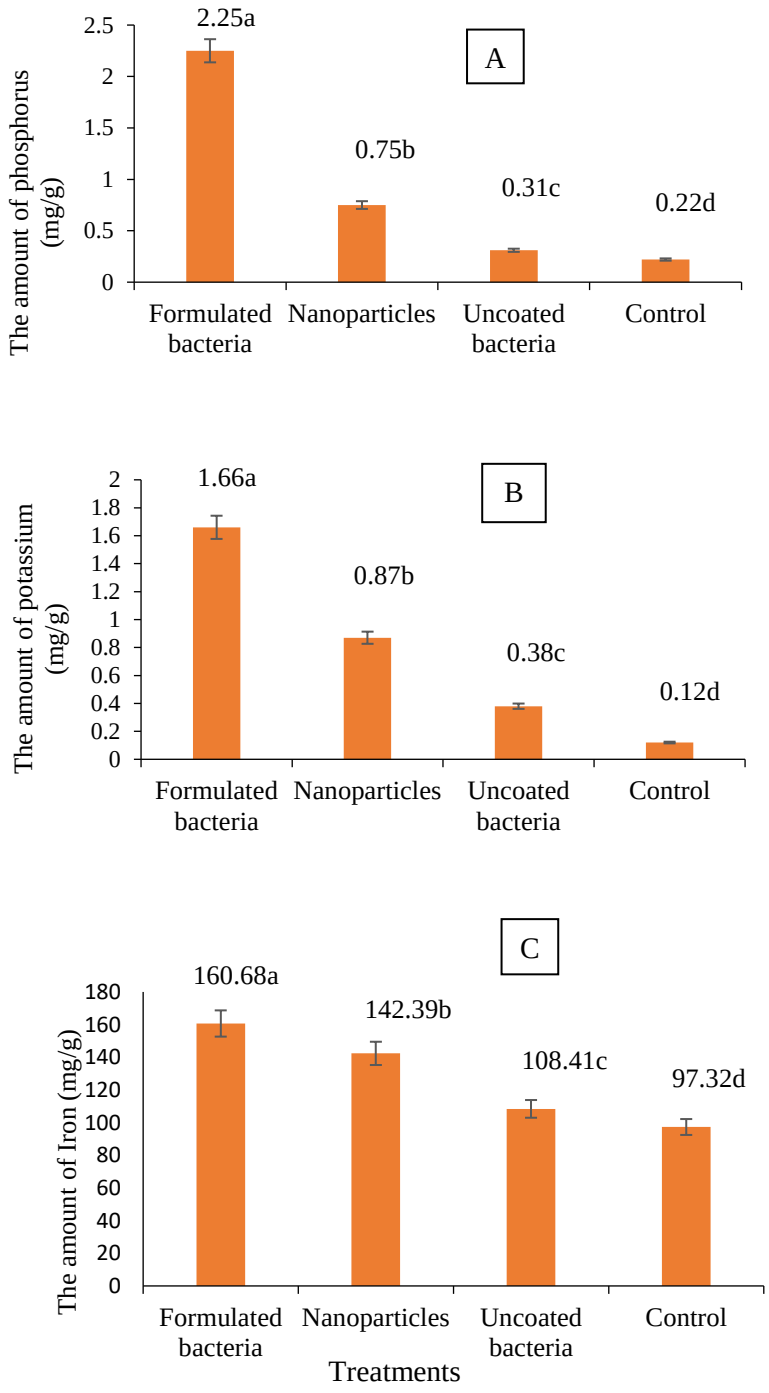
طبق نتایج به‌دست آمده، تیمار گیاهان گوجه‌فرنگی با باکتری کپسوله‌شده اثرات قابل توجهی بر میزان فسفر در دسترس گیاه نسبت به سایر تیمارها داشت ($P<0.05$) (شکل A3). میزان فسفر در تیمار باکتری بدون پوشش اگرچه نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود، اما به طور معنی‌داری از تیمار باکتری کپسوله‌شده و از تیمار نانوذرات کمتر بود.

داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که تلقیح باکتری کپسوله‌شده موجب افزایش پتاسیم برگ شد (شکل B-۳). همچنین، نانوذره سیلیس و نانو ذره روی نیز باعث افزایش معنی‌دار پتاسیم در اندام‌های هوایی گیاه شدند، اما این افزایش نسبت به تیمار باکتری کپسوله‌شده کمتر و در حدود نصف آن بود. باکتری بدون پوشش در مقایسه با کنترل باعث افزایش پتاسیم در گیاه شد، اما نسبت به تیمارهای دیگر کمتر بود.

میزان آهن در گیاهان تیمار شده با باکتری کپسوله‌شده نسبت به بقیه تیمارها به‌طور معنی‌داری افزایش داشت. این عنصر در تیمارهای نانوذرات و باکتری بدون پوشش نیز نسبت به کنترل افزایش نشان داد (شکل C-۳).

بررسی اثر باکتری کپسوله‌شده بر طول دوره زندگی شب‌پره مینوز برگ گوجه‌فرنگی

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به طول دوره زندگی مینوز گوجه‌فرنگی روی تیمارهای مورد آزمایش نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد؛ به‌طوری‌که طول دوره زندگی شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی در تیمار گیاهان حاوی باکتری کپسوله‌شده به طور معنی‌داری طولانی‌تر و طول دوره زندگی در گیاهان شاهد کوتاه‌تر بود. طول دوره پیش از تخمریزی حشرات کامل ماده (Adult pre-oviposition period= APOP) و طول کل دوره پیش از تخمریزی حشرات کامل ماده (Total pre-oviposition period= TPOP) در تیمار باکتری کپسوله‌شده نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری را نشان داد. کمترین تعداد تخم‌های گذاشته‌شده به ازای هر ماده، در گیاهان تیمار شده با باکتری کپسوله‌شده و بیشترین تعداد آن در گیاهان شاهد شمارش شد (جدول ۱).



شکل ۳- میانگین (± خطای معیار) مقدار فسفر (A)، پتاسیم (B) و آهن (C) در گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با باکتری کپسوله‌شده، نانوذرات (روی+ سیلیس)، باکتری بدون پوشش (میلی گرم/گرم) و شاهد (آب + آلژینات + وی پروتئین)

Figure 3. The mean (±SE) amount of phosphorus (A), potassium (B), and iron (C) in tomato plants treated with capsulated bacteria, nanoparticles (zinc + silica), uncoated bacteria (mg/g) and control (water+ alginate+ whey portein)

Different letters indicate significant differences among treatments (P<0.05).

جدول ۱- اثر تیمارهای مختلف باکتری بر فراسنجه‌های زیستی (میانگین ± خطای معیار) *Tuta absoluta*

Table 1. Effect of different treatments of bacteria on the biological parameters (Mean ± SE) of *Tuta absoluta*

Life table parameters	Capsulated bacteria	Nanoparticles	Uncoated bacteria	Control	p-value
APOP*(day)	4.51±0.12[a]	4.32±0.16[b]	4.23±0.17[b]	4.19±0.23[b]	0.003
TPOP** (day)	36.09±0.02[a]	34.11±0.07[b]	32.73±0.5[c]	32.21±0.14[c]	0.0001
Fecundity (Egg/Femal)	70.41±4.15[c]	82.75±3.32[b]	99.43±3.17[a]	97.23±5.81[a]	0.003
Longevity (day)	42.085±0.77[a]	39.06±066[b]	38.11±0.23[c]	37.39±0.69[d]	0.003

Different letters in the row indicate significant difference among the groups at P<0.05 (Paired bootstrap test).
* Adult pre- oviposition period, ** Total pre- oviposition period

بحث

گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که گونه‌های بسیاری از باکتری‌ها از جمله *Pseudomonases* sp. عوامل بیماریزای حشرات آفت می‌باشند (Yadav *et al.*, 2020; Sarkhandia *et al.*, 2023). با توجه به اهمیت استفاده از عوامل زیستی در کنترل حشرات آفت و جایگزینی آنها با آفت‌کش‌های شیمیایی این باکتری با استفاده از فناوری نانو کپسوله کردن فرموله شد و سمیت آن روی *T. absoluta* بررسی شد.

در کپسوله کردن عوامل زیستی انتخاب روش و مواد برای بالا بردن کارایی آن اهمیت دارد. بنابراین، انتخاب مواد زیستی مورد استفاده به عنوان مواد دیواره برای کپسوله کردن، محافظت و رهایش باکتری‌ها در محل و زمان مناسب می‌تواند بسیار مهم و تاثیرگذار باشد. به طور معمول، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای طبیعی به دلیل غیر سمی بودن و نداشتن اثرات سوء بر محیط زیست، انتخابی مناسب برای کپسوله کردن می‌باشند.

باکتری‌های *P. fluorescens* توانایی تولید چندین ترکیب فعال زیستی از جمله سیدروفورها را دارند که طیف گسترده‌ای از مکانیسم‌های کنترل بیولوژیک را شامل می‌شوند. در پژوهش حاضر مشخص شد که این باکتری نیز قادر به تولید سیدروفور می باشد. سیدروفورها که توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها تولید می‌شوند، ترکیبات آلی کلات‌کننده آهن هستند و بالاترین قدرت حل شوندگی در ترکیب آهن (III) را دارند (Ghosh *et al.*, 2020). بنابراین، این ترکیبات با بهبود جذب آهن از محرک‌های مهم رشد گیاه می‌باشند. نتایج پژوهش طهماسبی و همکاران (Tahmasbi *et al.*, 2014) نشان داد کاربرد باکتری *P. fluorescens* به سبب تولید سیدروفور باعث افزایش میزان کلروفیل در گیاه گندم می‌شود. دلیل افزایش میزان کلروفیل را جذب عناصری مانند فسفر، پتاسیم، آهن، نیتروژن، مس و منگنز که در صورت استفاده از باکتری به آسانی در دسترس گیاه می‌باشند، می‌دانند. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه با روش‌هایی مانند تولید هورمون‌های گیاهی (جیبرلین و اکسین) (Glick *et al.*, 2001)، افزایش فسفر قابل دسترس و از طریق روش‌های مختلفی مانند ACC د- آمیناز (Larsen *et al.*, 2009) نیز در تحریک رشد گیاه و افزایش ارتفاع بوته گیاهان نقش ایفا می‌کنند.

بررسی‌ها نشان داده‌اند برخی از باکتری های خاکزی دارای قدرت تولید سیانید هیدروژن (HCN) هستند که می‌تواند از رشد بسیاری از حشرات، نماتدها و عوامل بیماری‌زا جلوگیری کند (Siddiqui *et al.*, 2006). HCN یک متابولیت فرار و یک مهارکننده قوی سیتوکروم اکسیداز c در زنجیره تنفسی است، از این رو یک مولکول سمی است. در تحقیق حاضر مشخص شد که باکتری مورد آزمایش قادر به تولید HCN می باشد که به‌احتمال بر رشد *T. absoluta* تاثیر داشته است.

در این تحقیق مشخص شد این باکتری قادر به تولید آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز می‌باشد. تولید آنزیم پروتئاز توسط

باکتری *P. fluorescens* یکی از مکانیسم‌های مهم و موثر در کنترل آفات و عوامل بیماریزای گیاهی به حساب می‌آید. این آنزیم سبب تخریب دیواره سلولی شده و موجب از بین رفتن آفت می‌شود (Kanost & Clem, 2012). آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی مانند پروتئازها، کیتینازها، لیپازها و گلوکانازها دارای خواص سمی روی آفات هستند. پروتئازها روی کوتیکول حشرات عمل می‌کنند، زیرا بیشتر ساختار آن را پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند. این آنزیم‌ها می‌توانند روی روده میانی حشره و هموسل حشرات اثر بگذارند. لیپازها لیپوپروتئین‌ها، موم‌ها و چربی‌های موجود در پوشش حشره را هیدرولیز می‌کنند و باعث اختلال در آن می‌شوند (Lopez *et al.*, 2021).

ریزپوشانی باکتری بدین‌منظور است که در دیواره کپسول از نانوذراتی استفاده شود که برای رشد و نموی گیاه و تامین نیازهای اساسی آن مفید باشد. استفاده از نانو ذرات در دیواره کپسول ضمن رهایش کنترل‌شده آن، با کم کردن میزان کودهای شیمیایی مصرفی و افزایش عملکرد نانوذرات سبب کاهش آلودگی زیست محیطی و افزایش عملکرد گیاه به شیوه‌های نوین می‌شود. عنصر روی در تولید اکسین نقش دارد و افزایش رشد گیاهان به علت گسترش رشد گره‌های داخلی، به افزایش اکسین نسبت داده شده است. قدسلاوی و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کردند که باکتری‌های محرک رشد گیاهی با توانایی تولید اکسین باعث بهبودی رشد گیاه می‌شوند (Ghodsalavi *et al.*, 2013). همچنین، نتایج بررسی‌های گلیک (Glick, 1985) نشان داد که باکتری‌های تولیدکننده اکسین بر خصوصیات ریشه‌ای تاثیر گذاشته و سبب افزایش رشد گیاهان می‌شوند.

فسفر که عنصر مغذی بسیار مهم در گیاه است به عملکردهای اساسی مانند بیوسنتز ماکرومولکول‌ها، تنفس، تبدیل انرژی و رشد و نمو گیاه کمک می‌کند. از آنجا که بیشتر فسفر در خاک غیرقابل حل می‌باشد، بنابراین قابل جذب برای گیاه نیست. این باکتری‌ها می‌توانند فسفات معدنی را با آزادسازی اسیدهای آلی و کاهش pH محیط اطراف حل کنند (Hariprasad & Niranjana, 2009). فسفر از جمله مواد ساختمانی DNA و RNA بوده و در غشاهای فسفولیپیدی به عنوان یک پل مولکولی عمل می‌کند. فسفر در گیاه وظایفی از قبیل ایجاد مکانیسم انتقال انرژی و نیز نقش تنظیم‌کنندگی در بسیاری از فرایندهای آنزیمی دارد (Gholami & Kimiaiy-Talab, 2006). پتاسیم یکی دیگر از عناصر غذایی اصلی و مهم در گیاهان و فراوان‌ترین کاتیون موجود در سیتوپلاسم است. پتاسیم مهم‌ترین عنصر در محلول‌های غیرآلی گیاه است و نقش مهمی در کاهش پتانسیل اسمزی در مغز ریشه دارد (Liang *et al.*, 2005). بررسی‌ها نشان داده‌اند که روی نیز باعث افزایش طول ریشه و سبب جذب بیشتر عناصر غذایی از خاک می‌شود (Koochaki & Sarmadian, 2012). در مطالعه حاضر، نانوذره به‌احتمال میزان جذب فسفر و پتاسیم را در گیاه گوجه‌فرنگی افزایش داده است.

در پژوهش حاضر تغذیه لارو حشره روی گیاه گوجه قرنگی آلوده به باکتری *P. fluorescens* سبب طولانی‌تر شدن دوره نسلی آن و کاهش تعداد نتاج آن نسبت به حشراتی شد که روی گیاهان شاهد بودند. طولانی بودن طول دوره یک نسل در کنار کاهش زادآوری یکی از عوامل موثر در کاهش رشد جمعیت آفت در نسل‌های متوالی روی گیاهان است. همچنین، طولانی شدن مدت زمان یک نسل سبب می‌شود که این آفت مدت زمان بیشتری در معرض دشمنان طبیعی قرار گیرد. در بررسی‌هایی که به‌تازگی توسط آذرنوش و همکاران (Azarnosh *et al.*, 2023) انجام شده است، تاثیرات کشندگی متفاوتی از سه سویه *Pseudomonas* روی تخم و لارو شب‌پره بید آرد (Zeller) *Anagasta keuhniella* مشاهده شده است. سویه *P. protegens* CHA0 باعث مرگ و میر حدود ۸۰ درصد و سویه *P. soli* VF16 سبب از بین رفتن ۶۴ درصد لارو *A. keuhniella* شد، اما سویه *P. persica* VKH13 فاقد اثر حشره‌کشی بود.

در تحقیق حاضر این روش کپسوله‌کردن به‌احتمال به دلیل داشتن نانوذرات روی که خاصیت حشره‌کشی دارد و نانوذرات سیلیس که سبب ضخیم شدن دیواره سلولی گیاه شده و هضم مواد غذایی را برای آفت مورد بررسی سخت می‌کند، سبب کم شدن تغذیه حشره شده که نرخ باروری و

زادآوری حشره را کم کرده است. همچنین، باعث افزایش طول دوره زندگی آفت شده و نیز بر طول دوره تخم‌گذاری حشره آفت تاثیر گذاشته که در نهایت باعث کاهش خسارت آفت می‌شود.

در کل نتایج این تحقیق نشان داد که کپسوله کردن باکتری *P. fluorescens* به همراه نانو ذرات روی و سیلیس با روش به‌کار رفته در این آزمایش‌ها در مقایسه با فرم بدون پوشش آن در شرایط گلخانه توانست به طور موثرتری روی فراسنجه‌های مهم زیستی *T. absoluta* از جمله تعداد تخم‌های تولید شده و طول دوره زندگی این آفت مهم محصولات کشاورزی تاثیر بگذارد. باکتری کپسوله‌شده در مقایسه با فرم بدون پوشش توانست به مدت ۶۰ روز در محیط ریزوسفری فعالیت کند، در صورتی که در فرم بدون پوشش بعد از چهار روز جمعیت باکتری در محیط خاک بسیار کاهش یافت که با یافته‌های فتحی و همکاران (Fathi *et al*., 2021) مطابقت دارد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کپسوله‌کردن به روش حاضر، باکتری را از شرایط نامساعد محیطی حفظ کرده و باعث زنده‌مانی بیشتر آن‌ها شد و با رهایش تدریجی باکتری و نانوذرات موجود، سبب بهبود رشد و عملکرد گیاه شد.

بنابراین، می‌توان گفت که این روش فرموله کردن با این ترکیب و با رهایش کنترل‌شده که برای اولین بار برای کنترل این آفت استفاده شده، می‌تواند برای کنترل این آفت مهم در نظر گرفته شود. اما قبل از نتیجه‌گیری نهایی نیاز است که این آزمایش‌ها در شرایط مزرعه و روی گونه‌های گیاهی دیگر بررسی شود و تاثیر پلمیرهای طبیعی مختلف در افزایش سطح القای مقاومت در گیاه گوجه‌فرنگی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

References

Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, *163*(2), 173-181. **DOI:https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001**

Alexander, D., & Zuberer, D. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of Soils, *12*, 39-45. **DOI:https://doi.org/10.1007/BF00369386**

Alström, S. (1987). Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. Plant and Soil, *102*, 3–9. **DOI:https://doi.org/10.1007/BF02370892**

Azarnoush, R., Yarahamdi, F., Keshavarz- Tawheed, V., & Rajabpour, A. (2023). An investigation on insecticidal effects of three growth stimulant bacteria belong to *Pseudomonas* sp. to control *Anagasta kuehniella* and the infected larvae on the host selecting by the parasitoid wasp, *Habrabracon hebetor*. Plant pest research, 13(1), 15-24. (In Farsi).

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Assaglia, L. M. (2012). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, *35*, 1044-1051. **DOI:https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020**

Bong, C. F. J., & Sikorowski, P. P. (1991). Effects of cytoplasmic polyhedrosis virus and bacterial contamination on growth and development of the corn earworm, *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of invertebrate pathology*, 57, 406–412. **DOI:https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90145-G**

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, *104*, 467-483. **DOI:https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031**

Chi, H. (1988). Life-table analysis incorporating both sexes and variable development rates among individuals. *Environmental Entomology*, *17*, 26–34. **DOI:https://doi.org/10.1093/ee/17.1.26**

Fallahzadeh-Mamaghani, V., Ahmadzadeh, M., & Sharifi, R. (2009). Screening systemic resistance-inducing *Pseudomonads fluorescent* for control of bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum. Plant Pathology, *91*, 663−670.**DOI:https://www.jstor.org/stable/41998684**

Fathi, F., Saberi-Riseh, R., & Khodaygan, P. (2021). Survivability and controlled release of alginate-microencapsulated *Pseudomonas fluorescens* VUPF506 and their effects on biocontrol of

Rhizoctonia solani on potato. *International Journal of Biological Macromolecules*, *183*, 627-634. **DOI:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.159**

Ghosh, S. K., Bera, T., & Chakrabarty, A. M. (2020). Microbial siderophore – A boon to agricultural sciences. *Biological Control, 144*, 104214. **DOI:https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104214**

Hariprasad, P., & Niranjana, S. (2009). Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and Soil*, *316*, 13–24. **DOI:https:// doi.org/10.1007/s11104-008-9754-6**

Huang, Y. B., & H. Chi. (2012). Age-stage, two-sex life table of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) with a discussion on the problem of applying females age-specific life table to insect population. *Insect Science*, *19*, 263–273. **DOI:https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2011.01424.x**

Ishwarya, R., Vaseeharan, B., Subbaiah, S., Nazar, A. K., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., & Al-Anbr, M. N. (2018). Sargassum wightii-synthesized ZnO nanoparticles–from antibacterial and insecticidal activity to immunostimulatory effects on the green tiger shrimp Penaeus semisulcatus. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *183*, 318-330. **DOI:https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.049**

Ingegno, B. L., Candian, V., Psomadelis, I., Bodino, N., & Tavella, L. (2017). The potential of host plants for biological control of *Tuta absoluta* by the predator *Dicyphus errans*. *Bulletin of Entomological Research, 107*(3), 340–348. **DOI:https://doi.org/10.1017/S0007485316001036**

Jameel, M., Shoeb, M., Khan, M.T., Ullah, R., Mobin, M., Farooqi, M. K. & Adnan, S. M. (2020). Enhanced insecticidal activity of thiamethoxam by zinc oxide nanoparticles: A novel nanotechnology approach for pest control. *American Chemical Society, 5*(3), 1607-1615. **DOI:https://doi.org/ 10.1021/acsomega.9b03680**

John, R. P., Tyagi, R., Brar, S., Surampalli, R., & Prévost, D. (2011). Bio encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews In Biotechnology*, *31*, 211–226. **DOI:https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327**

Jones, U. S., Katyal, J. C., Mamaril, C. P., & Park, C. S. (1982). Wetland rice-nutrient deficiencies other than nitrogen. Rice Research Strategies for the Future. Manila, IRRI. pp. 327-378. **DOI:http://books.irri.org/9711040611_content.pdf**

Ghodsalavi, B., Ahmadzadeh, M., Soleimani, M., Madloo, P. B., & Taghizad- Farid, R. (2013). Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis*. *Australian Journal of Crop Science*, *7*(3), 338-344.

Gholami, M., & Kimiaiy- Talab, M. R. (2006). Physiology of temperate zone fruit trees. Written by Miklos Faust. Bu-Ali Sina University Press, Hamadan. pp. 486. (in Farsi).

Glick, B. R., Penrose, D., & Wendo, M. (2001). Bacterial promotion of plant growth. *Biotechnology Advanced*, *19*,135-138.

Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-Living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*, 109-117. **DOI:https://doi.org/10.1139/m95-015**

Kanost, M. R., & Clem, R. J . (2012). Insect proteases. In Gilbert , L. I. (Ed.). Insect molecular biology and biochemistry. Academic Press, San Diego, pp. 346 –364. **DOI:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10010-8**

Keel, C., & Défago, G. (1997). Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: A.C., Gange V.K. Brown (Ed.), multitrophic interaction in terrestrial system. Oxford, Blackwell Science. pp. 24-47.

Khan, S., Yu, H., Li, Q., Gao, Y., Sallam, B. N., Wang, H., Liu, P., & Jiang, W. (2019). Exogenous Application of Amino Acids Improves the Growth and Yield of Lettuce by Enhancing Photosynthetic Assimilation and Nutrient Availability. *Agronomy*, *9*(5), 266. **DOI:https://doi.org/10.3390/ agronomy9050266**

Koochaki, A., & Sarmadnia, G. H. (2012). Physiology of crop plant. Jahad-e Daneshgahi Mashhad, Mashhad, Iran. pp. 87. (in Farsi).

Larsen, J., Cornejo, P., & Miguel- Barea, J. (2009). International between the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices and the plant growth promoting rhizobacteria Paenibacillus polymyxa and P. macerans in the mycorrhizosphere of cucumsi sativas. *Soil Biology and Biochemistry*, *41*, 286-292. **DOI:https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.029**

Leong, J. (1986). Siderophore: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens.

Annual Review Journal of Phytopathology, *24*, 187-209. **DOI:https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.001155**

Liang, Y. C., Zhang, W. H., Chen, Q., & Ding, R. X. (2005). Effects of silicon on tonoplast H+–ATPase and H+-PPase activity, fatty acid composition and fluidity in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany*, *53*, 29-37. **DOI:htt**ps://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.02.010

Lopes, F. C., Martinelli, A. H. S., John, E. B. O., & Ligabue-Braun, R. (2021). Microbial hydrolytic enzymes: Powerful weapons against insect pests. In: Khan M. A., and Ahmad W., (Eds.). Microbes for Sustainable Insect Pest Management. Sustainability in Plant and Crop Protection. Springer; Basel, Switzerland: pp. 1–31. **DOI:https://doi.org/10.1007/978-3-030-67231-7_1**

Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D., & Défago, G. (1995). Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology*, *44*, 40-50. **DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02714.x**

Olga, K. S., Nadezhda, A.V., Ruchiy, A.S., Shakhnazarova, V.Y., Vorobyov, N.I., & Chebotar, V.K. (2015). The influence of soils with different textures on development, colonization capacity and interactions between *Fusarium culmorum* and *Pseudomonas fluorescens* in soil and on barley roots. *Plant and Soil*, *389*, 131-144. **DOI:https://doi.org/10.1007/s11104-014-2351-y**

Omidvari, M. (2015). Biological control of *Fusarium solani*, the causal agent of damping off, by *Pseudomonas fluorescens* and studying some of their antifungal metabolite productions on it. Msc. Thesis. Tehran University, 94 p. (In Farsi)

Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, *42*(3), 207–220. **DOI:https://doi.org/10.1139/m96-032**

Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria. In: S. S. Gnanamanickam (Ed.), Plant-associated bacteria. *Netherlands*, pp. 155-159. **DOI:https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7**

Picard, C., Cello, I., Ventura, M., Fani, R., & Guckert, A. (2000). Frequency and biodiversity of 2,4-diacetyphloroglucinol production bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 948-955. **DOI:https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.948-955.2000**

Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S., & Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein - alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, *4*, 891–898. **DOI:https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.06.006**

Saberi-Riseh, R., Moradi-Pour, M., Mohammadinejad, R., & Thakur, V. K. (2021). Biopolymers for biological control of plant pathogens: Advances in microencapsulation of beneficial microorganisms. *Polymers*, *13*(12), 1938. **DOI:https://doi.org/10.3390/polym13121938**

Sarkhandia, S., Devi, M., Sharma, G., Mahajan, R., Chadha, P., Saini, H. S., & Kaur, S. (2023). Larvicidal, growth inhibitory and biochemical effects of soil bacterium, *Pseudomonas* sp. EN4 against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *BMC Microbiology*, *23*(95). **DOI**:**https://doi.org/10.1186/s12866-023-02841-w**

Sehrawat, A., Sindhu, S. S., & Glick, B. R. (2022). Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere*, *32*(1), 15-38. **DOI:https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60058-9**

Schippers, B. (1988). Biological control of pathogens with rhizobacteria. Philosophical transactions of the Royal Society of London. *Biological Sciences*, *318*, 283-293. **DOI:https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0010**

Sharma, P. K., Gill, O. P., & Sharma, B .L. (1992). Effect of source and mode of sulfur application on yield of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Indian Journal of Agronomy*, *3*, 489-492.

Sheard, G. F. (1966). The economic importance of the tomato as a commercial crop. *Scientific Horticulture*, *18*, 5-9. **DOI:https://www.jstor.org/stable/45126659**

Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., Sheikh, I. H., & Khan, A. (2006). Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*, 641–650. **DOI:https://doi.org/10.1007/s11274-005-9084-2**

Son, H. J., Park, G.T., Cha, M. S., & Heo, M. S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates

by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, *97*, 204-210. **DOI:**h**ttps://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.021**

Subashri, R., Raman, G. & Sakthivel, N. (2013). Biological control of pathogens and plant growth promotion potential of fluorescent Pseudomonads. In *Bacteria in agrobiology: disease management*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. pp. 77-110. **DOI:doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3_4**

Ta, L. P., Bujna, E., Antal, O., Ladányi, M., Juhász, R., Szécsi, A., Kun, S., Sudheer, S., Gupta, V. K., & Nguyen, Q. D. (2021). Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, *183*, 1136-1144. **DOI:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.170**.

Tahmasbi, F., Lakzian, A., Khavazi, K., & Pakdin- Parizi, A. (2014). Isolation, identification and evaluation of sidrophore production in *Pseudomonas* bacteria and its effect on hydroponically grown corn. *Journal of Soil Biology*, *3* (1), 75-87. (In Farsi).

Ugras, S. & Uzmez, S. (2016). Characterization of a newly identified lipase from a lipase producing bacterium. *Frontiers in Biology*, *11*(4), 323–330. **DOI:https://doi.org/10.1007/s11515-016-1409-z**

Yadav, A. N, Kaur, T., Devi ,R., Kour, D., Yadav, N. (2021). Biodiversity and biotechnological applications of extremophilic microbiomes: current research and future challenges. In: Yadav, A. N., Rastegari, A. A., and Yadav, N. (Eds.). Microbiomes of extreme environments: biodiversity and biotechnological applications. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 278–290.

Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, *97*(2), 250-256. **DOI:https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0250**

Wu, Z., Guo, L., Qin, S. & Li, C. (2012). Encapsulation of R. planticola Rs-2 from alginate starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *39*, 317–327. **DOI:https://doi.org/10.1007/s10295-011-1028-2**

Yuan, J. S., Köllner, T. G., Wiggins, G., Grant, J., Zhao, N., Zhuang, X., Degenhardt, J., & Chen, F. (2008). Elucidation of the genomic basis of indirect plant defense against insects. *Plant Signaling & Behavior*, *3*(9), 720-721. **DOI:https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03524.x**

Plant Pest Research
2024- 14 (1): 45-60

Open access
doi: 10.22124/iprj.2024.26991.1565
pISSN: 2322-2409
eISSN: 2538-6123

Research paper

Microencapsulation of *Pseudomonas fluorescens* bacteria with silica/zinc oxide nanoparticles and its effect on tomato and some biological parametrs of *Tuta absoluta*

E. Tamanadar [1], S. Shahidi-Noghabi[2*] and R. Saberi Riseh[3]
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran
1. 0009-0006-2761-3650, 2. 0000-0002-3492-8355 , 3. 0000-0002-8791-7756

(Received: March 9, 2024 - Accepted: May 18, 2024)

Abstract

Using microcapsulation in formulation of biological agents such as antagositic bacteria plays an important role in increasing the efficiency and stability of these agents in the adverse environmental conditions. In the present study, the effect of encapsulation of *Pseudomonas fluorescens* VUPF5 bacteria with alginate-whey protein and silica and zinc oxide nanoparticles was investigated on some important elements of the tomato plant, the number of eggs, oviposition period and the Longevity of the tomato moth *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechidae). Greenhouse experiments were carried out at 27±2 °C, relative humidity of 60±5% and photoperiod of 16:8 h light:dark. The amount of some importatnt nutrients in tomato plant were measured in four treatments including: 1) plant treated with capsulated bacteria, 2) plant treated with zinc oxide + silica nanoparticles, 3) plant treated with uncoated bacteria, and 4) plant treated with water + alginate + whey protein (control). The results indicated that treatment of the plants with the capsulated bacteria caused an increase of 10.2, 13.8 and 1.6 times the amount of phosphorus, potassium and iron elements respectively compared to control plants, Moreover, length of the adult pre-oviposition period (APOP), the total pre-oviposition period (TPOP), and the Longevity were longer in the insects were fed on the plants treated with the capsulated bacteria. But, the number of eggs were fewer compared with insects fed on the control plants. The results showed that the bacteria improved plant growth and increased its resistance against *T. absoluta*.

Key words: Capsulated bacteria, pests, plant essential elements, Tomato plant resistance

*Corresponding author: shahidi@vru.ac.ir