تاثیر کاربرد باکتری آنتاگونیست *Bacillus subtilis* وسالیسیلیک اسید در گیاه گوجه فرنگی در برابر پژمردگی فوزاریومی و *Meloidogyne javanica*

سمانه دشتی‌پور[۱*]، نوازله صاحبانی[۲] و حشمت‌اله امینیان[۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، بیمارشناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران.
۲- دانشیار، گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران.
*مسئول مکاتبه Email: samane.dashtipoor1988@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش:۹۵/۱۰/۲۷

چکیده

دراین تحقیق اثرات مستقیم کاربرد باکتری آنتاگونیست *Bacillus subtilis* و اسید سالیسیلیک بررشد قارچ فوزاریوم *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در شرایط آزمایشگاهی در قالب آزمون تقابل و مواد فرار مورد بررسی قرار گرفت. اثرغلظت-های مختلف اسید سالیسیلیک (۸-دو میلی مولار) بررشد فوزاریوم به روش اختلاط با محیط کشت آزمایش شد. در آزمایش گلخانه ای اثرات القایی اسیدسالیسیلیک و*Bacillus subtilis* برتغییر فعالیت‌های آنزیمی فنیل آلانین آمونیالیاز به عنوان یکی از آنزیم‌های مهم دفاعی گیاه، در گوجه‌فرنگی آلوده به پژمردگی فوزاریومی و *Meloidogyne javanica* ودرحالت تعامل دو بیماری مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج، کلیه غلظت های اسید سالیسیلیک به طور کامل از رشد قارچ عامل بیماری جلوگیری کرد. در تست تقابل و مواد فرار باکتری به طور معنی‌داری موجب کنترل موثر فوزاریوم شد که به ترتیب ۳۴/۸ و۳۵ درصد بوده است. ارزیابی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز نشان داد که تمام تیمارهای باکتری و اسید سالیسیلیک به طور موثری موجب افزایش سطح فعالیت آنزیم در مقایسه با شاهد و گیاهان آلوده به فوزاریوم و نماتد شدند و بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار آلوده به پاتوژن ها همراه با باکتری و اسید سالیسیلیک درروز پنجم بعداز مایه زنی بود.

واژه‌های کلیدی: فوزاریوم، نماتد گره ریشه،فنیل آلانین آمونیالیاز، سالیسیلیک اسید و *Bacillus*.

مقدمه

پژمردگی فوزاریومی یکی از بیماری‌های بسیار مهم گوجه فرنگی باعامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Snyder& Hasen(Sacc) است (وست کات۱۹۷۹). کنترل این بیماری اغلب با استفاده ازسموم شیمیایی و یا ارقام مقاوم انجام می گیرد. ازبین بردن اینوکولوم اولیه واصلاح ارقام مقاوم بهترین شیوه کنترل پوسیدگی فوزاریومی ریشه است (گاملیل ۱۹۹۶).

نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne*spp. (Treub) Chitwood به طور قابل توجهی موجب تغییر فعالیت های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی میزبان می شود (پاواراجو همکاران ۲۰۱۰) و در کشت‌های گلخانه‌ای، که دما برای تولید مثل نماتد مولد گره ریشه مناسب است، رایج می باشد (سیکورا و فرناندز، ۲۰۰۵).گونه های *M. javanica* با داشتن پراکنش جهانی، یکی از چهار گونه مهم از این جنس است (مهدیخانی و همکاران ۲۰۰۳). در گوجه فرنگی آلوده به گونه‌های نماتد *Meloidogyne* خسارت، زمانی که با آلودگی فوزاریومی همراه شود، شدت می یابد (اوستندراپ و سیکورا۱۹۸۹). روش‌های مختلفی برای کنترل و کاهش خسارت نماتدهای مولد گره ریشه پیشنهاد شده است و اغلب تلفیقی از روش ها مانند استفاده از نماتدکش‌ها، آیش، ضدعفونی اندام‌ها و قطعات گیاهی با آب داغ و آفتاب‌دهی برای کسب نتیجه بهتر می باشد (جپسون ۱۹۸۷).

بـه دلیـل وجـود اثـرات مضـرباقیمانده سـموم،آلودگی زیست محیطی، هزینه‌ی بالا وایجاد مقاومت در برابرقـارچ، روش‌هایی از قبیل کنترل زیستی و القای مقاومت، می تواند به عنوان روش‌های ایمن محیط زیست درکنترل نماتـد گـره ریشه وپژمردگی فوزاریومی استفاد می‌شود (پاول ۱۹۷۱).

زمانی که گیاه توسط ترکیبات شیمیایی القا کننـده و یـا میکروارگانیسم‌ها تحریک می گردد، نـوعی مقاومـت تولیـد می شود که مانع از گسترش طیـف وسـیعی از پـاتوژن هـا می گردد. ایـن نـوع مقاومـت، از نـوع مقاومـت سیسـتمیک القـایی (ISR) نامیـده شـده اسـت (گوسـکی و همکـاران ۲۰۰۱)وموجب فعال شدن ژن‌های دفاعی گیاه و یا افـزایش بیان آنها می شود. عکس العمل گیاه ممکن است به صورت موضعی با تولید ترکیبات فنلـی بیشـتر، ROS، فیتوالکسـین وبا لیگنینی شدن درمحل آلودگی تظاهر نماید و یا بصورت سیستمیک، با تولید ترکیبات و آنزیم‌های دفاعی در قسمت-های دیگر گیاه صورت پذیرد(اگالو و مکلور ۱۹۹۶). باکتری های PGPR از جمله گونـه‌هـای *Bacillus* بـا القـای سیسـتم ایمنـی و بـا تغییـرات فیزیولـوژیکی و بیوشـیمیایی نفـوذ و گسـترش پـاتوژن را درمیزبـان محـدود مـی کننـد (بوچنور۱۹۹۸). اسید سالیسـیلیک در برخـی سیسـتم‌هـای انتقال سیگنال موجب تحریک آنزیم‌های سنتزکننده ترکیبات دفـاعی در گیـاه مـی‌گـردد وکـاربرد خـارجی آن بـا تولیـد مقاومت سیستمیک ظرفیت دفاعی گیـاه را علیـه پـاتوژن‌هـا افزایش می‌دهد (تون و همکاران ۲۰۰۱). با توجـه بـه نقـش مهم القای مقاومت به عنوان یکی از مکانیسم‌های عمل اسید سالیسـیلیک و *B.subtilis*، در ایـن تحقیـق بـه بررسـی اثرکاربرد آنهابر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، به عنوان یک ترکیب دفاعی و مـارکر القـا مقاومـت در گیاه گوجه‌فرنگـی آلـوده نماتـد مولـد گـره و پژمردگـی فوزاریومی پرداخته شده است.

مواد و روش ها

تهیه رقـت هـای مختلـف اسـید سالیسـیلیک و بـاکتری *B. subtilis*

اسید سالیسیلیک شرکت مـرک (Merk) در غلظـت هـای ۳،۲ ، ۴ ،۵، ۶، ۷ و ۸ میلی مولار بـا اسـتفاده از روش اکـا و همکاران (۱۹۹۹)تهیه شد. بـاکتری*B. subtilis* از آزمایشـگاه بیماری شناسـی پـردیس ابوریحـان تهیـه و آمـاده سـازی سوسپانسیون باکتری بـا روش تامپسـون (۱۹۹۶) درطـول مـوج λ =۵۹۰ nm ، OD=۰/۶ ودرغلظـت $۱۰^{۹}$cfu/ml انجـام گرفت.

تهیه قارچ عامل بیماری

جدایـــه *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* از آزمایشگاه بیماری شناسی پـردیس ابوریحـان تهیـه شـد. مطابق با روش فرادکین (۱۹۸۵) سوسپانسـیونی بـا غلظـت ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی لیتر آب مقطر استریل با استفاده از لام گلبـول شـمار،از کشـت ۱۰ روزه قـارچ روی محـیط کشت PDA وبا افـزودن آب مقطـر سـترون بـه دسـت آمـد (بتا،۱۹۹۹).

تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح نماتد *M.javanica*

نمونه گیاهان آلـوده از مـزارع گوجـه فرنگـی پاکدشـت جمع آوری شدو شناسـایی گونـه‌ی *Meloidogyne javanica* براساس الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بـدن نماتـد مـاده،از طریق کلید جپسون(۱۹۸۷) انجام گرفـت. پـس از شناسـایی چندین دوره‌ی متوالی تکثیر روی رقم حساس گوجه فرنگی (ارلی اوربانا Y)جمعیت کافی نماتد به وجود آمـد. لارو سـن دوم به عنوان اینوکلوم نماتـد،طبق روش هوسـی و بـارکر، (۱۹۷۳) مورد استفاده قرار گرفت.برای شـمارش لاروهـای سن دوم، محتویات پتـری دیـش در یـک بشـر ریختـه شـد وحجم سوسپانسیون یادداشت شد. سـپس در سـه نوبـت، بعد از به هم زدن محتویات بشر جهت یکنواخت شدن، یـک میلـی لیتـر از سوسپانسـیون برداشـته شـد ودر ظـرف شمارش زیر بینوکولر تعـداد لاروهـای سـن دوم شـمارش گردیدو طبق رابطه زیر تعداد کل لاروهای سن دوم بدسـت آمد:

میانگین لاروهای سن دوم در یک میلی لیتر ×حجم کل سوسپانسیون = تعداد کل لاروهای سن دوم
در نهایت حجم سوسپانسیون لازم که محتوی ۲۰۰۰ لارو سن دو باشد ، تعیین شد.

اثر بازدارندگی باکتری آنتاگونیست بررشد فوزاریوم در شرایط آزمایشگاهی

آزمون اثرمتقابل

این آزمون طبق روش دنیس ووبستر(۱۹۷۱) انجام گرفت. ابتدا نیمی از ظروف کشت حاوی PDA با کشت ۲۴ ساعته *B.subtilis* به طور یکنواخت پر شد،سپس در نیمه دیگر به فاصله‌ی یک سانتی‌متر از حاشیه‌ی ظروف کشت پلاکی به قطر نیم سانتی‌متر از کشت هفت روزه *F.oxsyporum* f.sp.*lycopersici* قرارداده شد. در پتری‌های شاهد به جای باکتری از آب مقطر استریل استفاده شد. زمانی که قارچ در شاهد تمام نیمه ی سطح ظروف کشت را اشغال نمود، فاصله ی کلنی قارچ و باکتری در تیمار اندازه‌گیری شد. آزمایش با دو تیمار قارچ + باکتری و قارچ (شاهد) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت.

آزمون اثر مواد فرار

بر اساس روش فیدامن و روزال(۱۹۹۳)، در یک کفه تشتک ظروف کشت حاوی PDA، باکتری ۲۴ ساعته چمنی کشت شد. در کفه دیگر تشتک ، پلاکی به قطر نیم سانتی-متر ازکشت هفت روزه ی فوزاریوم در مرکز قرار داده شد سپس در مجاورت شعله، درب های تشتک روی هم قرار گرفتند. در شاهد به جای باکتری از آب مقطر استریل استفاده شد. زمانی که قارچ در ظروف کشت شاهد تمام سطح ظرف کشت را اشغال نمود، مساحت کلنی قارچ در تیمار اندازه گیری شد. این تست با دو تیمار قارچ + باکتری و قارچ (شاهد) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت.

بررسی غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک(SA) بر رشد قارچ فوزاریوم به روش اختلاط با محیط کشت

غلظت‌های صفر ،۲،۳، ۴ ، ۵ ، ۶ ، ۷ ، ۸ میلی مولار از اسید سالیسیلیک به روش مخلوط با محیط کشت PDA تهیه شد. در وسط هر پتری پلاگی از قارچ گذاشته شد. درصد بازدارندگی اسید سالیسیلیک روی قارچ، طبق فرمول زیرمحاسبه گردید:

$$N= (A-B)/A\times100$$

A= قطررشد کلنی شاهد،B = قطر رشد کلنی تیمار، N = درصد بازدارندگی (اعتباریان وهمکاران، ۲۰۰۵). آزمایش با هشت تیمار و چهار تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت.

بررسی اثرات مستقیم غلظت‌های مختلف SA برمیزان رشد باکتری *Bacillus subtiliss* با روش اسپکتروفتومتری

غلظت‌های صفر ،۲،۳، ۴ ، ۵ ، ۶ ، ۷ ، ۸ میلی مولاراسید سالیسیلیک در محیط کشت NB تهیه شد و یک میلی لیتر از سوسپانسیون *B.subtilis* با غلظت10^9cfu/ml به هرلوله اضافه گردید. لوله ها به مدت ۲۴ ساعت جهت رشد یکنواخت باکتری روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس شش دقیقه درrpm ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل با یک میلی لیتر آب مقطر استریل روی ورتکس مخلوط شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور آنها در طول موج ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری و برآورد جمعیت گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با هشت تیمار و چهار تکرار انجام شد.آنالیز داده ها براساس آزمون دانکن درسطح احتمال ۵٪ با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

بررسی فعالیت آنزیم PAL در گوجه فرنگی در شرایط گلخانه ای

بذور گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y در گلدان‌های یک کیلویی با قطر دهانه هشت سانتی متر در شرایط یکنواخت

ودمای ۲±۲۵درجه ی سانتیگراد حاوی خاک استریل شامل خاک، ماسه و کود برگ (۱:۱:۱) کشت گردید. گیاهچه‌ها در مرحله‌ی چهار تا شش برگی با اسید سالیسیلیکو باکتری تیمار شدندو دو روز بعد با قارچ و نماتد مایه زنی شدند (جدایه ی قارچی که قبلادرتحقیقات همسو با این پایان نامه درگلخانه درجه‌ی بالای بیماریزایی آن به اثبات رسیده بود).آزمایش در قالب طرح فاکتوریل ۹ × ۴ بر پایه‌ی کاملاً تصادفی که فاکتور A شامل۹ تیمار و فاکتور B شامل چهار زمان نمونه برداری در روزهای یک،سه و هفت پس از مایه زنی با نماتد و قارچ انجام شد. آنالیزهای آماری نیز با استفاده ازنرم افزار(9.0) SAS و براساس آزمون چند دامنه ای دانکن برای تعیین میزان فعالیت آنزیم PAl انجام شد. تیمارها شامل: (P) گیاهان مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل به عنوان شاهد سالم(N) گیاهان مایه زنی شده با جمعیت ۲۰۰۰ تایی لاروسندوم*M.javanica* به این شکل که با میله شیشه‌ای سترون سوراخ به عمق یک سانتی متر ایجادشد و سوسپانسیون در مجاورت ریشه قرار گرفت. (F) گیاهان مایه زنی شده با ۲۵ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت spor/ml $۱۰^{۶}$ به روش خیساندن خاک با ریختن سوسپانسیون به پای گیاه (طبق صاحبانی ۲۰۰۴)، (SA) گیاهان مایه‌زنی شده با ۲۵ میلی لیتر اسید سالیسیلیک پنج میلی مولار به روش اسپری برگ‌ها) (B)(گیاهان مایه‌زنی شده با۲۵ میلی لیتر سوسپانسیون $۱۰^{۴}$cfu/ml باکتری به روش خیساندن خاک با ریختن به پای گیاه)(N+F+SA), گیاهان آلوده به قارچ، نماتد به همراه اسپری اسید سالیسیلیک، (N+B+SA) گیاهان آلوده به نماتد و قارچ و ریختن باکتری به پای گیاه،(F+B+SA) گیاه آلوده به قارچ به همراه باکتری و اسید سالیسیلیک،(N+F+B+SA) گیاهان آلوده به نماتد و قارچ به همراه باکتری و اسید سالیسیلیک.

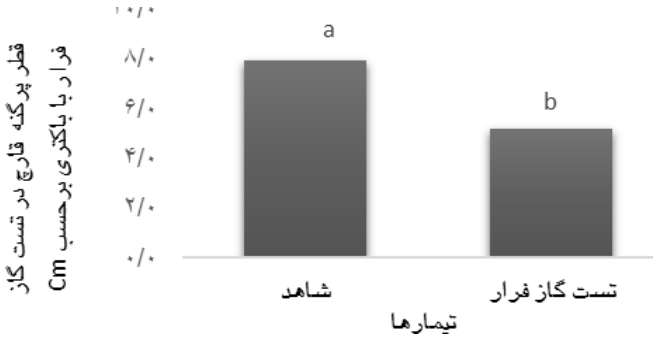
ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

طبق روش روویني(۱۹۸۵) نیم گرم از بافت ریشه با کمک ازت مایع کوبیده شدو یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مول با pH= ۶ و مخلوط شد.سپس در rpm ۱۳۰۰۰به مدت ۲۰ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. دو میلی لیتر مخلوط واکنش شامل ۱۸۰۰ میکرولیتر محلول بافر (Tris- HCl)۰/۵ مول با(pH ۶/۸) و فنیل آلانین شش میکرومول و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی تهیه شد و به مدت ۷۰ دقیقه در حمام ماری ۳۷ درجه سانتیگراد تیمار شدوبا افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک پنج نرمال به هر لوله در دقیقه هفتادم، واکنش متوقف شد. برای رسم منحنی استاندارد PAL از ماده خالص ترانس سینامیک اسید استفاده شد. غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/4، ۰/۷، ۱، ۲، ۷ و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر از این ماده در بافر تریس فاقد فنیل آلانین تهیه شد. حجم محلول-ها با افزودن تریس اسیدی به دو میلی‌لیتر رسانده شد. میزان جذب در هر لوله درطول موج λ max=۲۹۰ nm اندازه‌گیری شد. برای هر غلظت چهار تکراردرنظرگرفته شد (چن و همکاران ۲۰۰۰)

نتایج و بحث

ارزیابی اثر بازدارندگی باکتری*B.subtilis* بررشد قارچ به روش آزمون کشت متقابل و آزمون مواد فرار

نتایج حاصل ازآزمون کشت متقابل(Dual-culture) و آزمون مواد فرار نشان داد که باکتری به طور موثری باعث کاهش رشد قارچ شده است. در این آزمایش میزان بازدارندگی باکتری به ترتیب ۳۴/۸و۳۵ برآورد شد (شکل-های ۱ و ۲).

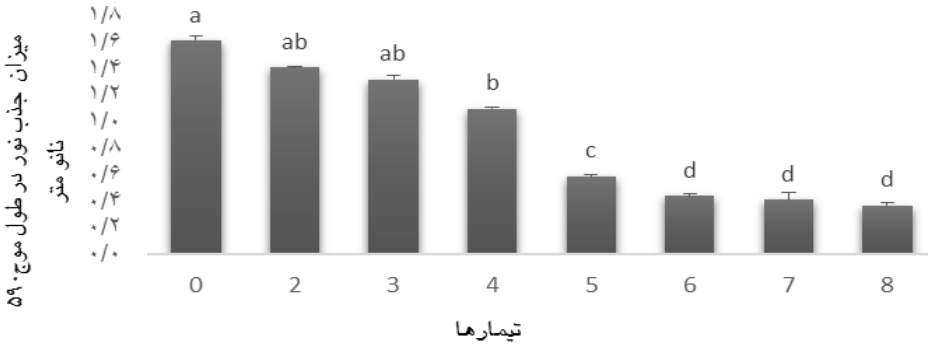


شکل ۱- اثرترکیات فرار حاصل از باکتری *Bacillus subtilis* بررشد قارچ *Fusarium oxysporoum f.sp. lycopersici* ، هر تیمار دارای ۴ تکرار است. ستون هایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند بر اساس T-student **دارای اختلاف معنی دار می باشد.**

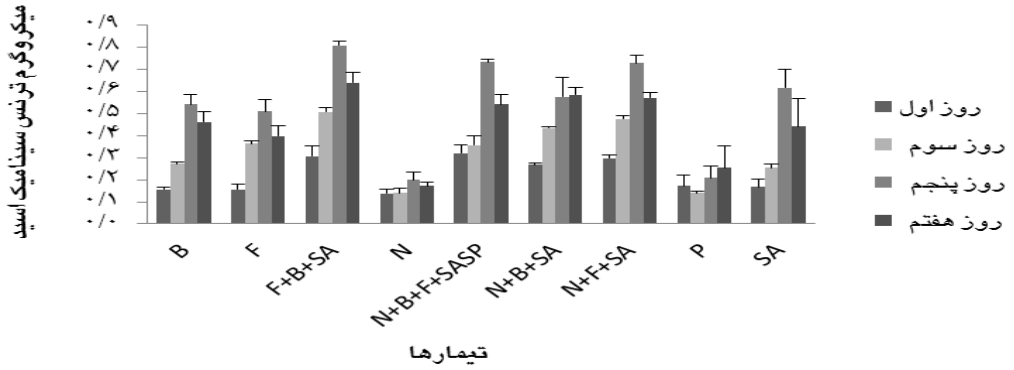
شکل۲- **اثر بازدارندگی باکتری *Bacillus subtilis* بر روی رشد قارچ *Fusarium oxysporoum f.sp. lycopersici* به روش آزمون تقابل،** هر تیمار دارای ۴ تکرار بوده وستون هایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند بر اساس T-student دارای اختلاف معنی دار می باشد.

ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بررشد باکتری *Bacillus subtilis* در شرایط آزمایشگاه

از غلظت چهار میلی مولار رشد باکتری کاهش معنی-داری نسبت به شاهدداشته است و در غلظت‌های شش ، هفت و هشت میلی‌مولار رشد با ۸۰ درصد کاهش به کمترین میزان خود رسیده است. این سه غلظت اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (شکل ۳).



شکل ۳- بررسی تاثیر غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید بررشد باکتری *Bacillus subtilis* **. این آزمایش دارای ۴ تکرار برای هر تیمار می باشد. ستون هایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند بر اساس** (آزمون دانکن**P≤۰/۰۵** درصد) **دارای اختلاف معنی دار می باشد.**



شکل۴- تغییرات فعالیت آنـزیم فنیـل آلانـین آمونیالیـاز در ریشـه ی گوجـه فرنگـی مایـه زنـی شـده بـا *M.javanica*، *F.oxsysporoum f.sp.*lycopersici ،سالیسیلیک اسید و باکتری *Bacillus subtilis* . اعداد مربوط به نمودار میانگین چهار تکرار می باشند و بار روی سـتون هـا خطای استاندارد (±SE) می باشد. Control : گیاه سالم، F : گیاه مایه زنـی شـده بـا *Fusarium oxysporoum* f.sp. *lycopersic*، SA : گیـاه تیمار شده با سالیسیلیک اسید به شیوه ی اسپری برگ‌ها، N :گیاه مایه زنی شده با *M. javanica* و B: گیاه تیمارشده با *B. Subtilis*..

ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر رشد *Fusarium oxysporoum* f.sp. *lycopersici*

نتایج نشان داد که در تمـام غلظتهـا اسـید سالیسـیلیک دارای اثر بازدارندگی مستقیم به میزان٪۱۰۰ بررشـد قـارچ فوزاریوم هستند. طبق نتایج تست‌های آزمایشگاهی و نتایج سـیاهپوش ۱۳۸۹ و ناصـری نسـب و همکـاران (۲۰۱۱), غلظت پنج میلی مولار اسید سالیسیلیک به عنوان موثرترین غلظت در کنترل نماتد مولد گره ریشه و قارچ فوزاریـوم بـا کمترین اثر منفی بر رشد بـاکتری*Bacillus subtilis* انتخـاب شد و در آزمایش گلخانه‌ای به عنوان غلظت مـوثر و بـدون اثرات گیاه‌سوزی به کار رفت.

ارزیابی میزان فعالیـت آنـزیم فنیـل آلانـین آمونیالیـاز (PAL)

در تمامی تیمارها تـا روز پـنجم افـزایش میـزان آنـزیم دیـده شـد ولـی درروزهفـتم میـزان آنـزیم کـاهش یافـت. بیشـترین میـزان آنـزیم تولیـد شـده در تیمـارF+B+SA+N بود.درتیمارهـای تلفیقـی F+B+ SAوN+B+F+SA میـزان آنزیم تولید شده بیشتراز تیمارهای مجزای باکتری و اسـید سالیسیلیک بود. (شکل۴، جدول‌های۱و۲). نتـایج نشـان داد که استفاده از اسید سالیسیلیک در غلظت پنج میلی مولار و *B. subtilis* درغلظت10^9cfu/ml به طور موثر موجب افـزایش میزان آنزیم دفاعی PAL در گوجـه فرنگـی آلـوده بـه *M. javanica* و پژمردگی فوزاریومی شده است. کاربرد تلفیقی باکتری و اسید سالیسیلیک به دلیـل داشـتن مکـانیزم عمـل متفاوت، اثر بهتری نسبت به کاربرد جداگانه آنهـا داشـت و باتوجه به نتایج پیشنهاد می‌شود که اسید سالیسیلیک و *B. subtilis* به عنوان یک عامل القای مقاومت و افـزایش دهنـده ی ظرفیت دفاعی گیاه می تواند به عنوان روش ایمـن جهـت کنترل بیماری‌های پژمردگی فوزاریومی و نماتد مولـد گـره به کار رود. فیدامن و روزال(۱۹۹۳), نشان دادنـد کـه مـواد فـرار تولیـد شـده توسـط بـاکتری *B. subtilis* درشـرایط آزمایشـــگاهی مـــی توانـــد از رشـــد *Fusarium solani*، *F.culmurum* ، *F. avenaceum* جلـوگیری کنـد. نتـایج ناصری نسب و همکاران (۲۰۱۱)، نشان داد کـه اسـتفاده از اسید سالیسیلیک پنج میلـی مولارموجـب افـزایش مقاومـت گوجه فرنگی علیه نماتد *M. Javanica* می شود.

جدول ۱ – تجزیه واریانس مربوط به تغییرات آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در ریشه‌ی گوجه فرنگی تیمار شده با سالیسیلیک اسید و *B. subtilis* قبل از مایه زنی با نماتد گره ریشه *M.javanica* و قارچ *Fusarium oxysporoum* f.sp. *lycopersici*

منبع تغییرات (SOV)	درجه ی آزادی(df)	میانگین مربعات (MS)
روزهای نمونه برداری (A)	۳	۰/۷۳۳**
تیمار(B)	۸	۰/۳۱۰**
A×B	۲۴	۰/۰۲۴**
خطا ی ازمایش	۱۰۸	۰/۰۰۸۲
کل	۱۴۳	۶/۱۵۰

** به احتمال ۹۹/۹۹ درصد($P\leq0.01$) اختلاف معنی دار است CV= 13. 34

پیش تیمارگیاهان باعوامل میکروبی غیربیماریزا یا القا کننده‌های شیمیایی موجب ایجاد مقاومت سیستمیک در مقابل دامنه های وسیعی از پاتوژن‌ها می‌شود (ون لون ۲۰۰۰). نتایج سیاهپوش (۱۳۸۹)، نشان می دهدکه تحریک خیار مایه کوبی شده با نماتد مولد گره ریشه توسط محرک های میکروبی و شیمیایی، مقدار فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در روز پنجم به اوج خود رسیده و سپس کاهش می یابد. بعضی از باکتری ها از جمله *Bacillus* spp. با تولید آنتی بیوتیک و افزایش سطح فعالیت آنزیم های دفاعی مثل پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز(PAL) در کنترل بیماری های خاکزاد مورد استفاده قرار میگیرند (جایاراج و همکاران ۲۰۰۴). *B. subtilis* موجب القای مقاومت در برابر *M .incognita* و *M. arenaria* در گیاه پنبه شده است (سیکورا ۱۹۸۸). کمال و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی تغییر در فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاهان پیاز تیمار شده با غلظت های دو میلی‌مولار اسید سالیسیلیک(اسپری برگی) و سپس مایه‌زنی شده با *Stemphylium vesicarium* را بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که مقدار این ترکیبات در گیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک و سپس مایه‌زنی شده با قارچ، بیشتر از گیاهان تیمار شده با آب و مایه‌زنی شده با قارچ بوده است. استفاده از باکتری‌های بهبود دهنده ی رشد گیاه، روش ایمنی برای مدیریت بیماری های گیاهی است از جمله باکتری های تولید کننده ی اسپور، نظیر گونه های *Bacillus* باعث تحریک رشد گیاه (کلوپر و همکاران ،۲۰۰۴) و مقاومت سیستمیک القایی گیاه می شوند (ون لون ،۲۰۰۷).

جدول ۲– مقایسه‌ی میانگین مربوط به تغییرات آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در ریشه‌ی گوجه فرنگی مایه‌زنی شده با سالیسیلیک اسید و باکتری *B.subtilis.* در کنترل بیماری نماتد گره ریشه *M.javanica* و قارچ *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

روز های بعد از مایه زنی نماتد	تیمار ها								
	B	F	F+B+SA	N	N+B+F+ SA	N+B+ SA	N+F+ SA	p	SA
۱	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۳	n	۰/۳۲	۰/۲۶	۰/۲۹	۰/۱۷	۰/۱۶
	m-n	m-n	j-m		i-l	k-n	n-m	l-n	m-n
۳		۰/۳۶	۰/۵۰	۰/۱۴	۰/۳۵	۰/۴۳	۰/۴۷		۰/۲۵
		g-k	c-g	n	g-j	e-j	d-h		k-n
۵	۰/۵۴	۰/۵۱	۰/۸۰	۰/۲	۰/۳۵	۰/۵۷	۰/۷۳	۰/۲۰	۰/۶۱
	c-f	c-g	a	l-n	ab	c-d	Ab	l-n	b-d
۷	۰/۴۶	۰/۳۹	۰/۶۴	۰/۱۷	۰/۵۴	۰/۵۸	۰/۵۷	۰/۲۵	۰/۴۴
	e-i	f-k	bc	l-n	c-f	c-e	c-e	k-n	e-j

اعداد متن میانگین چهار تکرار است . میانگین هایی که در هر ستون و ردیف از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند با حروف بزرگ مشخص شده اند. تفاوت ها با آزمون دانکن ($P\leq0/05$) ارائه شده اند. **P** (گیاه سالم) ، **B** (گیاه مایه زنی شده با باکتری ***B.subtilis***)، **F** (گیاه مایه زنی شده با قارچ ***F.oxysporum* f.sp. *lycopersici***)، **N** (گیاه مایه زنی شده با نماتد)، **N+B+F+SA** (گیاه مایه زنی شده نماتد ، قارچ ، باکتری و سالیسیلیک اسید) ،**N+B+F +SA** (گیاه مایه زنی شده نماتد ، قارچ ، باکتری و سالیسیلیک اسید)، **N+B+SA** (گیاه مایه زنی شده با نماتد ، باکتری و سالیسیلیک اسید) ، **N+F+B**(گیاه مایه زنی شده با نماتد ، قارچ و باکتری) ، **N+F+SA** (گیاه مایه زنی شده با نماتد ، قارچ و سالیسیلیک اسید)، **SA** (گیاه مایه زنی شده با سالیسیلیک اسید).

منابع مورد استفاده

سیاهپوش س، ۱۳۸۹.کاربرد تلفیقی باکتری*Bacillus cereus* وسالیسلیک‌اسید علیه نماتد مولدگره ریشه *Meloidogyne javanica* روی خیار، پایان نامه کارشناسی ارشد پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

Batta Y A, 1999. Biological effect of two strains of microorganisms antagonistic to *Botrytis cinerea*: causal organism of gray mold on strawberry. An- Najah Univ.J.Res. Natural Sci. 13: 67-83.

Buchenauer H, 1998. Biological control of soil- borne diseases by rhizobacteria.Journal ofPlantDisease and Protection 105: 329-348.

Chen C , Belanger RR , Benhamou N, PaulitzTC, 2000.Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant-grow-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythiumaphanidermatum* .Physiological and Molecular Plant Pathol56:13-23.

Dennis C, Webster J, 1971b. Antagonistic Properties of Species Groups of *Trichoderma* (production of non-volatile antibiotics)Transaction of the British Mycological Society 57:41-48.

Etebatian H R, Scholberg P L, Eastwell KC, Sayler R, 2005.Biological control of apple blue mold with *pseudomonas fluerescens*.Can. J Microbiol51:591-598.

Fiddaman PJ and Rossa l S, 1993.The production of antifungal volatiles *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology 74: 119-126.

Fradkin A and Patrick Z A, 1985. Interaction between conidia of Cochilobolus sativum and soil bacteria as affected by physical contact andexogenus nutrients. *Canadian Journal of Plant Pathology 7,7-18.*

Gamliel A, Katan T, Yunis H and Katan J.1996.Fusarium wilt and crown rot of sweet basil:involvement of soilborne and airborne inoculums.Phytopathol86:56-62.

Guestky R, Shtienberg D, EladYandDinoor A, 2001.Combining biocontrolageuts to reduce variability of biological control, phytopathology 91:261-267Handelsman, J., and Stabb, V.1996. Biocontrol of soil borneplant pathogens. The Plant Cell 8:1855-1869.

Hussey RS, Barker KR, 1973, A comparision of methods of collecting inocula of *Meloidogyne*spp. Including a new technique, Plant Disease Reporter 57:1025-1028. International Oxon, UK, 320 pp.

Jayaraj J, Yi H, Liang GH, Muthukrishnan S Velazhahan R, 2004. Foliar application of *B. subtilis*AUBS1 reduces sheath blight and triggers defense mechanisms in rice. Journal of Plant Diseases and Protection115-125.

Jepson S B, 1987. Identification of Root-knot nematodes. Cambrian New Ltd. Jin, R.D., Suh, J.W., Park, RD Kim, YW Krishnan, HB and KimKY. 2005. Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersiconesculentum* Mill).Nematology 7(1):125-132.

Kloepper JW, Ryu C M and Zhang S. 2004.Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94: 1259–1266.

Mehdikhani E, Kheiri A, Mohammadi M, Eshtiaghi H, Okhovvat M, 2003. Three new records of Meloidogyne species for Iran. Iranian Journal Plant Pathology 39: (3, 4). 189-211.

Naserinasab F, Sahebani N , Etebarian HR, 2011.Biological control of *Meloidogyne javanica*by *Trichoderma harzianum* BI and Salicylic acid on Tomato Afr. J. Food Sci. 5(3) pp. 276 – 280.

Ogallo J L and Mcclure M A, 1996. Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematode in tomato phytopathology 86:498-501.

Oka Y, Cohen Y and Speigel Y. 1999.Local and systemic induced resistance to the root knot tomato by DL–O-amino-n-butyric acid. Phytopathology 89: 1138–1143.

Oostendorp M and Sikora RA, 1989. Seed treatment with antagonistic bacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. Review de Nematologie 12: 77-83.

Pavaraj M, Karthikairaj K, Rajan MK, 2010. Effect of leaf extract of Ageratiumconyzoides on biochemical profile of black gram, Vignamungo infected by root-knotnematode, *M. incognita*. J Biopest 3: 313-316.

Powel NT, 1971. Interactions betweennematodes and fungi in disease complexes .Ann .Rev .Phytopath. 9:253-274.

Reuveni Rand Bothma G C,1985. The relationship between promydaseactivity and resistance of *Sphaerotca fuligena* in melons, Phytopathologisclie Zeitschrift 114-260.

Sahebani N, 2004. Interaction *M. javanica*with *Fusariumoxysporum*f.sp*lycopersici*and evaluation some defence biochemical mechanisms [PhD]. [Tehran (Iran)]: University of Tehran.

Sikora RA, 1988. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Meded. Fac. Landb Wet. Rijksunive. Gent, 53:867-878.*

Sikora R A, Fernandez E, 2005. Nematode parasites of vegetables.Pp.319-392 *in* M. Luc, R.A.

Steiner, U andSchonbeck, F,1995. Induced disease resistance in monocots,In: Hammerschmidt, R., and Kuc, J. Induced resistance to disease in plant, Kluwer Academic publisher, Dordrecht Boston London 86-109.

Thompson D C, 1996.Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer patch symptoms Kentucky bluegrass, Plant disease 80:850-862. Thordal-Christensen,H, 2003.Fresh insights into processes of nonhostresistance.Curr.Opin. Plant Biol. 6:351-357.

Ton J, Van PeltJA,Van Loon LC and Pieterse CMJ, 2001. Differential effectiveness of salicylate-dependent and hasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. Mpmi.15:27-34.

Van Loon LC, BakkerPA HMandPieterse CMJ, 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36: 453-483.

Van LoonL C, 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology 119: 243-254.

Van Loon L C, 2000. Systemic induced resistance. In: *Mechanism of resistance to plant diseases*, Slusarenko AJ, Fraser RSS and Van Lon LC. (eds) Kluwer,Dordrecht,pp521-574.

Westcott C, 1979. Plant disease Hand Book.4th edition.Published by Van NostrandReihold Company, London.803PP.

Application Effects of *Bacillus subtilis* and Salicylic Acid on the Tomato Plants Against *Fusarium oxysporoum* f.sp. *lycopersici* and *Meloidogyne javanica*

S Dashtipoor[1*], N Sahebani[2] and H Aminian[2]

[1]MSc. Student, Aboreihan Pardis, University of Tehran, Tehran, Iran.
[2]Associate Professor, Aboreiahan Pardis, University of Tehran, Tehran, Iran.
*Corresponding author: samane.dashtipoor1988@gmail.com

Received: 30 January 2016 Accepted: 16 January 2017

Abstract

In this study, direct application effects of antagonistic bacteria *Bacillus subtilis* and Salicylic acid on Fusarium growth *Fusarium oxysporoum* f.sp. *lycopersici* examined in vitro, in two formats, contrast test and volatile materials test. Effect of different concentrations of salicylic acid (2-8 mM) on Fusarium growth has tested as a manner mixing with medium. In greenhouse tests induction effects was resuled from application of Salicylic acid and *Bacillus subtilis*on on activity of PAL as one of the most important enzymes in plant defense tomato which infected with Fusarium wilt and *Meloidogyne javanica* also it was investigated when the two diseases interact with each other. According to the results all Salicylic acid concentrations completely prevented growth of the fungui. In contrast tests and volatile, antagonist bacteria significantly controlled Fusarium that respectively was 34.8 and 35 %. Evaluation the activity PAL indicated that all treatments including bacteria and Salicylic acid effectively increased level of enzyme activity compared with control and infected plants with fungi and nematodes and highest enzyme activity was in plant treated with pathogens and *B. subtilis* and salicylic acid on fifth days after inoculation.

Keywords: Bacillus,Fusarium, PAL, Root knote nematode, SA.