جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۰ (۳۵۱-۳۳۹)

تلفیق سالیسیلیک اسید و *Bacillus subtilis* در کنترل پوسیدگی ساقه و ریشه خیار ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* و بررسی فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

حدیث یوسفی[۱]*، نواز اله صاحبانی[۲]، لیلا فرآورده[۳] و وحیده مهدوی[۴]
۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
۳، ۴، محقق و مربی پژوهش مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۴ - تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۴)

چکیده

در این تحقیق کاربرد سالیسیلیک اسید و باکتری *Bacillus subtilis* روی بیماری پوسیدگی ساقه و ریشه خیار ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* و القای مقاومت میزبان در مقابل پاتوژن مورد بررسی قرار گرفت. اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (۸-۲ میلی‌مولار) بر رشد *F. oxysporum* f. sp *radicis-cucumerinum* و *B. subtilis* آزمایش شد. نتایج نشان داد که همه غلظت‌های سالیسیلیک اسید روی رشد باکتری اثر منفی داشتند، همچنین غلظت‌های بیشتر از ۵ میلی‌مولار آن نیز به طور کامل از رشد قارچ عامل بیماری جلوگیری کرد. برای آزمایش‌های گلخانه‌ای سه غلظت ۳، ۵ و ۷ میلی‌مولار انتخاب شدند. این آزمایش‌ها به دو روش، کاربرد باکتری و سالیسیلیک اسید قبل و یا بعد از آلودگی قارچی انجام شدند. نتایج آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که تیمار گیاهان خیار با باکتری و سالیسیلیک اسید، قبل از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری سبب کاهش شدت بیماری و افزایش برخی فاکتورهای رشدی در مقایسه با گیاهان شاهد آلوده می‌شود. همچنین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در تیمار کاربرد تلفیقی باکتری و سالیسیلیک اسید در مقایسه با کاربرد هر کدام از آنها به تنهایی و نیز گیاهان شاهد سالم و آلوده افزایش یافته بود. بالاترین مقدار فعالیت این آنزیم در روز ششم بعد از کاربرد القاءکننده‌ها مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که کاربرد سالیسیلیک اسید به عنوان محرک شیمیایی و *B. subtilis* به عنوان عامل کنترل‌کننده بیولوژیک و نیز افزایش‌دهنده رشد گیاه، می‌تواند یک اقدام مفید و امیدبخش برای کنترل عوامل بیماریزای گیاهی از قبیل *F. oxysporum* f. sp. *radicis- cucumerinum* باشد.

واژه‌های کلیدی: القاء مقاومت، سالیسیلیک اسید، *Bacillus subtilis*، *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*، خیار

مقدمه

افزایش مقاومت گیاه نسبت به عوامل بیماریزا با استفاده از محرک‌های زنده یا غیرزنده، بدون تغییر در ساختار ژنتیکی آن القاء مقاومت نامیده می‌شود. در حقیقت این پدیده سبب افزایش سرعت و مقدار واکنش‌های دفاعی گیاه در برابر عوامل بیماریزا می‌شود

* نویسنده مسئول: حدیث یوسفی تلفن: ۰۲۱-۲۲۰۴۵۷۰۰ E-mail: yousefi.ariya@gmail.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

و هدف آن فعال کردن سیستم دفاع میزبان می‌باشد. گیاهان در اثر حمله عوامل بیماریزا چندین واکنش دفاعی نشان می‌دهند. یکی از این واکنش‌ها مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) است که می‌تواند توسط محصول ژنهای غیر بیماریزای پاتوژنها یا توسط عوامل غیر زنده فیزیکی یا شیمیایی که محرک نامیده می‌شوند، تحریک شود (Durrant & Dong, 2004). مقاومت سیستمیک به عنوان افزایش ظرفیت دفاعی گیاهان در برابر دامنه وسیعی از پاتوژنها و آفات است که بعد از تحریک مناسب حاصل می‌شود. به عبارت دیگر SAR، پدیده‌ای است که به موجب آن مکانیزم های دفاع گیاهان بوسیله پیش تیمار آنها با عوامل بیولوژیکی یا شیمیایی تحریک می‌شوند (Ryals *et al*., 1996). در مقاومت سیستمیک القاء شده (ISR) نیز مانند مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR)، مقاومت تحریک شده به قسمت‌های سالم گیاه منتقل می‌شود و در نتیجه نسبت به دامنه وسیعی از عوامل بیماریزا مقاومت بوجود می‌آید (Pieterse *et al*., 2002). مسیرهای هر دو نوع مقاومت ISR و SAR با هم سازگار است و تداخل مهمی میان آنها وجود ندارد، بنابراین وجود هر دو یک وسیله قابل توجه در جهت بهبود کنترل بیماری فراهم می‌کند (Pieterse *et al*., 2002). سالیسیلیک اسید (SA) از جمله القاءگرهای شیمیایی است که به طور معمول برای ایجاد اثرات سیستمیک آلودگی موضعی، استفاده می‌شود (Kessmann *et al*., 1994; Vallad & Goodman , 2004) و در تنظیم مقاومت علیه عوامل بیماریزا نقش دارد (Murphy *et al*., 1999 ; Naylor *et al*., 1998). سالیسیلیک اسید در حقیقت یک مولکول سیگنال‌دهنده طبیعی با ماهیت فنلی است که در فیزیولوژی گیاه به ویژه تحریک واکنش‌های دفاعی گیاه علیه عوامل بیماریزا نقش دارد (Prithiviraj *et al*., 2005). کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید سبب بیان مقاومت و افزایش ظرفیت دفاعی بافت‌ها به صورت بروز مقاومت سیستمیک اکتسابی می‌شود (Ryals *et al*., 1996). همچنین Murphy *et al*. (2000) گزارش کرده است که استفاده از این ماده در مقادیر غیر سمی برای گیاهان حساس توتون سبب افزایش مقاومت به عوامل بیماریزای قارچی نکروتروفیک در آنها می‌شود. Raju *et al*. (2008) تحریک برخی آنزیم‌های دفاعی و ترکیبات فنلی در ریشه‌ها و شاخه‌های دو ژنوتیپ گوناگون ارقام نخود حساس (L550) و مقاوم (ICC10) به بیماری پژمردگی فوزاریومی تیمار شده با سالیسیلیک اسید را بررسی کردند. آنها دریافتند که در تیمار با سالیسیلیک اسید و پاتوژن مقادیر آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ترکیبات فنلی در ریشه‌ها و شاخه‌های رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس است و هیچ گونه تغییر عمده‌ای در رقم حساس بعد از تیمار مشاهده نشده است. در گیاهان لوبیای دو هفته‌ای تیمار شده با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار، امکان جلوگیری از ایجاد زخم‌های موضعی ویروس نکروتیک توتون در برگ‌های اولیه لوبیا آلوده شده با این ویروس مشاهده شد . این بازدارندگی بویژه در غلظت‌های پایین سالیسیلیک اسید استفاده شده در مقایسه با گیاهان شاهد تیمار نشده، با افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز مرتبط بوده است. علاوه بر این، تجمع پروتئین تام نیز در مقایسه با گیاهان شاهد تیمار نشده، افزایش یافته بود (Fayza & Sabrey, 2006). در تحقیق دیگری اثرات سالیسیلیک اسید و قارچ مایکوریز (*GE*) *Glomus etunicatum* روی توسعه گیاهان گوجه‌فرنگی و امکان آلودگی بیماری پژمردگی فوزاریومی بررسی شده است. ابتدا غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید در توسعه میسلیوم *F. oxysporum* f. sp *lycopersici* (*Fol*) در محیط کشت تست شد و سپس دو غلظت سالیسیلیک اسید و *GE* برای آزمایشات گلخانه‌ای استفاده شدند. در بررسی‌های گلخانه‌ای تلفیق *GE* و سالیسیلیک اسید یک میلی‌مولار بیشترین اثر را روی بیماری داشته و شدت بیماری را حدود ۷۰ درصد کاهش داده است. نتایج بررسی‌ها نشان داد که *GE* سبب افزایش رشد گیاهان گوجه‌فرنگی می‌شود و می‌تواند در مقابل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی استفاده شود در حالی که سالیسیلیک اسید در القاء مقاومت در برابر پاتوژن مؤثر است. همچنین سالیسیلیک اسید اثر منفی روی تسخیر ریشه‌ها بوسیله *GE* دارد (Ozgonen *et al*., 2001).

باکتری‌های همزیست ریشه و افزایش‌دهنده رشد گیاه (PGPR) شامل یک دامنه وسیعی از باکتری‌های

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تسخیرکننده ریشه با توان افزایش رشد گیاه توسط مکانیزم‌های متعددی می‌باشند (Kloepper *et al.*, 1980). استرین‌های خاصی از باکتری‌های ریزوسفر سبب کاهش بیماری بوسیله فعال کردن یک مکانیزم مقاومت در گیاهان که مقاومت سیستمیک القاء شده ریزو باکتریایی (ISR) نامیده می‌شود، می گردند (Pieterse *et al.*, 2002). توانایی آنها برای تولید ترکیبات متنوع (از قبیل هورمونهای گیاهی، اسیدهای آلی، سیدروفورها) تثبیت نیتروژن، حل کردن فسفات و تولید آنتی‌بیوتیک‌های متوقف‌کننده رشد ریزوباکتری‌های مخرب و تولید مواد بیولوژیکی فعال یا تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGRS)، مکانیزم‌های عمده‌ای هستند که توسط آنها باکتری‌های PGPR، رشد و توسعه گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. علاوه بر افزایش رشد گیاه، کاربرد استرین‌های خاصی از PGPRها روی بذور و گیاهچه‌ها، سبب بروز مقاومت سیستمیک القائی در گیاهان تیمار شده می‌شود (Kloepper *et al.*, 1992). PGPRها می‌توانند عوامل بیماریزا را به طور مستقیم و غیرمستقیم تحت تأثیر قرار دهند. تسخیر ریشه توسط ریزوباکتری‌های مخصوصی مقاومت سیستمیک را که در برابر عوامل بیماریزای قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدها مؤثر است، تحریک می‌کند (Kurata, 1994). مقاومت سیستمیک القاء شده در تعداد زیادی از گیاهان از قبیل میخک، خیار، توتون، گوجه‌فرنگی، لوبیا، تربچه و آرابیدوپسیس بررسی شده است. دو استرین *B. pumilis* (استرین‌های ۲۰۳-۷ و ۲۰۳-۲۰۳۶) و یک استرین *B. mycoides* (استرین BACJ) شدت بیماری لکه برگی سرکوسپورایی ایجاد شده توسط *Cercospora beticola* را کاهش می‌دهند (Bargabus *et al.*, 2002; Bargabus *et al.*, 2004). بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار گلخانه‌ای با عامل *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *radicis-cucumerinum* D.J.Vakalounakis یکی از مهمترین بیماری‌های مخرب خیار گلخانه‌ای در بسیاری از کشورهای جهان از جمله یونان، کانادا و کلمبیا، فرانسه، اسپانیا و بلغارستان می‌باشد (Vakalounakis, 1996; Punja & Parker, 2000; Moreno *et al.*, 2001). اکنون در اکثر گلخانه‌های خیار کشور مانند جیرفت و یزد این بیماری وجود دارد (Shahriyari & Zare, 2007). علائم به صورت پوسیدگی روی طوقه و معمولاً یک سمت ساقه به رنگ سبز روشن متمایل به قهوه‌ای ظاهر و سپس به سمت ریشه گسترش می‌یابد، با پیشرفت بیماری اندام قارچ به رنگ سفید و سپس نارنجی در محل آلوده مشاهده می‌شود. ریشه‌های اولیه، ثانویه، پایه ساقه و بالاخره بافت آوندی قهوه‌ای می‌شوند. مراحل پیشرفته بیماری شامل تسخیر رو به بالا و پیشرفته ساقه است. گیاهان آلوده یک ساقه سفت و محکم با توده‌های اسپوری نارنجی صورتی و رشد پنبه‌ای مانند سفید قارچی روی سطح خارجی ساقه خود دارند.

هدف از انجام این تحقیق استفاده از سالیسیلیک اسید و باکتری *B. subtilis* به تنهایی و در تلفیق با یکدیگر جهت کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و ساقه خیار توسط *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* بوده است. در این تحقیق همچنین القاء گیاهان از جنبه بیوشیمیایی با بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

کاشت خیار و شرایط نگهداری

برای کشت خیار از مخلوط کمپوست برگ، ماسه، پرلیت و خاک مزرعه به نسبت ۱:۲:۱:۱ و سترون شده در اتوکلاو استفاده شد. سپس چهار عدد بذر رقم متحمل فستیوال در گلدان‌های کوچک با قطر دهانه ۸ سانتی‌متر کاشته شد. در مرحله گیاهچه‌ای گلدان‌ها تنک شدند به طوری که در هر گلدان دو گیاه باقی ماند و در شرایط یکنواخت (دمای ۲۴±۲°C و نور طبیعی اردیبهشت‌ماه) تا مرحله یک تا دو برگی برای انجام آزمایش نگهداری شدند.

تهیه قارچ عامل بیماری

جدایه p1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* از کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی پردیس ابوریحان تهیه شد.

تهیه زاد مایه خاک آلوده به قارچ

ابتدا ماسه و آرد ذرت به نسبت ۹ به ۱ مخلوط و به ازای ۱۰۰ گرم از مخلوط به دست آمده، ۱۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد، سپس ظروف حاوی مخلوط فوق

در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. بعد از خنک شدن چند قطعه ۵ میلی‌متری از محیط کشت ۴ روزه قارچ به مخلوط هر ظرف اضافه شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. این مخلوط با خاک سترون شده به نسبت ۱/۵ تا ۲ درصد وزنی مخلوط شد (Ricker, 1963).

روش مایه‌زنی گیاهان با عامل بیماری و شرایط نگهداری گیاهان آلوده

برای مایه‌زنی گیاهان از خاک آلوده به قارچ بیمارگر به مقدار ۱/۵ تا ۲ درصد مخلوط با خاک گلدان تازه و سترون متشکل از کمپوست برگ، ماسه، پرلیت و خاک مزرعه به نسبت ۱:۲:۱:۱ استفاده شد. برای گلدان‌های شاهد از مخلوط آرد ذرت و ماسه سترون فاقد عامل بیماری استفاده شد. سپس نشاهای خیار در مرحله یک تا دو برگی به خاک آلوده و شاهد منتقل شده و در گلخانه با دمای مناسب رشد قارچ و گیاه (دمای روزانه ۲۹ درجه و دمای شبانه ۲۴ درجه سلسیوس) تا ظهور علائم نگهداری شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتری *Bacillus subtilis*

سوش باکتری *B. subtilis* خالص از کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی پردیس ابوریحان تهیه شد. پس از کشت باکتری در داخل ظروف کشت حاوی محیط NB به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و باکتری‌های ته‌نشین شده در لوله سانتریفیوژ با آب مقطر سترون شستشو داده شد و عدد جذب سوسپانسیون حاصل به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. برای تهیه سوسپانسیون باکتری با غلظت موردنظر در این مطالعه (10^9CFU/ml) در طول موج ۵۹۰nm (OD= 0.06) استفاده شده است (Thompson, 1996).

نگهداری جدایه باکتری

جهت نگهداری طولانی مدت باکتری بعد از اطمینان از خلوص آن یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری درون شیشه‌های درب‌دار حاوی ۳-۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل و درب آنها با نوار پارافیلم مسدود شد. با این روش باکتری تا یکسال در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال قابل نگهداری خواهد بود.

تهیه محلول سالیسیلیک اسید (SA)

برای تهیه غلظت‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ میلی‌مولار از سالیسیلیک اسید شرکت مرک (Merck) استفاده شد، در این بررسی ابتدا مقادیر لازم از پودر سالیسیلیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر الکل ۹۶٪ حل شد و سپس حجم محلول با آب مقطر سترون به ۱ لیتر رسانده شد (Oka *et al*., 1999).

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر *Bacillus subtilis* در ظروف کشت

غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید از ۲ تا ۸ میلی‌مولار هر کدام در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت NA ترکیب و سپس در ظروف کشت‌های ۹ سانتی متری ریخته شد. سپس باکتری در آنها کشت داده شد (۴ تکرار برای هر غلظت و شاهد). بعد از ۴۸ ساعت ظروف کشت از نظر رشد کلنی‌های باکتری بررسی شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تیمار و چهار تکرار انجام شد. برای تیمار شاهد به جای محلول سالیسیلیک اسید از آب مقطر سترون استفاده شد.

بررسی اثر سالیسیلیک اسید روی قارچ عامل بیماری

غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید از ۲ تا ۸ میلی‌مولار، هر کدام در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA ترکیب و در ظروف کشت‌های ۹ سانتی‌متری ریخته شد. سپس یک قطعه ۵ میلی‌متری از کشت ۴ روزه قارچ در وسط هر کدام از آنها قرار داده شد. آزمایش زمانی که رشد کلنی قارچ تمام سطح پتری شاهد را فرا گرفته بود، متوقف شد و درصد بازدارندگی سالیسیلیک اسید روی قارچ از فرمول N=A-B/A محاسبه گردید.

A= قطر یا شعاع رشد کلنی شاهد، B = قطر یا شعاع رشد کلنی تیمار، N= درصد بازدارندگی (Etebarian *et al*., 2005)

آزمایش با ۸ تیمار و ۴ تکرار در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد.

اثر SA و *Bacillus subtilis* روی رشد گیاه و شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه

این بررسی به دو صورت انجام شد: ۱- آلوده‌سازی

گیاه با عامل بیماری و پس از ۲ هفته تیمار گیاه با محرک‌ها؛ ۲- ابتدا تیمار گیاه با محرک‌ها و بعد از ۴ روز آلوده‌سازی گیاه با عامل بیماری. تیمارها شامل: گیاه سالم (شاهد سالم) - گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری (شاهد آلوده) - گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری و ریختن سوسپانسیون باکتری پای گیاه (خیساندن خاک) - گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری و افزودن محلول سالیسیلیک اسید پای گیاه (خیساندن خاک) - گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری و تیمار شده با هر دو نوع محرک زنده (*B. subtilis*) و غیرزنده (سالیسیلیک اسید)، کاربرد هردو به صورت زمینی (خیساندن خاک) و یا کاربرد باکتری به صورت زمینی و سالیسیلیک اسید به صورت اسپری برگ‌ها بود. با توجه به نتایج بررسی‌هایی که در شرایط آزمایشگاه انجام گرفته بود، برای کارهای گلخانه‌ای از غلظت‌های ۵ میلی‌مولار و در مرحله آخر ۳ و ۷ میلی‌مولار استفاده شد. به این ترتیب که بعد از تهیه محلول‌های مورد نظر گیاهچه‌های خیار به دو روش اسپری برگ‌ها یا آبیاری در خاک با آنها تیمار شدند. برای آلوده سازی گیاهان از زاد مایه تهیه شده جدایه p1 قارچ عامل بیماری که قبلاً توسط تست بیماریزایی در گلخانه درجه بالای بیماریزایی آن به اثبات رسیده بود، استفاده شد. مایه‌زنی به روش آلوده‌سازی خاک با قارچ عامل بیماری انجام شد. ۴ هفته بعد از مایه‌زنی و ظهور کامل علائم شاخص شدت بیماری (جدول۱) و فاکتورهای رشد شامل وزن تازه ریشه و اندام‌های هوایی و ارتفاع بوته اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و چهار تکرار انجام شد. آنالیزهای آماری نیز با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.0) و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام شد.

بررسی تغییرات بیوشیمیایی

پس از انجام آزمایشات گلخانه‌ای و تعیین مؤثرترین روش یعنی کاربرد همزمان هر دو نوع القاءکننده با همدیگر، جهت بررسی تغییرات بیوشیمیایی از چهار تیمار شامل: کاربرد تلفیقی غلظت ۷ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به صورت محلول‌پاشی برگ و مایه‌زنی باکتری (10^9CFU/ml) به روش خیساندن خاک، سالیسیلیک اسید و باکتری به تنهایی با مقادیر فوق هر دو به روش خیساندن خاک، شاهد سالم فاقد بیمارگر شاهد آلوده (مایه‌زنی شده با قارچ)، در قالب طرح فاکتوریل ۸×۵ بر پایه کاملاً تصادفی که شامل پنج تیمار و هشت روز نمونه‌برداری متوالی بعد از کاربرد القاءکننده‌ها بود، استفاده شد. برای آلوده‌سازی گیاهان از روش خاک آلوده به قارچ عامل بیماری استفاده شد.

جدول ۱- شاخص شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه خیار با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (Vakalounakis, 1996)

علائم	مقیاس شدت بیماری
آ	۰
ب	۱
ج	۲
د	۳
و	۴

آ= بدون علائم، ب= پوسیدگی ابتدایی روی ریشه اصلی، ریشه‌های ثانویه و طوقه به همراه کمی تغییر رنگ آوندی در ساقه، ج= پوسیدگی متوسط روی ریشه اصلی، ریشه‌های ثانویه و طوقه به همراه کمی تغییر رنگ آوندی در ساقه، د= پوسیدگی شدید ریشه اصلی ریشه‌های ثانویه و طوقه همراه با پژمردگی یا کوتولگی و تغییر رنگ آوندی در ساقه، و= مرگ گیاهچه.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل ۱۸۰۰ میکرولیتر محلول بافر تریس اسیدی ۰/۵ مول با pH ۶/۸ و فنیل‌آلانین ۶ میکرو مول که به آن ۲۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی اضافه شده بود، تهیه شد. سپس این مخلوط به مدت ۷۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سلسیوس تیمار شد. بعد از گذشت زمان آزمایش، واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۵ نرمال به لوله‌ها متوقف شد. مقدار جذب نور برای هر لوله توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت شد (Sahebani, 2004).

تهیه منحنی استاندارد و معادله رگرسیون آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)

برای رسم منحنی استاندارد این آنزیم از ماده خالص ترانس سینامیک اسید استفاده شد. غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۷، ۱، ۲، ۷ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این ماده در بافر تریس فاقد فنیل‌آلانین تهیه و میزان جذب نور آن با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. حجم محلول هر لوله با افزودن تریس اسیدی به دو

میلی‌لیتر رسانده شد. میزان جذب نور در هر لوله در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت شد. برای هر غلظتی سه تکرار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر *Bacillus subtilis* در ظروف کشت

همه غلظت‌های ۲ تا ۸ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بر باکتری اثر منفی داشتند و تمامی این غلظت‌ها حتی تا مدت ۱۰ روز از رشد کلنی‌های باکتری در محیط جلوگیری کردند.

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر رشد *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

طبق نتایج به دست آمده با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید اثر بازدارندگی آن بر رشد قارچ *F. o. r. c* نیز بیشتر می‌شد و رابطه‌ای خطی بین غلظت سالیسیلیک اسید و اثر بازدارندگی آن وجود داشت. درصد بازدارندگی رشد قارچ در غلظت‌های ۲ تا ۴ میلی‌مولار از نظر آماری تفاوت معنی‌دار با یکدیگر نداشت اما میزان بازدارندگی در غلظت ۵ میلی‌مولار با میزان آن در تیمار غلظت‌های کمتر و بیشتر از خود دارای اختلاف معنی‌دار بود که این اختلاف به وضوح در تصاویر مشخص است (شکل ۱). طوری که در غلظت‌های کمتر از ۵ میلی‌مولار (۲، ۳ و ۴ میلی‌مولار) درصد بازدارندگی بسیار کم ولی در غلظت‌های بیشتر از آن (۶، ۷ و ۸ میلی‌مولار) درصد بازدارندگی ۱۰۰٪ بوده است (جدول ۲).

تأثیر باکتری *B. subtilis* و سالیسیلیک اسید بر شدت بیماری و فاکتورهای مختلف رشد در روش کاربرد آنها بعد از مایه‌زنی گیاه با عامل بیماری

تیمارها از نظر شدت بیماری پس از ۸ هفته در سطح ۱٪ با شاهد مثبت (گیاه آلوده به قارچ) و با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند، اما با شاهد منفی (گیاه سالم) دارای اختلاف معنی‌دار بودند. از نظر وزن تر ریشه همه تیمارها با شاهد مثبت اختلاف معنی‌داری داشتند. از نظر وزن اندام‌های هوایی تازه تمام تیمارها به جز تیمار تلفیقی کاربرد باکتری در خاک و محلول‌پاشی برگ با سالیسیلیک اسید ۵ میلی‌مولار با شاهدهای مثبت و منفی در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌داری داشتند و تیمار تلفیقی ذکر شده فقط با شاهد مثبت تفاوت معنی‌دار داشت. از نظر ارتفاع بوته کلیه تیمارها به جز تیمار شاهد منفی و تیمار تلفیقی کاربرد باکتری در خاک و محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید با غلظت ۵ میلی‌مولار روی برگ‌ها با شاهد مثبت تفاوت معنی‌داری نداشتند (جدول۳).

جدول ۲- در صد بازدارندگی از رشد *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* در محیط حاوی غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (Mm)

غلظت SA (mM)	درصد بازدارندگی (٪)
۲	۳/۴۳۵C
۳	۴/۵۹۲C
۴	۶/۵۲۵C
۵	۱۷/۴۹۵B
۶	۱۰۰A
۷	۱۰۰A
۸	۱۰۰A

Cv= 4.015

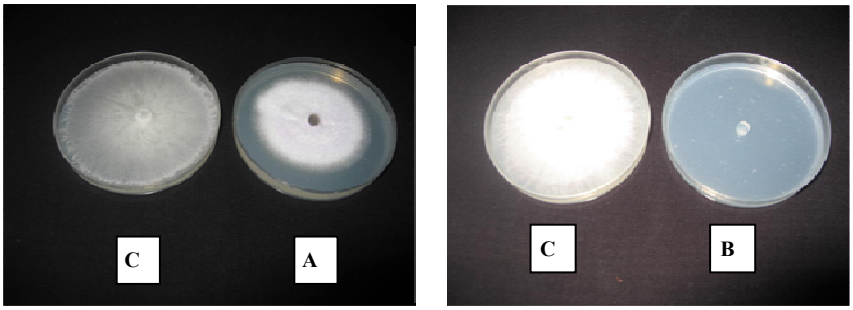
اعداد با حروف یکسان در سطح ۱٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

تأثیر *B. subtilis* و سالیسیلیک اسید بر شدت بیماری و برخی فاکتورهای رشدی در روش استفاده از آنها قبل از آلوده‌سازی گیاهان با عامل بیماری

تمام تیمارها به جز تیمار کاربرد سالیسیلیک اسید به تنهایی از نظر تأثیر روی شدت بیماری با شاهد مثبت (گیاه آلوده به قارچ) اختلاف معنی‌دار داشتند و سبب کاهش شدت بیماری شدند. در مورد فاکتور رشد وزن تر ریشه کلیه تیمارها با شاهد مثبت در سطح ۱٪ دارای تفاوت معنی‌داری بودند و وزن ریشه گیاه را افزایش دادند. وزن تازه اندام‌های هوایی همه تیمارها با تیمار شاهد مثبت تفاوتی معنی‌دار نداشت، از نظر وزن تازه اندام‌های هوایی و ارتفاع بوته بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول۴).

تأثیر *B. subtilis* و سالیسیلیک اسید بر شدت بیماری و برخی فاکتورهای رشدی در روش استفاده از آنها قبل از آلوده‌سازی گیاهان با عامل بیماری

از نظر شدت بیماری تیمار شاهد آلوده با سایر تیمارها به جز تیمارهای کاربرد غلظت‌های ۳ و ۷



شکل ۱- اثر غلظت‌های ۵ و ۸ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید روی *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (A-C). پتری‌های سمت چپ قارچ بدون سالیسیلیک اسید (شاهد)، پتری‌های سمت راست به ترتیب حروف الفبای لاتین غلظت‌های ۵ و ۸ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید

جدول ۳- تأثیر سالیسیلیک اسید و *Bacillus subtilis* بر شدت بیماری، وزن تر ریشه، وزن تازه اندام‌های هوایی و ارتفاع بوته در روش استفاده از آنها بعد از مایه‌زنی گیاه با عامل بیماری

تیمار	شدت بیماری	وزن تازه ریشه (g)	وزن تازه اندام‌های هوایی (g)	ارتفاع بوته (cm)
P+F+B	۱-۴۹۳۶۷ a	۱/۷۱۱۲ a	۲/۹۷۲۲b	۳/۲۶۱۹bc
P+F+SA_{sp}(5mM)+B	۱-۴۱۴۲۱a	۱/۷۸۸۰ a	۳/۱۲۳۰ab	۳/۸۱۱۲ab
P+F	۱/۵۷۳۱۳ a	۰/۸۴۵۴b	۲/۱۲۱۲c	۲/۹۴۴۵c
P+F+SA_{sd}(5mM)	۱/۵۷۳۱۳ a	۱/۴۴۰۲ a	۲/۹۴۰۲b	۳/۳۵۳bc
P+F+SA_{sd}(5mM)+B	۱/۴۹۳۶۷ a	۱/۴۵۹۱ a	۲/۸۶۷۸b	۲/۹۹۲۰bc
CO	۰/۰B	۱/۸۲۷۲ a	۳/۶۶۷۸a	۴/۴۲۲۳a

اعداد هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۱٪ بر اساس آزمون دانکن با هم اختلاف معنی‌دار ندارند (هر عدد میانگین چهار تکرار است.)
P= گیاه، F= قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه، B= باکتری، SA_{sp}= کاربرد سالیسیلیک اسید به صورت اسپری برگی، SA_{sd}= کاربرد سالیسیلیک اسید به صورت خیساندن خاک، co= گیاه شاهد.

جدول ۴- تأثیر سالیسیلیک اسید و *Bacillus subtilis* بر شدت بیماری، وزن تر ریشه، وزن تازه اندام‌های هوایی و ارتفاع بوته در روش استفاده از آنها قبل از مایه‌زنی گیاه با عامل بیماری

تیمار	شدت بیماری	وزن تازه ریشه (g)	وزن تازه اندام‌های هوایی (g)	ارتفاع بوته (cm)
CO	۰/۰d	۱/۸۱۷۵a	۲/۶۲۴۹a	۱/۸۲۰۳۵a
P+SA_{sd} (5mM)+F	۱/۴۱۴۲۱ab	۱/۹۵۳۲a	۲/۴۰۷۳a	۱/۵۸۶۳۶b
P+SA_{sd} (5mM)+B+F	۱/۲۰۷۱bc	۱/۸۰۸۴a	۲/۷۱۷۵a	۱/۵۵۹۴۱b
P+ SA_{sp} (5mM)+B+F	۱/۰c	۲/۱۱۷۹a	۲/۶۲۵۳a	۱/۶۹۸۹۷ab
P+B+F	۱/۱۰۳۶c	۲/۱۶۷۳A	۲/۷۶۶۴a	۱/۶۶۲۰۴ab
P+F	۱/۵۷۳۱a	۱/۱۱۷۸B	۲/۱۸۳۴a	۱/۶۳۹۳۱ab

اعداد هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۱٪ بر اساس آزمون دانکن با هم اختلاف معنی‌دار ندارند (هر عدد میانگین چهار تکرار است.)
P= گیاه، F= قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه، B= باکتری، SA_{sp}= سالیسیلیک اسید به صورت اسپری برگی، SA_{sd}= سالیسیلیک اسید به صورت خیساندن خاک، CO= گیاه شاهد.

میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به تنهایی در خاک و تیمار تلفیقی کاربرد سالیسیلیک اسید ۳ میلی‌مولار به روش خیساندن خاک یک هفته بعد از مایه‌زنی گیاهان با باکتری، اختلاف معنی‌داری داشت. بیشترین اثر روی کاهش شدت بیماری در تیمار تلفیقی باکتری و غلظت ۷ میلی‌مولار محلول‌پاشی هوایی سالیسیلیک اسید دیده شد و با تیمارهای تلفیقی،کاربرد غلظت ۷ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به صورت محلول‌پاشی هوایی یک

هفته بعد از مایه‌زنی گیاهان با باکتری، تیمار تلفیقی استفاده از باکتری و غلظت ۷ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید هر دو به صورت خیساندن خاک، تیمار سالیسیلیک اسید ۳ میلی‌مولار به روش خیساندن خاک یک هفته بعد از مایه‌زنی گیاهان با باکتری اختلاف معنی‌دار داشت. در مورد فاکتور رشد وزن تر ریشه، کلیه تیمارها اختلاف معنی‌داری با شاهد مثبت داشتند. از نظر وزن اندام‌های هوایی همه تیمارها به جز تیمار کاربرد ۳ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به تنهایی در خاک با شاهد آلوده تفاوتی معنی‌دار داشتند. از نظر ارتفاع بوته تیمار باکتری به تنهایی و همه تیمارهای تلفیقی با شاهد آلوده دارای تفاوت معنی‌داری بودند. بیشترین وزن اندام‌های هوایی و طول آن مربوط به تیمار تلفیقی باکتری و غلظت ۷ میلی‌مولار محلول‌پاشی برگ با سالیسیلیک اسید بود (جدول ۵).

جدول ۵- تأثیر سالیسیلیک اسید و *Bacillus subtilis* بر شدت بیماری و فاکتورهای رشدی مختلف در روش کاربرد آنها قبل از مایه‌زنی گیاهان با عامل بیماری در شرایط تغییر در زمان کاربرد و مقدار القاء کننده بیوشیمیایی

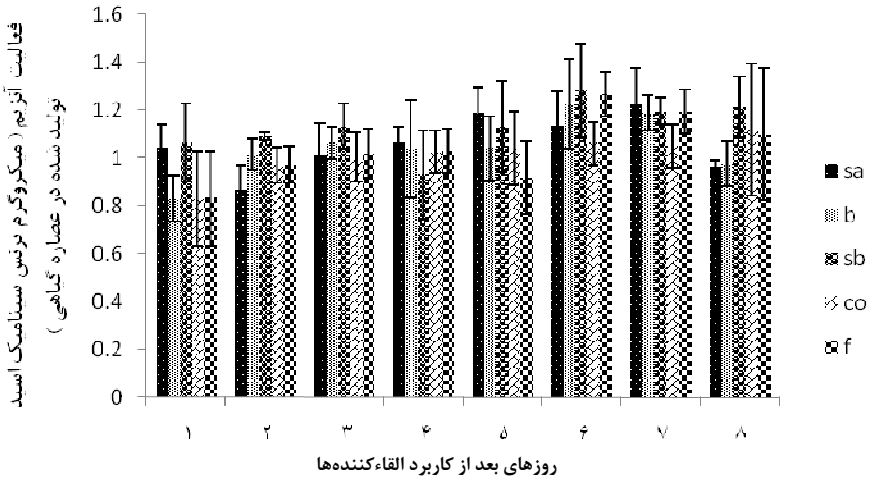
تیمار	شدت بیماری	وزن تازه ریشه (g)	وزن تازه اندام‌های هوایی (g)	ارتفاع بوته (cm)
P+B+F	۱/۱۰۳۶bc	۱/۷۰۵۷۵a	۲/۷۱۷۹a	۴/۳۵۴۲ab
P+SA_{sd}(7mM)+B+F	۱/۰c	۱/۶۰۰۲۸ab	۲/۵۸۶۰a	۴/۳۰۵۲ab
P+SA_{sp}(7mM)+B+F	۰/۵d	۱/۶۳۱۶۴ab	۲/۸۲۲۹a	۴/۳۹۱۷a
P+SA_{sd}(7mM)+F	۱/۴۱۴۲ab	۱/۲۰۲۱۲c	۲/۶۳۰۵a	۳/۷۵۲۶cd
P+SA_{sd}(3mM)+F	۱/۴۹۳۷a	۱/۲۰۷۴۶c	۰/۳۶۳۷c	۳/۸۶۴۰bcd
P+F	۱/۵۷۳۱a	۱/۰۴۸۸۱c	۰/۰۹۳۲c	۳/۶۵۳۷d
CO	۰/۰e	۱/۴۵۵۷۲b	۲/۲۴۴۹b	۳/۹۳۱۵abcd
P+SA_{sp}(7mM)+B+F*	۱/۰c	۱/۴۹۰۸ab	۲/۶۹۰۳a	۴/۳۴۵۹ab
P+SA_{sd}(3mM)+B+F**	۱/۳۱۰۷abc	۱/۴۵۷۴B	۲/۵۳۳۲a	۴/۲۰۰۴abc

اعداد هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۱٪ با هم اختلاف معنی‌دار ندارند (هر عدد میانگین چهار تکرار است). P=گیاه، F= قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه، B= باکتری، SA_{sp} = سالیسیلیک اسید به صورت اسپری برگی، SA_{sd}= کاربرد سالیسیلیک اسید به صورت خیساندن خاک CO= گیاهان شاهد، * و ** = تیمار گیاه با سالیسیلیک اسید یک هفته بعد از مایه‌زنی گیاه با باکتری و سه روز پس از آلوده‌سازی گیاه با عامل بیماری

بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاه خیار تیمار شده با سالیسیلیک اسید و *B. subtilis* و سپس مایه‌زنی با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

در این بررسی مقایسه تغییرات میزان فعالیت آنزیم در بین تیمارهای مختلف (شکل ۲) نشان داد که در گیاهان تیمار شده با باکتری و سالیسیلیک اسید میزان فعالیت آنزیم از روز اول تا روز چهارم دارای یک روند افزایشی بود اما فعالیت آنزیم تنها در روز اول با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت سپس در روز چهارم فعالیت آنزیم کاهش یافت حتی از تیمار شاهد نیز کمتر شد. ولی در روز پنجم دوباره فعالیت آنزیم افزایش یافت و به بیشترین میزان خود در روز ششم رسید. روز هفتم نیز فعالیت آنزیم کاهش یافت طوری که کمتر از روز هشتم شد، با این حال با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. القاء گیاهان با سالیسیلیک اسید به تنهایی نیز سبب افزایش فعالیت آنزیم در روز اول شد، اما با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. در روز دوم فعالیت آنزیم کاهش یافته و از روز سوم تا پنجم فعالیت آنزیم یک روند افزایشی داشت سپس در روز ششم دو مرتبه کاهش یافته، ولی روز هفتم یکبار دیگر افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود در این روز رسید و از آن به بعد فعالیت آن کاهش یافت. در طی مدت آزمایش فعالیت آنزیم تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. در تیمار کاربرد باکتری به تنهایی نیز تا روز هفتم فعالیت آنزیم روند افزایشی داشت و بیشترین فعالیت آنزیم در روز ششم مشاهده شد. در این تیمار فعالیت آنزیم اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. در گیاهانی که فقط با قارچ عامل بیماری

مایه‌زنی شده بودند فعالیت آنزیم تا روز پنجم دارای یک روند افزایشی بود اما روز پنجم کاهش یافت به طوری که میزان فعالیت آن کمتر از شاهد غیر آلوده شد. روز ششم دوباره افزایش یافته و به بیشترین میزان فعالیت خود در این روز رسید و بعد از آن نیز مجدداً کاهش یافت. تفاوت معنی‌داری بین فعالیت آنزیم در این گیاهان با گیاهان شاهد غیر آلوده مشاهده نشد. در طول مدت آزمایش فعالیت آنزیم گیاهان تیمار شاهد غیر آلوده یک روند صعودی را طی کرد به طوری که بیشترین میزان آن در روز هشتم مشاهده شد با این حال فعالیت آنزیم در این تیمار در طول مدت آزمایش اختلاف معنی‌داری نشان نداد.



شکل ۲- اثر سالیسیلیک اسید، باکتری *Bacillus subtilis*، *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* روی میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز درریشه خیار. هر ستون میانگین چهار تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم به صورت میکرو گرم ترنس سینامیک اسید تولید شده در عصاره گیاه نشان داده شده است. (sa= گیاه تیمار شده با سالیسیلیک اسید قبل از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری، b= گیاه تیمار شده با باکتری قبل از آلوده‌سازی با قارچ عامل بیماری، sb= گیاه القاء شده با هر دو نوع القاءکننده میکروبی وشیمیایی قبل از آلوده‌سازی با قارچ عامل بیماری، co= گیاه شاهد سالم، f= گیاه مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری یا شاهد آلوده).

بحث

القاء مکانیزم‌های دفاعی گیاهان توسط پیش تیمار گیاه با یک القاءکننده بیولوژیکی یا بیوشیمیایی به عنوان یک استراتژی جدید و تازه حفاظت گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به اینکه این بیماری در سالهای اخیر در کشور شروع به گسترش کرده و به عنوان مهمترین بیماری خیار گلخانه‌ای مطرح شده است بگونه ای که در برخی مناطق میزان خسارت روی ارقام حساس تا حدود ۱۰۰ درصد گزارش شده است و از سوی دیگر عوامل بیوکنترل و القاءکننده‌های شیمیایی به عنوان دو شیوه امید بخش در کنترل بیماری‌های گیاهی مطرح می‌باشند (Yu & Zheng, 2006). در این تحقیق از تلفیق دو روش القاء مقاومت و کنترل بیولوژیک به کمک SA (القاءکننده شیمیایی) و *B. subtilis* (عامل بیوکنترل بسیاری از عوامل بیماریزای گیاهی) جهت مبارزه با بیماری استفاده گردید. هدف از انجام این تحقیق نیز یافتن راهی مناسب و کارا جهت کاربرد توأم هر دو استراتژی بود.

توانایی یک گیاه برای بیان طیف وسیع مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) بعد از آلودگی اولیه به خوبی شناخته شده است و به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است. شکل دیگر مقاومت به بیماری، توسط ریزوباکتری‌های غیربیماریزای تسخیرکننده ریشه که معمولاً به عنوان مقاومت سیستمیک القاءشده ریزوباکتریایی (ISR) نامیده می‌شود، در گیاه بوجود می‌آید (Van Loon *et al*., 1998). به عبارت دیگر میکروارگانیسمهای خاکزاد غیر بیماریزا می‌توانند رشد گیاه را بخوبی توقف بیماری‌ها افزایش دهند. افزایش

رشد گیاه نتیجه به دست آوردن مواد غذایی بیشتر یا تحریک هورمونی می‌باشد. توقف بیماری نیز می‌تواند به علت آنتاگونیسم میکروبی یا القاء مقاومت در گیاه باشد. چندین استرین ریزوباکتریایی نشان داده‌اند که به سبب تحریک رشد و مقاومت سیستمیک القائی (ISR)، به عنوان باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه فعالیت می‌کنند (Van Loon, 2007).

با توجه به اینکه باکتری و سالیسیلیک اسید می‌توانند روی یکدیگر اثر منفی داشته باشند پس ابتدا در شرایط آزمایشگاه اثر آنها بر یکدیگر بررسی شد. بررسی اختلاط غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید با محیط کشت نشان داد که باکتری نتوانست در هیچ غلظتی رشد کند. زیرا چنانچه مشخص شده است سالیسیلیک اسید و برخی ترکیبات مرتبط با آن اثر منفی روی عوامل بیماریزای گیاهی و همچنین باکتری‌های PGPR از قبیل *B. subtilis* دارند. اثر سالیسیلیک اسید بر قارچ عامل بیماری نیز بررسی شد و طبق نتایج به دست آمده قارچ در غلظت‌های ۶ و ۷ و ۸ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید رشد نکرد. در بررسی اثر غلظت‌های ۰/۱ تا ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بر رشد *F. oxysporum* f. sp *lycopersici* در محیط کشت، اثر بازدارندگی سالیسیلیک اسید روی رشد قارچ با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید نسبت مستقیم داشت، به طوری که در غلظت ۰/۶ میلی‌مولار قارچ رشد نکرد (Ozgonen *et al*., 2001). بررسی‌های آزمایشگاهی برای شناسایی اثر آنتاگونیستی و سینرژیستی محرک‌ها مفید هستند ولی نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی را نمی‌توان به شرایط طبیعی تعمیم داد زیرا در محیط طبیعی عوامل زیادی مانند رطوبت، pH خاک، دما و دیگر میکروارگانیسم‌ها، برهمکنش SA و *B. subtilis* با یکدیگر را تحت تأثیر قرار می‌دهند، به همین دلیل در آزمایش‌های گلخانه‌ای از غلظت‌های ۳، ۵ و ۷ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید استفاده شد.

در بررسی‌های گلخانه‌ای اثر باکتری و سالیسیلیک اسید در کنترل بیماری توسط شاخص‌های شدت بیماری، وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی مورد ارزیابی قرار گرفت. در اولین آزمایش که باکتری و سالیسیلیک اسید بعد از مایه‌زنی گیاه با عامل بیماری استفاده شدند، همه تیمارها با شاهد آلوده از نظر شدت بیماری تفاوت معنی‌داری نداشتند. در حالی که در آزمایش دوم که کاربرد باکتری و سالیسیلیک اسید قبل از مایه‌زنی گیاه با عامل بیماری بود، از نظر شدت بیماری همه تیمارها به جز تیمار کاربرد سالیسیلیک اسید به تنهایی با شاهد آلوده تفاوت معنی‌دار داشتند. همچنین وزن تر ریشه کلیه تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری با گیاه آلوده به قارچ بود. بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد باکتری و سالیسیلیک اسید قبل از آلوده‌سازی گیاه نسبت به استفاده از آنها بعد از آلوده شدن گیاه در کنترل بیماری مؤثرتر می‌باشد. اما به دلیل اینکه بین تیمارها با یکدیگر تفاوتی مشاهده نشد و از آنجا که کاربرد توأم دو محرک می‌تواند کارایی بیشتری در مبارزه با بیماری‌ها نسبت به کاربرد تنها یک محرک داشته باشد، پس آزمایش سومی بر اساس تغییر در مقدار و زمان کاربرد القاءکننده‌ها جهت تعیین بهترین حالت کاربرد توأم آنها طراحی شد. همه تیمارهای تلفیقی این بررسی از نظر شدت بیماری وزن تر ریشه اندام‌های هوایی و ارتفاع بوته با گیاهان آلوده به قارچ تفاوت معنی‌دار داشتند ولی تنها از نظر شدت بیماری میان آنها تفکیک حاصل شد به طوری که تیمار کاربرد توأم باکتری (خیساندن خاک) و غلظت ۷ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (اسپری برگی)، نتایج بهتری در مبارزه با بیماری نشان داد و به عنوان بهترین تیمار جهت داشتن بیشترین اثر روی کاهش بیماری در نظر گرفته شد. شاید یکی از دلایل انتخاب این تیمار به علت اثر منفی سالیسیلیک اسید بر باکتری که در شرایط آزمایشگاه نیز اثبات شد، باشد. پس کاربرد آنها با اختلاف مکانی این مشکل را مرتفع می‌سازد.

از جنبه‌های مهم دفاع گیاه در مقابل عوامل بیماریزا، دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های مربوط به آن می‌باشد .با توجه به اینکه یکی از مکانیزم‌های احتمالی فعالیت باکتری *B. subtilis* تحریک مقاومت سیستمیک می‌باشد و سالیسیلیک اسید نیز به عنوان محرک مقاومت سیستمیک اکتسابی شناخته شده است، پس با ارزیابی میزان فعالیت آنزیم PAL اثر این دو محرک در مکانیسم مقاومت بررسی شد. آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز یکی از آنزیم‌های کلیدی است که در مسیر فنیل پروپانوئیدها و

فلاونوئیدها، در واکنش‌های سازگار و ناسازگار میزبان و عامل بیماریزا افزایش می‌یابد. بررسی تغییرات فعالیت این آنزیم نشان داد که بین تیمارها و بین روزها تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ وجود دارد به گونه‌ای که القاء مقاومت گیاهان با استفاده از هر دو نوع القاءگر سبب افزایش فعالیت این آنزیم به میزان بالاتری نسبت به گیاهان تیمار شده با هر کدام از القاءکننده‌ها به تنهایی شد و القاء با باکتری میزان فعالیت این آنزیم را بیش از تیمار با سالیسیلیک اسید افزایش داد. به طوری که در تیمار تلفیقی و باکتری به تنهایی فعالیت آنزیم سریع‌تر به اوج رسید و با شیب کندتری کاهش یافت در حالی که تیمار با سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم شیب کندتری داشت و یک روز بعد از رسیدن به اوج سریعاً کاهش یافت، که این مساله به سبب اثر القاءکنندگی بیشتر و پایدارتر دو تیمار اول می‌باشد. بر طبق نتایج به دست آمده تغییرات فعالیت این آنزیم در تیمار تلفیقی در روز اول با شاهد تیمار باکتری و در آخرین روز با تیمارهای کاربرد هر کدام از القاءکننده‌ها به تنهایی تفاوت معنی‌دار داشت همچنین تغییرات فعالیت آنزیم دارای نوساناتی بود به گونه‌ای که تا روز سوم روند افزایشی را طی کرد ولی روز چهارم دچار افت فعالیت شد. که شاید علت افزایش آن در روز پنجم و سپس اوج فعالیت آن در ششمین روز به علت تحریک مقاومت توسط قارچ در دومین روز بعد از مایه‌زنی با آن باشد. القاء با باکتری نیز در روز چهارم کاهش یافت ولی دو روز بعد از مایه‌زنی با عامل بیماری به علت آلوده شدن گیاه و القاء مجدد آن به بیشترین مقدار خود رسید. میزان فعالیت این آنزیم در تیمار سالیسیلیک اسید نیز در سومین روز پس از مایه‌زنی با قارچ به بالاترین میزان خود رسید با اینحال این تیمار هم مانند دو تیمار قبلی قبل و بعد از آلوده‌سازی گیاه فراز و نشیب‌هایی داشت، اما نسبت به آنها از میزان فعالیت کمتر و شیب کندتری برخوردار بود. در تیمار قارچ تنها نیز، دومین روز بعد از مایه‌زنی، مصادف با اوج فعالیت آنزیم مذکور بود طوری که در این روز فعالیت آنزیم با روز قبل دارای تفاوت معنی‌داری بود و می‌توان نتیجه گرفت که قارچ عامل بیماری در تحریک این آنزیم و مقاومت گیاه مؤثر می‌باشد. محققین دیگری نیز نقش آنزیم PAL را در دیگر تعامل‌های گیاه -پاتوژن- محرک بررسی کرده و نتایج متفاوتی گرفتند به عنوان مثال Seah *et al.* (1996) جهت بررسی حساسیت گیاهچه‌های گندم نسبت به قارچ عامل بیماری پاخوره، برگ‌ها (به صورت غوطه‌ور کردن یا اسپری) و ریشه‌های (به صورت آبیاری) گیاهچه‌های یک تا دو هفته‌ای گندم با غلظت‌های ۰، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار SA تیمار کردند. همچنین غلظت‌های ۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار در روش خیساندن بذور قبل از جوانه‌زنی استفاده شدند. طبق نتایج به دست آمده، تیمارهای SA به دلیل عدم تحریک فعالیت آنزیم‌های PAL و POX ریشه‌های گیاهچه‌های گندم در القاء مقاومت نا توان بودند و میزان و روش کاربرد SA سبب کاهش حساسیت گیاهچه‌های گندم نسبت به *Ggt* نشده بود. کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید ۲۰۰ میکرو مولار از راه آبیاری ریشه و اسپری اندام‌های هوایی توانست مقاومت سیستمیک بر علیه *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (*Fol*) را در گوجه‌فرنگی تحریک کند. به طوری که در ۱۶۸ ساعت پس از آبیاری ریشه‌ها فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز ۵/۹ برابر به طور نسبی از گیاهان شاهد بیشتر بود، همچنین فعالیت این آنزیم در همین فاصله زمانی در تیمار اسپری اندام‌های هوایی به طور نسبی ۳/۷ برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود (Sudhamoy *et al.*, 2009). در گیاهان هندوانه پیش تیمار شده با جدایه *Bacillus subtilis* W1 بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز ۶ روز پس از مایه‌زنی با *Alternaria alternata* مشاهده شده است (Chandrasekaran *et al.*, 2009). تیمار گیاهچه‌های نخودفرنگی با پروتئین دیواره سلولی *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceri* نسبت به گیاهان تیمار شده با آب سبب تحریک واکنش‌های دفاعی گیاه می‌شود، چنانچه بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز دو روز بعد از تیمار گیاهچه‌های نخودفرنگی با این محرک گزارش گردید (Saikia *et al.*, 2006). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که باکتری و سالیسیلیک اسید، همچنین قارچ عامل بیماری توانستند میزان فعالیت این آنزیم را نسبت به شاهد افزایش دهند اما علت معنی‌دار نبودن میزان فعالیت آنزیم تیمارها با شاهد شاید بیانگر دخالت مسیرها و

متابولیت‌های دیگر در سنتز ترکیبات فنلی یا کمرنگ بودن نقش PAL به عنوان یک شاخص مقاومت گیاه در این تعامل باشد، که البته این مسأله شاید با در نظر گرفتن اصلاحاتی در مقدار و زمان کاربرد القاءکننده‌ها و یا در نظر گرفتن آنزیم‌های جایگزین مناسب بهبود یابد.

REFERENCES

1. Bargabus, R. L., Zidack, N. K., Sherwood, J. W. & Jacobsen, B. J. (2002). Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61, 289-298.
2. Bargabus, R. L., Zidack, N. K., Sherwood, J. W. & Jacobsen, B. J. (2004). Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological.Control*, 30, 342-350.
3. Chandrasekaran, U., Ambalavanan, S. & Perumal, N. (2009). Induced systemic resistence in watermelon by biocontrol agents against *Alternaria alternate*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42, 1187-1195.
4. Durrant, W. E. & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185-209.
5. Etebarian, H. R., Sholberg, P. L., Eastwell, K. C. & Sayler, R. (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 591-598.
6. Fayza, A. F. & Sabrey, Y. M. 2006. Induction of resistance in *Phaseolus vulgaris* against TNV by salicylic acid and kinetin. *International Journal Agriculture and Biology*, 8, 47-51.
7. Kessman, H., Staub, T., Hoftmann, C., Maetzke, T. & Herzog, J. (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 439-459.
8. Kloepper, J. W., Leong, J., Teinze, M. & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886.
9. Kloepper, J.W., Wei, G. & Tuzun, S. (1992). Rhizosphere population dynamics and internal colonization of cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria which induce systemic resistance to *Colletotrichum orbiculare*. In: E. S. Tjamos (Ed.), *Biological Control of Plant Diseases*, (pp. 185-191). Plenum Press.
10. Kurata, K. (1994). Cultivation of grafted vegetables and developing of grafting robotsin Japan. *HortScience*, 29, 240-244.
11. Moreno, A., Alferez, A., Aviles, M., Dianez, F., Blanco, R., Santos, M. & Tello, J. C. (2001). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-cucumerinum* on cucumber in Spain. *Plant Disease*, 85, 1206.
12. Murphy, A. M., Chivasa, S., Singh, D. P. & Carr, J. P. (1999). Salicylic acid induced resistance to viruses and other pathogens.*Trends In Plant Science*, 4, 155-160.
13. Murphy, A. M., Holcombe, L. J. & Carr, J. P. (2000). Characteristics of salicylic acid induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 31, 139-145.
14. Naylor, M., Murphy, A. M., Berry, J. Q. & Car, J. P. (1998). Salicylic acid-induced resistance to plant virus movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 860-880.
15. Oka, Y., Cohen, Y. & Speigel, Y. (1999). Local and systemic induced resistance to the root – knot tomato by DL – β-amino-n-butyric acid. *Phytopathology*, 89, 1138-1143.
16. Ozgonen, H., Bicici, M. & Erkilic, A. (2001). The effect of salicylic acid and endomycorrhizal fungus *Glomus etunicatum* on plant development of tomatoes and Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25, 25-29.
17. Pieterse, C. M. J., Jurriaan Ton, S., Van Wees, S., Hase, K., Leon-Kloosterziel, B., Verhagen, J., Van Pelt, A. & Van Loon, L. C. (2002). Induced resistance in plants against insect and diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 51-61.
18. Prithiviraj, B., Bis, H. P., Jha, A. K. & Vivanco, J. M. (2005). *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA-dependent, NPR1 independent host responses. *The Plant Journal*, 42, 417-432.
19. Punja, Z. K. & Parker, M. (2000). Developing of *Fusarium* root and stem rot, a new disease on greenhouse cucumber in British Columbia, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis cucumerinum Canadian Journal of Plant Pathology*, 22, 349-363.
20. Raju, S., Jayalakshmi, S. K. & Sreeramulu, K. (2008). Comparative study on the induction of defence related enzymes in two different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes by salicylic acid, spermin and *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceri*. *Australian Journal of Crop Science*, 2(3), 121-140.
21. Ricker, A. S. (1963). *Introduction to research*. Plant Disease. CRC Press. London, England.

22. Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
23. Sahebani, N. (2004). *Interaction M. javanica with Fusarium oxysporum f.sp lycopersici and evaluation some defence biochemical mechanisms*. Ph. D. dissertation. University of Tehran.
24. Saikia, R., Yadav, M., Singh1, B. P., Gogoi, D., Singh, T. & Arora, D. K. (2006). Induction of resistance in chickpea by cell wall protein of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* and *Macrophomina phaseolina*. *Current Science*, 91, 1543-1546.
25. Seah, S., Sivasithamparam, K. & Turner, D. W. (1996). The Effect of Salicylic Acid on Resistance in Wheat (*Triticum aestivum*) Seedling Roots against the Take-All Fungus, *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*. *Australian Journal of Botany*, 44(4), 499-507.
26. Shahriyari, D., Zare, R., Hafez, Kh. & Kherkhani, H. (2006). *Fusarium* root and stem rot of cucumber. In: Proceedings of *the 17th Iranian Plant Protection Congress*. 2-5 Sep. University of Tehran, Karaj, Iran. P. 191. (In Farsi)
27. Sudhamoy, M., Nirupama, M. & Adinpunya, M. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 642-649.
28. Thompson, D. C. (1996). Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer pateh symptomisn Kentucky blue grass. *Plant Disease*, 80, 850-862.
29. Vakalounakis, D. J. (1996). Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis cucumerinum*. *Plant Disease*, 80, 313-316.
30. Vallad, G. E. & Goodman, R. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44, 1920-1934.
31. Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. & Pierterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453-483.
32. Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 243-254.
33. YU, T. & Zheng, X. (2006). Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of the antagonist *Cryptococcus laurentii* in apple fruit. *Journal Plant Growth Regulation*, 25, 166-174.