دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال پنجم، شماره اول، بهار و تابستان 1396
صص 58-47

القای مقاومت و بررسی تغییرات فنل و پراکسیداز در گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با *Bacillus subtilis* و سالیسیلیک اسید در برابر پژمردگی فوزاریومی و نماتد مولد گره ریشه

سمانه دشتی پور[*1]، نوازاله صاحبانی [2]، حشمت اله امینیان[2]

تاریخ دریافت: 95/6/11 تاریخ پذیرش: 95/9/26

چکیده

در این مقاله، اثر *Bacillus subtilis* و سالیسیلیک اسید در تغییرات بیوشیمیایی و تغییر فعالیت آنزیم های دفاعی گیاه گوجه فرنگی در برابر دو بیماری مهم ناشی از نماتد مولدگره ریشه (*Meloidogyne javanica*) و قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* مورد بررسی قرار گرفت. در یک آزمایش گلخانه ای به منظور ارزیابی ثر سالیسیلیک اسید و *B. subtilis* در القای نشانگرهای مقاومت، شامل آنزیم پراکسیداز و محتوای فنل کل در گوجه فرنگی آلوده به این دو بیماری طراحی شد. *B. subtilis* به عنوان عامل محرک زنده در غلظت 10^9 *cfu/ml* و سالیسیلیک اسید به عنوان یک القاء کننده شیمیایی در غلظت 5 میلی مولار، قبل از تیمارها با عوامل بیماری زا به کار رفتند. نتایج نشان داد سالیسیلیک اسید و *B. subtilis* در تیمار ترکیبی وکاربرد جداگانه، هریک به طور موثری منجر به افزایش فعالیت پراکسیداز و محتوای فنل نسبت به تیمارآلوده به فوزاریوم و نماتد و شاهد شدند و می توانند به صورت توام به عنوان یک روش ایمن و موثر در کنترل این دو بیماری مورد بررسی قرار بگیرند. بالاترین سطح فعالیت آنزیم پراکسیداز و فنل کل به ترتیب در روز پنجم و هفتم بعد از تلقیح پاتوژن ها بود.

واژه های کلیدی: سالیسیلیک اسید، فوزاریوم، فنل، پراکسیداز، *Meloidogyne*.

[1]- دانش آموخته کارشناسی ارشد، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[2]- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[*]- نویسنده مسئول مقاله: samane.dashtipoor1988@gmail.com

مقدمه

نماتد گره ریشه *Meloidogyne* spp. (Treub) Chitwood پارازیت اجباری ساکن است که بخش وسیعی از چرخه زندگی خود را در داخل گیاه تکمیل می کند (Abad *et al*., 2004) و به طور قابل توجهی فعالیت های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی میزبان را تغییر می‌دهد (Pavaraj *et al*., 2010). گالهای نماتد گره ریشه منجر به کاهش جذب آب به ساقه می‌شود. شدت کاهش عملکرد وابسته به گونه نماتد، واریته گیاهی و فصل رشد است و عمدتا در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری (Fernandez and Sikora, 2005) و در گلخانه ها که شرایط برای نماتد گره مساعد است رایج می باشد (Wesemael *et al*., 2011). گونه *M. javanica* با داشتن توزیع جهانی یکی از چهار گونه مهم این جنس است (Mehdikhani *et al*., 2003).

قارچ *F. oxysporum* از نظراقتصادی، از مهم ترین گونه های قارچ فوزاریوم و عامل اصلی پژمردگی آوندی ریشه و پوسیدگی ساقه است (Agrios, 1997). پژمردگی فوزاریومی، تولید گوجه فرنگی را کاهش می دهد. تلفات در ارقام حساس و زمانی که در طول فصل رشد دمای خاک و هوا بالا باشد، بیشتر است (Agrios, 2005).

به دلیل مسمومیت شیمیایی، آلودگی زیست محیطی برای انسان، گرانی، و مقاومت در پاتوژن ها، در حال حاضر دیگر استراتژی های ایمن برای مدیریت بیماری های گیاهی جایگزین استفاده از سموم شده است (Nico *et al*., 2004).

باکتری های محرک رشد گیاه (PGPR) موجب افزایش رشد، عملکرد، سرعت جوانه زنی و تحمل به خشکی می شوند (Yildirim *et al*., 2006) یا به طور غیرمستقیم با کاهش اثر مضر پاتوژن ها، اثرات مثبت بر روی وزن ساقه و ریشه گیاهان دارند (Weller *et al*., 2002). باکتریهای PGPR با القاء مقاومت، منجر به تغییر متابولیسم گیاه شده و با تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان، گسترش پاتوژن در میزبان را محدود می کنند (Buchenauer *et al*., 1998). برخی از گونه های *Pseudomonas* spp. و *Bacillus* spp. با القای سیستم دفاعی گیاه مقاومت سیستمیک در برابر نماتد گره ریشه ایجاد می کنند (Kloepper and Ryu, 2006).

سالیسیلیک اسید یک مولکول انتقال دهنده سیگنال است که تنظیم و تحریک رشد گیاه را موجب می شود و در واکنش بیوسنتز آنزیم های دفاعی، بیان پروتئین های مرتبط با بیماریزایی (PR)، پلی فنل‌ها (Zahang, 2002) و القا واکنش‌های فوق حساسیت مشارکت دارد (Ryal *et al*., 1996). کاربرد خارجی SA با تولید مقاومت سیستمیک، ظرفیت دفاعی گیاه را افزایش داده است و مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) را در گیاه تولید می‌کنند (Ogallo and McClure, 1996).

مواد فنلی و آنزیم های دفاعی مانند پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز باعث ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن‌های گیاهی می‌شوند. به منظور کنترل پوسیدگی ساقه و ریشه گوجه فرنگی، فاکتورهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شامل تغییر آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز درگیاهان آلوده و تیمارهایی که آنزیم‌ها را در گیاه سیستمیک می کنند، اندازه گیری می شود (Eisenback, 1985).

هدف از این مطالعه، بررسی اثر بخشی *B. subtilis* و سالیسیلیک اسید به عنوان عامل محرک سیستم دفاعی گیاه در تغییر میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان نشانگرهای مقاومت در گیاه گوجه فرنگی است که به دو بیماری نماتد گره ریشه و پژمردگی فوزاریومی آلوده شدند.

مواد و روش‌ها

آماده سازی زادمایه نماتد

نمونه های آلوده به نماتد مولد گره ریشه، از مزارع گوجه فرنگی آلوده در پاکدشت (تهران، ایران) جمع آوری شد و به آزمایشگاه منتقل شدند. شناسایی گونه نماتد مولد گره ریشه با استفاده از ویژگی های مورفولوژیکی نماتد نر، ماده ولارو سن دوم و همچنین به کمک الگوی برش انتهایی بدن ماده انجام شد (Eisenback, 1985). پس از شناسایی گونه *M. javanica*، توده های تخم منفرد، جداشد و در گلخانه روی گیاهان گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) واریته ارلی اوربانا Y تکثیر شد. تخم ها طبق روش هوسی و بارکر (1973) استخراج شد و لارو سن دوم نماتد به عنوان ماده تلقیح مورد استفاده قرار گرفت.

آماده سازی زادمایه قارچ

عامل پژمردگی گوجه فرنگی، ایزوله قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* از آزمایشگاه بیماری شناسی پردیس ابوریحان (دانشگاه تهران) تهیه شد. غلظت 10^6 spore/ml اسپور (میکروکنیدی در میلی لیتر آب مقطراستریل) ازکشت یک هفته‌ای قارچ درپتری‌های حاوی محیط کشت PDA به عنوان زادمایه بیماری استفاده شد (Batta, 1999).

آماده سازی عوامل القایی

B. subtilis از آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی پردیس ابوریحان تهیه شد. ایزوله مورد نظر در آب مقطر استریل نگهداری شد و در محیط کشت NA کشت داده شد. سوسپانسیون (cfu/ml) 10^9 از کشت 24 ساعته باکتری با استفاده از سری رقت در طول موج 590 نانومتر آماده شد (Thompson, 1996). سالیسیلیک اسید ازشرکت (Merck) تهیه شد و غلظت 5 میلی مولار سالیسیلیک اسید با حل کردن در اتانول و آب برای آزمایش استفاده شد (Oka *et al*., 1999).

آماده سازی خاک و استریلیزه کردن آن

خاک استریل با ترکیبی از خاک مزرعه، ماسه و کودبرگ، به ترتیب به نسبت 1: 1: 1 (V / V) مخلوط شدند و برای پر کردن گلدان یک کیلوگرمی استفاده شدند.

پرورش و نگهداری بوته های آزمایش

بذرهای گوجه فرنگی (*Lycopersicone sculentum*, var. Erly Urbana Y) در هیپوکلریت سدیم 0/1% به مدت 2 دقیقه ضدعفونی سطحی شده و پس از آن سه بار با آب مقطر شسته شدند. هربذر در یک گلدان کاشته شد. نگهداری گلدان ها تحت شرایط گلخانه ای و درجه حرارت °C 2 ± 25 درجه سانتی گراد انجام گرفت.

روش مایه زنی

گیاهچه‌های 4-6 برگی به صورت کاربرد جداگانه و ترکیبی توسط سالیسیلیک اسید و *B. subtilis* به شرح ذیل تیمار شدند. دو روز پس از تیمار با این عوامل، گیاهچه ها با نماتد و قارچ تلقیح شدند. تیمارهای آزمایش شامل این موارد بود:

Control: گیاهان تیمارشده با آب مقطر استریل به عنوان شاهد (گیاه سالم)، F: گیاهان تلقیح شده با قارچ فوزاریوم (25 میلی لیتر سوسپانسیون اسپور در آب مقطر استریل با غلظت 10^6spore/ml به روش خیساندن خاک)، SA: گیاهان تیمارشده با 25 میلی لیتر سالیسیلیک اسید با غلظت 5 میلی مولار به صورت اسپری روی برگها پاشیده شد (به نحوی که تمام سطح بالا و پایین برگ آغشته شود)، B: گیاهان تیمارشده با 25 میلی لیتر سوسپانسیون *B. subtilis* با غلظت 10^9 cfu/ml به روش خیساندن خاک، M: گیاهان مایه زنی شده با 2000 لارو سن دوم *M. javanica* به ازای هر بوته (چند سوراخ در خاک ایجاد کرده و سوسپانسیون درون آن ریخته شد تا نماتد به سطح ریشه رفته و لاروها به درون ریشه نفوذ کنند).

طراحی آزمایش و اندازه گیری

آزمایش در قالب طرح فاکتوریل و به شکل بلوک تصادفی 4 × 9 انجام شد. بر اساس آن فاکتور A شامل 9 تیمار و فاکتور B شامل 4 زمان نمونه گیری بود که 1، 3، 5 و 7 روز پس از تلقیح نماتد صورت گرفت. ریشه‌ها پس از شستشو و تمیز کردن خاک از سطح شان، برای استخراج به آزمایشگاه منتقل شدند و تغییرات میزان فنل کل و سطح فعالیت پراکسیداز اندازه گیری شد.

ارزیابی میزان فنل کل: استخراج فنل گیاه

یک گرم بافت ریشه گوجه فرنگی، با استفاده از نیتروژن مایع در داخل هاون چینی کوبیده شد و عصاره آن جهت استخراج ترکیبات جدا شد، سپس 10 میلی لیتر متانول 80% (pH = 2) به آن اضافه شد. مخلوط حاصل در 4000g به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی که حاوی ترکیبات فنلی بود، جدا شده و در دمای 20- درجه سانتی گراد برای آزمایش های بعدی نگهداری شد (Mohammadi and Kazemi, 2002).

تهیه محلول پایه غلظت های فنل استاندارد

محلولی با حل کردن مقدار 10 میلی گرم اسید کافئیک (Fluka، آلمان) در 5 میلی لیتر متانول خالص آماده شد. حجم نهایی محلول با افزودن آب مقطر به 50 میلی لیتر رسید. مقادیر 0/5، 1، 2، 3، 4، 5، 6 و 8 میلی لیتر از محلول به طور جداگانه در لوله های آزمایش ریخته شد و حجم هر یک از لوله ها با اضافه کردن آب مقطر استریل به 10 میلی لیتر رسانده شد. بطوری که 0/5میلی لیتر از محلول در هر یک از لوله ها به ترتیب دارای 5، 10، 20، 30، 40، 50، 60 و 80 میکروگرم کافئیک اسید باشد.

تهیه منحنی استاندارد و معادله رگرسیون

نیم میلی لیتر از غلظت های مختلف تهیه شده کافئیک اسید در 7 میلی لیتر آب مقطر ریخته شد. 0/5 میلی لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. سه دقیقه بعد یک میلی لیتر محلول اشباع کربنات سدیم به آن اضافه شد و با اضافه

کردن آب مقطر حجم نهایی محلول به 10 میلی لیتر رسید. بعد از یک ساعت، جذب در λ max = 725 nm اندازه گیری شد. این مراحل را به طور جداگانه برای هر یک از غلظت ها تکرارشد برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر، محلولی استفاده شد که به جای اسید کافئیک دارای همان مقدار آب مقطر بود (Seevers *et al.*, 1971). هر نمونه سه تکرارداشت.

ارزیابی پراکسیداز (POX)

فعالیت آنزیم پراکسیداز به وسیله آنالیز اسپکتروفتومتری داده‌ی حاصل از نمونه های آزمایش برآورد شد. گوآیکول که سوبسترای این آنزیم است، به عنوان نشانگر فعالیت پراکسیداز انتخاب شد. نیم گرم از بافت ریشه با استفاده از نیتروژن مایع در یک هاون چینی عصاره گیری شد. سپس 1 میلی لیتر بافر (فسفات سدیم 0/1 مولار، pH = 6) اضافه شده، مخلوط حاصل به میکروتیوب 2 میلی لیتری منتقل شد و در 13000 دور در دقیقه به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی جدا شد و در دمای C °40 - برای آزمایش نگهداری شد (Bradford, 1976).

دو میلی لیتر مخلوط واکنش با ترکیب میلی لیتر عصاره گیاهی (مقداری از عصاره که حاوی 40 میکروگرم پروتئین است) و 20 میکرولیتر گوآیکول و افزودن مقدار کافی بافر فسفات سیترات 25 mM (pH = 5/4) تهیه شد و در میکروتیوب 2 میلی لیتری ریخته شد تا به عنوان نمونه آزمایش در اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار بگیرد. سپس 10 میکرولیتر پراکسید هیدروژن 30% به این مجموعه اضافه شد و بلافاصله میزان جذب در طول مدت 1 دقیقه در فواصل 10 ثانیه اندازه گیری شد (λ max= 475nm) و در نهایت فعالیت پراکسیداز برحسب تغییرات جذب مخلوط واکنش در هر میلی گرم پروتئین کل در دقیقه بیان شد. برای اطمینان از حداکثر تطبیق نتایج هرتیمار با سه بار تکرار انجام گرفت (Reuveni and Bothma, 1995).

تجزیه و تحلیل آماری

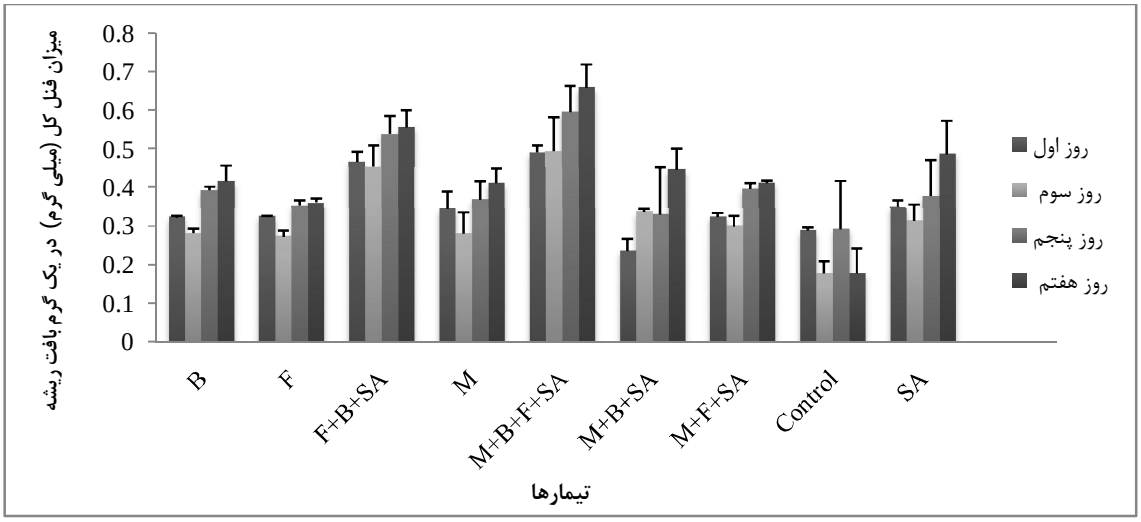
داده ها با کمک نرم افزار SAS.9 آنالیز شدند و مقایسه میانگین مربعات با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ($P\leq 0/01$) انجام گرفت.

نتایج و بحث

سنجش میزان فنل کل

در تمام تیمارها، به جز گیاه سالم (Control)، محتوای فنل در روز هفتم به حداکثر مقدار خود رسید. همچنین در تمام تیمارها تولید فنل بیشتر از شاهد بود. حداکثر فعالیت آنزیم مربوط به تیمار (نماتد + باکتری + قارچ + سالیسیلیک اسید) بود. اختلاف معناداری بین تیمارهای (B) و (SA) درمقدار فنل تولید شده دیده نشد. تیمار های (M) و (F) با گیاه سالم (Control) اختلاف معنی داری داشتند که نشان دهنده‌ی این مطلب بودکه حضور نماتد و قارچ هم بر سیستم دفاعی گیاه اثرگذاشته و موجب افزایش میزان ترکیبات فنلی شده است. با مقایسه تیمارهای(F + B + SA)، (B + M + SA) و (M + B + F + SA) مشخص شد که کاربرد ترکیبی سالیسیلیک اسید و باکتری،

بیشترین اثر القایی در تولید ترکیبات فنلی را در حالت تعامل دو بیماری داشت. همچنین در القای سیستم دفاعی در برابر پژمردگی فوزاریومی نسبت به نماتد مولد گره ریشه کارایی بیشتری داشت (شکل 1، جدول 1).



شکل1- تغییرات فنل کل در ریشه ی گوجه فرنگی مایه زنی شده با *M .javanica*، *F. oxsysporoum* f.sp. *lycopersici*، سالیسیلیک اسید و باکتری *Bacillus subtilis*. اعداد مربوط به نمودار میانگین چهار تکرار می‌باشند و بار روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می باشد.

جدول 1 - تجزیه واریانس مربوط به تغییرات آنزیم فنل 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*.

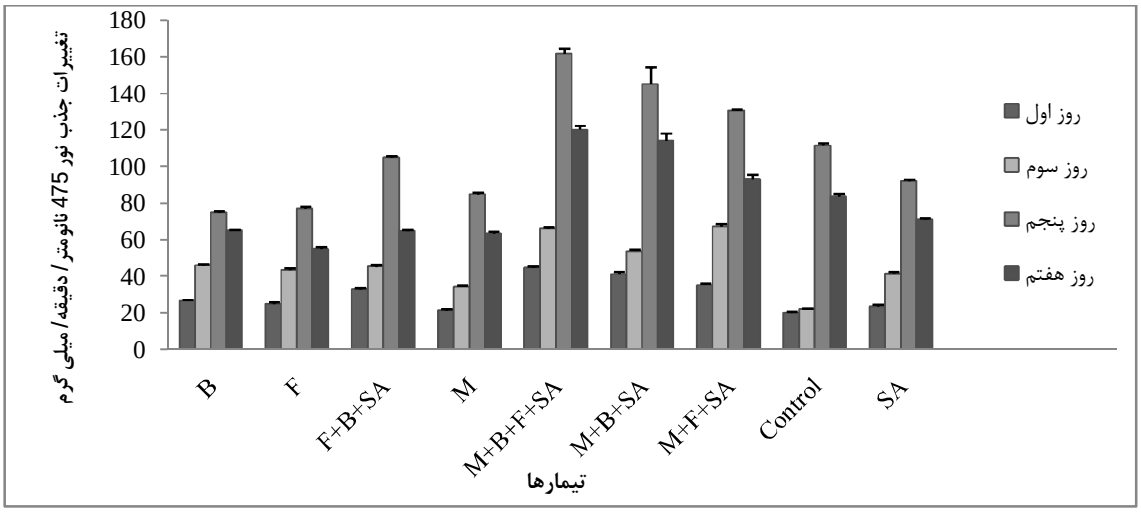
منبع تغییرات (SOV)	درجه ی آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
تیمارها (A)	3	2/115	0/705	169/74
روزهای نمونه برداری (B)	8	1/313	0/164	39/54
A×B	24	0/269	0/011	2/71
خطای آزمایش	108	0/448	0/0041	
کل	143	4/147		

** به احتمال 99/99 درصد ($P\leq0.01$)دارای اختلاف معنی دار است CV= 17.07

سنجش پراکسیداز

تجزیه و تحلیل مربوط به تغییرات فعالیت آنزیم دفاعی پراکسیداز در ریشه گوجه فرنگی تیمارشده با *B. subtilis*، سالیسیلیک اسید و تلقیح شده با پاتوژن ها نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم در تمام تیمارها در روز پنجم بود و پس از آن روند نزولی داشت. حداکثر فعالیت آنزیم درتیمار (F + M + B + SA) دیده شد و پس از آن بیشترین میزان آنزیم در تیمار (M + B + SA) بود که تفاوت معنی داری نسبت به گیاه سالم (Control) داشت. در

تیمارهای ترکیبی *B. subtilis* و سالیسیلیک اسید شامل (F + M + B + SA)، (F + B + SA) و (M + B + SA) تولید آنزیم نسبت به تیمارهای جداگانه باکتری و سالیسیلیک اسید بیشتر بود. میزان پراکسیداز تولید شده در گیاه سالم (Control)، بیشتر از گیاهان آلوده به نماتد (M) و قارچ (F)بود. مقایسه کاربرد ترکیبی باکتری و سالیسیلیک اسید در تیمارهای (M + B + SA) و (F + B + SA)، نشان داد که میزان تولید و فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار (M+B+SA) بیشتر بوده است و ترکیب دو عامل القایی اثر بهتری در کنترل نماتد نسبت به فوزاریوم داشته است. همچنین مقایسه دو تیمار (SA) و (B) نشان دهنده‌ی این مطلب است که سالسیلیک اسید، در القای سیستم دفاعی گیاه در جهت تولید پراکسیداز نسبت به باکتری نقش موثرتری داشته است (شکل 2 و جدول 2).



شکل2- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه ی گوجه فرنگی مایه زنی شده با *M. javanica*، *F. oxsysporoum* f.sp. *lycopersici* ،سالیسیلیک اسید وباکتری *Bacillus subtilis*. اعداد مربوط به نمودار میانگین چهار تکرار می باشند و بار روی ستون ها خطای استاندارد(±SE)می باشد.

جدول 2- تجزیه واریانس مربوط به تغییرات آنزیم پراکسیداز 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*.

منبع تغییرات	درجه ی آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
تیمارها (A)	3	106223/0511	35407/6837	7482/59
روزهای نمونه برداری(B)	8	78603/5710	7860/3571	1661/10
A×B	24	30581/2926	1019/3764	215/42
خطای آزمایش	108	624/6250	4/7320	
کل	143	216032/5398		

** به احتمال 99/99 درصد ($P\leq0.01$) دارای اختلاف معنی دار است CV= 3. 49

نتایج نشان داد که استفاده از سالیسیلیک اسید و *B. subtilis* در دو شکل ترکیبی وکاربرد جداگانه، میزان فعالیت ترکیبات دفاعی گیاه را در مقایسه با گیاهان آلوده به فوزاریوم (F)، نماتد (M) و گیاه سالم (Control) به طور موثری افزایش داد و این افزایش منجر به تولید مقاومت سیستمیک در برابر این دو بیماری می شود (شکل-های1 و 2، جدول‌های 1 و 2).

پرماچاندرا و همکاران(1983) نشان دادند که فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) به عنوان بخشی از واکنش های دفاعی، نقش موثری در تولید مقاومت در برابر .*Meloidogyne* spp ایفا می‌کند. مقادیر زیاد تولید و فعالیت آنزیم کیتیناز و پراکسیداز در ریشه ی رقم مقاوم پنبه پس از آلودگی به *M. incognita* نشان دهنده‌ی نقش این آنزیم ها در مکانیزم مقاومت میزبان است (Colling *et al*., 1993).

پراکسیداز در پلیمریزاسیون لیگنین دخالت دارند. سخت شدن دیواره سلولی، به عنوان یک سد مکانیکی در برابر نفوذ مقابل پاتوژن شناخته می شود و به گیاه اجازه می دهد تا زمان کافی برای تنظیم واکنش های خود دفاعی خود را داشته باشد (Durner *et al*., 1997).

عوامل آنتاگونیست، موجب القای سنتز فیتوالکسین شده که با ایجاد تغییر در دیواره سلولی ریشه بوته های خیار همراه است. همچنین منجر به افزایش سطح فعالیت آنزیم پراکسیداز، کیتیناز و بتا گلوکاناز و در نتیجه تولید مقاومت در گیاه شده است (Sharon *et al*., 2001).

کنترل بیولوژیک قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) بوسیله ی باکتریهای محرک رشد گیاه، به عنوان مثال ترکیبی از گونه های جنس .*Bacillus* spp، موجب افزایش تجمع ترکیبات دفاعی گیاه مانند آنزیم های PAL و PPO در گیاه شده است (Kloepper *et al*., 2004).*B. subtilis* با القای مقاومت سیستمیک به طور غیر مستقیم اثرات بازدارنده در برابر نماتد گره ریشه ایجاد کرده است (Jonathan *et al*., 2009).

سالیسیلیک اسید در غلظت 5 میلی مولار باعث ایجاد مقاومت سیستمیک درگیاه گوجه فرنگی در برابر *M. javanica* می شود (Naserinasab *et al*., 2011). تحقیقات *کاوالکانتی* و همکاران (2006) نشان داد که استفاده از استیل سالیسیلیک اسید درگوجه فرنگی با افزایش سطح فنل کل، مقاومت القایی در برابر *Xanthomonas vasicatoria*ایجاد می کند. در گیاهان پیاز تیمار شده با غلظت 2 میلی مولار سالیسیلیک اسید (اسپری برگی) و پس از آن تلقیح شده توسط *Stemphylium vesicarium* بررسی تغییر فعالیت آنزیم پراکسیداز و محتوای فنل نشان دادکه که مقدار این ترکیبات در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید و تلقیح شده با قارچ، بیشتر از گیاهان تیمار شده با آب مقطر (شاهد) و آلوده به قارچ بود (Kamal *et al*., 2009).

طبق نتایج پیشنهاد می شود که سالیسیلیک اسید به عنوان عامل شیمیایی القاء سیستم دفاع گیاهان و *B. subtilis* به عنوان یک عامل محرک زنده افزایش دهنده ظرفیت دفاعی گیاه، می توانند به صورت توام به عنوان روش ایمن و موثر در بیوکنترل پژمردگی فوزاریومی و نماتد مولد گره ریشه گوجه فرنگی استفاده شوند.

References

1. Abad P, Favery B, Rosso MN and Castagnone-Sereno P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. Molecular Plant Pathology 4: 217–224.
2. Agrios GN. 1997 Plant Pathology. 4th ed. New York: Academic Press. 635 p.
3. Agrios GN. 2005. Plant Pathology. 5th ed. San Diego: Academic Press. 922 p.
4. Batta YA. 1999. Biological effect of two strains of microorganisms antagonistic to *Botrytis cinerea*: causal organism of gray mold on strawberry. Natural Science 13: 67–83.
5. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248–254.
6. Buchenauer H, Stadnik M, Chamsai J, Jeun C, Orobar M, Siegrist J and Anfoka G. 1998. Induction of resistance in different crops against fungal and viral diseases. Paper presented at: SCL Conference on Systemic Acquired Resistance; 10 March; London, England.
7. Cavalcanti FR, Resende MLV, Pereira RB, Costa JCB and Carvalho CPS. 2006. Atividades de quitinase e beta-1,3- glucanaseapóseliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. Pesquisa Agropecuária Brasileira 41: 1721–1730.
8. Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U and Vad K. 1993. Plant chitinases. Plant Journal 3: 31–40.
9. Durnner J, Shah J and Klessing DF. 1997. Salicylic acid and disease in plants. Trends in Plant Science 2: 266–274.
10. Eisenback JD, Hirschmann H, Sasser JN and Triantaphyllou AC. 1981. A Guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) with a pictorial key. Raleigh, North Carolina: A Cooperative Publication of the Departments of Plant Pathology and Genetics, North Carolina State University and US Agency for International Development. 48 p.
11. Hussey RS and Barker KR. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57: 1025–1028.
12. Jonathan EI, Raguchander T, Zareena Begum M and Sundaramoorthy S. 2009. Field efficacy of biocontrol agents for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood and reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis* (Linford and Olivera) in tomato. Biological Control 23: 311–316.
13. Kloepper JW and Ryu CM. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. pp. 33–52, *In* BE Schulz, CC Boyle and T Sieber (eds). Microbial Root Endophytes. Heidelberg: Springer.
14. Kloepper JW, Ryu CM and Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94: 1259–1266.

15. Mehdikhani E, Kheiri A, Mohammadi M, Eshtiaghi H and Okhovvat M. 2003. Three new records of *Meloidogyne* species for Iran. Iranian plant Pathology 39 (3, 4): 189–211.
16. Mohammadi M and Kazemi H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Journal of Plant Science 162: 491–498.
17. Naserinasab F, Sahebani N and Etebarian HR. 2011.Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on tomato. African Journal of Food Science 5(3): 276 – 280.
18. Nico AI, Rafaell RM, Jimenez-Daza M and Castillo P. 2004. Control of root-knot nematodes by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. Crop Protection 23: 581–587.
19. Ogallo JL and Mcclure MA. 1996. Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematode in tomato. Phytopathology 86:498–501.
20. Pavaraj M, Karthikairaj K and Rajan MK. 2010. Effect of leaf extract of *Ageratium conyzoides* on the biochemical profile of black gram, *Vigna mungo* infected by root-knot nematode, *M. incognita*. Journal of Biopesticides 3: 313–316.
21. Reuveni R and Bothma GC. 1985. The relationship between promydase activity and resistance of *Sphaeroteca fuligena* in melons. Phytopathologisclie Zeitschrift: 114–260.
22. Ryals JA, Neuensch Wander VH, Willits MG, Molina A, Teiner HY and Hunt MD. 1996. Systemic acquired resistance. Plant cell 8: 1809–1819.
23. Seevers PM, Daly JM and Catedral FF. 1971. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust. Plant Physiology 48: 353–360.
24. Shah J. 2003.The salicylic acid loop in plant defense. Current Opinion in Plant Biology 6: 365–371.
25. Sharon E, Bar-Eyal M, Chet I, Herrara-Estrella A, Kleifeld O and Spiegle Y. 2001. Biological Control of the Root-knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 91(7): 687–693.
26. Sikora RA and Fernandez E. 2005. Nematode parasites of vegetables. pp. 319–392, *In* M Luc, RA Sikora and J Bridge (eds). Plant-Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. 2nd ed. Wallingford: CABI Publishing.
27. Thompson DC. 1996. Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer patch symptoms Kentucky bluegrass. Plant disease 80: 850–862.
28. Weller DM, Raaijmakers JM, Mcspadden BB and Thomashow LS. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressivenss to plant pathogens. Annual Review of phytopathology 40: 309–3048.
29. Wesemael WML, Viaene N and Moens M. 2011. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. Nematology 13: 3–16.

30. Yildirim E, Taylor AG and Spittler TD. 2006. Ameliorative effects of biological treatments on growth of squash plants under salt stress. Scientia Horticulturae 111: 1–6.
31. Zahang S, Moyne AL, Reddy MS and Klooper JW. 2002. The role of Salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of Tobacco. Biological control 25: 288–296.

Induction of resistance and changes of phenol and peroxidase in tomato plants treated with *Bacillus subtilis* and salicylic acid against Fusarium wilt and root-knot diseases

S. Dashtipour [1]*, N, Sahebani [2], H. Aminian [2]

Abstract

In this paper, effects of *Bacillus subtilis* and salicylic acid on changes in biochemical and defense enzyme activity of tomato plant against two important pathogens *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici,* was evaluated. A greenhouse experiment was designed in order to assess the effect of salicylic acid and *B. subtilis* in the induction of resistance markers, including peroxidase and total phenol content. *B. subtilis* was used as live stimulator at concentration 10^9 CFU/ml and salicylic acid as a chemical inducer at concentration 5mμ before treatment with pathogens. The results showed that application of salicylic acid and *B. subtilis* in combination and also when applied singly, effectively increased peroxidase activity and total phenol compared to treatments of *Fusarium* (F), nematode (M) and control (C). The activity of peroxidase and the phenol content of the plant reach to its highest level at the fifth and seventh day after inoculation with the pathogens, respectively. It is suggested to further investigate the use of bacillus and SA in different combinations as a safe and effective method to control this complex disease.

Key words: Salicylic acid, *Fusarium,* Phenol, peroxidase, *Meloidogyne*.

[1]- Former MSc Student, Department of Plant Protection, Abourayhan Campus, University of Tehran, Iran.
[2]- Associated professor, Department of Plant Protection, Abourayhan Campus, University of Tehran, Iran.
*Corresponding author: samane.dashtipoor1988@gmail.com