اثر سالیسیلیک اسید و *Bacillus subtilis* بر پوسیدگی ساقه و ریشه خیار با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* *

THE EFFECT OF SALICYLIC ACID AND *BACILLUS SUBTILIS* ON CUCUMBER ROOT AND STEM ROT, CAUSED BY *Fusarium oxysporum* F.SP. *radicis cucumerinum*

حدیث یوسفی[۱**]، نوازاله صاحبانی[۱]، منصوره میرابوالفتحی[۲]، لیلا فراورده[۲] و وحید مهدوی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۲/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۹/۱۹)

چکیده

در این تحقیق آثار سالیسیلیک اسید و *Bacillus subtilis* روی بیماری پوسیدگی ساقه و ریشه خیار با عامل *F. oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* مورد بررسی قرار گرفت. در محیط پتری غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (۸-۲ میلی‌مولار) بر رشد *B. subtilis* اثر منفی داشتند، در حالی‌که غلظت‌های بیشتر از ۵ میلی‌مولار به طور کامل از رشد قارچ عامل بیماری جلوگیری کردند. کاربرد سالیسیلیک اسید (۳، ۵ و ۷ میلی‌مولار) و *B. subtilis* قبل و یا بعد از آلودگی قارچی با هدف ارزیابی شدت بیماری، وزن تر ریشه، اندام‌های هوایی و ارتفاع بوته تحت شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار گیاهان خیار با غلظت ۷ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (به صورت اسپری برگ‌ها) و *B. subtilis* (به صورت خیساندن خاک) قبل از مایه‌زنی با عامل بیماری سبب کاهش بیماری و افزایش رشد گیاه نسبت به شاهد آلوده و سایر تیمارها می‌شود. ارزیابی محتوای فنل کل و میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تیمار کاربرد تلفیقی هر دو نوع القا کننده در مقایسه با کاربرد هر کدام از القا کننده‌ها به تنهایی و نیز گیاهان شاهد سالم و آلوده افزایش یافته بود. بیشترین مقدار این ترکیبات به ترتیب در روزهای هفتم و پنجم بعد از کاربرد القاکننده‌ها دیده شد. طبق نتایج به دست آمده، سالیسیلیک اسید به عنوان یک محرک شیمیایی دفاع گیاه و *B. subtilis* به عنوان عامل کنترل بیولوژیک و افزایش دهنده رشد گیاه، برای حفاظت مؤثر گیاهان خیار در برابر *F. oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* می‌توانند با هم استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: سالیسیلیک اسید، *Bacillus subtilis*، *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*، polyphenol oxidase

---

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: yousefi.ariya@gmail.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲. به ترتیب دانشیاران پژوهشی و مربی پژوهشی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

مقدمه

خیار یکی از مهم‌ترین محصولات گلخانه‌ای در دنیا محسوب می‌شود. بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار با عامل *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr.f.sp. *radicis-cucumerinum* D.J.Vakalounakis یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های خیار به شمار می‌آید. این بیماری ابتدا طی سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۸۹ در یونان با خسارت شدید روی کشت‌های گلخانه‌ای مشاهده و گزارش شد (Vakalounakis 1996). در حال حاضر این بیماری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مخرب خیار گلخانه‌ای در بسیاری از کشورهای جهان از جمله یونان، کانادا و کلمبیا، فرانسه، اسپانیا و بلغارستان است (Vakalounakis 1996; Punja & Parker 2000; Moreno *et al*. 2001). در گلخانه‌های ورامین و پیشوا نیز طی سال‌های ۸۴-۸۳ این بیماری دیده شد. در اکثر گلخانه‌های خیار کشور مانند جیرفت و یزد این بیماری وجود دارد (Shahriyari & Zare 2007). گیاهان می‌توانند در برابر آلودگی عوامل بیماری‌زا به واسطه یکسری ساز و کارهای متنوعی که می‌توانند موضعی یا سیستمیک باشند، از خود دفاع کنند. یکی از این واکنش‌ها مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) بوده که شامل طیف وسیعی از پاسخ‌های دفاعی گیاه است که می‌توانند به طور بیولوژیکی توسط برهمکنش گیاه با یک عامل بیماری‌زای معین یا در معرض قرار گرفتن گیاه با ترکیبات شیمیایی در گیاه تحریک شوند (Durrant & Dong 2004). به عبارت دیگر SAR، پدیده‌ای است که به موجب آن ساز و کارهای دفاع گیاهان به وسیله پیش تیمار آنها با عوامل بیولوژیکی یا شیمیایی تحریک می‌شوند (Ryals *et al*. 1996). در مقاومت سیستمیک القا شده نیز مانند مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR)، مقاومت تحریک شده به قسمت‌های سالم گیاه منتقل می‌شود و در نتیجه مقاومت نسبت به دامنه وسیعی از عوامل بیماری‌زا به وجود می‌آید. پیش تیمار گیاهان با عوامل غیر بیماری‌زا (القا کننده‌های زنده) یا ترکیبات شیمیایی (القا کننده‌های غیر زنده) می‌تواند مقاومت گیاهان را به حمله بعدی نه تنها در محل تیمار بلکه هم‌چنین در بافت‌های مجزا از محل اولیه آلودگی افزایش دهد، که این نوع سیستم مقاومت القایی به عنوان مقاومت سیستمیک اکتسابی در مقابل بیمارگرهای متنوعی شامل ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها مؤثر است (Ryals *et al*. 1996). سالیسیلیک اسید 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) و کاربرد خارجی آن سبب بیان مقاومت و افزایش ظرفیت دفاعی بافت‌ها به صورت بروز مقاومت سیستمیک اکتسابی، می‌شود (Ryals *et al*. 1996 ; Ryals *et al*. 1994). *مورفی* (Murphy 2000) نشان داده است که استفاده از این ماده در مقادیر غیر سمی برای گیاهان حساس توتون توانست مقاومت به عوامل بیماری‌زای قارچی نکروتروفیک را در آنها افزایش دهد. *فایزا و سابری* (Fayza & Sabrey 2006) در گیاهان دو هفته‌ای لوبیا تیمار شده با غلظت‌های ۰/۱ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار، عدم بروز زخم‌های موضعی ویروس بافت مردگی توتون در برگ‌های اولیه آلوده لوبیا به این ویروس را گزارش نمودند. این بازدارندگی به ویژه در تیمار غلظت‌های پایین سالیسیلیک اسید در مقایسه با گیاهان شاهد تیمار نشده، با افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز مرتبط بود. علاوه بر این، تجمع پروتئین تام در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافته بود. ریزوباکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه (PGPR) که از گروه میکروارگانیسم های متنوع

مرتبط با گیاه و تحریک‌کننده پاسخ‌های دفاعی گیاهان هستند (VanPeer & Schippers 1992) شامل دامنه وسیعی از باکتری‌های تسخیر کننده ریشه با توان افزایش رشد گیاه توسط ساز و کارهای بسیاری هستند. در بیشتر موارد گونه‌های *Bacillus* که سبب تحریک مقاومت سیستمیک می‌شوند رشد گیاه را نیز افزایش می‌دهند. علاوه بر افزایش رشد گیاه، کاربرد سویه‌های خاصی از PGPR ها روی بذرها و گیاهچه‌ها، سبب بروز مقاومت سیستمیک القائی در گیاهان تیمار شده می‌شود (Kloepper *et al.* 1980). PGPRها می‌توانند عوامل بیماری‌زا را به طور مستقیم یا با آثار غیر مستقیم تحت تأثیر قرار دهند. کلونیزه شدن ریشه توسط بعضی ریزو باکتری‌ها در تحریک مقاومت سیستمیک در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتودها مؤثر است (Kurata 1994). تیمار بذرهای خیار با سویه *B. subtilis* GBO3 یا *B. amyloliquefaciens* IN937a و ترکیبی از این دو سویه سبب افزایش قابل ملاحظه رشد گیاه و کاهش شدت بیماری لکه زاویه‌ای خیار شده است (Raupach & Kloepper 2000). مایه‌زنی بذرهای بادام زمینی با سویه *B. subtilis* AF1 در خاک‌های حاوی *Aspergillus niger* سبب کاهش مشخص پوسیدگی طوقه گیاهچه‌ها می‌شود. این کنترل زیستی با القای فعالیت لیپوکسیژناز و تحریک ISR در گیاهچه‌ها مرتبط است (Sailaja *et al.* 1997).

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 ساقه و ریشه خیار توسط *F. oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* بوده است. در این تحقیق هم‌چنین القای گیاهان از جنبه بیوشیمیایی با بررسی محتوی فنل کل و میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کاشت خیار و شرایط نگه‌داری

برای کاشت 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 کاشته و در گلخانه (دمای ۲۴ ±۲ $^{\circ}$C در اردیبهشت ماه) نگه‌داری شدند. در مرحله گیاهچه‌ای گلدان‌ها تنک شدند به طوری‌که در هر گلدان دو گیاه باقی ماند و تا مرحله یک تا دو برگی حقیقی مراقبت‌های لازم به عمل آمد تا برای انجام آزمایش آماده شوند.

تهیه قارچ عامل بیماری

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

تهیه زادمایه 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$^{\circ}$C و فشار۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. بعد از خنک شدن در هر ظرف چند قطعه ۵ میلی‌متری از محیط کشت ۴ روزه قارچ به مخلوط حاصل اضافه شد و در دمای ۲۵ $^{\circ}$C به مدت ۴ هفته نگه‌داری شدند و سپس با خاک سترون شده به نسبت ۱/۵

تا ۲ درصد وزنی مخلوط شدند (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 ۱۷ درجه سانتی‌گراد) تا ظهور علائم نگه‌داری شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتری *B. subtilis*

سوش *B. subtilis* خالص از کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی پردیس ابوریحان تهیه شد. باکتری در داخل ظروف کشت حاوی محیط Nutrient Broth به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق تهیه گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و باکتری‌های ته نشین 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 مورد نظر در این مطالعه (10^9 CFU/ml) در طول موج ۵۹۰nm ، OD= 0.06 استفاده شده است (Thompson 1996).

تهیه محلول سالیسیلیک اسید(SA)

برای تهیه غلظت‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ میلی‌مولار، از سالیسیلیک اسید شرکت مرک (Merck) و از روش *اکا* و *همکاران* (Oka *et al*. 1999) استفاده شد.

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر *B. subtilis* در ظروف کشت

غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید از ۲ تا ۸ میلی‌مولار هر کدام در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت Nutrient Agar ترکیب و سپس در ظروف کشت‌های ۹ سانتی‌متری 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 پرگنه‌های 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 از۲ 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 کلنی قارچ تمام سطح تشتک پتری شاهد را فرا گرفته بود، متوقف شد و درصد بازدارندگی سالیسیلیک اسید روی قارچ طبق فرمول زیر محاسبه گردید. آزمایش با ۸ تیمار و ۴ تکرار در قالب طرح کامل تصادفی انجام گرفت.

N= A-B/A

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

اثر SA و *Bacillus subtilis* روی رشد گیاه و شدت 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 آلوده سازی 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 غیر زنده (سالیسیلیک اسید)، کاربرد هردو به صورت زمینی و یا کاربرد باکتری به صورت زمینی و سالیسیلیک اسید به صورت هوایی بود. با توجه به نتایج بررسی‌هایی که در شرایط آزمایشگاه انجام گرفته بود، برای کارهای گلخانه‌ای غلظت ۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و در آخرین آزمایش از غلظت‌های ۳ و ۷ میلی‌مولار نیز استفاده شد. بدین ترتیب که بعد از تهیه محلول‌های مورد نظر گیاهچه‌های خیار به دو روش پاشش برگ‌ها یا آبیاری در خاک با آنها تیمار شدند. برای آلوده‌سازی گیاهان از زادمایه تهیه شده جدایه p1 قارچ عامل بیماری که قبلاً به وسیله آزمون بیماری‌زایی در گلخانه درجه بالای بیماری‌زایی آن به اثبات رسید، استفاده شد. مایه‌زنی به روش آلوده سازی 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 نرم افزار SAS 9.0 و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام شد.

بررسی تغییرات بیوشیمیایی

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 نمونه برداری متوالی بعد از کاربرد القا کننده‌ها بود، استفاده شد. برای آلوده‌سازی گیاهان از روش خاک آلوده به قارچ عامل بیماری استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره نمونه گیاهی که حاوی ۴۰ میکروگرم پروتئین بود، ۲۰ میکرولیتر محلول پرولین و حجمی از بافر سیترات - فسفات ۲۵ میلی‌مولار تا نهایت حجم نهایی مخلوط واکنش دو میلی‌لیتر شود، در یک لوله آزمایش کاملاً مخلوط و توسط ورتکس به مدت دو دقیقه هوادهی شد، سپس دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط صفر شد. دستگاه اسپکتروفتومتر روی برنامه کینتیک با مشخصات طول موج ۵۱۵ نانومتر، زمان یک دقیقه با فواصل زمانی ۱۰ ثانیه تنظیم شد. سپس ۴۰ میکرولیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی‌مولار به مخلوط فوق اضافه و بلافاصله تغییرات جذب نور با فواصل زمانی ۱۰ ثانیه و به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات

جدول۱. شاخص شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه خیار با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* (Vakalounakis 1996).

Table1-Disease severity index of cucumber root and stem rot caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* (Vakalounakis 1996).

Disease severity index	Symptoms
0	no Symptoms
1	light rot of the taproot, secondary roots and crown, light vascular discoloration in the stem
2	moderate rot of the taproot, secondary roots and crown, light vascular discoloration in the stem
3	severe rot on taproot, secondary roots and crown, with or without wilting and stunting, vascular discoloration in the stem
4	dead seedling

جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین عصاره گیاهی محاسبه شد (Mohammadi & Kazemi 2002).

ارزیابی میزان پروتئین کل

با توجه به اینکه جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم باید میزان کل پروتئین موجود در عصاره نمونه گیاهی به طور دقیقی تعیین شود، پس بدین منظور از روش *برادفورد* (۱۹۷۶) برای تعیین میزان کل پروتئین موجود در عصاره‌ها استفاده شد. پروتئین استاندارد مورد استفاده، آلبومین سرم گاوی شرکت فراکسیون (Bovine serum albumin= BSA) بود که به صورت آماده تهیه گردید.

استخراج پروتئین

ابتدا یک گرم از بافت گیاه را در هاون چینی که قبلاً در یخچال سرد شده بود، به خوبی ساییده، سپس یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH= 6 به آن اضافه گردید. عصاره به دست آمده به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اپندورف منتقل و توسط میکرو سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای $4^{\circ}C$، سانتریفیوژ شد. در مرحله آخر محلول رویی به لوله‌های جدید منتقل و تا زمان ارزیابی ترکیبات دفاعی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (Reuveni 1995).

نتایج

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر *B. 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 پرگنه‌های 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 *F. oxysporum* f.sp *radicis cucumerinum* 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 درصد بازدارندگی در غلظت ۵ میلی‌مولار با مقدار آن در تیمار غلظت‌های کمتر و بیشتر از خود دارای اختلاف معنی‌دار بود، به طوری‌که در غلظت‌های کمتر از ۵ میلی‌مولار (۲،۳ و۴ میلی‌مولار) درصد بازدارندگی بسیار کم ولی در غلظت‌های بیشتر از آن (۶، ۷ و ۸ میلی‌مولار) درصد بازدارندگی ۱۰۰٪ بوده است (شکل۱) و (جدول۲).

تأثیر *B. subtilis* و سالیسیلیک اسید بر شدت بیماری و فاکتورهای مختلف رشد در روش کاربرد آنها بعد از مایه‌زنی گیاه با *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*:

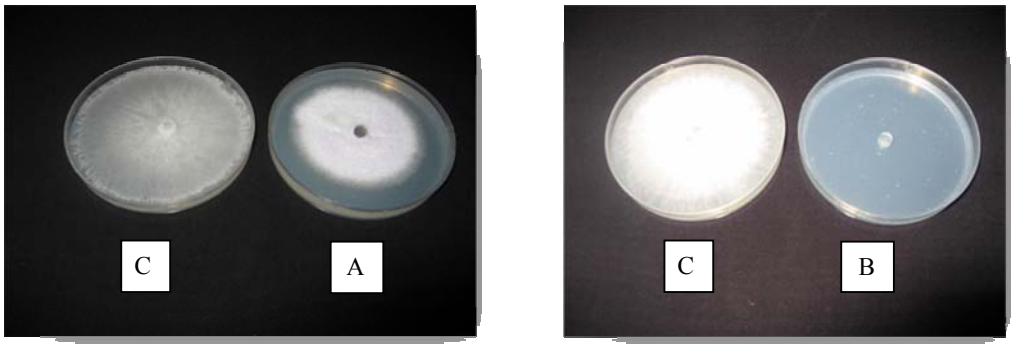
تیمارها از نظر شدت بیماری با گیاهان سالم دارای اختلاف معنی‌دار بودند و از نظر وزن تر ریشه همه تیمارها با گیاهان آلوده به قارچ عامل بیماری اختلاف معنی‌داری داشتند. از نظر وزن تازه اندام‌های هوایی تمام تیمارها به جز تیمار تلفیقی کاربرد باکتری در خاک و محلول‌پاشی برگ با سالیسیلیک اسید ۵ میلی‌مولار با گیاهان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

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

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 دیده نشد (جدول۴).

تأثیر *B. subtilis* و سالیسیلیک اسید بر شدت بیماری و برخی فاکتورهای رشدی در روش کاربرد آنها قبل از مایه‌زنی گیاهان با عامل بیماری در شرایط تغییر در زمان کاربرد و مقدار القا کننده بیوشیمیایی

از نظر شدت بیماری تیمار شاهد آلوده با سایر تیمارها به جز تیمارهای کاربرد غلظت‌های ۳ و۷ 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



شکل۱. اثر غلظت‌های ۵ و ۸ میلی مولار سالیسیلیک اسید روی *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis cucumerinum* (A-C) . تشتک‌های پتری سمت چپ قارچ بدون سالیسیلیک اسید (شاهد) ، تشتک‌های پتری سمت راست به ترتیب حروف الفبای لاتین غلظت‌های ۵ و ۸ میلی مولار سالیسیلیک اسید.

Fig. 1. Effect of the SA concentrations (5 and 8 mM) on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* . (A-C). C = control (0 mM), A= 5mM, B= 8Mm.

جدول۲. درصد بازدارندگی رشد *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* در محیط حاوی غلظت‌های اسید سالیسیلیک (Mm).

Table 2. Effects of the different SA concentrations on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* *in vitro*.

(Inhibitory rate) (%) میزان بازدارندگی (٪)	(Concentration of SA) mM غلظت اسید سالیسیلیک
3.435C	2
4.592C	3
6.525C	4
17.495B	5
100A	6
100A	7
100A	8

cv = 4.016

اعداد با حروف یکسان در سطح ۱٪ معنی‌دار نمی‌باشند.

Column represent the mean inhibitory rate on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*. Those with the same letter are not significantly different ($P = 0{\cdot}01$).

ریشه، کلیه تیمارها اختلاف معنی‌داری با 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 (جدول۵).

جدول۳. تأثیر سالیسیلیک اسید و *Bacillus subtilis* بر شدت بیماری، وزن تر ریشه، وزن اندام‌های هوایی و ارتفاع بوته در روش استفاده از آنها بعد از مایه زنی گیاه با عامل بیماری.

Table 3. Effect of the SA and *Bacillus subtilis* on disease severity, root and shoot fresh weight and shoot length in method, application them after plant inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*.

Shoot length (cm)	Shoot fresh weigh (g)	Root fresh weight (g)	Disease severity	Treatments
3.2619bc	2.9722b	1.7112a	1.49367a	P+F+B
3.8112ab	3.1230ab	1.7880a	1.41421a	P+F+SA_{sp}(5mM)+B
2.9445c	2.1212c	0.8454b	1.57313a	P+F
3.3534bc	2.9402b	1.4402a	1.57313a	P+F+SA_{sd}(5mM)
2.9920bc	2.8678b	1.4591a	1.49367a	P+F+SA_{sd}(5mM)+B
4.4223a	3.6678a	1.8272a	0b	CO

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

Numbers followed by different letters in each column differ significantly at $P \leq 0{\cdot}01$ using Duncan's multiple-range test. (means obtained from four replicates.) P = plant, F = *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*, B = *Bacillus subtilis*, SA_{sp} = foliar spray application of SA, SA_{sd} = soil drench application of SA, CO = control plant.

جدول۴. 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 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*.

Table 4. Effect of the SA and *Bacillus subtilis* on disease severity, root and shoot fresh weight and length shoot in method, application them prior to fungal infection with *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*.

Shoot length (cm)	Shoot fresh weigh (g)	Root fresh weight (g)	Disease severity	Treatments
1.82035a	2.6249a	1.8175a	0d	CO
1.58636b	2.4073a	1.9532a	1.41421ab	P+SA_{sd} (5mM)+F
1.55941b	2.7175a	1.8084a	1.2071bc	P+SA_{sd} (5mM)+B+F
1.69897ab	2.6253a	2.1179a	1c	P+ SA_{sp} (5mM)+B+F
1.66204ab	2.7664a	2.1673a	1.1036bc	P+B+F
1.63931ab	2.1834a	1.1178b	1.5731a	P+F

اعداد هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده اند 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 بصورت اسپری برگی، SA_{sd} = سالیسیلیک اسید بصورت خیساندن خاک، CO= گیاه شاهد.

Means followed by different letters in the same column are significantly different (Duncan test at p<0.01). (Data presented are means of three replications.)
P = plant, F = *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*, B = *Bacillus subtilis*, SA_{sp} = foliar spray application of SA, SA_{sd} = soil drench application of SA, CO = control plant.

جدول۵. تأثیر سالیسیلیک اسید و *Bacillus subtilis* بر شدت بیماری و فاکتورهای رشدی مختلف در روش کاربرد آنها قبل از مایه‌زنی گیاهان با *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* در شرایط تغییر در زمان کاربرد و مقدار القاء کننده بیوشیمیایی.

Table 4. Effect of the SA and *Bacillus subtilis* on disease severity, root and shoot fresh weight and length shoot in method, application them prior to fungal infection with *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*.

Shoot length (cm)	Shoot fresh weigh (g)	Root fresh weight (g)	Disease severity	Treatments
4.3542ab	2.7197a	1.70575a	1.1036bc	P+B+F
4.3052ab	2.5860a	1.60028ab	1c	P+SA_{sd}(7mM)+B+F
4.3917a	2.8229a	1.63164ab	0.5d	P+SA_{sp}(7mM)+B+F
3.7526cd	2.6305a	1.20212c	1.4142ab	P+SA_{sd}(7mM)+F
3.8640bcd	0.3637c	1.20746c	1.4937a	P+SA_{sd}(3mM)+F
3.6537d	0.0932c	1.04881c	1.5731a	P+F
3.9315abcd	2.2449b	1.45572b	0e	CO
4.3459ab	2.6903a	1.49081ab	1c	P+SA_{sp}(7mM)+B+F*
4.2004abc	2.5332a	1.45746b	1.3107abc	P+SA_{sd}(3mM)+B+F**

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.

Means followed by different letters in the same column are significantly different (Duncan test at p<0.01). (means obtained from four replicates.) P = plant, F = *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*, B = *Bacillus subtilis*, SA_{sp} = foliar spray application of SA, SA_{sd} = soil drench application of SA, CO = control plant. * , **= plant treated with SA, one week after plant inoculation with *B. subtilis* and three days after fungal infection.

تعیین محتوی ترکیبات فنلی کل در ریشه خیار تیمار شده با *Bacillus subtilis*، سالیسیلیک اسید و *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*:

نتایج نشان داد که بین تیمارهای مختلف، بین روزهای نمونه‌برداری و اثر متقابل آنها از نظر مقدار ترکیبات فنلی کل در ریشه تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ وجود دارد. تجمع بالای ترکیبات فنلی در ریشه‌های تیمارشده با باکتری + سالیسیلیک اسید مشاهده شد، به گونه‌ای که این تیمار از روز اول با شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. بیشترین مقدار ترکیبات فنلی این تیمار در روز هفتم بود که در مقایسه با گیاه سالم، گیاه مایه‌زنی شده با قارچ و گیاه مایه‌زنی شده با باکتری و سالیسیلیک اسید هر کدام به تنهایی اختلاف معنی‌داری داشت. این مقدار ترکیبات فنلی با محتوی ترکیبات فنلی روزهای قبل و بعد از خود نیز دارای تفاوت معنی‌داری بود. در تیماری که سالیسیلیک اسید به تنهایی القا کننده بود مقدار ترکیبات فنلی در روز اول با شاهد سالم تفاوت معنی‌دار نداشت ولی از روز دوم شروع به افزایش کرده به گونه‌ای که با شاهد تفاوت معنی‌دار پیدا کرد و در روز هفتم به بالاترین میزان خود رسید، سپس در روز هشتم مجدداً کاهش یافت. در تیمار القاء مقاومت با استفاده از باکتری به تنهایی نیز بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در روز هفتم دیده شد و این تیمار از روز دوم با شاهد تفاوت معنی‌دار پیدا کرد حتی در روز هشتم که مقدار ترکیبات فنلی نسبت به روز هفتم کاهش پیدا کرده بود نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار داشت. مقدار ترکیبات فنلی در شاهد طی روزهای مختلف نمونه‌برداری

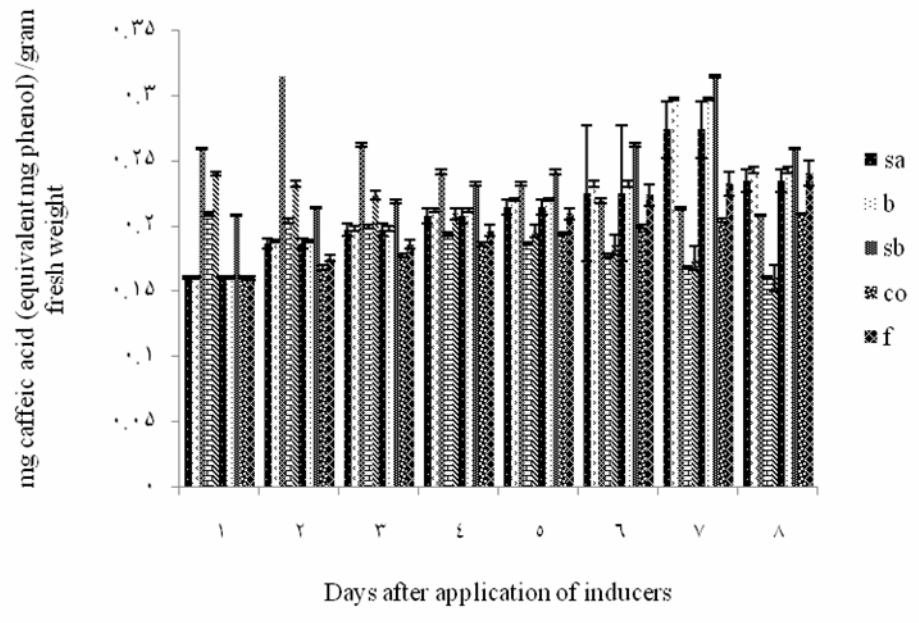
بدون اختلاف معنی‌دار بود. بیشترین تجمع ترکیبات فنلی در شاهد آلوده، در روز هشتم بود که در این روز با شاهد سالم اختلاف معنی‌داری داشت (شکل۲) و (جدول۶).

بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاه خیار تیمار شده با سالیسیلیک اسید و *Bacillus subtilis* و سپس مایه‌زنی با *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* :

تحریک گیاهان خیار با استفاده از باکتری + سالیسیلیک اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در روز سوم شد به طوری که در این روز تفاوت معنی‌داری با شاهد سالم پدیدار شد و در روز پنجم به بالاترین میزان فعالیت خود نسبت به شاهد سالم، گیاه مایه‌زنی شده با باکتری، گیاه القا شده با سالیسیلیک اسید به تنهایی و گیاه مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری رسید. از روز پنجم به بعد فعالیت آنزیم کاهش یافت ولی همواره با شاهد سالم اختلاف معنی‌داری داشت. تغییرات فعالیت آنزیم در گیاهان تحریک شده با سالیسیلیک اسید طی روزهای اول تا چهارم تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد نداشتند اما از روز چهارم افزایش یافت و در روز ششم به بالاترین میزان فعالیت خود رسید. سپس در روزهای بعد فعالیت آن کاهش یافت. در گیاه مایه‌زنی شده با باکتری حداکثر فعالیت آنزیم در روز پنجم دیده شد و طی روزهای بعد کاهش یافت. فعالیت آنزیم در این تیمار از روز چهارم دارای یک روند افزایشی شد که نسبت به شاهد سالم اختلاف معنی‌دار داشت (شکل۳) و (جدول۷).

بحث

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 به گونه‌ای که در برخی مناطق میزان خسارت روی ارقام حساس تا حدود ۱۰۰ درصد گزارش شده است و از سوی دیگر عوامل بیوکنترل و القا کننده‌های شیمیایی به عنوان دو شیوه امیدبخش در کنترل بیماری‌های گیاهی مطرح می‌باشند (Yu & Zheng 2006) در این تحقیق از تلفیق دو روش القای مقاومت و کنترل زیستی به کمک SA (القا کننده شیمیایی) و *B. subtilis* (عامل بیوکنترل بسیاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی) ، جهت مبارزه با بیماری استفاده گردید. هدف از انجام این پژوهش نیز یافتن راهی مناسب و کارا جهت کاربرد توأم هر دو استراتژی بود. واکنش‌های دفاعی گیاهان توسط شبکه پیچیده‌ای از مولکول‌های سیگنالی و تنظیم کننده‌های نسخه‌برداری از ژن‌ها تنظیم می‌شوند. سه مولکول سیگنال کلیدی به نام‌های سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن سبب بیان واکنش‌های دفاعی خاص و اساسی می‌شوند (Jalali 2005). 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 غیر بیماری‌زای تسخیر کننده ریشه که معمولاً به عنوان مقاومت سیستمیک القاء شده ریزوباکتریایی(ISR) نامیده می‌شود، در گیاه به وجود می آید (Van Loon *et al*. 1998). چندین سویه ریزوباکتریایی به سبب تحریک رشد و مقاومت سیستمیک القائی (ISR)، به عنوان باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه فعالیت می‌کنند



شکل۲. اثر سالیسیلیک اسید ، باکتری *Bacillus subtilis* ، *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* روی مقدار ترکیبات فنلی ریشه خیار. هر ستون میانگین چهار تکرار ± خطای استاندارد (SE) 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 القا شده با هر دو نوع القا کننده میکروبی و شیمیایی قبل از آلوده‌سازی با قارچ عامل بیماری، CO = گیاه شاهد سالم، F = گیاه مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری یا شاهد آلوده).

Fig 2. Effect of SA , *Bacillus subtilis* , *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* on phenolic contents in cucumber root. Each column obtained from four replicate. Vertical bars represented standard deviations of the means.(SA= SA treated plant prior to fungal infection, B= pretreated plant with *Bacillus subtilis* prior to fungal infection , SB= plant induced by microbial and chemical elicitors, prior to fungal infection, CO= healthy plant , F= plant inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* or infected plant.

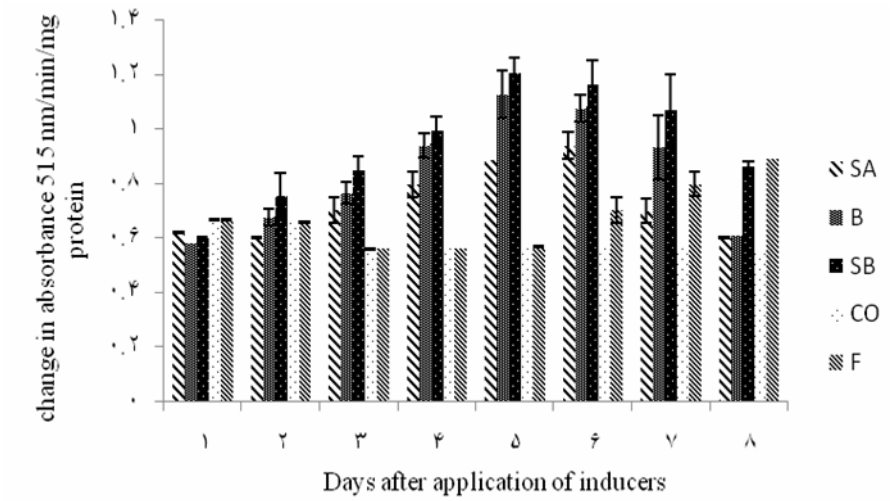
جدول۶. تجزیه واریانس بررسی مقادیر فنل کل در ریشه گیاهان شاهد سالم، شاهد آلوده وگیاهان تیمار شده با هر کدام از القاء کننده‌ها به تنهایی یا در حالت تلفیق با یکدیگر.

Table 6. The ANOVA Procedure of total phenol content in root healty plants, infected plants and plants treated with elicitors alone or in form combined.

F Value	میانگین مربعات Mean Squares (MS)	مجموع مربعات TypeI Squares (SS)	درجه آزادی Degree of freedom (df))	منبع تغییرات Sources of variation (SOV)
125/32	0/01400317	0/05601270	4	Treatment
164/6*	0/183971*	0/12879094*	7	Days of sampling
5/37*	0/00059952*	0/1678659*	28	Treatment × Days of sampling
			121	Error
			160	Corrected Total

* :در سطح ۵ درصد معنی دار است. CV (ضریب تغییرات) در این آزمون ۴/۹۶۹۹۷۰ می‌باشد.

*= significant at P≤ 0·05 , CV= 4.96



شکل۳. اثر سالیسیلیک اسید، باکتری *Bacillus subtilis* ، *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* روی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ریشه خیار. هر ستون میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (SE) 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 القا شده با هر دو نوع القاکننده میکروبی و شیمیایی قبل از آلوده سازی با قارچ عامل بیماری، CO = گیاه شاهد سالم، F = گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری یا شاهد آلوده).

Fig 3. Effect of SA , *Bacillus subtilis* , *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* on polyphenol oxidase activity in cucumber root. Each column obtained from three replicate. Vertical bars represented standard deviations of the means.(SA= SA treated plant prior to fungal infection, B= pretreated plant with *Bacillus subtilis* prior to fungal infection , SB= plant induced by microbial and chemical elicitors, prior to fungal infection, CO= healthy plant , F= plant inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* or infected plant.

جدول۷. تجزیه واریانس بررسی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ریشه گیاهان شاهد سالم، شاهد آلوده و تیمار شده با هر کدام از القا کننده‌ها به تنهایی یا در حالت تلفیق با یکدیگر.

Table 7. The ANOVA Procedure of polyphenol oxidase activity in root healty plants, infected plants and plants treated with elicitors alone or in form combined.

F Value	میانگین مربعات Mean Squares (MS)	مجموع مربعات TypeI Squares (SS)	درجه آزادی Degree of freedom (df)	منبع تغییرات Sources of variation (SOV)
39/26*	0/01400317	0/05601270	4	Treatment
12/30*	0/01839871	0/12879094	7	Days of sampling
4/77*	0/00059952	0/01678659	28	Days of × Treatment sampling
			80	Error
			119	Corrected Total

*: در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد.CV (ضریب تغییرات) در این آزمایش ۱۴/۲۳ می‌باشد.

* =significant at P≤ 0·05 , CV=14.23

(Van Loon 2007). با توجه به اینکه باکتری و سالیسیلیک اسید می‌توانند روی یکدیگر اثر منفی داشته باشند 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 مانند *B. subtilis* دارند. اثر سالیسیلیک اسید بر قارچ عامل بیماری نیز بررسی شد و طبق نتایج به دست آمده قارچ در غلظت‌های ۶، 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 هم افزایی محرک‌ها مفید هستند ولی نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی را نمی‌توان به شرایط طبیعی تعمیم داد زیرا در محیط طبیعی عوامل زیادی مانند رطوبت، پی اچ خاک، دما و دیگر میکروارگانیسم‌ها، برهمکنش SA و *B. subtilis* با یکدیگر را تحت تأثیر قرار می‌دهند، به همین دلیل در آزمایش‌های گلخانه‌ای از غلظت‌های۳ ، 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 حالی‌که 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 از این آزمایش 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 است. اما به دلیل اینکه بین تیمارها با یکدیگر تفاوتی دیده 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 القا کننده‌ها جهت تعیین بهترین حالت کاربرد توأم آنها طراحی شد. همه تیمارهای تلفیقی این آزمایش 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 (پاشش 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. بنابراین 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 است. با توجه به اینکه یکی از ساز و کارهای 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 محتوای فنل کل و میزان فعالیت آنزیم PPO اثر این دو محرک در ساز و کار مقاومت بررسی شد. نتایج بررسی محتوای فنل کل در تیمارها نشان داد که مقدار ترکیبات فنلی در طی زمان نمونه‌برداری تا روز هفتم دارای یک روند افزایشی بود و سپس کاهش یافت. در تیمار تلفیقی مقدار ترکیبات فنلی با مقدار این ترکیبات در سایر تیمارها طی هشت روز زمان نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری داشت. نتیجه نهایی اینکه در این پژوهش بین القاکننده‌های زیستی و شیمیایی با شاهد سالم افزایش مقدار ترکیبات فنلی کل تفاوت معنی‌داری داشت و می‌توان نتیجه گرفت که سریع‌تر بودن تولید و تجمع ترکیبات فنلی در تیمار تلفیقی به علت اثر القای مقاومت این دو محرک می‌باشد که سبب فعال شدن ساز و کارهای دفاعی و افزایش تدریجی تولید و تجمع ترکیبات فنلی می‌شوند. نتایج این بررسی با نتایج مطالعات دیگر محققین مطابقت دارد. مقدار فنل کل در مقاومت رقم مقاوم نخود به بیماری پژمردگی فوزاریومی نقش داشته است (Mandavia *et al*. 1997). ریشه‌ها و شاخه‌های نخود فرنگی تیمار شده با سالیسیلیک اسید، اسپرماین (Spermine)، سالیسیلیک اسید + اسپرماین و پاتوژن *F. oxysporum* f.sp. *ciceri* مقادیر بالاتر ترکیبات فنلی را در مقایسه با گیاهان تیمار شده با آب نشان دادند (Raju *et al*. 2008). کاهش وقوع بیماری شانکر باکتریایی در بذور گوجه فرنگی تیمار شده با سویه *Bacillus subtilis* GBO3 به طور مشخصی با افزایش محتوی فنلی و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز مرتبط است (Girish & Umesha 2005) . پلی فنل اکسیدازها سبب اکسیداسیون دی هیدروکسی فنل‌ها به کینون‌ها که برای عوامل بیماری‌زا سمی‌تر هستند، می‌شوند. سمیت مستقیم کینون‌ها برعلیه عوامل بیماری‌زا پیشنهاد شده است (Mayer & Harel 1979). علاوه بر این مطالعات زیادی نیز نشان داده‌اند که این آنزیم در واکنش نسبت به زخم شدن مکانیکی، آلودگی قارچی باکتریایی یا به وسیله تیمار با مولکول‌های خبر رسان از قبیل جاسمونیک اسید/ متیل جاسمونیت، سیستمین و سالیسیلیک اسید تحریک می‌شود (Constablel *et al*. 2000 ; Stewart *et al*. 2001). مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بین تیمارهای گوناگون نشان داد که در همه تیمارها افزایش فعالیت آنزیم بعد از کاربرد القا کننده‌ها و مایه‌زنی عامل بیماری وجود دارد. تیمار تلفیقی از روز سوم با شاهد تفاوت معنی‌دار پیدا کرد و در پنجمین روز به اوج فعالیت خود رسید که در این روز نه تنها با شاهد بلکه با تیمار سالیسیلیک اسید نیز دارای اختلاف معنی‌داری بود. پایداری مقاومت القاء شده توسط این تیمار و تیمار القای با باکتری نسبت به تیمار سالیسیلیک اسید بیشتر بود هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم در آنها در مقایسه با سالیسیلیک اسید تنها دارای شیب تندتری بود. می‌توان استنباط کرد که قارچ عامل بیماری نیز می‌تواند محرک واکنش‌های دفاعی گیاه باشد زیرا طبق نتایج به دست آمده سومین روز بعد از آلوده‌سازی گیاهان با عامل بیماری در تیمار قارچ تنها، روز اوج فعالیت آنزیم بود. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که القای گیاه با استفاده از این القاگرها و عامل بیماری سبب افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم می‌شود، و علی‌رغم پایین بودن میزان فعالیت این آنزیم از نظر کمیت ولی می‌توان آن را به عنوان یک نشانگر مقاومت در این گیاه در نظر گرفت. *شووی و همکاران*(Shouwei *et al*. 2009) در ارقام مختلف خیار تغییر در فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز را بعد از مایه‌زنی با

عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* بیماری پژمردگی فوزاریومی خیار بررسی کردند. همه ارقام ابتدا فعالیت آنزیم افزایش سپس کاهش و در پایان مجدداً افزایش یافت. بیست و چهار ساعت پس از مایه‌زنی اولین اوج فعالیت آنزیم در تمام ارقام رخ داد. در ارقام حساس اولین اوج به طور مشخصی بیشتر از تیمارهای شاهد بود. دومین اوج فعالیت آنزیم ارقام مقاوم و حساس به ترتیب ۴۸ و ۶۰ ساعت بعد از مایه‌زنی با عامل بیماری دیده شد. با توجه به نتایج به دست آمده این آنزیم توانست به عنوان شاخص ارزیابی جهت انتخاب ارقام مختلف خیار حساس یا مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی استفاده شود. در برگ‌های گلابی کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید به عنوان یک محرک شیمیایی سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز، پراکسیداز و بروز مقاومت سیستمیک و موضعی نسبت به بیماری نقطه سیاه (*Alternaria kikuchiana* Tanaka) می‌شود. سه روز پس از تیمار با سالیسیلیک اسید بیان مقاومت سیستمیک در برگ‌ها قابل تشخیص بوده و به مدت ۱۰ روز ادامه داشت. کمترین میزان وقوع بیماری در تیمار غلظت ۰/۰۲ mM/L سالیسیلیک اسید دیده شد (Wang *et al.* 2010). نتایج بررسی‌های کاربرد باکتری آنتاگونیست سویه *B. subtilis* AR12 برای کنترل پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی (*Ralstonia solanacearum*) در گلخانه نشان داد که کارایی کنترل بیولوژیکی باکتری بالای ۹۰/۱۸ درصد بود. ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با عامل بیماری بیشترین فعالیت این آنزیم در گیاهان تیمار شده با باکتری مشاهده شد، در مقابل گیاهان گوجه فرنگی که تنها با *R. solanacearum* تیمار شده بودند، میزان فعالیت آنزیم کمتر و دیرتر افزایش یافت و کمترین مقدار فعالیت آنزیم با تغییرات اندک نیز در گیاهان تیمار شده با آب سترون مشاهده گردید (Li *et al.* 2008).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (87-85) متن انگلیسی مراجعه شود.