

تأثیر ناهمسازی برخی سویه‌های باکتری *Pseudomonas fluorescens* بر القای پاسخ دفاعی گیاه پسته علیه پوسیدگی فیتوفترایی طوقه و ریشه

بدروسادات محمودی میمند^۱، روح اله صابری ریشه^{۲*}، محمد مرادی^۳، حسین علایی^۴ و امیرحسین محمدی^۳
 ۱، ۲، ۴. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج)، رفسنجان، ایران
 ۳. استادیاران، پژوهشکده پسته، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران
 (تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۵)

چکیده

تأثیر ناهمسازی (آنتاگونیستی) سی سویه باکتری *Pseudomonas fluorescens* جداسازی شده از خاک‌های مناطق مختلف روی *Phytophthora drechsleri* عامل انگومک (گموز) پسته در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بررسی شد. در آزمایشگاه، برای ارزیابی توان بیوکنترلی سویه‌ها از آزمون کشت متقابل و متابولیت‌های فرار استفاده شد. در آزمون کشت متقابل سویه T17-4 با ۶۱/۹۰۴ درصد و در آزمون متابولیت‌های فرار سویه VUPF760 با ۵۷/۸۷ سبب بیشترین میزان کاهش رشد در بیمارگر شدند. در گلخانه، سویه‌های VUPF760 و VUPF506 به ترتیب با ۶۸/۷۵ و ۱۶/۶۶ درصد بیشترین و کمترین تأثیر را در کاهش شدت بیماریزایی داشتند. در قسمت دوم آزمایش توانایی سویه‌های منتخب آزمایشگاهی به‌عنوان فعال‌کننده سازوکار دفاعی گیاه پسته علیه بیماری فیتوفتورایی بررسی شد. میزان تغییرپذیری برخی ترکیب‌های دفاعی گیاهی از جمله آنزیم پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیا لایز و همچنین میزان فنل کل در روزهای ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سویه‌های باکتری فعالیت آنزیم‌های بالا و همچنین ترکیب‌های فنلی را در نهال‌های آلوده تیمار شده با عامل ناهمساز (آنتاگونیست) افزایش داد که این افزایش در روز ششم پس از مایه‌زنی، به بیشترین میزان خود رسید. سویه‌های باکتری توانایی متفاوتی در روند افزایشی آنزیم پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیا لایز و همچنین میزان فنل کل داشته به طوری که سویه VUPF760 بیشترین و سویه VUPF506 کمترین تأثیر را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: انگومک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کنترل بیولوژیک، مقاومت القایی.

Induction of plant defense response against *Phytophthora* crown and root rot in pistachio by *Pseudomonas fluorescens* strains

Badrosadat Mahmudi mimand¹, Rohollah Saberi Ryseh^{2*}, Mohammad Moradi³, Hoseein Alaei⁴ and Amir Hosein Mohammadi⁵

1, 2, 4. M. Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr, University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

3. Assistant Professors, Pistachio Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran
 (Received: Oct, 2, 2015 - Accepted: Sepp, 26, 2016)

ABSTRACT

Activities of thirty bacterial strains obtained from plants rhizosphere in different areas against *Phytophthora drechsleri* were assessed through *in vitro* and greenhouse experiments. Dual culture and extracellular metabolites tests were used in *in vitro* assays. The bacterial strains inhibited growth of *P. drechsleri*, the highest inhibition zones was belonged to T17-4 strain with 61.904% in dual culture and VUPF760 strain with 57.87% in cell free metabolites tests. The highest and lowest reduction rates of disease severity were belonged to VUPF760 and VUPF506 with 68.75 and 16.66%, respectively. In the second section of the study, the ability of bacterial strains to induce peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia lyase and phenolic compounds in pistachio seedling was investigated 3, 6, 12 and 24 days after inoculation. Bacterial strains increased enzyme activities that reached the maximum levels 6 days after inoculation with pathogen. The highest level of phenolic compounds was observed at 6 days after pathogen inoculation in treatments of bacterial strains and *Ph. drechsleri* compared with control. Induction of resistance in plants even 24 days after post-treatment with bacterial strains was effective for induction of more durable resistance compared to other activators of plant defense system. The ability of bacterial strains to increase enzymes activities and levels of phenolic compounds may be some of the mechanisms responsible for their biocontrol activities. VUPF760 strain showed the highest increase enzymes activities and levels of phenolic compounds.

Keywords: antioxidant activity, biological control, gummosis, induce resistance.

مقدمه

پسته *Pistacia vera* L. یکی از گیاهان مقاوم به شرایط نامساعد محیطی و میوه آن به عنوان مهم ترین محصول اقتصادی در بسیاری از مناطق کویری و خشک ایران قابل توصیه و توسعه است. بیماری انگومک (گموز) دیرزمانی است به عنوان یکی از معضلات اصلی درختان پسته مطرح می شود به گونه ای که در باغ های با شرایط مناسب برای بیمارگر، باعث غیراقتصادی شدن تولید می شود. چندین گونه مختلف قارچ *Phytophthora* از مناطق مختلف پسته کاری به عنوان عامل این بیماری گزارش شده اند (Moradi, 1998; Banihashemi, 1995; Mirabolfathy *et al.*, 2001). به منظور کنترل بیماری از روش هایی چون مبارزه زراعی، شیمیایی، کنترل زیستی (بیولوژیک) و پایه های مقاوم استفاده می شود. لازم به یادآوری است که کاربرد مداوم و گسترده قارچ کش ها به دلیل آلودگی زیست محیطی، اثرگذاری مخرب روی انواع مختلف موجود (ارگانیسم) های غیر هدف و ایجاد سویه های مقاوم جایز به نظر نمی رسد (Roberts, 2002). در چنین شرایطی و نظر به مشکلات چندی که در زمینه کنترل بیمارگر پوسیدگی طوقه و ریشه پسته وجود دارد و با توجه به مرگومیر شدید درختان بیمار و آسیب زیاد به باغداران، اهمیت استفاده از روش های سازگار با محیط زیست در مدیریت این بیماری آشکار می شود.

در زمان تحریک گیاه توسط برخی مواد شیمیایی، نژادهای ناسازگار عامل های بیماریزا و یا عامل های بیماریزایی که ظهور نشانه های آنها وابسته به شرایط محیطی است، ظرفیت دفاعی گیاه بالا می رود، که این حالت به القاء مقاومت تعبیر می شود (Gorlach *et al.*, 1997; Sticher *et al.*, 1996). آغاز این مقاومت با عنوان مقاومت اکتسابی نظام یافته یا سیستمیک (SAR)، همراه با افزایش نظام یافته و موضعی سالیسیلیک اسید (SA) است (Malamy *et al.*, 1990). نوع دیگری از مقاومت القایی در گیاهان توسط عامل های زنده غیر بیماریزا ایجاد می شود که مقاومت نظام یافته القایی (ISR) نامیده می شود (Audenaert *et al.*, 2002; Raupach *et al.*, 1996; Van Loon *et al.*, 1998). یکی از عامل های القاگر ISR، ریزوباکترهای (PGPR) هستند که از مسیرهای مختلفی باعث القاء

مقاومت می شوند. در پی تیمار گیاهان با PGPRها، افزایش چشمگیری در مقدار فیتوالکسین های (Phytoalexin) (Van Peer *et al.*, 1991)، ترکیب های فنلی (Piga *et al.*, 1997)، پراکسیدازها (Zdore & Anderson, 1992; Albert & Anderson, 1987) سطوح mRNAهای شناساگر فنیل آلانین آمینولاز (PAL) و همچنین میزان چوبی شدن گیاه، مشاهده شده است. در شرایط طبیعی بین میزان تولید ROS (Reactive oxygen species) و فعالیت سازوکار (مکانیسم) های از بین برنده ROS تعادل وجود دارد، اما تحت تنش این تعادل به هم می خورد و موجب تنش اکسایشی (اکسیداتیو) در گیاهان می شود (Abdul Jaleel *et al.*, 2009; Bhattacharjee, 2005).

گیاهان سازوکارهای ضد اکسایش (اکسیداسیون) برای کاهش اثر رادیکال های آزاد دارند. این سازوکارها شامل بروز تغییرهایی در میزان آنزیم های دفاعی گیاه مانند کاتالاز، پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز، آنزیم PAL و ترکیب های دیگری از جمله فنل ها است (Honty *et al.*, 2003; Hsu & Kao, 2005). پراکسیدازها از جمله آنزیم هایی که بر اثر تنش های زیستی فعال می شود و به دنبال تیمار گیاه با عامل های ناهمساز (آنتاگونیست) افزایش پیدا می کند. این آنزیم ها یاخته را در برابر مقادیر سمی H_2O_2 حفاظت می کنند (Parida & Das, 2005). تجمع پراکسیدازها در یاخته نقش مهمی در استحکام دیواره یاخته ای در فرآیند تمایز یاخته ای و افزایش مقاومت به نفوذ عامل های بیمارگر دارد (Chittoor *et al.*, 2001; Odjakova & Hadjuvanova, 1999). پلی فنل اکسیداز یا تیروزیناز آنزیمی دو اتم مس در هسته مرکزی خود دارد که اکسایش دی فنل ها به کینون ها را انجام می دهد. این آنزیم در این واکنش از اکسیژن مولکولی به عنوان بستره (سوبسترا) استفاده می کند (Mayer, 2006). فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) نخستین و مهم ترین آنزیم مسیر فنیل پروپانویید است که باعث ساخت (سنتز) بنزوئیک اسید، سالیسیلیک اسید و دیگر فنل های وابسته به دفاع سوخت و ساز (متابولیسم) های ثانویه گیاه می شود (Tsuge *et al.*, 2004). فنل ها ترکیب هایی با وزن مولکولی پائین هستند که در پاسخ گیاه به تنش های مختلف از جمله عامل های بیماریزای

آزمون ترکیب‌های فرار ضد قارچی برابر روش Fiddaman & Rossall (1994) انجام شد. به‌منظور بررسی تولید برخی متابولیت‌های ضدقارچی در سویه‌های منتخب از آزمون پروتئاز بنا بر روش Maurhofer *et al.* (1995)، توان تولید سیانید هیدروژن با استفاده از روش Alstrom & Burns (1989) و اندازه‌گیری میزان تولید آهن‌بر (Siderophore) به روش طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتری) برابر روش Meyer & Abdallah (1978) استفاده شد. شمار پنچ سویه باکتری با توان ناهمسازی بالا، در آزمایش‌های گلخانه‌ای و همچنین بررسی سازوکار مقاومت استفاده شد.

سنجش ایجاد مقاومت القایی در نهال‌های پسته تحت شرایط گلخانه

کاشت نهال

بذرهای پسته رقم سرخس از مؤسسه تحقیقات پسته کشور در رفسنجان تهیه شد. کاشت بذرها برابر روش ارائه‌شده توسط Moradi (1998) در خاک سترون صورت گرفت.

مایه‌زنی قارچ عامل بیماری

برای مایه‌زنی نهال‌های شش ماهه، زادمایه *P. drechsleri* روی دانه برنج سترون به مدت یک ماه در دمای ۲۷ درجه سلسیوس پرورش داده شد (Holmes & Benson, 1994). به‌منظور مایه‌زنی قارچ عامل بیماری خاک سطحی گلدان‌ها برداشته و مایه (اینوکولوم) *P. drechsleri* در ناحیه اطراف ریشه نهال‌های پسته (۵ گرم به ازای هر کیلوگرم خاک گلدان) قرار گرفت و دوباره با همان خاک پوشانده شد. برای گیاه شاهد بدون مایه‌زنی از برنج سترون استفاده شد.

مایه‌زنی سویه‌های باکتری

برای افزودن دروایه (سوسپانسیون) سویه‌های باکتری، در آغاز باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی محیط کشت NA کشت داده شدند و سپس دروایه‌ای با غلظت 10^{10} از یاخته هرکدام از باکتری‌ها در آب مقطر استریل (10^{10} یاخته باکتری = OD ۰/۵) تهیه و

گیاهی دخالت دارند (Zheng *et al.*, 2005). آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز از جمله آنزیم‌هایی هستند که در اکسایش فنل به کینون و تشکیل لیگنین در یاخته‌های گیاهی در طول حمله بیمارگرها نقش مهمی دارند (Flott *et al.*, 1989).

با توجه به آسیب و زیان بالای بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه پسته و لزوم توجه به روش‌های سازگار با محیط‌زیست، در این تحقیق نقش باکتری‌های ناهمساز در ایجاد القاء مقاومت در پسته در حضور بیمارگر بررسی شد.

مواد و روش‌ها

قارچ عامل بیماری

این قارچ از کلکسیون بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مؤسسه تحقیقات پسته کشور تهیه شد.

عامل‌های زیست‌کنترل باکتری

از هزار جدایه باکتری کلکسیون کنترل بیولوژیک دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان که طی سال‌های ۸۸-۸۷ از ریزوسفر گیاهان مختلف سراسر ایران جداسازی شده بود، شمار سی سویه باکتری *P. fluorescens* با توجه به پژوهش‌های پیشین انجام‌شده توسط دانشجویان آن دانشگاه که توانایی کنترل چندین بیماری (مانند پاخته غلات و نماد ریشه گرهی پسته و غیره) را داشتند، در این پژوهش استفاده شد. سویه‌ها پس از خالص‌سازی در گلیسرول ۴۰ درصد در دمای 8°C نگهداری شدند (Kim *et al.*, 1997).

بررسی توانایی زیست‌کنترلی سویه‌های باکتری در

شرایط آزمایشگاه

برای بررسی توانایی زیست‌کنترلی سویه‌های بالا در شرایط آزمایشگاه از آزمون کشت متقابل بنا بر روش Hagedorn *et al.* (1989) استفاده شد. درصد بازدارندگی از رشد میسلیم پس از ۹۶ ساعت با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{بازدارندگی} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: رشد هیف در شاهد، B: رشد هیف در تیمار.

فرمول شیمیایی $(C_7H_8O_2)$ و ۴۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید (H_2O_2) ۰/۳ مولار اضافه شد و بی‌درنگ تغییرهای جذب نور در طول موج $\lambda_{max}=436nm$ با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری در فاصله‌های یک دقیقه و به مدت سه دقیقه ثبت شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم پراکسیداز آخرین عدد جذبی خوانده شده از نخستین عدد جذبی کم و بر عدد ۳ تقسیم می‌شود (Mac-Adam *et al.*, 1992).

تهیه عصاره آنزیمی پلی فنل اکسیداز و ارزیابی میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO)

۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل ۲/۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $pH=7$ و ۰/۶ میلی‌لیتر پیروکتکول ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در یک لوله آزمایش کوچک به‌طور کلی مخلوط شد. در حضور آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، پیروکتکول موجود در مخلوط واکنش، به پورپوروگالین تبدیل می‌شود. کاهش در جذب پیروکتکول در ۴۲۵ نانومتر، پس از ده دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نسبت به زمان آغاز واکنش، محاسبه شد. سپس با استفاده از ضریب خاموشی پیروگالول $(6/2mM^{-1}cm^{-1})$ و فرمول $A=\epsilon bc$ ، فعالیت آنزیمی محاسبه شد. یک واحد آنزیمی پلی‌فنل‌اکسیداز شامل میزان پیروگالولی است که در مدت یک دقیقه به پورپوروگالین تبدیل می‌شود (Fujita *et al.*, 1995). فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در میزان پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره به‌دست آمده از روش Bradford (1976) محاسبه شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاکسیداز (PAL)

برای این منظور ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج، ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای $37^{\circ}C$ نگهداری شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۶ مولار متوقف شد و جذب نمونه‌ها در طول موج $\lambda_{max}=260nm$ اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به‌عنوان ۱

به میزان ۱۰ میلی‌لیتر برای هر گلدان حاوی ۱ کیلوگرم خاک اضافه شد. بدین‌صورت که چهار حفره نیمه عمیق در اطراف نهال‌ها ایجاد و پس از تلقیح بی‌درنگ پوشانیده شد. گلدان‌ها در تناوب نوری هشت ساعت تاریکی و شانزده ساعت روشنایی نگهداری شدند. دمای گلخانه بین ۲۵-۳۰ درجه سلسیوس متغیر بود.

زمان‌های نمونه‌برداری برای بررسی مقاومت القایی

میزان تغییرپذیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیاکسیداز و همچنین تغییرپذیری‌های میزان فنل کل طی روزهای سوم، ششم، دوازدهم و بیست و چهارم پس از مایه‌زنی ارزیابی شد.

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل‌حل در عصاره و سنجش پروتئین استاندارد

به‌منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره مورد آزمایش و تهیه منحنی پروتئین استاندارد، از روش Bradford (1976) استفاده شد.

استخراج پروتئین از بافت گیاه

در آغاز کار در محیط یخ ۰,۵ گرم از بافت برگ گیاه در ۳-۵ میلی‌لیتر بافر نمونه پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $pH=7/5$ حاوی PVPP (Polyvinylpyrrolidone) ۱ درصد و EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۱ میلی‌مولار در یک هاون چینی به‌طور کلی له شد. مخلوط حاصل بی‌درنگ به ریزلوله (میکروتیوب)‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه و توسط میکروسانتریفوژ در ۴۰۰۰g در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ شد. دروایه رویی برای بررسی میزان تغییرپذیری‌های آنزیمی جدا و تا پیش از انجام آزمایش در $-20^{\circ}C$ درجه سلسیوس نگهداری شد (Reuveni, 1995).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (GPX)

برای این منظور به ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۳ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با $pH=6$ و ۵۰ میکرولیتر مایع گایاکول ۰/۲ مولار با

بیشترین هاله بازدارندگی روی قارچ عامل بیماری بوده و قطر هاله از ۶ تا ۱۶ میلی‌متر متغیر بود که کمترین و بیشترین میزان هاله مربوط به سویه‌های CHA0 و T17-4 است. سویه T17-4 با ۶۱/۹۰۴ و دو سویه VUPF760 و VUPF5 با ۵۱/۱۴۲ درصد، پس از سویه T17-4 بیشترین تأثیر را در بازدارندگی از رشد *P. drechsleri* داشتند (شکل ۱).

بنابر نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر ترکیب‌های فرار ضد قارچی دو سویه VUPF760 و T17-4 به ترتیب با ۵۷/۸۷ و ۳۳/۴ درصد بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد ریشه‌ای *P. drechsleri* نشان دادند (شکل ۲). از آنجایی که فعالیت‌های بیوشیمیایی بر فعالیت زیست‌کنترلی باکتری‌های ناهم‌ساز تأثیر بسزایی دارد در نتیجه این آزمون‌ها بهتر می‌تواند قابلیت باکتری‌ها را نشان دهند. سویه‌های باکتری توانایی متفاوتی در تولید سیانید هیدروژن (HCN) داشتند که بیشترین میزان مربوط به سویه VUPF5 بود. بهترین فعالیت پروتئازی در سویه VUPF5 (۷ میلی‌متر) پس از گذشت ۲۴ ساعت بوده که در طی ۴۸ ساعت به ۱۴ میلی‌متر رسید. نتایج ناشی از تولید آهن‌بر از نوع پایوردین با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری در طول موج ۴۰۰ نانومتر پس از گذشت چهل ساعت خوانده شد. سویه VUPF5 بالاترین آهن‌بر را تولید کرد و سویه VUPF506 تنها موردی بود که آهن‌بر تولید نکرد (جدول ۱).

بنابر نتایج آزمایشگاهی، شمار پنج سویه با توانایی بالا در بازدارندگی روی قارچ عامل بیماری برای آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند.

جدول ۱. برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی سویه‌های سودوموناس فلورسنت

Bacterial strains	Siderophores (Micromole)	Protease (Millimeter)	Hydrogen cyanide
CHA0	227.0	6.0	+
VUPF5	427.0	7.0	+++
VUPF506	0.0	6.0	+
VUPF760	196.0	1.6	+
T17-4	157.0	2.3	+

+: رنگ کاغذ نشانگر به کرم متمایل گشت.

+: Indicator of the ability of hydrogen cyanide production.

میکرومول سینامیک‌اسید تولیدشده در مدت یک دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در نظر گرفته شد. برای محاسبه میزان سینامیک‌اسید تولیدشده از منحنی استاندارد سینامیک‌اسید استفاده شد (Mohammadi & Kazemi, 2002).

ارزیابی میزان فنل کل و تهیه محلول پایه غلظت‌های فنل استاندارد

برای سنجش محتوای ترکیب‌های فنلی کل، ۰/۰۵ گرم از بافت در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده و مخلوط به‌دست‌آمده به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ ۴۰۰۰g به مدت ده دقیقه، به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و حجم محلول با آب مقطر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به محلول حاصل ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد افزوده و جذب نمونه‌ها پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی با طیف‌سنج نوری در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد (Roland & Laima, 1999). برای محاسبه غلظت ترکیب‌های فنلی کل با استفاده از گالیک اسید منحنی استاندارد رسم و غلظت ترکیب‌های فنولی برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گیاه محاسبه و گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی در چهار تکرار (هر تکرار یک گلدان) و هر تکرار حاوی چهار نهال پسته رقم سرخس بود. داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 تجزیه و تحلیل آماری شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند (Duncan & Ferris, 1983).

نتایج

آزمایشگاه

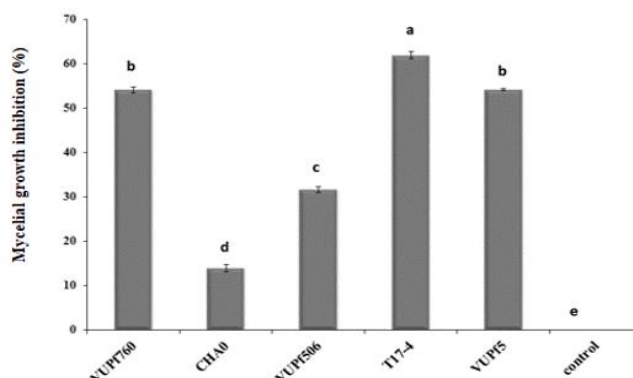
نتایج به‌دست‌آمده از کشت متقابل نشان داد که از سی سویه باکتری *P. fluorescens* جداسازی شده از ریزوسفر گیاهان مختلف شمار پنج سویه قادر به ایجاد

بررسی‌های گلخانه‌ای

تأثیر سویه‌های باکتری روی درصد وقوع بیماری

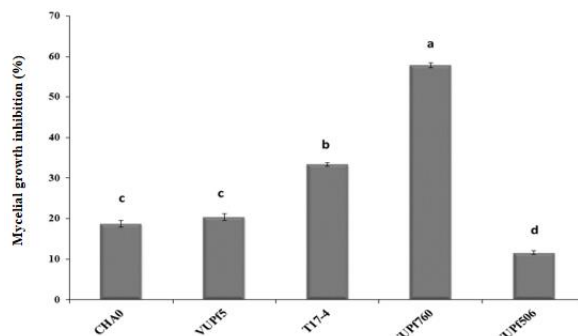
از میان سویه‌های مورد بررسی، سویه VUPF760 و VUPF506 با ۶۸/۷۵ و ۱۶/۶۶ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را در کاهش مرگ‌ومیر ناشی

از بیماری در گلخانه داشتند و نسبت به شاهد آلوده و دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. در نهال‌های تلقیح‌شده با *P. drechsleri* به تنهایی مرگ ۱۰۰ درصد نهال‌های پسته مشاهده شد (شکل ۳).



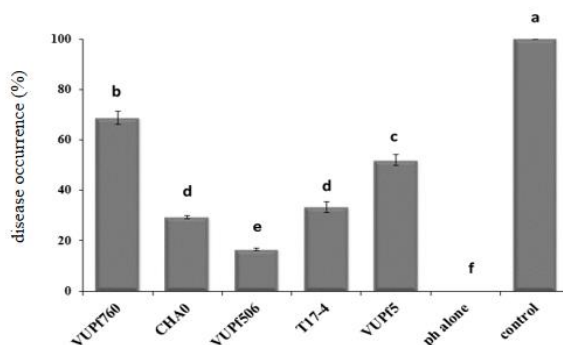
شکل ۱. تأثیر سویه‌های باکتری ناهمساز روی بازدارندگی رشد میسلیمی (*Phytophthora drechsleri*) در آزمون کشت متقابل در شرایط آزمایشگاهی

Figure 1. Inhibitory effects of bacterial strains on mycelial growth of *Phytophthora drechsleri* in dual culture assays under invitro conditions.



شکل ۲. تأثیر سویه‌های باکتری ناهمساز روی بازدارندگی رشد میسلیمی (*Phytophthora drechsleri*) در آزمون متابولیت‌های فرار

Figure 2. Inhibitory effects of volatile compounds of bacterial strains on mycelial growth of *Phytophthora drechsleri* under invitro conditions



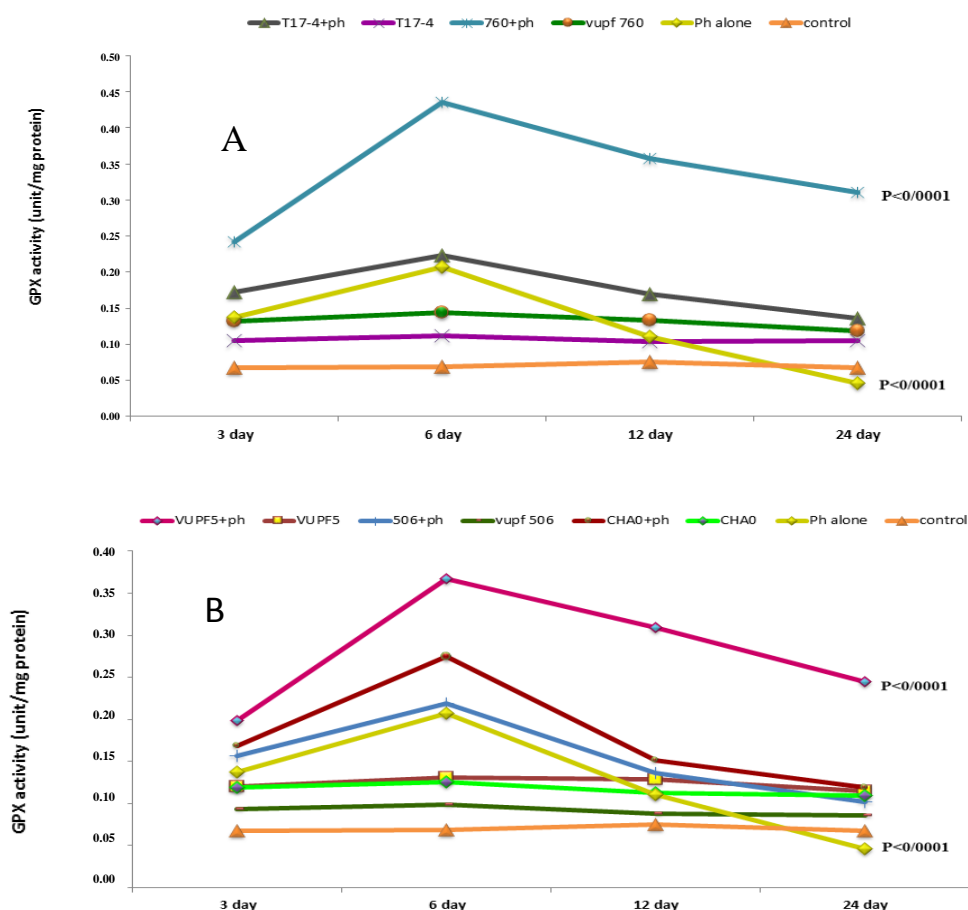
شکل ۳. درصد رخداد بیماری در نهال‌های پسته تلقیح‌شده با سویه‌های مختلف *P. fluorescens* همزمان با مایه‌زنی *Phytophthora drechsleri* در شرایط گلخانه‌ای

Figure 3. Disease occurrence percent in pistachio seedling (cv. Sarakhas) inoculated with *Phytophthora drechsleri* and *Pseudomonas fluorescens* strains, simultaneously under greenhouse conditions.

افزایش نسبت به شاهد سالم و کمترین میزان مربوط به مایه‌زنی همزمان سویه VUPF506 و قارچ *P. drechsleri* با ۳/۱۷ برابر افزایش نسبت به شاهد سالم بود. در این روز افزایش ۲/۹۹ برابری سطوح آنزیمی، در شاهد آلوده نسبت به شاهد سالم مشاهده شد. لازم به بیان است که بیشترین میزان فعالیت آنزیم نیز در بین روزهای نمونه‌برداری در روز ششم مشاهده شد. در تأیید این نتیجه چن و همکاران نیز بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز در گیاه سپیدار را شش روز پس از مایه‌زنی *Pythium aphanidermatum* با تیمارهای مایه‌زنی‌شده با ریزوباکتری‌ها گزارش کردند (Chen *et al.*, 2000). در روز دوازدهم فعالیت آنزیم نسبت به روز ششم کمتر شد و در روز بیست و چهارم این روند کاهشی مانند روز دوازدهم ادامه پیدا کرد.

بررسی تغییرپذیری‌های آنزیم پراکسیداز
 نهال‌های آلوده تیمار شده با سویه‌های باکتری سودوموناس فلورسنت از نظر میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با نهال‌های سالم شاهد و همچنین نهال‌های سالم تیمار شده با سویه ناهمساز تنها، افزایش معنی‌داری نشان دادند (شکل ۴).

در روز ششم بیشترین میزان فعالیت آنزیم همانند روزهای پیش در نهال‌های آلوده تیمار شده با سویه ناهمساز دیده شد. به‌طور کلی میزان آنزیم‌های دفاعی، در نهال‌های آلوده تیمار شده با سویه ناهمساز در مقایسه با تیمار آلوده (دارای قارچ و بدون باکتری) افزایش نشان داد که بیشترین میزان افزایش در سطوح آنزیمی مربوط به مایه‌زنی مخلوط سویه VUPF760 و قارچ *P. drechsleri* با ۶/۳۱ برابر



شکل ۴. تغییرپذیری آنزیم پراکسیداز در نهال‌های پسته تلقیح‌شده با سویه‌های مختلف *P. fluorescens* همزمان با مایه‌زنی *Phytophthora drechsleri* در شرایط گلخانه‌ای

Figure 4. The levels of peroxidase enzyme in pistachio seedling (cv. Sarakhas) inoculated with *Phytophthora drechsleri* and *Pseudomonas fluorescens* strains simultaneously under greenhouse conditions

A: VUPF760, T17-4, VUPF760+ph, T17-4+ph, ph alone, control

B: VUPF5, VUPF506, CHA0, VUPF5+ph, VUPF506+ph, CHA0+ph, ph alone, control

بررسی تغییرپذیری آنزیم پلی فنل اکسیداز

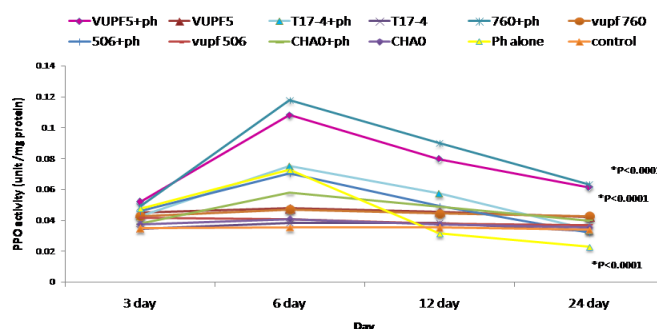
به‌طورکلی مایه‌زنی با سویه‌های باکتری و قارچ عامل بیماری به‌تنهایی و یا به‌صورت مخلوط باعث افزایش سطوح آنزیم‌های اندازه‌گیری‌شده در درجه‌های مختلف شد که بسته به سویه باکتری میزان آن متفاوت بود. نهال‌های آلوده تیمار شده با سویه‌های باکتری سودوموناس فلورسنت از نظر میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با نهال‌های سالم شاهد و همچنین نهال‌های سالم تیمار شده با ناهمساز تنها، افزایش معنی‌داری نشان دادند. میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در نمونه‌های بررسی‌شده به‌تدریج افزایش یافت و در روز ششم به بیشترین حد خود رسید و بار دیگر رو به کاهش گذاشت (شکل ۵).

در روز ششم بیشترین میزان فعالیت آنزیم نیز در بین روزهای نمونه‌برداری مشاهده شد، به‌جز در شاهد آلوده که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در روز سوم

مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در نهال‌های تیمار شده با باکتری، قارچ، قارچ و باکتری همزمان، نسبت به تیمار شاهد سالم (بدون باکتری و قارچ) افزایش نشان داد. در بین تیمارهای سویه‌های باکتری و قارچ *P.drechsleri*، بیشترین میزان افزایش فعالیت آنزیم در مایه‌زنی همزمان سویه VUPF760 و قارچ *P. drechsleri* با ۳/۳۵ برابر افزایش نسبت به شاهد سالم و کمترین میزان در مایه‌زنی همزمان سویه CHA0 و قارچ *P. drechsleri* با ۱/۶۴۵ برابر افزایش نسبت به شاهد سالم مشاهده شد.

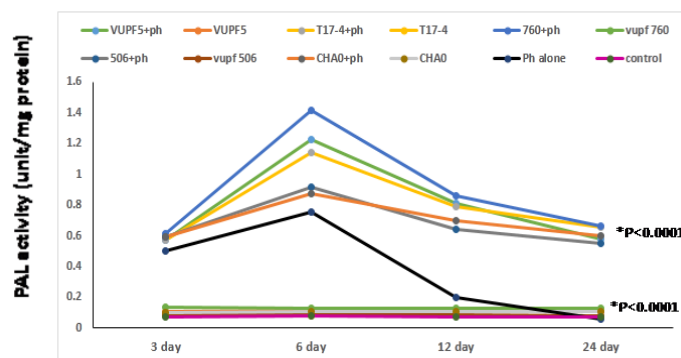
بررسی تغییرپذیری آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در نمونه‌های بررسی‌شده به‌تدریج افزایش یافت و در روز ششم به بیشترین حد خود رسید، سپس بار دیگر رو به کاهش گذاشت (شکل ۶).



شکل ۵. تغییرپذیری آنزیم پلی فنل اکسیداز در نهال‌های پسته تلقیح‌شده با سویه‌های مختلف *P. fluorescens* همزمان با مایه‌زنی *Phytophthora drechsleri* در شرایط گلخانه‌ای

Figure 5. The levels of Polyphenoloxidases enzyme in pistachio seedling (cv. Sarakhas) inoculated with *Phytophthora drechsleri* and *Pseudomonas fluorescens* strains simultaneously under greenhouse conditions



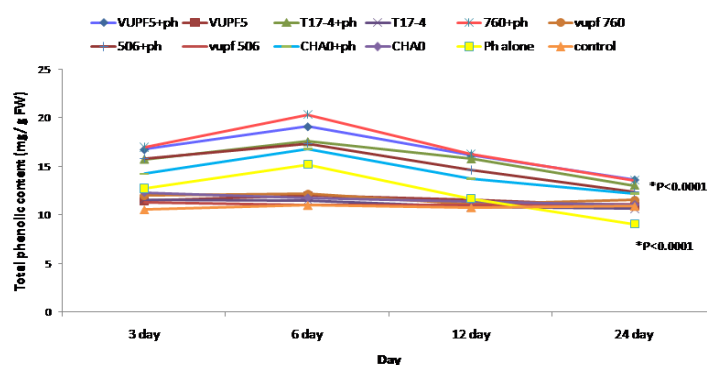
شکل ۶. تغییرپذیری آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در نهال‌های پسته تلقیح‌شده با سویه‌های مختلف *P. fluorescens* همزمان با مایه‌زنی *Phytophthora drechsleri* در شرایط گلخانه‌ای

Figure 6. The levels of phenylalanine ammonia-lyase enzyme in pistachio seedling (cv. Sarakhas) inoculated with *Phytophthora drechsleri* and *Pseudomonas fluorescens* strains simultaneously under greenhouse conditions.

بررسی میزان تغییرپذیری فنل کل

میزان ترکیب‌های فنلی نیز در نهال‌های تیمار شده با سویه‌های باکتری سودوموناس فلورسنت به همراه قارچ عامل بیماری در روز ششم نسبت به روز سوم افزایش یافت. در روز ششم بیشترین میزان ترکیب‌های فنلی نیز در بین روزهای نمونه‌برداری مشاهده شد. این میزان در روز دوازدهم با کاهش تدریجی روبه‌رو شد و این روند کاهشی تا روز بیست و چهارم نیز ادامه داشت (شکل ۷). در بین تیمارهای سویه‌های باکتری و قارچ *Ph. drechsleri* بیشترین میزان ترکیب‌های فنلی در مایه‌زنی همزمان سویه VUPF760 و قارچ *P. drechsleri* و کمترین میزان در مایه‌زنی همزمان سویه VUPF506 و قارچ *P. drechsleri* مشاهده شد.

در روز ششم بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز نیز در بین روزهای نمونه‌برداری مشاهده شد. به‌طور کلی میزان آنزیم، در نهال‌های آلوده تیمار شده با سویه ناهمساز در مقایسه با شاهد سالم افزایش نشان داد که بیشترین میزان افزایش در سطوح آنزیمی مربوط به مایه‌زنی مخلوط سویه VUPF760 و قارچ *P. drechsleri* با ۱۷/۹۲ برابر افزایش نسبت به شاهد سالم و کمترین میزان مربوط به مایه‌زنی همزمان سویه CHA0 و قارچ *P. drechsleri* با ۱۱/۰۶ برابر افزایش نسبت به شاهد سالم بود. در این روز افزایش ۹/۵ برابری سطوح آنزیمی، در شاهد آلوده نسبت به شاهد سالم مشاهده شد.



شکل ۷. تغییرپذیری فنل کل در نهال‌های پیسته تلقیح شده با سویه‌های مختلف *P. fluorescens* همزمان با مایه‌زنی *Phytophthora drechsleri* در شرایط گلخانه‌ای

Figure 7. The levels of total phenol in pistachio seedling (cv. Sarakhas) inoculated with *Phytophthora drechsleri* and *Pseudomonas fluorescens* strains simultaneously under greenhouse conditions

ترشح‌های ریشه میزبان و میزان سریع رشد، در رقابت با دیگر ریزجانداران (میکروارگانیزم‌ها) موفق‌تر عمل می‌کنند. این باکتری‌ها همچنین با تولید متابولیت‌های ثانویه پرشماری چون سیانید هیدروژن و آهن‌بر بازدارنده حیات عامل بیماریزا (پاتوژن) و موجب افزایش سلامتی گیاه می‌شوند.

نتایج به‌دست‌آمده از کشت متقابل نشان داد که از سی سویه باکتری *P. fluorescens* جداسازی شده از ریزوسفر گیاهان مختلف شمار پنج سویه (T17-4، VUPF760، VUPF5، VUPF506 و CHA0) که بهترین تأثیر را نیز روی کنترل چندین بیماری (مانند پاخوره غلات، نماد ریشه‌گرهی پسته و بوته‌میری جالیز)

بحث

در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی در زمینه مبارزه کنترل‌زیستی (بیولوژیک) با بیماری‌های گیاهی صورت پذیرفته است. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) گروهی از باکتری‌های سودمندند که قابلیت پرگنه (کلنیزه) کردن ریشه، تحریک رشد گیاه و کاهش وقوع بیماری‌های گیاهی را دارند. جنس *Pseudomonas* به‌عنوان یکی از عامل‌های ریزگیاهان (میکروفلورهای) هوازی ریزوسفر در بسیاری از گیاهان معرفی شده است. بین جمعیت سودوموناس‌های فلورسنت و درجه کاهش بیماری‌های مختلف رابطه مستقیم مثبتی مشاهده شده و با توجه به گرایش بالای باکتری‌های سودوموناس به

یکی از جنبه‌های مهم دفاعی گیاه میزبان در برابر عامل‌های بیماریزا، جنبه دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده آن است (Steiner & Schönbeck, 1995). القاء مقاومت فرآیندی است که گیاه را برای دفاع در برابر عامل‌های بیماریزا آماده می‌کند، این فرآیند با فعالیت سامانه‌های بیوشیمیایی همانند آنزیم PAL و پراکسیداز همخوانی دارد (Bradford, 1967; Schlumberg, 1986). گیاهان به‌منظور از بین بردن اثر رادیکال‌های آزاد ناشی از عامل‌های تنش‌زای (استرس) زنده و غیرزنده سازوکارهای دفاعی خود را به کار می‌گیرند، چندین آنزیم از جمله پراکسیداز، کاتالاز، پلی فنل اکسیداز و ترکیب‌هایی همانند فنل به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه که در پاسخ به استرس در گیاهان تجمع می‌یابند به اثبات رسیده‌اند (Elad & Chet, 1987).

وجود مقاومت القایی در نهال‌ها می‌تواند بیانگر همزیستی و استقرار عامل ناهمساز روی ریشه باشد که باعث تحریک نهال‌ها شده است. این موضوع همچنین نشان می‌دهد که مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری به‌عنوان یک تنش‌زای زنده خارجی باعث تحریک گیاه به فعال شدن و یا افزایش سازوکارهای دفاعی روی نهال‌های پسته می‌شود. در بررسی قابلیت نظام‌یافته شدن فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و PAL در تیمار بافت‌های ریشه چنین استنباط می‌شود که القای آنزیم تا روز ششم افزایش شایان توجهی داشته است و به نظر می‌رسد که اثر مقاومت القایی نظام‌یافته به‌وسیله سویه‌های باکتری بانفوذ قارچ به درون بافت گیاه افزایش یافته و باعث القاء و تأثیر بر ساخت آنزیم‌ها و سازوکارهای دفاعی گیاه شده است. ارتباط بین افزایش آنزیم‌های دفاعی و مقاومت بیشتر به عامل‌های بیماریزا توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است. تیمار بذره‌ای بادام‌زمینی با باکتری سودوموناس باعث تجمع سریع آنزیم‌های دفاعی مرتبط با مقاومت مانند کیتیناز، بتا گلوکاناز، پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیلایز در بذره‌ای بادام‌زمینی در مقایسه با شاهد سالم می‌شود (Kishore et al., 2006).

تیمار گیاه برنج با باکتری *P. fluorescens* منجر به

داشتند، برای مرحله گلخانه انتخاب شدند. در این پژوهش، نتایج به‌دست‌آمده از آزمون هاله بازدارندگی و بررسی سطح بازدارندگی در شرایط گلخانه‌ای گویای آن بود که میان نتایج بازدارندگی آزمون هاله و نتایج به‌دست‌آمده از بررسی بازدارندگی در شرایط گلخانه‌ای در برخی موارد همبستگی وجود داشت. به‌طور مثال سویه باکتریایی T17-4 که در آزمایشگاه بیشترین هاله بازدارندگی را علیه قارچ عامل بیماری ایجاد کرده بود باینکه در شرایط گلخانه‌ای بهترین نبود اما توانست به میزان ۳۳/۳۳ درصد باعث کاهش بیماری شود. البته سویه‌های VUPf760 و VUPf5 که در شرایط آزمایشگاه توانستند به میزان ۵۴/۱۴۲ درصد از رشد قارچ عامل بیماری جلوگیری کنند، در گلخانه نیز قابلیت زیست‌کنترلی بالایی از خود نشان دادند به‌طوری‌که به ترتیب توانستند به میزان ۶۸/۷۵ و ۵۲ درصد باعث کاهش بیماری شوند.

سازوکارهای چندی در قابلیت زیست‌کنترلی عامل‌های ناهمساز از جمله باکتری‌ها دخالت دارند، از جمله می‌توان به تولید ترکیب‌های ضدقارچی مانند پادزی‌ها، آنزیم‌ها، آهن‌برها، سیانیدهیدروژن، اتیلن و همچنین ترکیب‌های رشدی (هورمون‌های گیاهی) اشاره کرد. این ترکیب‌ها در حقیقت متابولیت‌هایی به‌شمار می‌روند که به‌صورت ترشح‌های مایع بیرون یاخته‌ای و یا ترکیب‌های فرار وارد محیط اطراف باکتری می‌شوند (Kamilova et al., 2005). بنا بر نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر ترکیب‌های فرار ضدقارچی دو سویه VUPf760 و T17-4 به ترتیب با ۵۷/۸۷ و ۳۳/۴ درصد بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد ریشه‌ای *P. drechsleri* نشان دادند.

سویه‌های باکتری توانایی متفاوتی در تولید سیانید هیدروژن (HCN) داشتند که بیشترین میزان مربوط به سویه VUPf5 بود. شاید یکی از دلایل موفقیت دو سویه VUPf760 و VUPf5 این نکته بود که مجموعه‌ای از عامل‌های زیست‌کنترلی در این دو سویه فعال است، درحالی‌که سویه VUPf506 با تولید نکردن آهن‌بر، کمترین میزان تولید متابولیت‌های فرار، استقرار ناکافی و کمترین میزان سیانید هیدروژن در فرآیند زیست‌کنترل چندان موفق عمل نکرد.

به VUPF506 و CHA0، T17-4، VUPF5، VUPF760 ترتیب سلامت بیشتری دارند و تا روز آخر نشانه‌های بیماری در اندام‌های هوایی کمتر دیده شد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی سویه‌های باکتری *P. fluorescens* مورد استفاده در این تحقیق، باعث کاهش ۱۰ تا ۶۲ درصد در رشد بیمارگر تحت شرایط آزمایشگاه و ۱۷ تا ۶۹ درصد در مرگ‌ومیر نهال‌های پسته شدند. نهال‌های تیمار شده با سویه‌های باکتری سودوموناس فلورسنت که با *P. drechsleri* نیز مایه‌زنی شده بودند نسبت به نهال‌هایی که تنها با *P. drechsleri* مایه‌زنی شدند روند پایداری را در بالا نگه داشتن میزان آنزیم‌های دفاعی در طول آزمایش نشان دادند که گویای کارایی مؤثر این سویه‌ها در ایجاد مقاومت القایی بادوام‌تر است. کاهش فراوان در میزان فعالیت آنزیم در گیاهان مایه‌زنی شده با *P. drechsleri* به‌تنهایی می‌تواند بیانگر آسیب ریشه و از بین رفتن نهال و به عبارتی غلبه عامل بیماریزا بر گیاه باشد. باید توجه داشت که روال ثابت شکل شاهد سالم نشان از صورت نگرفتن القاء در این تیمار نسبت به تیمارهای دیگر است. سویه VUPF760، در بین سویه‌های مورد استفاده بهترین تأثیر را هم در آزمایشگاه و هم روی نهال‌های پسته نشان داد.

القای مقاومت نظام‌یافته علیه *Rhizoctonia solani* می‌شود و نتیجه این مقاومت، افزایش فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و پراکسیداز است (Nandakumar et al., 2001). تیمار گیاه *Physic nut* (*Jatropha curcas* L.) با سودوموناس فلورسنت (Pf1) ضمن القاء مقاومت نظام‌یافته، افزایش در فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیلایز، پلی فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و فنل کل را سبب می‌شود که بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های بالا و ترکیب‌های فنل کل در پنجمین روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد (Narmadhavathy et al., 2013).

به‌طور کلی نهال‌های تیمار شده با سویه‌های باکتری سودوموناس فلورسنت که با *P. drechsleri* نیز مایه‌زنی شده بودند نسبت به نهال‌هایی که تنها با *P. drechsleri* مایه‌کوبی شدند روند پایداری را در بالا نگه داشتن میزان آنزیم‌های دفاعی نشان دادند که این نشان از کارایی مؤثر این سویه‌ها در ایجاد مقاومت القایی بادوام‌تر است. کاهش فراوان در میزان فعالیت آنزیم در گیاهان مایه‌زنی شده با *P. drechsleri* به‌تنهایی می‌تواند بیانگر آسیب ریشه و از بین رفتن نهال و به عبارتی غلبه عامل بیماریزا بر گیاه باشد. باید توجه داشت که روال ثابت شکل شاهد سالم نشان از صورت نگرفتن القاء در این تیمار نسبت به تیمارهای دیگر است. از لحاظ ساختار ظاهری (مرفولوژی) گیاهان تیمار شده با سویه‌های

REFERENCES

1. Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S. & Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 427-436.
2. Albert, F. & Anderson, A. J. (1987). The effect of *Pseudomonas putida* colonization on root surface peroxidase. *Plant Physiol*, 85, 535-541.
3. Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P. & Hofte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 1147-1156.
4. Banihashemi, Z. (1995). Identification of *Phytophthora* species associated with pistachio gummosis in Iran. *Acta Horticultural*, 419, 349-352.
5. Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 98(7), 1113-1121.
6. Bradford, M.M. (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.
7. Chen, C., Belanger, R.R., Beha, A.N. & Paullitz, T.C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Plant Pathology*, 56, 13-23.
8. Chittoor, J. M., Leach, J.E. & White, F.F. (1999) Pathogenesis related proteins in plants, 171-193. CRC Press, London.

9. Duncan, L.W. & Ferris, H. (1983). Validation of a model for prediction of host damage by two nematode species. *Journal of Nematology*, 15(2), 227-234.
10. Elad, Y. & Chet, I. (1987). Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium damping-off* by bacteria. *Phytopathology*, 77, 190-195.
11. Flott, B.E., Moerschbacher, B.M. & Resener, H. (1989) Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytologist*, 111, 413-421.
12. Fravel, D.R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Annual Review. Phytopathology*, 26, 75-91.
13. Fujita, S., Saari, N.B., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N. & Tono, T. (1995). Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleraceae* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43(5), 1138-1142.
14. Grolach, J., Volrath, S., Knoauf -Better, G., Hgngy, G., Beckhove, U., Kogel, K., Oostendorf, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. & Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class inducers of systemic acquired resistance, activated gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, 8, 629- 643.
15. Hammerschmidt, R. & Kuc, J. (1982). Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiological Plant Pathology*, 20, 61-69.
16. Holmes, K.A. & Benson, D.M. (1994). Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. *Plant Disease*, 78(2), 193-199.
17. Honty, K., Hevesi, M., Toth, M. & Stefanovits-Banyai, E. (2005). Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia amylovora*. In: Proceedings of the 8th Hungarian Congress on Plant Physiology and the 6th Hungarian Conference on Photosynthesis. *Acta Biologica Szegediensis*, 49, 127-129.
18. Hsu, S.Y. & Kao, C.H. (2003). Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol and antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 39, 83-90.
19. Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. & Lugtenberg, B. (2005). Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental microbiology*, 7, 1809-1817.
20. Kim, D. S., Cook, R. J. & Weller, D. M. (1997). *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87, 551-558.
21. Kishore, GK., Pande, S. & Podile, R. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* GSE 18 inhibits the cell wall degrading enzymes of *Aspergillus niger* and activates defence- related enzymes of groundnut in control of collar rot disease. *Australasian Plant Pathology*, 35, 259-263.
22. MacAdam, J.W., Sharp, R.E. & Nelson, C.J. (1992). Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. II. Spatial distribution of apoplatic peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiology*, 99, 879-885
23. Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F. & Raskin, L. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250, 1002-1004
24. Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidase in plants and fungi: going place A review. *Phytochemicals*, 67, 2318-2331.
25. Mirabolfathy, M., Cooke, D. E. L. Duncan., J. M., Williams, N. A., Ershad, J. & Alizadeh, A. (2001). *Phytophthora pistaciae* sp. nov. and *P. melonis* the principal causes of pistachio gummosis in Iran. *Mycological Research*, 105, 1166-1175.
26. Mohammadi, M. & Kazemi, H. (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162, 491-498.
27. Moradi, M. (1998). *Isolation and identification of Phytophthora species from root and crown of pistachio in Kerman and Fars provinces and resistance determination of root and crown among current pistachio cultivars*. M.Sc. dissertation, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Iran. (in Farsi)
28. Nandakumar, R., Babu, S., Wiswanathan, R., Raguchander, T. & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *P. fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 603-612.
29. Narmadhavathy, S., Vanitha, S., Karthikeyan, G., Raguchander, T. & Ramjegathesh, R. (2013). Induced systemic resistance and their implications in host resistance to physic nut against leaf blight disease. *Molecular Microbiology Research ISSN*, 1927-5595.
30. Odjakova, M. & Hadjuvanova, C. (2001). The compelexity of pathogen defense in plants. *Bulgarian Plant Physiology*, 27, 101-109.
31. Parida, A.K. & Das, A.B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324-349.
32. Piga, P., Belanger, R., Paulitzand, T.Z. & Benhanau, N. (1997). Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescence*, strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50, 301-320.

33. Raupach, G.S., Liu, L., Murphy, J.F., Tuzun, S. & Kloepper, J.W. (1996). Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Disease*, 80, 891-894.
34. Reuveni, R. (1995). Biochemical marker for disease resistance, In: Singh, R. P., Singh, U.S. (Eds), *Molecular Methods in Plant Pathology*, CRC Press, Boca Raton, FL, 99-144.
35. Roberts, M.A. (2002). *Actinomycetes, biocontrol, questions and answers*. Available on internet at: <http://www.palouse.net/ibs/micro2.htm>.
36. Roland, S.F. & Laima, S.K. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture*, 1, 1-5.
37. Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U. & Boller, T. (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, 324, 365-367.
38. Scott-Craig, J.S., Kerby, K.B., Stein, B.D. & Somerville, S.C. (1995). Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis* f.sp. hordei). *Physiological and Molecular of Plant Pathology*, 47, 407-418.
39. Sticher, L., MauchMani, B. & Mettraux, J.P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual. Review. Phytopathology*, 35, 235-270.
40. Steiner, U. & Schönbeck, F. (1995). Induced disease resistance in monocots. In: R., Hammerschmidt and J., Kuc (Eds.), *Induced resistance to disease in plants*. Springer, 86-110.
41. Tsuge, S., Ochiai, H., Inoue, Y., Ohu, T., Tsuno, K., Kaku, K. & Kubo, Y. (2004). phosphoglucose isomerase in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Phytopathology*, 94, 478-483.
42. Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annuals Review of Phytopathology*, 36, 453-483.
43. Van Peer, R., Niemann, G.J. & Schippers, B. (1991). Induced resistance and Phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417r. *Phytopathology*, 81, 728-734.
44. Zdor, R.E. & Anderson, A. J. (1992). Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. *Plant and Soil*, 140, 99-107.
45. Zheng, H., Cui, C., Zhang, Y., Wang, D., Jing, Y. & Kim, K.Y. (2005). Active changes of lignifications-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *Journal of Zhejiang University Science*, 6, 778-786.