

蕈狀芽孢桿菌防治番茄萎凋病之機制分析平台

湯佳蓉^{1, a}、張碧芳^{1, 2}、張道禾^{1, 2}、林盈宏³、黃振文^{1, 2*}

¹ 國立中興大學植物病理學系；^a目前連絡地址：行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系。830高雄市鳳山區文龍東路530號，臺灣

² 國立中興大學永續農業創新發展中心。402台中市南區興大路145號，臺灣

³ 國立屏東科技大學植醫學系。912屏東縣內埔鄉學府路1號，臺灣

* 聯絡作者，E_mail: jwhuang@nchu.edu.tw

摘要

湯佳蓉、張碧芳、張道禾、林盈宏、黃振文*。2019。蕈狀芽孢桿菌防治番茄萎凋病之機制分析平台。植物醫學61(1): 29-38。

本研究在三角瓶中栽培番茄實生苗與接種生物防治菌及植物病原菌，以分析生物防治菌誘導番茄植株產生抗病的相關機制。以 Biolog GP Microplate 分析番茄萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 菌株及 *Bacillus mycoides* CHT2402 和 NP02 兩菌株對於碳、氮素源的需求，隨後比較生物防治菌及病原菌對營養需求的差異性，以便確立基礎培養基的配方，結果得知在 Murashige 和 Skoog 兩氏 (MS) 培養基中蔗糖的濃度調為 1% (w/v)，最適於番茄植株、生物防治菌及病原菌等三者間的交互作用。將番茄種子於 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 菌液中催芽後培養於 MS 培養基二週，再以番茄萎凋病菌單孢接種於番茄莖基部，5 天後可見對照組的植株已受病原菌感染且出現倒伏的現象，惟兩生物防治菌處理過的植株尚維持挺立且未表現病徵。自三角瓶、溫室栽植處理及未處理過 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 菌株之番茄根部取樣後，以環氧樹脂包埋後切片，再以光學顯微鏡觀察根部組織之細胞結構，可見處理過 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 之植株根部於表皮細胞下方的細胞壁均較對照組分別增厚 0.015-0.018 μm 與 0.014-0.016 μm 以上，至於皮層細胞下方的細胞壁也有是分別類似增厚的現象 0-0.008 μm 與 0.014-0.03 μm 。利用穿透式電子顯微鏡觀察的結果，顯示處理過 *B. mycoides* 之番茄根部細胞大多於細胞間隙以非結晶物質累積於細胞壁，造成組織增厚的現象。在防禦相關基因表現方面，以即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, real time qRT-PCR) 分析處理 *B. mycoides* 之番茄根部於第 9、11、13、15 天後之苯丙氨酸氨裂解酶 (phenylalanine

ammonia lyase, PAL) 與脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX) 基因表現差異。結果顯示於三角瓶中處理 *B. mycoides* NP02 後第 11 天與處理 *B. mycoides* CHT2402 後第 13 天 PAL 與 LOX 基因有提高表現之趨勢；另外，溫室中處理過 *B. mycoides* NP02 的番茄根部於 11-13 天後 PAL 基因有受誘導表現的現象，且於處理後第 13-15 天 LOX 基因亦受誘導表現；然而處理過 *B. mycoides* CHT2402 的番茄根部則於處理後第 13 天僅 LOX 基因有受高量誘導表現的現象。綜合本研究結果得知 *B. mycoides* 須先在病原菌感染前纏據於番茄根部與維管束組織，且誘導番茄植株產生防禦反應，才能有效抵抗萎凋病菌的感染。

關鍵詞：番茄镰孢菌萎凋病、誘導抗病、蕈狀芽孢桿菌

緒言

番茄萎凋病係由 *Fusarium oxysporum* (Schl.) f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen 所引起，它的防治方法主要可採用土壤燻蒸劑減少土壤中病原菌的族群量、栽種抗病品種或嫁接抗病根砧、改善土壤 pH 值至 6-7、以免賴得藥劑消毒種子表面以減少帶菌率⁽⁸⁾，或是以根圈微生物及拮抗微生物來降低病害發生。其中生物防治菌大多由植株根部附近的土壤中分離而得，可於栽培作物時防治多種根部病害⁽¹¹⁾。西元 2004 年 McSpadden Gardener 與 Driks 兩氏將可促進植物生長的生物防治菌命名為 plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)⁽¹⁵⁾。PGPR 菌可直接纏據於植株根部表面，或是於植株根圈附近的土壤中建立族群，進而與病原菌或土壤中有害微生物競爭生存空間、養分及生態區位 (ecological niches)，製造一些特殊抗生物質⁽⁹⁾、毒素⁽¹⁹⁾，亦或是誘導植株產生系統性抗病反應 (induced systemic resistance, ISR) 以防阻病害的發生⁽¹²⁾。近年來，藉由施用 PGPR 預防植物病害發生的報導多以螢光假單胞

菌屬 (fluorescent *Pseudomonads*)⁽⁶⁾與芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.)⁽¹¹⁾ 等二群的根圈細菌為主⁽¹⁸⁾。芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 為革蘭氏陽性菌，可形成耐熱及耐旱的內生孢子保護自身於逆境中生存，同時，此特色亦可以增加其商品的儲架壽命，頗具有生物防治的潛力⁽²⁰⁾。PGPR 可藉由誘導植物系統性抗病反應 (ISR) 降低病菌的為害程度。例如 *B. pumilus* 可纏據於番茄根部表皮細胞及皮層細胞間，誘導植株根部細胞間隙中產生非結晶物質 (amorphous material) 增厚細胞壁，以減緩番茄萎凋病菌進一步入侵至維管束⁽⁴⁾。Bargabus 氏等在甜菜葉面施用 *B. mycoides* 細菌懸浮液除了可有效降低甜菜葉斑病 (*Cercospora beticola*) 的罹病程度外，同時於植體中過氧化氫酶 (peroxidase)、幾丁質酵素 (chitinase) 及 β -1,3 葡聚醣酶 (β -1, 3-glucanase) 均有累積的現象⁽³⁾。丁氏⁽⁵⁾ 的研究結果顯示 *B. mycoides* 具有防治番茄萎凋病的潛力，筆者為了減少栽培環境中生物或非生物因子干擾植株的抗病反應，本研究嘗試利用三角瓶的栽培系統，研析 *B. mycoides*、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 及番茄幼苗間的交互作用，藉以探討 *B. mycoides* 防治番茄萎凋病的相關機制。

材料與方法

供試病原菌株和植株來源與培養

本試驗之供試病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 菌株係取自於國立中興大學病害管理研究室保存的菌種，Fol-04 菌株對於番茄具強致病力⁽⁵⁾。首先以單孢分離培養方式培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂平板 (potato dextrose agar; PDA, Difco, Becton, USA 出品) 上。在 12 小時光照(間接日光或 2 支 40 W 日光燈約 2000~3000 Lux) 和 22-25°C 的培養箱中培養。番茄種子係由農友種苗公司 (高雄，台灣) 購得，品種為農友 301。播種前以 1% (V/V) 氯水消毒 20 分鐘後，再以蒸餾水漂洗三次，浸泡於無菌水中催芽三至四天，待種皮破裂發芽後播種於栽培基質，進行試驗。

供試生物防治細菌菌株來源與培養

供試細菌 *Bacillus mycoides* CHT2402 菌株，係由台灣中部地區番茄根系所分離獲得；*B. mycoides* NP02 菌株則是由台灣中部地區所採集的甜瓜根系分離所得。將此二菌株劃線培養於牛肉煎汁瓊脂培養基 (Nutrient agar, NA, Difco Becton, USA 出品) 平板，培養於 30°C 的培養箱中，隔週繼代更新一次，供試驗之用；取單一菌落移至滅菌過的 20% 甘油 (glycerol) 中，並於 -20°C 保存⁽⁷⁾。

在三角瓶中培養番茄、*Bacillus mycoides* 及番茄萎凋病菌的條件

選用 Murashige 及 Skoog 兩氏培養基 (MS 培養基) 作為基礎培養基。MS 培養基的配方及調配方法如下：將 33 克硝酸鉀 (KNO_3)，38 克硝酸銨 (NH_4NO_3)，8.8 克氯化鈣 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，7.4 克硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)，3.4 克磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)，0.166 克碘化鉀 (KI)，1.24 克硼酸 (H_3BO_3)，4.46 克硫酸錳 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)，1.72 克硫酸鋅 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)，0.05 克鉬酸鈉 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，0.005 克硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)，0.005 克氯化亞鈷 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，5.56 克硫酸亞鐵 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)，7.46 克乙二胺四乙酸二鈉 ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，20 克肌酊醇 (myo-inositol)，0.1 克菸鹼酸 (nicotinic acid)，0.1 克維他命 B6 (pyridoxine-HCl)，0.1 克硫胺素 (thiamine-HCl)，0.4 克甘胺酸 (glycine)，30 克蔗糖 (sucrose)，10 克洋菜粉 (agar, Difco 出品) 加入蒸餾水至 1 升並以滅菌斧高溫高壓滅菌。此外，取適量番茄種子以 70% 酒精浸洗 3 分鐘後，置換 1% (V/V) 次氯酸鈉水溶液並均勻振盪清洗 15 分鐘後，以無菌水浸洗種子 6 次，一次約 4 分鐘，即完成種子表面消毒。將表面消毒完成的番茄種子浸泡於 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 菌株之懸浮液 (OD_{620} 值約 0.3，菌量約為 10^8 cfu/mL)，室溫下靜置三天。待種子發芽後移植至三角瓶內 MS 培養基中培養，於 28°C 四週後移開根部附近的培養基以單一孢子接種一株番茄幼苗的方式，將病原菌的分生孢子接種至番茄莖基部，隨後逐日觀察植株發病的進展，其中每處理各有五重複。

利用 Biolog GP Microplate 分析 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04、*B. mycoides* NP02 與 CHT2402 對碳、氮素源之利用

利用 Biolog 鑑定系統 (Biolog Inc., Hayward, CA, U.S.A) 分別檢測生物防治菌 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 菌株及番茄萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04，對於 95 種碳、氮素源的利用，進而選出有助於生物防治菌生長，但病原菌無法快速利用的碳、氮素源，用以調整 MS 培養基的成份，藉以建立共同培養番茄植株、生物防治菌及病原菌的試驗基質平台。將 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 劃線培養於 BUG 培養基 (Biolog Universal Growth Agar; BUG Agar 57 g, water 1 L) 上，於 30°C 繼代培養三次，挑取單一菌落增量培養 16 小時後，將細菌懸浮於 GN/GP-IF 接種液 (0.4% NaCl, 0.03% Pluronic F-8, 0.01% Gellan Gum) 中，調整其濃度至透光值 $28\% \pm 3\%$ (革蘭氏陽性菌推薦濃度)，每孔逐一注入 150 μL 的細菌懸浮液至 Biolog GP2 96 孔微量盤 (microplate) 中，於 30°C 培養，在 4~6 小時與 16~24 小時之間，以 Biolog Microstation reader (OD_{405} 吸光值) 判讀 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 對碳、氮素源之利用率，再以 Biolog Microlog 3 ver. 4.20 系統進行分析，並以資料庫進行比對。番茄萎凋病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 則於 PDA 培養基平板培養 7 天後，以無菌水製成分

生孢子懸浮液，於 3000 rpm (rotor 12145, Sigma 2K15, 704 ×g) (KUBOTA, Tokyo, Japan) 離心 5 分鐘，除去上清液。重複上述步驟二次後，將孢子懸浮液濃度調整至 10^8 spores/mL，再置入 150 μ L 的孢子懸浮液於 Biolog GP2 96 孔微量盤中，以前述相同的實驗條件在 48 及 72 小時依上述系統進行分析及與資料庫比對，藉以了解 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 對碳、氮素源之利用率。

不同碳、氮素源對 *Bacillus mycoides* CHT2402 防治番茄萎凋病之影響

將表面消毒完成的番茄種子浸泡於 *B. mycoides* CHT2402 菌株之懸浮液 (OD_{620} 值約 0.3，菌量約為 10^8 cfu/mL)，於室溫下靜置 3 天。待種子發芽後，將種子移植至碳、氮素源濃度為 1% 的 MS 培養基中進行育苗，於 28°C 培養 4 週後，以移植針移開根部附近的培養基，將病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 的分生孢子以單孢靠接至番茄根部，並在接種 2 週後，觀察處理組與對照組發病的差異，每處理各有五重複。此外，以含 1% 蔗糖的 MS 培養基培育番茄幼苗，接種 *B. mycoides* CHT2402 與 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 後，亦進行相似的前述試驗研究，每處理各五重複。

處理過 *Bacillus B. mycoides* 之番茄根系的組織化學解剖分析

在溫室栽培及三角瓶栽培環境中，培養 *B. mycoides* 處理過的番茄植株，14 天後拔取植株，清除培養基質後，取根系置於戊二醛溶液 (2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer) 中切割取樣，其樣品大小約為 0.5~2 mm²，並以此溶液做前固定，以鐵酸 (1% osmium in 0.1 M phosphate buffer) 進行後固定，接著用酒精及丙酮進行一系列脫水反應，再陸續滲入 Spurr 氏之環氧樹脂 (Spurr's resin)，最後以該樹脂進行包埋後置入 70°C 烘箱中，放置 12 小時後取出以轉動式切片機進行切片。最後將切片以 0.1% 甲苯胺藍 (Toluidine blue) 溶液染色後於光學顯微鏡下觀察其組織形態，並利用 Axio Vision Rel.4.8 軟體輔助計數番茄根部表皮細胞內層及皮層細胞內層二處的細胞壁厚度，並以鄧肯多重差距檢定 (Duncan's Multiple Range Test) 進行分析，每處理各五重複。

穿透式電子顯微鏡觀察番茄根系組織

前述試驗所獲得之環氧樹脂包埋樣品，以轉動式切片機進行超薄切片，選取切片反光呈現白色或金色者 (其厚度約為 70 nm)，再以銅網沾起切片並以濾紙吸除多餘水份。銅網的製作步驟如下：將乾淨玻片置入 0.5% Formvar 數秒後快速取出，於室溫中風乾 3 分鐘，刮掉玻片周圍的膜並將玻片垂直插入無菌水中，製成的薄膜會漂浮於水面上，將銅網小心排列在薄膜上以石蠟膜將銅網及薄膜沾起，最後利用高溫環境下昇華碳筆，

於銅片表面上完成鍍膜 (coating) 後備用。切片染色是以 4% 醋酸鉍鹽 (uranyl acetate) 遮光染色 15 分鐘後，以無菌水洗滌 20 秒再以檸檬酸鉛 (lead citrate) 作雙重染色 (double staining)，完成染色後仍以無菌水將染劑洗淨，以濾紙吸乾銅網上多餘水份後，以穿透式電子顯微鏡 (JEM-1400, JEOL, Japan) 進行觀察，每處理各三重複。

處理過 *Bacillus mycoides* 之番茄植體內苯丙氨酸氨裂解酶 (PAL) 與脂氧合酶 (LOX) 之基因表現

(一) 番茄 mRNA 之萃取

於溫室栽培及無菌栽培環境中的番茄幼苗，以前述方式處理 *B. mycoides* 後第 9、11、13、15 天，取番茄幼苗根部 0.1 克，置於液態氮中快速冷凍並研磨成粉末，隨後加入 1 毫升 RNazol®RT (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) 振盪均勻後，於室溫下靜置 15 分鐘後，將上清液移至新的微量離心管中，並加入 0.4 毫升純水搖晃均勻，於室溫下靜置 15 分鐘後離心 (12000 ×g/15 min)，吸取 1 毫升水層上清液至新的微量離心管中，並加入 0.4 毫升 75% DEPC-ethanol，靜置 10 分鐘後離心 (8000 ×g/3 min)，重覆以上述酒精洗滌二次後，加入 30 μ L DEPC-dH₂O 回溶 RNA。以瓊脂變性膠體電泳法^(13, 22)，純化 RNA (1 μ g) 與 3 μ L 核酸電泳樣品載劑 (nucleic acid loading buffer, 0.4% (w/v) bromophenol blue, 50% (w/v) glycerol) 及 7 μ L 變性溶液 (denaturation solution, 200 μ L 10 X MOPS buffer (200 mM 3-N-morpholino propane sulfonic acid, pH 7.0, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA, 350 μ L formaldehyde (37%), 100 μ L formamide, 5 μ L ethidium bromide (200 μ g/mL)) 混合，混合溶液於 65°C 水浴槽 15 分鐘後置於冰上 5 分鐘，處理後樣品以 1.2% 瓊脂膠體 (1 X MOPS) 進行電泳分析⁽²²⁾，確認 RNA 的品質，而 mRNA 濃度是利用分光光度計 GeneQuant II RNA/DNA Calculator (80-2105-98) (Pharmacia Biotech, FJ, Cambridge, England) 測定吸光值，藉此推估 RNA 濃度與純度 (若 OD_{260}/OD_{280} 比值達 1.8 至 2.0 即為高純度 RNA)，每處理各五重複。

(二) 即時定量反轉錄—聚合酶鏈鎖反應

參考劉氏 (2013) 之即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應⁽¹³⁾，以根據 SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Waltham, CA, USA) 試劑組建議的實驗步驟，製備 cDNA。取總量為 1 μ g 番茄根部的 RNA，並以 DEPC-dH₂O 定量體積至 8 μ L 後加入 10 μ L 2X RT Reaction Mix 與 2 μ L RT Enzyme Mix 均勻混合後，依序於 25°C 作用 10 分鐘，50°C 作用 30 分鐘以及 85°C 作用 5 分鐘後置於冰上，於反應液中加入 1 μ L RNase H 並於 37°C 作用 20 分鐘後完成 cDNA 的製備。將產物保存於 -20°C 備用。委請生工公司 (MDBio Inc., Taipei, Taiwan) 合成 *PAL* (5'-TTGCCACATTTCAGCAACAAGGGC-3'/5'-TGCCACGGAGAGGCCAAACACG-3') 與

LOX (5'-AGCTCCCCACATGGCATTTCGT-3'/5'-TCGCGGAGCTCCTTCCACCA-3') 基因之專一性引子對 (林等人, 未發表)。取用前述方法製備的 cDNA (100 ng) 利用上述專一性引子對在即時定量聚合酶鏈鎖反應器 (Rotor-Gene Q, QIAGEN SCIENCES, Inc., Duesseldorf, Germany) 中進行定量 PCR⁽¹³⁾ (quantitative PCR, qPCR), 並以 α -tubulin [5'-TGAACAACCTCATAAGTGGCAAAG-3'/5'-TCCAGCAGAAGTGACCCAAGAC-3'] 之增幅引子對做為 qRT-PCR 對照組基因。反應條件如下: 每 15 μ L 反應液包含 7.5 μ L POWER SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc., Waltham, USA) 和各 0.5 μ M 之上述專一性引子對。而 PCR 之條件設定如下: 以 95°C 變性五分鐘, 每循環以 95°C 變性 10 秒, 三組引子對皆以 60°C 黏合 30 秒, 72°C 延長 45 秒, 共 40 個循環, 相對基因數值以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 運算表示⁽¹⁴⁾。

番茄移植前不同時間以 *Baillus mycoides* 處理植株後對番茄萎凋病發生的影響

取適量番茄種子浸泡於無菌水中, 待發芽後播種於溫室環境下的栽培介質 (BVB NO.4, Coldenhovelaan, The Netherlands) 中進行育苗。分別在播種後第 4、6、8、10、12 及 14 天, 澆灌 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 的懸浮液 (OD₆₂₀ 值約 0.3, 菌量約為 10⁸ cfu/mL) 至栽培介質中, 並於播種後第 14 天將番茄幼苗移植種於番茄萎凋病菌土 (10³ propagules/g soil) 中, 於接種三週後觀察植株生長勢及植株的發病情形, 每處理各五重複。

結 果

在三角瓶中培養番茄、*Bacillus mycoides* 及番茄萎凋病菌的交互作用

將表面消毒過的番茄種子於 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 細菌懸浮液中催芽, 並於種子發芽後移植至 MS 培養基中, 在移植後四週以單孢靠接番茄萎凋病菌的分生孢子於番茄莖基部進行接種, 於接種 2 週內發現番茄萎凋病菌可感染植株, 並引起植株莖基部縮縮與倒伏的現象。同時也發現 *B. mycoides* CHT2402 及 NP02 亦可纏據番茄根系, 並具有防治功效 (結果未顯示)。

以 Biolog GP Microplate 比較 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04、*B. mycoides* NP02 以及 CHT2402 對碳、氮素源之利用

由 Biolog 的結果挑選出 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 於 24 小時內可快速利用的碳、氮素源, 並去除 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 亦可快速利用者, 共計有麥芽糖

(maltose)、土冉糖 (turanose)、麥芽三糖 (maltotriose)、D-甘露糖 (D-mannose)、D-松三糖 (D-melezitose)、糊精 (dextrin)、纖維二糖 (D-cellobiose)、腺苷 (adenosine)、丙酮酸 (pyruvic acid)、3-甲基-D-葡萄糖 (3-methyl-D-glucose)、L-天門冬醯胺酸 (L-asparagine)、胸腺嘧啶 (thymidine) 及尿素 (uridine) 這 13 種碳、氮素源 (表一)。由於考量各別之成本, 故選價格較低廉的麥芽糖、糊精、纖維二糖及 L-天門冬醯胺供作後續試驗之用。

不同碳、氮素源對 *Bacillus mycoides* 防治番茄萎凋病之影響

將糊精、纖維二糖及 L-天門冬醯胺等三種碳、氮素源分別以 1% 與 3% 的濃度配置 MS 培養基, 並以原配方所使用的

表一、以 Biolog GP Microplate 分析 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04、*Bacillus mycoides* NP02 與 CHT2402 對碳、氮素源之利用。

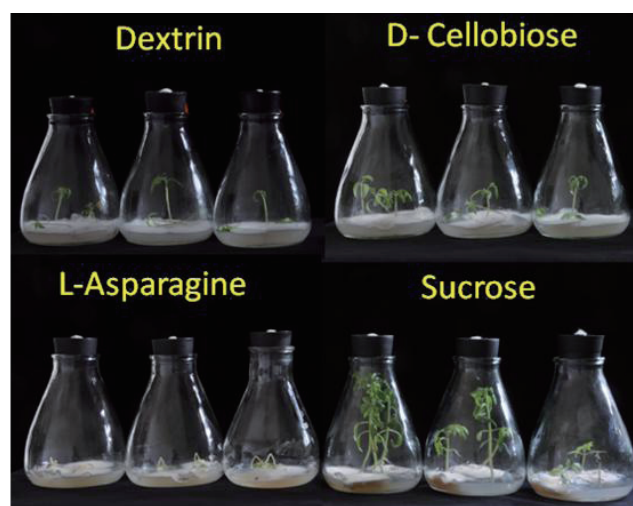
TABLE 1. Utilization of carbon and nitrogen sources in Biolog GP Microplate by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04, and *Bacillus mycoides* NP02 and CHT2402.

Nutrient regimes	Fol-04		NP02	CHT2402
	48 hr	72 hr	24 hr	24 hr
Carbon source				
D-Trehalose	+	+	+	+
Maltose	—	+	+	+
Turanose	—	—	+	+
Maltotriose	—	—	+	+
D-Mannose	—	+	+	+
D-Melezitose	—	+	+	+
Tween 40	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+
Gentiobiose	—	+	+	—
α -D-Glucose	+	+	+	+
β -Methyl-D-Glucose	—	+	+	—
Sucrose	+	+	+	+
α -Ketovaleic Acid	—	—	+	—
Dextrin	—	+	+	+
D-Cellobiose	—	+	+	+
L-Fucose	—	+	—	+
N-Acetyl-D-Mannosamine	—	—	—	+
Pyruvic acid	—	—	+	+
3-Methyl-D-Glucose	—	—	+	+
Nitrogen source				
Adenosine	—	—	+	+
L-Asparagine	—	—	+	+
L-Alanyl-Glycine	—	—	—	+
Thymidine	—	—	+	+
Uridine	—	—	+	+
Uridine-5'-Monophosphate	—	—	—	+

蔗糖 (3%) 作為對照組，得知以 1% 的上述碳、氮素源種植番茄，植株的生長勢較好 (結果未顯示)。因此後續試驗將處理過 *B. mycoides* CHT2402 之番茄實生苗種植於含 1% 上述碳、氮素源的培養基中，在接種 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 二週後，發現番茄植株於四種不同碳、氮素源培養基中有不同的生長表現，其中對照組植株的生長勢較為正常，植株雖受病原菌感染惟未出現植株倒伏或葉片黃化的病徵；糊精與麥芽糖均會使番茄的真葉無法正常生長；纖維二糖雖不會影響植株真葉的生長，但其生長勢卻較對照組的番茄植株弱小；L-天門冬醯胺的處理，在接種病原菌後植株即白化並且出現倒伏死亡的現象 (圖一)。綜合本研究結果得知含有 1% 蔗糖的 MS 培養基最適於作為 *B. mycoides* 防治番茄萎凋病的研究試驗。進一步，將表面消毒後的番茄種子浸泡於 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 菌株的細菌懸浮液中催芽，於發芽時將種子移入含有 1% 蔗糖的 MS 培養基中育苗 4 週後，進而於番茄根部單孢接種 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04，第 5 天後可見對照組的番茄植株出現倒伏的病徵，惟 *B. mycoides* 處理組的植株尚未出現倒伏的現象。陸續觀察接種後 11 天的結果，得知處理 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 菌株者比對照組之植株發病百分率分別減輕 25% 與 24% (圖二)。

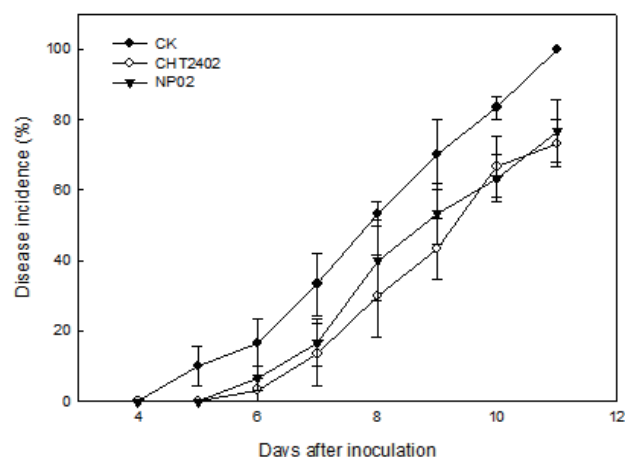
番茄根系之組織化學與穿透式電子顯微鏡觀察

利用塑膠包埋切片法觀察番茄處理 *B. mycoides* 後第 14 天



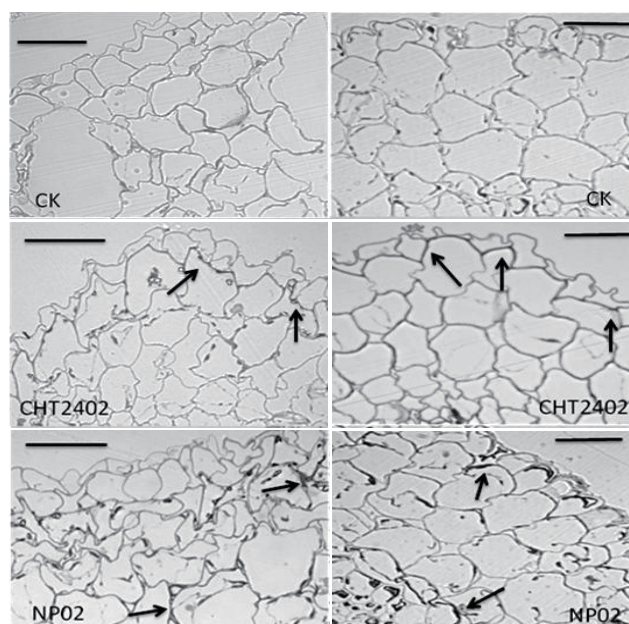
圖一、不同碳、氮素源 (1%) 的 MS 培養基對 *Bacillus mycoides* CHT2402 防治番茄萎凋病之影響。糊精會使番茄的真葉無法正常生長；纖維二糖雖不會影響植株真葉的生長，但其生長勢較對照組植株弱小；在接種病原菌後，L-天門冬醯胺的配方造成植株白化並且出現倒伏死亡的現象。

Fig. 1. Effect of *Bacillus mycoides* CHT2402, cultured in Murashige and Skoog (MS) media with various carbon and nitrogen sources (1%), on controlling Fusarium wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04. Three representative results for each treatment were shown.



圖二、在三角瓶栽培環境下 *Bacillus mycoides* CHT2402 與 NP02 防治番茄萎凋病的效果。

Fig. 2. Effect of *Bacillus mycoides* CHT2402 and NP02 cultured in modified Murashige and Skoog (MS) media (with 1% sucrose) on decreasing the disease incidence of tomato Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 in flask cultivation system. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 was used to inoculate tomato plants after treating *B. mycoides* for 4 weeks.



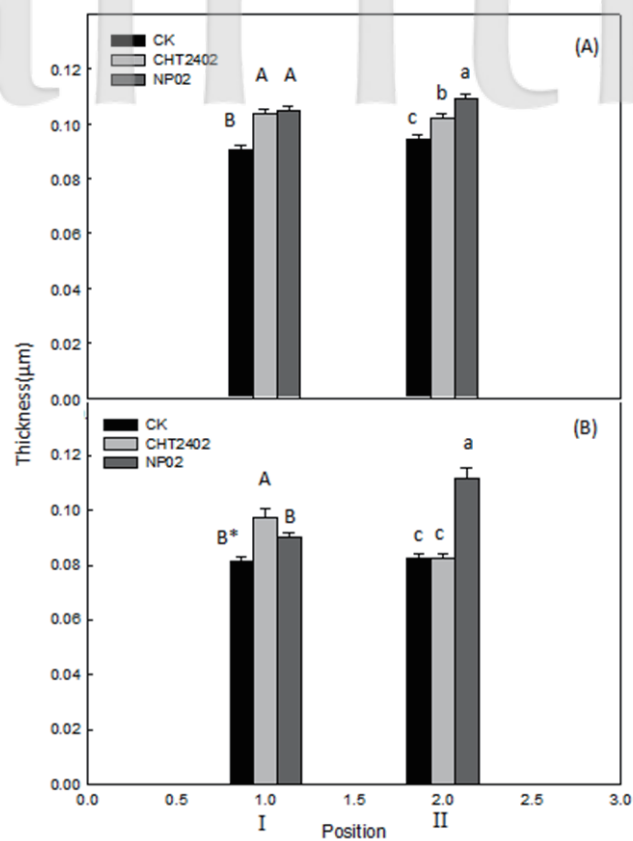
圖三、在溫室 (A) 和三角瓶 (B) 栽培環境下 *Bacillus mycoides* CHT2402 與 NP02 對番茄根部組織結構的影響。

比例尺：50 μ m。箭頭代表細胞壁增厚處。

Fig. 3. Effect of *Bacillus mycoides* CHT2402 and NP02 on strengthening the root tissues of tomato seedlings cultured in the greenhouse (A) and flask cultivation systems (B).

Bar: 50 μ m. Arrows indicate thickened cell wall.

之根部結構形態，結果顯示在溫室與三角瓶栽培環境下，處理 *B. mycoides* CHT2402 之番茄根部表皮細胞與皮層細胞之間

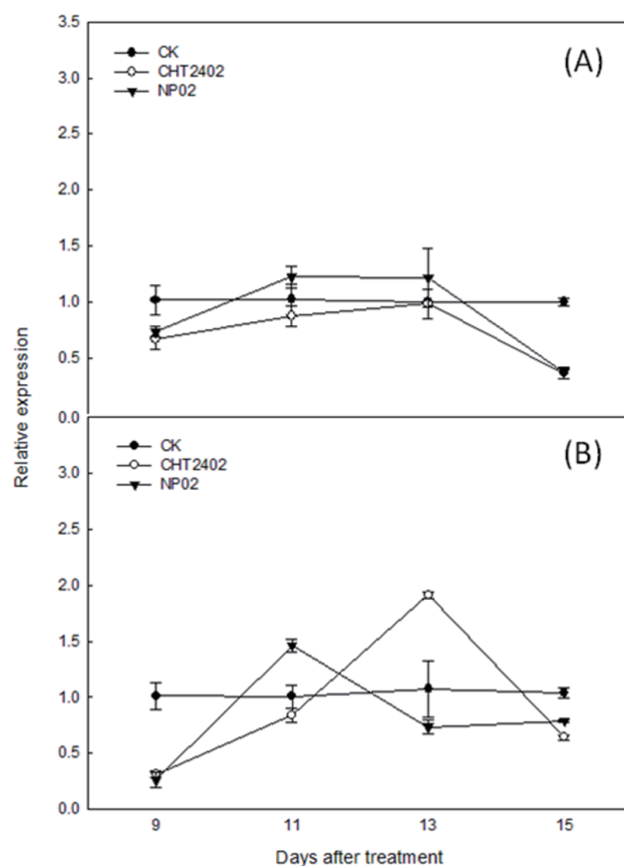


圖四、在溫室 (A) 和三角瓶 (B) 栽培環境下 *Bacillus mycoides* CHT2402 與 NP02 對於番茄根部組織細胞壁厚度的影響。其中位置 I 代表於表皮細胞下方的細胞壁，位置 II 代表於皮層細胞下方的細胞壁。以鄧肯多重差距檢定 (Duncan's Multiple Range Test) 進行結果分析。

Fig. 4. Effect of *Bacillus mycoides* CHT2402 and NP02 on increasing the cell wall thickness of tomato root tissues in the greenhouse (A) and flask cultivation systems (B). Position I represents the cell wall under epidermal cells, position II represents the cell wall under cortex cells. *Means treatments (n=5) in the same column followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

的細胞壁 (位置 I) 均較對照不處理組分別增厚約 0.015 與 0.018 μm ；處理 NP02 後的番茄根部細胞壁則是較對照不處理組分別增厚約 0.016 與 0.014 μm (圖三、四)。此外，處理 CHT2402 之皮層細胞與維管束細胞間的細胞壁 (位置 II) 亦較對照不處理組分別增厚約 0.008 與 0 μm ；處理 NP02 之細胞壁則是較對照不處理組分別增厚約 0.014 與 0.03 μm (圖三、四)。以鄧肯多重差距檢定 (Duncan's Multiple Range Test) 進行結果分析，處理 *B. mycoides* CHT2402 之番茄根部位置 I 之細胞壁厚度與對照組相較下有顯著差異；處理 *B. mycoides* NP02 之番茄根部位置 II 之細胞壁厚度與對照組相較下有顯著差異。

以即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real time qRT-PCR)



圖五、以即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real time qRT-PCR) 分析溫室 (A) 和三角瓶 (B) 栽培環境中處理過 *Bacillus mycoides* CHT2402 與 NP02 番茄幼苗的 *PAL* 基因表現。

Fig. 5. Real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of *PAL* gene expression in tomato seedlings treated with *Bacillus mycoides* CHT2402 and NP02 in the greenhouse (A) and flask cultivation systems (B).

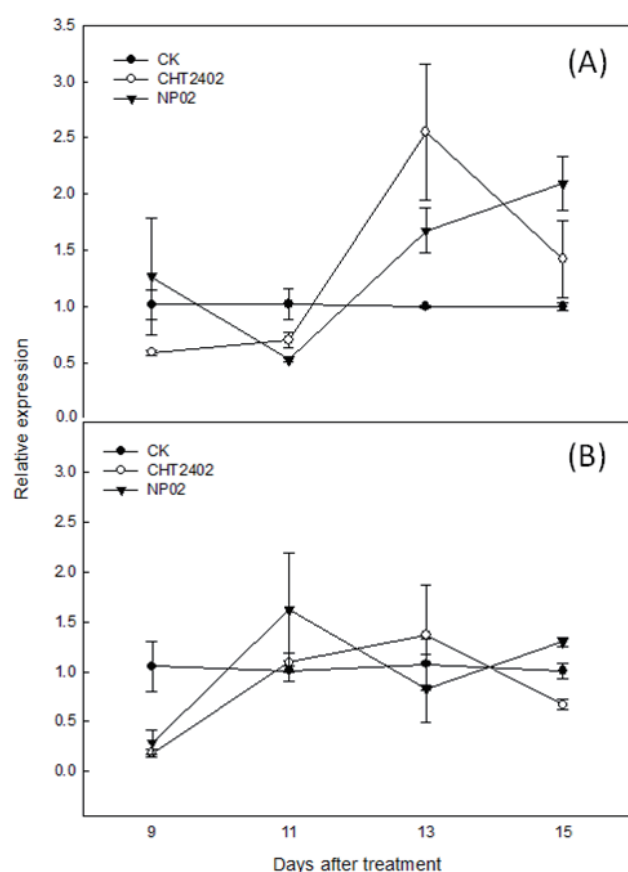
分析番茄植株苯丙氨酸氨裂解酶 (*PAL*) 與脂氧合酶 (*LOX*) 之基因表現情形

由 qRT-PCR 的結果中，得知於三角瓶栽培環境中處理過 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 的番茄根部，其苯丙氨酸氨裂解酶 (phenylalanine ammonia lyase) *PAL* 基因與脂氧合酶 (lipoxygenase) *LOX* 基因均有被誘導表現的現象。番茄經 *B. mycoides* NP02 與 CHT2402 處理後第 11-13 天 *PAL* 與 *LOX* 二基因有相似表現情形 (圖五、圖六)。在溫室方面，處理過 NP02 的番茄根部於處理後 11-13 天，其 *PAL* 基因可被誘導表現 (圖五)；且於處理後第 13-15 天 *LOX* 基因亦受誘導而有較高的表現量。此外，處理過 *B. mycoides* CHT2402 的番茄根部則於處理後第 13-15 天出現 *LOX* 基因被誘導表現的情形 (圖六)。

番茄移植前不同時間以 *Bacillus mycoides* 處理植株對番茄萎凋病發生的影響

番茄種子於無菌水中發芽後，於溫室中以栽培介質進行

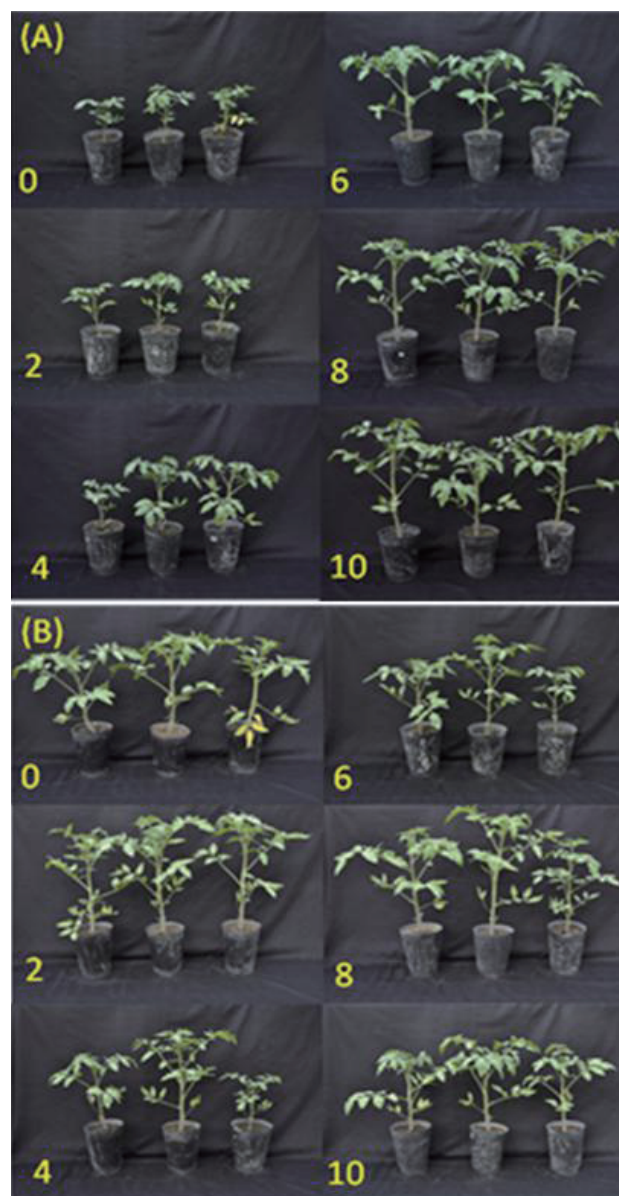
育苗，分別在播種後第 4、6、8、10、12 及 14 天時澆灌 *B. mycoides* 細菌懸浮液，並於播種後第 14 天一併移植至帶有番茄萎凋病菌之土壤中，結果顯示於接種病原菌 3 週後番茄植株生長勢受 *B. mycoides* CHT2402 不同處理時間的影響甚劇，隨著作用時間減少至 6 天以下 (即移植前第 0-4 天)，植株生長受病原菌抑制的現象愈發明顯 (圖七)。反觀 *B. mycoides* NP02 的處理對植株雖不似 CHT2402 菌株未有如 *B. mycoides* CHT2402 明顯抑制生長的現象，處理 *B. mycoides* NP02 並未因作用時間減少進而抑制大部份番茄植株之生長勢，僅但仍可觀察到在移植前第 4 天與第 6 天 (即播種後第 8 天與第 10 天) 觀察到 3 個處理植株中有 1 至 2 株較其它處理時間植株矮 處理的番茄株高比其它處理時間的植株矮 (圖七)。*B. mycoides* 與 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 於同一天處理會使番茄植株提前出現萎凋的病徵。*B. mycoides* CHT2402 和 NP02 與 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 同時處理之植株於接種後第



圖六、以即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real time qRT-PCR) 分析溫室 (A) 和三角瓶 (B) 栽培環境中處理過 *Bacillus mycoides* CHT2402 與 NP02 番茄幼苗的 *LOX* 基因表現。

Fig. 6. Real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of *LOX* gene expression in tomato seedlings treated with *Bacillus mycoides* CHT2402 and NP02 in the greenhouse (A) and flask cultivation systems (B).

三週會出現黃化葉片外 (圖七 A0 和 B0)，其餘各組不同處理時間的番茄植株均未出現病徵。於接種病原菌 4 週後可見 *B. mycoides* CHT2402 處理時間少於 6 天的植株受病原菌感染比對照組植株有較高的罹病度，但處理時間等於或大於 6 天的番茄植株能有效防治萎凋病的發生；然而番茄萎凋病防病效果則不受 *B. mycoides* NP02 的處理時間限制，仍有良好的防病現象 (結果未顯示)。



圖七、於溫室中移植到 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 病土前不同天處理 *Bacillus mycoides* CHT2402 (A) 與 NP02 (B) 對栽植於病土之番茄植株的影響。

Fig. 7. Effect of drenching treatment with *Bacillus mycoides* CHT2402 (A) and NP02 (B) at different day before transplanting on the growth of tomato seedlings planted in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04-infested soil under greenhouse environment condition.

討 論

本研究為了降低外界環境的干擾而運用 MS 培養基之栽培方式，常被用於探討植株誘導系統性抗病反應的試驗。Aimé 等人⁽¹⁾將作物種植於消毒過 (100°C/1 hr) 的焙燒粘土 (calcinated clay) 中分析非病原性 *Fusarium oxysporum* Fo47 誘導植株抗病基因的表現，卻於對照組的樣品中也發現有誘導抗病基因表現的現象，且與處理組的結果並無顯著差異。因此 Aimé 等人更改植株栽培方式，於無菌環境下以細胞培養 (cell culture) 的方式培養番茄下胚軸癒傷組織供實驗之用，並於結果中證實非病原性 *F. oxysporum* Fo47 具有誘導番茄抗萎凋病的能力。藉由組織培養、細胞培養或水耕栽培，這些能避免環境中生物⁽¹⁷⁾及非生物因子干擾的栽培技術有助於分析植物體內生理代謝反應，以培養基培養實生幼苗此類無菌栽培的技術運用於植物生理代謝及誘導抗病反應的試驗案件，也曾報導於阿拉伯芥、煙草、玉米及番茄等作物⁽¹⁶⁾。

在 MS 培養基的配方中，其成分可以分為水、無機鹽、有機物、天然複合物、培養體的支持材料等五大類。其中無機鹽類可提供植株生長的必要元素：氮 (nitrogen)、磷 (phosphorus)、鉀 (potassium)、鈣 (calcium)、鎂 (magnesium) 和硫 (sulfur)，作為生理代謝及組織結構的成分⁽¹⁵⁾。有機物的來源大都以碳水化合物為主，最常使用蔗糖，其次為葡萄糖和果糖，亦有利用麥芽糖、半乳糖、甘露糖和乳糖的例子⁽²⁰⁾。在培養植物時培養基中有機物的用量極須注意，過多的糖量會影響植株根部正常的滲透壓，因而導致其生理代謝異常。此外，糖類對不同生長時期植株、不同種類植物及不同組織部位的需要量均不一致，故選用適當的糖種類與用量於培養植株確實格外重要。本研究結果中，得知不同種的碳、氮素源會影響植株的生育。蔗糖不僅可提供植株生長所需，該濃度 (1%) 亦不影響植株正常的生理代謝。反觀其它種類的碳、氮素源，可見糊精、纖維二糖及麥芽糖均不利於植株的正常生長。此外 L-天門冬醯胺，會使植株呈現白化且生長不良的現象 (圖一)。鐵元素是氧化酶 (oxidase)、細胞色素氧化酶 (cytochrome)、過氧化氫酶 (peroxidase) 及葉綠素 (chloroplast) 不可或缺的物質，於培養基中的鐵對幼胚的形成、嫩芽的分化以及植株轉綠有促進作用⁽²⁾，故植株白化的原因有可能為植株無法有效利用鐵元素所致。然而，麥芽糖及葡萄糖雖為植株可利用的碳素源，惟若用量異常時，易使植株生理出現負面的反應。在本配方中蔗糖不僅在測試的二種濃度 (1% 與 3%) 對植株均無負面影響外 (結果未顯示)，尚有助於 *B. mycoides* 在培養基中纏繞植株根部與 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fo47 的生長，故頗適合做為本研究分析基質。此外，於無菌栽培 (3% 蔗糖) 環境下的番茄，在萎凋病菌接種後可於植株莖基部出現縊縮的現象，導致無法繼續支撐地上部組織而出現倒伏的情形 (結果未顯示)。

若是預先以 *B. mycoides* 處理植株，其處理時間點與接種

病原菌的時間點愈近，對植株的生長促進及抗病效果較差^(1, 11)，尤其在處理 *B. mycoides* CHT2402 後 6 天內接種番茄萎凋病菌，番茄植株均會遭受病菌感染，並且抑制植株的生長；但若處理 *B. mycoides* NP02 的植株，則馬上具有防病與促進植株生長的功效 (圖七)。

本研究於溫室及三角瓶栽培環境下處理過 *B. mycoides* 的番茄根部，其細胞壁有增厚的現象，且增厚的細胞壁多位於表皮細胞與皮層細胞下方的細胞間隙，與前人報導中所指的位置雷同 (圖三)⁽⁴⁾。此外，以 Axio Vision Rel.4.8 軟體輔助計數上述報導指出細胞壁可能增厚的部位，每處理計數 100 個細胞壁的厚度，得知 *B. mycoides* CHT2402 能誘導表皮細胞與皮層細胞間的細胞壁增厚約 0.015-0.018 μm ，而 *B. mycoides* NP02 處理組於表皮細胞與皮層細胞下方這二個位置則有細胞壁增厚 0.014-0.03 μm 的現象。以鄧肯多重差距檢定進行結果分析，發現處理 *B. mycoides* CHT2402 之番茄根部位置 I 之細胞壁厚度與對照組相較下有顯著差異；處理 *B. mycoides* NP02 之番茄根部位置 II 之細胞壁厚度與對照組相較下有顯著差異。

qRT-PCR 的結果指出在三角瓶及溫室栽培環境中處理過 *B. mycoides* CHT2402 與 NP02 的番茄植株，其根部在處理組中有誘導表現防禦相關基因的情形。在三角瓶栽培環境中兩種防禦相關基因 *PAL* 與 *LOX* 有類似的表現趨勢，於處理 *B. mycoides* NP02 第 11 天時其 *PAL* 與 *LOX* 基因表現較控制組高，而處理 *B. mycoides* CHT2402 之番茄根部於第 13 天時有類似前述的表現差異 (圖五、圖六)。總結上述結果可知 *B. mycoides* 處理後防禦相關基因 *PAL* 與 *LOX* 於不同時間點提高表現量，此現象或可為番茄提供抗萎凋病之抗性。

綜合本次試驗結果推測 *B. mycoides* 能有效防治番茄萎凋病的原因應為促使植株根部增厚細胞壁作為屏障 (圖四)，並於病原菌感染前誘導植物防禦相關基因的表現，藉此減緩病原菌入侵的速度，進而延緩植株病勢發展及發病時間。

謝 辭

本研究承蒙教育部高教深耕計畫特色領域研究中心計畫永續農業創新發展中心經費補助得以順利完成，謹此致謝。

引用文獻

1. Aimé, S., Cordier, C., Alabouvette, C., and Olivain, C. 2008. Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73: 9-15.
2. Alejandro, P. G., Diego, R. and Antonio, D. V. 2011. Plant

protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Biotechnology* 22: 187-193.

3. Bargabus, R. L., Zidack, N. K., Sherwood, J. W., and Tacobsen, B. J. 2002. Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61: 289-298.
4. Benhaumou, N., Joseph, W. K. and Tuzun, S. 1998. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* 204: 153-350.
5. Ding, P. F. 2006. Identification for biocontrol agents of tomato Fusarium wilt and evaluation for their potential biocontrol ability. Department of Plant Pathology, National Chung-Hsing University, master thesis. 51 pp. (in Chinese)
6. Duijff, B. J., Gianinazzi-Pearson, V., and Lemanceau, P. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytol.* 135: 325-334.
7. Hollander, D. H. and Nell, E. E. 1954. Improved preservation of *Treponema pallidum* and other bacteria by greezing with glycerol. *Appl. Microbiol.* 2 (3): 164-170.
8. Huang, J. W., and Sun, S. K. 1982. Tomato Fusarium wilt in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 24: 265-270.
9. Huang, J. S., Peng, Y. H., Chung, K. R., Huang, J. W. 2018. Suppressive efficacy of volatile compounds produced by *Bacillus mycoides* on damping-off pathogens of cabbage seedlings. *The journal of J. agricultural Agr. Sscience.* 156 (6):1 795-15809.
10. Jacobsen, B. J., Zidack, N. K., and Larson, B. J. 2004. The role of Bacillus-based biological control agents in intergrated pest management system. *Phytopathology* 94: 1272-1275.
11. Jetiyanon, K. and Kloepper, J.W. 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control.* 24: 285-291.
12. Liu, L., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promotin-rhizobacteria. *Phytopathology* 85: 695-698.
13. Liu, Y. W. 2013. Effects of nanomaterials on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, seed germination and seedling growth of vegetables. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, master thesis. 14 92 pp. (in Chinese)
14. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
15. McSpadden Gardener, B. B., and Driks, A. 2004. Overview of the nature and application of biocontrol microbes: *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94 (11): 1244.
16. Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
17. Muslim, A., Homiouchi, H., Hayakumachi, M. 2003. Control of Fusarium crown and root rot of tomato with hypovirulent binucleate Rhizoctonia in soil and rock wool systems. *Plant Dis.* 87: 739-747.
18. Nash, S. M. and Snyder, W. C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot Fusarium in field soils. *Phytopathology* 52: 567-572.
19. Peng, Y. H. Chou, Y. J., Liu, Y. C., Jen, J. F., Chung, K. R. and Huang, J. W. 2017. Inhibition of cucumber *Pythium* damping-off pathogen with zoosporicidal biosurfactants produced by *Bacillus mycoides*. *Journal of p. Plant diseases Dis. and Pprotection.* 124, : 481-491.
20. Pérez-Garcia, A., Romero, D., and Vicente, A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Biotechnology* 22: 187-193.
21. Trigiano, R. N. and Gray, D. J. 2010. *Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology.* CRC Press, Boca Raton, 186.
22. Wan, Y. L. 2009. Expression of virulence-related genes in variants of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, master thesis. 50 pp. (in Chinese)

ABSTRACT

Tang, J. R., Chang, P. F. L., Chang, T. H., Lin, Y. H., and Huang, J. W., 2019. The analysis platform for mechanisms on controlling tomato Fusarium wilt with *Bacillus mycoides*. *J. Plant Med.* 61(1): 29-38.

*Corresponding author, Huang, J. W., jwhuang@nchu.edu.tw

In order to explore the control mechanisms for tomato plants resistant to Fusarium wilt disease by the biocontrol agent *Bacillus mycoides*, a platform was set up for simultaneously culturing tomato seedlings, *B. mycoides*, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 in the flask cultivation system. Biolog GP Microplate was used to analyze the utilization of carbon and nitrogen sources by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04, *B. mycoides* CHT2402 and NP02 isolates. The results showed that adjusting sucrose

concentration in Murashige's and Skoog's (MS) medium to 1% (w/v) was suitable for the interactions among tomato seedlings, the pathogen, and biocontrol agents. Tomato seeds were incubated in the cell suspension (10^8 cfu/mL) of *B. mycooides* CHT2402 and NP02 for 3 days, and then they were transplanted to the modified MS medium in the flask. Two weeks later, each tomato seedlings was inoculated with single spore of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-04 near the root. It was found that tomato seedlings could be protected from the pathogen by *B. mycooides* CHT2402 and NP02 for five days in the flask cultivation system. To study the mechanisms for controlling tomato Fusarium wilt by the biocontrol agents, the root tissues of tomato plants treated respectively with *B. mycooides* CHT2402 and NP02 were analyzed by tissue section and real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) techniques. The results of Spurr's resin block section indicated that the cell wall thickness of epidermis cells of the tomato plant treated with *B. mycooides* CHT2402 and NP02, respectively, increased 0.015-0.018 μm and 0.014-0.016 μm , whereas the cell wall thickness of cortex cells increased 0-0.008 μm and 0.014-0.03 μm . In addition, the expression of *PAL* (phenylalanine ammonia lyase) and *LOX* (lipoxygenase) genes in tomato roots was analyzed by qRT-PCR after *B. mycooides* CHT2402 and NP02 application in both flask cultivation and greenhouse condition. Accordingly, the results demonstrated *B. mycooides* CHT2402 and NP02 application induced the expression of *PAL* and *LOX* in tomato plants at different time points. Collectively, our results suggest that *B. mycooides* CHT2402 and NP02 are able to control tomato Fusarium wilt if they could colonize the roots and vascular tissues of tomato plants and trigger *PAL* and *LOX* expression prior to pathogen infection.

Keywords: tomato Fusarium wilt, induced resistance, *Bacillus mycooides*