نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳ (۱۲۶-۱۱۷)

کنترل بیولوژیک نماتد *Meloidogyne javanica* توسط دو عامل آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* CHA0, *Trichoderm harzianum* BI در گیاه گوجه‌فرنگی

۱. سمیه مختاری*؛ ۲. نوازاله صاحبانی؛ ۳. حسن رضا اعتباریان
۱. کارشناسی ارشد (مربی)، دانشگاه خلیج فارس
۲ و ۳. دانشیار و استادیار، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۹ - تاریخ تصویب: ۹۳/۱۱/۱۸)

چکیده

نماتدهای مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) از مهم‌ترین نماتدهای پارازیت گیاهی می‌باشند که باعث ایجاد خسارت روی اکثر گونه‌های گیاهی می‌شود. در این تحقیق به بررسی اثر دو عامل آنتاگونیستی *Trichoderma harzianum* BI و *Pseudomonas fluorescens* CHA0 در کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه و بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در طی پدیده القای مقاومت پرداخته شد. نتایج نشان داد که استفاده از این قارچ و باکتری به طور تلفیقی موجب کاهش معنی‌دار در فاکتورهای بیماریزایی نماتد نسبت به تیمار باکتری تنها و شاهد (نماتد) گردید. اما این تیمار تلفیقی با تیمار قارچ تنها در کلیه فاکتورها تفاوت معنی‌داری نشان نداد. نتایج بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه گیاه در تیمارهای مشابه نشان داد که تغییرات فعالیت این آنزیم از روز اول افزایش نشان داد و در روز چهارم به اوج خود رسید و سرانجام در روزهای بعد فعالیت این آنزیم کاهش پیدا کرد بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به تیمار قارچ +باکتری بود که تفاوت معنی‌داری با فعالیت آنزیم در تیمار باکتری نداشت. همچنین در بررسی فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز مشاهده شد که اوج فعالیت این آنزیم در تیمار قارچ+باکتری طی روز پنجم بعد از مایه‌کوبی نماتد بود که دارای تفاوت معنی‌داری با بقیه تیمارها بود. بنابراین هر دو عامل قادر به القا آنزیم دفاعی پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز به طور سیستمیک در کل گیاه از جمله ریشه شده و بدین طریق مانع از فعالیت نماتد مولد گره ریشه می‌شود.

کلیدواژگان: نماتد مولد گره ریشه، *Pseudomonas fluorescens* CHA0، *Trichoderma harzianum* BI، القای مقاومت سیستمیک.

مقدمه

نماتدهای مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) از مهم‌ترین و خطرناک‌ترین نماتدهای پارازیت گیاهی در سرتاسر جهان می‌باشد. این نماتد دارای طیف وسیع میزبانی بوده و تاکنون ۲۰۰۰ گونه گیاهی به عنوان میزبان این نماتد شناخته شده است که تنها گونه *M. javanica* قادر است حدود ۷۰۰ گونه گیاهی را آلوده نماید (Sasser 1989).

* تلفن: ۰۹۱۷۱۲۵۷۹۶۷
E-mail: mokhtari_so@yahoo.com

آنتاگونیست‌های ریزوباکتریایی ازجمله *P. fluorescens* توانایی کنترل بیولوژیک نماتدهای پارازیت گیاهی را دارند. صدیقی و همکاران گزارش کردند که از ۳۳ جدایه باکتریایی *P. fluorescens* که از محصولات مختلف به دست آمده بودند بیش از ۵۰٪ باعث مرگ‌ومیر لاروهای نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاهی شدند (Siddiqui and Shaukat 2003). ملکی و همکاران گزارش کردند، که قارچ تریکودرما *T. harzianum* BI در غلظت مؤثر $۱۰^{۶}$ اسپور درمیلی به عنوان عامل کنترل‌کننده نماتد ریشه گوجه‌فرنگی (*Meloidogyne javanica*) در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای عمل کرده و این قارچ به عنوان القاکننده و سنتزکننده ترکیبات دفاعی از جمله فنل کل بوده و موجب تحریک نظام دفاعی گیاه نیز می شود (Maleki Ziarati *et al.* 2009).

این نکته حائز اهمیت است که مخلوط یا ترکیب دو یا چند آنتاگونیست که بتواند بیماری های خاک را سرکوب کند می‌تواند در کنترل بیمارگرهای خاکزاد نیز مورد استفاده قرار گیرد (Schippers 1992).

گیاهان دارای مکانیسم‌های فعالیت دفاعی علیه حمله بیمارگر می‌باشند اما این مکانیسم‌ها برای گیاهی که توسط یک بیمارگر مورد حمله قرار می‌گیرد کافی نیست زیرا برخی بیمارگرها می‌توانند واکنش‌های مقاومت را سرکوب کند. اگر مکانیسم دفاعی توسط یک محرک شدت یابد باعث کاهش بیماری توسط بیمارگر خواهد شد (Van–Loon *et al.* 1998). مقاومت القائی حالتی از بالا رفتن عمومی ظرفیت دفاعی گیاه بوده و می‌تواند توسط محرک‌هایی مثل مواد شیمیایی معین، عوامل غیربیماریزا، نژادهای ناسازگار از بیمارگر، بیمارگرها و حتی زخم ایجاد شود (Gorlach *et al.* 1996). معمولاً القای مقاومت سیستمیک یا SAR (systemic acquired resistance) وابسته به اسید سالیسیلیک در ریشه ایجاد می‌شود در حالی‌که ریزوباکتری‌ها ISR (induced systemic resistance) را که یک مسیر سیگنالی متفاوت و بی‌نیاز به سالیسیلیک اسید می‌باشد را القا می‌کنند. به طور کلی القای مقاومت سیستمیک در گیاه باعث افزایش تجمع فیتوالکسین‌ها، ترکیبات فنلی، پروتئین‌های فعال مرتبط با بیماری‌زایی (PR proteins) مثل پراکسیداز، سطح mRNA کدکننده فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و دیگر آنزیم‌های دفاعی مانند پلی‌فنل اکسیداز شده و همچنین باعث افزایش لیگنینه شدن دیواره سلولی می‌شود (Van–Loon and Bakker 2005). ویلیامسون و همکاران در ریشه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد ریشه *Meloidogyne* spp.، ژن‌هایی را مشخص کردند که در مکانیسم دفاعی گیاه باعث القای آنزیم‌هایی چون پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز، لیپوکسیژناز و پراکسیداز می‌شوند (Windham *et al.* 1989). بسیاری از مواد فنلی ممکن است کم و بیش برای بیمارگرهای مختلف در آزمایشگاه سمی‌باشند، ولی بیشتر مواد فنلی در غلظت‌هایی که به طور طبیعی رخ می‌دهند، برای بافت گیاهی در آزمایشگاه خیلی سمی نیستند. فرآورده‌های پلیمریزه شده و اکسید شده فنل‌ها سمیت متفاوت دارند. فرآورده‌های حاصل از کم ترین میزان اکسیداسیون فنل‌ها، یعنی کوئینون‌ها (که توسط آنزیم پلی‌فنل اکسیداز صورت می‌گیرد)، بسیار سمی و فعال‌اند. فرآورده‌هایی از پلی‌فنل‌ها که بیش از حد اکسید و پلیمریزه شده‌اند، کمتر سمی یا غیر سمی هستند (Lyr 1965). همچنین ابراهیم نقش آنزیم پراکسیداز و آیزوزیم‌های آن را در گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد *Meloidogyne* spp. بررسی کرد (Ibrahim 1991). شارون و همکاران گزارش کردند که در تیمار گیاه با عوامل آنتاگونیست مانند تریکودرما باعث افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مثل کیتیناز، پراکسیداز و غیره می‌شود (Sharon *et al.* 2001).

پراکسیداز که عموماً از چندین آیزوزایم تشکیل شده است، در گیاهان در مقابل بیمارگرهای مختلف القا می‌شود که قادر به کاتالیز چندین نوع مختلف از واکنش‌های اکسیدکننده می‌باشد. آیزوزایم‌های پراکسیداز ممکن است در خصوصیات بیوشیمیایی همچون فعالیت اختصاصی، میل ترکیبی با رشد مایه، کوفاکتورها، حساسیت به بازدارنده‌ها، pH مناسب و غیره تفاوت داشته باشند. همچنین ممکن است واکنش‌های کاتالیز شده توسط پراکسیداز، بوسیله مواد مختلفی که اثرات فعال‌کننده یا بازدارنده دارند، تحت تأثیر قرار گیرد (Ku *et al.* 1970, Kosuge 1969). در رابطه با عملکرد پراکسیداز در گیاهان و بیماریزایی گیاهی، با توجه به گزارش‌های زیادی که در خصوص بالا رفتن فعالیت آنزیم پراکسیداز در مدت تعامل

بین گیاه و بیمارگر صورت گرفته، می‌توان گفت که این آنزیم در مکانیسم دفاعی گیاه نقش مهمی را ایفا می‌کند که شامل: لیگنینه کردن دیواره، ایجاد H_2O_2، سم‌زدایی H_2O_2، cross-linking پروتئین‌های ساختاری پلی‌ساکاریدها اشاره کرد (Yamasaki *et al.* 1997, Mader and Fussl 1982). پیش‌ماده‌های لیگنین به نام‌های سینامیل الکل، کوماریل الکل و کونی فریل الکل می‌باشد. با پلیمریزه شدن این ترکیبات الکلی توسط آنزیم پراکسیداز در حضور H_2O_2 لیگنین ایجاد می‌گردد. همچنین وجود پراکسیداز در تقویت دیواره سلولی لازم و ضروری می‌باشد (Zacheo *et al.* 1993). تشکیل H_2O_2 نیز توسط آنزیم پراکسیداز کاتالیز می‌شود که طی اکسید شدن NADH بوده و این واکنش وابسته به pH می‌باشد (Wojtaszek 1997).

مواد و روش‌ها

تهیه مایه آلوده‌کننده نماتد

نمونه گیاهی آلوده به نماتد *Meloidogyne javanica* از گلخانه های خیار در منطقه ورامین تهیه شد، سپس با استفاده از روش توده تخم منفرد (single egg mass) خالص سازی شده و روی رقم کارون به طور متوالی تکثیر شد. برای انجام تست‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی از تخم و لارو سن دو این نماتد که به روش هوسی و بارکر استخراج شده بود استفاده شد (Hussay and Barker 1973). شناسایی نماتد بر اساس معیارهای مورفولوژیک و مورفومتریک و با استفاده از کلید جپسون انجام شد (Jepson 1987).

تهیه مایه آلوده‌کننده قارچ و باکتری

قارچ و باکتری مورد استفاده از گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران تهیه شد که پس از تک اسپور کردن قارچ و تک کلون کردن باکتری به ترتیب روی محیط کشت‌های PDA و NA تکثیر شد. سپس برای تهیه مایه آلوده‌کننده قارچ با ریختن آب مقطر سترون روی سطح کلونی قارچ و به هم زدن آن با انتهای خمیده لوله شیشه‌ای سوسپانسیونی از اسپور و میسلیوم قارچ به دست آمد که پس از عبور دادن از چند لایه پارچه ململ، میسلیوم آن جدا گردید. سپس برای به دست آوردن غلظت موردنظر از لام گلبول‌شمار استفاده شد. در کلیه آزمایش‌ها از غلظت 10^6 اسپور در ملی‌لیتر قارچ استفاده شد. برای تهیه مایه آلوده‌کننده باکتری پس از کشت آن در محیط NB به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای اتاق، جداسازی سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ انجام شد، در کلیه آزمایش‌ها از غلظت 10^9 باکتری استفاده گردید (Thompson 1996).

اثر *T. harzianum* BI و *P. fluorescense* CHA0 روی نماتد مولد گره ریشه در گیاه گوجه‌فرنگی

ابتدا بذور گوجه‌فرنگی رقم Cal-JN3 به مدت ۲-۳ دقیقه توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی سطحی شد. سپس در گلدان‌های حاوی خاک سترون (شامل خاک مزرعه، ماسه، کود برگ به ترتیب به نسبت ۱،۱،۲) کاشته شد. گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله چهار برگی به شرح زیر به وسیله قارچ و باکتری مورد نظر مایه‌کوبی شدند.

الف) مایه‌کوبی ریشه گیاه با سوسپانسیون اسپور قارچ (10^6spore/ml) به روش غوطه‌ور کردن ریشه در سوسپانسیون به مدت پنج دقیقه

ب) مایه‌کوبی ریشه گیاه با سوسپانسیون باکتری (10^9 CFU/ml) به روش خیساندن خاک به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر به ازای ۳۶۰ گرم خاک موجود در هر گلدان

ج) مایه‌کوبی ریشه گیاه بوسیله تلفیق باکتری و قارچ به روش‌های ذکر شده در بالا

یک هفته بعد از مایه‌کوبی آنتاگونیست‌ها، جمعیت ۲۰۰۰ لارو سن دو نماتد *M. javanica* به هر گلدان اضافه گردید (Siddiqui and Shaukat 2004). شاهد در این آزمایش گیاهچه‌های مایه‌کوبی‌شده با آب مقطر سترون بود. سپس گلدان‌ها را در تشت آب که دمای آن توسط هیترهای آکواریومی روی ۲۶ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود؛ نگهداری شدند. ۶۰ روز پس از مایه‌کوبی گیاهچه‌ها با نماتد، ریشه آنها از خاک خارج کرده و پس از شستشو با آب بر اساس معیارهای متوسط تعداد گال به ازاء هر گیاه، متوسط تعداد توده تخم به ازاء هر گیاه، متوسط تعداد تخم در هر توده تخم، وزن تر ریشه و وزن تر اندام هوایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل در پایه کاملاً

تصادفی با پنج تکرار انجام گرفت. این آزمایش دو بار تکرار شد.

ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز

ابتدا بذور گوجه‌فرنگی رقم Cal-JN3 همانند آزمایش قبل ضد عفونی سطحی شد. سپس در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشته شد. گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله چهار الی شش برگی به وسیله قارچ و باکتری موردنظر همانند آزمایش قبل مایه‌کوبی شدند. یک روز بعد از مایه‌کوبی آنتاگونیست‌ها، به هر گلدان که شامل یک گیاه بود حدود ۲۰۰۰ لارو سن دو نماتد *M. javanica* اضافه گردید. شاهد در این آزمایش گیاهچه‌های مایه‌کوبی شده با آب مقطر سترون بود. سپس گلدان‌ها در تشتک‌های آب که دمای آن توسط هیترهای آکواریومی روی ۲۶ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود؛ نگهداری شدند. نمونه‌گیری از بافت ریشه به مدت ۷ روز متوالی به فاصله یک روز پس از مایه‌کوبی با نماتد انجام گرفت. آزمایش در قالب طرح فاکتوریل در پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت.

استخراج پروتئین از بافت گیاه

نیم گرم از بافت گیاهی ریشه در هاون چینی با استفاده از ازت مایع به خوبی کوبیده و نرم گردید. سپس یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مول با ۶ =pH به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتر منتقل و توسط میکروسانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایه رویی حاصل برای انجام آزمایش‌ها جدا و تا قبل از انجام آزمایش در دمای۴۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Reuveni 1995).

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره

تعیین میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره با استفاده از منحنی استاندارد به روش برادفورد انجام شد (Bradford 1976)، سپس به منظور تعیین میزان کل پروتئین عصاره به دست آمده در آزمایش‌ها، مقدار ۲۰ میکرولیتر عصاره هر نمونه با سه ملی‌لیتر معرف برادفورد در یک لوله آزمایش کوچک مخلوط شد. سپس میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نامومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Lambda 25 V/VIS Spectrometer) قرائت گردید. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و میزان کل پروتئین هر عصاره با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره (که دارای ۴۰ میلی‌گرم پروتئین باشد)، ۲۰ میکرولیتر گوئیکول و مقدار کافی بافر سیترات فسفات، در یک لوله آزمایش ریخته، و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج ۴۷۵ نانومتر صفر گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد به مخلوط اضافه گردید و سریعاً تغییرات جذب نور به فواصل ۱۰ ثانیه، به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس تغییرات جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Reuveni 1995).

ارزیابی میزان فعالیت پلی‌فنل اکسیداز (*Polyphenol oxidase*)

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره (که دارای ۴۰ میلی‌گرم پروتئین باشد)، ۲۰ میکرولیتر محلول پرولین و مقدار کافی بافر سیترات-فسفات ۲۵ میلی‌مول (pH ۶/۴) طوری که حجم نهایی دو ملی‌لیتر باشد، در لوله آزمایش ریخته و توسط ورتکس به مدت ۲ دقیقه کاملاً مخلوط شد. سپس دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط صفر گردید. در ادامه به مخلوط واکنش ۴۰ میکرولیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی‌مول افزوده و سریع مخلوط نموده و بلافاصله تغییرات جذب نور را با طول موج ۵۱۵ = λ max نانومتر به مدت یک دقیقه با فاصله ۱۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات جذب نور دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Mohammadi and Kazemi 2002).

الکتروفورز بومی (native PAGE) آیزوزایم‌های پراکسیداز

الکتروفورز بومی با استفاده از ژل جداکننده ۱۲ درصد و متراکم‌کننده ۶ درصد انجام شد. در هر چاهک مقداری از

عصاره که حاوی ۲۰ میکروگرم پروتئین باشد ریخته شده و حجم نهایی هر چاهک با استفاده از بافر نمونه به ۳۵ میکرولیتر رسانده شد. ولتاژ در مرحله ژل متراکم‌کننده ۷۵ ولت و در مرحله ژل جداکننده ۱۰۰ ولت در نظر گرفته شد. سپس ژل Run شده از بین صفحات شیشه‌ای خارج و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس در بافر سیترات-فسفات ۲۵ میلی‌مول حاوی گوئیکول با غلظت نهایی پنج میلی‌مول و pH ۵/۴ به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. سپس مقدار یک درصد پراکسید هیدروژن قطره قطره به آن اضافه شد. پس از چند لحظه باندهای قهوه‌ای که نشان‌دهنده آیزوزایم‌های پراکسیداز بودند ظاهر شد (Laemmli 1976).

نتایج

بررسی تأثیر *T. harzianum* BI و *P. fluorescense* CHA0 روی نماتد مولد گره ریشه در گیاه گوجه‌فرنگی نتایج به دست آمده در جدول ۱ نشان داد که بین تیمارهای مختلف و شاهد از نظر فاکتورهای بیماریزایی اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در تیمار مایه‌کوبی شده با باکتری+ قارچ و قارچ تنها بر علیه نماتد از نظر کلیه فاکتورها به جز وزن قسمت‌های هوایی اختلاف معنی‌داری نبود. همچنین بین تیمارهای باکتری+ قارچ و باکتری تنها بر علیه نماتد از نظر تعداد گال به ازاء هر گیاه و وزن تر اندام‌های هوایی و وزن تر ریشه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

جدول ۱. اثر قارچ *T. harzianum* BI و باکتری*P. fluorescens* CHA0 روی خصوصیات بیماریزایی نماتد مولد گره ریشه

تیمارها	نماتد	باکتری + نماتد	قارچ+نماتد	باکتری + قارچ + نماتد
وزن تر ریشه گیاه (g)	۲/۷۰b	۳/۷۹ ab	۴/۳۳ a	۳/ ۳۵ ab
وزن تر قسمت‌های هوایی (g)	۷/۸۳c	۱۰ /۳۷b	۱۲/۱۷a	۱۰b
متوسط تعداد گال به ازاء هر گیاه	۲۶۰a	۱۵۳b	۶۵ c	۶۹ c
متوسط تعداد توده تخم به ازاء هر گیاه	۱۳۰a	۷۱b	۳۹ bc	۳ ۳c
متوسط تعداد تخم در هر توده تخم	۷۰۰a	۵۵۶b	۴۰۳ c	۳۶۰c

در هر ردیف عددهایی را که با حروف مشترک نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ بدون اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

نتایج همچنین نشان داد که بین تیمارهای مختلف در همه فاکتورها به جز وزن تر ریشه با شاهد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. همچنین بین تیمارهای قارچ+ باکتری و قارچ تنها برعلیه نماتداختلاف معنی‌دار مشاهده نشد در حالی‌که بین تیمار قارچ+باکتری و باکتری تنها برعلیه نماتد اختلاف معنی‌دار بود.

ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج به دست آمده نشان داد که فعالیت این آنزیم در ریشه از روز اول بعد از مایه‌کوبی نماتد شروع و در روز چهارم به حداکثر میزان خود رسیده و طی روزهای بعد روند کاهشی داشته است. در روز اول تا سوم بعد از مایه‌کوبی نماتد بین تمام تیمارها بجز تیمار باکتری+ نماتد اختلاف معنی‌داری با شاهد (نماتد) مشاهده نشد.

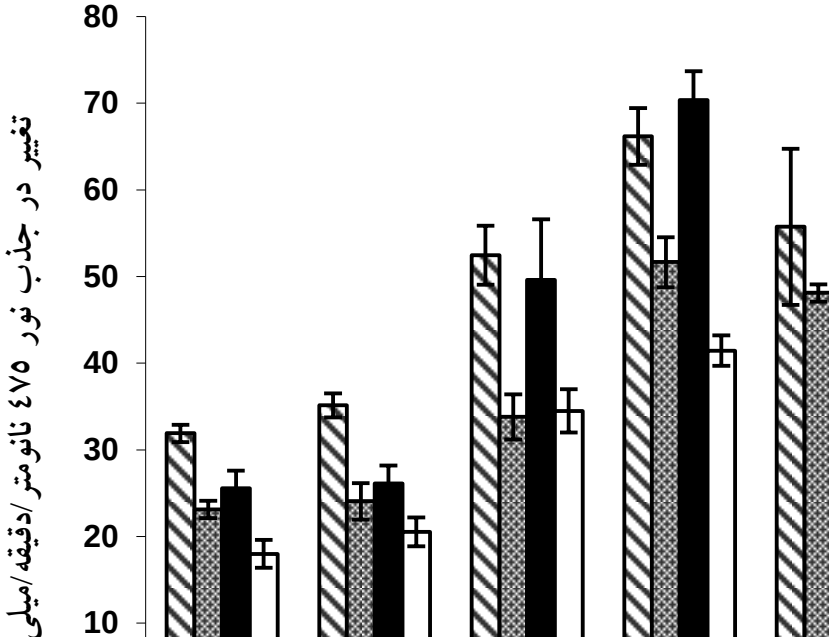
در حالی که در روز چهارم تمام تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند بجز تیمار قارچ+ نماتد که فقط در روز ششم بعد از مایه‌کوبی نماتد با شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد. بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به دو تیمار باکتری+قارچ+نماتد و باکتری+نماتد در روز چهارم می‌باشد که ین دو تیمار در روز چهارم بعد از مایه‌کوبی نماتد با هم هیچ اختلاف معنی‌داری ندارند و نهایت در روز هفتم فعالیت آنزیم در دو تیمار باکتری+قارچ+نماتد و باکتری+نماتد نسبت به روز چهارم کاهش پیدا کرد (شکل ۱).

اعداد مربوط به نمودار، میانگین سه تکرار و خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشد. فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در ۴۷۵ نانومتر در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین تام نشان داده شده است.

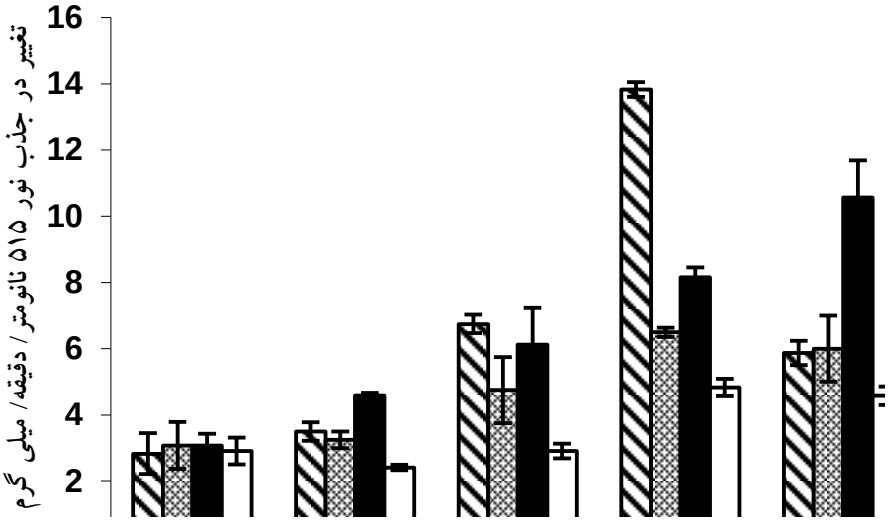
ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی مایه‌کوبی‌شده با *P. fluorescens* CHA0, *T. harzianum* BI علیه نماتد مولد گره ریشه

نتایج نشان داد که بین تیمارها، بین روزهای نمونه برداری و بین اثر متقابل آنها در تغییرات فعالیت آنزیم

پراکسیداز اختلاف معنی‌داری (P≤٪۵) وجود دارد. همچنین نتایج به دست آمده (شکل ۲) نشان داد فعالیت این آنزیم در گیاه گوجه‌فرنگی در روز اول بعد از مایه‌کوبی نماتد بدون اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و شاهد (نماتد) شروع شد و طی روزهای دوم و سوم فعالیت آنزیم افزایش یافته به طوریکه بین کلیه تیمارها با شاهد (نماتد) اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در روز چهارم بعد از مایه‌کوبی نماتد فعالیت آنزیم در تیمارهای باکتری+نماتد و قارچ+نماتد به حداکثر میزان خود رسید در حالی‌که فعالیت آنزیم در تیمار باکتری+قارچ+نماتد در روز پنجم به حداکثر میزان خود رسید که با شاهد و دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد و در روزهای بعد فعالیت آنزیم به تدریج کاهش یافت و در روز هفتم به کمترین مقدار خود رسید.



شکل ۱. تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی مایه‌کوبی شده با *P. fluorescens* CHA0 و قارچ *T. harzianum* BI علیه نماتد مولد گره ریشه *M. javanica*

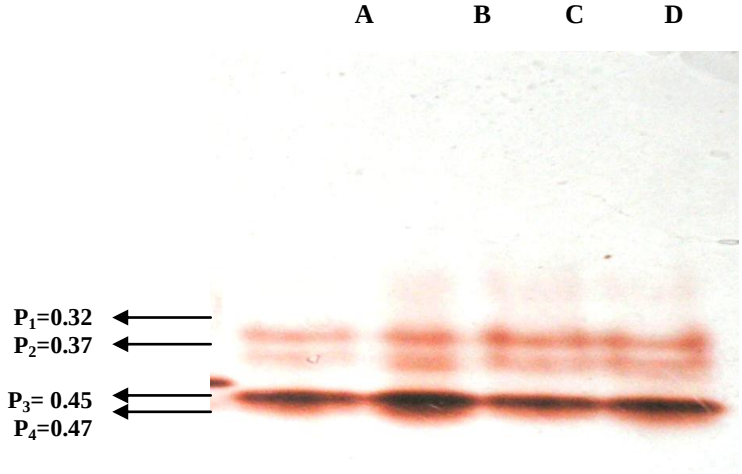


شکل ۲. تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی مایه‌کوبی شده با *P. fluorescens* CHA0 و *T. harzianum* BI علیه نماتد مولد گره ریشه *M. javanica*

اعداد مربوط به نمودار، میانگین سه تکرار و خطوط روی ستونها خطای استاندارد (±SE) می‌باشد. فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در ۵۱۵ نانومتر در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین تام نشان داده شده است.

الکتروفورز بومی (native PAGE) آیزوزایم‌های پراکسیداز

آیزوزایم‌های پراکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی با چهار تیمار باکتری+نماتد، قارچ+نماتد، باکتری+قارچ+نماتد، نماتد در ژل جداکننده به رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز و با Rfهای ۰/۳۲، ۰/۳۷، ۰/۴۵ و ۰/۴۷تشکیل شدند. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌کنید تیمار باکتری+ قارچ+نماتد دارای باندهای متراکم‌تری بوده، در حالی‌که باندها در تیمار نماتد تنها، دارای تراکم کمتری می‌باشند (شکل ۳).



شکل ۳. الکتروز بومی آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی مایه‌کوبی شده با باکتری *P. fluorescens* و قارچ *T. harzianum* و نماتد *M. javanica*

A: نماتد، B: باکتری+ قارچ + نماتد، C: قارچ + نماتد، D: باکتری+ نماتد

بحث

عوامل آنتاگونیست با مکانیسم‌های مختلفی موجب محدودیت رشد و بیماریزایی عوامل بیماریزای گیاهی می‌شوند. به عنوان مثال قارچ *T. harzianum* با ایجاد رقابت، خواص مایکوپارازیتیسمی و تولید آنزیم‌ها و ترکیبات سمی با عوامل بیماریزا مقابله می‌کند. این قارچ به طور اختصاصی در مقابل نماتدها دارای مکانیسم‌های، ایجاد ترکیبات ضد نماتدی و اثر مستقیم روی لاروهای سن دو و تخم نماتد و همچنین با کاهش میزان جذب نماتدها توسط ریشه، نفوذ آنها را محدود کرده و علاوه بر این با القای مکانیسم دفاعی گیاه در مقابل حمله نماتد موجب محدودیت بیماریزایی آن می‌شود به طوری‌که می‌توان گفت مکانیسم‌های مختلف قارچ *T. harzianum* به جز رقابت بر علیه نماتدها مؤثر می‌باشد (Sharon *et al.* 2001).

در ایران نیز از قارچ تریکودرما در آزمایش‌های کنترل بیولوژیک نماتدهای پارازیت گیاهی استفاده شده است. مهدیخانی مقدم و همکاران به منظور کنترل بیولوژیک نماتدسیستی چغندرقند اثر ۱۰ جدایه از قارچ تریکودرما متعلق به گونه‌های *T. virens* و *T. harzianum* روی تخم و سیست نماتد در آزمایشگاه و گلخانه (خاک استریل و خاک مزرعه) مورد بررسی قرار دادند. در بین آنها دو جدایه *T. harzianum* BI و *T. virens* VM۱ به ترتیب با ۷۶/۱۸ و ۷۲/۵۵ درصد پارازیتیسم بهتر از جدایه‌های دیگر عمل کردند.

باکتری *P. fluorsences* نیز با مکانیسم‌هایی مانند ایجاد ترکیباتی سمی و کاهش ترشحات ریشه موجب محدودیت نماتد می‌شود، همچنین این باکتری با افزایش مکانیسم دفاعی گیاه و القای مقاومت سیستمیک در گیاه موجب بازدارندگی نماتد می‌شود (Siddiqui *et al.* 2001, Sikora and Hoffmann-Hergarten 1993).

نتایج آزمایش بررسی این دو آنتاگونیست در شرایط گلخانه روی گیاه گوجه‌فرنگی نشان داد که تیمارهای قارچ تنها و باکتری+قارچ بر علیه نماتد به میزان معنی‌داری موجب کاهش فاکتورهای بیماریزایی و فاکتورهای تولید توده تخم و تعداد تخم در هر توده تخم گردید. با توجه به عدم اختلاف معنی‌دار بین این دو تیمار، استفاده همزمان این دو آنتاگونیست در محیط خاک موجب افزایش راندمان کنترل نماتد گردید. تحقیقات انجام گرفته توسط می یرو و همکاران نشان داد که اثر تلفیقی قارچ *T. virens* و باکتری *Burkholderia cepacia* بر علیه نماتدهای مولد گره ریشه *M. incognita* مؤثر نبوده و هر کدام به تنهایی اثر کنترل‌کنندگی مؤثرتری روی نماتد مولد گره ریشه دارند (Meyer *et al.* 2001). فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی با چهار تیمار مختلف مورد سنجش قرار گرفت که شامل نماتد تنها، قارچ + نماتد، باکتری + نماتد و قارچ + باکتری + نماتد بود. از نتایج آزمایش چنین استنباط می‌شود که فعالیت آنزیم پراکسیداز از روز اول بعد از مایه‌کوبی نماتد شروع شده و در روز چهارم به حداکثر فعالیت خود رسیده و سپس در روزهای بعد به تدریج کاهش یافته که این کاهش در شاهد به شدت و در تیمارهای دیگر خیلی به کندی صورت گرفت که دلیلی بر پایداری اثر القای مقاومت توسط آنتاگونیست‌ها می‌باشد که باعث فعال بودن مکانیسم‌های دفاعی و کاهش تدریجی فعالیت آنزیم در داخل بافت گیاه شده است که در مقاومت گیاه علیه نماتد مولد گره ریشه مؤثر است. در مقایسه بین تیمارها در ارتباط با فعالیت این آنزیم مشخص شد که دو تیمار باکتری + نماتد و باکتری + قارچ + نماتد در القای این آنزیم در بالاترین سطح فعالیت و بدون اختلاف معنی‌دار با هم در گیاه گوجه‌فرنگی بر علیه نماتد مولد گره ریشه القا شدند. همچنین فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در روز اول بعد از مایه‌کوبی نماتد بدون اختلاف معنی‌داری بین تیمارها افزایش یافت و در روز چهارم به اوج خود رسید که در بین تیمارها، تیمار باکتری + نماتد در روز چهارم بالاترین سطح فعالیت آنزیم را به خود اختصاص داد و در روز پنجم آنزیم در تیمار باکتری+ قارچ + نماتد به افزایش فعالیت خود ادامه داد، و در سطح بالاتری نسبت به تیمارهای دیگر قرار گرفت. در حالی که تیمار باکتری + نماتد دچار کاهش شدید فعالیت شد و در روزهای بعد فعالیت آنزیم در همه تیمارها کاهش تدریجی نشان داد. با توجه به نتایج به دست آمده از تغییرات فعالیت دو آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در این آزمایش می‌توان گفت که نماتد بعد از رسیدن به ریشه و نفوذ به داخل بافت ریشه، طبیعتا باعث زخمی شدن ریشه می‌گردد و با حرکت بین سلولی خود در بافت ریشه خود را به مکان تغذیه می‌رساند. این نفوذ و حرکت بیمارگر به دلیل اینکه بین سلولی بوده و باعث از بین بردن سلول‌ها در مسیر خود نشده، باعث القای کمتر متابولیت های دفاعی در میزبان می‌گردد. با ورود نماتد به داخل گیاه ترشحاتی توسط نماتد تولید می‌شود که روی واکنش‌های بیوشیمیایی اثر گذاشته و سبب خاموش شدن بعضی واکنش‌های بیوشیمیایی و بالطبع کاهش سنتز ترکیبات و آنزیم‌های دفاعی را به همراه دارد (Windham *et al.* 1989). بنابراین در تیمار نماتد تنها میزان القای آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز نسبت به تیمارهای تلقیح شده با باکتری به طور معنی‌داری کمتر می‌باشد. در حالی‌که دو آنتاگونیست باعث افزایش القا و سنتز پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز به میزان زیادی می‌شود. زاکو و همکاران ثابت کردند که آنزیم پراکسیداز به عنوان یک القا شونده سیستمیکی و به عنوان نشانگری برای القای مقاومت در گیاه برای ایجاد cross-link و محکم کردن دیواره سلولی ضروری می‌باشد (Zacheo *et al.* 1993). همچنین ریتز و همکاران مکانیسم‌های مقاومت ایجاد شده توسط Rhizobium استرین G12 برعلیه نماتد مولد سیست *Globodera pallida* در سیب‌زمینی را بررسی و ثابت کردند که واکنش مقاومت اسلحه‌ای برای استرین G12 بر علیه نماتد مولد سیست است که این کار را با بالا بردن PR پروتئین‌هایی مثل کیتیناز و گلوکاناز در گیاه انجام می‌دهد (Ritze *et al.* 2000). بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق مشخص شد که کاربرد توام این دو آنتاگونیست موجب بالا بردن راندمان کنترل بیولوژیک و همچنین افزایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز علیه نماتد مولد گره گردید. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات بعدی روش‌های مختلف کاربرد تلفیقی این دو آنتاگونیست علیه نماتد مولد گره ریشه به ویژه از نظر زمان و مکان استفاده از آنها مورد آزمایش قرار گیرند.

REFERENCES

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization the principle of protein–dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Gorlach J, Volrath S, Knoauf-Better G, Hgngy G, Beckhove U, Kogel K, Oostendort M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1996) Benzothiadiazole, novel class inducers of systemic acquired resistance, activated gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell 8: 629-643.

Hussay RS, Barker KR (1973) Comparison of methods of collecting inoculate of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57: 1025-1028.

Ibrahim SK (1991) Peroxidase isoenzymes from *Meloidogyne* spp. cultured of different hosts. Revue de Nématologie 143: 335-344.

Jepson SB (1987) Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). Wallingford UK, C.A.B. Interactional. 256pp.

Kosuge T (1969) The role of photonics in host response to infection. Annual Review of Phytopathology 7: 195-222.

Ku HS, Yang SF, Pratt HK (1970) Ethylene production and peroxidase activity during tomato fruit ripening. Plant Cell Physiology (Tokyo) 11: 241-246.

Laemmli UK (1976) Cleavage of structural proteins during the assembly of the bead of bacteriophage. Nature 227: 680-685.

Lyr H (1965) On the toxicity of oxidized polyphones. Journal of Phytopathology 52: 229-240.

Mader M, Fussl R (1982) Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. Plant Physiology 70: 1132-1134.

Mahdikhani Moghadam E, Rouhani H, Flahi M (2009) Biological control of sugar beet cyst forming nematode with trichoderma under in vitro and green house condition. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 13(48): 301-312).

Maleki Ziarati H, Roustaee A, Sahebani N, Etebarian HR, Aminian H (2009) Study of biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Trube) chitwood, in tomato by *Trichoderma harzianum* Rifai in greenhouse and quantitative changes of phenolic compounds in plant. Seed and Plant Production Journal 25: 259-272. (In Persian).

Meyer SLF, Roberts DP, Chitwood DJ, Carta LK, Lumsden RD, Mao W (2001) Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens* alone and in combination, against *M. incognita* on bell pepper. Nematropica 31: 75-86.

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.

Reuveni R (1995) Biochemical marker for disease resistance, In: Singh RP and Singh US (ed), Molecular Methods in Plant Pathology. CRC Press. Boca Raton. FL. pp. 99-144.

Ritze M, Rudolph K, Schroder I, Hoffmann-Hergarten S, Hallmann J, Sikora RA (2000) Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. Applied and Environmental Microbiology 66: 3515-3518.

Sasser JN (1989) Plant parasitic nematodes: the farmer shidden enemy. A cooperative publication of the department of plant pathology and consortium for International. 115 pp.

Schippers B (1992) Prospects for management of natural suppressiveness to control soil borne pathogens, In: Tjamos EC, Papaviza GC, Cook RJ (ed.), Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the Future Plenum Press, New York, NY, USA. pp. 21-34.

Sharon E, Bar-Eyal M, Chet I, Herrera-Estrella A, Keleifed O, Spiegel Y (2001) Biological control of the root –knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 91: 687-693.

Siddiqui IA, Ehteshamul-Haque S, Shaukat SS (2001) Use of rhizobacteria in the control of root rot-root knot disease complex of mungbean. Journal of Phytopathology 149: 337-346.

Siddiqui IA, Shaukat SS (2004) *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds in vitro and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. Letters in Applied Microbiology 38: 169-175.

Siddiqui IA, Shaukat SS (2003) Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root –infection fungi in tomato .Phytopathology 151: 215-222.

Sikora RA, Hoffmann-Hergarten S (1993) Biological control of plant-parasitic nematodes with plant-health promoting rhizobacteria, in pest management, In: lumsden Redland Vaughn JL(ed), Biologically based technologies, proceeding of Beltsville symposium XVIII, American Chemical Society, Washington. Pp. 166-172.

Thompson DC (1996) Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer pateh symptoms in Kentucky blue grass. Plant Disease 80: 850-862.

Van-Loon L, Bakker PA (2005) Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. PGPR: Biocontrol and Biofertilization 11: 39-66.

Van-Loon L, Bakker PA, Pieterse CM (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36: 453-483.

Williamson VM, Hussay RS (1996) Nematode pathogenesis and resistance in plant. The Plant Cell 8: 1735-1745.

Windham GL, Windham MT, Williams WP (1989) Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. Plant Disease 73: 493-500.

Wojtaszek P (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense response. Acta Physiologiae Plantarum 19: 581-589.

Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H_2O_2. Plant Physiology 115: 1405-1412.

Zacheo G, Oriando C, Bleve T (1993) Characterization of anionic peroxidase in tomato isolines infected by *Meloidogyne incognita*. Nematology 25: 249-256.