فصلنامه ی تحقیقات بیماری های گیاهی
سال اول، شماره‌ی چهارم، زمستان ۱۳۹۲
صص ۱۲-۱

مطالعه‌ی اثر قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* BI بر القای پاسخ دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی علیه نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica*

فاطمه ناصری نسب*[۱]، نوازالله صاحبانی[۲]، حسن رضا اعتباریان[۳]

تاریخ دریافت:۹۲/٤/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/٤

چکیده

در این بررسی، فعالیت بیوکنترلی جدایه‌ی *Trichoderma harzianum* BI علیه *Meloidogyne javanica* و توانایی آن در القاء سیستم دفاعی در گیاه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y در آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. ریشه‌ی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله‌ی ٦ برگی توسط سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* BI با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال سن دو نماتد به ازاء هر گیاه مایه‌زنی گردید. میزان فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و میزان فنل کل در روزهای اول تا هشتم بعد از مایه‌زنی نماتد، اندازه‌گیری شد. این جدایه، علاوه بر کاهش شدت بیماری و تعداد گال در گلخانه، افزایش درصد مرگ و میر لاروها و کاهش درصد تفریخ تخم‌ها در آزمایشگاه، فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز را افزایش داد که این افزایش در روز چهارم بعد از مایه‌زنی نماتد به حداکثر میزان خود رسید. بیشترین میزان فنل کل در گیاه آلوده‌ی تیمار شده با جدایه‌ی *T. harzianum* BI در روز پنجم بعد از مایه‌زنی مشاهده شد. نتایج تغییرات در میزان فعالیت آنزیم‌ها و همچنین فنل کل طی روزهای مختلف پس از مایه‌زنی، نشان داد که امکان تحریک مقاومت القایی در گیاه گوجه فرنگی توسط *T. harzianum* BI علیه *M. javanica* وجود دارد.

واژه های کلیدی: کنترل بیولوژیک، ترکیبات فنلی، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز.

[۱]- کارشناس ارشد، گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۲]- استادیار گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۳]- استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول مقاله: fnaserinasab63@gmail.com

مقدمه

در دهه‌های اخیر کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی با استفاده از میکروارگانیزم‌ها، توجه بسیاری از محققین را به‌خود جلب نموده است. تحقیقات نشان داده که معرفی آنتاگونیست‌های مختلف از جمله تریکودرما به محیط خاک و ریزوسفر، می‌تواند از خسارت بیماری تا زیر آستانه‌ی زیان اقتصادی بکاهد(اعتباریان و همکاران،۲۰۰۵). موفقیت در کنترل بیماری‌های گیاهی همراه با سلامت محیط زیست، توانسته کنترل بیولوژیک را یکی از مقبول‌ترین روش‌های کنترل بیماری‌ها در مبارزه‌ی تلفیقی بیماری‌های گیاهی معرفی نماید. پدیده‌ی بیوکنترل دارای مکانیزم‌های مختلفی می‌باشد که به‌طور مفصل توسط دانشمندان مورد بررسی قرار گرفته است. این مکانیزم‌ها شامل پدیده‌ی آنتی بیوز، رقابت برای فضا، مواد غذایی و به‌خصوص غیرقابل جذب کردن آهن از طریق تولید سیدروفور، تولید آنزیم‌های لیزکننده و پارازیتیسم، افزایش رشد گیاه و القاء مقاومت می‌باشند (Sikora *et al*., 2003). عوامل بیوکنترل قارچی در دو دهه‌ی اخیر اهمیت زیادی در کنترل بیماری‌های گیاهی پیدا کرده‌اند (Janisiewicz *et al*., 2001). آنتاگونیست‌های قارچی مانند *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) به‌طور چشمگیری برای کنترل بسیاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله بیماری‌های شبه گونه‌های *Fusarium* و *Rhizoctonia* به‌کار برده می‌شوند. این قارچ از عوامل مفیدی است که می‌تواند با پارازیته کردن تخم، لارو و ماده‌ی بالغ نماتد *M. javanica* (Treub) جمعیت این نماتد را کاهش دهد. این قارچ همچنین قادر به تحریک القاء مقاومت در مقابل نماتدها و کاهش خسارت می‌باشد(Van Loon and Vanstrien, 1999). یکی از مکانیسم‌های مهم در عمل بیوکنترل، تولید آنتی‌بیوتیک و القاء مقاومت است. بسیاری از آنتاگونیست‌ها سبب القاء مقاومت در گیاه و تغییر در میزان آنزیم‌هایی نظیر سوپر اکساید دیس موتاز، کاتالاز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و ترکیبات دیگری نظیر فنل در گیاه می‌شوند(Salehpour *et al*., 2005). ترکیبات فنلی به‌همراه سایر آنزیم‌ها و مواد دفاعی نظیر پراکسیدازها و پلی فنل اکسیداز، در مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی به‌خصوص نماتدها به‌صورت سیستمیک دخالت دارند و در مقدار و میزان این مواد در میزبان تغییراتی پدید می‌آید (Ogallo and McClure, 1996). کلونیزه شدن سطح ریشه‌ی گیاه توسط آنتاگونیست‌ها و به‌خصوص *Trichoderma* می‌تواند با ایجاد مقاومت القایی سیستمیک منجر به کاهش حمله‌ی مستقیم عوامل بیماری‌زا شود(Kloepper *et al*., 1992). هدف از این تحقیق، بررسی کارایی قارچ *T. harzianum* BI برای کنترل نماتد *M. javanica* عامل گره ریشه‌ی گوجه فرنگی در شرایط گلخانه‌ای و بررسی میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و همچنین میزان ترکیبات فنل کل گیاه گوجه فرنگی رقم Early Urbana Y در اثر مایه‌زنی با نماتد و جدایه‌ی *T. harzianum* BI می‌باشد.

مواد و روش ها

عامل بیماری

ریشه‌های آلوده به نماتد مولد گره ریشه از گلخانه‌های خیار و گوجه فرنگی منطقه‌ی پیشوای ورامین جمع آوری شد. تکثیر نماتد با روش Single egg mass روی رقم ارلی اوربانا Y انجام و شناسایی گونه‌ی نماتد مطابق کلید جپسون صورت گرفت (Jepson, 1987). پس از چندین دوره تکثیر متوالی نماتد، جمعیت کافی نماتد خالص *M. javanica* ایجاد شد. استخراج تخم و لارو سن دو با استفاده از روش *هوسای و بارکر* (Hussay and Barker, 1973) انجام شد.

آنتاگونیست

جدایه‌ی BI *T. harzianum* از آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان به‌صورت خالص تهیه و پس از تک اسپور کردن روی محیط PDA تکثیر شد (Booth, 1997). پس از تهیه‌ی سوسپانسیون اسپور در آب مقطر، با استفاده از لام گلبول شمار غلظت موثر 10^6 اسپور در میلی‌لیتر قارچ جهت استفاده در آزمایشات تهیه شد (Maleki, 2008).

آزمایش اثر مستقیم قارچ BI *T. harzianum* روی تفریخ تخم نماتد *M.javanica* در شرایط آزمایشگاه

در این آزمایش، پلاک‌های ۵ میلی‌متری از کشت ۷ روزه‌ی قارچ BI *T. harzianum* در وسط ظروف پتری حاوی آب آگار دو درصد قرار داده شد و پس از پوشیده شدن سطح پتری با قارچ (پس از ۱۰ روز)، یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی جمعیت ٤٠-٥٠ تخم نماتد استریل شده توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به تشتک های پتری اضافه شد. به پتری‌های شاهد نیز که فاقد قارچ بودند، به همان میزان سوسپانسیون تخم اضافه شد. سپس پتری‌ها به مدت ١٤ روز در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، نگهداری شد و بعد از گذشت این زمان تعداد تخم‌های تفریخ شده در تیمار و شاهد شمارش شد. این آزمایش با ٦ تکرار و در قالب طرح کاملا" تصادفی انجام شد (Irfan *et al*., 2005).

آزمایش اثر مستقیم BI *T. harzianum* روی مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه

در این آزمایش، از کشت ۱۰ روزه‌ی قارچ روی محیط آب آگار استفاده شد و سوسپانسیونی از لاروهای تازه‌ی تفریخ شده و استریل نماتد با جمعیت حدود ۲۰-۳۰ لارو در یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه و به تشتک‌های پتری اضافه و سپس در ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد و به‌ترتیب پس از گذشت زمان‌های ٤٨ و ٩٦ ساعت میزان مرگ و میر لارو ها در پتری‌های تیمار و شاهد شمارش شد. پتری‌های فاقد قارچ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. این آزمایش با ٦ تکرار و در قالب طرح کاملا" تصادفی انجام شد (Irfan *et al*., 2005).

آزمایش اثر BI *T. harzianum* بر میزان بیماری نماتد مولد گره ریشه در شرایط گلخانه

ابتدا بذور گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y با وایتکس۱۰ درصد(حاوی ۵ درصد هیپوکلریت سدیم و به مدت یک دقیقه) ضدعفونی سطحی شد و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر سترون در داخل گلدان‌های حاوی خاک الک شده (شامل هوموس، خاک مزرعه، ماسه با نسبت ۱:۱:۲ و پاستوریزه شده در دمای ۸۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو) کشت گردید. در این آزمایش، گیاهچه‌های گوجه فرنگی در مرحله‌ی ٦ برگی توسط ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ *T. harzianum* BI با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال نماتد به ازاء هر گیاه، مایه‌زنی شدند. تیمارها شامل: ۱) گیاه سالم، ۲) گیاه مایه‌زنی شده با نماتد، ۳) گیاه مایه زنی شده با نماتد و عامل آنتاگونیست به روش خیساندن ریشه (Root dip) و ٤) گیاه مایه‌زنی شده با نماتد و عامل آنتاگونیست به روش خیساندن خاک (Soil drench) بودند. گیاهچه‌ها پس از مایه‌زنی به مدت ٤٥ روز در شرایط گلخانه(دمای ۲۸-٢٤ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۸ ساعت تاریکی و ١٦ ساعت روشنایی) نگهداری شد و پس از آن ریشه‌ها برای بررسی بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ٦ تکرار انجام شد.

ارزیابی تغییرات برخی ترکیبات دفاعی در ریشه گوجه فرنگی مایه زنی شده با نماتد و قارچ BI *T. harzianum*

در این آزمایش نیز همانند آزمایش قبل، گیاهچه‌های گوجه فرنگی تهیه و در مرحله‌ی ٦ برگی مایه‌زنی گردیدند. به ازاء هر گیاهچه، تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال سن دو نماتد و ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر استریل استفاده شد. تیمارها شامل: ۱) گیاه سالم مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل، ۲) گیاه مایه‌زنی شده با عامل آنتاگونیست، ۳) گیاه مایه‌زنی شده با نماتد و ٤) گیاه مایه‌زنی شده با نماتد و آنتاگونیست، بودند. برای هر تیمار، ٤ تکرار در

نظر گرفته شد. آزمایش‌ها به‌صورت طرح فاکتوریل ۵ × ۸ که فاکتور A شامل ۵ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل ۸ زمان نمونه‌برداری۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، ۷ و ۸ روز بعد از مایه‌زنی با نماتد بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز و نیز تغییرات میزان فنل کل در روزهای اول تا هشتم ارزیابی شد.

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره و سنجش پروتئین استاندارد

به‌منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره‌ی مورد آزمایش و تهیه‌ی منحنی پروتئین استاندارد، جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

استخراج پروتئین از بافت گیاه

با استفاده از ازت مایع، نیم گرم از بافت ریشه در هاون چینی کوبیده و له شد. یک میلی‌لیتر بافر نمونه‌ی فسفات سدیم ۰/۱ مول با pH=٦ به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و توسط میکروسانتریفوژ در ۱۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۲۰ دقیقه در ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایه‌ی رویی برای انجام آزمایش‌ها جدا شده و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (Reuveni, 1995).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)

ارزیابی پرکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Milton Roy Company- Unterfoehring –Germany به‌صورت زیر انجام شد:

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای ٤۰ میکروگرم پروتئین باشد، ۲۰ میکرولیتر گوئیکول و مقدار کافی بافر سیترات- فسفات ۲۵ میلی مولار با pH=٥/٤ را در یک لوله آزمایش ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج ٤۷٥ نانومتر صفر گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد به این مخلوط اضافه شد و سریعاً تغییرات جذب نور به فواصل ۱۰ ثانیه، به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (ΔOD/Min/mg protein) (Reuveni, 1995).

تهیه‌ی عصاره‌ی آنزیمی پلی فنل اکسیداز و ارزیابی میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز(Polyphenol oxidase)

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای٤۰ میلی‌گرم پروتئین باشد، ۲۰ میکرولیتر محلول پرولین و مقدار کافی بافر سیترات- فسفات ۲۵ میلی مول pH=٦/٤ در یک لوله آزمایش کوچک کاملاً مخلوط شد و این مخلوط توسط ورتکس به مدت دو دقیقه هوادهی و سپس دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط صفر گردید. سپس بلافاصله ٤۰ میکرولیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی مول به مخلوط واکنش افزوده، سریع مخلوط نموده و بلافاصله تغییرات جذب نور در طول موج ٥۱٥ نانومتر به‌مدت یک دقیقه با فاصله‌ی ۱۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات جذب نور در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد(Mohammadi and Kazemi, 2002).

ارزیابی میزان فنل کل و تهیه‌ی محلول پایه غلظت‌های فنل استاندارد

۱۰ میلی‌گرم از اسیدکافئیک (Fluka, Germany) را در پنج میلی‌لیتر متانول خالص حل کرده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ٥۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس مقادیر ۰/٥، ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، ۸ میلی‌لیتر از این محلول، جداگانه در لوله‌های آزمایش ریخته و حجم هر لوله با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به این ترتیب هر ۰/٥ میلی‌لیتر از محلول در هریک از لوله‌ها به‌ترتیب۸۰، ٦۰، ٥۰، ٤۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰، ٥ میکروگرم اسید کافئیک را داراست. برای صفر کردن دستگاه از محلول فاقد اسید کافئیک استفاده شد (Seevers *et al*., 1971).

تهیه‌ی منحنی استاندارد فنل

مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف تهیه شده‌ی اسیدکافئیک را در ۷ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. سه دقیقه بعد از افزودن معرف فولین، یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به آن اضافه و حجم نهایی محلول با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از گذشت یک ساعت، میزان جذب نور در λmax =۷۲۵nm اندازه‌گیری شد. این مراحل به‌طور جداگانه برای هرکدام از غلظت‌های مختلف اسیدکافئیک انجام شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر، از محلولی که فاقد اسیدکافئیک بود و به همان میزان آب مقطر اضافه شده بود، استفاده شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین فنل کل عصاره‌ی به‌دست آمده در آزمایش‌ها، همانند روش تهیه‌ی منحنی استاندارد عمل شد. تنها تفاوت در این بود که از ۰/۵ میلی لیتر عصاره استخراج شده گیاه استفاده شد (Seevers *et al*., 1971).

استخراج فنل گیاه

جهت استخراج ترکیبات فنلی، یک گرم بافت ریشه داخل هاون چینی و درون نیتروژن مایع عصاره‌گیری شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول۸۰ درصد به آن اضافه گردید، مخلوط حاصله از دو لایه پارچه‌ی ململ عبور داده و در شیشه‌های مک‌کارتنی نگهداری شد. در پایان، عصاره‌ی حاصل در g ٤۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی داخل لوله‌ها حاوی ترکیبات فنلی است که از رسوب بافتی جدا شده و جهت آزمایشات بعدی در لوله‌های درب‌دار۱۰ میلی‌لیتری در دمای۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (Mohammadi and Kazemi, 2002).

نتایج

فعالیت بیوکنترل *T. harzianum* BI علیه *M. javanica* در آزمایشگاه و گلخانه

در آزمایش اثر مستقیم قارچ *T. harzianum* BI روی تفریخ تخم نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه، درصد تخم‌های تفریخ نشده در اثر تیمار قارچ تریکودرما ۵۸٪ بود که این میزان در مقایسه با شاهد ٢٦٪ بیشتر بود. در آزمایش اثر مستقیم *T. harzianum* BI روی مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه تریکودرما توانست تعداد لاروها را کاهش دهد. در این آزمایش، درصد مرگ ومیر لاروها بعد از ٤٨ و ٩٦ ساعت اندازه‌گیری شد. درصد مرگ و میر لاروها بعد از ٩٦ ساعت توسط تریکودرما ٦٦٪ در مقایسه با شاهد ۲۳ درصدی بود(جدول۱). در آزمایش اثر *T. harzianum* BI روی بیماری در شرایط گلخانه نیز قارچ آنتاگونیست، توانست تعداد گال‌ها و تعداد کیسه‌ی تخم (Egg mass) را به‌طور معنی‌دار در مقایسه با شاهد کاهش دهد. وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی نیز اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

جدول ۱- درصد مرگ و میر لاروها توسط قارچ تریکودرما در آزمایشگاه.

تیمار	درصد لاروهای مرده بعد از ٤٨ ساعت	درصد لاروهای مرده بعد از ٩٦ ساعت
C	۱۱/۲b	۲۳/۹۱b
T	٥٦/۲۱a	٦٦/٤a

هر تیمار دارای ٦ تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با هم اختلاف معنی‌دار دارند (آزمون دانکن ($p<$ ۰/۰۵). C: شاهد (فاقد آنتاگونیست)، T: تیمار با *T. harzianum* BI

جدول۲- اثر *T. harzianum* BI بر تفریخ تخم های *M. javanica* در آزمایشگاه

	درصد تخم های تفریخ نشده پس از ١٤ روز
C	٢١ b
T	٨٤a

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، با هم اختلاف معنی‌دار دارند (آزمون دانکن ($p< ٠/٠٥$).C: شاهد، T: تیمار با *T. harzianum* BI.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

در روز اول، در گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI از نظر میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. گیاه آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست، در روز سوم در مقایسه با تیمارهای گیاه آلوده به نماتد، گیاه سالم و همین طور نسبت به گیاه سالم تیمار شده با آنتاگونیست، تنها دارای اختلاف معنی-داری بود. در روز چهارم، بیشترین میزان فعالیت آنزیم همانند روز قبل در گیاه آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست دیده شد؛ در این روز بیشترین مقدار در فعالیت آنزیم در بین روزهای نمونه برداری مشاهده شد. در روز پنجم، فعالیت آنزیم در کلیه‌ی تیمارها به‌جز تیمار گیاه سالم کاهش پیدا کرد که البته این کاهش در تیمار گیاه آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست نسبت به روز قبل معنی‌دار نبود. در روز ششم، فعالیت آنزیم در کلیه‌ی تیمارها نسبت به روز پنجم کمتر شد. در روز هفتم و هشتم نیز این روند کاهشی مانند روز ششم ادامه پیدا کرد (جدول ۳).

جدول۳- اثر *T. harzianum* BI روی بیماری در شرایط گلخانه بر روی تعداد گال، تعداد egg mass، وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی.

تیمار	تعداد گالهای هر گیاه	تعداد egg mass هر گیاه	وزن تر ریشه(گرم)	وزن تر اندام های هوایی(گرم)
H	٠c	٠c	٩/٢a	٤٠/٥a
N	٢٧٣a	١٥٦/٥a	٨/٦a	٣٢/١c
N+T(Rd)	٤٦b	٣٣/٥b	٥/٢c	٢٩/٤cd
N+T(Sd)	٤٢b	٣٤/١٧b	٧/٣b	٣٨/٦b

تجزیه‌ی آماری داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد و میانگین داده‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن($p<0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت. هر تیمار دارای ٦ تکرار بوده و میانگین هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با هم اختلاف معنی‌دار دارند(آزمون دانکن($p< ٠/٠٥$). T: *T. harzianum* BI و N : *M. javanica* ، H: گیاه سالم، Rd:روش خیساندن ریشه و Sd: روش خیساندن خاک می باشند.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز

در روز اول گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست *T. harzianum BI* از نظر میزان فعالیت آنزیم نسبت به گیاه سالم و گیاه آلوده به نماتد افزایش معنی‌داری نشان دادند. ولی در مقایسه با گیاه گوجه فرنگی تیمار شده با آنتاگونیست تنها اختلاف معنی‌داری نداشت و حتی از نظر عددی نیز مقدار آن کمتر بود؛ فعالیت آنزیم در روز دوم در گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست، گیاه آلوده به نماتد و همچنین گیاه گوجه فرنگی تیمار شده با آنتاگونیست تنها، در مقایسه با گیاه سالم افزایش معنی‌داری نشان داد. در این روز، گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست، تفاوت معنی‌داری با

سایر تیمارها داشت. در روز چهارم، گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست، بیشترین مقدار فعالیت را داشت و تفاوت معنی‌داری با گیاه آلوده به نماتد، گیاه تیمار شده با آنتاگونیست تنها و گیاه سالم داشت. در این روز، بیشترین فعالیت آنزیم در بین روزهای نمونه‌برداری هم مورد مشاهده قرار گرفت. در روز پنجم، فعالیت آنزیم در کلیه‌ی تیمارها کاهش پیدا کرد که البته این کاهش در همه‌ی تیمارها به‌جز گیاه سالم نسبت به روز قبل معنی‌دار بود. در روز ششم نیز فعالیت آنزیم در کلیه‌ی تیمارها نسبت به روز پنجم کمتر شد. در روز هفتم و هشتم نیز بیشترین میزان فعالیت آنزیم در گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست بود (جدول ٤).

جدول ٤- مقایسه‌ی میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز(تغییرات جذب در ٥١٥ نانومتر در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)در ریشه‌ی گیاه گوجه‌فرنگی در اثر مایه‌زنی با نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* و قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI

تیمار	روز های بعد از مایه زنی نماتد							
	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨
T+N	e٢/٥B	d٣/٤٦B	c ٥/١A	a٦/٨٤A	ab٦/٣٥A	b٥/٧٧A	c٤/٨A	d٣/٤١A
T	e٢/٣٨B	c٣/٥٩B	b ٤/٤٥B	a٥/٠١B	ab٤/٩٦B	ab٤/٩٨B	c٣/٦٦B	d٣/٢٩A
N	d٣/٠١ AB	b٣/٨٢AB	b٣/٩٥C	a٤/٨٤B	b٤/٠٢C	c٣/٦٧C	cd٣/٣٢B	d٣/١٧A
H	bc٢/٤٧B	abc٢/٩B	a٣/٣٢D	abc٢/٧C	ab٣/٠٦D	abc٢/٨D	abc٢/٦٥C	c٢/٤٢B

هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف بزرگ و میانگین هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف کوچک مشخص شده اند. تفاوت ها با آزمون دانکن ($P\leq0.05$) ارائه شده اند.T قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI و N نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* و H: گیاه سالم (شاهد) می باشند.

بررسی میزان تغییرات مقدار فنل کل:

میزان ترکیبات فنلی در گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست *T. harzianum* BI از روز اول تا پنجم افزایش یافت؛ ولی به تدریج از روز ششم رو به کاهش گذاشت و این کاهش تا روز هشتم که آخرین روز نمونه برداری بود، ادامه داشت. در روز ششم اختلاف معنی‌دار بین میزان ترکیبات فنلی گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست و تیمار آنتاگونیست تنها وجود نداشت. در روز پنجم تیمار گیاه آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت و بیشترین مقدار فنل در بین تیمارها در این روز مشاهده شد. در کلیه‌ی روزهای نمونه برداری، کمترین میزان فنل کل مربوط به تیمار گیاه سالم بود (جدول ٥).

جدول ۵- مقایسه‌ی میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (ΔOD 475/min/mg) در ریشه‌ی گیاه گوجه فرنگی در اثر مایه‌زنی با نماتد مولد گره ریشه‌ی *M. javanica*، قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI

تیمار	روز های بعد از مایه زنی نماتد							
	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
T+N	f۳۸/۱۲A	e٥۹/٦۸A	b ۸۸A	۱۰٦/۰۷A	c۸۰/۳۸A	d٦۸/۰۲A	e٥٦/٤A	f٤۰/۳۷ A
T	f۳۹/۱A	e٤۷B	e ٦۱B	a۹٥/۲۲B	b٦۸/۲۱B	c٦۰/۱AB	d٥۰/۱۳B	g۳٥/۱۲B
N	f۲٥/۱ C	d٤۰/۲C	c٥٦/۲٥C	a۹۸/۲۳B	b۷۹/٤٦A	c٥٦/٤B	d٤۱/۲٥C	e۳۳/۱۲B
H	d۲٥/٥ C	c۲۷D	c۲۸/٦٦D	a۳۳/٥۳C	a۳۳/۰۹C	b۳۰/٦۳C	c۲۷/٦D	a۳۲/۷٤B

هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین‌هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند، با حروف مختلف بزرگ و میانگین‌هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند، با حروف مختلف کوچک مشخص شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن($P\leq0.05$) ارائه شده‌اند. T قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI و N نماتد مولد گره ریشه‌ی *M. javanica* و H گیاه سالم (شاهد) می‌باشند.

جدول ٦- مقایسه‌ی میانگین تغییرات میزان ترکیبات فنل کل(میلی‌گرم در یک گرم بافت ریشه) در ریشه‌ی گیاه گوجه فرنگی در اثر مایه‌زنی با نماتد مولد گره ریشه‌ی *M. javanica* و قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI

تیمار	روز های بعد از مایه زنی نماتد							
	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
T+N	f۰/۳۸A	d۰/٥٤A	b۰/٦۸A	b ۰/۷۱A	a۰/۸۱A	c۰/٦B	cd۰/٥٦A	e۰/٤۹A
T	e۰/۳٦A	c۰/٥۱AB	a۰/٦٥A	a۰/٦٦B	a۰/٦۸B	b۰/٥۷B	c۰/٤۸B	d۰/٤۳B
N	c۰/٤۱ A	b۰/٤۸B	b۰/٤۹B	b۰/٥۱C	a۰/٦۲C	a۰/٦۷A	c۰/٤۰C	d۰/۳۳C
H	c۰/۳٤٥ A	bc۰/۳۸C	b۰/٤۰C	ab۰/٤۱D	a۰/٤٦C	bc۰/٤۰C	ab۰/٤۱C	c۰/۳٤٥C

هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین‌هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند، با حروف مختلف بزرگ و میانگین‌هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند، با حروف مختلف کوچک مشخص شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن($P\leq0.05$) ارائه شده اند. T قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI و N نماتد مولد گره ریشه‌ی *M. javanica* و H گیاه سالم (شاهد) می‌باشند.

بحث

نتایج آزمایش بیوکنترلی قارچ *T. harzianum* BI علیه نماتد *M. javanica* در آزمایشگاه، نشان داد که این آنتاگونیست توانایی پارازیته نمودن تخم نماتد و همچنین لاروهای سن دوم در محیط کشت را داراست که این توانایی، می‌تواند در اثر تولید عوامل آنتی‌بیوتیک و متابولیت‌های ثانویه و تولید برخی آنزیم‌های لیزکننده‌ی کوتیکول نماتدها مانند پروتئاز در مقابل لاروهای سن ۲ باشد(Khan and Saxena, 1997). با توجه به وجود کیتین در لایه‌های میانی پوسته‌ی تخم نماتد با ضخامت ۰/٤ میکرومتر، به نظر می‌رسد *T. harzianum BI* توسط تولید آنزیم کیتیناز اثر خود را بر بازدارندگی از تفریخ تخم‌های نماتد اعمال میکند(Brant *et al*., 2000). در کار مشابهی که توسط الفتاح و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد، متابولیت‌های خارج سلولی در آزمایش محیط کشت فیلتر شده‌ی تریکودرما، توانست تا ۳۰ درصد باعث مرگ و میر لارو سن دو نماتد شود (Al-Fattah *et al*., 2007). در آزمایش‌های گلخانه‌ای، عامل آنتاگونیست توانست تعداد گال و کیسه های تخم ایجاد شده بر روی ریشه‌ی گوجه فرنگی را هم به روش خیساندن ریشه (Root dip) و هم به روش خیساندن خاک (Soil drench)

کاهش دهد. با وجود معنی‌دار نبودن اختلاف، تعداد گال‌های ایجاد شده در تیمار با آنتاگونیست به روش Soil drench کمتر بود و نیز وضعیت وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی در این تیمار بهتر بود و با کاربرد قارچ به روش خیساندن ریشه اختلاف معنی‌دار داشت. به نظر می‌رسد چون در وضعیت خیساندن خاک آنتاگونیست محدوده‌ی وسیع‌تری از خاک اطراف ریشه را پوشش می‌دهد و دامنه‌ی فعالیت آن گسترده‌تر می‌باشد، می‌تواند اثر بیشتری بر بهبود رشد گیاه و جلوگیری از پیشروی نماتد بگذارد. همچنین احتمالا" در روش خیساندن ریشه با سوسپانسیون اسپور، طی مدتی که ریشه‌ی گیاه بیرون از خاک می‌ماند؛ گیاه دچار تنش شده و در نتیجه بر رشد گیاه اثر سوء داشته است. در کار مشابهی، جدایه‌ی Th از قارچ *T. harzianum* توانست تعداد گال‌ها را بر روی ریشه‌ی گوجه فرنگی کاهش دهد (Khattak *et al*., 2008). از نتایج آزمایش مربوط به فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز، چنین دریافت می‌شود که فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در گیاه آلوده‌ی تیمار شده با قارچ آنتاگونیست تریکودرما نسبت به سالم افزایش داشته است. ترکیبات فنلی ترکیبات ضد قارچی هستند و تجمع آنها در گیاهان تیمار شده به‌وسیله‌ی عوامل آنتاگونیست، می‌تواند دلیل کاهش حمله پاتوژن ها باشد (Mpiga *et al*., 1997). میزان فنل کل در بین ۸ روز نمونه برداری در تیمارها نسبت به شاهد سالم نیز افزایش داشته است. ارتباط بین افزایش آنزیم‌های دفاعی و مقاومت بیشتر به عوامل بیماری‌زا توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. در ارتباط میزبان و عامل بیماری‌زا وقتی که ارقام مقاوم و حساس باهم مقایسه می‌شوند، در بیشتر موارد سرعت تجمع ترکیبات فنلی بعد از ابتلا به بیماری در رقم مقاوم زیادتر از رقم حساس است و یک رابطه‌ی خطی مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و مقاومت گیاه وجود دارد (Goodman *et al*., 1986). چن و همکاران، افزایش آنزیم پراکسیداز در ریشه‌های خیار بعد از مایه‌زنی با باکتری سودوموناس را علیه قارچ *Pythium aphanidermatum* مورد مشاهده قرار دادند (Chen *et al*., 2000). تیمار بذور بادام زمینی با باکتری سودوموناس باعث تجمع سریع آنزیم‌های دفاعی مرتبط با مقاومت از قبیل کیتیناز، بتا ۱ و۳ گلوکاناز، پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز در بذور بادام زمینی در مقایسه با شاهد سالم می‌گردد (Kishore *et al*., 2006). عوامل بیوکنترل همراه با رشد سریع در محل ریشه، با بافت رابطه‌ی متقابل دارند و تغییرات بیوشیمیایی متفاوتی از قبیل افزایش فعالیت کیتیناز، بتا ۱و ۳ گلوکاناز، پراکسیداز و تشکیل سدهای ساختمانی و تجمع فیتوآلکسین ها را در زخم‌ها القاء می‌کنند (El Ghaouth *et al*., 1998). مهم‌ترین برتری عوامل بیوکنترلی که از مکانیزم القاء مقاومت بهره می‌برند، این است که مکانیزم‌های دیگر تنها در حضور آنتاگونیست فعال امکان‌پذیر است، در حالی‌که این نوع حفاظت وقتی جمعیت عامل آنتاگونیست در خاک به آستانه‌ی خاصی رسید مکانیزم‌های مقاومت گیاه میزبان القاء شده، حتی بعد از کاهش جمعیت آنتاگونیست نیز مقاومت ایجاد شده می‌تواند تا مدت طولانی دوام داشته باشد (Van Loon *et al*., 1998). از نتایج آزمایش مربوط به میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه گوجه فرنگی این‌طور برداشت می‌شود که نماتد نیز فعالیت آنزیم پراکسیداز را در گیاه گوجه فرنگی افزایش می‌دهد، از طرفی قارچ آنتاگونیست هم باعث افزایش فعالیت پراکسیداز می‌شود. در تمام روزهای نمونه‌برداری گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست نسبت به شاهد آلوده با نماتد افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز را نشان دادند، یعنی فعالیت آنزیم در گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست، بیشتر از شاهد آلوده است، می‌شود نتیجه گرفت که آنتاگونیست در همه‌ی روزها علاوه بر نماتد، باعث افزایش القاء آنزیم پراکسیداز در گیاه می‌گردد. همچنین میزان القاء ترکیبات دفاعی گیاه توسط نماتد، کمتر از القاء توسط عامل آنتاگونیست بوده است که می‌توان آن را به‌دلیل حرکت بین سلولی نماتد مولد گره ریشه و رفتار مسالمت آمیز آن با گیاه و به‌کارگیری مکانیسم‌های خاموش کننده‌ی پاسخ‌های دفاعی بیوشیمیایی گیاه بیان کرد. تجمع پراکسیدازها در سلول نقش مهمی در مستحکم سازی دیواره‌ی سلولی در طی تمایز سلولی و افزایش مقاومت به نفوذ عوامل بیمارگر دارد. از دیگر وظایف پراکسیدازها در مقاومت،

تولید رادیکال‌های آزاد، تولید لیگنین و تجمع ترکیبات فنلی است. این آنزیم در اثر تیمار گیاه با عوامل آنتاگونیست مانند تریکودرما افزایش پیدا می کند (Depinto and De Gara, 2004).

نتیجه گیری

نظر به کنترل موفق بیماری ریشه‌ی گره‌ی گوجه فرنگی در آزمایشگاه و گلخانه و همین طور القاء مکانیسم‌های دفاعی گیاه به‌وسیله‌ی این عامل آنتاگونیست، این قارچ می‌تواند به‌عنوان یک عامل بیوکنترل موفق در کنترل بیماری‌های نماتدی ریشه و به‌خصوص کنترل نماتد مولد گره ریشه به‌کار گرفته شود. همچنین با توجه به اینکه بسیاری از عوامل زراعی نظیر تناوب، افزایش مواد اصلاح کننده‌ی خاک، تغییرات اسیدیته‌ی محیط و تغییر بافت خاک و غیره به نفع آنتاگونیست‌ها، می‌تواند در استقرار آنتاگونیست‌ها موثر باشد و اثر آنها را افزایش یا کاهش دهد، بررسی اثر آنتاگونیست‌های مورد نظر در شرایط مزرعه‌ای و خاک غیراستریل برای شناسایی شرایط ایده‌آل در جهت بالا بردن کارایی عوامل بیوکنترل و روش‌های به‌کار گرفته شده ضروری می‌باشد.

References:

1. Al-Fattah A, Dababat A and Sikora A. 2007. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato. Jordan Journal Agricultural Sciences 3: 297–309.
2. Booth C. 1977. Fusarium Laboratory Guide to Identification of Major Species. Commonwealth Mycological Institue. Kew, England: CAB International. 55 p.
3. Bradford MM. 1967. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Journal of Analytical Biochemistry 72: 248–254.
4. Brants A, Brrown CR and Earir ED. 2000. *Trichoderma harzianum* endochitinase does not provide resistance to *Meloidogyne hapla* in tobacco. Journal of Nematology 32: 289–296.
5. Chen C, Belanger RR, Beha AN and Paullitz TC. 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.
6. De Pinto MC and DeGara L. 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. Journal of Experimental Botany 55: 2559–2569.
7. El-Ghaouth A, Wilson CL and Wisniewski M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Journal of Phytopathology 88: 282–291.
8. Etebarian HR, Sholberg P, Eastwell K, and Sayler R. 2005. Biological control of blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. Canadian Journal of Microbiology 51: 591–598.
9. Gong Y, Toivonen PMA, Lau OL and Wiersma PA. 2001. Antioxidant system level in Braeburn' apple is related to its browning disorder. Botanical Bulletin of Academia Sinica 42: 259–264.
10. Goodman RN, Kiraly Z and Wood KP. 1986. Biochemical and Physiological Aspects of Plant Disease. Second edition. USA: University of Missouri Press. 433 p.
11. Hussey RS and Barker KR. 1973. A Comparison of Methods of Collecting Inocula of *Meloidogyne* spp. Including a New Technique. Plant Disease Reporter 57: 1025–1028.
12. Irfan UD, Saifullah-Khan H and Khattak, B. 2005. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Trichoderma harzianum* and spent mushroom compost in tomato under field conditions. Pakistan Journal of Phytopathology 17: 144–145.
13. Janisiewicz WJ Tworkoshi TJ and Kurtzman CP. 2001. Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherima* strains against blue mold of apple. Phytopathology 91: 1098–1108.
14. Jepson SB. 1987. Identification of Root – Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). Wallingford, UK: CAB International. 265 p.
15. Khan TA and Saxena SK. 1997. Effect of root dip treatment with fungal filtrates on root penetration, development and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. International Journal of Nematology 7: 85–88.
16. Khattak B and Stephen SM. 2008. Effect of some indigenous isolats of *Trichoderma harzianum* on root knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. Sarhad Journal of Agriculture 24: 285–288.
17. Kishore GK, Pande S and 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.

18. Kloepper J, Tuzun S and Kuc J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. Journal of Biocontrol Science and Technology 2: 347–349.
19. Malick CP and Singh MB. 1980. Plant Enzymology and Histoenzymology. New Delhi: Kalyani Publisher. 280 p.
20. Maleki Ziarati H, Sahebani N, Rahnama K and Noori N. 2008. Effect of fungus *Trichoderma harzianum* on induced systemic phenolic compounds against root knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato. Journal of Agriculture Science and Natural Resources 14: 161–168 (In Farsi).
21. Mohammadi M and Kazemi H. 2002. Changes in peroxidase and Polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science 162: 491–498.
22. Mpiga P, Belange RR, Paulitz TC and Benhamou N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. Journal of Physiological and Molecular Plant Pathology 50: 301–320.
23. Ogallo JL and McClure MA. 1996. Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematode in tomato. Journal of Phytopathology 86: 498–501.
24. Reuveni R. 1995. Biochemical marker of disease resistance. pp. 99–114, *In* RP Singh. and US Singh (eds). Molecular Methods in Plant Pathology. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
25. Salehpour M, Etebarian HR, Roustaei A, Khodakaramian G and Aminian H. 2005. Biological control of common root rot of wheat *(Bipolaris sorokiniana*), by *Trichoderma* isolates. Plant Pathology Journal 4: 85–90.
26. Seevers DM, Daly JM and Catedral FF. 1971. The role of peroxidase isozyme in resistance to wheat stem rust disease. Journal of Plant Physiology 48: 353–360.
27. Sikora RA, Niere B and Kimenju J. 2003. Endophytic microbial biodiversity and plant nematode management in African agriculture. pp. 179–192, *In* P Neuenschwander, C Borgermeister and J Langewald (eds.). Biological Control in IPM Systems in Africa. Wallingford, UK: CABI Publishing.
28. Van Loon LC and Vanstrien EA. 1998. The families of pathogenesis–related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. Journal of Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85–97.