فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۲
صص ۳۴-۲۳

استفاده از قارچ نماتد خوار *Arthrobotrys oligospora* و القاء کننده اسید سالیسیلیک جهت کنترل نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* و مطالعه برخی پاسخ‌های دفاعی گیاه

حدیث مصطفی نژاد[۱]، نوازاله صاحبانی[*۲]، شاهین نوری نژاد زرقانی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۲۳

چکیده

در این پژوهش توانایی قارچ شکارگر *Arthrobotrys oligospora* و القاء کننده اسید سالیسیلیک در کنترل نماتد گره ریشه *Meloidogyne javanica* روی گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین تغییرات آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز و نیز میزان تجمع ترکیبات فنلی در اثر تیمارهای مختلف مطالعه گردید. غلظت پنج میلی مولار اسید سالیسیلیک به صورت اسپری هوایی و غلظت 10^6 اسپور قارچ در میلی‌لیتر به روش خیساندن خاک، به صورت جداگانه و توأم در مرحله شش برگی گیاه گوجه‌فرنگی در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. پنجاه روز پس از مایه‌زنی، قطر گال‌ها، تعداد گال و توده تخم در هر گیاه، تعداد تخم موجود در هر توده تخم، وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد که استفاده از قارچ *A. oligospora* و اسید سالیسیلیک هر یک به تنهایی در کنترل نماتد *M. javanica* مؤثرند، هر چند که استفاده تلفیقی از این عوامل به مراتب مؤثرتر از کاربرد هر یک به صورت جداگانه می‌باشد. هم‌چنین بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز و نیز میزان تجمع ترکیبات فنلی در تیمارهای مورد بررسی بیانگر افزایش فعالیت آنزیم‌های مذکور و نیز تجمع ترکیبات فنلی در ریشه گیاه بود که خود نشان دهنده تحریک سیستم دفاعی گیاه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Arthrobotrys oligospora*، *Meloidogyne javanica*، اسید سالیسیلیک، کنترل، پلی‌فنل اکسیداز، پراکسیداز، ترکیبات فنلی

---

[۱]- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
[۲]- دانشیار گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
[۳]- استادیار گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
[*]- نویسنده مسئول مقاله: n_sahebani@yahoo.com

مقدمه

نماتدهای گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) از جمله مهم‌ترین عوامل ایجاد خسارت اقتصادی به طیف وسیعی از محصولات کشاورزی در مناطق مختلف جهان، خصوصاً نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری به شمار می‌روند (Sikora and Fernandez, 2005). جهت کنترل و کاهش خسارت ناشی از نماتدها، روش‌های مختلفی همچون تناوب زراعی با گیاهان غیرمیزبان، آیش، استفاده از ارقام مقاوم، آفتاب دهی خاک و روش‌های شیمیایی قابل استفاده است (Pakeerathan *et al.,* 2009). به علاوه استفاده از عوامل کنترل زیستی و القاء کننده‌های مقاومت گیاه از جمله روش‌هایی است که مورد توجه محققان بسیاری قرار گرفته است. از جمله عوامل کنترل زیستی نماتدها، قارچ آسکومیست *Arthrobotrys oligospora* می‌باشد که با تشکیل شبکه‌های سه بعدی چسبنده مانع حرکت نماتدها شده و آنها را به دام می‌اندازد (Veenhuis *et al.,* 1985). این قارچ توکسینی را تولید می‌کند که از طریق میخ آلوده کننده به بدن نماتد وارد می‌شود (Olthof and Estey, 1963). *دوپونویس و همکاران* (Duponnois *et al.,* 1995) نشان دادند که قارچ *A. oligospora* جمعیت نماتد مولد گره ریشه درگیاه گوجه‌فرنگی را کنترل می‌کند.

مقاومت القایی نیز از جمله روش‌های کنترل بیمارگرها بشمار رفته که موجب فعال شدن سیستم دفاعی گیاه و در نتیجه محدود شدن فعالیت بیمارگر می‌گردد. از جمله شناخته شده‌ترین ترکیبات مورد استفاده جهت القاء مقاومت در گیاهان ماده شیمیایی اسید سالیسیلیک می‌باشد (He and Wolyn, 2005). *کمپستر و همکاران* (Kempster *et al.,* 2001) نشان دادند که استفاده از اسید سالیسیلیک در گیاه شبدر موجب القاء مقاومت علیه نماتد *Heterodera trifolii* می‌شود. *ناندی و همکاران* (Nandi *et al.,* 2003) نیز از اسپری هوایی اسید سالیسیلیک به منظور کنترل نماتد *M. incognita* در بامیه (*Abelmoschus esculentus*) و لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) استفاده کردند. آنها نشان دادند که اسید سالیسیلیک موجب کاهش معنی‌دار تعداد گال حاصل از فعالیت نماتد در این گیاهان می‌گردد.

افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با سیستم دفاعی گیاهان و نیز تجمع متابولیت‌های مؤثر در این زمینه از مهم‌ترین مکانیسم‌های القاءکننده‌های شیمیایی در گیاهان است. آنزیم‌های متعددی در دفاع گیاهان علیه پاتوژن‌ها نقش دارند (Odjakova and Hadjiivanova, 2001). از جمله‌ی این آنزیم‌ها می‌توان به پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز اشاره کرد (Simons and Ross, 1970; Daly *et al*., 1971; Loon and Geelen, 1971; Chen *et al*., 2000). آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در اکسیداسیون فنل‌ها به کوئینون و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی مورد حمله میکروب‌ها نقش مهمی دارد (Concellón *et al.,* 2004). نقش آنزیم پراکسیداز در مقاومت گیاه، توانایی آن در اکسیده کردن متابولیت‌های دفاعی می‌باشد (Kosuge, 1969). نقش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ایجاد مقاومت به *Sclerospora graminicola*، عامل سفیدک دروغی گیاه ارزن دری (*Pennisetum glaucum*) اثبات شده است (Raj *et al.,* 2006). *یائو و تیان* (Yao and Tian, 2005) گزارش کردند که آنتاگونیست *Cryptococcus laurentii* و متیل جاسمونیت باعث القاء فعالیت برخی آنزیم‌ها همچون پراکسیداز در میوه هلو می‌شوند. *سیلوا و همکاران* (Silva *et al.,* 2004) نیز فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز را در ارتباط با مقاومت القایی سیستمیک عنوان کرده‌اند. آنها نشان دادند که در ریشه گیاه خیار تیمار شده با باکتری *Pseudomonas corrugata* فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز بعد از تیمار با باکتری افزایش می‌یابد. *یائو و تیان* (Yao and Tian, 2005) گزارش کردند که آنتاگونیست *Cryptococcus laurentii* و متیل جاسمونیت باعث القاء فعالیت برخی آنزیم‌ها همچون پراکسیداز در میوه هلو می‌شوند. *سیلوا و همکاران* (Silva *et al.,* 2004) نیز نشان دادند که در ریشه گیاه خیار تیمار شده با باکتری *Pseudomonas corrugata* فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز بعد از تیمار با باکتری افزایش می‌یابد.

ترکیبات فنلی نیز از جمله ترکیباتی هستند که در پاسخ گیاهان به تنش‌های مختلف از جمله عوامل بیماری‌زای گیاهی دخالت دارند (Zheng *et al.,* 2007). *ویوکنانتان و همکاران* (Vivekananthan *et al.,* 2006) گزارش کردند که تیمار درختان انبه با باکتری *P. fluorescens* و کیتین، پس از ۱۵ روز موجب افزایش میزان فنل و نیز فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز می‌گردد.

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر قارچ نماتدخوار *A. oligospora* و نیز تاثیر اسید سالیسیلیک به عنوان یک القاء کننده مقاومت در گیاه بر نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بوده است. هم‌چنین بررسی تغییرات آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز و نیز میزان تجمع ترکیبات فنلی در ریشه گوجه‌فرنگی نیز یکی دیگر از اهداف تحقیق است.

مواد و روش‌ها

تهیه اینوکلوم اولیه نماتد

ریشه‌های آلوده به نماتد مولد گره ریشه از مزارع گوجه‌فرنگی شهرستان ورامین در استان تهران جمع آوری و پس از جداسازی تک توده تخم، روی ریشه گیاه گوجه‌فرنگی رقم ارلی اوربانا وای (Early Urbana Y) تکثیر گردید. سپس با استفاده از خصوصیات ریخت شناسی و ریخت سنجی، گونه نماتد مشخص گردید (Eisenback, 1985). در تمامی آزمایشات از لارو سن دوم به‌عنوان زاد مایه نماتد استفاده شد (Hussey and Barker, 1973). ضد عفونی سطحی لاروها با استفاده از روش *میتچم و همکاران* (Mitchum *et al.*, 2004) انجام شد.

تهیه قارچ *Arthrobotrys oligospora*

این قارچ از کلکسیون گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تهیه و به روش تک اسپور روی محیط کشت آب آگار (Water Agar) خالص‌سازی شد. این قارچ توسط صاحبانی از منطقه ورامین تهران جمع آوری شده است. به منظور تهیه سوسپانسیون اسپور، قارچ روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar) کشت داده شد و به مدت ۲۸ روز در انکوباتور در دمای ۲۵±۱°C قرار گرفت. پس از این مدت غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور قارچ در میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر در آب مقطر سترون تهیه گردید.

تهیه اسید سالیسیلیک

ماده شیمیایی اسید سالیسیلیک از شرکت مرک (Merck) تهیه شد و غلظت پنج میلی مولار آن برای انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت (Katoch *et al.*, 2005).

بررسی اثر قارچ *A. oligospora* بر مرگ و میر لارو سن دوم نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاهی

از حاشیه پرگنه قارچ *A. oligospora* رشد یافته بر روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار، به کمک چوب پنبه سوراخ کن قطعاتی به قطر ۰/۵ سانتی متر جدا شد و هر قطعه بر روی محیط کشت آب آگار دو درصد قرار گرفت. پس از هشت روز به هر ظرف کشت، دو میلی‌لیتر ازسوسپانسیون نماتد حاوی ۵ ±۱۰۰ لارو تازه تفریخ شده سترون اضافه گردید. این ظروف در دمای ۲۵±۱°C نگهداری شد و پس از گذشت ۷۲ و ۹۶ ساعت، درصد نماتدهای مرده در ظروف تیمار و شاهد شمارش گردید. درصد مرگ و میر لاروها از فرمول $IP = (C-T / C) \times 100$ که در آن IP درصد مرگ و میر لارو، C تعداد لاروهای زنده در تیمار شاهد و T تعداد لاروهای زنده در سایر تیمارها بود، محاسبه گردید. لاروهایی مرده در نظر گرفته شدند که فاقد تحرک بوده و حتی هنگامی که با سوزن سترون به آنها ضربه زده می‌شد تحرکی نداشتند (Cayrol *et al.*, 1989). ظروف کشت فاقد قارچ به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. این آزمایش دو بار در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت.

بررسی اثر مستقیم اسید سالیسیلیک بر میزان مرگ و میر لارو سن دوم نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاهی

در این آزمایش از ۲۰ میلی‌لیتر اسید سالیسیلیک پنج میلی‌مولار در ظروف کشت سترون (با قطر دهانه نه سانتی‌متر) حاوی ۵±۱۰۰ لارو تازه تفریخ شده و فعال نماتد استفاده شد. از ظروف حاوی آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده گردید. این ظروف در انکوباتور با دمای ۲۵±۱°C قرار گرفتند و درصد مرگ و میر لاروها پس از گذشت ۷۲ و ۹۶ ساعت طبق فرمول ذکر شده در بالا محاسبه شد. لاروهای فاقد تحرک، طبق روش *کایرول و همکاران* (۱۹۸۹) به عنوان لاروهای مرده در نظر گرفته شدند. این آزمایش دو بار و در قالب طرح کاملاً تصادفی، با چهار تکرار انجام شد.

بررسی اثر *A. oligospora* و اسید سالیسیلیک روی نماتد *M. javanica* در گلخانه

بذور گوجه‌فرنگی رقم کالجی ان ۳ به مدت پنج دقیقه توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی و سپس پنج بار توسط آب مقطر سترون آبکشی شدند. این بذور در گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی خاک سترون (شامل حجم مساوی از خاک مزرعه، ماسه و کود برگ) کشت گردید و در شرایط مساعد گلخانه (شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۷±۵°C) پرورش داده شد.

گیاهچه‌ها در مرحله‌ی شش برگی با اسید سالیسیلیک پنج میلی‌مولار اسپری هوایی شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچ با غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر به سطح خاک اضافه گردید. پس از سه روز، تیمارهای مورد نظر توسط حدود ۲۰۰۰ لارو فعال سن دوم نماتد مایه زنی شدند، به این صورت که موقتاً، مقداری از خاک سطح گلدان برداشت شد و سوسپانسیون لاروهای مذکور در تمام سطح خاک پخش گردید. تیمارها شامل: گیاهان مایه زنی شده با آب مقطر استریل (شاهد غیر آلوده)، گیاهان مایه زنی شده با نماتد (شاهد آلوده)، گیاهان مایه زنی شده با اسید سالیسیلیک، گیاهان مایه زنی شده با اسید سالیسیلیک + نماتد، گیاهان مایه زنی شده با سوسپانسیون اسپور قارچ + نماتد، گیاهان مایه زنی شده با اسید سالیسیلیک + سوسپانسیون اسپور قارچ + نماتد بودند. پنجاه روز پس از مایه زنی با نماتد، گیاهچه‌ها به منظور سنجش قطر گال‌ها، تعداد گال و توده تخم به ازاء هر گیاه، تعداد تخم‌های درون هر توده تخم و نیز شاخص‌های وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی به آزمایشگاه منتقل شدند. قطر گال‌ها به کمک قطر سنج[1] اندازه گیری شد. تعداد گال و توده تخم به ازاء هر گیاه نیز به کمک بینوکولر مشاهده شد. به منظور محاسبه تعداد تخم‌های درون هر توده تخم، ابتدا تخم‌های مربوط به هر توده تخم به طور جداگانه با روش هوسی و بارکر (۱۹۷۳) استخراج شده سپس با استفاده از پتری شمارش تعداد هر تخم در یک توده تخم مشخص گردید. آزمایش با شش تیمار و پنج تکرار، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

بررسی برخی مکانیسم‌های دفاع بیوشیمیایی گیاه

بذور ضد عفونی شده گوجه‌فرنگی رقم کالجی ان ۳ به همان ترتیبی که اشاره شد، در گلدان‌های سترون کشت گردید. گیاهچه‌ها در مرحله شش برگی با اسید سالیسیلیک پنج میلی‌مولار و قارچ *A. oligospora* با غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر مایه زنی شده و سه روز بعد حدود ۲۰۰۰ لارو فعال سن دوم نماتد به گلدان‌های مورد نظر اضافه گردید. تیمارها در این بررسی مشابه تیمارهای در نظر گرفته شده در آزمایشات گلخانه‌ای بود. آزمایشات به آرایش فاکتوریل ۷×۶ بر پایه طرح کاملاً تصادفی و با چهار تکرار انجام شد. هم‌چنین تغییرات آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز و نیز میزان تجمع ترکیبات فنلی در روزهای اول تا هفتم پس از مایه زنی با نماتد مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا از ریشه گیاهان عصاره تهیه گردید، به این صورت که یک گرم از بافت ریشه در هاون چینی با استفاده از ازت مایع کوبیده و پودر شد. سپس یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۱۰ میلی‌مولار با pH= ۶ به آن اضافه و مخلوط گردید. مخلوط حاصل به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و در g ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای °C ۴ سانتریفوژ شد و سپس مایع رویی جهت انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت (Sahebani and Hadavi, 2008).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

جهت ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز از روش *لیو و همکاران* (Liu *et al.,* 2002) با کمی تغییرات استفاده گردید، به این ترتیب که از ۵۰۰ میکرولیتر عصاره ریشه گیاه استفاده شد. در نهایت تغییرات جذب نور در طول موج ۵۱۵ نانومتر با فواصل زمانی ۱۰ ثانیه به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس تغیرات جذب نور در یک دقیقه در یک گرم بافت ریشه گیاه محاسبه شد.

[1]- Caliper

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش *رئووئنی* (Reuveni, 1995) با کمی تغییرات، انجام گرفت. مقدار فعالیت آنزیم در ۲۰۰ میکرولیتر عصاره ریشه گیاه بر حسب تغییرات جذب نور در طول موج ۴۷۵ نانومتر در یک دقیقه در یک گرم بافت ریشه اندازه گیری شد.

بررسی میزان تجمع ترکیبات فنلی

بررسی میزان تجمع ترکیبات فنلی در گیاه بر اساس روش *سینگلتون و همکاران* (Singleton *et al.,* 1999) انجام شد. به این ترتیب که مقدار تجمع ترکیبات فنلی به صورت میلی‌گرم معادل کافئیک اسید در یک گرم بافت ریشه با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده بر اساس کافئیک اسید (Fluka)، محاسبه گردید.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد، هم‌چنین میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. برای رسم شکل‌ها از نرم افزار Excel 2003 استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر مرگ و میر لارو سن دوم نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاهی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که غلظت پنج میلی‌مولار اسید سالیسیلیک پس از ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب موجب ۲۱/۲۰٪ و ۲۴/۴۳٪ مرگ و میر در لاروهای سن دوم نماتد *M. javanica* گردید. *عمران زاده* (۲۰۰۸) نیز نشان داد که غلظت اسید سالیسیلیک ۱۰ میلی مولار پس از سه روز موجب مرگ و میر ۴۲/۰۶ درصدی لاروهای سن دوم نماتد *M. javanica* شده است. این اختلاف در میزان مرگ و میر لارو سن دوم نماتد می‌تواند ناشی از اختلاف در غلظت اسید سالیسیلیک مورد استفاده باشد.

بررسی اثر قارچ *A. oligospora* بر مرگ و میر لارو سن دوم نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاهی

نتایج نشان داد که قارچ *A. oligospora* پس از ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب موجب ۷۶/۸۳٪ و ۹۹/۴۱٪ مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد شد. *سینگ و همکاران* (Singh *et al*., 2012a) نیز نشان دادند که جدایه VNS-1 همین قارچ پس از هشت روز موجب مرگ و میر ۵۷/۸ درصدی لاروهای سن دوم نماتد *M. graminicola* شد. در تحقیق سایر محققان نیز اثر بیوکنترل این گونه قارچ بر روی نماتدهای مولد گره به اثبات رسیده است (Jamshid nezhad *et al*., 2013; Singh *et al*., 2012c).

بررسی اثر *A. oligospora* و اسید سالیسیلیک روی نماتد *M. javanica* در گلخانه

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که شاخص‌های مورد ارزیابی در تمامی تیمارها، دارای اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0.05$) با شاهد (گیاهان مایه زنی شده با *M. javanica*) می‌باشند (جدول ۱). کمترین میزان قطر گال، تعداد گال و تعداد توده تخم در هر گیاه و نیز کمترین تعداد تخم در هر توده تخم در تیمار اسید سالیسیلیک + قارچ *A. oligospora* + نماتد *M. javanica* مشاهده شد که با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود. در بررسی اثر اسید سالیسیلیک و نیز قارچ *A. oligospora* به تنهایی بر نماتد، مشاهده گردید که قارچ *A. oligospora* در خصوص کاهش شاخص‌های تعداد گال و تعداد توده تخم در هر گیاه موفق‌تر از اسید سالیسیلیک عمل می‌کند. *سیمون و آنامیکا* (Simon and Anamika, 2011) نشان دادند که استفاده از قارچ *A. oligospora* در گیاه برنج آلوده به نماتد *M. graminicola* Golden and Birchfield موجب افزایش ۶۱/۱٪ وزن تر اندام هوایی و ۲۴/۳٪ وزن تر ریشه در گیاهان آلوده به نماتد و نیز کاهش ۸۶/۹٪ تعداد گال می‌گردد. نتایج بررسی‌های *شارما و پندی* (Sharma and Pandey, 2009) نیز نشان می‌دهد که کنترل بیولوژیک نماتد *M. incognita* توسط قارچ *A. oligospora* موجب کاهش تعداد گال‌های نماتد و هم‌چنین افزایش رشد در گیاه بوزیدان (*Withania somnifera*) می‌گردد.

جدول ۱- تأثیر مایه زنی با قارچ *A. oligospora* و اسید سالیسیلیک در کنترل نماتد *M. javanica* در شرایط گلخانه

تیمار	قطرگال (میلی‌متر)	تعداد گال در هر گیاه	تعداد توده تخم در هر گیاه	تعداد تخم در هر توده تخم	وزن تر ریشه (گرم)	وزن تر اندام هوایی (گرم)
SA+Ar+N	۱/۰۶ ± ۰/۱۳^{c}	۴۴/۴۰± ۱/۹۴ ^{d}	۲۱/۲۰ ±۰/۴۹ ^{d}	۱۰۰/۲۰±۴/۵۹ ^{c}	۹/۷۳± ۰/۱۱^{cd}	۳۸/۳۱±۱/۰۷^{b}
SA+N	۱/۷۰ ±۰/۲^{b}	۱۵۸/۸۰ ±۶/۵۶^{b}	۱۱۷/۲۰±۶/۶۵^{b}	۱۵۲/۸۰ ±۴/۷۳^{b}	۱۰/۷۹ ±۰/۲۳^{b}	۳۰/۳۲ ±۰/۷۳^{c}
Ar+N	۱/۶۶ ±۰/۱۱^{b}	۶۹/۶۰ ±۲/۶۴^{c}	۵۴/۴۰ ±۵/۴۲^{c}	۱۴۴/۸۰ ±۵/۱۵^{b}	۱۰/۱۹ ±۰/۰۵^{c}	۳۲/۷۰ ±۰/۹۱^{c}
SA	–	–	–	–	۹/۴۴ ±۰/۱۶^{de}	۴۳/۳۱ ±۱/۲۷^{a}
H	–	–	–	–	۸/۹۶ ±۰/۲۰^{e}	۴۰/۲۴±۱/۶۳^{ab}
Control	۲/۵۲ ±۰/۱۰^{a}	۲۸۶/۴۰ ±۱۰/۵۰^{a}	۲۲۹/۲۰±۷/۴۵^{a}	۳۴۴/۰۰ ±۱۲/۰۸^{a}	۱۱/۶۲ ±۰/۲۲^{a}	۲۶/۰۹ ±۱/۳۶^{d}

میانگین‌هایی که در هر ستون بر اساس آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0.05$) می‌باشند با حروف مختلف نشان داده شده‌اند. N: *M. javanica*، SA: اسید سالیسیلیک، Ar: *A. oligospora*، H: شاهد بدون آلودگی، Control: شاهد آلوده به نماتد.

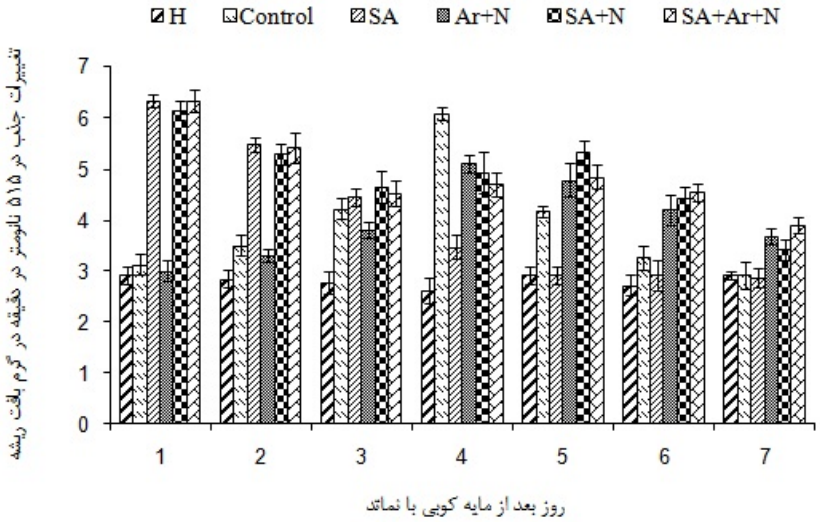
در بررسی نتایج به دست آمده این نکته نیز قابل تأمل است که اسید سالیسیلیک نیز به طور معنی‌داری موجب کاهش قطر گال‌ها، تعداد گال و تعداد توده تخم در هر گیاه و نیز تعداد تخم در هر توده تخم در مقایسه با شاهد گردیده است. *سرافراز* (۲۰۰۹) نشان داد که اسپری هوایی اسید سالیسیلیک ۱۰ میلی‌مولار موجب کاهش معنی‌دار تعداد گال و تعداد توده تخم در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد *M. javanica* می‌گردد. *ناندی و همکاران* (Nandi *et al.,* 2002) نیز نشان دادند که استفاده از اسپری هوایی اسید سالیسیلیک در غلظت ۱۰ میلی مولار در گیاه لوبیا چشم بلبلی آلوده به نماتد *M. incognita* موجب کاهش معنی‌دار تعداد گال و تخم در هر گیاه در مقایسه با شاهد می‌گردد. آنها هم‌چنین نشان دادند که اسپری هوایی اسید سالیسیلیک موجب افزایش معنی‌دار وزن اندام هوایی در مقایسه با شاهد می‌گردد. در این پژوهش نیز بیش‌ترین میزان وزن تر اندام هوایی در گیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک مشاهده گردید که البته فاقد اختلاف معنی‌دار با گیاهان تیمار شده با آب مقطر سترون بود.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز و نیز میزان تجمع ترکیبات فنلی

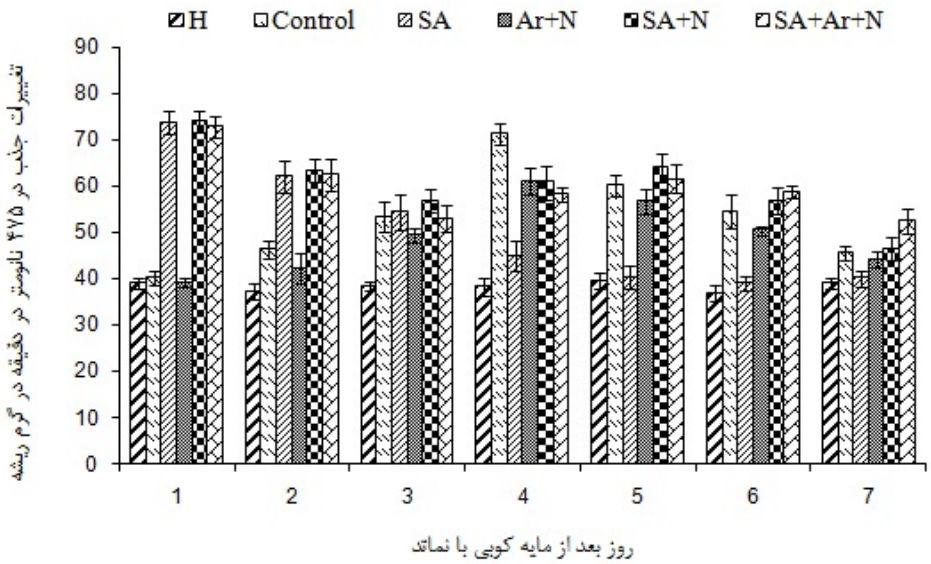
نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (شکل ۱) نشان داد که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم مربوط به تیمارهای اسید سالیسیلیک به تنهایی، اسید سالیسیلیک + *M. javanica* + *A. oligospora* و نیز تیمار اسید سالیسیلیک + *M. javanica* در روز اول بعد از مایه زنی با نماتد بوده (به ترتیب معادل ۶/۳۳، ۶/۳۳ و ۶/۱۴ تغییر جذب در دقیقه در یک گرم بافت ریشه) که اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد (گیاهان مایه زنی شده با نماتد) در روز چهارم بعد از مایه زنی با نماتد (۶/۰۷ تغییر جذب در دقیقه در یک گرم بافت ریشه) نداشت. بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (شکل ۲) نیز نشان داد که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم مربوط به تیمارهای اسید سالیسیلیک + *M. javanica*، اسید سالیسیلیک به تنهایی و تیمار اسید سالیسیلیک + *M. javanica* + *A. oligospora* در روز اول بعد از مایه زنی با نماتد بوده (به ترتیب معادل ۷۳/۹۶، ۷۳/۷۷ و ۷۲/۸۶ تغییر جذب در دقیقه در یک گرم بافت ریشه) که اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد در روز چهارم بعد از مایه زنی با نماتد (۷۱/۳۷ تغییر جذب در دقیقه در یک گرم بافت ریشه) نداشت. *عمران زاده* (۲۰۰۸) نیز بیش‌ترین میزان فعالیت دو آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز را در ریشه گیاهان خیار مایه زنی شده با غلظت ۱۰ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک پنج روز پس از مایه زنی مشاهده کرد. *ناصری نسب* (۲۰۱۱) نیز نشان داد که بیش‌ترین میزان فعالیت دو آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز در ریشه گیاهان گوجه‌فرنگی رقم ارلی اوربانا وای مایه زنی شده با اسید سالیسیلیک پنج میلی-مولار به ترتیب چهار و پنج روز پس از مایه زنی قابل مشاهده است. *الیویرا و همکاران* (Oliveira *et al.,* 2012) فعالیت آنزیم پراکسیداز را در گیاه لوبیا چشم بلبلی آلوده به نماتد *M. incognita* به مدت ۱۰ روز پس از مایه زنی با نماتد بررسی کرده و نشان دادند دو اوج فعالیت آنزیم چهار و هشت روز پس از مایه کوبی با نماتد مشاهده می‌شود.

عمران زاده (۲۰۰۸) نشان داد که در گیاهان خیار آلوده به نماتد *M. javanica* بیش‌ترین میزان فعالیت دو آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز چهار روز پس از مایه زنی قابل مشاهده است. *ملکی زیارتی* (۲۰۰۶) نیز حداکثر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در گوجه‌فرنگی رقم کینگ استون (King stone) را، شش روز پس از مایه‌زنی با نماتد مشاهده کرده است.

این اختلافات در روز اوج فعالیت آنزیم در بررسی‌های محققیق مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت در گیاه و غلظت اسید سالیسیلیک مورد استفاده باشد. *ویلیامسون* (Williamson, 1999) ژن‌هایی را در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) شناسایی کرد که موجب القاء آنزیم‌هایی مانند پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز می‌شوند.



شکل ۱- تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی مایه زنی شده با اسید سالیسیلیک، قارچ *A. oligospora* و نماتد *M. javanica* بار روی هر ستون بیانگر خطای استاندارد (±SE) است. N: *M. javanica* ، SA: اسید سالیسیلیک، Ar: *A. oligospora*، H: شاهد بدون آلودگی، Control: شاهد آلوده به نماتد.



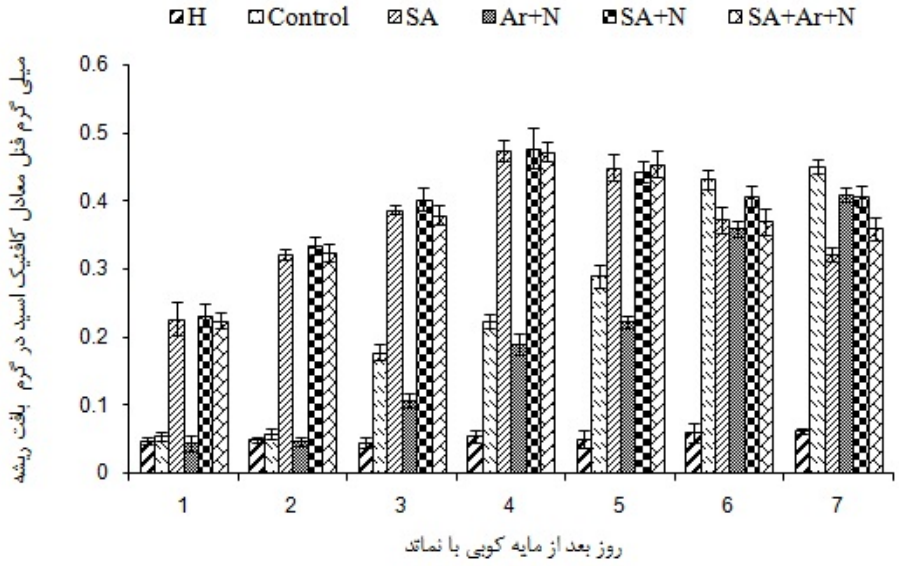
شکل ۲- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی مایه زنی شده با اسید سالیسیلیک، قارچ *A. oligospora* و نماتد *M. javanica* بار روی هر ستون بیانگر خطای استاندارد (±SE) است. N: *M. javanica* ، SA: اسید سالیسیلیک، Ar: *A. oligospora* ، H: شاهد بدون آلودگی، Control: شاهد آلوده به نماتد.

در این پژوهش در تیمارهای اسید سالیسیلیک به تنهایی، اسید سالیسیلیک + *M. javanica* و نیز تیمار اسید سالیسیلیک + *M. javanica* + *A. oligospora* از روز اول نمونه‌برداری تا روز چهارم روندی افزایشی در تجمع ترکیبات فنلی قابل مشاهده بود (شکل ۳) که از روز چهارم به بعد به تدریج از میزان تجمع این ترکیبات کاسته شد. در تیمار شاهد و نیز تیمار *M. javanica* + *A. oligospora* بیش‌ترین میزان تجمع ترکیبات فنلی هفت روز پس از مایه زنی گیاهان با نماتد

M. javanica مشاهده شد. *عمران زاده* (۲۰۰۸) نیز بیشترین میزان تجمع ترکیبات فنلی در ریشه گیاهان خیار مایه زنی شده با نماتد *M. javanica* را در روز هفتم بعد از مایه زنی مشاهده کرد.

سینگ و همکاران (Singh *et al.,* 2012b) نشان دادند که آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی به نماتد *M. incognita* سبب افزایش ترکیبات فنلی در ریشه‌های این گیاه می‌گردد. *والت و همکاران* (Valette *et al.,* 1998) نیز نشان دادند که در گیاه موز آلوده به نماتد *Radopholus similis* (Cobb) Thorne تجمع مواد فنلی در سلول‌های پارانشیمی اطراف آوندها مشاهده می‌شود. *کاوالکنتی و همکاران* (Cavalcanti *et al.,* 2006) نیز نشان دادند که میزان ترکیبات فنلی در گوجه‌فرنگی زمانی که گیاه با اسید سالیسیلیک تیمار شود، افزایش پیدا می‌کند و این افزایش موجب ایجاد مقاومت القایی علیه باکتری *Xanthomonas vasicatoria* می‌گردد.

تفاوت معنی‌داری در میزان تجمع ترکیبات فنلی در گیاهان تیمار شده با آب مقطر سترون طی روزهای مختلف مشاهده نشد (شکل ۳). این مسأله در خصوص میزان فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز (شکل ۱) و پراکسیداز (شکل ۲) نیز قابل مشاهده بود. این امر می‌تواند بیانگر این نکته باشد که در این گیاهان القایی صورت نگرفته است.



شکل ۳- تغییرات در تجمع ترکیبات فنلی در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی مایه زنی شده با اسید سالیسیلیک، قارچ *A. oligospora* و نماتد *M. javanica*. بار روی هر ستون بیانگر خطای استاندارد (±SE) است. N: *M. javanica* ، SA: اسید سالیسیلیک، Ar: *A. oligospora*، H: شاهد بدون آلودگی، Control: شاهد آلوده به نماتد.

نتیجه گیری کلی

با توجه به اثرات زیان بار کاربرد سموم شیمیایی بر انسان و محیط زیست استفاده از عوامل کنترل زیستی و نیز القاءکننده‌های سیستم دفاعی گیاه که به نظر می‌رسد خطری برای انسان و محیط زیست ندارند راهی مؤثر جهت کنترل آفات محصولات کشاورزی می‌باشد. همان‌طور که نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد هر چند استفاده از قارچ *A. oligospora* به دلیل توانایی بالای آن در به دام اندازی لاروهای نماتد مولد گره ریشه و نیز استفاده از اسید سالیسیلیک به دلیل القای فعالیت دفاعی گیاه به تنهایی نیز در کنترل نماتد *M. javanica* مؤثر واقع شده است اما کاربرد تلفیقی این عوامل به مراتب مؤثرتر از کاربرد هر کدام به تنهایی می باشد.

References

1. Cavalcanti F, Resende M, Carvalho C, Silveira J and Oliveira J. 2006. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis perniciosa*. Biological Control 39: 408–417.
2. Cayrol JC, Djian C and Pijarowski L. 1989. Study of the nematicidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. Revue de Nématologie 12: 331–336.
3. Chen C, Belanger RR, Benhamou N and Paulitz TC. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology 56: 13–23.
4. Concellón A, Añón MC and Chaves AR. 2004. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. Food Chemistry 88: 17–24.
5. Daly J, Ludden P and Seevers P. 1971. Biochemical comparisons of resistance to wheat stem rust disease controlled by the Sr6 or Sr11 alleles. Physiological Plant Pathology 1: 397–407.
6. Duponnois R, Mateille T and Gueye M. 1995. Biological characteristics and effects of two strains of *Arthrobotrys oligospora* from Senegal on *Meloidogyne* species parasitizing tomato plants. Biocontrol Science and Technology 5: 517–526.
7. Eisenback JD. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp). pp. 95-112. *In* JN Sasser and CC Carter (eds). An advanced treaties on *Meloidogyne*. Vol 1: Biology and control. USA: North Carolina State University Graphics.
8. Jamshidnezhad V, Sahebania N and Etebariana H. 2013. Potential biocontrol activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Trichoderma harzianum* BI against *Meloidogyne javanica* on tomato in the greenhouse and laboratory studies. Archives of Phytopathology and Plant Protection 46: 1632–1640.
9. He C and Wolyn D. 2005. Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* .Plant Pathology 54: 227–232
10. Hussey R and Barker K. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter 57: 1025–1028.
11. Katoch R, Mann APS and Sohal BS. 2005. Enhanced enzyme activities and induction of acquired resistance in pea with elicitors. Journal of Vegetable Science 11:67–83.
12. Kempster VN, Davies KA and Scott ES. 2001. Chemical and biological induction of resistance to the clover cyst nematode (*Heterodera trifolii*) in white clover (*Trifolium repens*). Nematology 3: 35–43.
13. Kosuge T. 1969. The role of phenolics in host response to infection. Annual Review of Phytopathology 7: 195–222.
14. Liu T, Li Y, Shi Y, Zhou B, Guo Y, Liu Z and Wen J. 2002. Induced resistance of tobacco to TMV with Non-fungicidal chemical compounds. Journal of Northeast Agricultural University 33: 129–133.
15. Loon LC and Geelen JLMC. 1971. The relation of polyphenoloxidase and peroxidase to symptom expression in tobacco var."Samsun NN" after infection with tobacco mosaic virus. Acta phytopathologica 6: 9–20.
16. Maleki Ziarati H. 2006. Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* and study on changes of some biochemical defence mechanisms in tomato [MSc]. [Tehran (IR)]: Abooreihan campus, Tehran University.
17. Mitchum MG, Sukno S, Wang X, Shani Z, Tsabary G, Shoseyov O and Davis E.L. 2004. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* Cel1 endo-1, 4-β glucanase gene is differentially expressed in plant feeding cells induced by root-knot and cyst nematodes. Molecular Plant Pathology 5: 175–181.

18. Nandi B, Banerjee N, Sukul N, Das P, Sengupta S and Sinha Babu S. 2002. Salicylic acid enhances resistance in cowpea against *Meloidogyne incognita*. Phytopathologia Mediterranea 41: 39–44
19. Nandi B, Kundu K, Banerjee N and Babu SPS. 2003. Salicylic acid-induced suppression of *Meloidogyne incognita* infestation of okra and cowpea. Nematology 5: 747–752.
20. Naseri Nasab F. 2011. Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and salicylic acid with combination of *Trichoderma harzianum* BI on tomato [MSc]. [Tehran (IR)]: Abooreihan campus, Tehran University.
21. Odjakova M and Hadjiivanova C. 2001. The complexity of pathogen defense in plants. Bulgarian Journal of Plant Physiology 27: 101–109.
22. Oliveira JTA, Andrade NC, Martins-Miranda AS, Soares AA Gondim DMF, Araújo-Filho JH, Freire-Filho FR and Vasconcelos IM. 2012. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Physiology and Biochemistry 51: 145–152.
23. Olthof THHA and Estey RH. 1963. A nematotoxin produced by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* Fresenius. Nature 197: 514-515.
24. Omranzadeh F. 2008. Induction of resistance to the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in cucumber (*Cucumis sativus*) by some chemical and microbial inducers [MSc]. [Tehran (IR)]: Abooreihan campus, Tehran University.
25. Pakeerathank K, Mikunthan G and Tharshani N. 2009. Effect of different animal manures on *Meloidngyne incognita* (Kofoid and White) on tomato. World Journal of Agricultural Sciences 5: 432–435.
26. Raj SN, Sarosh B and Shetty H. 2006. Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. Functional Plant Biology 33: 563–571.
27. Reuveni R. 1995. Biochemical Markers as Tools for Screening Resistance Against Plant Pathogens. pp. 21-45, *In* R Reuveni (ed). Novel Approaches to Integrated Pest Management Boca Raton: CRC Press.
28. Sahebani N and Hadavi N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology and Biochemistry 40: 2016–2020.
29. Sarafraz Nico F. 2009. Induction of resistance to the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato by some chemical and microbial inducers and study of some active oxygens and related enzyms [MSc]. [Tehran (IR)]: Abooreihan campus, Tehran University.
30. Sharma P and Pandey R. 2009. Biological control of root-knot nematode; *Meloidogyne incognita* in the medicinal plant; *Withania somnifera* and the effect of biocontrol agents on plant growth. African Journal of Agricultural Research 4: 564–567.
31. Sikora RA and Fernandez E. 2005. Nematode Parasites of Vegetables. pp. 319–392, *In* M Luc, R. A. Sikora and J. Bridge (eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. UK: CAB International.
32. Silva HSA, Romeiro RDS, Macagnan D, Halfeld-Vieira BDA, Pereira MCB and Mounteer A. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. Biological Control 29: 288–295.
33. Simon S. and Anamika A. 2011. Management of root knot disease in rice caused by *Meloidogyne graminicola* through nematophagous fungi. Journal of Agricultural Science 3: 122–127.
34. Simons TJ and Ross A. 1970. Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco. Phytopathology 60: 383–384.
35. Singh UB, Sahu A, Singh RK, Singh DP, Meena KK, Srivastava JS and Renu Manna MC. 2012a. Evaluation of biocontrol potential of *Arthrobotrys oligospora* against *Meloidogyne graminicola* and *Rhizoctonia solani* in Rice (*Oryza sativa* L.). Biological Control 60: 262–270.

36. Singh UB, Sahu A, Sahu N, Singh R, Prabha R, Singh DP, Sarma B and Manna M. 2012b. Co-inoculation of *Dactylaria brochopaga* and *Monacrosporium eudermatum* affects disease dynamics and biochemical responses in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to enhance bio-protection against *Meloidogyne incognita*. Crop Protection 35: 102–109.
37. Singh UB, Sahu A, Sahu N, Singh RK, Renu S, Singh DP, Manna MC, Sarma BK, Singh HB and Singh KP. 2012c. *Arthrobotrys oligospora*-mediated biological control of diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) caused by *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani*. Journal of Applied Microbiology 114: 196–208.
38. Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299: 152–178.
39. Valette C, Andary C, Geiger J, Sarah J and Nicole M. 1998. Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*. Phytopathology 88: 1141–1148.
40. Veenhuis M, Nordbring-Hertz B and Harder W. 1985. An electron-microscopical analysis of capture and initial stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. Antonie Van Leeuwenhoek 51: 385–398.
41. Vivekananthan R, Ravi M, Ramanathan A, Kumar N and Samiyappan R. 2006. Pre-harvest application of a new biocontrol formulation induces resistance to post-harvest anthracnose and enhances fruit yield in mango. Phytopathologia Mediterranea 45: 126–138.
42. Williamson VM. 1999. Plant nematode resistance genes. Current Opinion in Plant Biology 2: 327–331.
43. Yao H and Tian S. 2005. Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. Journal of Applied Microbiology 98: 941–950.
44. Zheng Y, Wang SY, Wang CY and Zheng W. 2007. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. LWT-Food Science and Technology 40: 49–57.