گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۵ شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱

تحریک تولید برخی ترکیبات دفاعی علیه نماتود مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* به وسیله اسید سالیسیلیک در گیاه گوجه فرنگی

فاطمه ناصری نسب[1*]، نوازالله صاحبانی[2] و حسن رضا اعتباریان[3]

۱*- **نویسنده مسئول:** دانشجوی سابق کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران (Fnaserinasab63@gmail.com)

۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۳- استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت:۱۳۸۹/۸/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۲۳

چکیده

در این مطالعه اثر اسید سالیسیلیک بر القاء پاسخ‌های دفاعی در گیاه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y در آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. گیاهچه‌ها در مرحله ٦ -٤ برگی توسط غلظت ٥ میلی مولار اسید سالیسیلیک و لارو سن دوم نماتود *Meloidogyne javanica* مایه‌زنی گردید. میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و میزان فنل کل در روزهای اول تا هشتم بعد از مایه‌زنی با نماتود اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان داد که علاوه بر کاهش شدت بیماری در گلخانه، فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و فنل کل گیاهچه‌های تیمار شده نیز در مقایسه با شاهد افزایش یافت. همچنین در این بررسی نشان داده شد که اسید سالیسیلیک می‌تواند سبب افزایش درصد مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتود در شرایط آزمایشگاه شود. نتایج تغییرات در میزان فنل کل در ریشه و نیز تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در طی زمان‌های مختلف پس از مایه کوبی نشان داد که اسید سالیسیلیک می تواند ترکیبی موثر جهت تحریک مقاومت القایی و کاهش شدت بیماری ناشی از *M. javanica* در گیاه گوجه فرنگی باشد.

کلید واژه‌ها: مقاومت القایی، اسید سالیسیلیک، ترکیبات فنلی، پلی فنل اکسیداز، نماتود مولد گره ریشه.

مقدمه

کنترل بیولوژیکی از طریق مکانیسم‌های مختلف از جمله پدیده‌های آنتی بیوز، رقابت برای فضا، مواد غذایی و به‌خصوص رقابت برای آهن از طریق تولید سیدروفر، تولید آنزیم‌های لیزکننده و پارازیتیسم، افزایش رشد گیاه و القاء مقاومت اعمال می‌گردد (سیکورا و همکاران[1]، ۲۰۰۳). مقاومت القایی به عنوان کلیه واکنش‌هایی که به فعال شدن مقاومت گیاه از طریق ایجاد موانع فیزیکی و شیمیایی در برابر عوامل زنده یا غیر زنده بیمارگر منجر می‌گردد، تعریف شده است (کلوپر و

1- Sikora *et al.*

همکاران[1]، ۱۹۹۲). در سال ۱۹۶۰، اورت و وان آندل برای اولین بار القاء مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی علیه *Phytophthora infestans* را در اثر تیمار با بتاآمینوبوتیریک اسید (BABA) اثبات کردند. اسید سالیسیلیک (SA) نوعی ترکیب فنلی است که نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان از جمله القاء پاسخ‌های دفاعی گیاه علیه بیمارگرها دارد (پریتیویراج و همکاران[2]، ۲۰۰۵). اسید سالیسیلیک در مسیر انتقال سیگنال مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) و مقاومت موضعی اکتسابی (LAR) مشارکت دارد. میزان اسید سالسیسلیک طی SAR افزایش می‌یابد و بنابراین میزان اسید سالسیسلیک را برای SAR لازم دانسته‌اند (ردمن و همکاران[3]، ۱۹۹۴). مسیری که اسید سالسیسلیک از فنیل آلانین تولید می‌شود، مهم‌ترین مسیر سنتز اسید سالیسیلیک در گیاهان است. در این مسیر فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید و ترانس سینامیک اسید به بنزوئیک اسید تبدیل می‌شود و نهایتاً بنزوئیک اسید به اسید سالسیسلیک تبدیل می‌شود (صاحبانی و هادوی، ۱۳۸۶).

افزایش فعالیت پراکسیداز با آغاز القاء مقاومت گیاه که شامل مکانیسم‌های دفاعی متفاوتی از جمله لیگنینی شدن و سوبرینی شدن است، مرتبط می‌باشد. قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها به عنوان محرک‌های مقاومت در گیاه هستند. اخیراً برخی از محرک‌های فیزیکی از جمله اشعه ماوراء بنفش، دماهای بالا و پایین و امواج الکترومغناطیسی، به عنوان عوامل موثر بر القاء مقاومت شناخته شده‌اند (یائو و تیان[4]، ۲۰۰۵). فنل‌ها ترکیباتی با وزن ملکولی پائین هستند که پس از حمله عوامل بیماری‌زا میزان آن‌ها در گیاه افزایش پیدا می‌کند. نقش ترکیبات فنلی از سال‌ها قبل در مقاومت گیاهان به عوامل بیماریزای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. ترکیبات فنلی در پاسخ دادن گیاهان به تنش‌های مختلف از جمله عوامل بیماریزای گیاهی دخالت دارند (ژنگ و همکاران، ۲۰۰۵). ترکیبات فنلی به همراه سایر آنزیم‌ها و مواد دفاعی نظیر پراکسیدازها و پلی فنل اکسیداز در مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی، بویژه نماتودها به صورت سیستمیک دخالت دارند. مقدار این مواد در میزبان متغییر می‌باشد (اوگالو و مگ کلور، ۱۹۹۶). اغلب محققان معتقدند که برخی ترکیبات فنلی از جمله اسید سالیسیلیک، نقش سیگنال در مقاومت سیستمیک[5] و نقش محرک در بروز مقاومت بویژه القاء پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی و افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز را ایفا می‌کنند (یالپینی و همکاران، ۱۹۹۱). صاحبانی و هادوی (۱۳۸۶) در تحقیقی نشان دادند که تیمار گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتود مولد گره ریشه *M. javanica* به‌وسیلهٔ بعضی از الیسیتورهای شیمیایی و میکروبی مانند بتاآمینوبوتیریک اسید (BABA)، اسید سالیسیلیک و باکتری *Pseudomonas fluorecens* CHAO، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم مانند سوپراکساید دیسموتاز (SOD) پراکسیداز گوایکول (GPOX) و کاتالاز می‌شود. همچنین تیمار گیاه‌چه‌های گوجه فرنگی با این الیسیتورها به صورت معنی‌داری باعث کاهش سطوح آلودگی شد (صاحبانی و هادوی، ۲۰۰۹).

هدف از این تحقیق بررسی اثر غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک بر کنترل نماتود *Meloidogyne javanica* عامل بیماری ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه و بررسی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، و همچنین میزان ترکیبات فنل کل در گیاه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y پس از مایه زنی با نماتود مذکور می‌باشد.

1- Kloepper *et al.*
2- Prithiviraj *et al.*
3- Redman *et al.*
4- Yao and Tian
5- SAR Signaling

مواد و روش‌ها

عامل بیماری

ریشه‌های آلوده به نماتود مولد گره ریشه از گلخانه‌های خیار و گوجه‌فرنگی منطقه پیشوای ورامین جمع‌آوری شد. تکثیر نماتود با روش تک کیسه تخم[1] روی رقم ارلی اوربانا Y انجام و شناسایی گونه نماتود مطابق کلید جپسون، با تهیه برش از شبکهٔ کوتیکولی انتهای بدن نماتودهای ماده بالغ صورت گرفت (جپسون[2]، ۱۹۸۷). پس از شناسایی گونه و چندین دوره تکثیر متوالی، جمعیت کافی نماتود خالص *M. javanica* ایجاد شد. استخراج تخم و لارو سن دو با استفاده از روش هوسای و بارکر[3] (۱۹۷۳) انجام شد.

بررسی اثر مستقیم غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر میزان مرگ و میر لارو سن دوم نماتود مولد گره ریشه

یک میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های مورد نظر در ظروف استریل (Plate های الایزا) ریخته شد و سپس تعداد ۱۰۰ لارو سن دوم فعال نماتود به هر ظرف اضافه و به مدت سه روز در دمای اتاق نگهداری شد و پس از آن مرگ و میر لاروها مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار(غلظت‌های ۴، ۵، ۷ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک وتیمار با آب مقطر سترون به عنوان شاهد) و ۶ تکرار انجام شد (ناندی و همکاران[4]، ۲۰۰۳).

آزمایش بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر بیماری ناشی از نماتود مولد گره ریشه در شرایط گلخانه

ابتدا بذور گوجه‌فرنگی رقم ارلی اوربانا Y با وایتکس ۱۰ درصد (حاوی ۰/۵٪ هیپوکلریت سدیم و به مدت یک دقیقه) ضد عفونی سطحی شد و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر سترون در داخل گلدان‌های حاوی ۱ کیلوگرم خاک الک شده (شامل هوموس، خاک مزرعه، ماسه با نسبت ۱:۱:۲ و پاستوریزه شده در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو) کشت گردید. در این آزمایش گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله ۴ تا ۶ برگی توسط غلظت ۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال نماتود به ازاء هر گیاه مایه‌زنی شدند (صاحبانی و هادوی، ۱۳۸۶). بر روی گیاه گوجه‌فرنگی سه تیمار به شرح زیر اعمال شدند: گیاه مایه‌زنی شده با نماتود (شاهد)، گیاه مایه‌زنی شده با نماتود و اسید سالیسیلیک به روش اسپری روی برگ‌ها، گیاه مایه‌زنی شده با نماتود و اسید سالیسیلیک به روش خیساندن خاک[5] (۲۵ میلی‌لیتر اسید سالیسیلیک ۵ میلی‌مولار به ازای ۱ کیلوگرم خاک) بودند (کاتوچ و همکاران[6]، ۲۰۰۵). گیاهچه‌ها پس از مایه‌زنی به مدت ۴۵ روز در شرایط گلخانه (دمای ۲۴-۲۸ درجه سانتی‌گراد، ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی) نگهداری شد و پس از آن ریشه‌ها برای بررسی بیماری به آزمایشگاه منتقل شد. شاخص‌های مورد ارزیابی شامل: تعداد گال‌های روی ریشه گیاه، تعداد کیسهٔ تخم (Egg mass) روی ریشه گیاه، تعداد تخم‌های درون هر کیسهٔ تخم این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۶ تکرار انجام شد (صاحبانی و هادوی، ۱۳۸۶).

آزمایش ارزیابی تغییرات فنل کل گیاه و فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ریشه گوجه فرنگی

در این آزمایش نیز همانند آزمایش قبل گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تهیه، و در مرحله ۶ برگی مایه‌زنی گردیدند. به ازاء هر گیاهچه تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال سن دو نماتود استفاده شد. در این آزمایش تیمارها شامل: ۱) گیاه مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل ۲) گیاه

1- Single egg mass
2- Jepson
3- Hussey and Barker
4- Nandi *et al.*
5- Soil drench
6- Katoch *et al.*

مایه‌زنی شده با نماتود ۳) گیاه مایه‌زنی شده با اسید سالیسیلیک به روش خیساندن خاک (۲۵ میلی لیتر به ازاء هر گلدان ۱ کیلوگرمی) و نماتود ۴) گیاه مایه‌زنی شده با اسید سالیسیلیک به صورت اسپری روی برگ و نماتود بودند. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. آزمایش‌ها به صورت طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی که فاکتور A شامل ۴ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل ۸ زمان نمونه‌برداری ۱، ۲، ۳ ، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ روز بعد از مایه‌زنی با نماتود بود انجام شد و میزان تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، و نیز تغییرات میزان فنل کل در روزهای اول تا هشتم مورد بررسی قرار گرفت (صاحبانی و هادوی، ۱۳۸۶).

تهیه منحنی استاندارد جهت ارزیابی میزان فنل کل

۱۰ میلی‌گرم از اسید کافئیک (Fluka, Germany) در ۵ میلی‌لیتر متانول خالص حل شده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس مقادیر ۰/۵ ، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸ میلی‌لیتر از این محلول جداگانه در لوله‌های آزمایش ریخته و حجم هر لوله با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای صفر کردن دستگاه از محلول فاقد اسید کافئیک استفاده شد (سیورز و همکاران[1]، ۱۹۷۱).

مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف قبلاً تهیه شده اسید کافئیک را در هفت 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 هر کدام از غلظت‌های مختلف اسید کافئیک 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. به منظور تعیین فنل کل عصاره به‌دست آمده در آزمایش‌ها همانند روش تهیه منحنی استاندارد عمل شد. تنها تفاوت در این بود که از ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره استخراج شده گیاه استفاده شد (سیورز و همکاران، ۱۹۷۱).

استخراج فنل گیاه

جهت استخراج ترکیبات فنلی، از یک گرم بافت ریشه گوجه‌فرنگی درون هاون چینی و در درون نیتروژن مایع عصاره‌گیری شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد که pH آن بر روی ۲ تنظیم شده، به آن اضافه گردید، مخلوط حاصله از دو لایه پارچه ململ عبور داده شد، و در شیشه‌های مک کارتی نگهداری شد. در پایان عصاره حاصل در g ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. بخش رویی داخل لوله‌ها حاوی ترکیبات فنلی است که از رسوب بافتی جدا شده و جهت آزمایشات بعدی در لوله‌های درب دار ۱۰ میلی‌لیتری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (محمدی و کاظمی، ۲۰۰۲).

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

به‌منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره مورد آزمایش و تهیه منحنی پروتئین استاندارد جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز از روش برادفورد استفاده شد (براد فورد[2]، ۱۹۶۷).

استخراج پروتئین از بافت گیاه

نیم گرم از بافت گیاهی ریشه در هاون چینی با استفاده از ازت مایع کوبیده و له شد. سپس یک میلی لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مول با ۶ pH به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به

1- Seeveres *et al.*

2- Bradford

میکروتیوب های دو میلی لیتری منتقل و توسط میکروسانتریفوژ در g ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایه رویی برای انجام آزمایش‌ها جدا و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (روونی[1]، ۱۹۹۵).

تهیه عصاره آنزیمی و ارزیابی میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز

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 میلی مول pH ۶/۴ به طوری که حجم نهایی دو میلی‌لیتر باشد در یک لوله آزمایش کوچک کاملاً مخلوط شد و این مخلوط توسط ورتکس به مدت دو دقیقه هوا دهی و سپس دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط صفر گردید. سپس بلافاصله به مخلوط واکنش (ذکر شده در بالا) ۴۰ میکرولیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی مول افزوده و سریع مخلوط نموده بلافاصله تغییرات جذب نور در طول موج ۵۱۵ نانومتر به مدت یک دقیقه با فاصله ۱۰ ثانیه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات جذب نور در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (محمدی و کاظمی، ۲۰۰۲).

تجزیه آماری داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p<0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

در بررسی اثر غلظت‌های اسید سالیسیلیک بر مرگ و میر لارو سن ۲ *M. javanica* در آزمایشگاه غلظت‌های ۳، ۵ و ۷ میلی مولار اسید سالیسیلیک در شرایط آزمایشگاه سبب افزایش معنی‌دار مرگ و میر لاروهای سن ۲ نماتود (به ترتیب به میزان: ۱۸/۳٪، ۲۸/۵۷٪ و ۳۳/۹۶٪)، نسبت به شاهد شد (شکل ۱). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک درصد مرگ و میر لاروهای *M. javanica* نسبت به شاهد افزایش می‌یابد. از آنجا که اسید سالیسیلیک یک ترکیب فنلی است، به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت آن میزان سمیت محیط برای لاروهای نماتود افزایش یافته و در نتیجه مرگ و میر آنها افزایش می‌یابد. عمران زاده (۱۳۸۶) در بررسی مشابه اثر غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک را بر مرگ و میر لاروهای سن دو *M. javanica* به ترتیب ۳۱/۲۸ و ۴۲/۰۶ درصد در مقایسه با شاهد (۳/۲۵۸ درصد) گزارش کرد.

در بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر بیماری در شرایط گلخانه، مایه‌زنی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی (شامل اسپری بر روی برگ‌ها و خیساندن خاک اطراف گیاهچه) توسط غلظت ۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک سبب کاهش موثر بیماری در شرایط گلخانه گردید. نتایج کاهش معنی‌دار تعداد گال، کیسه تخم و تعداد تخم در هر توده تخم را نسبت به شاهد نشان داد. استفاده از اسید سالیسیلیک به صورت اسپری روی برگ‌های گوجه‌فرنگی در مقایسه با روش خیساندن خاک، کاهش موثرتری در میزان بیماری را نشان داد (شکل۲). طبق نتایج آتی تالا[2] ۲۰۰۴) حضور یا غیاب ژن‌های مقاومت عامل تعیین کننده در مقاومت حاصله نسبت به عوامل بیماریزا نیست، بلکه سرعت و مقدار بیان این ژن‌ها و میزان تاثیر این ترکیبات روی پاتوژن هدف است که سبب واکنش سازگاری یا ناسازگاری می‌شود. بنابراین احتمالاً همه گیاهان پتانسیل ژنتیکی برای القاء ژن‌های مقاومت را به‌صورت بالقوه دارند. گیاهان می‌توانند چنین پتانسیلی را به‌صورت ایمنی بعد از تلقیح محدود بوسیله جمعیت پائین پاتوژن، تلقیح به‌وسیله جدایه‌های غیر بیماریزای پاتوژن یا تیمار با مواد شیمیایی که به‌عنوان القاء گر محسوب می‌شوند و مواد

1- Reuveni

2- Attitala

شیمیایی که الیسیتور آزاد می‌کنند، بروز دهند (ملکی زیارتی و همکاران، ۱۳۸۶).

ناندی و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که اسید سالیسیلیک از طریق کاهش تعداد گال و تعداد تخم نماتود *M. javanica* روی بامیه و روی لوبیا چشم بلبلی باعث کاهش بیماری می‌شود. در تحقیق مشابه دیگر، القاء مقاومت در گیاه گوجه‌فرنگی علیه نماتود *M. javanica* با استفاده از ترکیب بتا آمینوبوتیریک اسید(BABA) با نشان دادن اثر آن در کاهش بیماری (ارزیابی تعداد گال، تعداد تخم نماتود و وزن تر ریشه و ساقه) اثبات شد (اوکا و همکاران[1]، ۱۹۹۹). در تحقیقی نشان داده شد که استفاده از SA علیه نماتودهای *Globodera rostochiensis* و *G. pallida* موجب القاء سنتز پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی شده است (ناندی و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین کمستر و همکاران[2] (۲۰۰۱) نشان دادند که مقاومت علیه نماتود مولد سیست *Heterodera trifolli* در گیاهان شبدر با کاربرد اسید سالیسیلیک القاء می‌شود.

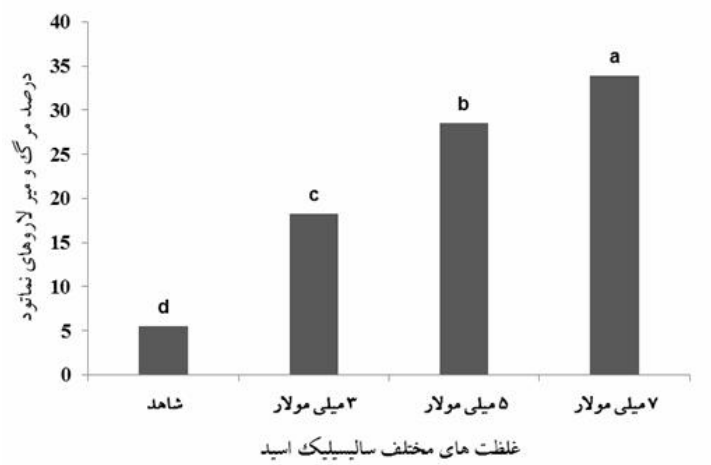
در بررسی میزان تغییرات فنل کل در روز اول پس از مایه زنی هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد، از روز دوم افزایش میزان فنل کل در گیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک مشهود بود، به‌طوری که تا آخرین روز نمونه‌برداری دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد بود. در گیاهان آلوده (به نماتود) تیمار شده با اسید سالیسیلیک در روز چهارم بیشترین میزان فنل کل در بین روزهای نمونه‌برداری و در بین تیمارها مشاهده شد (۰/۷۵ میکروگرم بر گرم ریشه گیاه) و در روزهای بعد این میزان دارای روند کاهشی بود. در گیاه سالم تیمار شده با اسید سالیسیلیک نیز میزان فنل کل بجز روز اول در دیگر روزهای نمونه‌برداری دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد بود و بیشترین میزان آن در روز سوم مشاهده شد.

میزان فنل کل در گیاه آلوده به نماتود ناگهان در روز پنجم افزایش یافت و بیشترین میزان آن در روز ششم مشاهده شد و در روز بعد با شیب تندی رو به کاهش گذاشت (شکل ۳). از آن‌جا که میزان فنل کل در گیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک جز در روز اول، در دیگر روزهای نمونه‌برداری دارای اختلاف معنی‌دار با دو تیمار گیاه آلوده به نماتود و گیاه سالم بود، می‌توان کارایی اسید سالیسیلیک را در القاء ترکیبات فنلی گیاه گوجه‌فرنگی نتیجه‌گیری کرد. همچنین میزان القاء ترکیبات دفاعی گیاه توسط نماتود کمتر از القاء توسط اسید سالیسیلیک بوده است، که می‌توان این نتایج را به حرکت بین سلولی نماتود مولد گره و بکارگیری مکانیسم‌های خاموش کننده پاسخ‌های دفاعی بیوشیمیایی و مهار مکانیسم‌های مقاومت گیاه نسبت داد (عمران زاده، ۱۳۸۶). گیاهان به‌منظور از بین بردن اثرات رادیکال‌های آزاد ناشی از استرس‌های زنده و غیر زنده مکانیسم‌های دفاعی خود را به‌کار می‌گیرند، تجمع چندین آنزیم از جمله پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکساید دیسمیوتاز، پلی فنل اکسیداز و ترکیباتی شبیه به فنل به عنوان متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به استرس در گیاهان به اثبات رسیده است (هونتی و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات نشان می‌دهند که کاهش مقاومت در دماهای مختلف می‌تواند با کاهش ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های PAL و پراکسیداز مرتبط باشد. کاهش سطح این آنزیم‌ها و سوبستراهایشان توان دفاع فعال را در سلول کاهش داده و گیاه را برای حمله بیمارگر مستعد می‌سازد (زاچو و همکاران[3]، ۱۹۹۵). اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کینون‌های ضد میکروبی توسط آنزیم‌های اکسیدکننده طی واکنش ناسازگار رخ می‌دهد و مقاومت گیاهان به بیماری اغلب با فعالیت این آنزیم‌ها و اکسیداسیون

1- Oka *et al.*
2- Kempster *et al.*
3- Zacheo *et al.*

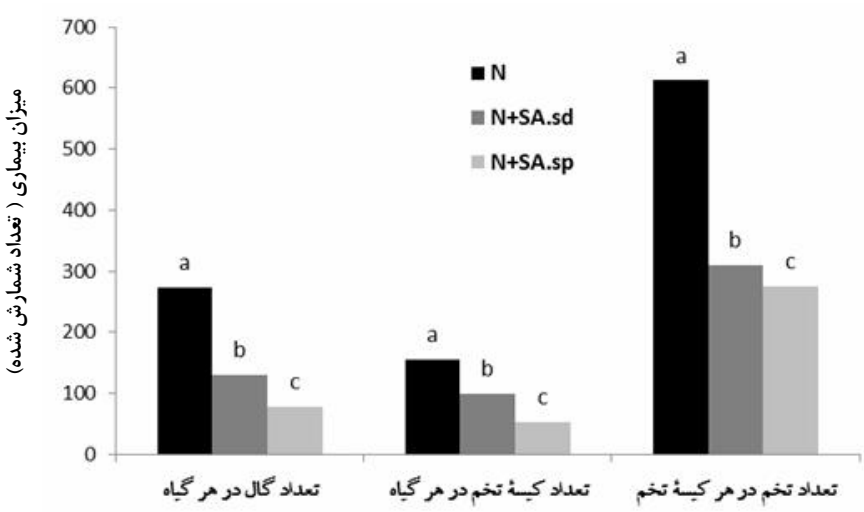
ترکیبات فنلی در بافت میزبان مرتبط می‌باشد (محمدی و کاظمی، ۲۰۰۲).

ناندی و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که استفاده از اسید سالیسیلیک علیه نماتودهای طلایی سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*) و *G.pallida* موجب القاء سنتز پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی می‌شود.



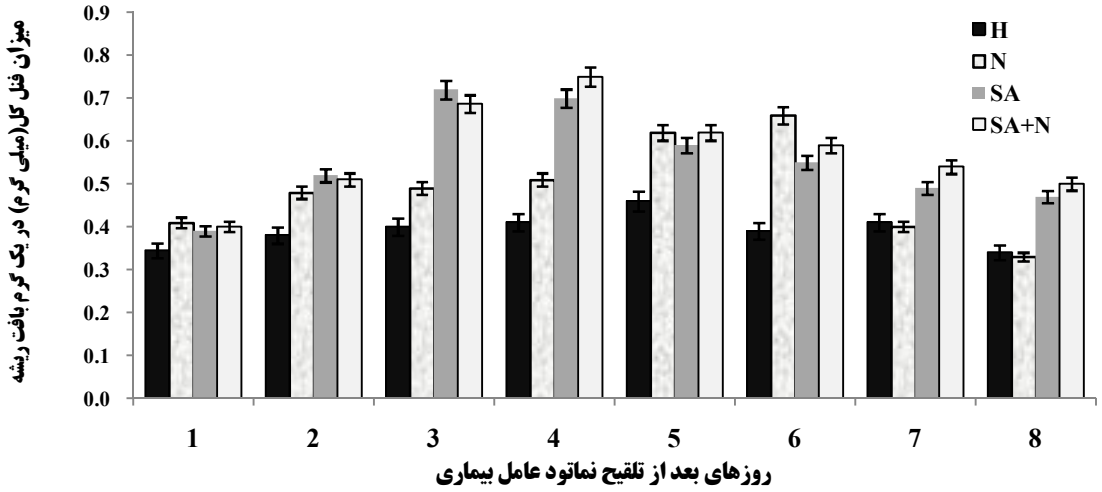
شکل ۱ - اثر غلظت های اسید سالیسیلیک برمرگ ومیر لارو سن ۲ *M.javanica* در آزمایشگاه

هر عدد میانگین ۵ تکرار است. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن ($P<0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.



شکل ۲- اثر غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک بر میزان بیماری در شرایط گلخانه

هر تیمار دارای ۶ تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با هم اختلاف معنی‌دار دارند (آزمون دانکن (۰/۰۵ >p). *N*: گیاه مایه‌زنی شده با نماتود، N+SA.sd : اسید سالیسیلیک به روش خیساندن خاک + نماتود، N+SA.sp : اسید سالیسیلیک به روش اسپری روی برگ ها + نماتود می‌باشند. تعداد تخم در هر کیسهٔ تخم متوسط تعداد ۱۰ کیسهٔ تخم است.



شکل ۳- مقایسه میانگین تغییرات میزان فنل کل (میکروگرم بر گرم ریشه گیاه) در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی در اثر مایه زنی با نماتود مولد گره ریشه *M. javanica* و اسید سالیسیلیک

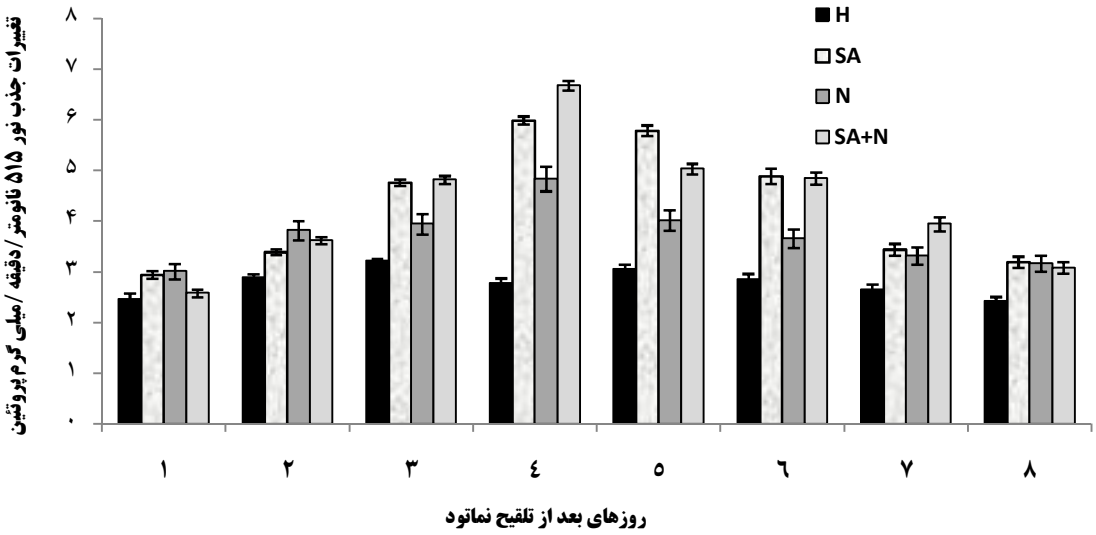
هر عدد میانگین چهار تکرار است و بار روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می باشند. SA : سالیسیلیک اسید (اسپری روی برگ)، N: نماتود (*M. javanica*)، H: گیاه سالم می باشند.

در تحقیق مشابهی ملکی زیارتی و همکاران نشان دادند که نماتود بر مسیر سنتز ترکیبات فنلی تاثیر داشته و با نفوذ لارو سن دو *M. javanica* و شروع تغذیه نماتود در هفته اول بعد از مایه کوبی، میزان فنل کل در بافت گیاه گوجه‌فرنگی، در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت. همچنین تیمار گیاه گوجه فرنگی با اسید سالیسیلیک سبب افزایش میزان فنل کل و نهایتاً ایجاد مقاومت القایی علیه باکتری *Xanthomonas vasicatoria* شد (کاوالا کانتای و همکاران[1]، ۲۰۰۶). ولت و همکاران[2] (۱۹۹۸) نشان دادند که تیمار گیاه موز با نماتود *Rhadopholus similis* باعث تجمع مواد فنلی در سلول‌های پارانشیمی اطراف آوندها شده است. در این ارتباط غلظت بالایی از ترکیبات فنلی از جمله ۳- هیدروکسی تیراسین در گیاه تجمع یافت که از جمله ترکیباتی هستند که قبل از مایه‌زنی با عوامل آنتاگونیست یا پاتوژن در ریشه گیاه سالم وجود داشت، ولی مایه‌زنی با این عوامل سبب افزایش میزان آن در گیاه شد.

در بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در روز اول پس از مایه زنی تیمارها اختلاف معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیم نشان ندادند. در روز دوم تیمارهای گیاه آلوده مایه‌زنی شده با اسید سالیسیلیک و گیاه آلوده دارای اختلاف معنی‌داری با شاهد بودند و در روزهای سوم و چهارم تیمارهای گیاهان مایه‌زنی شده با اسید سالیسیلیک دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار گیاه آلوده و شاهد بودند. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در روز چهارم و در تیمار گیاه آلوده مایه‌زنی شده با اسید سالیسیلیک مشاهده شد، که با بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار گیاه سالم مایه‌زنی شده با اسید سالیسیلیک که در همین روز بود اختلاف معنی‌دار نداشت، اما با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود. در روزهای بعد میزان فعالیت آنزیم روند کاهشی داشت (شکل ۴).

در گیاه آلوده تیمار شده با اسید سالیسیلیک در روز پنجم کاهش فعالیت آنزیم با شدت بیشتری (تغییر از کلاس A به کلاس B) نسبت به گیاه سالم تیمار شده با اسید سالیسیلیک مشاهده شد، می‌توان این تغییر را با نقش نماتود در تقلیل و یا تعدیل فعالیت آنزیم و در نتیجه عکس‌العمل دفاعی گیاه مرتبط دانست.

1- Cavalcanti *et al.*
2- Vallette *et al.*



شکل٤- تغییرات میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ریشه گوجه فرنگی در اثر مایه زنی با نماتود *M. javanica* و اسید سالیسیلیک (تغییرات جذب در ۵۱۵ نانومتر در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)

هر عدد میانگین چهار تکرار است. و بار روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می باشند. SA: اسید سالیسیلیک (اسپری روی برگ)، N: نماتود (*M. javanica*)، H: گیاه سالم می باشند.

بیان زیاد آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاهان گوجه‌فرنگی به اثبات رسیده است و بیان زیاد این آنزیم با افزایش مقاومت به پاتوژن‌ها همراه است (لی و استفنز[1]، ۲۰۰۲). ویلیامسون و هوسی[2] (۱۹۹۶) در ریشه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود مولد گره ریشه *Meloidogyne* spp.، ژن‌هایی را در مکانیسم‌های دفاعی گیاه شناسایی کردند که باعث القاء آنزیم‌هایی مانند پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، لیپوکسی ژناز و پراکسیداز می‌شوند (ویلیامسون و هوسی، ۱۹۹۶). کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک یا مشابه سنتزی آن یعنی بنزو- ۱و۲و۳ – تیادیازول- ۷- کربوتیوئیک اسید- اس- متیل استر (BTH) به‌عنوان محرک مقاومت در بیان ژن‌های PR و در نتیجه افزایش مقاومت نسبت به پاتوژن موثر است (شاه، ۲۰۰۳). میچل و والتر[3] (۲۰۰۴) نشان دادند که تیمار برگ‌های اولیه جو با فسفات پتاسیم منجر به کاهش معنی‌دار آلودگی برگ‌های ثانویه به قارچ عامل سفیدک پودری *Blumeria graminis* fsp *hordei* می‌گردد. تیمار برگ های اولیه با فسفات منجر به افزایش معنی‌داری در فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز، پراکسیداز و لیپوکسیژناز در برگ‌های ثانویه می‌گردد. فعالیت آنزیمی، به ویژه فنیل آلانین آمونیالیاز و پراکسیداز زمانی افزایش یافت که برگ‌های ثانویه گیاهان تیمار شده با فسفات با سفیدک سطحی مایه زنی گردیدند.

مقاومت القایی با تشخیص محرک‌ها آغاز می‌شود و منجر به تولید مولکول‌های سیگنال که در فواصل طولانی منتقل می‌شوند، می‌گردد و فرایندهای گوناگونی که در توسعه پتانسیل دفاعی گیاهانی که مایه‌کوبی ثانویه پاتوژن را درک کرده‌اند شکل می‌گیرد. درک محرک‌ها از طریق باند شدن مولکول‌های محرک به سایت‌های پذیرنده روی غشاءها و دیواره‌های سلول‌های گیاهی انجام می‌گیرد. تولید و طبیعت سیگنال‌ها، طرز انتقال و واکنش آن‌ها موضوع مهمی در تحقیقات آینده می‌باشد (مک دوول و ووفندن، ۲۰۰۳).

1- Li and Steffens
2- Wiliamson and Hussay
3- Mitchel and Walter

نظر به کنترل موفق بیماری ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در آزمایشگاه و گلخانه وهمین طور القاء مکانیسم‌های دفاعی گیاه به وسیلهٔ این محرک شیمیایی این ماده می‌تواند به عنوان عاملی موثر جهت القاء مقاومت و کنترل بیماری‌های نماتودی ریشه و به خصوص کنترل نماتود مولد گره ریشه به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

بودجه این طرح از محل اعتبار طرح حوزه معاونت پژوهشی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تامین شده است، لازم می‌دانم کمال تشکر را از این حوزه داشته باشم. همچنین از دکتر جلال غلام نژاد، دکتر محمد ناصری نسب، نگین ناصری نسب و یلدا غلام نژاد که طی مراحل تحصیل همواره همراهم بوده‌اند بسیار سپاسگزارم.

منابع

۱- صاحبانی، ن.، هادوی، ن. ۱۳۸۶. مطالعهٔ تأثیر نماتود مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در ریشهٔ گوجه فرنگی در تعامل با قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۴۳: ۲۱۷-۲۲۵.

۲- عمران زاده، ف. ۱۳۸۶. القاء مقاومت به نماتود مولد گره ریشه (*M. javanica*) در خیار در گلخانه به وسیله برخی محرک های شیمیایی و میکروبی. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران. ۱۵۵ ص.

۳- ملکی زیارتی، ح.، صاحبانی، ن.، رهنما، ک.، نوری، ن. ۱۳۸۶. اثر قارچ *Trichoderma harzianum* در سیستمیک شدن ترکیبات فنلی ایجاد شده در گیاه گوجه فرنگی علیه نماتود مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica*. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۴(۶) :۱۸۶-۱۶۱.

4- Attitalla, I. H. 2004. Biological and molecular characteristics of microorganism stimulated defense response in Lycopersicon esculentum L. Comprehensive Summary of Uppsala Dissertation from the Faculty of Science and Technology, 943, Acta Universitatis Upsaliensis, Sweden.

5- Bradford, M.M. 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.

6- Cavalcanti, F.R., Resende, M., Carvalho, P. and Silveira, 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.

7- Honty, K., Hevesi, M., Toth, M., and Stefanovits-Banyai, E. 2005. Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia amylovora*, Proceedings of the 8th Hungarian Congress on Plant Physiology and the 6th Hungarian Conference on Photosynthesis. Acta Biologica Szegediensis, 49: 127-129.

8- Hussey, R.S., and Barker, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Journal of Plant Disease Reporter, 57: 1025-1028.

9- Jepson, S.B.1987. Identification of root knot nematodes. Cambrian News Ltd. CAB International, Wallingford, UK. 256 pp.

10- Katoch, R., Mann, A. P. S., Sohal, B. S. 2005. Enhanced enzyme activities and induction of acquired resistance in pea with elicitors. Journal of Vegetable Science, 11: 67-83.

11- Kempster, V.N., Davies, K.A. and Scott, E.S. 2001. Chemical and biological induction of resistance to the clover cyst nematode (*Heterodera trifolii*) in white clover (*Trifolium repens*). Journal of Nematology, 3: 35-43.

12- Kloepper, J.W., Tuzun, S. and Kuc, J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. Biocontrol Science and Technology, 2: 349-351.

13- Li, L., and Steffens. J. C. 2002. Over expression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Journal of Planta, 215: 239-247.

14- Mitchel, A. F., Walter, D. F. 2004. Ptassium phosphate induces systemic protection in barely to powdery mildew infection. Pest Management Science, 60: 126-134.

15- McDowell J.M., and Woffenden B. J. 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. Trends in Biotechnology, 21: 178-183.

16- 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. Journal of Plant Science, 162: 491-498.

17- Nandi, B., Kundu, K., Banerjee, N., and Babu, S.P.S. 2003. Salicylic acid induced suppression of *Meloidogyne incognita* infestation of okra and cowpea. Journal of Nematology, 5: 747-752.

18- Oka, Y., Cohen, Y., and Speigel, Y. 1999. Local and systemic induced resistance to the root knot tomato by DL β-amino-n-butyric acid. Journal of Phytopathology, 89: 1138-1143.

19- Ogallo, J.L., and McClure, M.A. 1996. Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematode in tomato. Journal of Phytopathology, 86: 498-501.

20- Oort, A. J. P., and Van Andel, O.M. 1960. Aspects in chemotherapy. Mededel. Opz. Gent, 25: 961-992.

21- Prithiviraj, B., Bis, H. P., Jha, A. K., and Vivanco., J. M. 2005. *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of

salicylic acid on the pathogen or by SA- dependent, NPR1 independent host responses. Plant Journal, 42: 417-432.

22- Redman, R., Freeman S., Clifton DR., Morrel j., Brown G., Rutsy J. 1994. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. Plant Physiology, 119: 795-804.

23- Reuveni, R. 1995. Biochemical marker of disease resistance. In: Singh, R. P., and Singh, U. S. (eds), Molecular methods in plant pathology, first ed. Taylor & Francis, Inc. England. pp. 99-114.

24- Sahebani, N., and Hadavi, N. 2009. Induction of H_2O_2 and related enzymes in tomato roots infected with root knot nematode (*M. javanica*) by several chemical and microbial elicitors. Biocontrol Science and Technology, 19: 301-313.

25- Seevers, D. M., Daly, J. M., and Catedral, F. F. 1971. The role of peroxidase isozyme in resistance to wheat stem rust disease. Journal of Plant Physiology, 48: 353-360.

26- Shah, J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. Current Opinion in Plant Biology, 6: 365- 295.

27- Sikora, R.A., Niere, B., and Kimenju, J. 2003. Endophytic microbial biodiversity and plant nematode management in African agriculture. In: Neuenschwander, P., Borgermeister, C. and Langewald, J. (ed), Biological control in IPM systems in Africa, Vol. 51. CABI Publishing. Wallingford. pp: 179-192.

28- Vallette, C., Andary, C., Geiger, J. p., Sarah, J. L., and Nicol, M. 1998. Histochemical and cytological investigations of phenols in roots of bananas infected the burrowing nematode *Rhadopholus similes*. Phytopathology, 82: 1141- 1148.

29- Wiliamson, V.M., and Hussay, R. S. 1996. Nematode Pathogensis and resistance in plants. The Plant Cell, 8: 1735-1745

30- Yalpini, N., Silverman, P., and Raskin, I. 1991. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus- inoculated tobacco. The Plant Cell, 3: 809-818.

31- Yao, H.J., and Tian, S.P. 2005. Effect of biocontrol agent methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. Journal of Applied Microbiology, 98: 941-950.

32- Zacheo, G., Beleve - Zacheo T., Pacoda, D., Orlando, C., Durdins, RD. 1995. The association between heat – induced susceptibility of tomato to Meloidogyne incognita and peroxidase activity. Physiological and Molecular Plant Pathology, 46: 491- 507.

33- Zheng, H., Cui, C., Zhang, Y., Wang, D., Jing, Y., Kim, K. Y. 2005. Active changes of lignifications- related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capasici*. Journal of Zhejiang University science, 6: 778-786.