بررسی روند تولید آنزیم‌های دفاعی در دو رقم گوجه‌فرنگی علیه نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* race 2 در شرایط گلخانه

امیر قاسم‌زاده[۱]، سالار جمالی[*۲]، مسعود اصفهانی[۳] و حسن پدرام فر[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲-* **نویسنده مسوول**: استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان (jamali@guilan.ac.ir)

۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۴- مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۲

چکیده

به منظور بررسی اثر نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne incognita* race2 بر روند تولید آنزیم‌های دفاعی گوجه‌فرنگی، آزمایشی گلدانی در شرایط گلخانه اجرا شد. آزمون به صورت کرت دو بار خرد شده در قالب طرح کاملا تصادفی روی دو رقم حساس (فلات وای) و متحمل (جینا وی اف) گوجه فرنگی با چهار سطوح جمعیتی نماتد صفر (شاهد)، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ عدد لارو سن دوم با چهار زمان مختلف نمونه‌برداری (صفر، ۳، ۵ و ۷ روز پس از تلقیح) و در چهار تکرار انجام شد. به این منظور، پس از نمونه‌برداری، خالص سازی، شناسایی و تکثیر، گونه و نژاد نماتد تعیین شد. با تکثیر جمعیت خالص نماتد روی رقم روتگرز گوجه‌فرنگی، مایه تلقیح مورد نیاز به دست آمد. سطوح جمعیتی نماتد در مرحله چهار برگی تلقیح و آنزیم‌های مورد نظر در زمان‌های ذکر شده اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که با افزایش سطوح جمعیتی نماتد فعالیت‌های بیوشیمیایی گیاه تحت تاثیر قرار گرفته و میزان پروتئین کل کاهش یافت. میزان فعالیت آنزیمهای دخیل در واکنش دفاعی میزبان نظیر کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز افزایش نشان داد. بیشترین میزان افزایش در آنزیم کاتالاز و در رقم متحمل مشاهده شد. در حضور تنش وارده از سوی نماتد، گیاه مکانیسم دفاعی آنزیمی خود را فعال نموده که این افزایش فعالیت، ۵ روز پس از مایه زنی از بیشترین مقدار برخوردار بود.

کلید واژگان: کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز، گوجه فرنگی، Meloidogyne incognita

مقدمه

گوجه‌فرنگی[۱] گیاهی است متعلق به تیره سیب‌زمینی‌سانان[۲] و از محصولات مهم کشت شده در جهان است که به عنوان میوه، سبزی و فرآورده صنعت دارویی استفاده می‌شود (Hasandokht, 2012). این گیاه الگوی مناسبی برای تحقیقات فیزیولوژیکی، سلولی، بیوشیمیایی و ژنتیک مولکولی به شمار می‌رود. تحقیقات انجام شده روی گوجه‌فرنگی، دانش ما را درباره برخی از فرآیندهای رشد افزایش داده است (Shekari et al., 2006). با توجه به گزارش سازمان خواربار و کشاورزی سازمان ملل متحد[۳] در حال حاضر بیش از

1- *Lycopersicon esculentum* Mill.

2- Solanaceae

3- FAO

چهار میلیون و ششصد هزار هکتار از اراضی دنیا به کشت گوجه‌فرنگی اختصاص دارد. ایران ۴/۷ درصد از تولید جهانی را به خود اختصاص داده است. در بین استانهای کشور، استان آذربایجان شرقی دارای بیشترین میزان تولید است. همچنین استان فارس در سال زراعی ۹۲-۹۱ مقام نخست سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی را از آن خود کرد. متوسط عملکرد گوجه‌فرنگی در کشور، بالاتر از متوسط جهانی و در حدود ۳۸ تن در هکتار می‌باشد. از نظر تولید در سال ۲۰۱۲، ایران با شش میلیون تن در سال، مقام ششم را در جهان دارا بوده است (Anonymous, 2014).

نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* از تمام نواحی دنیا و روی بسیاری از گیاهان زراعی و گونه‌های علف هرز گزارش شده است. این نماتد از نظر میزان خسارت وارده به محصولات کشاورزی، یکی از مهمترین نماتدهای انگل گیاهی است (Perry et al., 2010). دامنه میزبانی وسیع، رفتار انگلی، چرخه زندگی کوتاه و تولیدمثل بالا این نماتد را در ردیف عوامل مهم محدود کننده تولیدات کشاورزی قرار داده است (Manzanilla lopez et al., 2004). نماتد برای عبور از مراحل مختلف زندگی به مقادیر متفاوتی انرژی نیاز دارد که این مقدار در نماتدهای ماده بالغ، حداکثر است. با توجه به اینکه نماتد مواد مورد نیاز برای تولید انرژی لازم را از میزبان دریافت می‌کند، با افزایش سن نماتد، فشار وارده بر میزبان افزایش خواهد یافت (Chen *et al*., 2003). در رابطه متقابل پارازیتیسم در طول زمان، ساز و کارهای دفاعی در گیاهان ، شامل ساز و کارهای آنزیمی و غیر آنزیمی تکامل یافته‌اند (Hollosy, 2002). سازوکارهای آنزیمی شامل فعالیت آنزیم‌های مختلفی است که به عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان در نظر گرفته می‌شوند، زیرا دارای خاصیت به دام اندازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق ترکیبات فنلی می‌باشند (Tian and Li, 2007). در حفاظت غیرآنزیمی، تولید آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی افزایش می‌یابد (Mittler, 2002). افزایش غلظت فلاونوئیدها، ناشی از فعالیت زیاد آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و یا سرعت بالای سنتز آن تحت شرایط تنش است (Guo and Wang, 2008).

یک آزمایش به منظور مقایسه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تعامل نماتد مولد گره‌ریشه *M. javanica* و قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در گیاه گوجه‌فرنگی رقم روما- وی اف[1] (مقاوم به قارچ و حساس به نماتد) انجام گرفت. نتایج نشان داد که نماتد نه تنها قادر است فعالیت آنزیم را محدود نماید، بلکه می‌تواند مانع از افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در مقابل قارچ می‌شود. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که آلودگی نماتدی در گیاه موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز و تشدید بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی شد (Sahebani et al., 2008). آزمایشی دیگر به منظور مطالعه تأثیر نماتد مولد گره‌ریشه *M. javanica* بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در ریشه گوجه فرنگی در تعامل با قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* صورت گرفت. مایه‌زنی یک قسمت از ریشه گیاه به وسیله نماتد سبب بروز و تشدید بیماری فوزاریومی در قسمت دیگری از ریشه همان گیاه مایه‌زنی شده با قارچ شد. هم‌چنین نماتد نه تنها قادر به کاهش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در محل فعالیت و تغذیه خود بود، بلکه توانست فعالیت این آنزیم را به میزان قابل توجهی در دیگر قسمت‌های ریشه نیز کاهش دهد (Sahebani and Hadavi, 2004). از آنجایی که نماتدها می توانند سبب ایجاد تنش زیستی در گیاه شوند، اطلاع از تأثیر جمعیت‌های نماتد در زمانهای مختلف و بررسی واکنشهای دفاعی ارقام میزبان از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر سطوح مختلف جمعیت نژاد دوم *Meloidogyne incognita* بر روند تولید آنزیم‌های دفاعی در زمانهای متفاوت، در دو رقم حساس و متحمل گوجه‌فرنگی بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه مایه تلقیح نماتد (*M. incognita*)

طی بازدیدهای انجام شده از گلخانه‌های گوجه‌فرنگی استان گیلان، نمونه‌برداری‌های لازم از نماتد مولد گره صورت

1- Roma VF

گرفت. پس از شستشوی ریشه ها با استفاده از روش تک کیسه تخم، به تکثیر نماتد در سطح گلخانه اقدام گردید. هر یک از توده‌های تخم در سوراخ‌هایی به عمق ۳ تا ۵ سانتی‌متر مجاور ریشه‌های نشاء گوجه‌فرنگی واریته روتگرز قرار داده شد. گلدان‌ها حاوی یک کیلوگرم خاک استریل شده با اتوکلاو به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک و نیم اتمسفر و نشاءها در مرحله ۴-۲ برگی حقیقی بودند. این گیاهچه‌ها به مدت ۴۶ تا ۶۰ روز در شرایط گلخانه نگهداری شدند. پس از تکثیر نماتد و ایجاد گال روی ریشه، اقدام به شناسایی نماتد گردید. استریل کردن گلدان‌های مورد استفاده و بذور گوجه‌فرنگی با محلول ده درصد هیپوکلریدسدیم تجاری انجام شد.

شناسایی گونه با استفاده از برش انتهای بدن نماتد ماده یا الگوی اثر انگشتی[1] مطابق روش پیشنهادی Taylor and Netscher (1974) و با استفاده از کلید Jepson (1987) صورت گرفت. جهت تثبیت ماده‌ها در داخل بافت و رنگ آمیزی آنها از روش Hartmen and Sasser (1985) استفاده شد. به منظور بررسی مشخصات ریخت شناسی و ریخت سنجی لاروهای سن دوم، ازکیسه‌های تخم نماتد ماده برش داده شده برای تفریخ لاروها و تهیه اسلاید استفاده گردید.

تعیین نژاد از طریق آزمون میزبان‌های افتراقی و بر اساس روش پیشنهادی Barker et al. (1985) انجام شد. جهت بدست آوردن جمعیت انبوه و خالص، چندین دوره متوالی تکثیر نماتد روی گوجه‌فرنگی رقم روتگرز انجام شد. مایه تلقیح از گوجه‌فرنگی‌هایی که به روش تک کیسه تخم آلوده شده بودند، تهیه گردید. جهت استخراج مایه تلقیح، براساس روش Hussy and Barker (1973) عمل شد. در نهایت لاروهای سن دوم استحصال شده توسط پتری مدرج مورد شمارش قرار گرفتند.

تهیه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی:

بذور ضدعفونی شده رقم‌های جینا وی اف[2] (رقم متحمل) و فلات وای[3] (رقم حساس) از شرکت فلات ایران تهیه شد (Gharabadian *et al*., 2012). این بذور در گلدان‌های حاوی خاک استریل شامل خاک، ماسه، کود برگ (۱:۱:۲) و مقداری پرلیت استریل کشت گردید. هر گیاهچه در مرحله ۶-۴ برگی توسط جمعیت‌های مختلف نماتد مایه‌زنی شد.

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت کرت-های دو بار خرد شده با چهار تیمار نماتدی در چهار بازه زمانی، روی دو رقم با در نظر گرفتن چهار تکرار صورت گرفت.

۱- گیاه شاهد از هر دو رقم (مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل).

۲ - رقم جینا وی اف مایه‌زنی شده با سه سطح نماتدی شامل ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتد در یک کیلوگرم خاک.

۳- رقم فلات وای مایه‌زنی شده با سه سطح نماتدی شامل ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتد در یک کیلوگرم خاک.

گیاهچه‌ها در تمام طول مدت آزمایش در شرایط گلخانه (۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. در چهار بازه زمانی صفر، ۳، ۵ و ۷ روز پس از مایه زنی، اقدام به نمونه‌برداری و اندازه‌گیری آنزیم‌های دفاعی شد.

سنجش پروتئین به روش Bradford (1979) و با استفاده از طول موج ۵۹۵-۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. برای تهیه محلول‌های استاندارد، در ابتدا از پروتئین سرم گاوی[4] به میزان ۵ میلی‌گرم در ۱ میلی-لیتر آب مقطر، استوک اولیه تهیه شد. سپس غلظت‌های مشخصی از محلول‌های استاندارد به حجم نهایی ۱۰۰۰ میکرولیتر ساخته شد.

معرف برادفورد مطابق روش گفته شده در حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه گردید. معرف در ابتدا به رنگ آبی بود و

1- Perineal pattern

2- Gina VF
3- Falat Y
4- BSA

پس از اضافه کردن آب مقطر، به رنگ قهوه‌ای متمایل شد. استخراج آنزیم‌ها و پروتئین محلول با استفاده از روش Stone and Gifford (1977) انجام شد. لوله‌ها تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. ۸ عدد لوله آزمایش در نظر گرفته و پس از شماره‌گذاری، در هر کدام ۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد ریخته شد. در لوله شماره یک، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول شاهد و در لوله‌های شماره دو تا هفت، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد اضافه شد، اما به لوله شماره ۸ عصاره آنزیمی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر افزوده شد. همه لوله‌ها ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. دستگاه اسپکتروفوتومتر در حالت برادفورد تنظیم و در ابتدا با شاهد صفر شد و سپس محلول‌های استاندارد به ترتیب در دستگاه قرار داده و در نهایت غلظت نمونه مجهول (لوله شماره ۸) قرائت شد. سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش Chance and Maehly (1955) انجام شد. تغییرات جذب محلول واکنش در طول موج ۴۷۰ نانومتر در بازه زمانی ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم براساس میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شده است. آزمایش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بر اساس روش Kar and Mishra (1976) انجام شد. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم براساس میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شده است.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز براساس روش Chance and Maehly (1955) انجام شد. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم براساس میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شده است.

سنجش میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز مطابق با روش فوتوشیمیایی Dickerson *et al.,* (1984) انجام شد. طول موج جذبی برای این آنزیم ۲۹۰ نانومتر تعیین شده که پس از متوقف شدن واکنش با اسیدکلریدریک ۶ مولار، میزان ترانس سینامیک اسید تولید شده از فنیل آلانین در مدت ۱ دقیقه برآورد گردید. داده‌ها براساس روش تجزیه واریانس و توسط نرم افزار SAS تجزیه و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی صورت گرفت.

نتایج و بحث

پروتئین کل

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف جمعیتی نماتد، زمان‌های مختلف نمونه‌برداری، اثر متقابل رقم در سطوح جمعیتی نماتد و اثر متقابل سطوح جمعیتی نماتد در زمان نمونه‌برداری تفاوت آماری معنی‌داری در سطح یک درصد وجود داشت و همچنین تفاوت بین ارقام و اثر متقابل رقم در زمان‌های نمونه‌برداری در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل رقم در سطوح جمعیتی نماتد نشان داد که بین کلیه تیمارهای جمعیتی نماتد با شاهد در هر دو رقم تفاوت آماری معنی‌داری در سطح یک درصد وجود داشت. همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل رقم در زمان‌های نمونه‌برداری نشان داد که بین تمام زمان‌های نمونه‌برداری با زمان اول نمونه‌برداری در هر دو رقم، تفاوت آماری معنی‌داری در سطح یک درصد وجود داشت. همچنین با مقایسه میانگین اثر متقابل زمان‌های نمونه‌برداری در سطوح جمعیتی نماتد، بین هیچ کدام از تیمارهای سطوح جمعیتی نماتد با شاهد در زمان اول نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری دیده نشد ولی در زمان‌های دوم، سوم و چهارم تفاوت بین کلیه تیمارهای نماتدی با شاهد در سطح یک درصد معنی‌دار بود. نتایج کلی حاکی از آن بود که با افزایش سطوح جمعیتی نماتد، میزان پروتئین کل کاهش یافت. این کاهش در رقم فلات وای به مراتب بیشتر از رقم جینا وی اف بود. همچنین بیشترین میزان کاهش در زمان سوم نمونه‌برداری مشاهده شد (جداول ۱، ۵، ۷ و ۸).

کاتالاز

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف جمعیتی نماتد، زمان‌های مختلف نمونه‌برداری

و کلیه اثرات متقابل دو گانه و سه گانه تفاوت آماری معنی-داری در سطح یک درصد وجود داشت. همچنین مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل رقم در تیمار سطوح جمعیتی نماتد در زمان نمونه‌برداری نشان داد که در زمان اول نمونه-برداری بین هیچ کدام از تیمارهای سطوح جمعیتی نماتد با شاهد در هر دو رقم، تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت ولی در زمان‌های دوم، سوم و چهارم نمونه‌برداری بین کلیه تیمارهای سطوح جمعیتی نماتد با شاهد، این تفاوت در سطح یک درصد در هر دو رقم معنی‌دار بود. به طورکلی، با افزایش جمعیت نماتد میزان آنزیم کاتالاز افزایش یافت که این افزایش در رقم جینا وی اف مشهودتر بود. بیشترین میزان این آنزیم در زمان سوم و کمترین آن در زمان اول نمونه‌برداری ثبت شد (جدول ۲ و ۳). آنزیم کاتالاز واجد نقش آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این آنزیم با پاک‌سازی رادیکال پراکسیدهیدروژن نقش مهمی در تنظیم غلظت آن دارد (Navabpour, 2012) و توانایی گیاه برای تنظیم عمل پروتئین‌ها براساس مقاومت آنها می‌باشد(Zhong et al., 2009).

پراکسیداز

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین ارقام تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد و بین سطوح مختلف جمعیتی نماتد، زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و کلیه اثرات متقابل دو گانه و سه گانه تفاوت آماری معنی‌داری در سطح یک درصد وجود داشت. نتایج مقایسه میانگین داده-های اثر متقابل رقم در تیمار سطوح جمعیتی نماتد در زمان نمونه‌برداری نشان داد که در زمان اول نمونه‌برداری بین هیچ کدام از تیمارهای سطوح جمعیتی نماتد با شاهد در هر دو رقم تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت، ولی در زمان‌های دوم، سوم و چهارم نمونه‌برداری بین کلیه تیمارهای سطوح جمعیتی نماتد با شاهد تفاوت آماری معنی‌داری در سطح یک درصد در هر دو رقم وجود داشت. نتایج کلی حکایت از آن دارد که با افزایش سطوح جمعیتی، میزان آنزیم پراکسیداز بیشتر شده و این میزان در رقم جینا وی اف بیشتر از رقم فلات وای بود. همچنین بیشترین میزان این آنزیم در زمان سوم و کمترین آن در زمان اول نمونه‌برداری ثبت شد (جدول ۲ و ۳). نتایج بدست آمده با نتایج تحقیق انجام شده روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در تعامل نماتد گونه *Meloidogyne javanica* و قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*، هم‌خوانی نشان داد (Sahebani et al., 2008). افزایش فعالیت پراکسیداز در اثر تنش خشکی در برنج نیزگزارش شده است (Sharma and Dubey, 2005). پراکسیدازها گلیکوپروتئین‌هایی هستند که با مصرف پراکسیدهیدروژن[1]، اکسیداسیون ترکیبات آلی و غیر آلی را کاتالیز می‌کنند. این پروتئین‌ها براساس وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، توالی اسید آمینه، روابط سرولوژیکی و محل و نوع فعالیت بیولوژیکی به ۱۷ خانواده تقسیم شده‌اند (VanLoon et al ؛ Edreva, 2005 2006). این پروتئین‌ها بر اساس خانواده‌ای که به آن تعلق می‌گیرند، دارای خصوصیات کیتینازی[2]، پروتئینازی، پراکسیدازی، ریبونوکلئازی[3] و غیره می‌باشند (Sels *et al.*, 2008). پراکسیدازها نقش‌های متفاوتی در مقاومت گیاهان علیه پاتوژن‌ها عهده دار بوده و از نقش‌های فیزیولوژیکی متنوع آنها در القای مقاومت، می‌توان به اکسیداسیون هیدروکسی- سینامیل الکل‌ها[4] به رادیکال‌های آزاد اکسیژن، اکسیداسیون فنل‌ها، اتصالات عرضی[5] پلی ساکاریدها، استحکام دیواره آوند چوبی، سنتز فیتوالکسین‌ها و تجمع ترکیبات فنلی در دیواره سلولی گیاهان، محدود کردن گسترش بیمارگر و تولید لیگنین اشاره کرد (Deepaka *et al.*, 2007). مونولیگنین‌ها واحد سازنده لیگنین بوده که توسط پراکسیدازها با مصرف پراکسیدهیدروژن پلی‌ریزه شده و لیگنین را می‌سازند (Taheri and Tarighi, 2010).

پلی فنل اکسیداز

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف جمعیتی نماتد، زمان‌های مختلف نمونه‌برداری،

1- H2O2
2- Chitinase.
3- Ribonuclease
4- Hydroxy-cinnamyl alcohols
5- Cross-linking

جدول ۱- تجزیه واریانس میزان پروتئین کل دو رقم گوجه‌فرنگی در چهار سطوح مختلف جمعیتی نماتد و در چهار زمان مختلف نمونه‌برداری

Table 1. Analysis of variance of total protein in two tomato varieties at four different levels of nematode populations in four different sampling times

Source	df	mean square
		Total protein
a	1	800.33*
b	3	13087.77**
c	3	2294.91**
b × a	3	910.42**
c× a	3	151.50*
c × b	9	2592**
c × b × a	9	30.10n.s
Error	88	165.96
Total	127	
CV		3.37

Note: *, ** and n.s are respectively significant level at 5%, 1% and no significant difference (a: variety, b: Treatment and c: time)

جدول ۲- تجزیه واریانس آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز دو رقم گوجه‌فرنگی در چهار سطوح مختلف جمعیتی نماتد و در چهار زمان مختلف نمونه‌برداری

Table 2. Analysis of variance of peroxidase and catalase in two tomato varieties at four different levels of nematode populations in four different sampling times

Source	Df	mean square	
		catalase	peroxidase
a	1	5.18n.s	93.10*
b	3	341.12**	353.75**
c	3	59.59**	78.50**
a × b	3	5.35**	35.13**
a× c	3	1/11**	17.07**
b × c	9	42.31**	68.81**
a × b × c	9	2.04**	16.68**
Error	88	0.67	0.85
Total	127		
CV		10.95	11.24

Note: *, ** and n.s are respectively significant level at 5%, 1% and no significant difference (a: variety, b: Treatment and c: time)

جدول ۳- مقایسه میانگین آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز (unit/gFW.min) دو رقم گوجه‌فرنگی در چهار سطوح مختلف جمعیتی نماتد و در چهار زمان مختلف نمونه‌برداری

Table 3. Comparison of means peroxidase and catalase enzymes (unit/gFW.min) in two tomato varieties at four different levels of nematode populations in four different sampling times.

variety	time	levels	peroxidase	catalase
F	1	1	3.62l	2.85j
F	1	2	3.50l	2.72j
F	1	3	3.77 l	2.97j
F	1	4	3.32l	2.65j
F	2	1	3.67l	2.62j
F	2	2	5.50Igkl	7.72i
F	2	3	7.77fghij	8.97ghi
F	2	4	9.32fg	10.65defgh
F	3	1	3.97kl	2.975j
F	3	2	7.50fghij	10.72cdefgh
F	3	3	8.77fgh	10.97bcdefg
F	3	4	16.32c	12.65bcd
F	4	1	4.47kl	2.71j
F	4	2	6.35hijk	9.72efghi
F	4	3	8.52fgh	9.97efgh
F	4	4	9.87ef	11.65bcdef
G	1	1	4.02kl	2.70j
G	1	2	4.32kl	2.82j
G	1	3	4.17kl	2.62j
G	1	4	3.92kl	2.97j
G	2	1	4.02kl	3j
G	2	2	5.32jkl	8.82hi
G	2	3	7.17ghij	9.62fghi
G	2	4	7.92fghi	11.72bcde
G	3	1	4.20kl	2.75j
G	3	2	13.32d	12.76bc
G	3	3	19.17b	12.62bcd
G	3	4	22.92a	17.97a
G	4	1	4.37kl	3j
G	4	2	12.32de	10.82cdefgh
G	4	3	18.62bc	10.62defgh
G	4	4	20.42b	12.97b

Common letters = no significant difference
F : (Falat Y) and G :(Gina VF)

اثر متقابل رقم در سطوح جمعیتی نماتد و اثر متقابل سطوح جمعیتی نماتد در زمان نمونه‌برداری تفاوت آماری معنی‌داری در سطح یک درصد وجود داشت. همچنین مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل رقم در تیمار سطوح جمعیتی نماتد مشخص کرد که بین همه تیمارهای نماتد با شاهد در هر دو رقم در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار آماری وجود داشت. همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل زمان‌های نمونه‌برداری در سطوح جمعیتی نماتد نشان داد که در زمان اول نمونه‌برداری بین هیچ کدام از تیمارهای سطوح جمعیتی نماتد با شاهد تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، ولی در زمان‌های دوم، سوم و چهارم نمونه‌برداری تفاوت بین کلیه تیمارهای نماتدی با شاهد در سطح یک درصد معنی‌دار بود. می‌توان گفت که با افزایش جمعیت نماتد، میزان آنزیم پلی فنل اکسیداز افزایش یافته واین افزایش در رقم متحمل بالاتر از رقم حساس بوده است. به طریق مشابه، بیشترین میزان آنزیم در زمان سوم و کمترین آن در زمان اول نمونه‌برداری به ثبت رسید (جداول ۴، ۶ و ۸). آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز، اکسیدوردوکتازهایی[1] هستند که

1- Oxidoreductase

در هنگام بروز آلودگی موجب جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده از سلول می‌شوند (Milavec et al., 2008). همچنین انباشتگی پراکسید هیدروژن در اثر جراحت[1] به عنوان پیام‌بر ثانویه عمل کرده و مجموعه‌ای از ژن‌های مرتبط با دفاع از جمله ممانعت کنندگان پروتئیناز و پلی‌فنل‌اکسیداز را القا می‌کند (Orozco-Cardenas *et* al., 2001). تیمار ارقام مقاوم و حساس نخود به بیماری پژمردگی فوزاریومی[2] با سالیسیلیک اسید و قارچ عامل بیماری سبب افزایش آنزیم پلی-فنل‌اکسیداز در ریشه و شاخه‌های رقم مقاوم شده و هیچ گونه تغییری در رقم حساس بعد از تیمار مشاهده نشده است (Raju *et al*., 2008). آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز موجب تبدیل ترکیبات منو فنل به دی فنل و یا تبدیل دی فنل به کینون می‌گردد. بنابراین احتمالا کاهش فعالیت این آنزیم در جهت جلوگیری از کاهش فنل‌های اسیدی می‌باشد (Hayrullah and Tuncer., 2003).

فنیل آلانین آمونیالیاز[3]

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف جمعیتی نماتد، زمان‌های مختلف نمونه‌برداری، اثر متقابل رقم در زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل سطوح جمعیتی نماتد در زمان نمونه‌برداری تفاوت آماری معنی‌داری در سطح یک درصد وجود داشت و همچنین تفاوت بین ارقام در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل رقم در زمان‌های نمونه‌برداری نشان داد که بین تمام زمان‌های نمونه‌برداری با زمان اول نمونه‌برداری در هر دو رقم تفاوت آماری معنی‌داری در سطح یک درصد وجود داشت. همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل زمان‌های نمونه‌برداری در سطوح جمعیتی نماتد نشان داد که در زمان اول نمونه‌برداری بین هیچ کدام از تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری دیده نشد، ولی در زمان‌های دوم، سوم و چهارم نمونه‌برداری بین کلیه تیمارها با شاهد، اختلاف در سطح یک درصد معنی‌دار بود. نتایج کلی نشان‌دهنده آن است که با افزایش سطوح جمعیتی نماتد میزان آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز بیشتر شده و این تغییر در رقم متحمل بیشتر از رقم حساس بوده است. همچنین حداکثر میزان این آنزیم در زمان سوم و حداقل آن در زمان اول نمونه‌برداری ملاحظه شد (جداول ۴، ۵ و ۷). یافته‌های این تحقیق با نتایج بررسی انجام شده روی تأثیر گونه *Meloidogyne javanica* برفعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در ریشه گوجه‌فرنگی در تعامل با قارچ عامل پژمردگی آوندی مطابقت نشان داد (Sahebani and Hadavi, 2004). از آنجایی‌که فنیل آلانین آمونیالیاز، آنزیمی کلیدی در متابولیسم فنیل پروپانوئیدهاست که تبدیل ال–فنیل آلانین به ترانس–سینامیک اسید[4]، اولین مرحله در متابولیسم فنولیک‌ها را برعهده دارد، این مرحله یک واکنش بیوشیمیایی کلیدی در نمو و دفاع گیاهان به شمار می‌رود (Chang et al., 2008). مطالعات انجام شده نشان داده است که تیمار با متیل جاسمونیت، به طور معنی‌داری باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین یعنی پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز و تغییر مسیر متابولیسم فنیل پروپانوئیدها از لیگنین به سمت افزایش فنل‌های محلولی نظیر آنتوسیانین شده است. آنتوسیانین-ها و فنل‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که با سرکوب کردن گونه‌های فعال اکسیژن، از گیاه در برابر واکنش‌های فتودینامیک آسیب رساننده، حفاظت می‌کنند. تیمار متیل جاسمونیت می‌تواند سبب افزایش تجمع آنتوسیانین‌ها در گیاه گردد (Peng et al., 2008 Cao et al., 2009; Kondo et al., 2001). نتایج حاصل از پژوهش‌های اخیر در رابطه با ژن فنیل آلانین آمونیالیاز نشان داد که بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز مورد بررسی در گیاهان برنج، پس از مایه‌زنی با *Magnaporthe grisea* افزایش یافت. این حالت نشانگر دخالت این ژن دفاعی در مقاومت پایه‌ای گیاه برنج علیه این قارچ می‌باشد (Sadati *et al*., 2012). هم‌چنین در گیاه ارزن تیمار شده با Ind-Ile-Me که از مشتقات مصنوعی جاسمونیت است، بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز افزایش یافته و سبب القای مقاومت به قارچ سفیدک پودری گردید (Deepaka et al., 2007).

1- Wonding
2- Blight Fusarium
3- PAL
4- Trans cinnamic acid

جدول ٤- تجزیه واریانس آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و آنزیم پلی فنل اکسیداز دو رقم گوجه‌فرنگی در چهار سطوح مختلف جمعیتی نماتد و در چهار زمان مختلف نمونه‌برداری

Table 4. Analysis of variance of phenylalanine ammonia lyase enzyme (PAL) and poly phenol oxidase in two tomato varieties at four different levels of nematode populations in four different sampling times

Source	Df	Mean square	
		poly phenol oxidase	PAL
a	1	178.25**	152.29*
b	3	3091.61**	771.92**
c	3	712.81**	195.44**
b × a	3	297.23**	64.46**
c× a	3	35.64n.s	43.28**
c × b	9	548.09**	133.12**
c × b × a	9	67.02n.s	31.05n.s
Error	88	54.31	30.59
Total	127		
CV		4.65	6.88

Note: *, ** and n.s are respectively significant level at 5%, 1% and no significant difference (a: variety, b: Treatment and c: time)

جدول ٥- مقایسه میانگین پروتئین کل (µg/FW) و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (unit/gFW.min) دو رقم گوجه‌فرنگی در چهار سطوح مختلف جمعیتی نماتد و در چهار زمان مختلف نمونه‌برداری

Table 5. Comparison of means of total protein and phenylalanine ammonia lyase enzyme (PAL) (unit/gFW.min) in two tomato varieties at four different levels of nematode populations in four different sampling times

Time	Levels	Total protein	PAL
1	1	404.50abc	74.50e
1	2	406.87a	73.50e
1	3	406.25ab	74.37e
1	4	409.50a	74.25e
2	1	407.12a	74.50e
2	2	392.25abcd	81cde
2	3	378.87bcde	84.37bcd
2	4	377.87cde	86.87bc
3	1	409a	73.62e
3	2	369.75def	86.50bc
3	3	346.12fgh	91.87ab
3	4	344.37fgh	96.37a
4	1	416.87a	72.87e
4	2	362.25efg	77.50de
4	3	338.12gh	80.50cde
4	4	331.25h	83.50cd

Common letters = no significant difference

جدول ٦- مقایسه میانگین میزان پلی فنل اکسیداز (unit/gFW.min) دو رقم گوجه‌فرنگی در چهار سطوح مختلف جمعیتی نماتد و در چهار زمان مختلف نمونه‌برداری

Table 6. Comparison of means of poly phenol oxidase (unit/gFW.min) in two tomato varieties at four different levels of nematode populations in four different sampling times

Time	Levels	Poly phenol oxidase
1	1	145gh
1	2	147.37fgh
1	3	147.62fgh
1	4	148.25efg
2	1	144.37h
2	2	157.50defg
2	3	161cde
2	4	165.62cd
3	1	144.12h
3	2	172.50bc
3	3	180b
3	4	194.50a
4	1	146.12gh
4	2	156.25defgh
4	3	159.50def
4	4	164.12cd

Common letters = no significant difference
F : (Falat Y) and G :(Gina VF)

جدول ۷- مقایسه میانگین پروتئین کل (µg/FW) و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (unit/gFW.min) دو رقم گوجه‌فرنگی در چهار سطوح مختلف جمعیتی نماتد و در چهار زمان مختلف نمونه‌برداری

Table 7. Comparison of means of total protein (µg/FW) and phenylalanine ammonia lyase enzyme (PAL) (unit/gFW.min) in two tomato varieties at four different levels of nematode populations in four different sampling times

Variety	Time	Total protein	PAL
F	1	403.93ab	74.06c
F	2	384.68abcd	80bc
F	3	359.87de	80.81bc
F	4	352.43e	77.62bc
G	1	409.62a	74.25c
G	2	393.37abc	83.37b
G	3	374.75bcde	93.37a
G	4	371.81cde	79.56bc

Common letters = no significant difference
F : (Falat Y) and G :(Gina VF)

جدول ۸- مقایسه میانگین پروتئین کل (µg/FW) و پلی فنل اکسیداز (unit/gFW.min) دو رقم گوجه‌فرنگی در چهار سطوح مختلف جمعیتی نماتد و در چهار زمان مختلف نمونه‌برداری

Table 8. Comparison of means of total protein (µg/FW) and poly phenol oxidase (unit/gFW.min) in two tomato varieties at four different levels of nematode populations in four different sampling times

Variety	Levels	Total protein	poly phenol oxidase
F	1	408.87c	144.93a
F	2	378.37ab	159.68bc
F	3	361.18bc	157.56bc
F	4	352.50ab	163.50c
G	1	409.87c	144.87a
G	2	387.18bc	157.12ab
G	3	373.50ab	166.50bc
G	4	379a	172.75bc

Common letters = no significant difference
F : (Falat Y) and G :(Gina VF)

نتیجه گیری

با افزایش جمعیت نماتد، فعالیت‌های بیوشیمیایی گیاه تحت تاثیر قرار گرفت. در اثر تنش وارده، میزان پروتئین کل گیاه کاهش نشان داد. این تغییر بیانگر آنست که نماتد به عنوان یک انگل اجباری وابسته به میزبان، فعالیتهای متابولیکی طبیعی گیاه را به سمت بهره‌برداری تغذیه‌ای، به سود خود سوق می‌دهد.

آنزیم‌های مختلفی در خلال آلودگی گیاهان القاء می‌شوند و هر آنزیم به نحوی در محدود کردن توسعه بیمارگر نقش دارد. یکی از آنزیمهای دخیل در سامانه تدافعی سلول‌های گیاهی علیه رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسیدازها هستند. با اعمال تنش از طرف نماتد، میزان فعالیت آنزیم مذکور، افزایش یافته و حداکثر میزان آن در زمان سوم نمونه‌برداری و در رقم متحمل مشاهده شد. گزارش‌های متعددی به نقش مثبت آنزیم پلی فنل اکسیداز در دفاع گیاهان در برابر آلودگی‌ها اشاره دارد. فعالیت این آنزیم در رقم متحمل و ۵ روز پس از تلقیح نماتد حداکثر میزان خود را دارا بود. آنزیم کاتالاز با پاک‌سازی رادیکال پراکسید هیدروژن، نقش مهمی در تنظیم غلظت آن دارد و به عنوان یکی از عناصر دفاعی گیاه محسوب می‌شود. در حضور نماتد، میزان فعالیت این آنزیم نیز افزایش یافت. فنیل آلانین آمونیالیاز آنزیمی کلیدی در شروع بیوسنتز ترکیبات دفاعی گیاه از جمله فیتوآلکسین‌ها به ویژه فنیل پروپانوئیدها و برخی از ترکیبات فنلی و لیگنینی می‌باشد. تنش وارده از سوی نماتد سبب القای فعالیت این آنزیم و ظهور بیشتر آن در رقم متحمل نسبت به رقم حساس گردید. حداکثر میزان افزایش تمامی آنزیمها در بین چهار زمان مورد مطالعه، در زمان سوم نمونه‌برداری (۵ روز پس از تلقیح) مشاهده شد. این در حالی بود که در زمان شروع آزمون تغییراتی نسبت به تیمار شاهد به ثبت نرسید. در زمان دوم (۳ روز پس از تلقیح) از سیرصعودی برخوردار بوده و در زمان آخر (۷ روز پس از تلقیح) نیز میزان آنها رو به نزول نهاده است. به عبارت دیگر بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های دفاعی، در فاصله زمانی ۵ روزه در سطح سلول میزبان به اوج خود رسیده است. این دوره نشان‌دهنده حداقل زمان مورد نیاز برای نمایان ساختن بیشترین فعل و انفعالات دفاعی در بازه زمانی مورد مطالعه می‌باشد. افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های دفاعی در رقم متحمل (جینا وی اف) نسبت به رقم حساس (فلات وای)، حکایت از تأثیرگذاری این آنزیمها در بروز پاسخ دفاعی و منتسب نمودن بخشی از تحمل گیاه به عملکرد آنها دارد. مطالعات تکمیلی در خصوص چگونگی برانگیختگی سازوکارهای دفاعی گیاه و ارتباط آن با جنبه های زیست شناختی و تغذیه نماتد می‌تواند پاسخگوی بسیاری از مسائل مطرح در این رابطه باشد.

REFERENCES

Anonymous, 2014. FAOstat. Available in: Fao.org/site/default.aspx.

Barker, K.R., Carter C.C., and Sasser J.N. 1985. An advanced treatise on *meloidogyne*. Plant Pathology, 4: 212- 233.

Bradford, M.M. 1979. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. Annul Biochemistry, 72: 248-254.

Cao, SH., Zheng Y., Wang K., and Rui H. 2009. Methyl jasmonate reduces chilling injury and enhances antioxidant enzyme activity in postharvest loquat fruit. Food Chemistry, 115(4): 1458-1464.

Chance, B., and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymology, 11: 755-764.

Chang, A., Lim, M.H. Lee, S.W. Robb, E.J., and Nazar, R.N. 2008. Tomato *PAL* gene family: highly redundant but strongly underutilized. Journal of Biology and Chemistry, 283: 33591-33601.

Chen, Z. X., Chen, S. Y., and Dicksno, D. W. 2003. Nematology- Advances and perspectives. Volume 2, 637-1219PP, 744 pp.

Deepaka, Sh., Niranjan-Raja, S., Shailasreea, Sh. Kinia, R. K. Boland, W. Shettya, H.S., and Mithofer, A. 2007. Induction of resistance against downy mildew pathogen in pearl millet by a synthetic jasmonate analogon. Physiological and Molecular Plant Pathology, 71: 96-105.

Dickerson, D.P., Pascholati, S.F. Hagerman, A.E. Butler, L.G., and Nicholson R.L. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum.* Physiology and Plant Pathology, 25: 111-123.

Edreva, A. 2005. Pathogenesis related proteins: Research progress in the last 15 years. General and Applied Plant Physiology, 31:105-124.

Gharabadiyan, F., Jamali, S., Ahmadiyan Yazdi, A., and Eskandari, A. 2012. Source of resistance to root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato cultivars. Journal of Agricultural Technology, 2011-2021.

Guo, J. and Wang, M.H. 2008. Characterization of the phenylalanine ammonia-lyase gene (*SIPAL5*) from tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Molecular Biology Report, 36(6): 1579-1585.

Hartman, K.M., and Sasser, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In Barker, K.R., Carter C.C., and Sasser, J.N. An advanced treatise on meloidogyne. Vol, 2, methodology, Relrigh, NC, USA: NCSU Graphics. P: 69-77.

Hasandokht, M.r. 2012. Vegetable production technology. Selsele publications, 576-635 pp. (in Farsi)

Hayrullah, Y., and Tuncer, T. 2003. Polyphenol oxidase Activity during rooting in cutting of grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. Turkian Journal Botany, 27:495-498.

Hollosy, F. 2002. Effects of ultraviolet on plant cells. Micron, 33: 179-197.

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

Jepson, S.B. 1987. Identification of Root-knot nematodes. Cambrian News Ltd.

Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315-319.

Kondo, S.N. Tsukada, Y., Niimi, G.L., and Seto, H. 2001. Interactions between jasmonates and abscisic acid in apple fruit, and stimulative effect of jasmonates on anthocyanin accumulation. Journal of Japan Society for Horticultural Science, 70: 546-552.

Manzanilla-Lopez, R. H., Franco, J. Peteria, B., and Kerry, B. 2004. *Nacobbus aberrans*: Its molecular diagnosis in soil and potato tubers. Programs and Abstracts of ONTA 34th Annual Meeting, Puerto Vallarta, Mexico. 83 pp.

Milavec, M., Gruden, K. Ravnikar M., and Kova. M. 2008. Peroxidases in the early responses of different potato cultivars to infection by Potato virus YNTN. Plant Pathology, 57: 861-869.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antipxidants and stress tolerance. Trends in Plant Sciences. 7: 405-410.

Navabpour, S. 2012. Molecular study of photosynthetic gene expression in the aging process leaf and other leaves in barley. Journal of Crop Production and Processing, 4: 13-24. (in Farsi with English abstract).

Orozco-Cardenas, M.L., Narvaez-Vasquez J., and Ryan, C.A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plant in response to wounding system in, and methyl jasmonate. The Plant Cell, 13:179-191.

Peng M., Hudson, D. Schofield, A. Tsao, R. Yang, R. Gu, H. Bi, Y.M., and Rothstein, S.J. 2008. Adaptation of Arabidopsis to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the *NLA* gene. Journal of Experimental Botany, 59(11): 2933-44.

Perry, R.N., Maurice M. and Starr J.L. 2010. Root-Knot Nematodes. CABI Head Office, UK. 531pp.

Raju, S., Jayalakshmi S. K., and Sreeramulu. K. 2008. Comparative study on the induction of defence related enzymes in two different cultivars of chickpea (*Cicer*

arietinum) genotypes by salicylic acid, spermin and *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceri.* Australian Journal of Crop Science, 2(3): 121-140.

Sadati, Z., Tajik ganbari M.A., Babaiizad V.A. and Rahimian A.H. 2012. Antimicrobial peptides involved in resistance rice to blast fungus (*Magnaporthe grisea*). Twelfth Congress of Genetics, Shahid Beheshti Universiey, Tehran, Iran. (in Farsi with English abstract).

Sahebani, N., and Hadavi N.J. 2004. Study on the Systemic Effect of Root-knot Nematode (*Meloidogyne javanica*) on Phenylalanine Ammonia Lyase Enzyme Activity in Tomato Root in the Interaction Between Root-knot Nematode and Tomato Fusarium Wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*). Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 43: 111-119. (in Farsi with English abstract).

Sahebani, N., Zad S.J., Sharifi Tehrani A. and Kheyri A. 2008. Study of qualitative and quantitative changes in peroxidase activity in the interaction between root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and Tomato wilt fungus (*Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*). Agricultural Sciences Iran, 6: 127-138. (in Farsi with English abstract).

Sharma, P. and Dubey. R. SH. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedling. Plant Growth Regulation, 46: 209-221.

Shekari, F., Masiha, S., and Esmailpour, B. 2006. The Physiology of Vegetable Crops. Zanjan Universiey publications, 394 pp. (in Farsi with English abstract).

Stone, S.L., and Gifford, D.J. 1997. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seeding growth: I. storage protein Reserves. International Journal Plant Science, 158: 727-737.

Tahery, P., and Tarighi, S. 2010. Riboflavininducesresistanceinriceagainst Rhizoctoniasolani via jasmonate-mediatedprimingofphenylpropanoidpathway. Journal of plant Physiology, 167:201-208.

Taylor, D. P., and Netscher, C. 1974. An improved technique for preparing perennial pattern of *Meloidogyne* spp. Nematologica, 20: 268.

Tian, X. and Y. Li. 2007. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seeding. Biologia Plantarum, 50: 775-778.

VanLoon, L.C., M. Rep and C.M.J. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology, 44: 135-162.

Zhong, L., Xu Y., and Wang, J. 2009. DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum.* African Journal of Biotechnology, 8(22): 6201-6207.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 39(1) Spring 2016

Detection production process of defense enzymes in two tomato cultivars against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* race 2 in greenhouse conditions

A. Ghasemzadeh[1], S. Jamali[2*], M. Esfahani [3] and H. Pedramfar[4]

1. M.Sc. Student of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
2. [*]**Corresponding Author:** Assistant Professor of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran, (jamali@guilan.ac.ir)
3. Associate Professor of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
4. Instructor of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

Received: 7 February 2015 Accepted: 2 January 2016

Abstract

To investigate the effect of root-knot nematode *M. incognita* race2 on tomato defense enzyme production process, an experiment was conducted under greenhouse conditions. The experiment was carried out in a completely randomized split split plot design with two susceptible (Falat Y) and tolerant (Gina VF) tomatoe varieties with four nematode population levels of 0 (control), 500, 1000 and 2000, the number of larvae of second stage with four different sampling times (0 (control), 3, 5 and 7 days after inoculation) and with four replications. In this experiment, after sampling, purification, identification and propagation of nematode species and race of nematodes were determined. With nematode purified amplification on the Rutgers cultivar tomato inoculum was obtained. The four-leaf stages were inoculated population in levels and the time mentioned of the enzyme was measured. The results showed that increasing levels of nematode population affected plant biochemical activities and the total protein content decreased. The activity of catalase, peroxidase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase involved in the defense reaction of host plant increased. The highest rates were observed in the catalase enzyme and in the tolerant variety. In the presence of nematode stress, plant activated its defense mechanism that has enabled it to increase its enzymatic activity which was at its maximum value 5 days after inoculation.

Keywords: Catalase, Meloidogyne incognita, Peroxidase, Polyphenol oxidase, Tomato