مطالعه تأثیر نماتود مولد گره ریشه (*Meloidogyne javanica*) بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در ریشه گوجه‌فرنگی در تعامل با قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

نوازاله صاحبانی و نجمه السادات هادوی [۱*]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۶/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۷/۴)

چکیده

در این تحقیق، تأثیر نماتود مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* ، بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در ریشه گیاه گوجه فرنگی واریته Roma VF (مقاوم به قارچ و حساس به نماتود) در تعامل با عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici race 1*) به روش تقسیم ریشه در دوگلدان مجاور (Split-root system) ارزیابی شد. در این تحقیق نشان داده شد که مایه‌زنی یک قسمت از ریشه گیاه به وسیله نماتود سبب بروز و تشدید بیماری فوزاریومی در قسمت دیگری از ریشه همان گیاه مایه‌زنی شده با قارچ می‌شود. به طوری که میزان بیماری در گیاهان تیمار در مقایسه با شاهد (بدون مایه‌زنی با نماتود) دارای اختلاف معنی‌دار بود. در این تحقیق هم‌چنین نشان داده شد که نماتود نه تنها قادر به کاهش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در محل فعالیت و تغذیه خود می‌باشد بلکه می‌تواند فعالیت این آنزیم را به میزان قابل توجهی در دیگر قسمت‌های ریشه نیز کاهش دهد. بررسی فعالیت آنزیم در گیاهان شاهد (بدون مایه‌زنی با نماتود) نشان داد که القای فعالیت آنزیم در مقابل قارچ، به قسمت‌های دیگر ریشه گیاه سیستمیک می‌شود، ولی وجود نماتود در ریشه (در گیاهان تیمار) سبب کاهش معنی‌دار این آنزیم در گیاه می‌شود. فعالیت آنزیم در ریشه مایه‌زنی شده با نماتود با ریشه مایه‌زنی شده با قارچ در شاهد اختلاف بسیار معنی‌دار داشت.

واژه‌های کلیدی: نماتود مولد گره، *Meloidogyne javanica*، تعامل، فنیل آلانین آمونیالیاز، القای مقاومت، پژمردگی آوندی گوجه فرنگی، *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*، سیستمیک، دفاع بیوشیمیایی

مقدمه

گیاهان همواره در تعامل با بسیاری از عوامل زنده و غیر زنده از جمله بیمارگرها هستند، ولی به ندرت تعداد کمی از آنها قادر به ایجاد بیماری روی گیاه هستند. دلایل زیادی برای بیان علل شکست بسیاری از بیمارگرها در ایجاد بیماری در گیاه (گیاهان) پیشنهاد شده است از جمله :

۱. گیاهان دارای سدهای دفاعی ساختمانی و شیمیایی از پیش ساخته شده‌ای در بافت‌ها و سلول‌های خود هستند، به طوری‌که اغلب بیمارگرها قادر به غلبه بر این سدها نمی‌باشند.
۲. پس از تشخیص بیمارگر (یا عوامل غیر بیمارگر) توسط میزبان، مکانیسم‌های دفاعی گیاه به صورت موضعی یا سیستمیک، قسمت‌های مختلف گیاه را محافظت می‌نماید.

۱. به ترتیب استادیار و کارشناس گیاه‌پزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت
* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shebani@ut.ac.ir

تا کنون عوامل بسیاری در گیاهان به عنوان مکانیسم‌های دفاعی شناخته شده است. از جمله سنتز و ترشح مواد فنلی داخل و خارج سلول، سنتز فیتوالکسین‌ها، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، سنتز گلیکوپروتئین‌های غنی از اسید آمینه غیر معمول مانند هیدروکسی پرولین (HPRG) یا هیدروکسی گلیسین(HGRG) و غیره (۱۵، ۲۴، ۲۷). القایی مقاومت در گیاهان با استفاده از محرک‌های زنده یا غیر زنده و یا استفاده از رقم‌های گیاهی ناسازگار با بیمارگر، از جمله راه‌کارهای مورد توجه محققان در مدیریت آفات و بیماری‌های گیاهی می‌باشد. القای مقاومت در گیاه شدیداً تحت تأثیر شرایط محیطی به ویژه دما و وضعیت رشد گیاه می‌باشد. به عبارت دیگر در گیاهانی که در شرایط مناسب محیطی و وضعیت مناسب رشدی قرار دارند، القای مقاومت در آنها سریع‌تر و کامل‌تر انجام می‌شود. تنش‌های محیطی به ویژه دما سبب کاهش یا خاموش شدن القای مقاومت در گیاه می‌شود. بروسک و دراپکین گزارش کردند که در رقم‌های مقاوم گوجه فرنگی افزایش میزان ترکیبات فنلی و آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) پلی فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX) در ۲۷ درجه سانتی‌گراد به عنوان مرحله مقاومت وجود دارد. ولی دماهای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان مرحله حساسیت سبب کاهش چشمگیر در آنها می‌شود (۷). ابوی و بارکر نشان دادند که کلتیوارهای منوژنیک و مقاوم گوجه فرنگی به فوزاریوم عامل پژمردگی آوندی نژاد یک، در اثر پیش مایه‌زنی با نماتود مولد گره ریشه *M. incognita*، حساس شده و بیماری در آنها ایجاد می‌شود. آنها پیشنهاد کردند که احتمالا مقاومت گیاه توسط نماتود شکسته شده است (۴). لیبورد نیز با انجام کار مشابهی با نژاد یک و دو این قارچ و ظهور بیماری در ارتباط با نماتود مولد گره ریشه، کاهش یا شکست مقاومت در اثر نماتود را پیشنهاد نمود (به نقل از ۲۰).

اغلب محققان معتقدند که برخی ترکیبات فنلی از جمله سالیسیلیک اسید، علاوه بر نقش مستقیم آن در مقاومت، نقش سیگنال در مقاومت سیستمیک (SAR Signaling) و نقش محرک در بروز مقاومت به ویژه القاء پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی و افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز را ایفا می‌کند (۳۰). زاچئو و همکاران ارتباط مستقیمی بین افزایش میزا ن فنیل آلانین آمونیالیاز و مقاومت به نماتود *M. incognita* در ارقام مختلف گوجه فرنگی پیدا کرده‌اند. آنها نشان دادند که تیمار دمائی (بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد) گیاهان حساس و مقاوم، موجب کاهش میزان فنیل آلانین آمونیا لیاز می‌شود. آنها هم‌چنین نشان دادند که تشکیل لیگنین در گیاه شدیداً مرتبط با فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز و Anodic peroxidase موجود در دیواره سلولی گیاه می‌باشد(۳۱). صاحبانی و همکاران نشان دادند که آلودگی گوجه فرنگی واریته Roma VF (مقاوم به نژاد یک قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* و حساس به نماتود *M. javanica*) به نماتود، موجب کاهش مقاومت آن به قارچ می‌شود. آنها هم‌چنین نشان دادند که نماتود در تمام مراحل بیولوژیک خود در گیاه به ویژه مرحله ظهور ماده‌های بالغ جوان قادر به کاهش یا مهار پاسخ‌های دفاعی در مقابل قارچ (از جمله میزان فنل کل گیاه، فعالیت آنزیم پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز) می‌باشد(۱ و ۲).

فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)(EC.4.3.1.5) نقش کلیدی در مراحل اولیه متابولیسم فنیل پروپانوئید به صورت تبدیل فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید در گیاهان بازی می‌کند. این واکنش به عنوان اولین قدم کلیدی در مسیر ساخت فنیل پروپانوئیدها می‌باشد. از آنجا که نقطه آغازین بیوسنتز تعداد زیادی از ترکیبات، از همین مسیر می‌باشد (از جمله لیگنین، فیتو آلکسین‌های پروپانوئیدی و فنیل پروپانوئیدی و...)، آنزیم PAL در بررسی ارتباطات متقابل بیمارگر- میزبان مورد توجه قرار گرفته است.

القای این آنزیم در مقابل بسیاری از محرک‌ها از جمله حمله بیمارگرها (۵، ۶، ۱۰ و ۱۲)، زخم(۱۹) و اشعه UV ثابت

شده می‌باشد. تغییر در میزان PAL از جمله معیارهای تعیین میزان سنتز لیگنین نیز می‌باشد. بنابراین مطالعه PAL می‌تواند به عنوان معیار کیفی واکنش دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرها باشد. در گیاهچه‌های سورگوم مایه‌زنی شده با *Peronosclerospora sorghi* (Weston & Uppal) Shaw، تجمع زیاد mRNA PAL در کولتیوارهای مقاوم در مقایسه با کولتیوارهای حساس مشاهده شده است(۲۹). در کشت سلول‌های کاج تیمار شده با الیسیتورهای قارچی نیز القای مقاومت در ارتباط با افزایش میزان PAL، لیگنین و دیگر آنزیم‌های مرتبط می‌باشد(۸). مهار نمودن بیان ژن PAL در توتون مقاوم به ویروس موزائیک توتون، موجب غیر فعال شدن مقاومت اکتسابی سیستمیک(SAR) و بروز آلودگی شده است(۲۶). آلودگی برگ‌های گندم به عامل زنگ ساقه با تزریق الیسیتورهای قارچی به برگ موجب تجمع لیگنین یا پلیمرهای مشابه لیگنین (قابل مشاهده با تکنیک‌های مختلف مانند رنگ آمیزی بافت) گردیده، افزایش میزان آنزیم PAL و افزایش mRNA PAL نیز درآن قابل مشاهده بوده است(۵ و ۱۷). القای تشکیل لیگنین هم‌آهنگ با افزایش سنتز آنزیم‌های PAL و آنزیم‌های دیگری که در مسیرفنیل پروپانوئید مشارکت دارند از جمله 4-coumarat- coA ligase و cinnamyl alcohol dehydrogenase نیز می‌باشد. هی ـ پینگ و همکاران (Hi- ping *et al*. 2001) القای PAL را در طول آلودگی گندم با عامل زنگ سیاه گندم از طریق مقایسه میزان mRNA در کلتیوارهای حساس و مقاوم گندم با استفاده از تکنیک PCR نشان دادند. آنها نتیجه گرفتند که الیسیتورهای زنده قارچی و الیسیتورهای استخراج شده از قارچ (مانند کیتین) و حتی الیسیتورهای با ماهیت شیمیایی قادر به القای PAL می‌باشند(۱۷). علاوه بر ساقه و برگ‌ها، سنتز PAL در ریشه‌ها نیز به میزان قابل توجهی صورت می‌گیرد که نشان دهنده مشارکت این آنزیم در مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌باشد (۱۴ و ۱۷). فعالیت آنزیم PAL در ریشه‌های گوجه فرنگی کولتیوار Nematex مورد حمله *M. incognita* در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد. ولی در صورتی‌که آلودگی همین کولتیوار در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد صورت گیرد، چنین افزایشی مشاهده نمی‌شود. بنابراین مقاومت کولتیوار Nematex به *M. incognita* در دماهای بالا به حساسیت تبدیل می‌شود (۱۲ و۲۳). فعالیت آنزیم PAL در واکنش متقابل سازگار بین *M. incognita* و سیب زمینی نیز کاهش نشان می‌دهد. در حالی‌که فعالیت این آنزیم در کولتیوارهای حساس سیب زمینی آلوده شده به وسیله *Globodera rostochiensis* (Woll.) افزایش نشان می‌دهد. کولتیوارهای حساس سیب زمینی آلوده شده با *M. hapla* نیز کاهش فعالیت این آنزیم را نشان می‌دهند (۱۲). استفاده از ممانعت کننده‌های فعالیت PAL مانند 2- amino Indon- 2 phosphonic acid (AIP)، مسیر فنیل پروپانوئید را مختل می‌نماید که این شامل بیوسنتز سالیسیلیک اسید نیز می‌شود. گیاهان آرابیدوپسیس (اکوتیپ col-o) مایه‌زنی شده با AIP موجب تبدیل رابطه ناسازگار *Phytophthpra parasitica* ایزوله EMWA با این گیاهان به رابطه سازگار شده است(۲۸).

در این تحقیق نشان داده شده است که نماتود مولد گره ریشه *M. javanica* نه تنها قادر به کاهش یا مهار فعالیت آنزیم PAL در گیاه گوجه فرنگی می‌باشد بلکه عامل مهار کنندگی آن درگیاه سیستمیک شده به طوری که فعالیت آنزیم در قسمت‌های مختلف ریشه آن گیاه کاهش چشمگیر نشان می‌دهد. کاهش فعالیت این آنزیم توسط نماتود یکی از علل تشدید حمله و بیماری‌زایی عوامل بیمایزای ثانویه به گیاهان آلوده به نماتود می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه مایه تلقیح قارچ

قارچ فوزاریوم عامل پژمردگی گوجه فرنگی از بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه شد و پس از تک اسپور نمودن و اثبات بیماری‌زایی با استفاده از ارقام افتراقی استاندارد بانی بست (حساس به نژاد یک و دو)، مانوپال (مقاوم به نژاد یک) و والتر (مقاوم به نژاد یک و دو)، نژاد یک

شکل ۱ . تقسیم ریشه گیاه در دو گلدان مجاور برای مطالعه تأثیر سیستمیک نماتود مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* بر میزان بیماری و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در تعامل با قارچ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی *Fusarium. oxysporum* fsp *lycopersici*

تشخیص داده شد (۳). این قارچ روی محیط عصاره سیب زمینی، سوکروز، آگار به فراوانی تولید اسپور می‌کند. لذا به منظور تهیه سوسپانسیون اسپور، بعد از رشد کامل قارچ با اضافه کردن حدود ده میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر تشتک پتری و به هم زدن آن با میله شیشه‌ای، سوسپانسیونی از اسپورها و میسلیوم قارچ تهیه گردید که پس از عبور این سوسپانسیون از چندین لایه پارچه ململ، میسلیوم‌های آن حذف گردید. غلظت سوسپانسیون با استفاده از لام گلبول شمار انجام گرفت. در انجام آزمایش‌ها از سوسپانسیون حاوی 10^6 اسپور در میلی‌لیتر استفاده شد.

ب) تهیه مایه تلقیح نماتود

نمونه آلوده به نماتود از مزارع گوجه فرنگی اطراف شیراز تهیه شد و پس از تهیه توده تخم منفرد روی گوجه فرنگی رقم روت گرز تکثیر گردید و پس از چند دوره متوالی انتقال روی گوجه فرنگی، میزان مناسبی از اینوکلوم نماتود به دست آمد. استخراج تخم و لارو سن دو با استفاده از روش هوسی و بارکر (۱۸) انجام گرفت. تعیین گونه نماتود با استفاده از خصوصیات مرفولوژیکی و مرفومتریک و بر اساس کلید تشخیص گونه (Eisenback 1985) انجام گرفت(۱۱). مدت زمان لازم برای نفوذ لاروهای سن دو نماتود به داخل ریشه‌های گوجه فرنگی واریته Roma VF و مدت زمان لازم برای رسیدن به ظهور بالغ‌های جوان به ترتیب دو روز و ۱۵ روز بر اساس صاحبانی در نظر گرفته شد(۱).

ج) بررسی امکان سیستمیک شدن کاهش مقاومت ایجاد شده توسط نماتود در تعامل با قارچ در قسمت‌های مختلف ریشه به روش تقسیم ریشه

در این آزمایش ابتدا بذرهای گوجه فرنگی فرنگی واریته Roma VF پس از ضدعفونی با وایتکس ۱۰ درصد (حاوی ۵ درصد هیپوکلریت سدیم) و چندین بار شستشو با آب مقطر سترون، در سینی حاوی خاک سترون کشت گردید. گیاهان در مرحله دو برگی اصلی در گلدان حاوی خاک سترون نشا گردیدند (یک گیاه به ازای هر گلدان). گیاهچه‌های هر گلدان در مرحله ۱۰ برگی ازخاک خارج و پس از شستشو و برطرف نمودن خاک اضافی، ریشه آنها به دقت تا ریشه اصلی به دو بخش تقسیم و در دو گلدان مجزا و مجاور یکدیگر کاشته شدند (بدون آسیب دیدن ریشه، شکل۱). سپس یکی از دوگلدان با جمعیت ۲۰۰۰ لارو سن دو نماتود مایه‌زنی گردید. هفده روز بعد از مایه‌زنی نماتود، با احتساب دو روز برای نفوذ نماتود به داخل ریشه گیاه مصادف با ظهور ماده‌های بالغ جوان می‌باشد. در این زمان ریشه موجود در گلدان مجاور از

خاک خارج و پس از شستشو با آب و دو مرتبه شستشو با آب مقطر سترون در سوسپانسیون اسپور (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به مدت ۵ دقیقه قرار داده و مجدداً در گلدان حاوی خاک سترون قرار داده شد. در این آزمایش گیاهچه‌هایی که به ریشه نیمه اول آن به جای نماتود، آب مقطر، و به ریشه نیمه دوم آن قارچ مایه‌زنی شده بود، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

گیاهان این آزمایش در دو بخش مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بخش اول: مشاهدات گلخانه‌ای با ارزیابی شاخص علائم برگ به عنوان مناسب‌ترین معیار ارزیابی میزان بیماری(۲۹)، به مدت ۵ هفته با ۱۰ تکرار به ازاء هر تیمار و در قالب طرح فاکتوریل در پایه کامل تصادفی انجام شد.

شاخص علائم برگ به صورت اندیکس استاندارد ۰-۱۰بود به طوری که ۰= ۰ الی ۱۰ درصد زردی و پژمردگی برگ‌ها، ۱= ۱۰ الی ۲۰ درصد زردی و پژمردگی برگ‌ها، و در نهایت ۹= ۹۰ الی ۱۰۰ درصد زردی و پژمردگی برگ‌ها و ۱۰= مرگ گیاه(۲۹).

بخش دوم: بررسی تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در این بخش نمونه برداری از ریشه گیاهچه‌ها به مدت ۷ روز با فاصله یک روز از بخش‌های زیر انجام شد. در این بخش به ازای هر تیمار ۱۰ تکرار و در قالب طرح فاکتوریل در پایه کامل تصادفی انجام شد.

الف) ریشه مایه‌زنی شده با نماتود

ب) ریشه مایه‌زنی شده با قارچ در حالی که نیمه دیگر ریشه با نماتود مایه‌زنی شده بود.

ج) ریشه مایه‌زنی شده با قارچ در حالی که نیمه دیگر ریشه بدون مایه‌زنی با نماتود بود.

د) ریشه مایه‌زنی شده با نماتود در حالی که نیمه دیگر ریشه با قارچ مایه‌زنی شده بود.

ه) ریشه مایه‌زنی نشده در حالی که نیمه دیگر ریشه با قارچ مایه‌زنی شده بود.

استخراج عصاره ریشه گیاه

یک گرم بافت ریشه گیاه در هاون چینی که قبلاً در یخچال سرد شده بود، با استفاده از ازت مایع به خوبی سائیده و نرم شد. سپس یک میلی‌لیتر بافر نمونه (Sample buffer) فسفات سدیم ۰/۱ مول pH=6 به آن اضافه و کاملاً هموژن شد و هم‌زمان بافت‌های سخت گیاه از بقیه جدا گردید. در تمام مدت انجام کار، هاون در داخل تشت حاوی یخ قرار داشت. مخلوط حاصل بلافاصله به لوله اپندورف منتقل و توسط میکروسانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سوپرناتنت حاصل برای ارزیابی فعالیت آنزیم جدا، و تا قبل از انجام آزمایش در ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

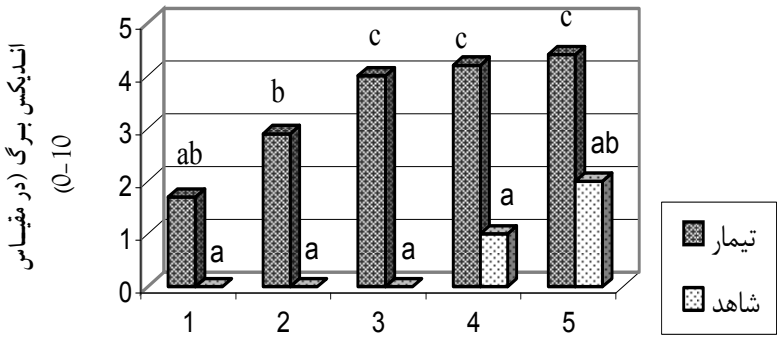
ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز بر اساس واکنش تبدیل فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید به روش چن و همکاران(۹) انجام شد. ارزیابی فعالیت آنزیم بر اساس کمیت سنجی میزان محصول واکنش (ترانس سینامیک اسید) به روش رنگ سنجی با میزان جذب نور در λ max = ۲۹۰ nm انجام شد.

برای محاسبات آماری و آنالیز میانگین کلیه آزمایش‌های انجام شده (از جمله مقایسه میزان بیماری و فعالیت آنزیم طی روزهای بعد از مایه‌زنی، مقایسه تیمارها و شاهد در هر آزمایش) از برنامه نرم افزاری(spss (ver.11، و برای رسم نمودارها نیز از برنامه نرم افزاری Excel (office 2003) استفاده گردید

نتایج و بحث

بررسی میزان فعالیت آنزیم PAL یکی از شاخص‌های قابل توجه در ارزیابی واکنش‌های دفاعی گیاه در مقابل بیمارگر (ها) می‌باشد. این آنزیم، اولین آنزیم در شروع خط سیر بیوسنتز بسیاری از ترکیبات دفاعی از جمله بسیاری از فیتوالکسین‌ها به ویژه گروه بزرگ (فنیل پروپانوئیدها)، برخی از ترکیبات فنلی و لیگنین می‌باشد که هر کدام از اینها از جمله ترکیبات مؤثر دفاعی در گیاه می‌باشند (۵، ۷، ۸، ۱۰، ۱۶، ۲۱، ۲۴، ۲۵ و ۲۷). بنابراین ارزیابی



شکل ۲ . مقایسه میزان بیماری (اندیکس برگ) پژمردگی فوزاریومی* گوجه فرنگی
در مایه‌زنی قسمتی از ریشه گیاه با نماتود *** و قسمت دیگر آن با قارچ**

* : *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* نژاد یک ** : واریته Roma VF *** : *Meloidogyne javanica*

شاهد : یک قسمت از ریشه گیاه بدون مایه‌کوبی، قسمت دیگر مایه‌کوبی با قارچ

– ستون‌هایی که با حروف همانند نشان داده شده‌اند در سطح ۵٪ و بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار ندارند.

– هر عدد میانگین ۱۰ تکرار است.

میزان این آنزیم به نحوی ارزیابی روند ساخت این ترکیبات می‌باشد. به عبارت دیگر میزان و سرعت فعالیت این آنزیم نشان دهنده میزان و سرعت ساخت ترکیبات مذکور می‌باشد.

در بخش اول آزمایش(مشاهدات گلخانه ای) علی‌رغم این‌که علائم بیماری در گیاهان شاهد تا هفته سوم ظاهر نشده بود، در گیاهان تیمار از هفته اول علائم بیماری ظاهر شد (کلاس ab) و تا هفته سوم (کلاس c) با سرعت قابل توجهی افزایش یافت و طی هفته‌های بعد بدون اختلاف معنی‌دار با هفته سوم، با روند کندتری افزایش نشان داد. در گیاهان شاهد علائم بیماری از هفته سوم (کلاس a) آغاز و طی هفته‌های بعد نیز بدون اختلاف معنی‌دار (کلاس ab) افزایش ناچیز داشت. با وجود گسترش بیماری در ریشه و قهوه‌ای شدن آوندها ناشی از وجود قارچ در آوندهای ساقه، قارچ عامل بیماری به ریشه‌های گلدان مایه‌زنی شده با نماتود(تیمار) و گلدان مایه‌زنی نشده(شاهد) انتشار نیافت (شکل۲).

در بخش دوم آزمایش (بررسی تغییرات فعالیت آنزیم PAL در قسمت‌های مختلف ریشه) بخش‌های زیر به تفکیک مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت (شکل۳).

- ریشه مایه‌زنی شده با نماتود درحالی که نیمه دیگر ریشه بدون مایه‌زنی بود:

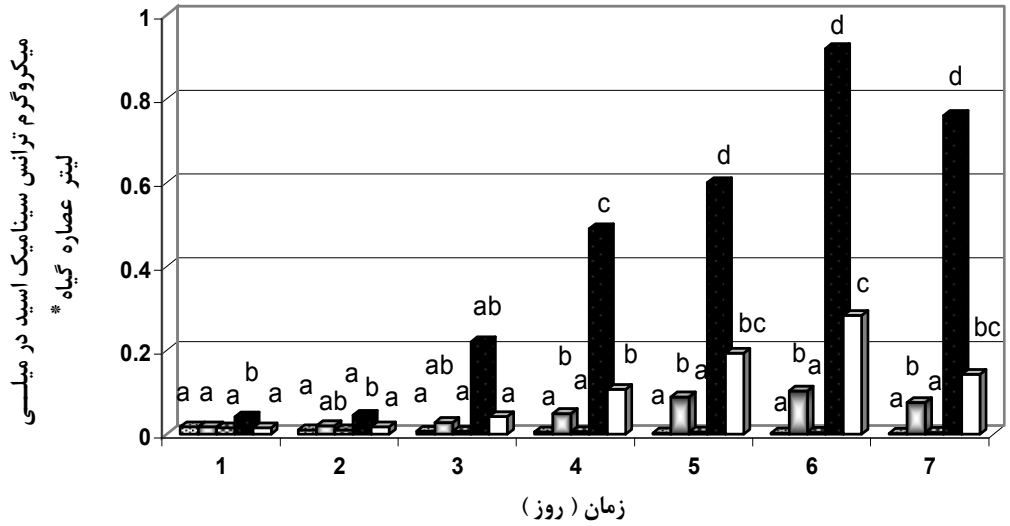
فعالیت آنزیم در روز اول با میزان ناچیزی آغاز شد (کلاس a) و طی روزهای بعد نیز بدون اختلاف معنی‌دار بود. میزان ناچیز فعالیت آنزیم در این تیمار احتمالا ناشی از عدم القاء سنتز انزیم در گیاه به وسیله نماتود یا جلوگیری از فعالیت آن توسط نماتود می‌باشد

- ریشه مایه‌زنی شده با قارچ در حالی که نیمه دیگر ریشه با نماتود مایه‌زنی شده بود:

فعالیت آنزیم در روز اول همانند بخش الف آغاز شد (کلاس a) و تا روز سوم تغییرات آن معنی‌دار نبود ولی به دنبال آن روند افزایش معنی‌دار آغاز شد و تا روز پنجم به تدریج افزایش یافت (کلاس b).

- ریشه مایه‌زنی شده با نماتود در حالی که نیمه دیگر ریشه با قارچ مایه‌زنی شده بود:

فعالیت آنزیم در روز اول مشابه بخش الف و ب بود



ارزیابی ریشه مایه کوبی با قارچ(نیمه دیگر با نماتد)
ارزیابی ریشه مایه کوبی با نماتد(نیمه دیگر بدون مایه کوبی)
ارزیابی ریشه مایه کوبی با قارچ(نیمه دیگر بدون مایه کوبی)
ارزیابی ریشه مایه کوبی با نماتد(نیمه دیگر با قارچ)
ارزیابی ریشه بدون مایه کوبی (نیمه دیگر با قارچ)

شکل ۳ . فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز در آزمایش امکان سیستمیک شدن کاهش مقاومت ایجاد شده توسط نماتود* دربرابر قارچ به قسمت‌های دیگر ریشه**

* : *M. javanica* ** : *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* *: فعالیت آنزیم بر اساس میزان محصول آنزیم (ترانس سینامیک اسید) تعیین شده است.
– ستون‌هایی که با حروف همانند نشان داده شده‌اند در سطح ۵٪ و بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار ندارند.
– هر عدد میانگین ۱۰ تکرار است.

(کلاس a) ولی طی روزهای بعد از مایه‌زنی بدون اختلاف معنی‌دار کاهش تدریجی داشت.

- ریشه مایه‌زنی شده با قارچ، درحالی که نیمه دیگر ریشه بدون مایه‌زنی بود:

فعالیت آنزیم در روز اول با اختلاف معنی‌دار نسبت به دیگر بخش‌ها آغاز شد(کلاس b) و طی روزهای بعد شدیداً افزایش نشان داد و در روز ششم به حداکثر میزان خود رسید (کلاس d).

- ریشه بدون مایه‌زنی درحالی که نیمه دیگر ریشه با قارچ مایه‌زنی شده بود:

فعالیت آنزیم در روز اول مشابه تیمار ب آغاز شد(کلاس a) ولی طی روزهای بعد با میزان بیشتری نسبت به این تیمار افزایش نشان داد و در روز ششم به حداکثر میزان خود رسید (کلاس c).

نتایج نشان می‌دهد که *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* القای کننده فعالیت‌های دفاعی در رقم مقاوم Roma VF است و محرک القای سیستمیک PAL در دیگر قسمت‌های ریشه می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش مایه‌زنی گیاه با نماتود، نیز چنین استنباط گردید که نماتود *M. javanica* در رقم حساس Roma VF ، نه تنها القا کننده فعالیت این آنزیم نمی‌باشد، بلکه سبب کاهش یا خاموش شدن فعالیت این آنزیم (فعالیت‌های دفاعی گیاه) نیز می‌گردد. ایدنس و همکاران نیزکاهش فعالیت آنزیم PAL در واکنش متقابل سازگار بین *M. incognita* و سیب‌زمینی را نشان دادند. کولتیوارهای حساس سیب زمینی آلوده شده با *M. hapla* نیز کاهش فعالیت PAL را نشان می‌دهند (۱۲). استفاده از ممانعت کننده‌های

فعالیت PAL مانند2- amino Indon- 2 phosphonic acid (AIP)، مسیر فنیل پروپانوئید را ممانعت می‌نماید. رابطه ناسازگار *P. parasitica* جدایه EMWA با گیاه آرابیدوپسیس اکوتیپ col-o مایه‌زنی شده با AIP به رابطه سازگار تبدیل شده است (۲۸). پالاس و همکاران نشان دادند که مهار نمودن بیان ژن PAL در توتون مقاوم به ویروس موزائیک توتون، موجب غیر فعال شدن مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) و بروز آلودگی می‌شود(۲۶). صاحبانی و همکاران نیز نشان دادند که مقاومت گوجه فرنگی واریته Roma VF (مقاوم به نژاد یک *F. oxysporum* fsp *lycopersici* وحساس به نماتود *M. javanica*) در اثر حمله نماتود به قارچ کاهش می‌یابد.

در این تحقیق نشان داده شده است که در تعامل بین نماتود مولد گره ریشه و عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی، نقش نماتود به مراتب فراتر از ایجاد زخم و آماده سازی زمینه نفوذ قارچ می‌باشد. کاهش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در گیاه گوجه فرنگی توسط نماتود در مقابل قارچ نه تنها در محل مایه‌زنی با نماتود، بلکه به تمام قسمت‌های ریشه گیاه سیستمیک می‌شود، لذا در صورتی که قسمتی از گیاه مورد حمله قرار گیرد، کاهش سیستم دفاعی گیاه در تمام قسمت‌های ریشه آن گیاه حادث شده به طوری که آلودگی پاتوژن‌های ثانویه مانند *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* افزایش می‌یابد.

با توجه به دامنه وسیع میزبانی برخی نماتودها از جمله نماتودهای مولد گره ریشه، این موضوع قابل استنباط است که به علت توانائی کاهش یا مهار مکانیسم‌های دفاعی در گیاه توسط این نماتود، تعداد واریته‌های مقاوم بر علیه این نماتود بسیار معدود می‌باشد. تاکنون مطالعات محدودی در خصوص چگونگی تأثیر نماتودها بر مکانیسم‌های دفاعی گیاه انجام شده است، بنابراین مطالعات تکمیلی‌در این زمینه و ارتباط آن با مراحل بیولوژی و تغذیه نماتود می‌تواند روشنگر بسیاری از مسائل در این زمینه باشد.

منابع مورد استفاده

۱. صاحبانی، ن.۱۳۸۲. بررسی شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در ارتباط با نماتود مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* و بررسی برخی مکانیسم‌های دفاع بیوشیمیائی گیاه. رساله دوره دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۲. صاحبانی، ن.،ج. زاد، ع. شریفی تهرانی، ا. خیری و م. محمدی. ۱۳۸۴. مطالعه ارتباط بین مراحل مختلف بیولوژی نماتود مولد گره (*Meloidogyne javanica*) و شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی (*Fusarium oxysporum Lycopersici*) و امکان سیستمیک شدن حساسیت ایجاد شده به وسیله نماتود در گیاه به قارچ. مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۶: ۱۹۹-۲۰۷.

۳. فصیحیانی،ع. ۱۳۷۱. نژاد فیزیولوژیک فوزاریوم عامل پژمردگی گوجه فرنگی در استان هرمزگان. بیماری‌های گیاهی، ۲۶: ۱۹-۲۶.

4. Abawi, G. S., K. R. Barker. 1984. Effects of cultivar, soil temperature and population levels of *Meloidogyne incognita* on root necrosis and Fusarium wilt of tomotoes. Phytopathol. 74: 433-438.
5. Birdmore, J. and J.W.Granger. 1983. Cellular lignification as a factor in hypersensitive resistance of wheat to stem rust. Physiol. Plant Pathol. 22:209- 220.
6. Brueske,C.H. 1980. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato root infected and resistant to the root knot nematode *M. incognita*. Physiol. plant Pathol. 16:409-414.
7. Brueske, C. H. and V. H. Dropkin. 1973. Free phenols and necrosis in nematex tomato infected with the root knot nematode. Phytopathol. 63: 329- 334.
8. Campbell,M.W. and B.E. Ellis. 1992. Fungal-elicitor mediated responses in pine cell culture.1.Induction of phenylpropanoid pathway. Planta 186:409- 417.
9. Chen, C., R. R. Belanger, N. Benhamou and T. C. Paulitz. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *phytium aphanidermatum*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 56:13-23.
10. Cui, Y., J. Magill, R. Frederiksen and C. Magill 1996. Chalcone synthase and Phenylalanine ammonia lyase mRNA

levels following exposure of sorghum seedling to three fungal pathogen. Physiol. Mol. Plant Pathol. 49:187-199.
11. Eisenback, J. D. 1985. Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males, and females of the genus Meloidogyne (root-knot nematode). *In:* Sasser, J. N. and C.C Carter, (Eds.), An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol. 1, Biology and control, North Carolina state Univ., Graphics,Raleigh.
12. Edens, R. M., S. C. Anand, and R. I. Bolla, 1995. Enzymes of the phenylpropanoid pathway in soybean infected with *Meloidogyne incognita* or *Heterodera glycines.* J.of Nematol. 27:292-307.
13. Giebel,J. 1974. Biochemical mechanisms of plant resistance to nematodes. A review. J. Nematol. 6:175-184.
14. Gottstein,H.D., and J.Kuc. 1989. Induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. Phtopathology 79:176-179.
15. Hammand-Kosack,E. and D.G.J. Jones.1996. Resistance gene- dependent plant defense responses. The Plant Cell. 8:1773- 1791.
16. Hammerschmidt, R. and J. Kuc. 1995. Induced resistance to disease in plants. Kluwer Academic. Pub. 183 pp.
17. Hi-Ping, L., F. Rainer and C.L.Yu. 2001. Molecular evidence for induction of phenylalanine ammonia lyase during *Puccinia graminis* infection and elicitation in wheat. Can. J. Plant Phatol. 23:286-291.
18. Hussey, R. S. and K. R. Barker. 1973. A comparison of methodes of collecting inocula of *Meloidogyne spp*., including a new technique. Plant Dis. Rep. 75: 1025-1028.
19. Lamb,C.J. and M.A.Dixon. 1989. Signal and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. Cell 56:215-224.
20. Mai, W. F. and G. S. Abawi. 1987. Interactions among root-knot nematodes and Fusarium wilt fungi on host plants. Ann. Rev. Phytopathol. 25: 317-338.
21. Mohammadi, M. and H. Kazemi. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science 162:491-498.
22. Niebel, A., J.A.Engler,C.Tier. G.Engler, M.V. Montagu and G.Gheysen. 1993.Induction pattern of an extensin gene in tobacco upon nematode infection.Plant Cell 5:1697-1710.
23. Oka,Y., I.Chet and Y. Spiegel. 1997. Are pathogenesis-related proteins induced by Meloidogyne *javanica* or *Heterodera avenae* invasion? J. Nematol. 29: 501-508.
24. Ogallo, J. L. and M. A. McClure. 1996. Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematodes in tomato. Phytopathol. 86: 498-501.
25. Pallas, A., N.L.Paiva and R.A.Dixon. 1996. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. Plant J. 10:281-293.
26. Paxton, J. D. 1981. Phytoalexins-a working redefinition. Phytopathol. 101: 106.
27. Ryals, J.A., Urs H. Neuensschwander, M.G. Willits, A. Molina, H. Y. Steiner and M.D. Hunt. 1996.Systemic acquired resistance. The Plant Cell 8: 1808-1819.
28. Schindler, A. F., R. N. Stewart and P. Semeniuk. 1961. A synergistic Fusarium- nematodes interaction in carnation. Phytopathol. 51: 143-146.
29. Walker, J.C. 1981. Fusarium Wilt of Tomato. The American Phytopathological Society. USA.
30. Yalpini, N., P.Silverman and I.Raskin.1991. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus- inoculated tobacco. Plant Cell 3: 809-818.
31. Zacheo, G., T. Bleve-Zacheo, D. Pagoda, G. Orlando, and R.D. Durbin. 1995. The association between heat-induced susceptibility of tomato to *Meloidogyne incognita* and peroxidase activity. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 46:491-507.