

مطالعه تأثیر نماتود مولد گره ریشه (*Meloidogyne javanica*) بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز در ریشه گوجه فرنگی در تعامل با قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی *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 آمونیا لایاز (PAL) در ریشه گیاه گوجه فرنگی واریته روما 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 مایه زنی یک قسمت از ریشه گیاه به وسیله نماتود سبب بروز و تشدید بیماری فوزاریومی در قسمت دیگری از ریشه همان گیاه مایه زنی شده با قارچ می شود. به طوری که میزان بیماری در گیاهان تیمار در مقایسه با شاهد (بدون مایه زنی با نماتود) دارای اختلاف معنی دار بود. در این تحقیق هم چنین نشان داده شد که نماتود نه تنها قادر به کاهش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز در محل فعالیت و تغذیه خود می باشد بلکه می تواند فعالیت این آنزیم را به میزان قابل توجهی در دیگر قسمت های ریشه نیز کاهش دهد. بررسی فعالیت آنزیم در گیاهان شاهد (بدون مایه زنی با نماتود) نشان داد که القای فعالیت آنزیم در مقابل قارچ، به قسمت های دیگر ریشه گیاه سیستمیک می شود، ولی وجود نماتود در ریشه (در گیاهان تیمار) سبب کاهش معنی دار این آنزیم در گیاه می شود. فعالیت آنزیم در ریشه مایه زنی شده با نماتود با ریشه مایه زنی شده با قارچ در شاهد اختلاف بسیار معنی دار داشت.

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

مقدمه

۱. گیاهان دارای سدهای دفاعی ساختمانی و شیمیایی از پیش ساخته شده ای در بافت ها و سلول های خود هستند، به طوری که اغلب بیمارگرها قادر به غلبه بر این سدها نمی باشند.

۲. پس از تشخیص بیمارگر (یا عوامل غیر بیمارگر) توسط میزبان، مکانیسم های دفاعی گیاه به صورت موضعی یا سیستمیک، قسمت های مختلف گیاه را محافظت می نماید.

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. به ترتیب استادیار و کارشناس گیاه پزشکی، 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). القای 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 گوجه‌فرنگی 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 گوجه‌فرنگی به فوزاریوم عامل پژمردگی آوندی نژاد یک، در اثر پیش‌مایه‌زنی با نماتود مولد گره ریشه *M. incognita*، حساس شده و بیماری در آنها ایجاد می‌شود. آنها پیشنهاد کردند که احتمالاً مقاومت گیاه توسط نماتود شکسته شده است (۴). لیورد 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 بیماری‌زایی و افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز را ایفا می‌کند (۳۰). زاچئو و همکاران ارتباط مستقیمی بین افزایش میزان فنیل آلانین آمونیا لیاز و مقاومت به نماتود *M. incognita* در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی 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 آمونیا لیاز و Anodic peroxidase موجود در دیواره سلولی گیاه می‌باشد (۳۱). صاحبانی و همکاران نشان دادند که آلودگی گوجه‌فرنگی 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 آمونیا لیاز) 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 آکسین‌های 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

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 و ۲۳). فعالیت آنزیم PAL در واکنش متقابل سازگار بین *M. incognita* و سیب زمینی نیز کاهش نشان می‌دهد. در حالی که 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 پروپانویید را مختل می‌نماید که این شامل بیوستنز سالیسیلیک اسید نیز می‌شود. گیاهان آرابیدوپسیس (اکوتیپ col-o) مایه‌زنی شده با AIP موجب تبدیل رابطه ناسازگار *Phytophthora 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 در گیاه سیستیمیک 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 بیماری‌زای 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

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 PAL mRNA در کولتیوارهای مقاوم در مقایسه با کولتیوارهای حساس مشاهده شده است (۲۹). در کشت سلول‌های کاج تیمار شده با الیستورهای 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 سیستیمیک (SAR) و بروز آلودگی شده است (۲۶). آلودگی برگ‌های گندم به عامل زنگ ساقه با تزریق الیستورهای 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 در آن قابل مشاهده بوده است (۵ و ۱۷). القای تشکیل لیگنین هم‌آهنگ با افزایش سنتز آنزیم‌های PAL و آنزیم‌های دیگری که در مسیر فنیل پروپانویید مشارکت دارند از جمله cinnamyl alcohol dehydrogenase و 4-coumarat-coA ligase نیز می‌باشد. هی - 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 کولتیوارهای حساس و مقاوم گندم با استفاده از تکنیک PCR نشان دادند. آنها نتیجه گرفتند که الیستورهای زنده قارچی و الیستورهای استخراج شده از قارچ (مانند کیتین) و حتی الیستورهای 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 سیستیمیک 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 صورتی که آلودگی



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 آمونیلایز در تعامل با قارچ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی *Fusarium. oxysporum fsp lycopersici*

واريته 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 بذره‌های 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 از خاک 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، شکل ۱). سپس یکی از دو گلدان 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

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 میسلیم قارچ تهیه گردید که پس از عبور این سوسپانسیون از چندین لایه پارچه ملامل، میسلیم‌های آن حذف گردید. غلظت سوسپانسیون با استفاده از لام گلبول شمار انجام گرفت. در انجام آزمایش‌ها از سوسپانسیون حاوی ۱۰^۶ 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 اینوکولوم 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 مرفومتريک 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

سرد شده بود، با استفاده از ازت مایع به خوبی سائیده و نرم شد. سپس یک میلی لیتر بافر نمونه (Sample buffer) فسفات سدیم ۰/۱ مول pH=6 به آن اضافه و کاملاً هموزن 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. سوپرناتانت حاصل برای ارزیابی فعالیت آنزیم جدا، و تا قبل از انجام آزمایش در ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا از

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا از 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 $\lambda_{max} = 290 \text{ nm}$ 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 سیر بیوستز بسیاری از ترکیبات دفاعی از جمله بسیاری از فیتوالکسین‌ها به ویژه گروه بزرگ (فنیل پروپانویدها)، 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

خاک خارج و پس از شستشو با آب و دو مرتبه شستشو با آب مقطر سترون در سوسپانسیون اسپور (10^6 اسپور در میلی لیتر) 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 ۰-۱۰ بود 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=۱۰۰ مرگ گیاه (۲۹).

بخش دوم: بررسی تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا از 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.

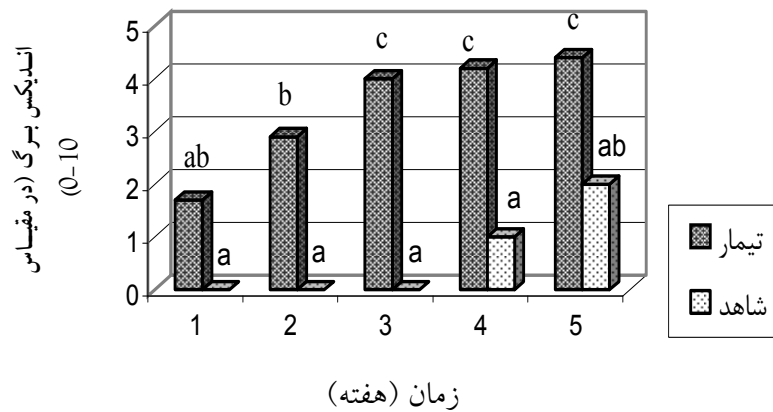
(ج) ریشه مایه‌زنی شده با قارچ در حالی که نیمه دیگر ریشه بدون مایه‌زنی با نماتود بود.

(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



شکل ۲. مقایسه میزان بیماری (اندیکس برگ) پژمردگی فوزاریومی * گوجه فرنگی **

در مایه‌زنی قسمتی از ریشه گیاه با نامتود *** 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.

ارزیابی و مقایسه قرار گرفت (شکل ۳).

- ریشه مایه‌زنی شده با نامتود 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 احتمالاً ناشی از عدم القاء سنتز آنزیم در گیاه به وسیله نامتود یا جلوگیری از فعالیت آن توسط نامتود می‌باشد

- ریشه مایه‌زنی شده با قارچ در حالی که نیمه دیگر ریشه با نامتود 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).

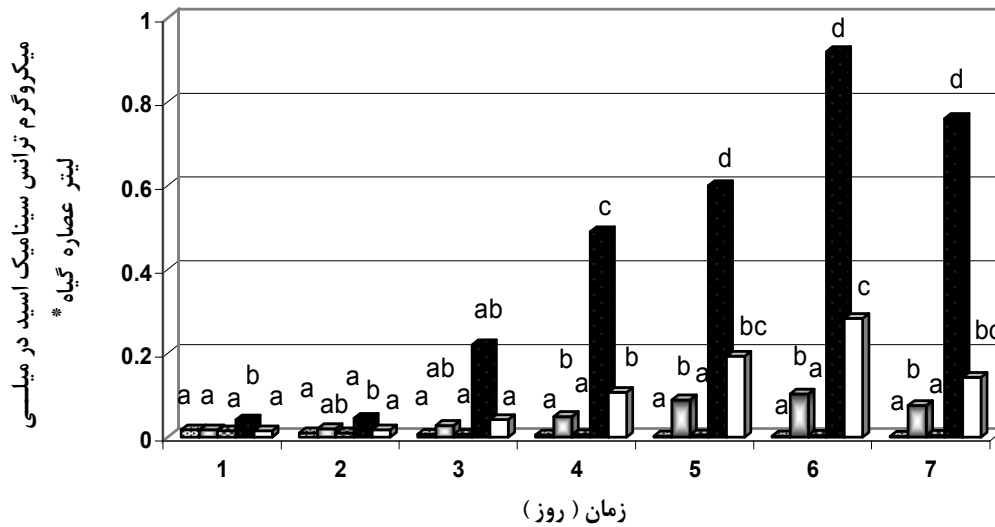
- ریشه مایه‌زنی شده با نامتود در حالی که نیمه دیگر ریشه با قارچ مایه‌زنی شده بود:

فعالیت آنزیم در روز اول مشابه بخش الف و ب بود

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 نامتود (تیمار) و گلدان مایه‌زنی نشده (شاهد) انتشار نیافت (شکل ۲).

در بخش دوم آزمایش (بررسی تغییرات فعالیت آنزیم PAL در قسمت‌های مختلف ریشه) بخش‌های زیر به تفکیک مورد



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

شکل ۳. فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز در آزمایش امکان سیستمیک شدن کاهش مقاومت ایجاد شده توسط نماتود*

در برابر 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 معنی دار ندارند. - هر عدد میانگین ۱۰ تکرار است.

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 نیز کاهش فعالیت آنزیم PAL در واکنش متقابل سازگار بین *M. incognita* و سیب زمینی را نشان دادند. کولتیوارهای حساس سیب زمینی آلوده شده با *M. hapla* نیز کاهش فعالیت PAL را نشان می‌دهند (۱۲). استفاده از ممانعت کننده‌های

(کلاس a) ولی طی روزهای بعد از مایه‌زنی بدون اختلاف

معنی دار کاهش تدریجی داشت.

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

فعالیت آنزیم در روز اول با اختلاف معنی دار 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

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 وارته‌های مقاوم بر علیه این نماتود بسیار محدود می‌باشد. تاکنون مطالعات محدودی در خصوص چگونگی تأثیر نماتودها بر مکانیسم‌های دفاعی گیاه انجام شده است، بنابراین مطالعات تکمیلی در این زمینه و ارتباط آن با مراحل بیولوژی و تغذیه نماتود می‌تواند روشنگر بسیاری از مسائل در این زمینه باشد.

فعالیت PAL مانند 2-amino Indon-2 phosphonic acid (AIP)، مسیر فنیل پروپانوئید را ممانعت می‌نماید. رابطه ناسازگار *P. parasitica* جدایه EMWA با گیاه آرابیدوپسیس اکوتیپ col-0 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 وارته Roma VF (مقاوم به نژاد یک *F. oxysporum* fsp *lycopersici* و حساس 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 آمونیلایز در

منابع مورد استفاده

- 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.
- صاحبانی، ن. ج. زاد، ع. شریفی تهرانی، ا. خیری و م. محمدی. ۱۳۸۴. مطالعه ارتباط بین مراحل مختلف بیولوژی نماتود مولد گره ریشه (*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.
- فصیحیانی، ع. ۱۳۷۱. نژاد فیزیولوژیک فوزاریوم عامل پژمردگی گوجه فرنگی در استان هرمزگان. بیماری‌های گیاهی، ۲۶: ۱۹-۲۶.
- 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 tomatoes. *Phytopathol.* 74: 433-438.
- 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.
- 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.
- 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.
- Campbell, M.W. and B.E. Ellis. 1992. Fungal-elicitor mediated responses in pine cell culture. I. Induction of phenylpropanoid pathway. *Planta* 186:409- 417.
- 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.
- 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. *Phytopathology* 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 Pathol.* 23:286-291.
 18. Hussey, R. S. and K. R. Barker. 1973. A comparison of methods 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. Neuenschwander, 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. Blevé-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.