مطالعه تغییرات کمّی و کیفی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تعامل بین نماتود مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* و قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

نوازاله صاحبانی[۱*]، جواد زاد[۲]، عباس شریفی تهرانی[۲] و احمد خیری[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۴/۴/۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۳/۳۰)

چکیده

مقایسه میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تعامل نماتود مولد گره ریشه (*Meloidogyne javanica*) و قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) در گیاه گوجه فرنگی رقم Roma VF (مقاوم به قارچ و حساس به نماتود) در تیمارهای مایه‌کوبی گیاه با قارچ، مایه‌کوبی با نماتود و مایه‌کوبی قارچ به گیاه پیش آلوده شده با نماتود در مراحل مختلف زندگی (به طور جداگانه) در شرایط گلخانه و آزمایشگاه انجام گرفت. نتایج نشان داد که در مایه‌کوبی گیاه با قارچ، فعالیت آنزیم از روز اول و طی روزهای بعد افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد نشان داده و در روز پنجم به حداکثر میزان خود رسید (Peak) و به دنبال آن به تدریج کاهش یافت. فعالیت این آنزیم در گیاه مایه‌کوبی شده با نماتود طی روزهای متوالی افزایش معنی‌دار نشان نداد ولی نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار بود. فعالیت این آنزیم در آزمایش مایه‌کوبی قارچ به گیاهان پیش آلوده شده با نماتود در مراحل مختلف زندگی و اختلاف معنی‌دار آن نسبت به شاهد (مایه‌کوبی شده با قارچ) نشان داد که نماتود در تمام تیمارها قادر است نه تنها فعالیت آنزیم را محدود نماید، بلکه مانع از افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در گیاه حتی در حضور قارچ شود. حداکثر میزان کاهش دهندگی فعالیت آنزیم‌ها توسط نماتود مربوط به مرحله ظهور بالغ‌های جوان (۱۵ روز بعد از نفوذ نماتود به ریشه گیاه) می‌باشد. با توجه به افزایش میزان تغذیه نماتود در این مرحله، به نظر می‌رسد القای کاهش فعالیت آنزیم توسط نماتود به نحوی مرتبط با تغذیه نماتود باشد. پنج فرم آیزوزایم پلی فنل اکسیداز با Rm های ۰/۲۶ ، ۰/۳۱ ، ۰/۴۴ ، ۰/۵۰ و ۰/۶۳در این آزمایش‌ها القای یا سنتز شد که در بین آنها باند ۰/۳۱ در گیاهان مایه‌کوبی شده با نماتود تنها و قارچ تنها دارای ضخامت مشابه بود. دو باند ۰/۴۴ و ۰/۵۳ در گیاهان مایه‌کوبی شده با نماتود همانند گیاهان سالم بود و باندهای ۰/۲۶ ، ۰/۴۴ ، ۰/۵۰ و ۰/۵۳ در گیاهان مایه‌کوبی شده با نماتود – قارچ در مقایسه با قارچ تنها کاهش قابل توجه نشان داد. بنابراین وجود نماتود در گیاه سبب کاهش یا خاموش شدن سنتز این آنزیم شده و کاهش در بعضی فرم‌های آن شامل ۰/۲۶ ، ۰/۴۴ ، ۰/۵۰ و ۰/۶۳ نسبت به ۰/۳۱ محسوس‌تر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Meloidogyne javanica* ، پلی فنل اکسیداز، مراحل زندگی نماتود، *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*، ارتباط متقابل گیاه– پاتوژن

۱. استادیار گیاه‌پزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲. استادان گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Sahebani@ut.ac.ir

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]

مقدمه

تعامل بین گونه‌های مختلف نماتود مولد گره و بسیاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله قارچ‌ها و باکتری‌ها مورد توجه بسیاری از محققین بوده است. اولین بار در سال ۱۸۹۲ اتکینسون مشاهده نمود که پژمردگی فوزاریومی پنبه در حضور نماتود مولد گره شدیدتر ظاهر شد (۱۲). تا کنون این‌گونه روابط متقابل روی بسیاری از محصولات از جمله یونجه (۹)، لوبیا (۱۳)، میخک (۱۹)، پنبه (۶و۸)، نخود (۷)، توتون (۱۷)، گوجه فرنگی (۴، ۱۲، ۱۳ و ۱۶) و سیب زمینی (۱۳) مطالعه شده است. در کلیه این روابط متقابل، نقش نماتود به عنوان تشدید کننده بیماری‌زایی پاتوژن ثانویه ذکر شده است. ابتدا تصور بر این بود که نقش نماتود تنها ایجاد زخم و تسهیل کننده نفوذ پاتوژن ثانویه می‌باشد تا این که پاول در سال ۱۹۷۱ و ۱۹۷۹ ثابت کرد که آلودگی قارچ در حضور نماتود به مراتب بیشتر از آلودگی قارچ به تنهایی است و شدت بیماری بیشتراز میزان بیماری هر کدام به تنهایی است. او پیشنهاد نمود که در این تعامل نقش نماتود صرفاً ایجاد زخم و آماده سازی زمینه نفوذ نبوده و احتمالاً نماتود موجب اختلال در فیزیولوژی گیاه شده به طوری که استعداد آلودگی آن توسط قارچ عامل پژمردگی افزایش می‌یابد (۱۳و۱۸). ایجاد زخم مکانیکی روی ریشه‌های پنبه و دیگر گیاهان، در مقایسه با زخم‌های ناشی از حمله نماتود مولد گره حساسیت کمتری در میزبان نسبت به آلودگی قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی ایجاد می‌کند (۱۳). در اثر آلودگی نماتود مولد گره تغییرات مرفولوژیکی، آناتومیکی و بیوشیمیایی درمنطقه تغذیه نماتود رخ می‌دهد. از طرف دیگر قارچ فوزاریوم مولد پژمردگی نیز در همین ناحیه فعالیت و بیماری‌زایی داشته و سرانجام خود را به آوندهای چوبی می‌رساند. بنابراین به نظر می‌رسد که در این محل تعامل مستقیم، اعم از نفوذ قارچ به داخل گال و تجمع در آن بین این دو پاتوژن برقرار شود. از طرف دیگر رشد و تکثیر بیش از حد طبیعی این سلول‌ها در اثر حمله نماتود مولد گره به نحوی روند طبیعی سلول‌ها، اعم از استحکام دیواره‌ها از نظر جانشینی مواد لیگنینی و سلولزی و ضخامت طبیعی دیواره سلولی را به تأخیر می‌اندازد. لذا آلودگی قارچی در این ناحیه به سهولت انجام می‌گیرد (۹). وفور ترکیبات مختلف اعم از اسیدهای آمینه، پروتئین، اسیدهای چرب، لیپید، RNA و DNA در سلول‌های غول آسا در مقایسه با سلول‌های سالم همانند یک بستر غذایی تمایل قارچ را به آلودگی، حتی درون سلول‌های غول آسا افزایش می‌دهد (۱۳). فتاح و وبستر (۹) نشان دادند که در تعامل نماتود *Meloidogyne javanica* و *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* طی سه هفته بررسی میزان نفوذ قارچ در آوندهای چوبی و سلول‌های غول آسا در ارقام حساس به قارچ به حدی بود که منجر به انسداد آوندها و تجزیه سلول‌های غول آسا گردیده است. در حالی که در ارقام مقاوم تا هفته دوم هیچ گونه علائمی از بیماری و نشانه‌ای از وجود قارچ در آوندهای چوبی مشهود نبوده و در هفته سوم نیز تعداد معدودی میکروکنیدی فقط در آوندهای چوبی قابل مشاهده بوده است. دی وی و همکاران (۸) نشان دادند که شدت پژمردگی فوزاریومی پنبه ناشی از ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* با میزان جمعیت نماتود رابطه مستقیم دارد. شدت بیماری در صورت وجود تعامل بین نماتود و قارچ می‌تواند منجر به مرگ گیاه شود. در حالی که همان میزان اینوکلوم قارچ بیماری را به مراتب کمتر ایجاد نموده است.

پلی فنل اکسیداز (PPO; EC 1.14.18.1) در اکسیداسیون فنل‌ها به کئینون‌ها و تشکیل لیگنین (Lignification) در سلول‌های گیاهی نقش مؤثری دارد. در ارتباط با امکان مؤثر بودن فعالیت اکسیداسیون آنزیم‌های فنل اکسیداز در واکنش‌های دفاعی گیاه از جمله واکنش فوق حساسیت (HR)، برخی تحقیقات نشان دهنده این است که آنزیم‌هایی مانند پلی فنل اکسیداز ممکن است در فعالیت‌های دفاعی و HR در مقابل ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها دخالت داشته باشد. این آنزیم هم‌چنین در واکنش‌های قهوه‌ای شدن بافت‌های زخمی و تشکیل سدهای دفاعی در مقابل بیمارگرها دخالت دارد (۱۴).

افزایش قابل توجه فنل‌ها و آنزیم PPO به‌طور هم‌آهنگ در

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]

مقاومت بسیاری از گیاهان قابل مشاهده است. این افزایش عمدتاً در محل آلودگی بیمارگر محسوس‌تر است. در این ارتباط لازم به ذکر است که ترکیبات کئینون حاصل از اکسیداسیون فنل‌ها، ترکیباتی به مراتب سمی‌تر از فنل‌ها می‌باشند. نقش کئینون‌ها در مقاومت گیاهان در مقابل باکتری‌ها و ویروس‌ها کاملاً ثابت شده است. این آنزیم به طور طبیعی در گیاهان پس از زخمی شدن نیز افزایش یافته و عمدتاً با قهوه‌ای شدن بافت (تشکیل ملانین) همراه می‌باشد (۹ و ۱۴). فعالیت این آنزیم به ویژه با مایه‌کوبی گوجه فرنگی و خربزه با فرم‌های ویژه *F. oxysporum* افزایش ناچیز نشان داده است (۹ و ۲۰). بورسک و دروپکین (۲۲) گزارش کردند که در رقم‌های مقاوم گوجه فرنگی، میزان ترکیبات فنلی اکسید شده و فعالیت آنزیم فنیل آلانین امونیالیاز (PAL) و PPO به طور هم‌آهنگ افزایش داشته است. حداکثر فعالیت این دو آنزیم و تجمع فنل، در ۲۷ درجه سانتی‌گراد بوده است. در حالی که مایه‌کوبی گیاهان در درجه حرارت‌های بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد موجب کاهش آنها شده است. با توجه به این‌که بین فنل‌های اکسید شده و آنزیم‌های اکسید کننده فنل‌ها (PPO) در رقم‌های مقاوم هم‌آهنگی نزدیکی وجود دارد، بسیاری از محققان نقش این آنزیم را در مقاومت با اهمیت توصیف کرده‌اند (۱۴ و ۲۲).

هدف از انجام این تحقیق بررسی تغییرات کمّی و کیفی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تعامل بین نماتود مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* و قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* و امکان کاهش القای (یا خاموش نمودن) سنتز این آنزیم توسط نماتود در گیاه و تشدید بیماری قارچی در این تعامل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

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 بیماریزائی 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 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 میلی لیتر آب مقطر سترون به هر تشتک پتری و به هم زدن آن با میله شیشه‌ای، سوسپانسیونی از اسپورها و میسلیوم قارچ تهیه شد 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 میلی لیتر استفاده شد.

تهیه مایه تلقیح نماتود

نمونه آلوده به نماتود از مزارع گوجه فرنگی اطراف شیراز (استان فارس) تهیه شد و پس از تهیه توده تخم منفرد، روی گوجه فرنگی رقم روت گرز تکثیر گردید. استخراج تخم و تهیه لارو سن دو با استفاده از روش هوسی و بارکر (۱۱) انجام گرفت. ضمناً با استفاده از خصوصیات مرفولوژیکی و مرفومتریک، گونه نماتود *M. javanica* تشخیص داده شد (۱۵).

مدت زمان لازم برای نفوذ بیشترین تعداد لارو سن دو نماتود به داخل ریشه گوجه فرنگی رقم Roma VF بدون اختلاف معنی‌دار نسبت به روز بعد بر اساس صاحبانی (۲) دو روز در نظر گرفته شد. هم‌چنین برخی از مراحل زندگی نماتود شامل مرحله تولید سلول‌های غول آسا، مرحله ظهور بالغ‌های جوان و مرحله تخم‌گذاری روی این واریته، نیز بر اساس منبع مذکور به ترتیب ۴ ، ۱۵ و ۲۱ روز در نظر گرفته شد.

آزمایش ۱ : بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گوجه فرنگی رقم Roma VF مایه‌کوبی شده با قارچ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی

در این آزمایش گیاهچه‌های گوجه فرنگی در مرحله شش برگی به وسیله سوسپانسیون 10^6 اسپور در میلی لیتر قارچ

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]

مایه‌کوبی شد. نحوه مایه‌کوبی به صورت قرار دادن ریشه‌ها در سوسپانسیون اسپور قارچ به مدت پنج دقیقه و کشت مجدد آنها در خاک سترون بود.

شاهد در این آزمایش شامل گیاهانی بودند که به جای قارچ، با آب مقطر سترون مایه‌کوبی شدند. این آزمایش با ۱۰ تکرار به ازای هر تیمار، در یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

آزمایش ۲ : بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گوجه فرنگی رقم Roma VF مایه‌کوبی شده با نماتود *M. javanica*.

در این آزمایش گیاهچه‌های گوجه فرنگی در مرحله شش برگی با جمعیت ۲۰۰۰ لارو به ازای هر گیاه (لارو سن دو نماتود) مایه‌کوبی شد. نحوه مایه‌کوبی، قراردادن لاروها در سه حفره در فاصله حدود یک سانتی‌متر در اطراف هر گیاه بود. شاهد در این آزمایش شامل گیاهانی بودند که به جای نماتود، با آب مقطر سترون مایه‌کوبی شدند. این آزمایش با ۱۰ تکرار به ازاء هر تیمار، در یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

آزمایش ۳ : بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گوجه فرنگی رقم Roma VF مایه‌کوبی شده با قارچ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی و نماتود در مراحل مختلف زندگی نماتود

بدین منظور آزمایشی با تیمارهای زیر طراحی گردید:

الف) مایه‌کوبی هم‌زمان نماتود و قارچ به گیاه

ب) مایه‌کوبی قارچ چهار روز بعد از نفوذ نماتود به ریشه گیاه، این زمان مصادف با تشکیل سلول‌های غول آسا در ریشه گیاه است.

ج) مایه‌کوبی قارچ ۱۵ روز بعد از نفوذ نماتود به ریشه گیاه، این زمان مصادف با به وجود آمدن بالغ‌های جوان است.

د) مایه‌کوبی قارچ ۲۱ روز بعد از نفوذ نماتود به ریشه گیاه، این زمان مصادف با آغاز تخم‌گذاری نماتود ماده است.

شاهد در این آزمایش برای هر تیمار شامل گیاهانی بودند که متناسب با همان زمان زندگی نماتود، فقط به وسیله قارچ مایه‌کوبی شدند.

مایه‌کوبی نماتود به گیاه در مرحله شش برگی و با جمعیت ۲۰۰۰ لارو به ازای هر گیاه انجام گرفت و با احتساب دو روز برای نفوذ نماتود به ریشه، گیاهچه از خاک خارج نموده و پس از شستشوی کامل ریشه‌ها با آب، مجدداً در خاک سترون کاشته شد. در تیمارهای دیگر نیز در زمان‌های مختلف متناسب با زندگی نماتود به عنوان تیمارهای آزمایش مجدداً از خاک خارج و ریشه آنها به روش فرو بردن در سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر به مدت پنج دقیقه مایه‌کوبی شدند. نمونه‌برداری برای هر تیمار با فواصل یک روز و به مدت هفت روز انجام گرفت. ریشه‌ها پس از شستشوی کامل با آب و آبگیری سطحی با دستمال کاغذی، تا زمان انجام آزمایش در ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

از آنجا که بهترین شرایط دمایی خاک برای فعالیت قارچ و نماتود و گیاه ۱ ±۲۷ درجه سانتی‌گراد است (۲۰)، در کلیه آزمایش‌ها جهت جلوگیری از نوسان شدید دما به ویژه در خاک سیستمی بدین صورت طراحی شد که سینی‌های حاوی آب به وسیله بخاری آکواریوم تنظیم دما می‌گردید. گیاهان در ظروف یک بار مصرف یک کیلویی بدون سوراخ کشت و داخل آب قرار داده می‌شدند به طوری که آب در بیرون ظروف تا سطح ریشه‌ها درجه حرارت مطلوب را تنظیم می‌نمود. هر گیاه هر روز به میزان مساوی آبیاری شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز به روش زیر انجام شد (۱۴). دو میلی لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره نمونه که دارای ۴۰ میکروگرم پروتئین باشد، ۲۰ میکرولیتر محلول پرولین و مقدار کافی بافر سیترات - فسفات ۲۵ میلی‌مول طوری که حجم نهایی دو میلی‌لیتر باشد در یک لوله آزمایش کوچک کاملاً مخلوط و این مخلوط به مدت دو دقیقه به وسیله ورتکس هوادهی شد. سپس دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط صفر گردید. دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu) با مشخصات طول موج λ max =۵۱۵ nm، زمان یک دقیقه، فواصل زمانی ۱۰ ثانیه و جذب نور (Absorbance)

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]

تنظیم گردید. سپس ۴۰ میکرولیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی‌مول به مخلوط فوق اضافه کرده و سریعاً مخلوط نموده و بلافاصله تغییرات جذب نور با فواصل ۱۰ ثانیه و به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات جذب نور (ناشی از واکنش آنزیم با سوبسترا) در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین عصاره گیاه تعیین شد. میزان پروتئین کل عصاره گیاه با روش بردفورد انجام گرفت (۵) و از آلبومین سرم گاوی فراکسیون پنج نیز به عنوان استاندارد استفاده شد.

بررسی الکتروفورز ناواسرشت آنزیم پراکسیداز

بررسی الکتروفورز بومی یا ناواسرشت (Native or non denaturing PAGE) ایزوزیم‌های پلی فنل اکسیداز با استفاده از ژل جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۶ درصد مطابق با روش ارائه شده در مقاله محمدی و همکاران (۱۴) انجام گرفت. رنگ آمیزی ژل با بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مول، pH=7 محتوی دی هیدروکسی فنیل آلانین (DOPA) انجام گرفت. برای ریختن نمونه در چاهک‌ها، برای کلیه تیمارها، مقداری از عصاره که حدود ۳۰ میکروگرم پروتئین داشته باشد حجم آن با افزودن بافر نمونه به حدود ۳۵ میکرولیتر رسانده شده بود به وسیله میکروپیپت و نوک بلند و نازک آن در داخل چاهک‌ها ریخته شد.

برای ارزیابی و محاسبات آماری کلیه آزمایش‌های انجام شده و آنالیز میانگین آنها از برنامه نرم افزاری spss(ver.11) و برای رسم نمودارها نیز از برنامه نرم افزاری (Office 2003) excel استفاده گردید.

نتایج

نتایج بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

- فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در آزمایش مایه‌کوبی گیاه با قارچ

فعالیت آنزیم در گیاهان تیمار از روز دوم اختلاف معنی‌دار (کلاس b) نسبت به شاهد (مایه‌کوبی شده با آب مقطر سترون) (کلاس a) نشان داده و در روزهای بعد نیز به سرعت افزایش نشان داد. اختلاف فعالیت آنزیمی طی روزهای متوالی معنی‌دار بود و در روز پنجم به حداکثر میزان خود رسید (کلاس e) و در روزهای بعد به تدریج کاهش یافت. در گیاهان شاهد تغییرات فعالیت آنزیم طی روزهای متوالی معنی‌دار نبود (شکل ۱).

- فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در آزمایش مایه‌کوبی گیاه با نماتود

در این آزمایش فعالیت آنزیم در روز اول با اختلاف معنی‌دار (کلاس b) نسبت به شاهد (مایه‌کوبی شده با آب مقطر سترون) (کلاس a) آغاز شد. ولی طی روزهای متوالی بعد از مایه‌کوبی بدون اختلاف معنی‌دار بود ولی با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (شکل ۲).

- فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در آزمایش مایه‌کوبی گیاه با نماتودو قارچ

الف) تیمار مایه‌کوبی قارچ و نماتود به گیاه به طور هم‌زمان

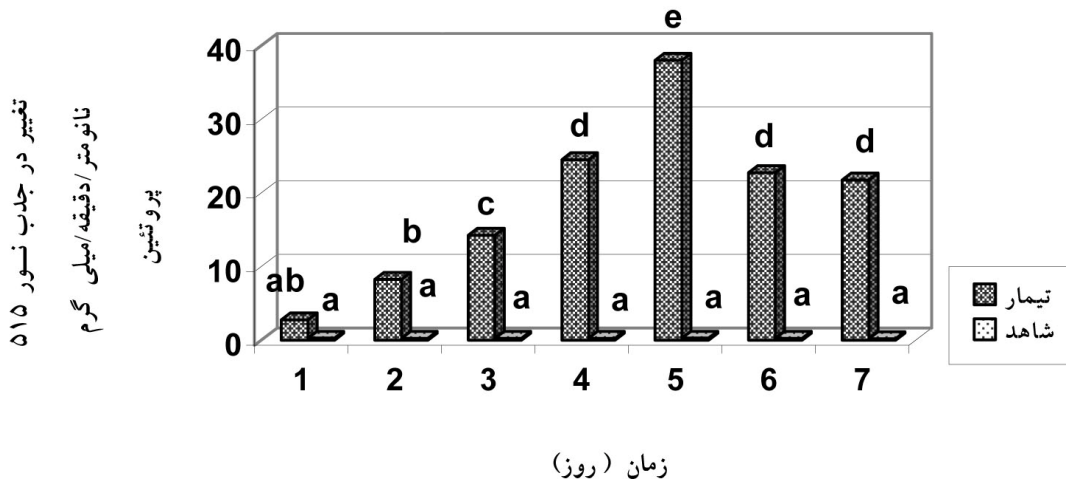
در این تیمار در روز اول میزان فعالیت آنزیم همانند شاهد (مایه‌کوبی شده با قارچ) (کلاس a) بود و تا روز چهارم نیز اختلاف بین تیمار و شاهد معنی‌دار نبود. ولی در روز پنجم اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. حداکثر فعالیت آنزیم در گیاهان تیمار (قارچ و نماتود) در روز چهارم بود (کلاس bc)، که با شاهد اختلاف معنی‌دار داشت. در حالی که در گیاهان شاهد حداکثر فعالیت آنزیم در روز پنجم بعد از مایه‌کوبی قارچ بود (کلاس d)، و طی روزهای بعد، فعالیت آنزیم در گیاهان تیمار و شاهد به تدریج کاهش یافت (شکل ۳).

ب) تیمار مایه‌کوبی گیاه با قارچ چهار روز بعد از نفوذ نماتود

میزان فعالیت آنزیم در گیاهان تیمار در روز اول بدون اختلاف معنی‌دار (کلاس a) نسبت به شاهد(مایه‌کوبی شده با قارچ) (کلاس ab) شروع شد. در حالی که در گیاهان شاهد طی روزهای بعد با اختلاف معنی‌دار افزایش نشان داده و در روز پنجم به حداکثر میزان خود رسید (کلاس d)، در گیاهان تیمار تا روز دوم افزایش ناچیز نشان داده (کلاس ab) ولی طی روزهای بعد به تدریج کاهش نشان داد (کلاس a)(شکل ۴).

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]



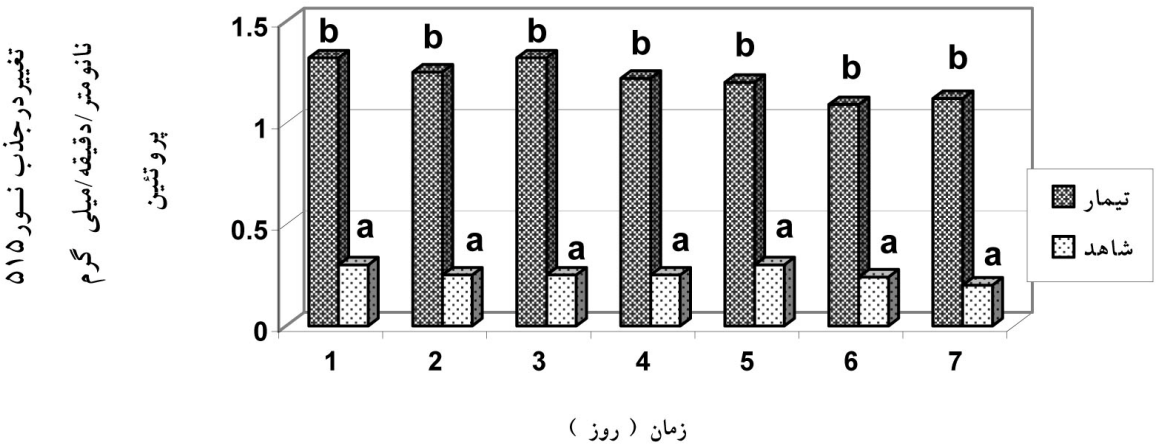
شکل ۱. مقایسه میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گوجه فرنگی* مایه‌کوبی شده با قارچ**

* : واریته Roma VF

** : ***F. oxysporum*** f.sp. ***lycopersici***

– 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.



شکل ۲. مقایسه فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز درگوجه فرنگی* مایه‌کوبی شده با نماتود**

* : واریته Roma VF

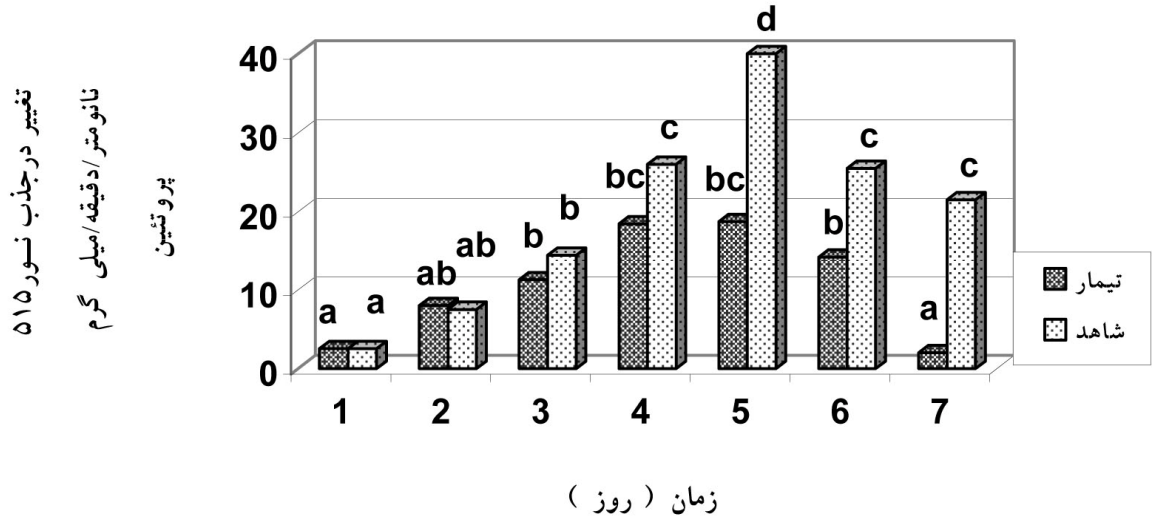
** : *M. javanica*

– 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.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]



شکل ۳. مقایسه فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گوجه فرنگی* مایه‌کوبی شده با قارچ- نماتود*** هم‌زمان**

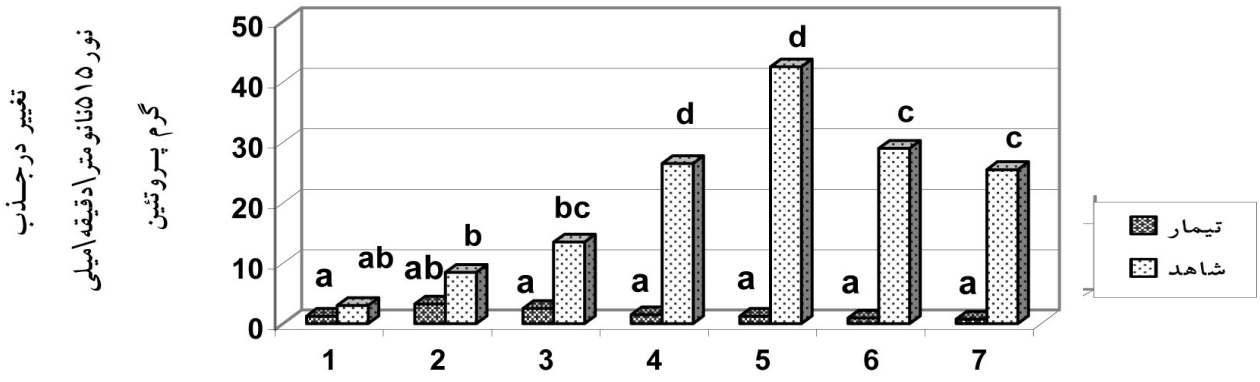
* : واریته Roma VF

** : *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

*** : *M. javanica*

- 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.



شکل ۴. مقایسه فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گوجه فرنگی* مایه‌کوبی شده با قارچ چهار روز بعداز نفوذ نماتود*****

* : واریته Roma VF

** : *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

*** : *M. javanica*

- 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.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]

ج) تیمار مایه‌کوبی گیاه با قارچ ۱۵ روز بعد از نفوذ نماتود

در این تیمار فعالیت آنزیم در روز اول با شاهد (مایه‌کوبی شده با قارچ) اختلاف معنی‌دار نداشت و طی روزهای بعد نیز به تدریج میزان آن کاهش یافت. در حالی که در گیاهان شاهد طی روزهای متوالی با اختلاف معنی‌دار افزایش نشان داد و در روز پنجم به حداکثر (peak) رسید (کلاس e). اختلاف میزان فعالیت آنزیم در تیمار و شاهد معنی‌دار بود شکل(۵).

د) تیمار مایه‌کوبی گیاه با قارچ ۲۱ روز بعد از نفوذ نماتود

در این تیمار فعالیت آنزیم در روز اول (کلاس a) با شاهد (مایه‌کوبی شده با قارچ) اختلاف معنی‌دار داشت (کلاس ab). ولی طی روزهای بعد به تدریج کاهش نشان داد. در حالی که در گیاهان شاهد طی روزهای متوالی با اختلاف معنی‌دار افزایش نشان داد (شکل ۶).

نتایج بررسی الکتروفورز بومی آنزیم پلی فنل اکسیداز

همان گونه که در شکل ۷ قابل مشاهده است، باندهای ایزوزایمی پلی فنل اکسیداز در ژل الکتروفورز بومی (ناواسرشت) به رنگ سیاه قابل مشاهده هستند. اختلاف در وجود یا عدم وجود باند و ضخامت آنها نشان دهنده دخالت ایزوزیم مربوطه در مقاومت گیاه در مقابل قارچ یا نماتود است. پنج فرم آیزوزایم پلی فنل اکسیداز با Rm های ۰/۲۶، ۰/۳۱، ۰/۴۴، ۰/۵۰ و ۰/۶۳ در این آزمایش‌ها القای یا سنتز شد.

در گیاهان سالم باندهای آیزوزایمی ۰/۴۴ و ۰/۶۳ با تراکم کمتری قابل مشاهده بودند. در حالی که در تیمار مایه‌کوبی گیاه با قارچ تنها، پنج باند آیزوزایمی دیده شد. در بین این باندها، باند ۰/۳۱ دارای ضخامت قابل توجه بود. باندهای ۰/۶۳ و ۰/۴۴ دارای ضخامت تقریباً مشابه در درجه بعد و باندهای ۰/۲۶ و ۰/۵۰ دارای ضخامت ضعیف تر در درجه سوم قرار داشتند.

در تیمار مایه‌کوبی گیاه با نماتود تنها نیز به جز در باند ۰/۳۱ که با ضخامت قابل توجهی قابل مشاهده بود، دو باند دیگر ۰/۴۴ و ۰/۶۳ با اختلاف ناچیز شبیه گیاه سالم بود و این در حالی است که در تیمار مایه‌کوبی گیاه به وسیله قارچ و نماتود (۱۵ روز بعد از نفوذ)، باند ۰/۳۱ با اختلاف قابل توجه همانند تیمار مایه‌کوبی گیاه با نماتود تنها بود. ولی باندهای ۰/۲۶، ۰/۴۴، ۰/۵۰ و ۰/۶۳ با کمی افزایش نسبت به مایه‌کوبی گیاه با نماتود تنها و کاهش قابل توجه نسبت به مایه‌کوبی گیاه با قارچ تنها قابل توجه بود.

بحث

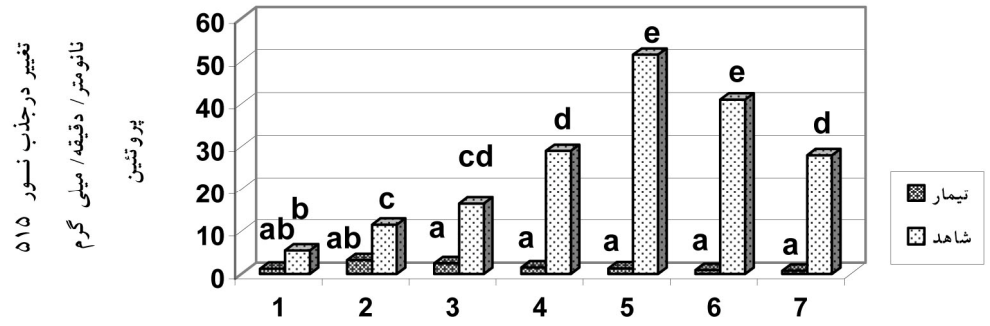
همان‌طور که از نتایج بررسی میزان فعالیت آنزیم پل فنل اکسیداز قابل مشاهده است، القای فعالیت این آنزیم توسط قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* از همان روز اول انجام گرفت. حداکثر میزان فعالیت آنزیم در روز پنجم بوده و به دنبال آن کاهش تدریجی و محسوس آنزیم رخ داد. مقایسه میزان فعالیت PPO در گیاهان تیمار و شاهد نشان داد که در حالت طبیعی، در گیاه، مقدار قابل توجهی آنزیم PPO جهت انجام روند طبیعی فیزیولوژیک تولید می‌شود. با این وجود اختلاف میزان آن در مقایسه با تیمار (القای به وسیله قارچ) قابل توجه بود.

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش مایه‌کوبی گیاه با نماتود، چنین استنباط گردید که تعامل نماتود – گیاه به شکل کاملاً متفاوتی نسبت به قارچ – گیاه انجام می‌گیرد. با توجه به این که نماتود جهت نفوذ به داخل گیاه و مهاجرت تا منطقه استقرار منطقه بین سلولی را انتخاب می‌کند (۲۱)، لذا حداقل تحریک گیاه صورت می‌گیرد. چهار روز بعد از نفوذ نماتود که هم زمان با شروع تشکیل سلول‌های غول آسا در منطقه تغذیه نماتود است. میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با روزهای قبل کاهش محسوس و قابل توجهی نشان داد. این زمان مصادف با شروع تعامل نماتود با سلول‌های گیاه و شروع تغذیه نماتود می‌باشد. با توجه به میزان فعالیت آنزیم PPO در این روز و روزهای بعد و مقایسه آن با شاهد، چنین استنباط می‌شود که نماتود قادر است روند طبیعی ساخت آنزیم را در گیاه تغییر داده و تنظیم منفی نماید.

علی‌رغم این که نماتود جهت تغذیه، سلول میزبان را زخم می‌نماید، ولی همان طور که ویلیامسون و هوسی

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]



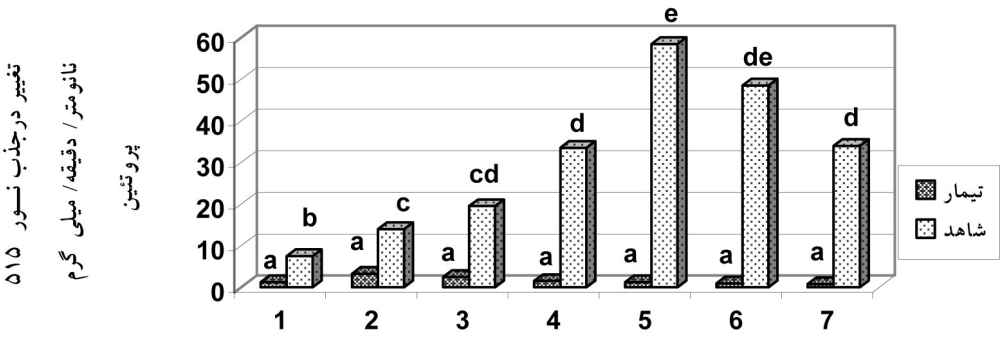
شکل ۵. مقایسه فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز درگوجه فرنگی* مایه‌کوبی شده با قارچ ۱۵روز بعد از نفوذ نماتود*****

* واریته Roma VF

** *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

*** *M. javanica*

- 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.



شکل ۶ . مقایسه فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیدازدرگوجه فرنگی* مایه‌کوبی شده با قارچ ۲۱روز بعد از نفوذ نماتود*****

* واریته Roma VF

** *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

*** *M. javanica*

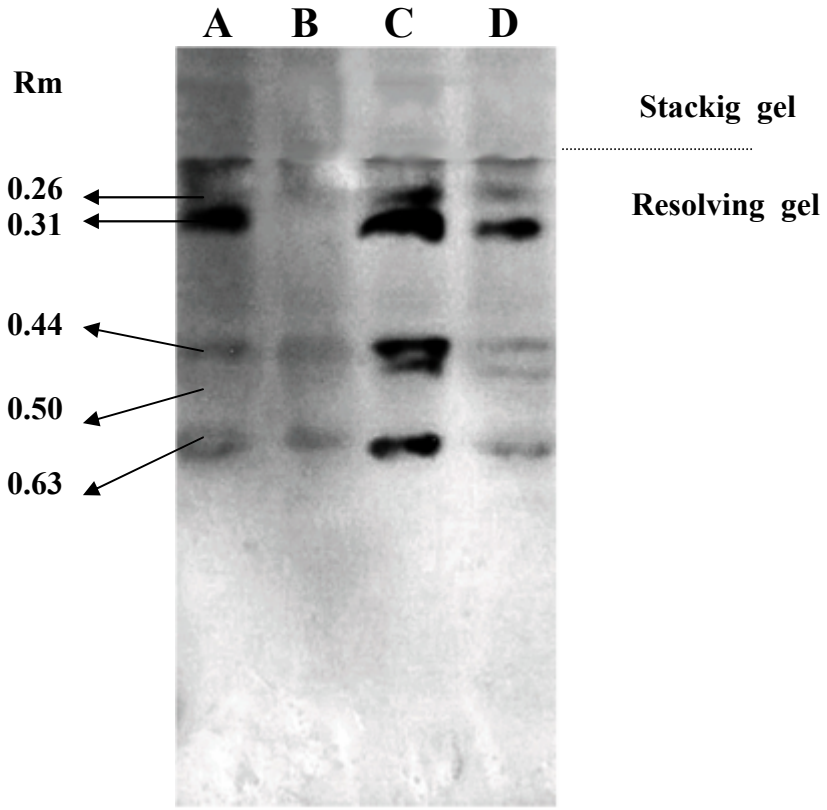
- ستون‌هایی که با حروف همانند نشان داده شده‌اند در سطح ۵٪ و براساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار ندارند.
- هر عدد میانگین ۱۰ تکرار است.

نشان داده‌اند نماتود در این زمان حداقل زخم را ایجاد می‌نماید (۲۱) و از طرف دیگر با توجه به این که نماتود از تعداد معدودی (۷- ۵) سلول غول آسا جهت تغذیه استفاده می‌کند و در هر سلول نیز به ایجاد یک سوراخ به اندازه نوک استایلت جهت مکش مواد غذایی از سلول اکتفا می‌کند، به نظر می‌رسد این تعداد زخم برای القای سیستم دفاعی گیاه کافی نباشد. از طرف دیگر با توجه به کاهش فعالیت آنزیم در مقایسه با شاهد این احتمال نیز وجود دارد که نماتود توسط کاهش دهنده یا خاموش‌کننده‌هایی روند ساخت این آنزیم را کاهش دهد.

براساس نتایج به دست آمده از آزمایش مایه‌کوبی گیاه با

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]



شکل۷ . مقایسه الکتروفورز بومی آیزوزایم‌های پلی فنل اکسیداز در آزمایش مؤثرترین مرحله زندگی

نماتود مولد گره ریشه در ایجاد کاهش مقاومت گیاه به قارچ

ترتیب چاهک‌ها:

A ریشه مایه‌کوبی شده با نماتود

B ریشه گیاه سالم (بدون مایه‌کوبی)

C ریشه گیاه مایه‌کوبی شده با قارچ

D ریشه گیاه مایه‌کوبی شده با قارچ و نماتود

نماتود، چنین استنباط گردید که یا نماتود القا کنندهٔ مناسبی برای فعالیت PPO نبوده و یا در تعامل نماتود – گیاه، شیوه ارتباط و شیوه تغذیه نماتود طوری است که حداقل تحریک را در گیاه ایجاد می‌نماید. این احتمال نیز وجود دارد که نماتود به نحوی سنتز این آنزیم را در گیاه کاهش دهد.

نتایج آزمایش مایه‌کوبی گیاه با قارچ و نماتود به طور هم‌زمان نشان داد که تا روز دوم که آغاز نفوذ نماتود به گیاه بود، علی‌رغم وجود نماتود، القای اولیه گیاه توسط قارچ انجام شده و میزان فعالیت آنزیم همانند شاهد بود. افزایش فعالیت آنزیم طی روزهای بعد نیز در اثر القای قارچ وجود داشت ولی نسبت به شاهد(مایه‌کوبی شده با قارچ) با سرعت کمتری انجام گرفت. افزایش فعالیت آنزیم تا روز ششم ادامه داشته و به حداکثر میزان خود رسید ولی در روز ششم وهفتم شدیداً کاهش یافت. این زمان مصادف با شروع تشکیل سلول‌های غول آسا و شروع تغذیه نماتود بود(۱و۲). در گیاهان شاهد افزایش فعالیت آنزیم با سرعت قابل توجه انجام گرفته و

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]

اختلاف آن با تیمار معنی دار بود. کاهش شدید فعالیت آنزیم PPO در روز ششم (شروع تشکیل سلول‌های غول آسا و تغذیه نماتود) نشان دهنده تأثیر نماتود در القاء سنتز و فعالیت آنزیم بود.

در تیمار مایه‌کوبی گیاه با قارچ، چهار روز بعد از نفوذ نماتود نیز، در روز اول فعالیت آنزیم به میزان حدود نصف شاهد (قارچ به تنهایی) آغاز شد و تا روز دوم نیز افزایش یافت که ناشی از القای اولیه آن توسط قارچ بود که علی‌رغم وجود مرحله فعال نماتود، همچنان موجب افزایش فعالیت آنزیم گردید. ولی به دنبال آن به سرعت فعالیت آنزیم کاهش یافت که احتمالاً ناشی از خاموش شدن یا کاهش سنتز و فعالیت آنزیم در اثر نماتود بود. در تیمار مایه‌کوبی قارچ به گیاه ۱۵ روز بعد از نفوذ نماتود، بیشترین میزان کاهش و سرکوب فعالیت آنزیم توسط نماتود مشاهده شد. این زمان که مصادف با خروج بالغ‌های جوان و آغاز تغذیه شدید نماتود می‌باشد، حداکثر القای کاهش مقاومت و سرکوب واکنش‌های دفاعی گیاه را اعمال نمود.

در تیمار مایه‌کوبی قارچ به گیاه ۲۱ روز بعد از نفوذ نماتود نیز، فعالیت آنزیم با میزان مشابه تیمار مایه‌کوبی گیاه با قارچ و نماتود به طور هم‌زمان آغاز شد و تا روز دوم نیز افزایش ناچیز نشان داد و به دنبال آن به تدریج کاهش یافت. با وجودی که این زمان مصادف با مرحله تخم‌گذاری نماتود بود، ولی تأثیر آن بر فعالیت آنزیم به اندازه ۱۵ روز بعد از نفوذ نبود، که احتمالاً ناشی از میزان تغذیه ،یا میزان کمتر القا نماتود در این مرحله بود. همان‌طور که از نتایج بررسی الکتروفورز بومی آنزیم پلی فنل اکسیداز قابل مشاهده است، در گیاهان سالم فرم‌هایی از آنزیم PPO به طور طبیعی سنتز شد (باندهای ۰/۴۴ و ۰/۶۳). ولی در تیمار مایه‌کوبی گیاه با قارچ، نه تنها ضخامت این باندها افزایش قابل توجه نشان داد، بلکه سنتز باندهای جدید ۰/۳۱ ، ۰/۲۶ و ۰/۵۰ نیز آغاز گردید. باند ۰/۳۱ دارای بیشترین ضخامت بوده و در مایه‌کوبی گیاه با بیمارگر سنتز آن آغاز شد. با توجه به این که در تیمار مایه‌کوبی گیاه با نماتود نیز این باند القا گردید، بنابراین احتمالاً در مقاومت به نماتود نقش فعال ندارد و سنتز آن توسط نماتود نیز کاهش نمی‌یابد. علاوه بر این دو باند ۰/۴۴ و ۰/۶۳ نیز در تیمار نماتود تنها دارای ضخامت همانند شاهد بود که به نظر می‌رسد کمتر از باندهای ۰/۲۶ و ۰/۵۰ تحت تأثیر نماتود باشد.

همان‌طور که از نتایج این آزمایش‌ها قابل مشاهده است، نماتود قادر است فعالیت این آنزیم را حتی در برابر قارچ محدود نماید و با توجه به این‌که این آنزیم از آنزیم‌های دفاعی گیاه می‌باشد، بنابراین کاهش فعالیت آن موجب کاهش مقاومت گیاه در مقابل بیمارگر می‌شود. در تعامل نماتود – قارچ، به نظر می‌رسد وجود نماتود کاهش دهنده واکنش‌های دفاعی گیاه و کاهش مقاومت در مقابل قارچ یا دیگر بیمارگرهای ثانویه باشد.

آنچه به طور کلی از این آزمایش استنباط گردید این بود که تعامل نماتود – گیاه و قارچ از ویژگی‌های خاصی برخوردار بود، از جمله :

– نماتود در موقع نفوذ ، تا زمان استقرار با حرکت بین سلول‌ها حداقل تحریک (زخم) را در سلول‌ها (گیاه) ایجاد می‌کند، به طوری که گیاه در مقابل آن همانند یک بیمارگر مخرب عکس العمل نشان نمی‌دهد (۲۱).

– در زمان تغذیه نماتود، حداقل ایجاد زخم در سلول‌های غول آسا ایجاد شده و تعداد محدود (۷–۵) سلول غول آسا به ازاء هر نماتود، به نحوی حداقل تحریک را در گیاه برای القاء سیستم دفاعی گیاه ایجاد می‌نماید.

– احتمالاً نماتود به نحوی روند طبیعی دفاع گیاه را دچار اختلال نموده و موجب کاهش فعالیت‌های دفاعی گیاه می‌شود. لذا غالبا وجود نماتود موجب افزایش شدت بیماری‌های ناشی از بیمارگرهای ثانویه می‌گردد.

تاکنون مطالعه‌ای در خصوص چگونگی تاثیر نماتودها بر مکانیسم‌های دفاعی گیاه انجام نشده 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.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]

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، 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: ۱۳۵۵-۱۳۶۰.

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

4. Abawi, G. S. and 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. Bradford, M.M.1979. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
6. Cauquil, j. and R. L. Shepherd. 1970. Effect of root-knot nematode-fungi combinations on cotton seedling disease. Phytopathol. 60: 448-451.
7. Davis, R. A. and W. R. Jenkins. 1963. Effects of *Meloidogyne spp*. And *Tylenchorhynchus claytoni* on pea wilt incited by *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* race 1. Phytopathol. 53: 745 (Abstr.)
8. DeVay, J. E., A. P. Gutierrez, and P. A. Roberts. 1997. Inoculum densities of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Vasinfectum* and *Meloidogyne incognita* in relation to the development of Fusarium wilt and the phenology of cotton plants (*Gossypium hirsutum*). Phytopathol. 87: 341-346.
9. Fattah, F., and J. M. Webster. 1983. Ultrastructural changes caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in *Meloidogyne javanica* induced giant cells in Fusarium: resistant and susceptible tomato cultivars. J. Nematol. 15:128-135.
10. Griffin, G. D. 1986. The importance of nematode resistance on the interaction of *Meloidogyne hapla* and *Fusarium oxysporum* on alfalfa. Phytopathol. 76: 843 (Abstr.)
11. 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.
12. Kroon. B. M. and D. M. Elgersma. 1993. Interactions between race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and near-isogenic resistant and susceptible lines of intact plants or callus of tomato. Phytopathol. 137: 1-9.
13. 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.
14. 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 Sci. 162:491-498.
15. Nickle,W.R. 1991. Manual of Agricultural Nematology Marcel- Dekker Inc., NewYork. USA(1035 pp).
16. Ogallo, J. L. and M. A. McClure. 1996. Systemic acquired resistanceand susceptibility to root-knot nematodes in tomato. Phytopathol. 86: 498-501.
17. Porter, D. M. and N. T. Powell. 1967. Influence of certain Meloidogyne species on Fusarium wilt development influecured tobacco. Phytopathol. 57: 282-285.
18. Powell. N. T. 1971. Interactions between nematode and fungi in disease complexes. Ann. Rev. Phytopathol. 9: 253-274.
19. Schindler, A. F., R. N. Stewart, and P. Semeniuk. 1961. A synergistic Fusarium- nematodes interaction in carnation. Phytopathol. 51: 143-146.
20. Walker, J. C. 1981. Fusarium Wilt of Tomato. The American Phytopathological Society, USA.
21. Williamson,V.M. and R.S.Hussey. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. The Plant Cell 8:1735-1745.
22. 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. Physiological and Mol. Plant Pathol. 46:491-507.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.15.8]