مجله کشاورزی، دوره ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۸۸، صص ۱۶۱-۱۵۱

بررسی کنترل بیولوژیک و القای سیستمیک فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* توسط باکتری آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* CHA0

سمیه مختاری *، نوازاله صاحبانی ** و حسن رضا اعتباریان ***

تاریخ وصول مقاله: ۸۶/۸/۱۲ و تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۲/۲۲

چکیده

کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه گونه *Meloidogyne javanica*، توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 طی چندین آزمایش گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری با غلظت (10^9 CFU/ml) به روش محلول‌پاشی اندام‌های هوایی باعث کاهش معنی‌داری (در سطح پنج درصد) در فاکتورهای متوسط تعداد توده تخم به ازای هر گیاه و متوسط تعداد تخم در هر توده تخم نسبت به شاهد (گیاه مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل) گردید. نتایج همچنین نشان داد که محلول‌پاشی این باکتری روی قسمت‌های هوایی گیاه باعث القای مقاومت سیستمیک در ریشه گیاه می‌شود. در این تحقیق، تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه گیاه بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز اول بعد از مایه‌زنی گیاه با نماتد بدون اختلاف معنی‌داری با شاهد (نماتد تنها) آغاز شد و طی روزهای بعد با اختلاف معنی‌داری افزایش یافت. ماکزیمم فعالیت آنزیم در روز پنجم بعد از مایه‌زنی نماتد مشاهده شد. بنابراین باکتری قادر به القای آنزیم دفاعی پراکسیداز به‌طور سیستمیک در کل گیاه از جمله ریشه شده و بدین طریق مانع از فعالیت نماتد مولد گره ریشه می‌شود.

کلمات کلیدی: پراکسیداز، کنترل بیولوژیک، گوجه‌فرنگی، نماتد مولد گره ریشه، *Pseudomonas fluorescens* CHA0

* – دانشجوی فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه حشره شناسی و بیماری های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران – ایران (**E-mail: m_mokhtari1384@yahoo.com**)

** – استادیار، گروه حشره شناسی و بیماری های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران – ایران

*** – استاد بازنشسته، گروه حشره شناسی و بیماری های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران – ایران

مقدمه

نماتدهای مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) از مهمترین و اقتصادی‌ترین نماتدهای بیمارگر گیاهی در سرتاسر جهان می‌باشند. این نماتدها با دامنه وسیع میزبانی باعث ایجاد خسارت به میزان پنج درصد به محصولات جهان می‌شوند (۱۳). روشهای مختلفی از قبیل تناوب، استفاده از ارقام مقاوم، کاربرد نماتدکش‌ها برای کنترل این نماتدها مورد استفاده قرار می‌گیرد اما استفاده از این روشها در مواردی، بسیار پرهزینه بوده و یا فاقد کارایی کافی می‌باشد. سموم نماتدکش نیز به دلیل مضر بودن برای سلامتی انسان و آلودگی‌های محیط زیست و دلایل اقتصادی، استفاده از آنها محدود شده است. با استفاده از کنترل بیولوژیک، امکان افزایش محصول با منابع موجود، کاهش احتمال ایجاد مقاومت در عوامل بیماری‌زا به مواد شیمیایی، کاهش نسبی آلودگی محیط زیست و دست‌یابی به روشهای کنترل بدون خطر و همچنین حرکت به سوی کشاورزی پایدار را فراهم می‌نماید (۱۲).

نژادهای معینی از سودوموناس‌های فلورسنت توانایی کاهش بیماری‌های خاکزاد گیاهی را دارا می‌باشند. براساس مطالعات انجام گرفته ثابت شده است که یک سری از ریزوباکتری‌ها از جمله سودوموناس‌های فلورسنت باعث کاهش خسارت ناشی از نماتدهای پارازیت گیاهی می‌شوند (۱۹).

از مکانیسم‌های اثر باکتری *Pseudomonas fluorescens* روی نماتد مولد گره می‌توان به ایجاد متابولیت‌هایی که باعث کاهش تفریخ تخم می‌شوند، همچنین کاهش ترشحات ریشه برای کنترل نماتد و ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه علیه این عامل بیماری‌زا اشاره کرد (۱۵). بنابراین یکی از مکانیسم‌های عمل این باکتری علیه بیمارگرهای گیاهی از جمله نماتد مولد گره ایجاد مقاومت سیستمیک یا ISR در گیاه میزبان می‌باشد. این مقاومت القاء شده باعث ایجاد موانع مکانیکی در دیواره سلولی و همچنین باعث تغییرات فیزیولوژیکی و واکنش‌های بیوشیمیایی در میزبان علیه بیمارگر می‌شود (۱۷). تحریکات ایجاد شده توسط این ریزوباکتری‌ها باعث تولید سریع ترکیبات دفاعی از جمله تجمع انبوه فیتوالکسین‌ها، ترکیبات فنلی، افزایش میزان آنزیم‌های مهم دفاعی از جمله فنیل‌الانین آمونیا-لیاز (PAL)، پراکسیداز (POX) و بالا رفتن سطح Lignifications در گیاه می‌شود (۸).

پراکسیدازها به صورت چندین آیزوزیم در گیاهان در مقابل بیمارگرهای مختلف القاء می‌شود. در رابطه با عملکرد پراکسیداز در مقابل عوامل بیماری‌زایی گیاهی و باتوجه به گزارش‌های زیادی درخصوص بالا رفتن فعالیت آنزیم پراکسیداز در مدت تعامل بین گیاه و بیمارگر، می‌توان گفت که این آنزیم در مکانیسم دفاعی گیاه نقش مهمی را ایفا می‌کند. این مکانیسم‌ها شامل لیگنینه کردن دیواره، ایجاد

H_2O_2، سم‌زدایی H_2O_2، سوبرینه کردن، Cross-linking پروتئین‌های ساختاری پلی‌ساکاریدها می‌باشد (۷ و ۱۸).

تحقیقات نشان داد کاربرد باکتری‌های *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* در یک قسمت از ریشه گیاه گوجه‌فرنگی (که در این آزمایش به دو قسمت کاملاً مساوی تقسیم شده بود) باعث ممانعت از نفوذ نماتدها در قسمت دیگر که باکتری وجود نداشت شدند (١٤). علت آن ایجاد القاء مقاومت سیستمیک (ISR) توسط باکتری در گیاه بیان شد.

هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* CHA0 به طریق محلول‌پاشی قسمت‌های هوایی در کنترل نماتد مولد گره ریشه و امکان سیستمیک شدن فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه توسط این آنتاگونیست برای مقابله با نماتد می‌باشد.

مواد و روشها

تهیه مایه آلوده‌کننده نماتد

نمونه گیاهی آلوده به نماتد *Meloidogyne javanica* از گلخانه‌های خیار در منطقه ورامین تهیه شد، سپس با استفاده از روش توده تخم منفرد (Single egg mass) خالص و روی رقم کارون
به‌طور متوالی تکثیر شد. سپس برای انجام تست‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی از تخم و لارو سن دو این نماتد استفاده شد (٤). شناسایی نماتد براساس معیارهای ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی و با استفاده از کلید جپسون انجام شد (۵).

تهیه مایه آلوده‌کننده باکتری *P. fluorescens* CHA0

باکتری مورد آزمایش از گروه حشره-شناسی و بیماری‌های گیاهی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران تهیه گردید و در محیط NB به مدت ٤٨ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm در دمای اتاق کشت داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤٥٠٠g سانتریفیوژ شد و به این طریق سلول‌های باکتری از محیط غذایی جدا شده و در انتها با آب مقطر استریل شستشو و سوسپانسیون باکتری با غلظت (CFU/ml) $۱۰^۹$ تهیه شد (١٦).

ارزیابی اثر باکتری *P. fluorescens* CHA0 علیه نماتد مولد گره ریشه روی گیاه گوجه‌فرنگی

ابتدا بذور گوجه‌فرنگی رقم کالجی N3 (CaljN3) به مدت ۳-۲ دقیقه توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی سطحی و در ظروف نشاء حاوی خاک استریل (خاک مزرعه، ماسه، کود برگ به نسبت ۲،۱،۱) کاشته شدند و در مرحله دو الی سه برگی به گلدان‌هایی حاوی ۳٦۰ گرم خاک استریل نشاء گردیدند (یک گیاه به ازای هر گلدان). به‌منظور کنترل دمای خاک، گلدان‌ها را در یک تشت بزرگ حاوی آب قرار داده و حرارت آن توسط هیتر آکواریوم تنظیم کرده و حداقل و حداکثر حرارت موجود در گلخانه بین ۳۰-۲۵ درنظر گرفته شد. سپس گیاهچه‌ها را در مرحله چهار برگی با

سوسپانسیون (10^9 (CFU/ml باکتری *P. fluorescens* CHA0 به روش محلول‌پاشی قسمت‌های هوایی به‌طوری‌که سوسپانسیون باکتری از برگ‌ها چکه کند (run-off) مایه‌زنی شد. گیاهان شاهد با آب مقطر استریل مایه‌زنی شدند (۲۰). بعد از گذشت یک هفته، به ازای هر گیاه ۲۰۰۰ لارو تازه تفریخ شده نماتد *M. javanica* به هر گلدان اضافه شد. ٦۰ روز بعد از مایه‌زنی نماتد گیاهچه‌های هر گلدان براساس معیارهای وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه، متوسط تعداد گال و توده تخم به ازای هر گیاه، متوسط تعداد تخم در هر توده تخم و درصد تخم‌های تفریخ شده در هر توده تخم بعد از گذشت ١٤ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار و دو مرتبه انجام گرفت.

ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در گلخانه

در این آزمایش، مانند آزمایش قبل گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله چهار برگی با باکتری *P. fluorescens* CHA0 مایه‌زنی و بعد از یک روز ۲۰۰۰ لارو تازه تفریخ شده نماتد به ازای هر گیاه اضافه شد. در این بررسی، چهار تیمار
به‌ترتیب زیر درنظر گرفته شد: گیاه مایه‌زنی شده با نماتد تنها (شاهد)، گیاه مایه‌زنی شده با باکتری تنها، گیاه مایه‌زنی شده با نماتد و باکتری و گیاه سالم. نمونه‌برداری از ریشه به‌ترتیب طی ٢٤، ۷۲، ۱۲۰ و ١٦٨ ساعت بعد از مایه‌زنی نماتد انجام گرفت. در ارزیابی میزان تغییرات آنزیم‌های دفاعی برای هر تیمار سه تکرار درنظر گرفته شد و آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل در پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت. فاکتور a چهار تیمار ذکر شده در بالا و فاکتور b روزهای نمونه‌برداری درنظر گرفته شد.

استخراج پروتئین از بافت گیاه

۰/۵ گرم از بافت گیاهی ریشه در هاون چینی با استفاده از ازت مایع به خوبی کوبیده و نرم گردید. سپس یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات‌سدیم ۰/۱ مول و pH برابر با شش به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتر منتقل و توسط میکروسانتریفیوژ در g ۱۵۷۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد.
مایع رویی حاصل برای انجام آزمایش‌ها جدا و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ٤۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰).

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره

تعیین میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره با استفاده از منحنی استاندارد به روش برادفورد انجام شد، سپس به منظور تعیین میزان کل پروتئین عصاره به‌دست آمده در آزمایش‌ها، مقدار ۲۰ میکرولیتر عصاره هر نمونه با سه میلی‌لیتر معرف برادفورد در یک لوله آزمایش کوچک مخلوط شد (۲). سپس میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از

اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. برای هر نمونه سه تکرار درنظر گرفته شد و میزان کل پروتئین هر عصاره با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره (که دارای ٤٠ میلی‌گرم پروتئین باشد)، ۲۰ میکرولیتر گوئیکول و مقدار کافی بافر سیترات فسفات، در یک لوله آزمایش ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج ٤٧٥ نانومتر صفر گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد به مخلوط اضافه گردید و سریعاً تغییرات جذب نور به فواصل ۱۰ ثانیه، به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس تغییرات جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد، در ضمن این آزمون گلخانه‌ای برای بررسی تغییرات فعالیت آنزیم بیش از یک بار انجام گرفت (۱۰).

الکتروفورز بومی (native PAGE) آیزوزایم‌های پراکسیداز

الکتروفورز بومی با استفاده از ژل پلی-اکریلامید که شامل دو بخش جداکننده ۱۲ درصد و

متراکم‌کننده شش درصد بود، انجام گرفت. در هر چاهک، مقداری از عصاره که حاوی ۳۰ میکروگرم پروتئین می‌باشد ریخته شده و حجم نهایی هر چاهک با استفاده از بافر نمونه به ۳۵ میکرولیتر رسانده شد. ولتاژ در مرحله ژل متراکم‌کننده ۷۵ ولت و در مرحله ژل جداکننده ۱۰۰ ولت درنظر گرفته شد. بعد از اتمام این مرحله ژل را از بین صفحات شیشه‌ای خارج و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس در بافر سیترات – فسفات ۲۵ میلی‌مول حاوی گوئیکول با غلظت نهایی پنج میلی‌مول و میزان pH ٥/٤ به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. مقدار یک درصد پراکسید هیدروژن قطره قطره به آن اضافه شد. پس از چند لحظه باندهای قهوه‌ای که نشان‌دهنده آیزوزایم‌های پراکسیداز بودند ظاهر شد (٦).

نتایج

ارزیابی اثر باکتری *P. fluorescens* CHA0 علیه نماتد مولد گره ریشه

نتایج به‌دست آمده نشان داد که بین تیمار باکتری + نماتد و شاهد (نماتد) از نظر فاکتورهای بیماری‌زایی مثل وزن تر ریشه و وزن تر اندام‌های هوایی اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد وجود نداشت. گیاه سالم نیز در وزن تر ریشه با تیمار باکتری + نماتد و نماتد اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد نداشت، درحالی-که در وزن تر اندام‌های هوایی با دو تیمار دیگر تفاوت معنی‌داری نشان داد. در فاکتورهای تعداد گال و تعداد توده تخم به ازای هر گیاه بین تیمار باکتری + نماتد و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین قابل ذکر است که تفاوت عددی بین شاهد و تیمار در کلیه فاکتورها وجود

داشت که همگی بیان‌گر اثر بازدارندگی باکتری روی نماتد بود.

جدول ۱ - بررسی اثر باکتری *P. fluorescens* استرین CHA0 روی نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* در گیاه گوجه‌فرنگی رقم کالجی N3

Table 1 - The effect of *P. fluorescens* CHA0, in tomato seedling against root-knot nematode (*M. javanica)*

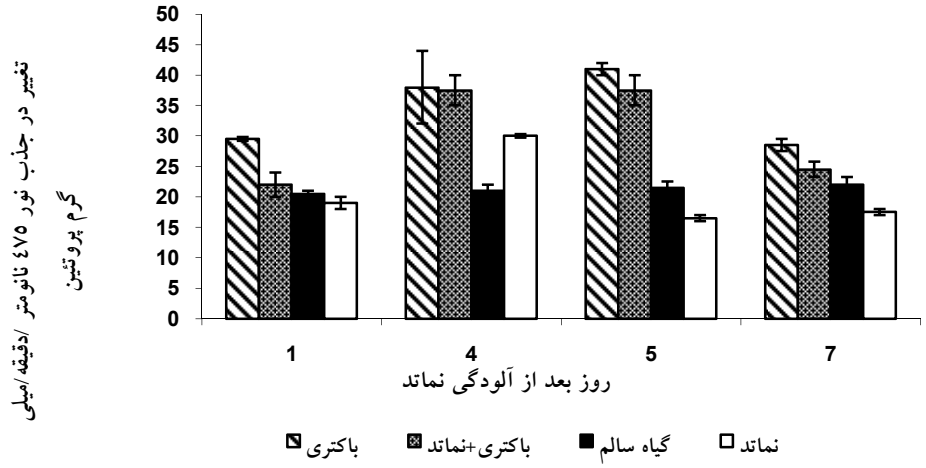
تیمارها	وزن تر ریشه (گرم)	وزن تر اندام‌های هوایی (گرم)	تعداد توده تخم به ازای هر گیاه	تعداد گال به ازای هر گیاه	متوسط تعداد تخم در هر توده	در صد تفریخ تخم‌های موجود در هر توده تخم (بعد از گذشت ۱۴ روز)
گیاه سالم	۱/۲۰^{a}± ۸/۳۳	۲/۴۰^{a}±۲۶/۶۶	-	-	-	-
باکتری + نماتد	۱/۴۵^{a} ± ۷/۶۶	۳/۱۶^{b}±۱۶/۸۳	۲۹/۰۰^{b} ±۱۵۳	۸/۳۲^{b} ± ۶۰	۵۱/۳۳ ^{a}±۲۷۰	۷/۲۱^{a}± ۶۹
نماتد (شاهد)	۰/۵۰^{a} ± ۶/۵۰	۱/۶۶^{b} ±۱۱/۶۶	۵۰/۳۳^{a}± ۴۴۰	۳۲/۱۴^{a}±۱۷۰	۶/۶۶^{a}± ۳۹۳	۱۰/۰۰^{a} ±۸۶

در هر ستون، عددهایی را که با حروف مشترک نشان داده شده‌اند براساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد بدون اختلاف معنی‌دار می‌باشند. هر داده ± ES شده است.

Numbers in columns followed by the same letter are not significantly different at ($p \leq 0.05$) in accordance with Duncan's multiple range test. Each data ±SE

ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج به‌دست آمده نشان داد که فعالیت این آنزیم در ریشه از روز اول بعد از مایه‌زنی نماتد شروع و در روزهای چهارم و پنجم به حداکثر میزان خود رسیده و در روز هفتم کاهش نشان داد (شکل ۱). در روز اول، بعد از مایه‌زنی با نماتد فقط تیمار باکتری تنها با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار نشان داد، درحالی‌که طی روزهای بعد بین همه تیمارها نسبت به شاهد (گیاه سالم) اختلاف معنی‌داری (در سطح پنج درصد) دیده شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار باکتری تنها، مربوط به روز پنجم بود، درحالی‌که در تیمارهای باکتری + نماتد و نماتد بیشترین فعالیت آنزیم در روز چهارم بعد از مایه‌زنی نماتد دیده شد. البته بین تیمار باکتری و باکتری + نماتد بین روز چهارم و پنجم هیچ اختلاف معنی‌داری (در سطح پنج درصد) دیده نشد. بنابراین از بین تیمارها بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به دو تیمار باکتری + نماتد و باکتری تنها (بدون اختلاف معنی‌دار) بود و سرانجام در روز هفتم فعالیت آنزیم در تمامی تیمارها به جز نماتد و گیاه سالم به‌طور معنی‌داری (در سطح پنج درصد) نسبت به روز پنجم کاهش یافت.

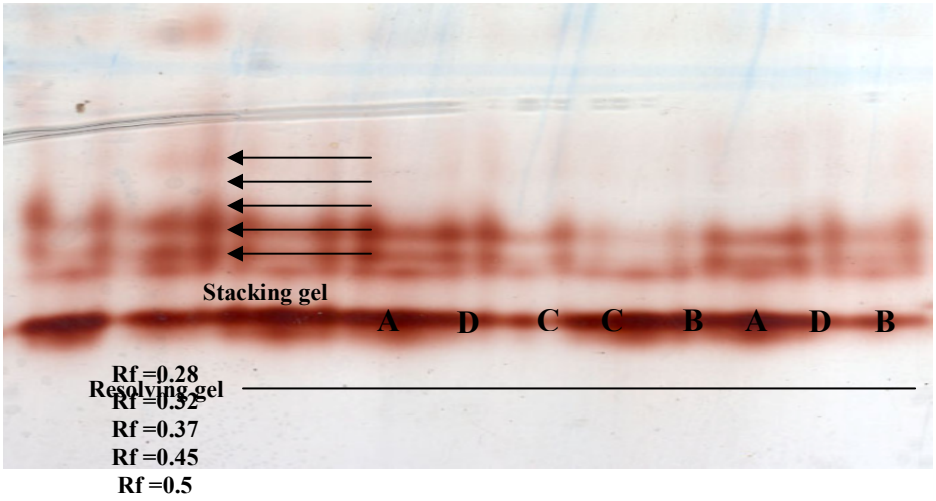


شکل ۱ - بررسی سیستمیک شدن فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با *P. fluorescens* CHA0 علیه نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* اعداد مربوط به نمودار، میانگین سه تکرار و خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشد. گوجه-فرنگی واریته CaljN3، نماتد *M. javanica*، باکتری *P. fluorescens* CHA0

Fig. 1 . Time course of change in peroxidase activity in root extracts of tomato plants infected with *P. fluorescens* CHA0 against root-knot nematode, Enzyme activities were determined as described in the text. Each value is the mean of three replications. Error bars indicate ± SE. Tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. CaljN3), Nematode (*M. javanica*), Bacterial (*P. fluorescens* CHA0)

چاهک‌هایی که با حروف یکسان نشان داده شده تکرار می‌باشند.

آیزوزایم‌های پراکسیداز به رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز با R_f های ۰/۲۸، ۰/۳۲، ۰/۳۷، ۰/٤٥ و ۰/۵ در ژل جداکننده تشکیل شدند. آیزوزیم‌های آنزیم پراکسیداز به‌دست آمده از عصاره تیمارها در روز پنجم به‌ترتیب زیر بود. C، D مربوط به باندهای آیزوزیم‌های پراکسیداز مربوط به تیمار باکتری و باکتری + نماتد می‌باشد که در این دو تیمار پنج آیزوزیم به‌ترتیب از بالا به پایین شامل R_fهای ۰/۲۸، ۰/۳۲، ۰/۳۷، ۰/٤٥ و ۰/۵ بیان شده است که درمقایسه با شاهد (A = نماتد) باندهای قوی‌تر بوده و حتی باند دوم با R_f = ۰/۳۲ نیز در شاهد مشاهده نمی‌شود و درمقایسه با گیاه سالم (B) مشاهده شد که باندهای آیزوزیمی از نظر تراکم ضعیف‌تر بیان شده و چنین به نظر می‌رسد که آیزوزیم مربوط به باند دوم و پنجم با R_f های ۰/۳۲، ۰/۵ در آن بیان نشده است.



شکل ۲ – الکتروز بومی آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با باکتری *P. fluorescens* CHA0 و نماتد و مقایسه آن با گیاه سالم. A: نماتد، B: گیاه سالم، C: باکتری و D: باکتری + نماتد

Fig. 2 . Native-PAGE assay of soluble peroxidase isozymes on the treated and untreated tomato roots by *Pseudomonase fluorescens* CHA0 in the absence and presence of *Meloidogyne javanica* challenge Rf], distance of isozyme migration divided by distance of migration of the dye fronts. A: *M. javanica*, B: healty control, C: *P. fluorescens*, D: *P. fluorescens* + *M. javanica*

بحث

بهترین راه اثبات سیستمیک شدن مقاومت ایجاد شده این است که اندام‌های مختلف یک گیاه به صورت جداگانه به وسیله آنتاگونیست و عامل بیماری تلقیح شوند. در روش مذکور، به دلیل جدا بودن آنتاگونیست و عامل بیماری مکانیزم‌های مستقیم بیوکنترل حذف می‌شود. بنابراین ضرورت چنین آزمایشی برای تأیید بیشتر مکانیزم ISR احساس می‌شود (۱). باتوجه به نتایج مشخص شد باکتری *P. fluorescens* استرین CHA0 می‌تواند با استفاده از مکانیسم القاء مقاومت در گیاه باعث کاهش میزان آلودگی در نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* شود. طبق نتایج به‌دست آمده در آزمایش گلخانه‌ای، کاهش در تعداد گال و توده تخم به ازای هر گیاه در ریشه گوجه‌فرنگی مایه-زنی شده توسط باکتری مشاهده شد. براساس تحقیقات صورت گرفته مشخص شد که باکتری *P. fluorescens* باعث کاهش نفوذ نماتد به گیاه گوجه‌فرنگی می‌شود. آنها با مایه‌زنی نصف ریشه با نماتد و نصف دیگر ریشه با باکتری نشان دادند که این باکتری بدون اثر مستقیم روی نماتد موجب کاهش میزان نفوذ نماتد می‌شود. کاهش میزان بیماری (گال) و تعداد توده تخم نماتد به‌و-

سیله باکتری می‌تواند ناشی از استرس ایجاد شده در گیاه به‌وسیله مکانیسم‌های متعدد دفاعی باشد (۱٤). باتوجه به نتایج آزمایش حاضر، بررسی فعالیت این آنزیم طی روزهای اول، چهارم، پنجم و هفتم مشخص شد که این آنزیم در طی مکانیسم القای مقاومت سیستمیک در گیاه توسط باکتری *P. fluorescens* بر علیه نماتد مولد گره ریشه به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. از بین پروتئین‌های القاء شده در گیاه توسط باکتری *P. fluorescens* استرین CHA0 آنزیم پراکسیداز با مشارکت در ایجاد ترکیبات دفاعی از جمله H_2O_2، لیگنین، سوبرین و غیره باعث کاهش فعالیت عوامل بیماری‌زای مختلف از جمله نماتد مولد گره ریشه در گیاه گوجه‌فرنگی می‌شود. همچنین مکانیسم‌های مقاومت ایجاد شده توسط Rhizobium استرین G12 علیه نماتد مولد سیست *Globodera pallida* در سیب‌زمینی بررسی و ثابت شده است که واکنش مقاومت اسلحه‌ای برای استرین G12 علیه نماتد سیستی است که این کار با بالا بردن PR پروتئین‌هایی مثل کیتیناز و α – ۱ و ۳– گلوکاناز در گیاه انجام می شود (اصطلاح پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی به‌صورت PR مخفف گردید و به مفهوم پروتئین‌هایی است که توسط گیاه میزبان رمز می‌شوند اما فقط در حضور عامل بیماری یا وضعیت‌های مربوط القاء می‌شوند) (۱۱).

باندهای حاصل شده از الکتروفورز بومی عصاره گیاه در تیمار مایه‌زنی شده توسط باکتری در روز پنجم توانایی باکتری در فعال کردن سیستم دفاعی گیاه از جمله القای آیزوزیم‌های پراکسیداز را تأیید می‌کند. آیزوزایم‌های این آنزیم با R_f برابر با ۰/۳۲، نقش ارزنده ای در مقاومت گیاه در برابر نماتد مولد گره ریشه دارند. تحقیقات نشان داد است که نژادهای مختلف *P. fluorescens* با تحریک گیاه باعث ایجاد ترکیبات بیوشیمیایی دفاعی از جمله آنزیم پراکسیداز می‌شود (۹). یکی از محاسن این تحقیق این بود که آنتاگونیست مورد بررسی در این آزمایش، در مطالعات دیگر در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای توانسته بود موجب کاهش شدت بیماری‌ها و برخی عوامل بیماری‌زای دیگر شود. به عنوان مثال محققین گزارش کردند باکتری *P. fluorescens* CHA0 باعث کنترل بیماری‌های ریشه از جمله پوسیدگی سیاه ریشه تنباکو می‌شود (۳).

نتایج نشان داد باکتری *P. fluorescens* CHA0 قادر به القاء سیستم دفاعی گیاه علیه نماتد مولد گره ریشه و کاهش میزان آلودگی آن می‌باشد و همچنین استفاده از باکتری به صورت محلول‌پاشی

قسمت‌های هوایی نیز موجب القای سیستم دفاعی گیاه در قسمت‌های مختلف گیاه از جمله ریشه می‌شود. سهولت محلول‌پاشی باکتری روی قسمت‌های هوایی به وسیله کشاورزان از جمله امتیازات این باکتری محسوب می‌شود. یکی از مشکلات استفاده ترکیبی از دو یا چند آنتاگونیست علیه عوامل بیماری‌زا، ضدیت موجود بین آنها می‌باشد. باتوجه به امکان استفاده از دیگر آنتاگونیست‌ها در ناحیه ریشه میسر می‌باشد.

References

1 . Aberra MB, Seah S and Sivasithamparam KC (1998) Suppression of the take-all fungus (*Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*) by a sterile red fungus through induced resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling roots. Soil Biology and Biochemistry 30: 1457-1464.

2 . Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization the principle of protein – dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

3 . Defago G, Berling CH, Haas D, Kahr G, Keel C, Voisard C and Wurthrich B (1990) Suppression of black root rot of tobacco and other root diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens* .Potential applications and mechanisms In Horny (editor) Biological control of soil-borne pathogens CAB International Wallingford, UK. Pp. 93-108.

4 . Hussay RS and Barker KR (1973) A compression of methods of collecting inoculate of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease. Rep. 57: 1025-1028.

5 . Jepson SB (1987) Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyn* spp.). C.A.B. Interactional, 256 pp.

6 . Laemmli UK (1976) cleavage of structural proteins during the assembly of the bead of bactriophage. Nature 227: 680-685.

7 . Mader M and Fussl R (1982) Role of peroxides in lignifications of tobacco cells II. Regulation by phenolic compounds. Plant Physiology 70: 1132-1134.

8 . Mpiga P, Belanger RR, Paulitz TC and Bennamou N (1997) Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. Physiological and Molecular Plant Pathology 50: 301-320.

9 . Nandakumar R, Babu S, Viswanathan R, Raguchander T and Samiyappan R (2001) Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *fluorescens Pseudomona*. Soil Biology Biochemistry 33: 603-672.

10 . Reuveni R (1995) Biochemical marker for disease resistance, In: Singh, R. P., Singh, U.S. (Eds), Molecular Methods in Plant Pathology, CRC Press, Boca Raton, FL. Pp. 99-144.

11 . Ritze M, Rudolph K, Schroder I, Hoffmann-Hergarten S, Hallmann J and Sikora RA (2000) Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida* Appl. Environ Microbiol 66: 3515-3518.

12 . Rodriguez-Kabana JA and Mcinroy RW (1992) Rhizospher bacteria antagonistic to soya bean

cyst (*Heterodera glicines*) and root-knot (*M. incognita*) nematodes: identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. Plant Soil 139: 75-84.

13 . Sasser JN (1989) Plant parasitic nematodes: the farmers hidden enemy. A cooperative publication of the department of plant pathology and consortium for International Crop Protection. 115 p.

14 . Siddiqui IA, Shaukat SS (2002) Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. Phytopathology 150: 469-473.

15 . Sikora RA and Hoffmann-Hergarten S (1993) Biological control of plant–parasitic nematodes with plant–health promoting rhizobacteria, in pest management: Biologically based technologies, proceeding of Beltsville Symposium XVIII, ed. by Lumsden R. D. and Vaughn JL, American Chemical Society, Washington, D.C. Pp. 166-172.

16 . Thompson DC (1996) Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer pateh symptoms in Kentucky blue grass. Plant Disease 80: 850-862.

17 . Van-Loon L, Baker PA and Pieterse CM (1998) Systemic resistance induced by rhizospher bacteria. Annul Review Phytopathology 36: 453-483.

18 . Yamasaki H, Sakihama Y and Ikehara N (1997) Flavenoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H_2O_2. Plant Physiology 115: 1405-1412.

19 . Zavaleta–Mejia E and Van Gundy SD (1982) Effects of rhizobacteria on *Meloidogyne* infection. Journal of Nematology 14: 475A-476B (Abst.).

20 . Zheng S, Reddy MS, Kokalis-Burelle N, Wells LW, Nightengale SP and Kloepper JW (2001) Leck of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth-promoting *Rhizobacteria* and chemical elicitors. Plant Disease 85: 879-884.

Journal of Agriculture, Vol. 11, No. 1, Spring 2009

Study on biological control and systemic induction of peroxidase enzyme activity in tomato plant infected with root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 antagonist

S. Mokhtari *, N. Sahebani ** and H. R. Etebarian ***

Abstract

Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by application of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 was evaluated under greenhouse condition. Results showed that *P. fluorescens* (10^9 $CFUml^{-1}$) as shoot spray significantly reduced in No. of eggmass and egg per individual eggmass as comparison to control. Application *P. fluorescens* as shoot spray induced systemic activation of peroxidase (POX) enzyme in root. In this study, changes of POX activity showed no significantly differences between treated plants at one day after inoculation with nematode and control (nematode treated plant). But it was stimulated significantly after one day and reached to maximum at 5^{th} day after inoculation. So *P. fluorescens* CHA0 can induce plant defense mechanisms such as POX in tomato plant against nematode infection.

Keywords: **Biological control, Peroxidase, *Pseudomonas fluorescens* CHA0, Root-knot nematode, Tomato**

* - M.Sc. Former Student, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran - Iran (**E_mail: s_mokhtari1384@yahoo.com**)

** - Assistant Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran - Iran

** - Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran - Iran