مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۰ (۳۱۳-۳۰۳)

# بررسی تغییرات فعالیت کمی پراکسیداز ارقام زیتون در تعامل بین قارچ عامل پژمردگی ورتیسیلیومی *Verticillium dahliae* و نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica*

آیت اله سعیدی زاده[1]* و فهیمه نیاستی[2]
۱، ۲، استادیار و کارشناس دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۰- تاریخ تصویب: ۹۰/۵/۱۲)

## چکیده

در این آزمایش نمونه‌برداری از قارچ *Verticillium dahliae* سویه غیر برگریز (SS-4) از باغ‌های آلوده زیتون در ناحیه توشن واقع در جنوب شهر گرگان انجام گرفت. نماتد ریشه گرهی، *Meloidogyne javanica* از نهال‌های زیتون آلوده جداسازی شده و بعد از شناسایی گونه، نماتد روی نشاءهای گوجه‌فرنگی رقم روتگرز تکثیر گردید. نهال‌های یکساله زیتون رقم زرد، روغنی، کرونیکی و مانزانیلا در بستری از خاک لومی شنی استریل به میزان ۲۰۰۰ گرم کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر اساس طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار و با ۳۲ تیمار شامل شاهد، نماتد به تنهایی، قارچ به تنهایی و قارچ + نماتد انجام گرفت. میزان مایه تلقیح نماتد با سه جمعیت (۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰) لارو سن دوم و در مورد قارچ ۲۰۰۰۰ عدد میکرواسکلروت برای هر گلدان (۲۰۰۰ گرم خاک شنی لومی) روی چهار رقم از زیتون انجام گرفت. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با نور طبیعی و دمای ۲۵-۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. میزان فعالیت کمی پراکسیداز محلول و باند شده با دیواره سلولی با استفاده از گوئیکول، به عنوان پیش ماده، برحسب تغییر جذب مخلوط واکنش در ۴۷۰ نانومتر در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین، در مراحل زمانی یک، ۱۰، ۲۰ و۳۰ روز پس از مایه‌زنی، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی در ارقام مورد آزمایش، در تیمارهایی که فقط قارچ دریافت کرده‌اند تا ۳۰ روز پس از مایه‌زنی سیر صعودی داشته است. فعالیت این آنزیم‌ها در تیمارهای دارای نماتد در رقم کرونیکی تا ۲۰ روز پس از مایه‌زنی افزایش و پس از آن کاهش معنی‌داری را نشان داده است ($p\leq ۰/۰۵$). این شرایط در مورد ارقام زرد، روغنی و مانزانیلا تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی افزایش و پس از آن کاهش داشته است ($p\leq ۰/۰۵$). نتایج حاکی از آن است که نماتد قادر است فعالیت آنزیم پراکسیداز را در روزهای نخستین پس از مایه‌زنی افزایش و بعد از آن کاهش دهد.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم، نماتد، ورتیسیلیوز، ایران

* نویسنده مسئول: آیت‌اله سعیدی‌زاده     تلفن: ۰۹۱۲-۶۴۰۹۹۲۷     E-mail: olivman314@yahoo.com

## مقدمه

امروزه به منظور مطالعه واکنش دفاعی ارقام مختلف گیاهان در قبال حضور بیمارگرها و عوامل غیرزنده محیطی از فاکتورهای بیوشیمیایی مختلفی استفاده می‌شود. بسیاری از آنزیم‌ها و ترکیبات فنلی از جمله این فاکتورهای بیوشیمیایی محسوب می‌شوند. این گونه مطالعات در مورد برخی از بیماری‌های گیاهان مختلف انجام گرفته است. قارچ *Verticillium dahliae* Klebahn عامل پژمردگی ورتیسیلیومی و نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood از سال‌ها قبل تا به امروز در زمرهٔ مهمترین بیمارگرهای زیتون در ایران و جهان به شمار می‌روند (Al-Ahmad & Mosli, 1993; Cao *et al*., 2005; Ruggieri, 1946; Afshari Azad & Alizadeh, 2004; Akhiani *et al*., 1984).

بسیاری از آنزیم‌های موجود در گیاهان در واکنش‌های دفاعی علیه بیمارگرها مطرح و مؤثر می‌باشند. این آنزیم‌ها شامل آنزیم‌های اکسیدکننده مانند پراکسیداز محلول و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی می‌باشد که تشکیل لیگنین و دیگر فنل‌های اکسید شونده که در ایجاد سدهای دفاعی برای تقویت ساختار سلولی گیاه نقش دارند را کاتالیز می‌کنند (Avdiushko *et al*., 1993). دیگر آنزیم‌های دفاعی شامل پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی از جمله بتا-۳،۱-گلوکاناز و بتا-۴،۱-گلوکاناز می‌باشند که سبب تجزیه دیواره سلولی قارچ‌ها می‌شوند. همچنین الیگومرهای گلوکان، آزاد شده در زمان تجزیه دیواره سلولی قارچ‌ها، به عنوان محرک جهت فعال کردن مکانیزم‌های دفاعی گیاهان عمل می‌کنند (Frindlender *et al*., 1993).

فعالیت آنزیم پراکسیداز در بسیاری از گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است. توزیع فراوانی و عدم پیچیدگی مطالعه، این آنزیم را به عنوان یک مارکر مولکولی مناسب در مطالعات ژنتیکی، فیزیولوژی و بیماری شناسی معرفی کرده است. اگرچه این آنزیم یک کاتالیزور نسبتاً قوی است، اما در واکنش‌های بیوشیمیایی کمتر اختصاصی عمل کرده و در مقابل بیمارگرهای مختلف القاء می‌شود (Mohammadi & Kazemi, 2002; Ragazzi *et al*., 1999). یکی از اعمال نسبت داده شده به پراکسیداز، نقش آن در تشکیل لیگنین است. چنین فرض شده است که پراکسیداز موجود در دیواره ممکن است پرولین را در دیواره سلولی به هیدروکسی پرولین تبدیل کند. منومر لیگنین ترکیبی فنلی به نام سینامیل الکل است که پراکسیداز در پلیمریزاسیون آن نقش دارد (Mader & Fussl, 1982).

شناسایی و یافتن چگونگی مکانیزم‌های دفاع بیوشیمیایی نهال‌های زیتون در مقابل آلودگی به نماتد *M. javanica* و قارچ *V. dahliae*، مسائل مختلفی را در مورد حساسیت و مقاومت برخی ارقام زیتون نسبت به این دو بیمارگر آشکار کرده و در جهت یافتن ارقام مقاوم نسبت به این دو بیمارگر مؤثر خواهد بود. از آنجایی که کشت ارقام مقاوم به نماتد *M. javanica* و قارچ *V. dahliae* یکی از مؤثرترین و اقتصادی‌ترین روش‌های کنترل این بیمارگرها به شمار می‌رود، در این آزمایش به منظور مقایسه عکس‌العمل دفاع بیوشیمیایی نهال‌های زیتون ارقام زرد و روغنی (به عنوان مهمترین ارقام داخلی) و ارقام کرونیکی و مانزانیلا (به عنوان ارقام به ترتیب مقاوم و حساس به ورتیسیلیوم) (Bellini, 2002; Tous & Ferguson, 1997)، نسبت به حضور دو مورد از مهمترین بیمارگرهای زیتون، قارچ *V. dahliae* و نماتد *M. javanica*، تغییرات فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز محلول در سیتوپلاسم و باند شده با دیواره سلولی، به عنوان یکی از مهمترین مارکرهای دفاعی، در زمان‌های یک، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از مایه‌زنی در ریشه ارقام مورد نظر اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### تهیه مایه تلقیح بیمارگرها و مایه‌زنی

### تهیه مایه تلقیح قارچ عامل پژمردگی ورتیسیلیومی *V. dahliae*

#### نمونه‌برداری از اندام های گیاهی آلوده به قارچ بیمارگر

نمونه آلوده به قارچ *V. dahliae* (نژاد غیر برگ‌ریز SS-4) از منطقه توشن، واقع در جنوب شهر گرگان، از باغ‌های زیتون رقم زرد در خرداد ۱۳۸۶ جمع‌آوری گردید. برای جداسازی قارچ *V. dahliae* از ساقه آلوده طبق روش ارائه شده توسط Rowe *et al.* (2000) و

Ausher *et al.* (1975) استفاده شد. جداسازی قارچ مورد نظر از شاخه‌هایی که بخشی از بافت پوست و چوب آنها در اثر فعالیت قارچ تغییر رنگ داده است، از حد فاصل بافت سالم و بیمار انجام گرفت. نمونه‌های دارای آلودگی پس از سترون شدن با محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم به مدت یک دقیقه و شستشو با آب مقطر به محیط PDA جهت رشد بیمارگر منتقل شد.

**خالص‌سازی و تشخیص قارچ بیمارگر**

پس از کشت قارچ مورد نظر، جهت شناسایی از آن اسلاید میکروسکوپی تهیه شد. شناسایی این قارچ بر اساس مشخصات مرفولوژیک و مرفومتریک فیالید، اسپور و میکرواسکلروت و با استفاده از کلید ارائه شده توسط هیلوکس انجام گرفت (Hilloks, 1992). مایه تلقیح قارچ برای انجام آزمون بیماریزایی، کنیدی و برای انجام آزمایش اصلی، میکرواسکلروت در نظر گرفته شد. این قارچ در محیط PDA در شرایط نور زرد تولید کنیدی و در محیط زاپک مایع در شرایط بدون نور، به میزان فراوان میکرواسکلروت تولید می‌کند. در هر دو حالت دمای محیط کشت قارچ مورد نظر ۲۳ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد (Bhat & Subbarao, 1999; Khan *et al.*, 2000).

**آزمون بیماریزایی قارچ بیمارگر**

برای تهیه سوسپانسیون کنیدی جهت آزمون بیماریزایی، به هر تشتک حاوی کلنی قارچ در حدود ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد. توسط یک میله شیشه‌ای سر کج سترون و حرکت آرام آن بر روی سطح پرگنه، بدون کندن محیط کشت، کنیدی‌ها از پرگنه جدا شده و در آب مقطر به صورت سوسپانسیون درآمدند. این سوسپانسیون از پارچه ململ دو لایه سترون عبور داده شد. با کمک اسلاید گلبول شمار تعداد کنیدی‌های موجود در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون تعیین گردید. با اضافه کردن آب مقطر سترون و یا اضافه کردن مجدد سوسپانسیون، غلظت نهایی سوسپانسیون روی $1\times10^{6}$ کنیدی در هر میلی‌لیتر تنظیم شد (Khan *et al.*, 2000). آزمون بیماریزایی به روش تزریق سوسپانسیون کنیدی به میزان یک میلی‌لیتر برای هر نهال، در بخش‌های فوقانی ساقه نهال یکساله، در پنج تکرار انجام گرفت. به نهال‌های شاهد همین میزان آب مقطر سترون تزریق گردید (Khan *et al.*, 2000; Dhingra & Sinclair, 1986).

در مورد آزمون بیماریزایی قارچ *V. dahliae*، پس از گذشت دو ماه، بخش‌هایی از ساقه (نواحی نزدیک به محل تزریق) که دارای نشانه های بیماری (پژمردگی در برگ‌ها و تیرگی در بافت ساقه) بودند، جداسازی و در محیط PDA کشت گردید. قارچ بدست آمده با مشخصات میکروسکوپی قارچ بکار رفته در آزمون مطابقت داشت (Khan *et al.*, 2000).

**تهیه مایه قارچ بیمارگر برای آزمایش اصلی**

برای تهیه میکرواسکلروتها ابتدا پرگنه قارچ به ترتیب از الک های ۶۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ مش عبور داده شد. سپس محتویات داخل الک ۴۰۰ مش با آب مقطر سترون به صورت سوسپانسیون جمع‌آوری گردید. این سوسپانسیون با حجم مساوی از ماسه ساحلی مخلوط گردید. ماسه ساحلی را ابتدا پس از شستشو با آب مقطر به ترتیب از الک‌های ۴۵ و ۶۰ مش عبور داده و محتویات الک ۶۰ مش در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سترون گردید. مخلوط میکرواسکلروت و ماسه پس از خشک شدن با مخلوط‌کن یکنواخت شد. جهت تعیین تعداد زادمایه[1] زنده در مایه قارچ، پنج نمونه یک گرمی از مخلوط را برداشته و با آب مقطر سترون، رقت‌های $10^{-2}$، $10^{-4}$، $10^{-6}$ و $10^{-8}$ از آن تهیه شد. هر رقت به طور جداگانه روی محیط کشت PDA در پنج تکرار کشت گردید. بعد از ۵-۶ روز نگهداری در انکوباتور با دمای ۲۳ درجه سلسیوس، تعداد زادمایه‌های جوانه زده در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰× یا بینوکولر با بزرگنمایی ۶۴× شمارش گردید و تعداد آنها در هر گرم از مخلوط میکرواسکلروت و ماسه ساحلی مشخص شد (Khan *et al.*, 2000; Hall & Ly, 1972).

تعداد زادمایه فعال (میکرواسکلروت زنده) برای جدایه توشن $5\times10^{4}$ عدد در گرم مخلوط میکرواسکلروت و ماسه ساحلی برآورد گردید. جهت مایه‌زنی قارچ به ریزوسفر میزبان، ۰/۴ گرم از مخلوط میکرواسکلروت و ماسه ساحلی (معادل ۲۰۰۰۰ عدد میکرواسکلروت زنده یا ۱۰ عدد میکرواسکلروت زنده در

هر گرم از خاک بستر) در پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون به حالت سوسپانسیون درآورده و به طور یکنواخت در عمق یک سانتی‌متری بستر نهال ریخته شد. مایه‌زنی قارچ و نماتد در اردیبهشت ماه انجام گرفته است.

**تهیه جمعیت نماتد ریشه گرهی *M. javanica***

**نمونه‌برداری و تشخیص نماتد ریشه گرهی**

در مورد نماتد *M. javanica* نمونه‌برداری از نهالستان های حومه شهر گرگان از نهال‌های یکساله و یا دو ساله رقم زرد زیتون به عمل آمد. استخراج نماتد نر و لارو سن دوم از خاک با استفاده از روش De Grisse (1969) به طریق کاربرد سری الک‌ها و سانتریفیوژ انجام شد.

پس از آن استخراج ماده بالغ از ریشه‌های آلوده و انجام برش‌های لازم، اسلاید میکروسکوپی از کوتیکول انتهای بدن ماده تهیه گردید. این کار جهت شناسایی قطعی گونه *M. javanica* ضروری است. مشخصات گونه *M. javanica* با مشخصات ارائه شده توسط Jepson (1987) و Eisenback & Triantaphyllou (1991) مطابقت داشت.

**خالص‌سازی و تکثیر نماتد ریشه گرهی**

برای خالص‌سازی و تکثیر نماتد از روش توده تخم منفرد (single egg mass) بر روی نشاء‌های گوجه‌فرنگی رقم روتگرز استفاده شد. شناسایی نماتد پس از تکثیر آن نیز انجام گرفت. استخراج تخم و تهیه لارو سن دوم با استفاده از روش Hussey & Barker (1973) انجام گرفت. تشتک حاوی تخم نماتد و آب، جهت تفریخ در انکوباتور و تاریکی با دمای ۲۰-۲۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار داده شد. پس از سترون کردن لاروهای سن دوم با محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم به مدت یک دقیقه و شمارش آنها، جمعیت نماتد با سه سطح (۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ عدد برای هر گلدان) در پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه شده و به طور یکنواخت در عمق یک سانتی‌متری بستر هر نهال (۲۰۰۰ گرم خاک لومی شنی) ریخته شد. برای شمارش لاروهای سن دوم، نیم سانتی‌متر مکعب از سوسپانسیون لارو سن دو به صورت قطرات کوچک روی یک تشتک پلاستیکی قرار گرفت و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ×۱۰۰ شمارش گردید. برای افزایش دقت در تخمین تعداد لاروها، شمارش لاروها سه مرتبه انجام گرفت (Hussey & Barker, 1973; Sasanelli *et al.*, 1997; Saeedizadeh *et al.*, 2003).

**آزمون نهال‌های یکساله زیتون در حضور نماتد *M. javanica* و قارچ *V. dahliae***

زیتون مورد آزمایش از قلمه‌های ساقه ارقام زرد، روغنی، کرونیکی و مانزانیلا ریشه دار شده در خاک لومی شنی سترون تهیه شد. نهال‌های مورد انتخاب یکساله، دارای بخش‌های هوایی سالم، فاقد شاخه فرعی و در حدود ۲۵ سانتی‌متر طول داشتند. برای هر رقم ۱۶۰ نهال (۳۲ تیمار با پنج تکرار) در نظر گرفته شد. میزان بستر منظور شده برای هر نهال دو کیلوگرم خاک لومی شنی تعیین گردید. آبیاری به طور منظم هر سه روز یک بار به میزان ۲۰ میلی‌لیتر آب در هر نوبت به هر واحد آزمایشی انجام گرفت.

جهت محاسبات آماری از آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳۲ تیمار و پنج تکرار به این شرح استفاده گردید: شاهد (بدون نماتد و قارچ)، نماتد به تنهایی (با سه جمعیت ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ لارو سن دوم)، قارچ به تنهایی (۱۰ عدد میکرواسکلروت به ازای هر گرم از خاک بستر)، قارچ + نماتد (با سه جمعیت ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ لارو سن دوم + ۱۰ عدد میکرواسکلروت به ازای هر گرم خاک بستر به صورت همزمان). به این ترتیب برای هر رقم زیتون هشت تیمار تعیین شد که مجموعاً برای چهار رقم زیتون مورد آزمایش ۳۲ تیمار تنظیم گردید. برای مقایسه میانگین‌ها از روش دانکن استفاده گردید.

**ارزیابی فعالیت کمی پراکسیداز در نهال‌های زیتون**

در این آزمایش فعالیت آنزیمی پراکسیداز محلول در سیتوپلاسم و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی در ریشه گیاه در تیمارهای مختلف در چهار سطح زمانی (۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از مایه‌زنی) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور ابتدا از بافر سدیم فسفات (pH ۶، ۰/۱ M) جهت استخراج آنزیم پراکسیداز محلول استفاده شد. نمونه‌های ریشه تیمارهای مختلف به میزان یک گرم در درون یک هاون از قبل سرد شده با مقدار یک میلی‌لیتر از محلول بافرکاملاً آسیاب شد. سوسپانسیون

بدست آمده در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در g× ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز رونشین به ویال‌هایی به حجم دو میلی‌لیتر منتقل گردید و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید (Madhaiyan *et al.*, 2004). به منظور جداسازی آنزیم پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی، ته‌نشین حاصل از سانتریفیوژ را با آب مقطر در دمای چهار درجه سلسیوس شستشو داده تا اثری از پراکسیداز محلول در رونشین باقی نماند. سپس ته‌نشین را با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول نمک طعام یک مولار شسته شده و به صورت سوسپانسیون در g×۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رونشین بدست آمده از نظر پروتئین‌های باند شده با دیواره سلولی مورد بررسی قرار گرفت (Okey *et al.*, 1997).

میزان فعالیت پراکسیداز محلول و باند شده با دیواره سلولی بر اساس روش ارائه شده توسط Janda *et al.* (2003) از طریق کاربرد گوئیکول (ساخت Merk)، به عنوان پیش ماده این آنزیم‌ها، اندازه‌گیری شد. به این منظور دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر از عصاره گیاه، ۲۰ میکرولیتر گوئیکول ۹۸٪ و مقدار کافی از بافر سیترات-فسفات (pH 5.4 , 0.1M)، در یک لوله کوچک آزمایش کاملاً مخلوط گردید و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط صفر گردید. سپس با اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر $H_2O_2$ ۳۰ درصد به مخلوط فوق، فعالیت خاص آنزیمی از طریق تغییر در جذب نور $\lambda_{max}$ = 470nm در مخلوط واکنش در میلی‌گرم از پروتئین کل در دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل اسپکترونیک ۵۰۱ خوانده شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بدست آمده از SAS version 9.0 استفاده شده است.

## نتایج

میزان پراکسیداز محلول در ارقام مورد آزمایش، در تیمارهایی که فقط قارچ داشته‌اند به تدریج از روز یکم تا سی‌ام پس از مایه‌زنی رو به افزایش نهاده و سیر صعودی داشته است.

در تیمارهایی که فقط با نماتد مایه‌زنی شده اند در رقم کرونیکی میزان پراکسیداز محلول از روز یکم تا بیستم افزایش معنی‌داری داشته و پس از آن کاهش را نشان داده است (p≤۰/۰۵) (جدول ۱).

در ارقام مانزانیلا، روغنی و زرد این میزان در روز دهم به حداکثر خود رسیده و پس از آن کاهش یافته است به طوری که در رقم مانزانیلا و زرد در روز سی‌ام پس از مایه‌زنی کمترین میزان پراکسیداز را در بین روزهای بررسی شده می‌توان یافت. این تغییرات در رقم روغنی و کرونیکی به گونه ایست که میزان پراکسیداز محلول در روز سی‌ام پس از مایه‌زنی از روز بیستم کمتر و از روز اول بیشتر است (p≤۰/۰۵) (جدول ۱). میزان فعالیت این آنزیم در سطوح مختلف جمعیت نماتد در اغلب موارد تفاوت معنی‌داری نشان نداده است (p≤۰/۰۵) (جدول ۱).

در تیمارهایی که دارای قارچ و نماتد هستند در رقم کرونیکی تا روز بیستم میزان پراکسیداز افزایش یافته و پس از آن تا روز سی‌ام کاهش را نشان داده است. این تیمارها در ارقام مانزانیلا و زرد تا روز دهم افزایش پراکسیداز محلول و پس از آن سیر نزولی این آنزیم را نشان داده است. در رقم روغنی افزایش میزان پراکسیداز محلول تا روز دهم اتفاق افتاده و پس از آن رو به کاهش نهاده است به گونه ای که میزان پرکسیداز در روز سی‌ام از روز اول بیشتر بود (p≤۰/۰۵) (جدول ۱). نتایج داده‌های بدست آمده در مورد پراکسیداز محلول و باند شده با دیواره سلولی نشان داده است که میزان این دو آنزیم صرف‌نظر از نوع رقم در طول زمان‌های مورد بررسی (یک، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از مایه‌زنی) از روند یکسانی برخوردار بوده است (جدول‌های ۱ و ۲).

## بحث

گیاهان در مقابل ارگانیسم‌های بیمارگر از طریق ایجاد سدهای دفاعی مانند کوتیکول‌های مومی و یا ترکیبات ضد میکروبی و برخی آنزیم‌ها واکنش‌های دفاعی دارند (Bonas & Lahaye, 2002).

آنزیم‌های دارای واکنش اکسیداتیو موجود در گیاهان، در بسیاری از برهمکنش‌های میزبان-بیمارگر مورد توجه محققین بسیاری قرار گرفته اند (Cao *et al.*, 2005; Morkunas & Gmerek, 2007; Reuveni, 1998).

جدول ۱- میزان فعالیت پراکسیداز محلول (تغییر جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در ریشه ارقام زیتون در مراحل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی قارچ *Verticillium dahliae* و نماتد *Meloidogyne javanica*

| رقم | تیمار | زمان پس از مایه‌زنی (روز) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ۱ | ۱۰ | ۲۰ | ۳۰ |
| | | میانگین | میانگین | میانگین | میانگین |
| کرونیکی | | | | | |
| | شاهد | ۶۹/۸a | ۷۱a | ۷۱/۴a | ۷۱/۸a |
| | قارچ | ۶۹/۸d | ۱۱۰/۴c | ۱۲۹/۶b | ۱۳۴/۶a |
| | نماتد۴۰۰۰ | ۷۰/۶d | ۱۰۵/۴c | ۱۱۰/۸a | ۱۰۸/۲b |
| | نماتد۴۰۰۰+قارچ | ۷۰/۸d | ۱۲۱/۶bc | ۱۳۰a | ۱۱۹/۶b |
| | نماتد۳۰۰۰ | ۷۰/۴d | ۱۰۲/۸c | ۱۰۸/۶a | ۱۰۷/۲ab |
| | نماتد۳۰۰۰+قارچ | ۷۲/۴c | ۱۲۰/۸b | ۱۲۵/۶a | ۱۲۱b |
| | نماتد۲۰۰۰ | ۷۰/۶d | ۹۹c | ۱۰۲/۶a | ۱۰۱/۶ab |
| | نماتد۲۰۰۰+قارچ | ۷۱d | ۱۱۰/۴c | ۱۲۰a | ۱۱۵b |
| مانزانیلا | | | | | |
| | شاهد | ۶۷/۸c | ۶۹b | ۷۰/۴ab | ۷۱a |
| | قارچ | ۷۰/۶d | ۸۲/۶۱c | ۹۳b | ۱۰۸a |
| | نماتد۴۰۰۰ | ۶۹/۸b | ۷۹/۲a | ۶۹/۸b | ۵۸/۴c |
| | نماتد۴۰۰۰+قارچ | ۷۰c | ۹۷/۲a | ۷۷/۶b | ۵۳/۲d |
| | نماتد۳۰۰۰ | ۶۹/۴bc | ۷۵a | ۷۰/۲b | ۶۰/۲d |
| | نماتد۳۰۰۰+قارچ | ۶۹/۶c | ۹۶/۶a | ۸۱/۶b | ۶۲d |
| | نماتد۲۰۰۰ | ۶۸/۶b | ۷۲/۸a | ۶۸/۸b | ۵۹/۶c |
| | نماتد۲۰۰۰+قارچ | ۶۹/۶c | ۸۴/۲a | ۷۴/۸b | ۵۹/۸d |
| روغنی | | | | | |
| | شاهد | ۶۹/۴b | ۷۰/۲a | ۷۰/۲a | ۶۹b |
| | قارچ | ۶۹/۸c | ۹۲/۶b | ۹۸a | ۹۸/۴a |
| | نماتد۴۰۰۰ | ۶۹/۸d | ۸۸/۸a | ۸۳b | ۷۷/۶c |
| | نماتد۴۰۰۰+قارچ | ۷۱d | ۱۰۴/۶a | ۹۴/۶b | ۸۰/۲c |
| | نماتد۳۰۰۰ | ۶۹/۸d | ۹۲/۴a | ۸۷/۶b | ۸۳/۶c |
| | نماتد۳۰۰۰+قارچ | ۶۹/۶d | ۹۹a | ۸۹/۲ab | ۷۹c |
| | نماتد۲۰۰۰ | ۷۰/۲d | ۸۳/۸a | ۸۰b | ۷۷/۶c |
| | نماتد۲۰۰۰+قارچ | ۷۰d | ۹۵/۲a | ۸۵/۴b | ۸۰/۶c |
| زرد | | | | | |
| | شاهد | ۷۰a | ۷۰/۲a | ۷۰/۲a | ۶۹/۸a |
| | قارچ | ۷۰/۴c | ۸۹/۴b | ۹۹b | ۱۰۳/۸a |
| | نماتد۴۰۰۰ | ۷۱/۲c | ۸۶/۸a | ۷۵/۶b | ۶۶d |
| | نماتد۴۰۰۰+قارچ | ۷۰c | ۱۰۰/۸a | ۸۴/۶b | ۶۴/۴d |
| | نماتد۳۰۰۰ | ۷۱/۴bc | ۸۲/۲a | ۷۳/۲b | ۶۷/۶d |
| | نماتد۳۰۰۰+قارچ | ۷۰/۶c | ۹۸/۸a | ۸۶/۶b | ۷۲d |
| | نماتد۲۰۰۰ | ۷۰/۲b | ۷۶/۲a | ۶۴/۸c | ۶۰/۶d |
| | نماتد۲۰۰۰+قارچ | ۷۰/۶c | ۹۲a | ۷۹/۸b | ۷۰/۴ d |

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ردیف بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهند.

جدول ۲- میزان فعالیت پراکسیداز دیواره سلولی (تغییر جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در ریشه ارقام زیتون در مراحل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی قارچ *Verticillium dahliae* و نماتد *Meloidogyne javanica*

| رقم | تیمار | زمان پس از مایه‌زنی (روز) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ۱ | ۱۰ | ۲۰ | ۳۰ |
| | | میانگین | میانگین | میانگین | میانگین |
| کرونیکی | | | | | |
| | شاهد | ۱۱۹/۴a | ۱۲۰/۲a | ۱۱۹/۴a | ۱۲۰a |
| | قارچ | ۱۱۸/۸d | ۱۶۰/۲c | ۱۷۵/۲b | ۱۸۰/۲a |
| | نماتد۴۰۰۰ | ۱۲۰/۲d | ۱۵۸c | ۱۸۰/۲a | ۱۷۷/۲b |
| | نماتد۴۰۰۰+قارچ | ۱۱۹a | ۱۶۹b | ۱۷۴a | ۱۶۴c |
| | نماتد۳۰۰۰ | ۱۱۸/۸c | ۱۴۹ab | ۱۵۰/۴a | ۱۴۹ab |
| | نماتد۳۰۰۰+قارچ | ۱۲۰c | ۱۶۴/۸b | ۱۶۹/۸a | ۱۶۴/۸b |
| | نماتد۲۰۰۰ | ۱۱۹/۶c | ۱۵۱/۲ab | ۱۵۳/۸a | ۱۵۳/۸a |
| | نماتد۲۰۰۰+قارچ | ۱۲۱c | ۱۶۲b | ۱۷۶a | ۱۶۱/۶b |
| مانزانیلا | | | | | |
| | شاهد | ۱۱۹a | ۱۱۹a | ۱۱۹a | ۱۱۹/۸a |
| | قارچ | ۱۱۹/۴d | ۱۳۵/۸c | ۱۴۵/۸b | ۱۶۰/۶a |
| | نماتد۴۰۰۰ | ۱۱۹/۴b | ۱۳۰/۴a | ۱۲۰b | ۱۱۰/۶c |
| | نماتد۴۰۰۰+قارچ | ۱۲۰/۶c | ۱۴۶/۸a | ۱۲۷b | ۱۱۲/۲d |
| | نماتد۳۰۰۰ | ۱۱۸/۶b | ۱۲۴a | ۱۱۹b | ۱۰۹/۴c |
| | نماتد۳۰۰۰+قارچ | ۱۱۹/۸c | ۱۴۴/۶a | ۱۲۹/۶b | ۱۱۰/۸d |
| | نماتد۲۰۰۰ | ۱۱۹/۶b | ۱۲۶a | ۱۱۹/۴b | ۱۰۹/۸c |
| | نماتد۲۰۰۰+قارچ | ۱۲۰c | ۱۳۴/۶a | ۱۲۴b | ۱۰۸/۸d |
| روغنی | | | | | |
| | شاهد | ۱۱۹/۸a | ۱۲۰/۲a | ۱۱۹/۴a | ۱۲۰a |
| | قارچ | ۱۱۹/۶c | ۱۴۵/۸b | ۱۵۰/۴a | ۱۵۰/۲a |
| | نماتد۴۰۰۰ | ۱۲۱/۶d | ۱۳۹/۶b | ۱۳۴/۶c | ۱۶۵/۶a |
| | نماتد۴۰۰۰+قارچ | ۱۲۱/۲c | ۱۵۶a | ۱۴۶/۲b | ۱۰۶/۶d |
| | نماتد۳۰۰۰ | ۱۱۹d | ۱۳۷a | ۱۳۲/۲b | ۱۳۰/۴bc |
| | نماتد۳۰۰۰+قارچ | ۱۱۹/۴d | ۱۴۹/۴a | ۱۳۷/۸b | ۱۲۹/۲c |
| | نماتد۲۰۰۰ | ۱۱۹/۲d | ۱۳۳/۴a | ۱۲۹/۲b | ۱۲۶/۴c |
| | نماتد۲۰۰۰+قارچ | ۱۱۸/۶d | ۱۴۱/۸a | ۱۳۱/۸c | ۱۳۸/۴b |
| زرد | | | | | |
| | شاهد | ۱۱۹/۸A | ۱۱۹/۸N | ۱۲۰P | ۱۱۹/۴Fgh |
| | قارچ | ۱۱۹/۶d | ۱۴۰/۶c | ۱۴۹/۸b | ۱۵۶a |
| | نماتد۴۰۰۰ | ۱۱۹/۶b | ۱۲۴a | ۱۱۴/۶c | ۱۰۴d |
| | نماتد۴۰۰۰+قارچ | ۱۲۰c | ۱۵۰/۸a | ۱۳۶b | ۱۱۵/۸d |
| | نماتد۳۰۰۰ | ۱۱۸/۸b | ۱۲۷/۶a | ۱۱۸/۴b | ۱۱۳/۴c |
| | نماتد۳۰۰۰+قارچ | ۱۲۰c | ۱۴۵a | ۱۳۳b | ۱۱۷/۸d |
| | نماتد۲۰۰۰ | ۱۱۹/۶b | ۱۲۷a | ۱۱۷/۴bc | ۱۱۱/۴d |
| | نماتد۲۰۰۰+قارچ | ۱۱۹/۴c | ۱۳۹/۸a | ۱۲۸b | ۱۱۸c |

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ردیف بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهند.

امروزه در برخی مطالعات از آنزیم‌هایی نظیر پراکسیداز محلول و باند شده با دیواره سلولی، بتا-۳،۱-گلوکاناز، بتا-۴،۱-گلوکاناز و محتوی ترکیبات فنلی به عنوان مارکرهای دفاع بیوشیمیایی در گیاهان میزبان استفاده می‌شود (Sari *et al.*, 2007; Sari *et al.*, 2008).

پراکسیداز غالباً در واکوئل‌ها جای دارد و به عنوان کاتالیزور سنتز $H_2O_2$ از NADH و $H_2O$ حمایت می‌کند. پراکسیداز در واکنش به ایجاد زخم در گیاهان به میزان فراوانی تولید می‌شود. این آنزیم با دیواره سلولی گیاه در ارتباط بوده و در محیط غیر زنده (in vitro) سینامیل

الکل‌ها را پلیمریزه می‌کند و پیشنهاد شده که در شکل‌گیری لیگنین و ایجاد باندهای عرضی بین مونومرهای اکستنسین (Extensin) و پلی‌ساکاریدها دخالت داشته باشد (Niebel *et al*., 1993).

از آن جایی که در بسیاری از مطالعات انجام گرفته در ایران و جهان، فعالیت پراکسیداز در مدت زمان ارتباط متقابل گیاه-بیمارگر افزایش نشان داده است، محققین بر این باورند که این آنزیم در واکنش‌های دفاعی گیاه نقش مهمی دارد (Kazemi, 1996; Parhizkar *et al*., 2003; Sahebani *et al*., 2008; Avdiushko *et al*., 1993; Chance & Maehly, 1995; Mohammadi & Kazemi, 2002; OKey *et al*.,1997; Sari *et al*., 2007; Sari *et al*., 2008).

از نتایج بدست آمده در این آزمایش چنین برمی آید که در اغلب موارد فعالیت آنزیم پراکسیداز (محلول و باند شده با دیواره سلولی) در تیمارهایی که فقط دارای نماتد بوده‌اند، در ۱۰ روز اول مایه‌زنی سیر صعودی داشته است (جدول‌های ۱ و ۲). با گذشت زمان میزان فعالیت این آنزیم در تیمارهای دارای نماتد رو به کاهش نهاده است. این شرایط خصوصاً در مورد رقم مانزانیلا مشهودتر می‌باشد (جدول‌های ۱ و ۲).

نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی در تیمارهایی که فقط قارچ دریافت کرده اند در ۳۰ روز پس از مایه‌زنی به ماکزیمم مقدار خود در روزهای مورد بررسی رسیده است. فعالیت این آنزیم‌ها در تیمارهای دارای قارچ و نماتد در ارقام روغنی، زرد و مانزانیلا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی و در رقم کرونیکی ۲۰ روز پس از مایه‌زنی بیشترین مقدار را در روزهای مورد بررسی داشته است ($p\leq۰/۰۵$). نتایج حاکی از آن است که نماتد ریشه گرهی *M. javanica* با گذشت زمان موجب کاهش فعالیت کمی پراکسیداز در ریشه میزبان شده است. این کاهش فعالیت حتی در حضور قارچ *V. dahliae* نیز مشاهده شده است. ممکن است علت این پدیده القا سنتز ترکیبات کاهش دهنده سنتز پراکسیداز باشد و یا رابطه پیشرفته انگلی نماتد با میزبان در کاهش میزان فعالیت کمی پراکسیداز مؤثر باشد.

Sahebani *et al.* (2008) با بررسی تغییرات کمی فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی در حضور قارچ *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen و نماتد *M. javanica* دریافتند که در تیمارهای دارای قارچ فعالیت آنزیم مورد نظر طی روزهای متوالی پس از مایه‌زنی افزایش یافته و در روز پنجم به حداکثر خود رسیده است. این در حالی است که در تیمارهای دارای نماتد فعالیت پراکسیداز در روزهای پس از مایه‌زنی معنی‌دار نبوده و به تدریج کاهش یافته است. ایشان علت این پدیده را اجباری بودن رابطه انگلی نماتد با میزبان در مقایسه با قارچ دانسته‌اند.

نتایج برخی مطالعات نیز نشان داده است که تجمع پراکسیدازها در دیواره سلولی نقش مهمی در استحکام دیواره سلولی در طی تمایز سلولی و افزایش مقاومت به نفوذ قارچ‌های بیمارگر دارد. از دیگر وظایف پراکسیدازها در واکنش به حضور بیمارگرها تولید رادیکال‌های آزاد، تولید لیگنین و تجمع ترکیبات فنلی است (Reuveni, 1998).

با توجه به اینکه در تیمارهایی که فقط قارچ دریافت کرده‌اند فعالیت آنزیم پراکسیداز تا ۳۰ روز پس از مایه‌زنی به ماکزیمم مقدار خود در روزهای مورد بررسی رسیده است، علت این پدیده را می‌توان عکس‌العمل گیاه به تهاجم و نفوذ مداوم هیف‌های قارچ به بافت میزبان دانست.

در مقابل برخی از محققین معتقدند که افزایش میزان برخی آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز و کیتیناز از جمله تغییرات بیوشیمیایی پدید آمده در سایت‌های غذایی نماتدهای ریشه گرهی موسوم به سلول‌های غول‌آسا می‌باشد (Zacheo *et al*., 1995). در تیمارهای دارای نماتد (به تنهایی) افزایش میزان پراکسیداز در ۱۰ روز اول پس از مایه‌زنی و کاهش تدریجی آن تا ۳۰ روز پس از مایه‌زنی می‌تواند به شکل گیری سلول‌های غول آسا در روزهای نخستین بعد از نفوذ نماتد و آغاز آلودگی مرتبط باشد. همچنین می‌توان کاهش پراکسیداز را در تیمارهای دارای نماتد در ۲۰ و ۳۰ روز پس از مایه‌زنی به استقرار لاروهای سن دوم در منطقه پروکامبیوم ریشه و کامل شدن سایت‌های غذایی نماتد تعبیر کرد.

فعالیت پراکسیداز در تیمارهای دارای قارچ و نماتد

در رقم کرونیکی ۲۰ روز پس از مایه‌زنی و در سایر ارقام مورد آزمایش ۱۰ روز پس از مایه‌زنی بیشترین مقدار را در روزهای مورد بررسی داشته است. برخی محققین معتقدند که در محل سایت‌های غذایی نماتد ارتباط متقابل مستقیم، اعم از نفوذ قارچ به درون گال و تجمع در آن بین دو بیمارگر مشاهده می‌شود. همچنین رشد و تکثیر بیش از حد سلول‌های میزبان در اثر حمله نماتد ریشه گرهی، روند طبیعی شکل‌گیری سلول‌ها و استحکام دیواره‌ها از نظر ترکیب و حضور مواد دیواره سلولی خصوصاً لیگنین و سلولز را به تأخیر می‌اندازد. در مقایسه با سلول‌های طبیعی در چنین سلول‌هایی آلودگی قارچی به سهولت انجام می‌گیرد (Fattah & Webster, 1983). می‌توان افزایش پراکسیداز در ۱۰ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی به علت برهمکنش و رقابت قارچ و نماتد در منطقه کورتکس و استوانه مرکزی ریشه میزبان توجیه کرد.

تحقیقات متعدد در مورد محرک‌های ویژه و شیمیایی نشان داده است که گیاهان توانایی تشخیص تعداد زیادی از ترکیبات مشتق شده از سطح میکروب‌ها را دارا هستند. این ترکیبات واکنش‌های دفاعی را در گیاهان میزبان (سازگار) و غیرمیزبان (ناسازگار) القا می‌کنند (Dong *et al.*, 2003; He *et al.*, 2002). برخی از این ترکیبات در کاهش شدت پژمردگی ورتیسیلیومی ناشی از قارچ *V. dahliae* روی نهال‌های کاکائو (*Theobroma cacao* L.) در گلخانه مؤثر بوده‌اند (Cavalcanti, 2005).

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌توان چنین استنباط کرد که ارقام کرونیکی و مانزانیلا در میان ارقام مورد بررسی از نظر یکی از مهمترین مارکرهای دفاع بیوشیمیایی، آنزیم پراکسیداز، به ترتیب از بیشترین و کمترین سرعت واکنش در عکس العمل به حضور *M. javanica* و *V. dahliae* برخوردار می‌باشند. برخی مطالعات انجام گرفته در مورد این ارقام این موضوع را تأیید می‌کند (Bellini, 2002; Tous & Ferguson, 1997). با توجه به گسترش جغرافیایی، دامنه میزبانی و اهمیت بیماریزایی نماتدهای ریشه گرهی و قارچ‌های عامل پژمردگی مطالعه تغییرات فیزیولوژیک در گیاهان میزبان آلوده به این بیمارگرها می‌تواند در جهت کسب اطلاعات جامع راجع به این بیمارگرها و نهایتا مدیریت آنها مؤثر باشد.

**نتیجه‌گیری کلی**

نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی در ارقام مورد آزمایش، در تیمارهایی که فقط قارچ دریافت کرده‌اند تا ۳۰ روز پس از مایه‌زنی سیر صعودی داشته است. نتایج حاکی از آن است که نماتد قادر است فعالیت آنزیم پراکسیداز را در روزهای نخستین پس از مایه‌زنی افزایش و بعد از آن کاهش دهد.

## REFERENCES


1. Afshari Azad, H. & Alizadeh P. (2004). Isolation of *Verticillium dahliae* from olive trees in Kohkiloei & Boyerahmad, Iran. In: Proceedings of *the 16th Iranian Plant Protection Congress*, Tabriz University, Tabriz, Iran, Vol II, p.348.
2. Akhiani, A., Mojtahed, H. & Naderi, A. (1984). Species and physiological races of root-knot nematodes in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 20, 1-4.
3. Al-Ahmad, M. & Mosli, M. N. (1993). Verticillium wilt of olive in Syria. *EPPO Bulletin*, 23, 521-529.
4. Ausher, R., Katan, J. & Ovadia, S. (1975). An improved selective medium for the isolation of *Verticillium dahliae*. *Phythoparasitica*, 3, 133-137.
5. Avdiushko, S., Aire, X. S. & Kuc, J. (1993). Detection of several enzymatic activities in leaf print of cucumber plants. *Physiological* and *Molecular Plant Pathology*, 42, 441-445.
6. Bellini, E. (2002). *Miglioramento Genetico*. En Asia en., La Toscana Nella Storia Dell'olivo e Dell'olio. Florence, Italy. Pp. 229-260.
7. Bhat R. G. & Subbarao, K. V. (1999). Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 89, 1218-1225.
8. Bonas, U. & Lahaye, T. (2002). Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 44-50.
9. Cao, J., Jiang, W. & He, H. (2005). Induced resistance in yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) fruit against infection by *Penicillium expansum* by postharvest infiltration of acibenzolar-S-methyl. *Phytopathology*, 153, 640-646.

10. Cavalcanti, F. R. (2005). *Induced resistance by natural extracts in tomato against Xanthomonas vesicatoria and cacao against Verticillium dahliae: biochemical, physiologic characterization and partial purification of protein elicitors*. Ph.D. dissertation. Federal University of Lavras, Lavras-MG, Brazil.
11. Chance, B. & Maehly, A. C. (1995). Assay of catalase and peroxidase. In: S. P. Colowick and N. D. Kaplan, (Eds). *Methods in enzymology*. (Pp: 764-791). Academic Press. New York. Vol. 2.
12. De Grisse, A. (1969). Redescription ou modifications de quelques techniques utilisees dans letude des nematodes phytoparasitaires. *Mededelingen Rijksfaculteit der Landbouwwetenschappen, Gent*, 34, 351-369.
13. Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. (1986). *Basic plant pathology methods*. CRC Press.
14. Dong, H., Li, W., Zhang, D. & Tang, W. (2003). Differential expression of induced resistance by an aqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against verticillium wilt of cotton. *Crop Protection*, 22, 129-134.
15. Eisenback, J. & Triantaphyllou, H.H. (1991). Root-knot nematodes: Meloidogyne species and races. In: W. R. Nickle, (Ed.). *Manual agricalture of nematology*. (Pp: 191-274). Marcel Dekker, Inc. New York.
16. Fattah, F. & Webster, J. M. (1983). Ultrastructural changes caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in *Meloidogyne javanica* induced giant cells in Fusarium: resistance and susceptible tomato cultivars. *Journal of Nematology*, 15, 128-135.
17. Frindlender, M., Inbar, J. & Chet, I. (1993). Biological control of soil-borne plant pathogens by a β-1,3-glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 1211-1221.
18. Hall R. & Ly, H. (1972). Development and quantitative measurement of *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Botany*, 50, 2097-2102.
19. He, C. Y., Hasiang, T. & Wolyn, D. J. (2002). Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* with non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 51, 225-230.
20. Hilloks, R. J. (1992). *Cotton Diseases*. C.A.B. International, Wallingford.
21. Hussey, R. S. & Barker, K. R. (1973). A Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease*, 75, 1025-1028.
22. Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzales, K., Veisa, O. & Paldi, E. (2003). Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*, 164, 301-306.
23. Jepson, S. B. (1987). *Identification of root–knot nematodes* (*Meloidogyne* spp.). C.A.B. International. Wallingford.
24. Khan, A., Atibalentja, N. & Eastburn, D. M. (2000). Influence of inoculum density of *Verticillium dahliae* on root discoloration of horseradish. *Plant Disease*, 84, 309-315.
25. Mader, M. & Fussl, R. (1982). Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. *Plant Physiology*, 70, 1132-1134.
26. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Senthikumar, M., Seshadri, S., Chung, H., Yong, J., Sundram, S. & Sa, T. (2004). Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa*) by *Methylobacterium* spp. *Botany Bulletin of Academy of Sciences*, 45, 315-324.
27. Mohammadi, M. & Kazemi, H. (2002). Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162, 401-408.
28. Morkunas, I. & Gmerek, J. (2007). The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 185-194.
29. Niebel, A., Engler, J. A., Tier, C., Engler, G., Montagu, M. V. & Gheysen, G. (1993). Induction pattern of an extension gene in tobacco upon nematode infection. *Plant Cell*, 5, 1697-1710.
30. Okey, E. N., Duncan, E. J., Sirju-charran. G. & Sreenivasan, T.N. (1997). *Phytophthora* canker resistance in cacao: Role of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase. *Phylopathology*, 145, 295-299.
31. Ragazzi, A., Moricca, S., Vagniluca, S., Comparini, C. & Dellavalle, I. (1999). Leat water potential and peroxidase activity in *Quercus cerris* and *Quercus rubescens* inoculation with *Diplodia mutila*. *Phytopathology*, 147, 55-59.
32. Reuveni, M. (1998). Relationship between leaf age, peroxidase and β-1,3-glucanase activity and resistance to downy mildew in grapevines. *Phytopathology*, 146, 525-530.
33. Rowe, R. C., Johnson, D. A., Beery, W. R. & Omer, M. A. (2000). Vegetative compatibility analysis of strains of Verticillium dahliae from potato seed tubers and plants from the western and eastern United States. In: E. Tjamas, R.C. Row, J. B. Heal and D. Fravel, (Eds.), *advances in verticillium research and disease management*. (Pp: 74-94). The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
34. Ruggieri, G. (1946). A new disease of olive. *Italian Agricola*, 83, 369-372. (In Italian)

35. Saeedizadeh, A., Kheiri, A., Okhovvat, S. M. & Hoseininejad, A. (2003). Study on interaction between root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, and wilt fungus, *Verticillium dahliae*, on olive seedlings in greenhouse. *Communication Applied Biology Science*, 68(4a), 139-143.
36. Sahebani, N., Zad, J., Sharifi tehrani, A. & Kheiri, A. (2008). A study of the changes in quantitative and quailitative activity of proxidase in tomato cultivars during the interaction between root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* and wilt fusarium fungus, *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersisci. Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 39(1), 127-138.
37. Sari, E., Etebarian, H. R. & Aminian, H. (2007). The Effects of *Bacillus pumilus*, isolated from wheat rhizosphere, on resistance in wheat seedling roots against the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Phytopathology*, 155, 720-727.
38. Sari, E., Etebarian, H. R. & Aminian, H. (2008). Effects of *Pseudomonas fluorescens* CHAO on the resistance of wheat seedling roots to the take-all fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Plant Protection Science*, 11(3), 298-306.
39. Sasanelli, N., Fontanazza, G., Lamberti, F., D'Addabbo, T., Patumi, M. & Vergari, G. (1997). Reaction of olive cultivars to *Meloidogyne* species. *Nematologia Mediterranea*, 25, 183-190.
40. Tous, J. & Ferguson, L. (1997). La Colltura Dell'olivo in California. *Olivae*, 67, 18-26.
41. Zacheo, G., Bleve-Zacheo, T., Pagoda, D., Orlando, G. & Durbin, R. D. (1995). The association between heat-induced susceptibility of tomato to *Meloidogyne incognita* and peroxidase activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46, 491-507.