

بررسی تغییرات بیان ژن‌های دفاعی فنیل آلانین آمونیا لایاز و پراکسیداز در برهم‌کنش با عصاره

گیاه چریش در گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتد *Meloidogyne javanica*

فاطمه ناصری نسب^۱ Ph.D.، رامین حیدری^۲ Ph.D.*، فروغ سنجریان^۳ Ph.D.، فرشاد رخشنده رو^۱ Ph.D.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی، بیماری‌شناسی گیاهی، تهران، ایران

۲- دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاه پزشکی، تهران، ایران

۳- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: rheydari@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۸

چکیده

هدف: هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر چند غلظت عصاره آبی میوه چریش بر روی میزان بیان ژن‌های رمزکننده دو آنزیم فنیل-آلانین آمونیا لایاز و پراکسیداز در گیاه گوجه فرنگی (دو رقم متین و ارلی اوربانا) در برهم‌کنش با نماتد بیمارگر *Meloidogyne javanica* بود.

مواد و روش‌ها: به این منظور، گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله ۴ تا ۶ برگی با غلظت‌های مختلف (غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) عصاره تلقیح و سپس توسط عامل بیمارگر مایه‌زنی شد. نمونه‌برداری از این گیاهان در شش نقطه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۹۲ و ۲۸۸ ساعت) بعد از مایه زنی قارچ بیمارگر انجام شد. میزان بیان ژن‌های رمزکننده این آنزیم‌ها با روش Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت و گیاه مایه زنی شده با عصاره به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

نتایج: در هر دو رقم مورد بررسی، مقدار بیان ژن رمزکننده هر دو آنزیم در تیمار توام نماتد بیمارگر و عصاره آبی چریش از زمان‌های اولیه پس از مایه‌زنی روند افزایشی داشت و دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد بود. در رقم متین افزایش بیان ژن با میزان و سرعت بیشتری در مقایسه با رقم ارلی اوربانا اتفاق افتاد به طوری که بیان ژن‌های PAL و POX در این رقم به ترتیب به میزان ۱۸/۲ و ۱۴/۵ برابر شاهد در گیاه تیمار شده با عصاره و نماتد مشاهده شد. در رقم ارلی اوربانا نیز بیشترین میزان افزایش بیان ژن PAL در زمان ۱۹۲ ساعت و به میزان ۷/۵ برابر، و در مورد ژن POX در زمان ۹۶ ساعت و به میزان ۳/۹ برابر شاهد مشاهده شد. همچنین در آزمایش‌های گلخانه‌ای شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد کاهش چشمگیری را در مقایسه با رقم ارلی اوربانا نشان دادند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه برای این گیاه بتواند در برابر تهاجم بیمارگرها مصون بماند باید بیان ژن‌های دفاعی در زمان‌های ابتدایی بعد از تلقیح بیمارگر افزایش پیدا کند. افزایش زود هنگام بیان ژن‌ها در گیاهچه‌های تیمار شده با عصاره چریش پدیده‌ای قابل توجه در مکانسیم مقاومت گیاه در برابر عامل بیمارگر به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: عصاره چریش، الگوی بیان ژن، پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیا لایاز، *Meloidogyne javanica*

مقدمه

وتقویت این زمین‌ها بازدهی و سودآوری کشاورزی را افزایش دهند (۵). استفاده از گیاهان و فرآورده‌های گیاهی از روش‌های نوین برای کنترل نماتدها می‌باشد. این روش ارزان، با کاربرد آسان، بدون خطرات آلودگی محیط‌زیست و با توانایی تأثیر مفید در ساختار و مواد مغذی خاک می‌باشد (۶).

استفاده از عصاره‌های گیاهی به دلیل عوارض جانبی کمتر، عدم مقاومت بیمارگر، پایین بودن نسبی هزینه تولید آن‌ها، تجزیه شدن در خاک و عدم آلودگی زیست‌محیطی می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسب سموم شیمیایی مطرح شود (۷).

کریستوبال آجو و همکاران فعالیت عصاره حاصل از ۵۵ گیاه بومی از جمله گیاهان تیره Myrataceae را علیه لاروهای سن دو نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه بررسی کردند. بر اساس نتایج، عصاره گیاه *Eugenia winzerlingii* در بین گیاهان مورد آزمایش، بهترین اثر را در مرگ و میر لاروها نشان داد (۸). در گیاهان، ژن‌های متعددی در پاسخ به بیمارگر فعال یا خاموش می‌شوند و همچنین ممکن است بیان آن‌ها افزایش یا کاهش پیدا کند. بررسی بیان متمایز ژن‌ها یکی از روش‌های مهم برای مشخص نمودن اساس زیستی سیستم‌های بیولوژیک است (۹).

میزان بیان ژن‌های دفاعی گیاه به‌عنوان یک عامل مهم در پاسخ‌های دفاعی SAR در گیاهان مختلف، علیه بسیاری از بیمارگرها می‌باشد (۱۰). تفاوت اصلی گیاه حساس و مقاوم در شناسایی به‌موقع بیمارگر مهاجم و فعال‌سازی سریع و موثر مکانیسم‌های دفاعی گیاه است (۱۱).

با توجه به اهمیت محصول گوجه فرنگی در ایران و با در نظر گرفتن این موضوع که یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای محدود کننده رشد آن در ایران نماتد بیمارگر *M. javanica* است، بررسی و مطالعه بیان ژن در زمان تنش این بیماری و به‌خصوص ژن‌های دفاعی که نقش مهمی را در فرایند پاسخ به تنش در گیاه بازی می‌کنند،

گوجه‌فرنگی از گیاهان متداول در کشت‌های گلخانه‌ای است که به لحاظ ارزش غذایی و اقتصادی، در خانواده بادمجانیان بعد از سیب زمینی در رتبه دوم اهمیت قرار گرفته است. با توجه به مصرف بالای میوه گوجه‌فرنگی می‌توان آن را به‌عنوان یک محصول استراتژیک در کشاورزی مدرن تلقی کرد. در سال زراعی ۹۳-۹۲ سطح زیر کشت گوجه فرنگی در ایران ۱۵۸۲۲۳ هکتار، و میزان تولید آن ۶۲۴۳۹۹۲ تن بوده است (۱).

در میان نماتد های انگل گیاهی، نماتدهای عامل ریشه گره‌ای *Meloidogyne spp.* دارای اهمیت اقتصادی بیشتری هستند و محدود کننده کیفیت و کمیت تولیدات کشاورزی می‌باشند. محصولاتی مانند گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی، چغندر قند و انواع کدو از مهم‌ترین میزبان‌های این نماتد می‌باشند (۲).

از میان گونه‌های مختلف این نماتد، گونه *M. javanica* باعث کاهش میزان محصول گوجه‌فرنگی به میزان ۵۰ درصد می‌شود. علاوه بر خسارت‌های مستقیم، نماتد ریشه گره‌ای به دلیل تشدید پژمردگی ورتیسلیومی و فوزاریومی در گیاهان از اهمیت خاصی برخوردار است (۳).

کنترل نماتد مولد گره ریشه به دلیل دامنه وسیع میزبانی، دوره کوتاه چرخه زندگی، تولیدمثل زیاد و نیز انگل داخلی بودن آن دشوار می‌باشد (۴). از جمله روش‌های مورد استفاده در کنترل نماتد ریشه گره‌ای، استفاده از نماتدکش‌ها، تیمار گرمایی قطعات گیاهی، ریشه‌کشی میزبان، کنترل بیولوژیک و استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. از جمله اثرات سوء نماتدکش‌های شیمیایی، تأثیر منفی بر سلامت انسان، آلودگی محیط‌زیست و ایجاد مقاومت در نماتدها می‌باشد. با پیشرفت فن‌آوری، کشورهای پیشرفته توانسته‌اند با به‌کارگیری روش‌های طبیعی، ضمن جلوگیری از تخریب زمین‌های کشاورزی، با اصلاح

سایه کاملاً خشک و سپس آسیاب شدند. مقدار ۲۵ گرم از پودر تهیه شده در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر خیسانده و به مدت ۲۴ ساعت در ۱۰۰ rpm روی شیکر تکان داده شد و جهت جدا کردن بقایای گیاهی از پارچه ملامل عبور داده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. عصاره حاصل (۲۵ گرم گیاه در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) به عنوان محلول پایه ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و با رقیق کردن با آب مقطر غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ و ۱۰۰ درصد تهیه شد (۱۴).

بررسی اثر عصاره گیاهی بر فاکتورهای بیماریزایی نماتد مولد غده ریشه در شرایط گلخانه: در این بررسی از غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد عصاره آبی میوه چریش جهت تیمار گیاهچه های گوجه فرنگی استفاده شد.

گیاهچه های گوجه فرنگی در مرحله ۴ تا ۶ برگگی به گلدان های یک کیلوگرمی منتقل شدند و یک روز پس از انتقال ابتدا هر گیاهچه توسط مقدار ۳۰ میلی لیتر از هر یک از غلظت های مختلف آبیاری شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت هر گیاهچه توسط تعداد ۲۰۰۰ لارو سن دوم تازه تفریخ شده نماتد *M. javanica* مایه زنی شد. گیاهچه های مایه زنی شده با آب مقطر استریل به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

پس از گذشت ۴۵ روز شاخص رشدی بوتها (وزن تر و خشک اندام های هوایی) با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گیری شد. وزن خشک با قراردادن ریشه و ساقه در آون به مدت پنج روز در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. شاخص گال بر اساس سیستم درجه بندی صفر تا پنج محاسبه شد (۲).

کشت ارقام گوجه فرنگی جهت انجام بررسی های آزمایشگاهی و بیان ژن: به منظور بررسی اثر عصاره میوه چریش بر بیان ژن های دفاعی گیاه، دو رقم ارلی اوربانا و ای (رقم حساس) و متین (رقم مقاوم) کشت شدند. بذرها ضد عفونی شده گوجه فرنگی مطابق شرایط

بسیار ضروری است. نتایج این تحقیقات اطلاعات مرتبط به سازوکار تحمل و مقاومت به این بیمارگر و همچنین سایر شرایط نامساعد زیستی را افزایش داده و تولید ارقام متحمل از طریق بیوتکنولوژی را هموارتر می نماید (۱۱). در این مطالعه ابتدا تاثیر غلظت های متفاوت عصاره میوه چریش بر بیماریزایی نماتد در شرایط گلخانه ارزیابی شد. سپس میزان تغییرات بیان دو ژن درگیر در سیستم دفاعی گیاه در برهمکنش با نماتد مولد گره ریشه و عصاره چریش، با روش کمی PCR زمان واقعی (Real Time-PCR) در یک دوره زمانی ۱۲ روزه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه گیاهچه های گوجه فرنگی: بذور ضد عفونی شده گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا و ای و رقم متین به ترتیب به عنوان ارقام حساس و مقاوم، در گلدان های استریل حاوی خاک استریل شامل خاک، ماسه، کود برگ (۲:۱:۱) و مقداری پیت و پرلیت کشت شد و در شرایط مساعد گلخانه (شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۶-۲۸ درجه سانتی گراد) پرورش داده شد. گیاهچه ها در مرحله ۴ تا ۶ برگگی، جهت انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند.

عامل بیمارگر: ریشه های آلوده به نماتد طی نمونه برداری از مزارع و گلخانه های کشت گوجه فرنگی استان البرز، جمع آوری شد. تکثیر نماتد به روش Single egg mass روی گیاهچه های رقم ارلی اوربانا و ای انجام و شناسایی مطابق کلید ایسن باخ صورت گرفت (۱۲). جداسازی لارو نماتد از خاک به روش سانتریفوژ و جداسازی ماده های بالغ به صورت مستقیم از ریشه آلوده انجام شد. پس از شناسایی گونه و چندین دوره تکثیر متوالی، جمعیت خالص گونه *M. javanica* ایجاد شد. در این تحقیق از لارو سن دوم نماتد استفاده شد (۱۳).

تهیه عصاره آبی: در این تحقیق از میوه چریش جهت تهیه عصاره آبی استفاده شد. میوه های گیاه چریش در

گیاهان مایه زنی شده با عصاره و عدم مایه زنی با نماتد
گیاه: گیاه مایه زنی شده با عصاره و با نماتد (تیمار با
عصاره ۲۴ ساعت قبل از مایه زنی با نماتد و تیمار با عصاره
۲۴ ساعت بعد از مایه زنی با نماتد)

طراحی آغازگر جهت تکثیر ژن های منتخب: در این
بررسی میزان بیان ژن های فنیل آلانین آمونیلایز و
پراکسیداز با استفاده از روش Real time-PCR انجام
شد.

آغازگرهای اختصاصی برای هر ژن بر اساس بررسی منابع
علمی و مقالات به دست آمدند. نکات استاندارد در طراحی
آغازگر از جمله طول آغازگر، دمای اتصال، % G+C،
ایجاد دایمر، تولید لوپ یا حلقه در درون هر یک از
آغازگرها و ΔG مناسب، با استفاده از نرم افزار Oligo
(National Biosciences Inc., Ver.6) بررسی شد
(جدول ۱). ساخت آغازگر توسط شرکت ژن فن آوران
انجام شد.

آغازگرها به طور اختصاصی تنها به ژن مورد نظر خود
متصل می شوند. پس از ساخت آغازگرهای اختصاصی برای
هر ژن شرایط PCR برای هر یک از جفت آغازگرهای
اختصاصی بهینه گشت. برای انجام PCR از الگوی
cDNA استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا RNA از گیاه
استخراج گردید و سپس با استفاده از آنزیم رونویسی
معکوس به cDNA تبدیل گشت تا به عنوان الگو در تهیه
محصول PCR هر ژن به کار رود.

بالا کشت شدند. این آزمایش در دو سطح قبل از حمله
نماتد و بعد از حمله نماتد و با سه تکرار انجام شد (۱۵).
در آزمایش قبل از حمله بیمارگر، ابتدا گیاهچه های گوجه
فرنگی توسط مقدار ۳۰ میلی لیتر از عصاره میوه چریش با
غلظت ۷۵ درصد آبیاری شد و ۲۴ ساعت بعد هر گیاهچه
توسط تعداد ۲۰۰۰ لارو نماتد مایه زنی شد.

در آزمایش پس از حمله بیمارگر: ابتدا هر گیاهچه
توسط تعداد ۲۰۰۰ لارو نماتد مایه زنی شد و ۲۴ ساعت
بعد توسط مقدار ۳۰ میلی لیتر از عصاره میوه چریش با
غلظت ۷۵ درصد آبیاری شد.

نمونه برداری جهت انجام آزمایش های ارزیابی بیان ژن در
زمان های ۰، ۱۲، ۲۴ ساعت و روزهای چهارم، هشتم و
دوازدهم بعد از مایه زنی بیمارگر و عصاره انجام گرفت و
بلافاصله گیاهچه ها در محل نمونه برداری به ظرف نیتروژن
مایع منتقل و سپس در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد
آزمایشگاه ذخیره شدند. در مطالعات مربوط به اندازه گیری
بیان ژن از دو رقم حساس ارلی اوربانا و مقاوم متین و
غلظت ۷۵ درصد عصاره آبی گیاه چریش استفاده شد که
این نمونه برداری ها در پنج نقطه زمانی انجام گرفت. در
محاسبات گیاه مایه زنی شده با عصاره تنها به عنوان شاهد
در نظر گرفته شد.

گیاه شاهد سالم: عدم کاربرد عصاره و نماتد

شاهد: گیاه مایه زنی شده با عصاره، و عدم مایه زنی با
نماتد

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن ها

منبع	اندازه محصول	توالی پرایمرها	اسامی ژن ها	ژن
(Aimé et al., 2013)	۱۹۷	5 ACGGGTTGCCATCTAATCTG3 5 AGCTCTTTTCCTGGCTGAAA3	F R	فنیل آلانین آمونیلایز
(el-Gaied et al., 2013)	۱۱۲	5TGCAGCATTGACAACACGTA3 5TCTTCCCATTTTCTCCATCG3	F R	پراکسیداز

گیاهچه گوجه فرنگی مایه زنی شده با عصاره و نماتد. (عصاره ۲۴ ساعت قبل از مایه زنی نماتد استفاده شده است).

گیاهچه های مایه زنی شده با عصاره و عدم کاربرد نماتد (شاهد)

گیاهچه گوجه فرنگی: نماتد+، عصاره.

گیاهچه ها با عصاره آبی ۷۵ درصد میوه چریش مایه زنی شده است.

در این تحقیق از روش SYBR Green استفاده شد. این روش روشی کم هزینه، و در دسترس است و می تواند با صحت بالا جهت بررسی نتایج مورد استفاده قرار گیرد.

آنالیز آماری

آزمون بررسی اثر غلظت های مختلف عصاره بر مرگ و میر لاروها به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد که شامل فاکتورهای A، غلظت و B، زمان بود. سایر آزمایش ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و میانگین ها با آزمون چند دامنه دانکن ($p \leq 0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

اثر عصاره های گیاهی بر فاکتور بیماریزایی نماتد (شاخص گال) مولد غده ریشه و وزن خشک و تر

ریشه در شرایط گلخانه

در این بررسی پس از گذشت ۴۵ روز اثر سطوح مختلف عصاره چریش بر فاکتور شاخص گال مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین وزن تر و خشک ریشه و اندام های هوایی گیاه نیز اندازه گیری شد.

ارزیابی شاخص گال

تجزیه واریانس داده های حاصل از بررسی شاخص گال نشان داد (جدول ۲) که بین تاثیر غلظت های مختلف عصاره گیاه چریش بر روی این فاکتور ۴۵ روز بعد از آلوده

استخراج RNA و ساخت cDNA استخراج RNA از بافت ریشه گوجه فرنگی با استفاده از کیت RNXplus (سیناژن، ایران) مطابق دستورالعمل انجام گرفت. برای ساخت cDNA از کیت ساخت cDNA (ThermoScientific، آمریکا) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد (Gholamnezhad et al., 2016).

ژن های $TeF1\alpha$ و اکتین به عنوان ژن خانه دار (House keeping gene) انتخاب شد. از RNA کل استخراج شده به عنوان الگو برای ساخت cDNA استفاده شد. پس از یکسان سازی غلظت RNA های مختلف، واکنش ساخت cDNA بر طبق دستورالعمل کیت YTA SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (یکتا تجهیز آزما، ایران) انجام گرفت. برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن ها در طی نقاط زمانی از روش Livak استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰ درصد است و از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ به منظور بررسی تغییر بیان ژن استفاده شد (۱۶).

میزان بیان ژن های دفاعی منتخب بر اساس ژن $TEF-1\alpha$ (ژن خانه دار) با بیان ثابت نرمال شده، سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه تیمارها نسبت به شاهد سنجیده شد.

نتایج به دست آمده از Real time-PCR با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال پنج درصد و با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت.

تیمارهای مورد استفاده در این آزمایش به صورت زیر می باشد:

گیاهچه های گوجه فرنگی سالم: عدم کاربرد عصاره و نماتد

گیاهچه گوجه فرنگی: مایه زنی شده با نماتد و عصاره (عصاره ۲۴ ساعت پس از مایه زنی نماتد استفاده شده است).

سازی با نماد، در مورد هر دو رقم متین و ارلی اوربانا، وجود دارد. اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$)

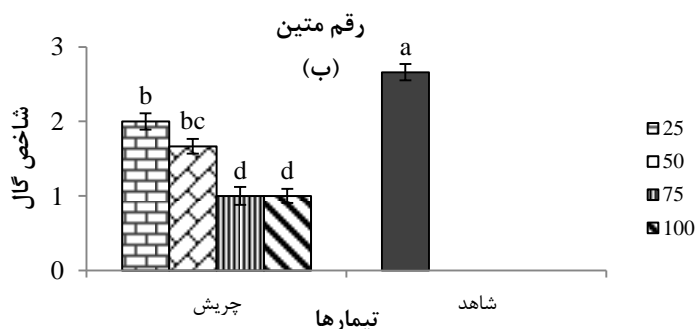
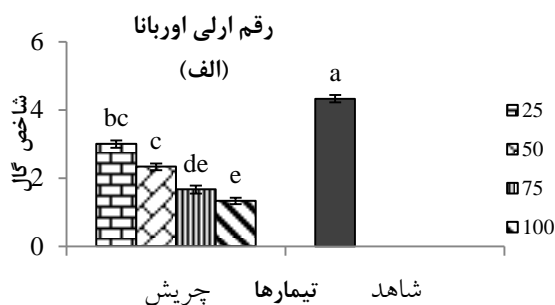
جدول ۲: تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر شاخص گال نماتد *M. javanica* در رقم متین در شرایط گلخانه

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)		F
		رقم متین	رقم متین	
تیمارهای مختلف (شامل عصاره های گیاهی و سطوح غلظت)	۴	۰/۷۸	۰/۹۸	۶/۱۲**
خطای آزمایش	۱۰	۰/۱۱	۰/۱۶	۷/۰۹**
کل	۱۵			

** به احتمال ۹۹/۹۹ درصد ($p \leq 0.01$) اختلاف معنی دار است، $C.V = 9.12\%$ (رقم متین)، $C.V = 7.37\%$ (رقم ارلی اوربانا)

اما شاخص گال در شاهد و همچنین بقیه تیمارها کمتر از رقم ارلی اوربانا بود. بیشترین مقدار عددی شاخص گال (۲) مربوط به غلظت ۲۵ درصد عصاره بود که این مقدار نیز دارای اختلاف معنی دار با شاهد (۲/۶۶) بود. در این رقم تمامی غلظت ها دارای اختلاف معنی دار با شاهد بودند، اما دو سطح غلظتی ۷۵ و ۱۰۰ درصد عصاره اختلاف معنی دار نداشتند.

در مورد رقم ارلی اوربانا بر اساس نمودار ۱، الف کمترین مقدار عددی شاخص گال مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد عصاره چریش با مقدار عددی ۱/۳۳ بود، که این مقدار با غلظت ۷۵ درصد عصاره این گیاه دارای اختلاف معنی دار نبود. تمامی تیمارها سبب کاهش معنی دار شاخص گال در مقایسه با شاهد به میزان ۴/۳۳ شدند. در مورد رقم متین همان طور که نتایج مقایسه میانگین انجام شده در نمودار ۱، ب نشان می دهد روند مانند رقم ارلی اوربانا بود،



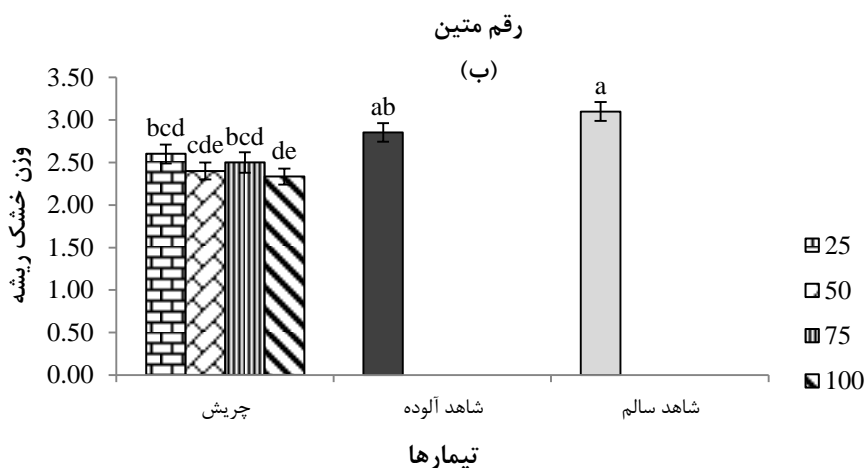
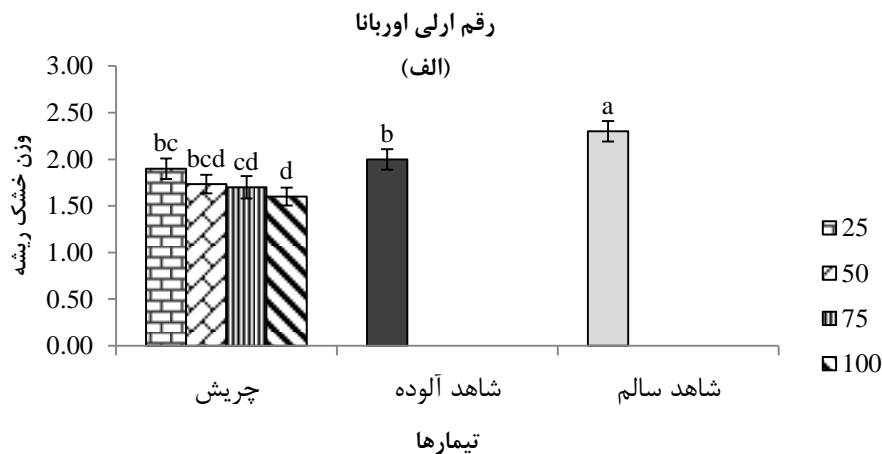
نمودار ۱: مقایسه میانگین اثر تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد عصاره چریش بر شاخص گال نماتد *M. javanica* رقم ارلی اوربانا (الف) و رقم متین (ب) در شرایط گلخانه. هر عدد میانگین سه تکرار است. میانگین هایی که با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف مشخص شده اند. تفاوت ها با آزمون دانکن ($p \leq 0.01$) ارائه شده اند.

وزن خشک ریشه

بر اساس نمودار ۲ الف، از نظر وزن خشک ریشه در رقم ارلی اوربانا، بالاترین مقدار مربوط به تیمار شاهد سالم، با مقدار عددی ۲/۳۰، بود که در گروه آماری a قرار گرفت و بعد از آن تیمارهای شاهد آلوده، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد، بالاترین مقادیر وزن خشک ریشه را داشتند. همان طور که نمودار نشان می دهد بین تیمار ۱۰۰ درصد و تیمار ۲۵ درصد عصاره چریش از نظر تاثیر بر وزن خشک اختلاف معنی داری وجود دارد. تیمار ۱۰۰ عصاره چریش همچنین با شاهد آلوده و سالم نیز دارای اختلاف معنی دار می باشد، بین سه تیمار (۲۵ درصد، ۵۰ درصد، ۷۵ درصد) اختلاف معنی دار وجود نداشت و تیمار ۱۰۰

درصد نیز با تیمار ۷۵ درصد و ۵۰ درصد فاقد اختلاف معنی دار بود.

بر اساس نمودار ۲ ب، از نظر وزن خشک ریشه در رقم متین مقدار وزن خشک ریشه مربوط به تیمار شاهد سالم، با مقدار عددی ۳/۱، بود و بعد از آن تیمارهای شاهد آلوده، ۲۵ درصد و در مرتبه های بعدی تیمارهای ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد، بالاترین مقادیر وزن خشک ریشه را داشتند. همان طور که نمودار نشان می دهد بین تیمار ۱۰۰ درصد و سایر تیمارها از نظر تاثیر بر وزن خشک، در رقم متین، اختلاف معنی داری وجود ندارد. اما تیمار ۱۰۰ درصد عصاره چریش دارای اختلاف معنی دار با شاهد آلوده و سالم می باشد.



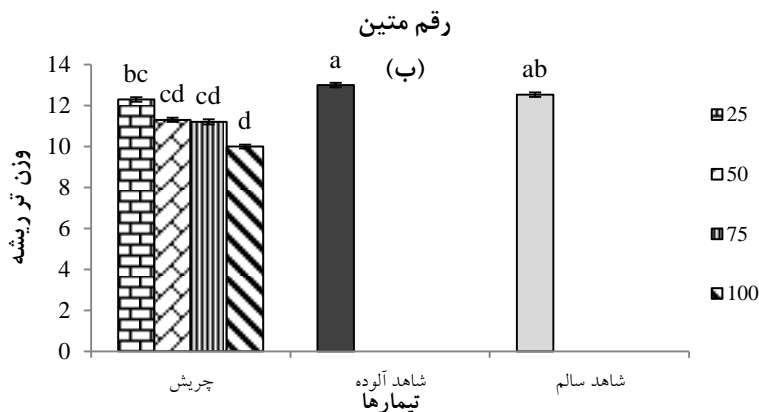
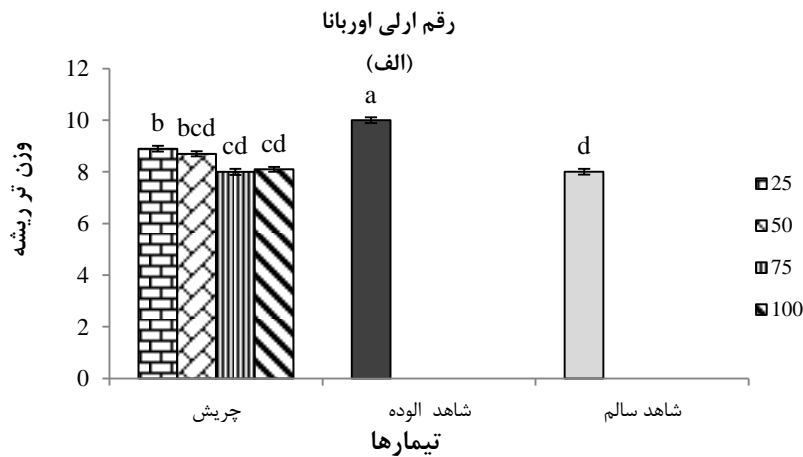
نمودار ۲: مقایسه میانگین اثر غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ درصد عصاره آبی چریش بر وزن خشک ریشه رقم ارلی اوربانا (الف) و متین (ب) در شرایط گلخانه. هر عدد میانگین سه تکرار است. میانگین هایی که با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف، مشخص شده اند. تفاوت ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.01$) ارائه شده اند.

وزن تر ریشه

شاهد آلوده در رقم ارلی اوربانا دارای بیشترین وزن تر با مقدار ۱۰ گرم بود، که این میزان یا سایر تیمارها دارای اختلاف معنی دار بود. بعد از شاهد آلوده به ترتیب بیشترین مقادیر وزن تر ریشه مربوط به تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد عصاره گیاهی چریش بود. در بین تیمارها فقط تیمار ۲۵ درصد عصاره چریش با دو تیمار ۷۵ و ۱۰۰ درصد عصاره چریش دارای اختلاف معنی دار بود (نمودار ۳ الف).

بر اساس نمودار ۳ ب، از نظر وزن تر ریشه در رقم ارلی

متین بیشترین مقدار این صفت مربوط به تیمار شاهد آلوده، با مقدار عددی ۱۳ گرم بود و بعد از آن تیمارهای شاهد آلوده، ۲۵ درصد چریش و در مرتبه های بعدی تیمارهای ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد، بالاترین مقادیر وزن تر ریشه را، از نظر عددی، نشان دادند. شاهد آلوده با شاهد سالم دارای اختلاف معنی دار نبود، اما دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها بود. تیمار ۲۵ درصد عصاره چریش در بین غلظت های مختلف این عصاره تنها با تیمار ۱۰۰ درصد عصاره چریش دارای اختلاف معنی دار بود (نمودار ۳ ب).



نمودار ۳. مقایسه میانگین اثر غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ درصد عصاره آبی چریش بر وزن خشک ریشه رقم ارلی اوربانا (الف) و متین (ب) در شرایط گلخانه. هر عدد میانگین سه تکرار است. میانگین هایی که با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف، مشخص شده اند. تفاوت ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.01$) ارائه شده اند.

بررسی بیان ژن ها در برهمکنش گیاه گوجه فرنگی

با عصاره آبی ۷۵ درصد میوه چریش و بیمارگر *M. javanica*

آنالیز و مقایسه الگوی بیان ژن های پاسخ دهنده به نماتد بیمارگر هم در سطح ترانسکریپتومیکس و هم در سطح پروتئومیکس می تواند اطلاعات ارزشمندی برای برنامه های اصلاحی در اختیار محققین قرار بدهد. هدف از انجام این تحقیق شناسایی ژن های درگیر در فرایند دفاعی در گیاه گوجه فرنگی (رقم مقاوم متین و رقم حساس ارلی اوربانا) در برهمکنش با نماتد بیمارگر *M. Javanica* و عصاره چریش است تا در مطالعات آینده با بررسی بیان ژن های القا شونده با تنش این بیمارگر و نیز عصاره های گیاهی پایه های فیزیولوژیکی واکنش به این تنش شناخته شود.

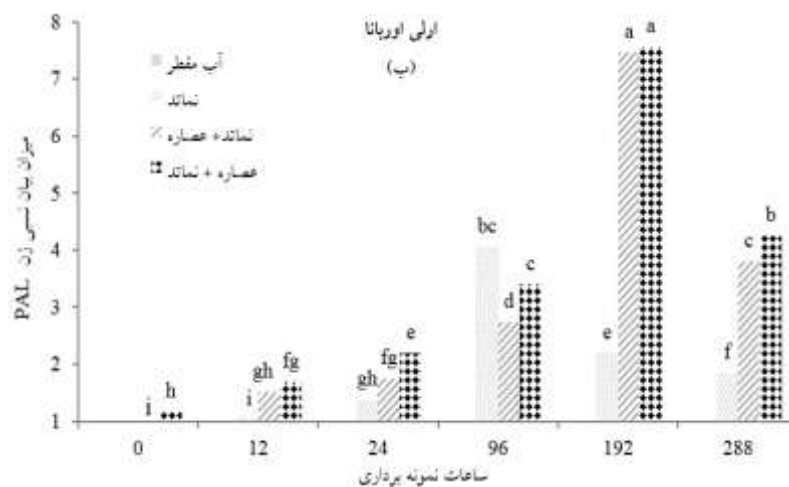
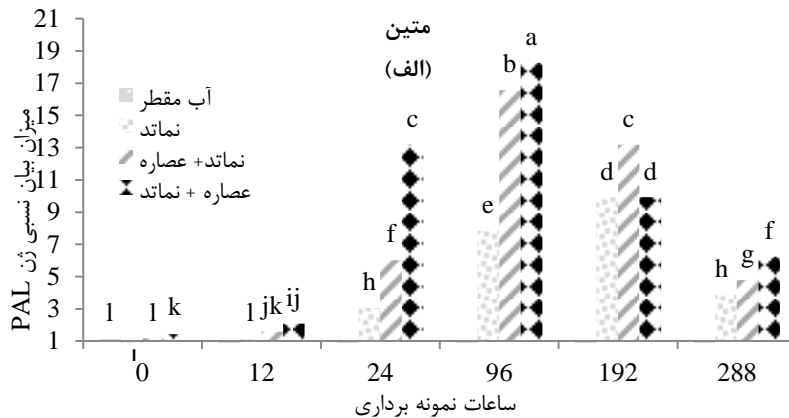
الگوی بیانی دو ژن فنیل آلانین آمونیا لیا ز با استفاده از روش کمی PCR زمان واقعی، بررسی شد. در این تحقیق برای بررسی میزان بیان ژن ها از روش کمیت سنجی نسبی استفاده شد. دو ژن مورد مطالعه شامل ژن های رمز کننده پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لیا ز بودند. نتایج حاصل از بررسی بیان این ژن ها در نقاط زمانی مختلف نشان داد که این ژن ها در زمان های مختلف و همچنین تحت تیمارهای مختلف تغییرات بیان نشان دادند. پس از تجزیه واریانس برای هر ژن، میانگین مربوط به هر ژن با استفاده از روش دانکن مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها به صورت نمودار بیان شده است.

فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL)

بر اساس نمودار ۳، الف میزان بیان ژن رمز کننده فنیل آلانین آمونیا لیا ز در رقم متین در دو زمان اول در تمام تیمارها نسبت به شاهد تغییرات زیادی نشان نداد. در گیاهان تیمار شده با نماتد از زمان ۲۴ ساعت تا زمان ۱۹۲ ساعت (روز هشتم) بیان این ژن روند افزایشی داشت و در بالاترین میزان خود ۹/۹ برابر شاهد بیان شد نسبت به شاهد مایه زنی شده با عصاره افزایش بیان قابل ملاحظه ای نشان داد و سپس در روز دوازدهم کاهش بیان

داشت. میزان بیان این ژن در مورد تیمار نماتد و عصاره در روز چهارم به بالاترین میزان خود رسید و پس از آن بیان ژن کاهش یافت. در تیمار عصاره و نماتد در چهارمین روز نمونه برداری به بیشترین مقدار خود رسید و با وجود کاهش بیان در روزهای بعد، در روز هشتم نمونه برداری با اختلاف معنی دار بیش از سایر تیمارها در مقایسه با شاهد بیان شد. در این روز میزان بیان ژن رمز کننده آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز به ۱۸/۲ برابر شاهد رسید.

بر اساس نمودار ۳، ب میزان بیان ژن رمز کننده فنیل آلانین آمونیا لیا ز در رقم حساس ارلی اوربانا در طول ۱۲ بعد از اولین نمونه برداری در هر سه تیمار دارای تغییرات ناچیزی بود، از زمان نمونه برداری سوم (۲۴ ساعت) افزایش بیان در هر سه تیمار نسبت به ساعات قبل افزایش یافت. در گیاه تیمار شده با نماتد، میزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیا ز در روز چهارم به بالاترین مقدار خود رسید و در این زمان با اختلاف معنی دار، بیش از میزان بیان در دو تیمار دیگر بود. در این نقطه زمانی بیان ژن در تیمار مذکور با بیش از چهار برابر بیان در شاهد (گیاه مایه زنی شده با عصاره چریش) رسید. در روزهای هشتم و دوازدهم با وجود کاهش بیان، مقدار بیان این ژن ثابت بود. در دو تیمار نماتد و عصاره، ۲۴ ساعت قبل و ۲۴ ساعت بعد از مایه زنی نماتد، بیشترین میزان بیان در روز هشتم نمونه برداری و بدون اختلاف معنی دار با یکدیگر (تقریباً ۷/۵ برابر شاهد) مشاهده شد. مقدار بیان این ژن در همه تیمارها به مقدار چشمگیری کمتر از رقم مقاوم متین بود. میزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیا ز در هر دو رقم حساس و مقاوم در دو زمان ابتدایی نمونه برداری تغییرات بسیار کمی نسبت به شاهد داشت. اما در رقم مقاوم از زمان سوم میزان بیان ژن آهنگ تندتری به خود گرفت و میزان بیان در مقایسه با رقم حساس حتی در روز پایانی نمونه برداری قابل ملاحظه است.



نمودار ۴: الگوی بیان ژن رمزکننده آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز در رقم‌های محتمل متین (الف) و حساس ارلی اوربانا (ب) تحت تیمارهای مختلف در نقاط زمانی متفاوت. نماتد به تنهایی، نماتد+ عصاره پس از ۲۴ ساعت، عصاره+ نماتد پس از ۲۴ ساعت، گیاه مایه زنی شده با آب مقطر. بیان همه ژن‌ها نسبت به شاهد (تیمار عصاره چریش تنها) سنجیده شد.

پراکسیداز (POX)

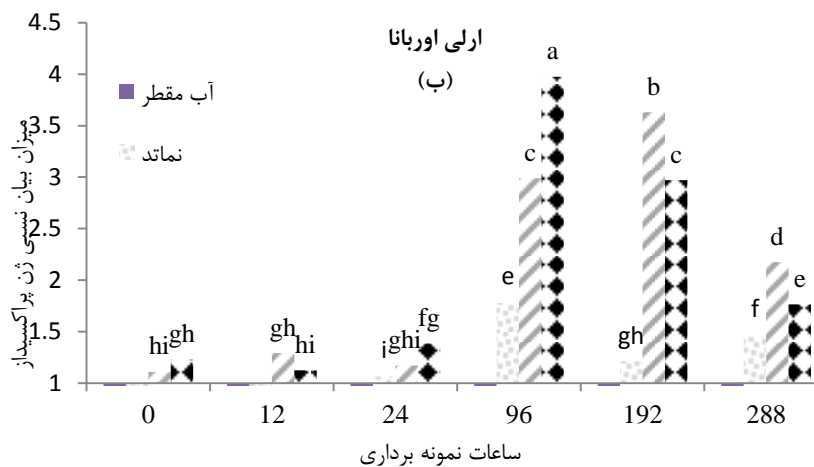
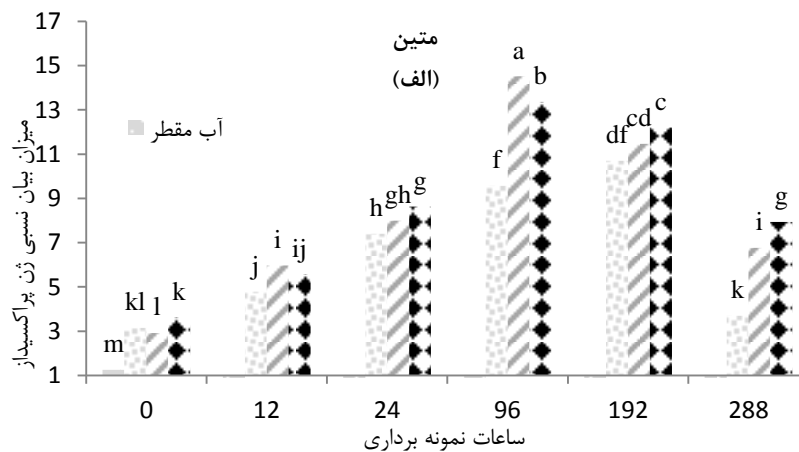
همانطور که نمودار ۵، الف نشان می‌دهد در رقم مقاوم متین، میزان بیان ژن رمز کننده پراکسیداز در طول ۹۶ ساعت (چهار روز) پس از اولین نمونه برداری در هر سه تیمار روند افزایشی داشته است، و پس از طی این مدت در گیاهان مایه زنی شده با عصاره به بیشترین مقدار خود در بین زمان‌های نمونه برداری رسیده است و سپس رو به کاهش گذاشته و این روند کاهشی تا روز دوازدهم نمونه برداری ادامه یافته است. در این روز بیشترین بیان مربوط به تیمار نماتد و عصاره به میزان ۱۴/۵ برابر شاهد بود. در تیمار گیاه مایه زنی شده با نماتد، بیشترین بیان (۱۰/۷)

برابر شاهد) در روز هشتم نمونه برداری اتفاق افتاد که با مقدار مربوط به تیمار نماتد و عصاره (۲۴ ساعت پس از مایه زنی با نماتد) در این روز اختلاف معنی‌دار نداشت. میزان بیان این ژن در مورد تیمار نماتد تنها در همه مقاطع زمانی نمونه برداری بیشتر از تیمار استفاده از عصاره به تنهایی بود.

بر اساس نمودار ۴، ب میزان بیان ژن رمز کننده پراکسیداز در رقم حساس ارلی اوربانا در طول ۲۴ ساعت بعد از اولین نمونه برداری در هر سه تیمار دارای نوسان در تغییر بیان ژن بود، ولی از این زمان به بعد دارای روند افزایشی بود و این روند تا هشت روز (۲۹۲ ساعت) بعد از

نماتد تنها ۹۶ ساعت بعد از اولین نمونه برداری میزان بیان ژن به بیشترین مقدار خود رسید سپس در مقطع زمانی بعد کاهش (در روز هشتم) و دوباره افزایش (در روز دوازدهم) یافت.

اولین نمونه برداری ادامه داشت و در این روز در تیمار عصاره و نماتد بیشترین میزان بیان ژن (۳/۹ برابر شاهد) ثبت شد و این مقدار دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها در این زمان بود. میزان بیان ژن در مورد تیمار



نمودار ۵: الگوی بیان ژن رمزکننده آنزیم پراکسیداز در رقم متحمل متین (الف) و حساس ارلی اوربانا (ب) تحت تیمارهای مختلف در نقاط زمانی متفاوت. نماتد به تنهایی، نماتد+ عصاره پس از ۲۴ ساعت، عصاره+ نماتد پس از ۲۴ ساعت، گیاه مایه زنی شده با آب مقطر. بیان همه ژن‌ها نسبت به شاهد (تیمار عصاره چریش تنها) سنجیده شد.

ریشه‌های آلوده به نماتد نسبت به ریشه‌های سالم کوتاه‌تر است. همچنین کاهش رشد ریشه را می‌توان به اختلالات ایجاد شده در نوک ریشه نسبت داد. به این ترتیب که نماتد ریشه‌گرهی با حمله به نوک ریشه باعث توقف رشد طولی در قسمت‌های مورد حمله گردیده و گیاه را به تولید ریشه‌های فرعی تحریک می‌کند. به دلیل کاهش طول ریشه جذب مواد غذایی نیز کمتر می‌شود (۱۷).

بحث

نماتدهای ریشه گره‌ای با ایجاد تغییرات ساختمانی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی موجب اختلال در سیستم ریشه و کاهش جذب آب و املاح و در نتیجه کاهش رشد اندام‌های گیاه خواهند شد. پیامد این تغییرات عدم توازن میان میزان جذب آب و املاح و میزان نیاز گیاه جهت رشد ریشه و بخش هوایی خواهد بود. بنابراین طول

حساسیت متفاوت گونه‌های مختلف گیاهی به مواد بازدارنده رشد می‌تواند به دلیل خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متفاوت گونه‌ها باشد (۲۰). اثر بازدارندگی عصاره آبی حاصل از اندام‌های مختلف گیاهی بر روی رشد سایر گیاهان در آزمایش‌های متعددی بررسی شده است. سینگ و همکاران (۲۱) گزارش نمودند که عصاره حاصل از برگ گیاه *Ageratum conyzoides* L. طول گندم و تربچه را کاهش داد. در آزمایش دیگری باتیش و همکاران (۲۲) بیان داشتند که عصاره‌های حاصل از ریشه و برگ *Anisomeles indica* رشد طولی ریشه و ساقه علف قناری را به‌طور معنی‌داری کاهش داده و کاهش شدت اثر بازدارندگی در ارتباط مستقیم با غلظت عصاره بوده است.

وزن تر ریشه در شاهد سالم و آلوده رقم متین اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند که این نتیجه می‌تواند نشان دهنده این موضوع باشد که فاکتورهای رشدی رقم مورد بررسی در بازه زمانی انجام پژوهش تاثیری از عامل بیماری نپذیرفته است. اما با افزایش غلظت عصاره در برخی تیمارها شاهد کاهش وزن تر ریشه در مقایسه با شاهد بودیم. با بررسی وزن تر اندام‌های هوایی در همان تیمارها متوجه افزایش وزن تر متناسب با افزایش غلظت عصاره می‌شویم. در چنین تیمارهایی که کاهش وزن تر اندام‌های هوایی در مقایسه با شاهد آلوده و حتی سالم هستیم، احتمال تاثیر منفی عصاره بر گیاه رد می‌شود. عصاره‌های ۷۵ درصد و ۱۰۰ درصد چریش موجب افزایش معنی دار وزن تر در مقایسه با شاهد آلوده شدند. عصاره ۵۰ درصد چریش باعث افزایش معنی دار وزن تر اندام‌های هوایی در مقایسه با شاهد آلوده شدند. با توجه به عکس العمل‌های متفاوت دو رقم متین و ارلی اوربانا نسبت به تیمار با عصاره‌های گیاهی و یا تلقیح با نماتد، می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به فیزیولوژی متفاوت

با توجه به‌موارد فوق الذکر در گیاهان آلوده به نماتد قاعدتا افزایش وزن ریشه و کاهش رشد گیاه و در نتیجه کاهش وزن اندام‌های هوایی قابل پیش‌بینی است. البته باید توجه داشت که عکس العمل گیاهان و ارقام مختلف تحت شرایط مختلف یکسان نیست و همیشه نمی‌توان انتظار نتیجه یکسان در گیاهان متفاوت را داشت. نتایج تحقیق انجام شده توسط مختاری و اولیا (۱۸) نشان داد که گیاهان گوجه فرنگی دارای تیمار نماتد و جدایه‌های قارچ *Pochonia chlamyosporia* var. *chlamyosporia* شماره ۵۰۴، ۱۱۳۱ و جدایه همدان تقریباً میزان رشد یکسانی را نشان دادند و از بین این چهار جدایه، جدایه‌ی شماره ۶۷۶ عملکرد کمتری داشت. ریشه گیاهان آلوده به نماتد از وزن بیشتری برخوردار بودند که در این مورد بعد از تیمار نماتد تنها، تیمار جدایه شماره‌ی ۶۷۶ بیشترین وزن ریشه را نشان داد. وزن تر و طول شاخساره به دلیل کاهش جذب مواد غذایی و کاهش میانگره‌ها در تیمارهای آلوده کاهش یافت.

بر اساس نتایج بررسی وزن تر و خشک ریشه در ارقام متین و ارلی اوربانا در یک نگاه کلی رقم متین بوته‌های قوی‌تر و دارای وزن بیشتری را در مدت زمان یکسان، نسبت به رقم ارلی اوربانا به دست می‌دهد. در رقم ارلی اوربانا وزن تر ریشه شاهد آلوده به نماتد افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد غیر آلوده نشان داد. افزایش وزن ریشه‌های آلوده نسبت به ریشه‌های سالم احتمالاً در اثر هیپر تروفیو هیپرپلازی سلول‌ها و همچنین افزایش ریشه‌های فرعی به‌عنوان واکنش میزبان به نماتد می‌باشد.

نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهد شدت اثر بازدارندگی مواد شیمیایی بر روی رشد گیاه هدف بسته به نوع گیاه متفاوت می‌باشد. مواد بازدارنده‌ای که در غلظت مشخص منجر به کاهش رشد یک گیاه می‌شوند در همان غلظت ممکن است منجر به اثرات بازدارندگی کمتر یا توقف رشد در گیاه دیگر شوند (۱۹).

در رقم متین برخلاف رقم ارلی اوربانا وزن شاهد سالم و آلوده اختلاف معنی دار نداشتند. بسیاری از تیمارها با شاهد اختلاف معنی دار نداشتند و با وجود کاهش آلودگی وزن خشک تغییر معنی داری نداشت. غلظت های بالای عصاره رازیانه و کرچک و استبرق باعث کاهش معنی دار وزن خشک شدند که با توجه به اینکه وزن خشک اندام های هوایی در آن گیاهان نسبت به شاهد سالم کاهش نداشته است، نمی توان گفت که عصاره اثر سوء بر رشد گیاه داشته است.

در رقم ارلی اوربانا وزن خشک ریشه شاهد آلوده به طور معنی داری در مقایسه با شاهد سالم کاهش یافت که این حالت موید اطلاعاتی است که در خصوص اثر آلودگی به نماتد مولد گره ریشه بر کاهش وزن خشک گیاه وجود دارد. اما تفاوت نتایج بین دو رقم گوجه فرنگی ارلی اوربانا و متین نشان می دهد که حتی در یک میزبان خاص نمی توان انتظار نتایج ثابت و قابل پیش بینی داشت، چرا که در یک سیستم زنده و پویا پاسخ و عکس العمل می تواند کاملاً متفاوت باشد.

ترکیبات فنیل پروپانوئیدی از اسیدسینامیک مشتق می شوند که خود اسیدسینامیک از اسید آمینه فنیل آلانین تشکیل شده است (۲۷). آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL) واکنش تبدیل فنیل آلانین را به ترانس اسید سینامیک را هدایت می کند. این مرحله، اولین قدم در مسیر فنیل پروپانوئید است و به عنوان یک گلوگاه تنظیمی مهم بین متابولیسم اولیه و ثانویه است (۲۸). PAL آنزیمی القا شونده است که در پاسخ به تنش های زنده و غیرزنده مانند بیمارگرها، تابش اشعه UV و دمای پایین القا می شود (۲۹).

در گیاه *Arabidopsis thaliana* آنزیم PAL به وسیله چهار ژن PAL1 تا PAL4 رمز می شود (۲۸). ریشه های گوجه فرنگی مقاوم کشت داده شده در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد دارای مجموعه ای از ترکیبات فنلی اند که به عنوان عوامل دفاعی عمل می کنند. آلودگی ریشه در ۲۷ درجه سانتی گراد (شرایط مقاومت) میزان فنل آزاد

ارقام باید انتظار نتایج متفاوتی را از تیمارهای یکسان در شرایط مشابه را داشت.

حسینی نژاد (۲۳) اثر مشتقات چریش بر نماتد مولد غده *Meloidogyne javanica* در گوجه فرنگی مورد بررسی قرار داده و علی رغم مشاهده کاهش معنی دار جمعیت نهایی، تعداد گره و توده های تخم نماتد در تمامی تیمارهای چریش، بیشترین افزایش رشد گیاه را در مقایسه با شاهد در تیمار پودر مغز دانه چریش گزارش نموده است.

مطالعات راثو و همکاران (۲۴) نشان داد که استفاده از برگ *Calotropis procera* به همراه *Glomus fasciculatum* Tul. در خاک علیه نماتد غده ریشه *M. incognita* سبب کاهش تعداد گال و تعداد تخم در هر کیسه تخم شد و علاوه بر این سبب بهبود رشد گیاه گوجه فرنگی و افزایش کلنیزاسیون آن توسط قارچ میکوریز شد.

تاکنون کشاورزان به صورت موفق از فرمولاسیون های مختلف چریش جهت مدیریت نماتدهای پارازیت گیاهی استفاده کرده اند. علاوه بر چریش تاثیر نماتدکشی گیاهان دیگری مثل میخک، گل جعفری افریقایی، توتون، چای، مارچوبه، زنجبیل، خرزهره و خردل مورد بررسی قرار گرفته و این گیاهان اثر قابل ملاحظه ای در کاهش جمعیت نماتد مولد گره داشته اند (۲۵). اثر بازدارندگی عصاره ها ممکن است به دلیل وجود مواد شیمیایی موجود در عصاره باشد که دارای خواص جنین و تخم کشی می باشند. این مواد شیمیایی یا بر روی رشد جنین تاثیر گذاشته یا موجب کشته شدن جنین موجود در تخم ها شده و یا حتی تو ده تخم ها را در خود حل کرده است (۲۶).

نماتدهای مولد گره ریشه با ایجاد گال بر روی سیستم ریشه گیاه و تجمع آب و مواد غذایی در ریشه سبب افزایش وزن تر ریشه گیاهان آلوده می شوند در حالی که وزن خشک ریشه نسبت به وزن تر آن کاهش می یابد.

وزن خشک ریشه در هر دو رقم مورد مطالعه، در شاهد آلوده به نماتد کمتر از شاهد سالم بود.

فنیل آلانین آمونیا لایز، آنزیمی کلیدی در متابولیسم فنل پروپانوئید است که تبدیل L- فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید، اولین مرحله در متابولیسم فنولیک ها را برعهده دارد، این مرحله یک واکنش بیوشیمیایی کلیدی در دفاع گیاهی به شمار می رود (۳۴).

پراکسیدازها می توانند سوبستراهای مختلفی را در حضور پراکسید هیدروژن (H_2O_2) اکسید کنند (۶). آنزیم های پراکسیداز در ایزوفرم های متعدد در گیاهان و جانوران وجود دارند (۳۵). دیواره سلولی یکی از اولین سطوح دفاعی گیاه علیه حمله بیمارگر می باشد و پراکسیداز یک آنزیم کلیدی در فرآیند سنتز دیواره سلولی است. پراکسیدازها در فرآیند ساختن دیواره سلولی مثل اکسیداسیون فنل، سوپرینی کردن و لیگینی شدن سلول گیاهی در حین دفاع علیه عامل بیماری زا شرکت دارند. آنزیم های آنتی اکسیدانت مثل پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، ترکیباتی مثل H_2O_2 را به آب تبدیل می کنند (۳۶) افزایش فعالیت پراکسیداز با القا مقاومت ارتباط دارد. آنزیم پراکسیداز به صورت ایزوفرم های متفاوت باعث جذب اکسیژن فعال در سلول می شوند (۳۷).

گزارش های زیادی در مورد فعالیت آنزیم پراکسیداز در افزایش مقاومت گیاهان وجود دارد که در واکنش ناسازگار افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقاومت حاصله دخیل شناخته شده و نشان داده شده است که در واکنش ناسازگار فعالیت این آنزیم چند برابر واکنش سازگار است (۳۸).

افزایش فعالیت پراکسیداز در گوجه فرنگی های مقاوم پس از مایه زنی با بیمارگرهای مختلف اعم از قارچها، باکتری ها و نماتدها مشاهده شده است، گیاهان ترانس ژنیک توتون، توتون زینتی، گوجه فرنگی و ذرت بیان کننده پراکسیداز آنیونی، مقاومت بیشتری به عوامل بیماری زای گیاهی و حشرات دارند. محققین معتقدند، مقاومت با ترکیبی از سه فاکتور تولید شده از پراکسیداز حاصل می گردد: (۱) سخت تر شدن بافت، (۲) نقصان کیفیت

کاهش و سبب افزایش فعالیت PPO و PAL می شود. به نظر می رسد افزایش فعالیت PAL با واکنش فوق حساسیت ارتباط نزدیکی داشته باشد، که ممکن است مکانیزمی برای توقف توسعه نماتدهای حمله کننده باشد. مایه زنی نشاهای مقاوم در ۳۲ درجه سانتی گراد (شرایط حساس) سبب کاهش فعالیت PAL و کاهش سریع ترکیبات فنلی می گردد. کاهش ترکیبات فنلی و PAL ریشه ها را برای آلودگی به نماتد مستعد می سازد (۳۰).

ژن های PAL1، PAL2 و PAL4 به مقدار زیادی در اندام های گل دهنده که دارای تجمع لیگنین هستند بیان می شوند در حالی که ژن PAL3 دارای بیان کمی در این اندامهاست. در غده های سیب زمینی که به وسیله قارچ بیمارگر *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary آلوده شده بودند مقدار فعالیت آنزیم PAL و همچنین فرم باند شونده و آزاد اسیدسالیسیلیک در بافت های آلوده شده در تعامل ناسازگار افزایش نشان دادند (۳۱). آنزیم PAL توسط عوامل زنده و غیر زنده مختلف القا می گردد که نتیجه آن تجمع ترکیبات فنلی؛ مثل اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها می باشد. فعالیت ممانعت کننده PAL (۲- آمینو- ۲- ایندافونیک اسید (AIP) می تواند فعالیت PAL را کاهش دهد. در نتیجه میزان محتوای فنلی به طرز محسوسی کاهش و مقاومت به استرسها ضعیف می شود. این نتایج نشان می دهد که PAL با تنظیم ترکیبات مختلف فنلی موجب مقاومت به استرسها می شود. زمانی که گیاه گندم و جو به وسیله ایزوله غیربیمارزای بیمارگر *B. sorokiana* آلوده شدند تغییری در میزان آنزیم PAL مشاهده نشد، اما جدایه های بیماری زای این قارچ باعث القای سطوح بالای این آنزیم در گیاه گندم و جو شد (۳۲).

یافته های این تحقیق با نتایج بررسی انجام شده روی تاثیر گونه *M. javanica* بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز در ریشه گوجه فرنگی در تعامل با قارچ عامل پژمردگی آوندی مطابقت نشان داد (۳۳). از آنجایی که

سرعت نفوذ عامل بیماری را کاهش می‌یابد و به سلول‌های گیاه اجازه داده می‌شود که واکنش‌های دفاعی خود را که برای فعال شدن به زمان بیشتری نیاز دارد (۴۳) تنظیم کند.

در بررسی انجام شده توسط Campos و همکاران (۴۴) تاثیر PPO و POX در مقاومت به آنتراکنوز در چهار رقم لوبیا، نشاها با SA و نژاد دلتای Colletotrichom lindemuthianum (قارچ القاگر) ارزیابی گردیدند. فعالیت آنزیمی و میزان فنل سه روز پس از کاربرد القاگر قارچی و پنج روز پس از مایه زنی با پاتوتیپ مهاجم اندازه گیری شده است. گیاهان تیمار شده با SA و القاگر قارچی افزایش فعالیت دو آنزیم را در همه ارقام نشان دادند. بیشترین فعالیت آنزیمی در ارقام مقاوم به بیماری مشاهده شده است.

در یک تحقیق انجام شده گزارش شد که تیمار درختان مانگو با باکتری *P. fluorescens* به علاوه کیتین بعد از ۱۵ روز موجب افزایش میزان فنل و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و PAL می‌شود (۴۵).

بر اساس نتایج این مطالعه عصاره گیاه چریش قادر بود شاخص گال را به عنوان یکی از شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد کاهش دهد. این عصاره بر روی میزان بیان ژن‌های دفاع پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لایاز تاثیر مثبت گذاشته و افزایش بیان این ژن‌ها را به دنبال داشته است. همان‌طور که در تحقیقات متعدد بارها به اثبات رسیده است برای اینکه گیاه بتواند در برابر عوامل بیماری‌زا از خود مقاومت نشان دهد باید میزان بیان ژن‌های دفاعی خود را در روزها و حتی ساعات ابتدایی بعد از حمله بیمارگر افزایش دهد، از طرفی ما در این تحقیق به وضوح مشاهده نمودیم که عصاره گیاه چریش قادر است به خوبی میزان بیان این دو ژن را در ساعات ابتدایی بعد از حمله بیمارگر افزایش دهد. نتایج این تحقیق نشان داد این عصاره گیاهی علاوه بر این که به صورت مستقیم اثر نماتدکشی دارد می‌تواند با تاثیر بر روی میزان بیان ژن‌های دفاعی، باعث القای آن‌ها و افزایش مقاومت گیاه در برابر بیمارگرهای

تغذیه، ۳) افزایش سمیت. افزایش سطح فعالیت پراکسیداز آنیونی در گوجه فرنگی مقاوم پس از مایه زنی با نماتد اثبات شد و نشان داده شده است که، ژن P7X مسئول سنتز پراکسیداز مقاومت به نماتد مولد گره ریشه را در لاین اصلاح شده ذرت MP307 القا می‌نماید. پراکسیدازها در فرآیند ساختن دیواره سلولی مثل اکسیداسیون فنل، سوپرینی کردن و لیگنینی شدن سلول گیاهی در حین دفاع بر علیه عامل بیماری‌زا شرکت دارند. آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مثل پراکسیداز، سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز، ترکیباتی مثل H_2O_2 را به آب تبدیل می‌کنند (۳۹).

بیمارگر سفیدک سطحی خیار *Sphaerotheca fuliginea*، *Pseudomonas syringaepv pisi* و سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم‌های کیتیناز، بتا ۱، ۳ گلوکاناز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و PAL را در بافت‌های برگ توتون ۲ تا ۳ روز پس از مایه زنی افزایش می‌دهند. همچنین این آنزیم‌ها با تیمار عصاره گیاهان مختلف و اتیلن فعال شدند. برخی مطالعات نشان می‌دهند که کاهش مقاومت (در دماهای مختلف) می‌تواند با کاهش ترکیبات فنلی، PAL و فعالیت POX مرتبط باشد. کاهش سطح این آنزیم‌ها و سوپستراهایشان توانایی دفاع فعال را در سلول کاهش داده و گیاه را برای حمله بیمارگر مستعد می‌سازد (۴۰).

مشخص شده است که افزایش فعالیت POX با القای مقاومت سیستمیک در خیار و توتون در مقابل بسیاری از بیمارگرها مرتبط می‌باشد (۴۱).

در واقع می‌توان گفت که تجمع پراکسیداز اغلب با شروع القا مقاومت ارتباط دارد. این آنزیم در دفاع علیه پاتوژن‌ها بسیار فعال عمل می‌کند. در گیاهانی که دفاع خیلی دیر اتفاق می‌افتد، پاتوژن به راحتی بافت گیاه را کلونیزه می‌کند (۴۲).

پراکسیداز در ترکیبات ساختاری دیواره سلولی و پلی مریزاسیون لیگنین باعث سفت شدن دیواره سلولی می‌شود، در نتیجه سدهای مکانیکی افزایش یافته و

graminicola. Scientia agriculturae bohemica, 2016; 47(1): 1-8.

7. Gholamnezhad J. Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. Journal of Integrative Agriculture. 2018; 17(0): 1-10.

8. Cristobal-Alejo J, Tun-Suarez JM, Moguel-Catzin S, Marban-Mendoza S, et al. In vitro sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants, Nematropica. 2006; 36(1): 89-96.

9. Wang X, Tang C, Zhang G, Li Y, et al. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striifonnis* f. sp. *tritici*. BMC genomics. 2009; 10: 289-304.

10. Schaffrath U, Zabbai F, Dudler R. Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. European Journal of Biochemistry. 2000; 267(19): 5935-5942.

11. Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi goltapeh E, Safaei N, et al. Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by *Mycosphaerella graminicola*, Iranian Journal of Plant Biology. 2016b; 8(30): 43-55.

12. Eisenback JD. Detailed morphology and anatomy of second_stage juveniles, males, and females of the genus *Meloidogyne*(Root_knot nematode). Biology and control. 1985; 1: 47-77.

13. Hussian SI, Masood A. Effects of some plant extracts on larval hatching of *Meloidogyne incognita*; Acta Bot. 1976; 3: 142-146.

14. Ranjitsingh KN, Sucheta KR. Effect of root extracts to control root knot nematode (*Meloidogyne* spp) of Soybean (*Glycine max*). Biological Forum- An International Journal. 2009; 1(1): 65- 68.

15. Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, et al. Functional analysis of the Arabidopsis PALgene family in plant growth, development, and response to

گیاهی شود، لذا پیشنهاد می شود که بر روی شناسایی مواد موثره این ترکیب و همچنین ایجاد فرمولاسیون های قابل استفاده به وسیله کشاورزان بیشتر مطالعه شود.

با توجه به نتایج این تحقیق می توان عصاره گیاه چریش را به عنوان یک ترکیب صددرصد طبیعی با خاصیت ضد نماتدی بالا معرفی نمود و بعد از رسیدن به فرمولاسیون مناسب به صورت یک محصول قابل عرضه آنرا وارد بازار نمود.

منابع

1. Ahmadi K, Gholizadeh H. Ebadzadeh H. Husseinpoor R. Hatami F. Fazli B. Kazemian A. and Rafiei M. Annual Agricultural Statistical Yearbook of Iran. Field Crops. Publication of Ministry of Jihad-eAgriculture of Iran. 2015; 1(2): 1-398. (amar.maj.ir).

2. Kayani MZ, Mukhtar T, Hussain MA. Evaluation of nematicidal effects of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*. Crop Prot. 2012; 39: 52-56.

3. Naserinasab F, Sahebani NA, Etebarian HR. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on Tomato. African Journal of Food Science. 2011; 5(3): 276 – 280.

4. Trudgill DL, Blok VC. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. Annual Review of Phytopathology. 2001; 39: 53-77.

5. Gholamnezhad J. Effect of plant extracts against apple gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Applied Microbiology in Food Industry. 2017; 3(4): 41-54.

6. Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi goltapeh E, Safaei N, et al. Effect of salicylic acid on enzyme activity in wheat in immediate early time after infection with *Mycosphaerella*

- environmental stress. *Plant Physiology*. 2010; 153(4):1526–1538.
16. Livak KL, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *METHODS*. 2001; 25(4): 402–408.
17. Kamalwanshi RS, Khan A, Srivastava AS. Reaction of tomato germplasm against root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Indian Journal of Nematology*, 2004; 34(1): 94-95.
18. Mokhtari F, Olliae M. Biological containment of native root nematode (*Meloidogyne javanica*) using isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* in tomatoes. *Plant protection*. 2015; 37(3): 85-104.
19. Stafford HA, Galston AW. Ontogeny and hormonal control of polyphenoloxidase isoenzymes in tobacco pith. *Plant Physiol*. 1970; 46(6): 763-767.
20. Stampar F, Solar A, Hudina M, Veberic R, et al. Traditional walnut liqueur-cocktail of phenolics. *Food Chemistry*. 2006; 95: 627–631.
21. Singh HP, Batish DR, Kaur S, Kohli RK. Phytotoxic interference of *Ageratum conyzoides* with Wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2003; 189(5): 341-346.
22. Batish DR, Kaur M, Singh HP, Kohli RK. Phytotoxicity of a medicinal plant, *Anisomeles indica*, against *Phalaris minor* and its potential use as natural herbicide in wheat fields. *Crop Protection*. 2007a; 26(7): 948-952.
23. Hosseininejad SA. Effect of neem products, *Azadirachta indica*, on root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, infesting. *Entomology and phytopathology*. 2004; 72(1): 69-89.
24. Rao MS, Reddy PP, Das SM. Effect of integration of *Calotropis procera* leaf and *Glomus fasciculatum* on the management of *Meloidogyne incognita* infesting tomato. *Nematol. Medit*. 1996; 24: 59-61.
25. Javed N, Gowen SR, El-Hassan SA, Inam-ul-Haq M, et al. Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. *Crop Protection*. 2008; 27(1): 36-43.
26. Adegbite AA, Adesiyun SO, Root extracts of plants to control root-knot nematode on edible soybean. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2005; 1(1): 18-21.
27. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. 2010; 3(1): 2-20.
28. Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, et al. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology* 2010; 153(4): 1526–1538.
29. Mandal S. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *African Journal Biotechnology*. 2010; 9(47): 8038–8047.
30. Zacheo G, Orlando C, Bleve Zacheo T. Characterization of anionic Peroxidase in tomato isolines infected by *Meloidogyne incognita*. *J. Nematology*. 1993; 25: 249-256.
31. Panina Y, Frave DR, Baker CJ, Shcherbakova LA, et al. Biocontrol and plant pathogenic *Fusarium oxysporum*-induced changes in phenolic compounds in tomato leaves and roots. *Journal of Phytopathology*. 2007; 155(7-8): 475-481.
32. Peltonen S, Karjalainen R. Phenylalanine ammonia-lyase activity in barley after infection with *Bipolaris sorokiniana* or treatment with its purified xylanase. *Journal of Phytopathology*. 1995; 143: 239-245.
33. Sahebani N, Hadavi NS, Omranzadeh F. The effects of β -amino-butyric acid on resistance of cucumber against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Acta Physiol Plant*. 2011; 33(4): 443–450.
34. Chang DS, Kuo YC, Chen TY. Productivity measurement of the manufacturing process for outsourcing decision: the case of a Taiwanese printed circuit board manufacturer. *Int J Prod Res*. 2008; 46(24): 6981-6995.

35. Chandru HK, Kim E, Kuk Y, Cho K, et al. Kinetics of wound- induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth stages, *Plant Sci.* 2003; 164(6): 935-941.
36. Gholamnejad J, Etebarian HR, Roustae A, Sahebani N. Biological control of apple blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Plant Protection research*, 2009; 49(3): 270-275.
37. Prusky D. Mechanism of resistance of fruits and vegetables to postharvest diseases. In: Bartz, J., Brecht, J., (Eds), *Postharvest Phisiology and Pathology of Vegetables*; 2003; 581-598.
38. van Loon LC, RepMand CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annul Review Phytopathology.* 2006; 44: 135-162.
39. Gong M, Li Y, Dai X, Tian M, et al. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of HS inuced thermotolerance in maize seeding, *Journal of Plant Physiology.* 1997; 150(5): 615-621.
40. Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi goltapeh E, Safaei N, et al. Evaluation of housekeeping gene expression of wheat interaction against *Mycosphaerella graminicola* with Reverse northern dot blot method. *Crop Biotechnology.* 2016; 12:1-10.
41. Yu Q, Tsao R, Chiba M, Potter J. Elucidation of the nematicidal activity of bran and seed meal of oriental mustard (*Brassica juncea*) under controlled conditions. *J Food Agric Environ.* 2007; 5(3-4): 374–379.
42. Kuc J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur J Plant Pathology*, 2001; 107(1): 7-12.
43. Durner J, Shah J, Klessig DF. Salicylic acid and disease in plants. *Trends Plant Sci.* 1997; 2(7): 266–274.
44. Campos AD, Ferreira AG, hamper MMV, Antune HF, et al. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic caid and *Colletotrichum lindemathianum* in common bean. *Plant Physiology.* 2004; 12: 961-970.
45. Vivekananthan R, Ravi M, Ramanathan A. Pre-harvest application of a new biocontrol formulation induces resistance to post-harvest anthracnose and enhances fruit yield in mango. *Phytopathol Mediterr.* 2006; 45: 126–138.

Investigation of the defense genes expression of Phenylalanine Ammoniumase and Peroxidase in interaction with *Azadirachta indica* extract in tomato infected with *Meloidogyne javanica*

Naserinasab F, Ph.D.¹, Heydari R, Ph.D.^{2*}, Sanjarian F, Ph.D.³, Rakhshandehroo F, Ph.D.¹

1. Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran
2. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Agriculture Biotechnology Institute, National Institute of Genetic Engineering and Research Biotechnology, Tehran, Iran

* Email corresponding author: rheydari@ut.ac.ir

Received: 19 Dec. 2018

Accepted: 24 Feb.2019

Abstract

Aim: The aim of this research was to investigate the effects of different concentrations of *Azadirachta indica* (neem) aqueous extract on the expression of the encoding genes of the two phenylalanine ammonialysis and peroxidase enzymes in tomato (Matin and Early Urbana cultivars) in the interaction with root knot nematode caused by *Meloidogyne javanica*.

Material and methods: The tomato seedlings were inoculated in the 4-6 leafed stages with different concentrations of the neem extract and then incubated with the pathogen. The plants sampling were at six time points (0, 12, 24, 96, 192 and 288 hours) after pathogen inoculation. The gene expression of the defense enzymes was investigated using the Real-time PCR techniques.

Results: In both cultivars, the gene expression of POX and PAL enzymes in the combined treatment of the pathogen nematode and the aqueous neem extract had increasing trend with significant difference with the control. In Matin cultivar, the increase of the gene expression was higher and faster than of Early Urbana cultivar, so that the expression of PAL and POX genes in this cultivar was 18.2 and 14.5 times more than the control. In the early Urbana cultivar, the highest rate of PAL gene expression was observed at 19.2 hours and was 7.5 times, and in the case of POX gene at 96 hours and 3.9 times when it was compared with control. In greenhouse experiments, the nematode pathogenicity indexes showed a significant decrease compared with the Early Urbana cultivar.

Conclusion: According to the results, in order to protect the plant against the invasions of the patients, the expression of the defensive genes should be increased at the earliest stages after the inoculation of the patient. Early increase in expression of genes in the seedlings treated with neem extract seems to be a justifiable phenomenon in the plant resistance to the pathogenic agent.

Keywords: Gene expression pattern, *Meloidogyne javanica*, Neem extract, Peroxidase, Phenylalanine ammonia-lyase, tomato