



## بررسی اثر تلفیقی سالیسیلیک اسید و قارچ *Trichoderma harzianum* BI بر مقاومت گیاه گوجه فرنگی علیه نماتد گره‌زای ریشه *Meloidogyne javanica*

فاطمه ناصری نسب<sup>۱\*</sup> - نوازله صاحبانی<sup>۲</sup> - حسن رضا اعتباریان<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۸

### چکیده

در این مطالعه اثر استفاده از کاربرد توأم سالیسیلیک اسید به عنوان محرک مقاومت و قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* BI بر بیماری ناشی از نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* روی گیاه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y در گلخانه و آزمایشگاه بررسی شد. گیاهچه‌ها در مرحله ۶ برگی توسط سالیسیلیک اسید با غلظت ۵ میلی مولار، سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* BI با غلظت ۱۰۶ اسپور در میلی لیتر و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال سن دو نماتد مایه زنی گردید. در بررسی گلخانه ای، میزان بیماری در تمامی تیمارهای تلفیقی به‌طور معنی دار ( $P < 0/05$ ) در مقایسه با شاهد کاهش یافت. میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و مقدار فنل کل ریشه طی روزهای اول تا هشتم پس از مایه زنی با نماتد اندازه‌گیری شد. استفاده از تلفیق سالیسیلیک اسید و عامل آنتاگونیست باعث افزایش معنی دار میزان فنل کل و میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در مقایسه با شاهد شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و نیز بیشترین میزان فنل کل که به ترتیب  $0/68 \mu\text{g/ml}$  و  $0/84 \mu\text{g/g}$  بود در روز چهارم پس از مایه زنی با نماتد مشاهده شد. در بررسی آزمایشگاهی سالیسیلیک اسید و عامل آنتاگونیست به ترتیب با  $33/96$  و  $66/4$  درصد افزایش مرگ و میر لاروهای سن ۲ نماتد دارای اختلاف معنی دار با شاهد بودند. همچنین *T. harzianum* BI درصد تفریح تخم‌های نماتد را به میزان ۸۴ درصد کاهش داد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که تلفیق *T. harzianum* BI و سالیسیلیک اسید علیه نماتد مولد گره ریشه، می‌تواند در مدیریت این بیماری در شرایط گلخانه روی گیاه گوجه‌فرنگی بسیار مؤثر واقع شود.

واژه‌های کلیدی: *T. harzianum* BI، سالیسیلیک اسید، کنترل بیولوژیک، *M. javanica*

### مقدمه

(۲۲)، در جهت کنترل نماتدهای انگل گیاهی به کار گرفته می‌شوند. در خاک‌های ایران *Trichoderma harzianum* از بهترین آنتاگونیست‌ها شناخته شده است که پتانسیل بالایی در کنترل بیماری‌های خاکزاد، برگی، پس از برداشت و غیره دارد. این آنتاگونیست دارای پتانسیل بالقوه در کنترل نماتد مولد گره ریشه بوده و مکانیسم القا مقاومت این قارچ علیه بسیاری از بیمارگرها از جمله نماتدها اثبات شده است (۳۲). شارون و همکاران نشان دادند که در خاک‌های آلوده به نماتد *Meloidogyne spp.* رشد گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با جدایه *T. harzianum* 203 افزایش یافته و گال‌های ریشه در مقایسه با شاهد به میزان قابل توجهی کاهش یافته است (۳۲). طبق نتایج آتی تالا و همکاران حضور یا غیاب ژن‌های مقاومت عامل تعیین کننده در مقاومت حاصله نسبت به عوامل بیماریزا نیست، بلکه سرعت و مقدار بیان این ژن‌ها و میزان تأثیر این ترکیبات روی پاتوژن است که سبب واکنش سازگاری یا ناسازگاری می‌شود. احتمالاً همه گیاهان پتانسیل ژنتیکی برای القا ژن‌های مقاومت را به‌صورت بالقوه

نماتدهای مولد گره ریشه شامل گونه‌های جنس *Meloidogyne* با توجه به وسعت انتشار و دامنه وسیع میزبانی، مهم‌ترین نماتدهای خسارت زای کشاورزی در جهان هستند (۲۷). کنترل نماتد مولد گره ریشه به‌دلیل دامنه وسیع میزبانی، دوره کوتاه چرخه زندگی، تولید مثل زیاد و نیز انگل داخلی بودن آن دشوار می‌باشد (۲۱).

به‌دلیل مشکل بودن مدیریت و مبارزه شیمیایی نماتدها، محققان به دنبال دستیابی به راه‌های مناسب کنترل این نماتد هستند. در سال‌های اخیر روش کنترل بیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است (۳۲). عوامل بیوکنترل مختلفی از جمله تعدادی از آنتاگونیست‌های قارچی

۱، ۲ و ۳ - دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان  
\* - نویسنده مسئول: (Email: Fnaserinasab63@gmail.com)

بیماری در گلخانه و بررسی تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز و میزان فنل کل در ریشه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y و همچنین بررسی تأثیر مستقیم عامل آنتاگونیست و غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر تخم و لارو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### عامل بیماری

ریشه‌های آلوده به نماتد مولد گره ریشه از گلخانه‌های خیار و گوجه فرنگی منطقه پیشوای ورامین جمع آوری شد. تکثیر نماتد با روش Single egg mass روی رقم ارلی اوربانا وای انجام شد و شناسایی گونه نماتد مطابق کلید چسبون صورت گرفت (۱۷). پس از چندین دوره تکثیر متوالی نماتد، جمعیت کافی نماتد *M. javanica* ایجاد شد. استخراج تخم و لارو سن دو با استفاده از روش Hussay & Barker انجام شد (۱۵).

### آنتاگونیست

جدیاه *T. harzianum* BI از آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران پردیس ابوریحان به صورت خالص تهیه و پس از تک اسپور کردن، روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) تکثیر شد (۱۱). پس از تهیه سوسپانسیون اسپور در آب مقطر با استفاده از لام هماسیتومتر (لام گلبول شمار) غلظت موثر ۱۰<sup>۶</sup> اسپور در میلی لیتر قارچ جهت استفاده در آزمایشات تهیه شد (۳).

### محرک شیمیایی

از سالیسیلیک اسید ساخت شرکت Merck با غلظت ۵ میلی مولار استفاده شد (۱۸).

### آزمون بررسی اثر مستقیم غلظت‌های مختلف

#### سالیسیلیک اسید بر مرگ و میر لارو سن ۲ نماتد

در این آزمایش ۱ میلی لیتر از هر یک از غلظت‌های مورد نظر در ظروف استریل ریخته شد و سپس تعداد ۱۰۰ لارو فعال نماتد به هر ظرف اضافه شد و به مدت سه روز در دمای اتاق نگهداری شد و پس از آن مرگ و میر لاروها مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار (غلظت‌های ۴، ۵، ۷ میلی مولار SA و تیمار با آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد) و ۶ تکرار انجام شد (۲۵).

دارند، گیاهان می‌توانند چنین پتانسیلی را به‌صورت ایمنی بعد از تلقیح بوسیله جمعیت پائین پاتوژن، تلقیح بوسیله جدیاه‌های غیر بیماریزای پاتوژن، تیمار با مواد شیمیایی که به‌عنوان القاگر محسوب می‌شوند و مواد شیمیایی که الیستینور آزاد می‌کنند، بروز دهند (۹). اسید سالیسیلیک یک ترکیب فنلی است که نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان از جمله القاء پاسخ‌های دفاعی گیاهی علیه پاتوژن‌ها دارد (۳۰). در سال ۱۹۶۰، اورت و وان آندل برای اولین بار مقاومت القاء شده در گوجه فرنگی را در مقابل *Phytophthora infestans* در اثر تیمار با بتا‌آمینوبوتیریک اسید (BABA) نشان دادند (۲۸). استفاده از تلفیق سه عامل بیوکنترل قارچی *T. harzianum*، *T. hamatum*، *Paecilomyces lilacinus* و دو محرک مقاومت شامل: Salicylic acid و Bion علیه پاتوژن‌های قارچی ریشه پنبه (*Fusarium oxysporum*، *Pythium debaryanum*) توانست سبب کاهش معنی دار شدت بیماری و همچنین افزایش معنی دار لیگنین و ترکیبات فنلی در مقایسه با شاهد شود (۷). ترکیبات فنلی به همراه سایر آنزیم‌ها و مواد دفاعی نظیر پراکسیدازها، پلی فنل اکسیداز در مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی خصوصاً نماتدها به صورت سیستمیک دخالت دارند و در مقدار و میزان این مواد در میزبان تغییراتی پدید می‌آید (۲۶). اغلب محققان معتقدند که برخی ترکیبات فنلی از جمله سالیسیلیک اسید، علاوه بر نقش مستقیم آن در القا مقاومت، نقش سیگنال در مقاومت سیستمیک و نقش محرک در بروز مقاومت بویژه القاء پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی و افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز را ایفا می‌کند (۳۶). PAL از وقایع کلیدی کنترل کننده سنتز فنیل پروپانوئیدهاست، بنابراین مرحله کلیدی در بیوسنتز فلاونوئیدها، لیگنین‌ها، استیلبنها و بسیاری ترکیبات دیگر می‌باشد. افزایش فعالیت PAL اغلب به‌عنوان واکنش دفاعی گیاهان به حمله بیمارگر ذکر شده است که پس از آلودگی با بیمارگر یا زخم افزایش معنی داری نشان می‌دهد. افزایش فعالیت PAL را می‌توان به‌عنوان مارکر بیوشیمیایی مقاومت در نظر گرفت، این آنزیم کلیدی ضروری برای سنتز فنل‌های مربوط به مقاومت است (۲۰). تغییر در میزان PAL از جمله معیارهای تعیین میزان سنتز لیگنین می‌باشد. بنابراین مطالعه PAL می‌تواند به‌عنوان معیار کیفی واکنش دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرها باشد. در گیاهچه‌های سورگوم مایه زنی شده با *Peronosclerospora sorghi* (Weston & Uppal) Shaw تجمع زیاد PAL mRNA در کولتیوارهای مقاوم در مقایسه با کولتیوارهای حساس مشاهده شده است (۳۴).

هدف از انجام این تحقیق استفاده از *T. harzianum* BI و سالیسیلیک اسید به‌منظور به کارگیری همزمان توان بیوکنترلی قارچ عامل آنتاگونیست و تحریک سیستم دفاعی گیاه توسط محرک شیمیایی، علیه نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* ارزیابی میزان

۲۰۰۰ لارو فعال نماتد به ازاء هر گیاه مایه زنی شدند. تیمارها شامل: (۱) شاهد: گیاه مایه زنی شده با نماتد (N)، (۲) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ به صورت روش خیساندن ریشه و سالیسیلیک اسید به روش خیساندن خاک (Trd+SAsd+N)، (۳) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ به روش خیساندن ریشه و سالیسیلیک اسید به روش اسپری روی برگها (Trd+SAsp+N)، (۴) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ و سالیسیلیک اسید به روش خیساندن خاک (Tsd+SAsd+N) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ به روش خیساندن خاک و سالیسیلیک اسید به روش اسپری روی برگها (Tsd+SAsp+N) بودند. برای کاهش اثر سوء سالیسیلیک اسید بر گیاه (اثر سوزندگی) تنها برگهای پائینی و مسن تر گیاه اسپری شدند. گیاهچهها پس از مایه زنی به مدت ۴۵ روز در شرایط مساعد گلخانه (دمای ۲۴-۲۸ درجه سانتی گراد، ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور) نگهداری شدند و پس از آن ریشهها برای بررسی بیماری از شاخصهای تعداد گال ایجاد شده، متوسط قطر بزرگترین گالها، تعداد توده تخم به ازاء هر گیاه و تعداد تخمهای درون هر توده تخم جهت بررسی بیماری استفاده شد) به آزمایشگاه منتقل شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۶ تکرار انجام شد.

#### ارزیابی تغییرات برخی ترکیبات دفاعی در ریشه گوجه

فرنگی مایه زنی شده با نماتد، قارچ *T. harzianum* BI و سالیسیلیک اسید

در این آزمایش نیز همانند آزمایش قبل گیاهچههای گوجهفرنگی تهیه، و در مرحله ۶ برگی مایه زنی گردیدند. گیاهچهها توسط مقدار ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ *T. harzianum* BI (در روش خیساندن خاک) با غلظت ۱۰<sup>۶</sup> اسپور در میلی لیتر، ۲۵ میلی لیتر محلول اسید سالیسیلیک ۵ میلی مولار (در روش خیساندن خاک) و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال نماتد به ازاء هر گیاه مایه زنی شدند. تیمارها شامل (۱) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ به روش خیساندن ریشه و سالیسیلیک اسید به روش اسپری روی برگها (Tsd+ SAsp+ N)، (۲) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ به روش خیساندن ریشه (Tsd+ N) گیاه مایه زنی شده با نماتد، سالیسیلیک اسید به روش اسپری روی برگها (SAsp+N) (۴) گیاه مایه زنی شده با نماتد (N) (۵) گیاه مایه زنی شده با آب مقطر استریل (H). برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. آزمایشات به صورت طرح فاکتوریل ۴×۸ که فاکتور A شامل ۴ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل ۸ زمان نمونه برداری ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ روز بعد از مایه زنی با نماتد بود در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و میزان تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز و نیز تغییرات میزان فنل کل در روزهای اول تا هشتم مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون اثر مستقیم *T. harzianum* BI روی مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه در این آزمایش از کشت ۱۰ روزه قارچ روی محیط آب آگار (که از محیط PDA بر روی محیط آب آگار منتقل شده بود) استفاده شد و سوسپانسیونی از لاروهای تازه تفریح شده و استریل نماتد با جمعیت حدود ۲۰-۳۰ لارو در یک میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه و به تشتکهای پتری اضافه شد و سپس در ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد و به ترتیب پس از گذشت زمانهای ۴۸ و ۹۶ ساعت میزان مرگ و میر لاروها در ظروف کشت تیمار و شاهد شمارش شد. ظروف کشت فاقد قارچ به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. این آزمایش با ۶ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد (۱۶).

#### آزمایش اثر مستقیم قارچ *T. harzianum* BI روی تفریح تخم نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه

در این آزمایش پلاکهای ۵ میلی متری از کشت ۷ روزه قارچ *T. harzianum* BI در وسط ظروف کشت حاوی آب آگار دو درصد قرار داده شد و پس از پوشیده شدن سطح پتری با قارچ (پس از ۱۰ روز)، یک میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی جمعیت ۴۰-۵۰ تخم نماتد استریل شده توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت یک دقیقه به تشتکهای پتری اضافه شد. به پتریهای شاهد نیز که فاقد قارچ بودند به همان میزان سوسپانسیون تخم اضافه شد. سپس پتری ها به مدت ۱۴ روز در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد و بعد از گذشت این زمان تعداد تخمهای تفریح شده در تیمار و شاهد شمارش شد. این آزمایش با ۶ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد (۱۶).

#### بررسی اثر تلفیق *T. harzianum* BI و اسید سالیسیلیک بر میزان بیماری ناشی از نماتد مولد گره ریشه در شرایط گلخانه

ابتدا بذور گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y با وایتکس ۱۰ درصد (حاوی ۵ درصد هیپوکلریت سدیم و به مدت یک دقیقه) ضد عفونی سطحی شد و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر سترون در داخل گلدانهای یک کیلویی حاوی خاک الک شده (شامل هوموس، خاک مزرعه، ماسه با نسبت ۱:۱:۲ و پاستوریزه شده در دمای ۸۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو) کشت گردید. در این آزمایش گیاهچههای گوجه فرنگی در مرحله ۶ برگی توسط مقدار ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ *T. harzianum* BI (در روش خیساندن خاک) با غلظت ۱۰<sup>۶</sup> اسپور در میلی لیتر، ۲۵ میلی لیتر محلول اسید سالیسیلیک با غلظت ۵ میلی مولار (در روش خیساندن خاک) و تعداد

## ارزیابی میزان فنل کل و تهیه محلول پایه غلظت‌های فنل استاندارد

۱۰ میلی‌گرم از اسید کافئیک (Fluka, Germany) در ۵ میلی لیتر متانول خالص حل شده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس مقادیر ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸ میلی لیتر از این محلول جداگانه در لوله‌های آزمایش ریخته و حجم هر لوله با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. به این ترتیب هر ۰/۵ میلی لیتر از محلول در هر یک از لوله‌ها به ترتیب ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰ میکرو گرم اسید کافئیک را داراست. برای صفر کردن دستگاه از محلول فاقد اسید کافئیک استفاده شد (۳۱).

### تهیه منحنی استاندارد فنل

مقدار ۰/۵ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف قبلاً تهیه شده اسید کافئیک را در هفت میلی لیتر آب مقطر ریخته و سپس ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. سه دقیقه بعد از افزودن معرف فولین یک میلی لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به آن اضافه و حجم نهایی محلول با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از گذشت یک ساعت میزان جذب نور در  $\lambda_{max} = 725 \text{ nm}$  اندازه گیری شد. این مراحل به‌طور جداگانه برای هر کدام از غلظت‌های مختلف اسید کافئیک انجام شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر از محلولی که فاقد اسید کافئیک بود و به همان میزان آب مقطر اضافه شده بود استفاده شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین فنل کل عصاره به دست آمده در آزمایش‌ها همانند روش تهیه منحنی استاندارد عمل شد. تنها تفاوت در این بود که از ۰/۵ میلی لیتر عصاره استخراج شده گیاه استفاده شد (۳۱).

### استخراج فنل گیاه

جهت استخراج ترکیبات فنلی یک گرم بافت ریشه گوجه فرنگی، درون هاون چینی و در درون نیتروژن مایع عصاره گیری شد و سپس ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد (pH=۲) به آن اضافه گردید، مخلوط حاصله از دو لایه پارچه لمل عبور داده شد و در شیشه‌های مک کارتی نگهداری شد. در پایان عصاره حاصل در ۴۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی داخل لوله‌ها حاوی ترکیبات فنلی است که از رسوب بافتی جدا شده و جهت آزمایشات بعدی در لوله های درب دار ۱۰ میلی لیتری در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۴).

### ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)

۲ میلی لیتر مخلوط واکنش شامل ۱۸۰۰ میکرو لیتر محلول بافر

تریس اسیدی (Tris-HCl) ۰/۵ مول با pH=۶/۸ و فنیل آلانین ۶ میکرومول که به آن ۲۰۰ میکرو لیتر عصاره گیاهی اضافه شده بود، تهیه گردید. این مخلوط به مدت ۷۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار شد. پس از پایان زمان قید شده با افزودن ۵۰ میکرو لیتر اسید کلریدریک ۵ نرمال به هر لوله، واکنش متوقف شد. مقدار جذب نور برای هر لوله توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در max  $\lambda = 290 \text{ nm}$  اندازه گیری شد (۱۳). برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. تجزیه آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن ( $p < 0.05$ ) مورد مقایسه قرار گرفت.

### تهیه منحنی استاندارد آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز

برای رسم منحنی استاندارد PAL از ماده خالص استاندارد ترانس سینامیک اسید استفاده شد. غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۷، ۱، ۲، ۷ و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر از این ماده در بافر تریس فاقد فنیل آلانین تهیه و میزان جذب نور آن با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. حجم محلول هر لوله با افزودن تریس اسیدی به دو میلی لیتر رسانده شد. میزان جذب نور در هر لوله در طول موج max  $\lambda = 290 \text{ nm}$  اندازه گیری شد. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد.

### نتایج و بحث

در بررسی اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مرگ و میر لارو سن ۲ *M. javanica* در آزمایشگاه غلظت‌های ۳، ۵ و ۷ میلی مولار سالیسیلیک اسید سبب افزایش معنی دار مرگ و میر لاروهای سن ۲ نماتد نسبت به شاهد شد (جدول ۱). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید درصد مرگ و میر لاروهای *M. javanica* نسبت به شاهد افزایش می‌یابد. از آنجا که سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنلی است، به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت آن میزان سمیت محیط برای لاروهای نماتد افزایش یافته و در نتیجه مرگ و میر آن‌ها افزایش می‌یابد. عمرمان زاده در بررسی مشابه گزارش کرد که غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی مولار سالیسیلیک اسید سبب افزایش معنی دار مرگ و میر لاروهای سن دو *M. javanica* در مقایسه با شاهد می‌شود (۱).

در آزمایش اثر مستقیم *T. harzianum* BI روی مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه تریکودرما پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت سبب افزایش معنی دار مرگ و میر لاروها در مقایسه با شاهد گردید (جدول ۲).

میرسد عامل آنتاگونیست در روش خیساندن خاک به نحو موثرتری توان بیوکنترلی خود را بر جلوگیری از پیش روی و نفوذ نماتد به ریشه‌ی گیاه اعمال میکند، زیرا در مقایسه با روش خیساندن ریشه که تنها سطح ریشه توسط اسپورهای قارچ پوشیده می‌شود، در این روش قارچ آنتاگونیست در سطح وسیع تری از خاک اطراف ریشه حضور دارد و در نتیجه بروز خاصیت آنتاگونیستی و ممانعت از تفریح تخم های نماتد و پیشروی لاروهای نماتد به نحو موثرتری ممکن می‌شود.

جدول ۲- درصد مرگ و میر لاروهای نماتد توسط قارچ تریکودرما در شرایط آزمایشگاهی

تیمار	درصد لاروهای مرده بعد از	
	۴۸ ساعت	۹۶ ساعت
*C	۱۱/۲b	۳۳/۹۱b
*T	۵۶/۲۱a	۶۶/۴a

هر تیمار دارای ۶ تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند با هم اختلاف معنی دار دارند (آزمون دانکن (p < ۰/۰۵)). C: شاهد (فاقد آنتاگونیست)، T: تیمار با *T.harzianum* BI

جدول ۳- اثر *T.harzianum* BI بر تفریح تخم‌های *M.javanica* در شرایط آزمایشگاهی

درصد تخم‌های تفریح نشده پس از ۱۴ روز		
C	۲۱ b	* C
T	۸۴a	* T

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند با هم اختلاف معنی دار دارند (آزمون دانکن (p < ۰/۰۵)). C: شاهد، T: تیمار با *T.harzianum* BI.



شکل ۱- پارازیت شدن تخم نماتد *M.javanica* (A)، توسط هیف های قارچ *T. harzianum* BI (B)

این قارچ به‌طور اختصاصی دارای مکانیسم‌های ایجاد ترکیبات ضد نمادی و اثر مستقیم روی لاروهای سن دوم و تخم نماتد می‌باشد، همچنین با کاهش میزان جذب نماتدها توسط ریشه سبب کاهش نفوذ نماتدها به گیاه می‌شود (۳۲). در عین حال تلفیق اثر بیوکنترلی عامل آنتاگونیست با تحریک مقاومت القایی ناشی از محرک شیمیایی سالیسیلیک اسید سبب کاهش معنی دار بیماری در مقایسه با شاهد گردیده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد این دو عامل

جدول ۱- اثر غلظت‌های Salicylic acid بر مرگ و میر لارو سن ۲ *M. javanica* در آزمایشگاه

تیمار	درصد مرگ و میر لاروها
شاهد	۵/۵d
۳ میلی مولار	۱۸/۳c
۵ میلی مولار	۲۸/۵۷b
۷ میلی مولار	۳۳/۹۶a

هر عدد میانگین ۵ تکرار است. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن (p < ۰/۰۵) دارای اختلاف معنی دار می‌باشند.

همچنین *T. harzianum* BI در شرایط آزمایشگاه سبب کاهش معنی دار تفریح تخم‌های نماتد در مقایسه با شاهد شد (جدول ۳، شکل ۱). نتایج آزمایش بیوکنترلی قارچ *T. harzianum* BI علیه نماتد *M. javanica* در آزمایشگاه نشان داد که این آنتاگونیست توانایی پارازیت نمودن تخم نماتد و همچنین لاروهای سن دوم را در محیط کشت داراست که می‌تواند در اثر تولید آنتی بیوتیک و متابولیت‌های ثانویه و تولید برخی آنزیم‌های لیز کننده کوتیکول نماتدها مانند پروتئاز در مقابل لاروهای سن ۲ باشد (۱۹). خان و ساکسنا با بررسی اثر متابولیت‌های تولید شده قارچ *T. viride* بر مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتدهای بیمارگر گیاهی، اثبات کردند که در تیمار قارچ *T. viride*، جدایه p2 که ژن پروتئاز به آن منتقل شده بود اثر خوبی بر مرگ و میر لاروهای سن دوم داشت، بنابراین به نظر می‌رسد که قارچ تریکودرما با ترشح آنزیم پروتئاز باعث لیز شدن دیواره و جلد لارو سن دو نماتد می‌شود (۱۹). در مطالعه مشابهی که توسط الفتح و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد متابولیت‌های خارج سلولی در آزمایش محیط کشت فیلتر شده تریکودرما توانست تا ۳۰ درصد باعث مرگ و میر لارو سن دو نماتد شود (۸). همچنین مهدی خانی و همکاران توانایی جدایه‌های *Trichoderma* را در پارازیت کردن سیست و تخم نماتد سیستی چغندر قند و نیز افزایش وزن تر گیاهچه‌های تیمار شده اثبات کردند (۶). با توجه به وجود کیتین در لایه‌های میانی پوسته تخم نماتد با ضخامت ۰/۴ میکرومتر، به نظر می‌رسد *T. harzianum* BI توسط تولید آنزیم کیتیناز اثر خود را بر بازدارندگی از تفریح تخم‌های نماتد اعمال میکند (۱۲).

در بررسی میزان بیماری ناشی از نماتد مولد غده در شرایط گلخانه تمامی تیمارهای تلفیقی میزان بیماری را (تعداد گال به ازاء هر گیاه، متوسط قطر بزرگترین گال‌های هر گیاه، تعداد کیسه تخم به ازاء هر گیاه و تعداد تخم درون هر کیسه تخم) به‌طور معنی دار در مقایسه با شاهد (تیمار با نماتد) کاهش دادند. تیمارهای تلفیقی: (a) عامل آنتاگونیست به روش خیساندن خاک و سالیسیلیک اسید به صورت اسپری روی برگ‌ها، (b) آنتاگونیست به روش خیساندن خاک و سالیسیلیک اسید به روش خیساندن خاک به‌طور موثرتری بیماری را در مقایسه با شاهد و سایر تیمارها کاهش دادند (جدول ۴). به نظر

دارای اثر سینرژیستی بر فعالیت یکدیگر می‌باشند و استفاده توأم از آن‌ها با توجه به اثر مستقیم جدایه آنتاگونیست بر نخم و لارو نماتد و محدود کردن نفوذ نماتد از طرفی و تلفیق آن با اثر غیر مستقیم سالیسیلیک اسید، یعنی تحریک سیستم دفاعی گیاه و در نتیجه آمادگی گیاه برای مقابله با پاتوژن و کاهش توان بیماریزایی آن، می‌تواند به‌طور موثرتری آلودگی به نماتد مولد گره ریشه را کاهش دهد. ملکی زیارتی و همکاران در بررسی اثر غلظت‌های مختلف سویانسیون اسپور جدایه آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* غلظت ۱۰<sup>۶</sup> اسپور بر میلی‌لیتر این جدایه را به‌عنوان موثرترین غلظت در کاهش قطر گال و توده تخم معرفی کردند، غلظت مذکور سبب افزایش میزان فنل کل در ریشه گوجه فرنگی شد (۴). طبق نتایج صدیقی و همکاران در کاربرد تلفیق دو عامل *T. harzianum* و *Pseudomonas fluorescens* به شکل B.sd + F.sd (قارچ به روش خیساندن خاک + باکتری به روش خیساندن خاک) علیه نماتد مولد گره ریشه، این تیمار در وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی تأثیر معنی‌داری نداشت، اما توانست جمعیت نماتد را به میزان معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش دهد (۳۳). در مطالعه دیگری اثر تلفیق دو عامل بیوکنترل *T. harzianum* BI و

*Pseudomonas fluorescens* علیه نماتد *M. javanica* تیمار قارچ به روش خیساندن خاک + باکتری به صورت اسپری روی برگ‌ها به‌عنوان بهترین تیمار معرفی شد، این تیمار علاوه بر کاهش بیماری در گلخانه، سبب افزایش وزن تر ریشه و قسمت‌های هوایی شد. در استفاده دو عامل به‌صورت خاک کاربرد کاهش بیماری به‌طور موثر مشاهده شد، اما این تیمار در افزایش وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی نسبت به شاهد موثر نبود (۲). در مطالعه مشابهی جدایه *Th* از قارچ *T. harzianum* توانست تعداد گال‌ها را بر روی ریشه گوجه فرنگی کاهش دهد (۲۰). همچنین کاهش میزان بیماری ناشی از نماتد *M. incognita* در اثر استفاده از تلفیق *Glomus mosseae*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Bradyrhizobium japonicum* گزارش شده است (۲۹). میزان فنل کل در تیمار تلفیقی (T+SA) در روز اول با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار نداشت، در دومین روز افزایش میزان فنل کل در این تیمار در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد و این میزان تا روز چهارم دارای روند افزایشی بود و پس از آن در حالی که همچنان دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد بود به تدریج رو به کاهش گذاشت.

جدول ۴- اثر استفاده از تلفیق سالیسیلیک اسید (۵mM) و *T.harzianum* BI (غلظت ۱۰<sup>۶</sup> اسپور در میلی‌لیتر) بر میزان بیماری ناشی از *M. javanica* در شرایط گلخانه

تیمار	تعداد گال	قطر گال	تعداد کیسه تخم	تعداد تخم
N	۲۷۳a	۳/۵a	۱۵۶a	۶۱۲a
Trd+SAsp+N	۳۷c	۱/۳۳b	۲۶c	۲۴۷c
Trd+SAsd+N	۶۶b	۱/۳۱b	۳۱b	۳۳۲b
Tsd+SAsp+N	۱۲d	۱/۱ c	۵/۵d	۲۰۲d
Tsd+SAsd+N	۱۴d	۱/۲c	۵/۷d	۲۲۶cd

هر تیمار دارای ۶ تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با هم اختلاف معنی‌دار دارند (آزمون دانکن (p < ۰/۰۵): N: نماتد *M. javanica*; Trd+SAsp+N: تریکودرما (به روش خیساندن ریشه) + سالیسیلیک اسید (اسپری برگ) + نماتد *M. javanica*; Trd+SAsd+N: تریکودرما (به روش خیساندن ریشه) + سالیسیلیک اسید (به روش اسپری روی برگ‌ها) + نماتد *M. javanica*; Tsd+SAsp+N: تریکودرما (به روش خیساندن خاک) + نماتد *M. javanica*; Tsd+SAsd+N: تریکودرما (به روش خیساندن خاک) + سالیسیلیک اسید (به روش خیساندن خاک) + نماتد *M. javanica*

جدول ۵- مقایسه میانگین تغییرات میزان فنل کل (میکروگرم بر گرم ریشه گیاه) در اثر مایه زنی با سالیسیلیک اسید، *T. harzianum* BI و نماتد *M. Javanica*

روزهای بعد از مایه زنی نماتد								تیمار
۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
d۰/۵۳A	cd۰/۵۷A	c/۶۲ AB	a۰/۸A	a۰/۸۴A	b۰/۷۴A	c۰/۶۱A	e۰/۳۷A	T+ SA
e۰/۴۹A	dc۰/۵۶A	c۰/۶B	a۰/۸۱A	b۰/۷۱B	b۰/۶۸B	d۰/۵۴B	f۰/۳۸A	T
e۰/۵۰A	de۰/۵۴A	cd۰/۵۹B	c۰/۶۲B	a۰/۷۵B	b/۶۹ AB	e۰/۵۱BC	f۰/۴۰A	SA
d۰/۳۳B	c۰/۴۰B	a۰/۶۶A	a۰/۶۲B	b۰/۵۱C	b۰/۴۹C	b۰/۴۸C	c۰/۴۱A	N
c۰/۳۴B	ab۰/۴۱B	bc۰/۳۹C	a۰/۴۶C	ab۰/۴۱D	b۰/۴۰D	bc۰/۳۸D	c۰/۳۴۵A	H

هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین‌هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف نشان داده شده‌اند. (آزمون دانکن (P ≤ 0.05): T+ SA: سالیسیلیک اسید (اسپری برگ) و *T. harzianum* BI (خیساندن خاک) و *M. javanica*: *T. harzianum* BI (خیساندن خاک)، و نماتد. SA: سالیسیلیک اسید (اسپری روی برگ). N: نماتد *M. javanica*; H: گیاه سالم.

در تیمار با عامل آنتاگونیست (T) بیشترین میزان فنل کل در روز پنجم مشاهده شد. در روز ۵، ۷ و ۸ اختلاف میزان فنل کل با تیمار تلفیقی معنی دار نبود. بیشترین میزان فنل کل در تیمار با سالیسیلیک اسید (SA)، در روز چهارم پس از مایه زنی با نماد مشاهده شد و پس از آن این میزان به تدریج کاهش یافت. این تیمار بجز روز اول در روزهای بعدی دارای اختلاف معنی دار باشد بود. ملکی زیارتی نشان داد که میزان فنل کل گوجه فرنگی رقم مقاوم King stone پس از تیمار با قارچ *Trichoderma harzianum* BI از روز اول پس از مایه زنی و طی روزهای متوالی با شاهد اختلاف معنی دار داشته و حداکثر میزان آن در روز هشتم بوده، سپس در روز نهم کاهش سریع صورت گرفت (۵). در تیمار مایه زنی شده همزمان قارچ تریکودرما و نماد *M. javanica* نیز میزان فنل کل در روز هشتم بعد از مایه کوبی به حداکثر رسید و سپس به تدریج کاهش یافته است. در ارتباط میزان و عامل بیماریزا و وقتی که ارقام مقاوم و حساس با هم مقایسه می شوند، در بیشتر موارد سرعت تجمع ترکیبات فنلی بعد از ابتلا به بیماری در رقم مقاوم زیادتر از رقم حساس است و یک رابطه خطی مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و مقاومت گیاه وجود دارد (۱۴).

#### بررسی تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز از اولین روز پس از مایه زنی در تیمارهای SA، T+SA، دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها بودند. در روزهای دوم و سوم فعالیت آنزیم در تیمار SA دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها بود، فعالیت آنزیم در این تیمار در روز سوم به بیشترین حد خود رسید و از آن پس رو به

کاهش گذاشت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار تلفیقی در روز چهارم مشاهده شد و پس از آن به تدریج رو به کاهش گذاشت. در تیمار T بیشترین میزان فعالیت آنزیم در روز چهارم مشاهده شد و پس از آن فعالیت آنزیم با شیب ملایمی رو به کاهش گذاشت (جدول ۶).

با توجه به نتایج به دست آمده میزان فعالیت آنزیم در گیاهان تیمار شده با عامل آنتاگونیست و سالیسیلیک اسید (تلفیقی و مجزا) به بیش از دو برابر فعالیت آنزیم در گیاه سالم و گیاه تیمار شده با نماد رسیده است. میزان کم فعالیت آنزیم در گیاهان تیمار شده با نماد در مقایسه با سایر تیمارها (بجز شاهد) را می توان ناشی از عدم القاء سنتز آنزیم در گیاه و یا ممانعت از فعالیت آنزیم توسط نماد دانست. آنزیم PAL توسط عوامل زنده و غیر زنده مختلف القاء میگردد 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 گردد (۳۵). Mitchel & Walters (۲۳) نشان دادند که تیمار برگهای اولیه جو با فسفات پتاسیم منجر به کاهش معنی دار آلودگی برگهای ثانویه به قارچ سفیدک پودری *Blumeria graminis* fsp. *hordei* می گردد. تیمار با فسفات در برگهای اولیه منجر به افزایش معنی داری در فعالیت PAL، پلی فنل اکسیداز (POX) و لیبوکسی ژناز در برگهای ثانویه می گردد. فعالیت های آنزیمی، به ویژه PAL و POX زمانی افزایش یافت که برگهای ثانویه گیاهان تیمار شده با فسفات با سفیدک سطحی مایه زنی گردیدند.

جدول ۶ - مقایسه میانگین تغییرات فعالیت آنزیم PAL (میکروگرم ترانس سینامیک اسید در میلی لیتر عصاره) در اثر مایه زنی با نماد *M. javanica* T: *Trichoderma harzianum* BI و سالیسیلیک اسید در ریشه گوجه فرنگی

تیمار	روزهای بعد از مایه زنی نماد							
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
T+ SA	A-۰/۲۴ f	B-۰/۲۳ e	B-۰/۵۹ b	A-۰/۶۸ a	A-۰/۶۱ b	A-۰/۵۹ b	B-۰/۴۲ c	AB-۰/۳۹ d
T	B-۰/۱۸ f	C-۰/۲۵ e	C-۰/۴۸ c	B-۰/۶۲ a	A-۰/۶۰ a	A-۰/۵۵ b	A-۰/۴۷ c	A-۰/۴۱ d
SA	A-۰/۲۳ g	A-۰/۴۷ d	A-۰/۶۴ a	B-۰/۵۹ b	B-۰/۵۳ c	B-۰/۴۴ d e	B-۰/۴۲ e	B-۰/۳۷ f
N	C-۰/۱۳ e	D-۰/۱۲ e	D-۰/۱۹ d	C-۰/۲۳ c	C-۰/۳۱ a	C-۰/۳۰ a	C-۰/۲۶ b	C-۰/۲۲ c d
H	B-۰/۱۶ d	D-۰/۱۱ e	D-۰/۲ b c	C-۰/۲۵ a	D-۰/۱۷ d	D-۰/۲۳ a b	D-۰/۱۹ c d	D-۰/۱۸ c d

هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف بزرگ و میانگین هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف کوچک مشخص شده اند. (آزمون دانکن  $(P \leq 0.05)$ ): T+ SA: سالیسیلیک اسید (اسپری برگ) و *T. harzianum* BI (خیساندن خاک) و *M. javanica* T: *Trichoderma harzianum* BI (خیساندن خاک)، و نماد. SA: سالیسیلیک اسید (اسپری روی برگ). N: نماد *M. javanica*. H: گیاه سالم.

## نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از جمله کاهش میزان بیماری در شرایط گلخانه و القاء برخی مکانیسم‌های دفاع بیوشیمیایی گیاه، میتوان چنین استنباط کرد که استفاده توأم قارچ آنتاگونیست (غلظت موثر ۱۰<sup>۶</sup>) *T. harzianum* BI به همراه محرک شیمیایی سالیسیلیک اسید با غلظت ۵ میلی مولار سبب افزایش قابل توجه پتانسیل این عوامل در جهت کنترل بیماری ناشی از نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* در شرایط گلخانه میگردد.

بیمارگر سفیدک سطحی خیار *Sphaerotheca fuliginea*، *Pseudomonas syringae* pv *pisi* و سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم‌های کیتیناز، بتا ۱، ۳ گلوکاناز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و PAL را در بافت‌های برگ توتون ۲-۳ روز پس از مایه زنی افزایش می‌دهند. همچنین این آنزیم‌ها با تیمار عصاره گیاهان مختلف و اتیلن فعال گردیدند (۲۳). برا و همکاران بررسی روی گیاه برنج و عامل شیت بلایت *Rhizoctonia solani* انجام دادند. افزایش پنج برابری فعالیت PAL در غلاف‌های برگ مایه زنی شده پس از ۲۴ ساعت بعد از مایه زنی مشاهده گردید که با افزایش زمان مایه زنی میزان آن کاهش یافته است. فعالیت PAL پس از مایه زنی، احتمال دخالت PAL در کاهش بیماری را نشان می‌دهد (۱۰).

## منابع

- ۱- عمران زاده ف. ۱۳۸۶. القاء مقاومت به نماتد مولد گره ریشه (*M. javanica*) در خیار در گلخانه به وسیله برخی محرک‌های شیمیایی و میکروبی. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران.
- ۲- مختاری س. ۱۳۸۶. بررسی کنترل بیولوژیک نماتد مولد غده *Meloidogyne javanica* توسط دو عامل بیوکنترل *Pseudomonas fluorescens* و *Trichoderma harzianum*. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران.
- ۳- ملکی زیارتی ح. ۱۳۸۵. کنترل بیولوژیک نماتد مولد غده ریشه *Meloidogyne javanica* توسط جدایه *Trichoderma harzianum* در گوجه فرنگی و بررسی تغییرات برخی مکانیزم‌های دفاع بیوشیمیایی گیاه. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران.
- ۴- ملکی زیارتی ح.، روستایی ع.، صاحبانی ن.، اعتباریان ح. و امینیان ح. ۱۳۸۸. بررسی امکان کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه گوجه فرنگی *Meloidogyne javanica* (Trube) Chitwood. به وسیله قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai در گلخانه و تغییرات کمی ترکیبات فنلی در گیاه. مجله علوم به زراعی نهال و بذر ۳: (۲).
- ۵- ملکی زیارتی ح.، صاحبانی ن.، رهنما ک. و نوری ن. ۱۳۸۶. اثر قارچ *Trichoderma harzianum* در سیستمیک شدن ترکیبات فنلی ایجاد شده در گیاه گوجه فرنگی علیه نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica*. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۱۴: (۶).
- ۶- مهدی خانی مقدم ع.، روحانی ح. و فلاحی رستگار م. ۱۳۸۸. کنترل بیولوژیک نماتود سیستی چغندر قند *Heterodera schachtii* به وسیله قارچ تریکودرما در آزمایشگاه و گلخانه. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۱۳: (۴۸).
- 7- Abo-Elyousr K. A. M., Hashem M., and Ali E. H. 2009. Integrated control of cotton root rot disease by mixing fungal biocontrol agents and resistance inducers. *Crop Protection*, 28: 295-301.
- 8- Al-Fattah A., Dababat A., and Sikora A. 2007. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the Biological Control of *Meloidogyne incognita* on Tomato. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 3:297-309.
- 9- Attitalla I. H. 2004. Biological and molecular characteristics of microorganism stimulated defense response in *Lycopersicon esculentum* L. Comprehensive Summary of Uppsala Dissertation from the Faculty of Science and Technology, 943, Acta Universitatis Upsaliensis, Sweden.
- 10- Bera S., Purkayastha R. P. 1999. Multicomponent coordinated defence response of rice to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight. *Curr. Sci*, 76, 1376-1384.
- 11- Booth C. 1977. Fusarium laboratory guide to identification of major species. Common wealth mycological Institute. Kew, Surrey, England, (55pp).
- 12- Brants A., Brown C. R., and Earle D. 2000. *Trichoderma harzianum* endochitinase dose not provide resistance to *M. hapla* in tobacco. *Journal of Nematology*, 32: 289-296.
- 13- Chen C., Belanger R. R., Benhamou N., and Paulitz T.C. 2000. Defence enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56: 13-23.



- 14- Goodman R. N., Kiraly Z., and Wood K. P. 1986. Biochemical and physiological aspects of plant disease. University of Missouri Press. 433 pp.
- 15- Hussey R.S. and Barker K.R. 1973. A Comparison of Methods of Collecting Inocula of *Meloidogyne* spp. Including A New Technique. Plant Disease Reporter, 57: 1025-1028.
- 16- Irfan U.D., Saifullah-Hakim K., and Baharullah H. 2005. Biological control of *M. javanica* with *Trichoderma harzianum* and spent mushroom compost in tomato under field conditions. Journal of Nematology, 75:194-198.
- 17- Jepson S.B. 1987. Identification of Root – Knot nematodes. *Cambrian News Ltd*, 847-853.
- 18- Katoch R., Mann A. P. S., Sohal B. S. 2005. Enhanced enzyme activities and induction of acquired resistance in pea with elicitors. Journal of vegetable science, 11:67-83.
- 19- Khan T. A., and Saxena S. K. 1997. Effect of root dip treatment with fungal filters on root penetration, development and reproduction of *M.javanica* on tomato. Journal of Nematology, 7: 85-88.
- 20- Khattak B., Stephen S.M. 2008. Effect of some endogenous isolates of *Trichoderma harzianum* on root knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood .Sarhad J. Agric, 24: 285-288. Crop Protection. 26: 1006–1012
- 21- Manzanilla-Lopez R. H., Kenneth E., & Bridge J. 2004. Plant diseases caused by nematodes. In Z. X. Chen, S. Y. Chen & D. W. Dickson (Eds.), Nematology—advances and perspectives. Volume II: Nematode management and utilization (pp. 637–716). Cambridge, MA: CABI Publishing.
- 22- Meyer S.L.F., Roberts D.P., Chitwood D.J., Carta L.K., Lumsden R.D. and Mao W. 2001. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. Nematropica, 31: 75-86.
- 23- Mitchel A. F., and Walter D. F. 2004. Potassium phosphate induces systemic protection in barely to powdery mildew infection. Pest Management Science, 60: 126-134.
- 24- Mohammadi M., and Kazemi H. 2002. Changes in peroxidase and Polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Journal of Plant Science, 162: 491 – 498.
- 25- Nandi B., Kundu K., Banerjee N., and Babu S.P.S. 2003. Salicylic acid induced suppression of *Meloidogyne incognita* infestation of okra and cowpea. Journal of Nematology, 5: 747 – 752.
- 26- Ogallo J.L., and McClure M.A. 1996. Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematode in tomato. Journal of Phytopathology, 86:498-501.
- 27- Oka Y., Kaltai H., Bareyl M., More M., Sharon E., chet I., and Spiegel Y. 2000. New strategies for the control of plant parasitic nematodes. Pest Management Science, 56: 983-988.
- 28- Oort A. J. P., and Van Andel O.M. 1960. Aspects in chemotherapy. Mededel. Opz. Gent, 25: 961- 992.
- 29- Oyekanmi E.O., Coyne D. L., Fagade O. E., and Osonubi O. 2007. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. Crop Protection, 26: 1006–1012.
- 30- Prithiviraj B., Bis H. P., Jha A. K., and Vivanco J. M. 2005. *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA-dependent, NPR1 independent host responses. Plant Journal, 42: 417 – 432.
- 31- Seevers D. M., Daly J. M., and Catedral F. F. 1971. The role of peroxidase isozyme in resistance to wheat stem rust disease. Journal of Plant Physiology, 48: 353-360.
- 32- Sharon E., Bar-Eyal M., Chet I., Herrera-Esterella A., Keleifeld O., and Spiegel Y. 2001. Biological control of the root\_knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 91: 687-693.
- 33- Siddiqui I. A., and Shaikat S. S. 2004. *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds *in vitro* and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescence* in tomato. Letters in Applied Microbiology, 38: 169-
- 34- Walker J.C. 1981. Fusarium Wilt of Tomato. The American Phytopathological Society. USA.
- 35- Wen P., Chen J. Y., Kong W. F., Pan Q. H., Wan S. B., and Huang W. D. 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. Plant Science, 169: 928-934.
- 36- Yalpini N., Silverman P., and Raskin I. 1991. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus- inoculated tobacco. The Plant Cell, 3: 809-818.