مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۷

بررسی تغییرات بیان ژن‌های دفاعی فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و پراکسیداز در برهم‌کنش با عصاره گیاه چریش در گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتد *Meloidogyne javanica*

فاطمه ناصری نسب .Ph.D[1]، رامین حیدری .Ph.D[2*]، فروغ سنجریان .Ph.D[3]، فرشاد رخشنده رو .Ph.D[1]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی، بیماری شناسی 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 دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۵

چکیده

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

مواد و روش‌ها: به‌این‌منظور، 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، 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 به‌طوری‌که بیان ژن‌های PAL و POX در این رقم به‌ترتیب به‌میزان 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 به‌میزان ۷/۵ برابر، و در مورد ژن POX در زمان ۹۶ ساعت و به‌میزان 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 برای‌این‌که 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 توجیه در مکانسیم مقاومت گیاه در برابر عامل بیمارگر به‌نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: عصاره چریش، الگوی بیان ژن، پراکسیداز، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، *Meloidogyne javanica*

مقدمه

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 به‌مصرف بالای میوه گوجه‌فرنگی می‌توان آن را به‌عنوان یک محصول استراتژیک در کشاورزی مدرن تلقی کرد. در سال زراعی۹۳-۹۲ سطح زیر کشت گوجه فرنگی در ایران۱۵۸۲۲۳ 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 کنندهٔ کیفیت و کمیت تولیدات کشاورزی می‌باشند. محصولاتی مانند گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی، چغندرقند و انواع کدو از مهم‌ترین میزبان‌های این نماتد می‌باشند (۲).

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

کنترل نماتد مولد گره ریشه به دلیل دامنه وسیع میزبانی، دورهٔ 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، ریشه‌کنی میزبان، کنترل بیولوژیک و استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. از جمله اثرات سوء نماتدکش‌های شیمیایی، تاثیر منفی بر سلامت انسان، آلودگی محیط‌زیست و ایجاد مقاومت در نماتدها می باشد. با پیشرفت فن‌آوری،کشورهای پیشرفته توانسته‌اند با به‌کارگیری روش‌های طبیعی، ضمن جلوگیری از تخریب زمین‌های کشاورزی، با اصلاح 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 به‌دلیل 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 آلجو 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 مطالعهٔ بیان ژن در زمان تنش این بیماری و به‌خصوص ژن‌های دفاعی که نقش مهمی را در فرایند پاسخ به تنش در گیاه بازی می‌کنند،

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 می‌نماید (۱۱). در این مطالعه ابتدا تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره میوه چریشبر 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 ۱۲روزه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی: بذور ضدعفونی شده گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا وای و رقم متین به‌ترتیب به‌عنوان ارقام حساس و مقاوم، در گلدان‌های استریل حاوی خاک استریل شامل خاک، ماسه، کود برگ (۱:۱:۲) و مقداری پیت و پرلیت کشت شد و در شرایط مساعد گلخانه (شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد) پرورش داده شد. گیاه‌چه‌ها در مرحله ۴ تا ۶ برگی، جهت انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند.

عامل بیمارگر: ریشه‌های آلوده به نماتد طی نمونه برداری از مزارع و گلخانه‌های کشت گوجه فرنگی استان البرز، جمع آوری شد. تکثیر نماتد به‌روش Single egg mass روی گیاهچه‌های رقم ارلی اوربانا وای انجام و شناسایی مطابق کلید ایسن باخ صورت گرفت (۱۲). جداسازی لارو نماتد از خاک به‌روش سانتریفوژ و جداسازی ماده‌های بالغ به‌صورت 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. میوه‌های گیاه چریش در سایه کاملا خشک و سپس آسیاب شدند. مقدار ۲۵ گرم از پودر تهیه شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر خیسانده و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۱۰۰ rpm روی شیکر تکان داده شد و جهت جدا کردن بقایای گیاهی از پارچه ململ عبورداده شد. سپس به‌مدت۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. عصاره حاصل (۲۵ گرم گیاه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به‌عنوان محلول پایه ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و با رقیق کردن با آب مقطر غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ و ۱۰۰درصد تهیه شد (۱۴).

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

گیاه‌چه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله ۴ تا ۶ برگی به گلدان‌های یک کیلوگرمی منتقل شدند و یک روز پس از انتقال ابتدا هر گیاه‌چه توسط مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های مختلف آبیاری شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت هر گیاه‌چه توسط تعداد ۲۰۰۰ لارو سن دوم تازه تفریخ شده نماتد *M. javanica* مایه‌زنی شد. گیاه‌چه‌های مایه زنی شده با آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

پس از گذشت ۴۵ روز شاخص رشدی بوته‌ها (وزن تر و خشک اندام‌های هوایی) با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گیری شد. وزن خشک با قراردادن ریشه و ساقه در آون به‌مدت پنج روز در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. شاخص گال بر اساس سیستم درجه بندی صفر تا پنج محاسبه شد (۲).

کشت ارقام گوجه فرنگی جهت انجام بررسی‌های آزمایشگاهی و بیان ژن: به‌منظور بررسی اثر عصاره میوه چریش بر بیان ژن‌های دفاعی گیاه، دو رقم ارلی اوربانا وای (رقم حساس) و متین (رقم مقاوم) کشت شدند. بذرهای ضدعفونی شده گوجه فرنگی مطابق شرایط

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 گیاهچه‌های گوجه فرنگی توسط مقدار ۳۰ میلی‌لیتر ازعصاره میوه چریش با غلظت ۷۵ درصد آبیاری شد و ۲۴ ساعت بعد هر گیاه‌چه توسط تعداد۲۰۰۰ لارو نماتد مایه زنی شد.

در آزمایش پس از حمله بیمارگر: ابتدا هر گیاه‌چه توسط تعداد۲۰۰۰ لارو نماتد مایه‌زنی شد و ۲۴ ساعت بعد توسط مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از عصاره میوه چریش با غلظت ۷۵ درصد آبیاری شد.

نمونه‌برداری جهت انجام آزمایش‌های ارزیابی بیان ژن در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴ ساعت و روزهای چهارم، هشتم و دوازدهم بعد از مایه‌زنی بیمارگر و عصاره انجام گرفت و بلافاصله گیاه‌چه‌ها در محل نمونه‌برداری به ظرف نیتروژن مایع منتقل وسپس در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه ذخیره شدند. در مطالعات مربوط به اندازه‌گیری بیان ژن از دو رقم حساس ارلی اوربانا و مقاوم متین و غلظت ۷۵ درصد عصاره آبی گیاه چریش استفاده شد که این نمونه‌برداری‌ها در پنج نقطه زمانی انجام گرفت. در محاسبات گیاه مایه زنی شده با عصاره تنها به‌عنوان 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

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 مایه‌زنی با نماتد و تیمار با عصاره ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی با نماتد)

طراحی آغازگر جهت تکثیر ژن‌های منتخب: در این بررسی میزان بیان ژن‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و پراکسیداز با استفاده از روش Real time-PCR انجام شد.

آغازگرهای اختصاصی برای هر ژن بر اساس بررسی منابع علمی و مقالات به‌دست آمدند. نکات استاندارد درطراحی 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 به‌طور اختصاصی تنها به ژن مورد نظر خود متصل می‌شوند. 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 به‌عنوان الگو در تهیه محصول PCR هر ژن به‌کار رود.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌ها

ردیف	اسامی ژن‌ها		توالی پرایمرها	اندازه محصول	منبع
۱	فنیل آلانین آمونیالیاز	F	5 ACGGGTTGCCATCTAATCTG3	۱۹۷	(Aimé et al., 2013)
		R	5 AGCTCTTTTCCTGGCTGAAA3		
۲	پراکسیداز	F	5TGCAGCATTGACAACACGTA3	۱۱۲	el-Gaied et al.,) (2013
		R	5TCTTCCCATTTTCTCCATCG3		

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).

ژن‌های TeF1α و اکتین به‌عنوان ژن خانه دار (House keeping gene) انتخاب شد. از RNA کل استخراج شده به‌عنوان الگو برای ساخت cDNA استفاده شد. پس از یکسان‌سازی 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 ژن‌ها 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 ۲-ΔΔCT به‌منظور بررسی تغییر بیان ژن استفاده شد (۱۶).

میزان بیان ژن‌های دفاعی منتخب بر اساس ژن TEF-1α (ژن خانه‌دار) با بیان ثابت نرمال شده، سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه تیمارها نسبت به شاهد سنجیده شد.

نتایج به‌دست آمده از Real time -PCR با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال پنج درصد و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

تیمارهای مورد استفاده در این آزمایش به‌صورت زیر می‌باشد:

گیاه‌چه‌های گوجه فرنگی سالم: عدم کاربرد عصاره و نماتد

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

گیاه‌چه گوجه فرنگی مایه‌زنی شده با عصاره و نماتد. (عصاره۲۴ ساعت قبل از مایه‌زنی نماتد استفاده شده است).

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

گیاه‌چه گوجه فرنگی: نماتد+، عصاره.

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

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

آنالیز آماری

آزمون بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره بر مرگ و میر لاروها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد که شامل فاکتورهای A، غلظت و B، زمان بود. سایر آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه دانکن ($p\leq ۰/۰۵$) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

اثر عصاره‌های 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 اندام‌های هوایی گیاه نیز اندازه‌گیری شد.

ارزیابی شاخص گال

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

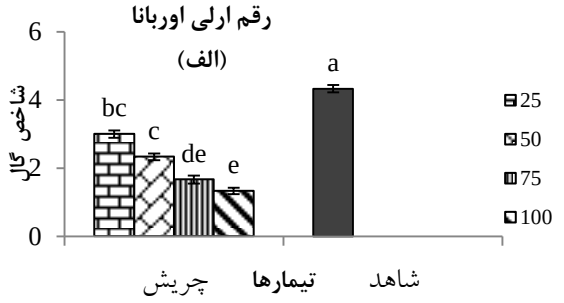
سازی با نماتد، در مورد هر دو رقم متین و ارلی‌اوربانا، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد (p≤ ۰/۰۱) وجود دارد.

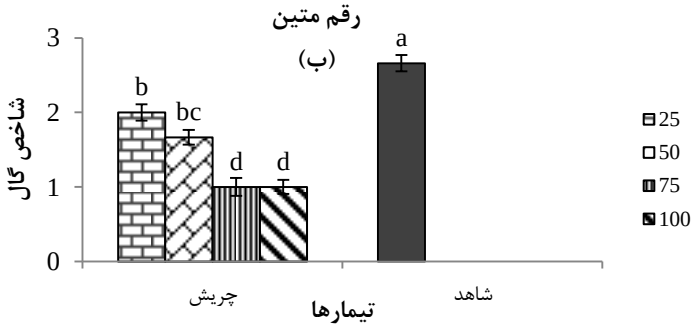
جدول ۲: تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر شاخص گال نماتد *M. javanica* در رقم متین در شرایط گلخانه

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

** به احتمال ۹۹/۹۹ درصد (p ≤ ۰/۰۱) اختلاف معنی دار است، C.V= ٪ ۹/۱۲ (رقم متین)، C.V= ٪ ۷/۳۷ (رقم ارلی‌اوربانا)

در مورد رقم ارلی اوربانا بر اساس نمودار۱، الف کمترین مقدار عددی شاخص گال مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد عصاره چریش با مقدار عددی ۱/۳۳ بود، که این مقدار با غلظت ۷۵درصد عصاره این گیاه دارای اختلاف معنی‌دار نبود. تمامی تیمارها سبب کاهش معنی‌دار شاخص گال در مقایسه با شاهد به میزان ۴/۳۳ شدند. در مورد رقم متین همان‌طور که نتایج مقایسه میانگین انجام شده در نمودار ۱،ب نشان می‌دهد روند مانند رقمارلی‌اوربانا بود، اما شاخص گال در شاهد و همچنین بقیه تیمار ها کمتر از رقم ارلی‌اوربانا بود. بیشترین مقدار عددی شاخص گال (۲) مربوط به غلظت ۲۵ درصد عصاره بود که این مقدار نیز دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد (۲/۶۶) بود. در این رقم تمامی غلظت‌ها دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد بودند، اما دو سطح غلظتی ۷۵ و۱۰۰ درصد عصاره اختلاف معنی‌دار نداشتند.



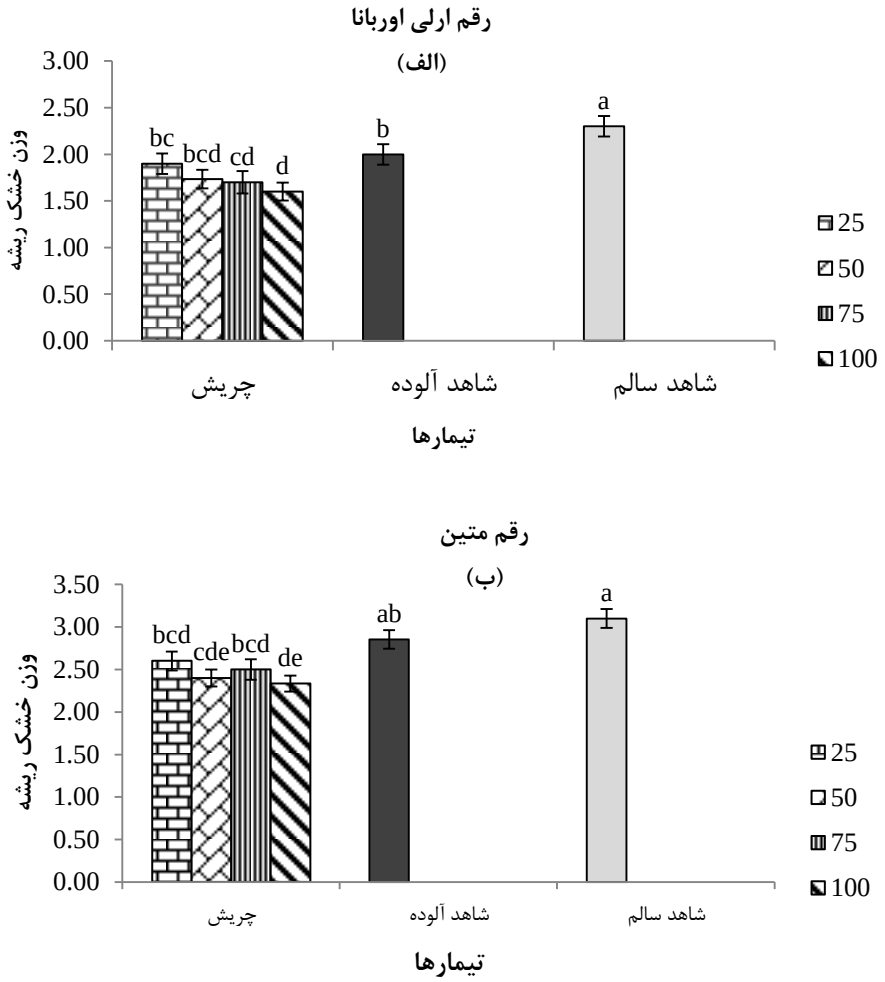


نمودار ۱: مقایسه میانگین اثر تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد عصاره چریش بر شاخص گال نماتد *M. javanica*. رقم ارلی‌اوربانا (الف)و رقم متین (ب) در شرایط گلخانه. هر عدد میانگین سه تکرار است. میانگین‌هایی که با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف مشخص شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن (p ≤ ۰/۰۱) ارائه شده‌اند.

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. همان‌طورکه نمودار نشان می دهد بین تیمار ۱۰۰ درصد و تیمار ۲۵ درصد عصاره چریش از نظر تاثیر بر وزن خشک اختلاف معنی‌داری وجود دارد. تیمار ۱۰۰ عصاره چریش همچنین با شاهد آلوده و سالم نیز دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد، بین سه تیمار (۲۵ درصد، ۵۰ درصد، ۷۵ درصد) اختلاف معنی‌دار وجود نداشت و تیمار ۱۰۰ درصد نیز با تیمار۷۵ درصد و ۵۰ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار 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. همان‌طورکه نمودار نشان می‌دهد بین تیمار ۱۰۰ درصد و سایر تیمارها از نظر تاثیر بر وزن خشک، در رقم متین، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. اما تیمار ۱۰۰ درصد عصاره چریش دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد آلوده و سالم می‌باشد.

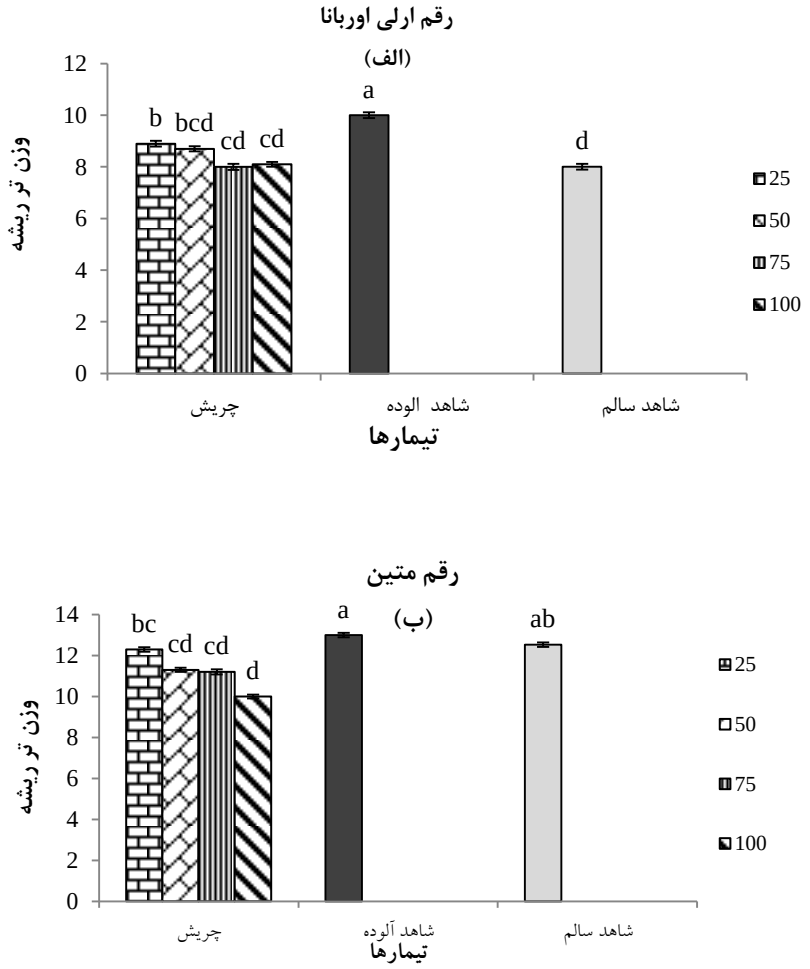


نمودار ۲: مقایسه میانگین اثر غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ درصد عصاره آبی چریش بر وزن خشک ریشه رقم ارلی اوربانا (الف) و متین (ب) در شرایط گلخانه. هر عدد میانگین سه تکرار است. میانگین‌هایی که با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف، مشخص شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($p\leq ۰/۰۱$) ارائه شده‌اند.

وزن تر ریشه

شاهد آلوده در رقم ارلی اوربانا دارای بیشترین وزن تر با مقدار ۱۰ گرم بود، که این میزان با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود. بعد از شاهد آلوده به‌ترتیب بیشترین مقادیر وزن تر ریشه مربوط به تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۷۵ درصد عصاره گیاهی چریش بود. در بین تیمارها فقط تیمار ۲۵ درصد عصاره چریش با دوتیمار ۷۵ و ۱۰۰ درصد عصاره چریش دارای اختلاف معنی‌دار 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 مرتبه‌های 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 معنی‌دار نبود، اما دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود. تیمار ۲۵ درصد عصاره چریش در بین غلظت‌های مختلف این عصاره تنها با تیمار ۱۰۰ درصد عصاره چریش دارای اختلاف معنی‌دار بود (نمودار ۳ ب).



نمودار ۳: مقایسه میانگین اثر غلظت‌های 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. میانگین‌هایی که با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف، مشخص شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن($p\leq$۰/۰۱) ارائه شده‌اند.

بررسی بیان ژن‌ها در برهمکنش گیاه گوجه‌فرنگی با عصاره آبی ۷۵درصد میوه چریش و بیمارگر M. javanica

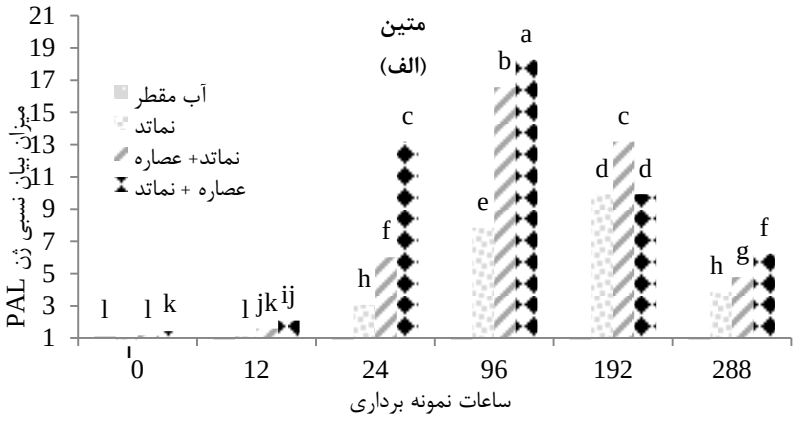
آنالیز و مقایسه الگوی بیان ژن‌های پاسخ دهنده به نماتد بیمارگر هم در سطح ترانسکریپتئومیکس و هم در سطح پروتئومیکس می‌تواند اطلاعات ارزشمندی برای برنامه‌های اصلاحی در اختیار محققین قرار بدهد. هدف از انجام این تحقیق شناسایی ژن‌های درگیر در فرایند دفاعی در گیاه گوجه فرنگی (رقم مقاوم متین و رقم حساس ارلی‌اوربانا) در برهم‌کنش با نماتد بیمارگر *M. Javanica* و عصاره چریش است تا در مطالعات آینده با بررسی بیان ژن‌های القا شونده با تنش این بیمارگر و نیز عصاره‌های گیاهی پایه‌های فیزیولوژیکی واکنش به این تنش شناخته شود.

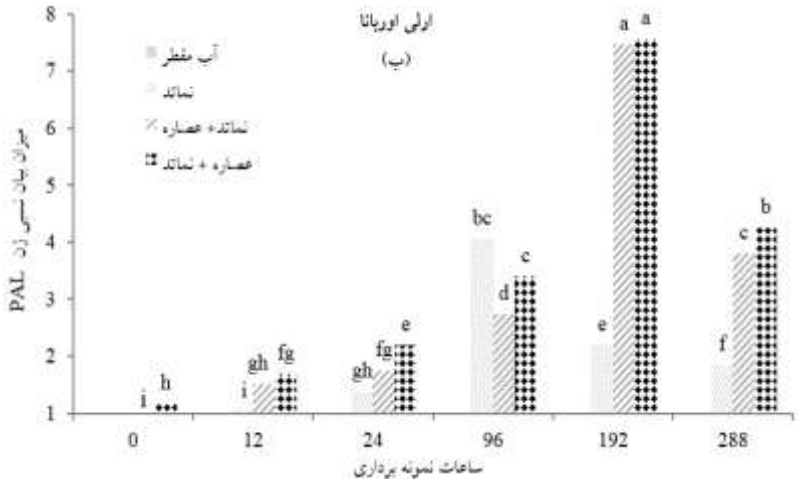
الگوی بیانی دو ژن فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز با استفاده از روش کمی PCR زمان واقعی، بررسی شد. در این تحقیق برای بررسی میزان بیان ژن‌ها از روش کمیت سنجی نسبی استفاده شد. دو ژن مورد مطالعه شامل ژن‌های رمز کننده پراکسیدار و فنیل آلانین آمونیالیاز بودند. نتایج حاصل از بررسی بیان این ژن‌ها در نقاط زمانی مختلف نشان داد که این ژن‌ها در زمان‌های 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 میانگین‌ها به‌صورت نمودار بیان شده است.

فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)

بر اساس نمودار ۳، الف میزان بیان ژن رمز کننده فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز 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 ملاحظه‌ای 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 درچهارمین روز نمونه‌برداری 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 آمونیالیاز به ۱۸/۲ برابر شاهد رسید.

بر اساس نمودار ۳، ب میزان بیان ژن رمز کننده فنیل‌آلانین آمونیالیاز در رقم حساس ارلی‌اوربانا در طول ۱۲ بعد از اولین نمونه‌برداری 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 فنیل‌آلانین آمونیالیاز در روز چهارم به بالاترین مقدار خود رسید و در این زمان با اختلاف معنی‌دار، 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 معنی‌دار با یکدیگر(تقریبا ۷/۵ برابر شاهد) مشاهده شد. مقدار بیان این ژن در همه تیمارها به‌مقدار چشمگیری کمتر از رقم مقاوم متین بود. میزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز 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.





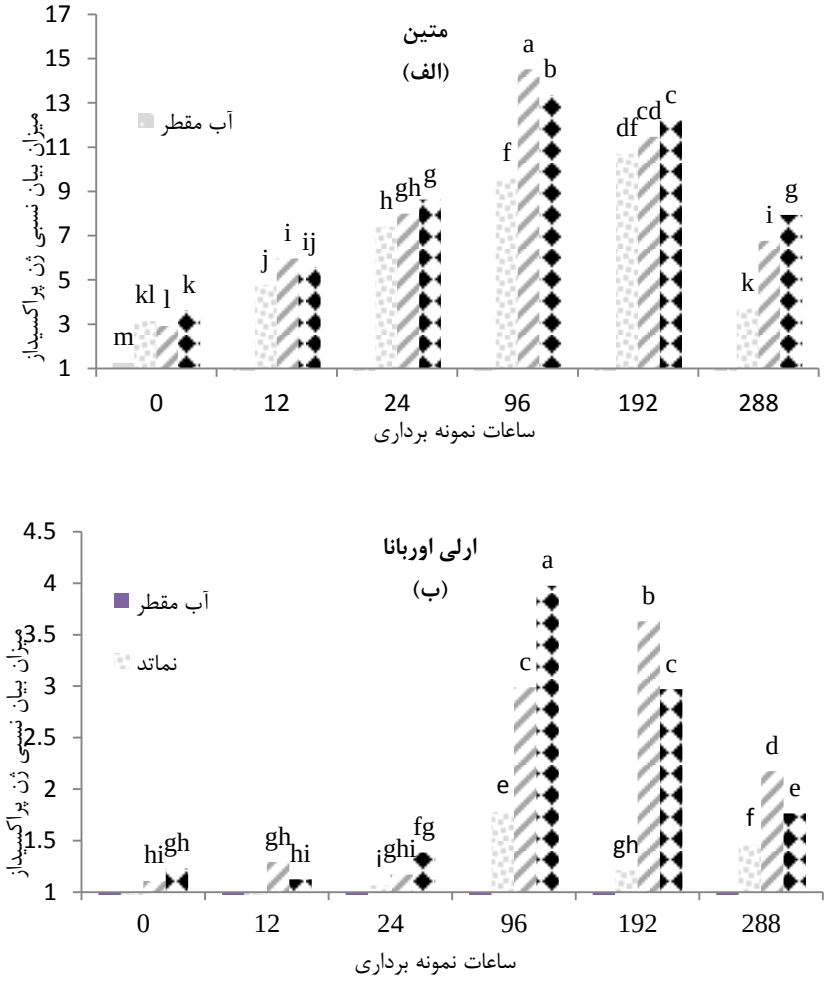
نمودار ۴: الگوی بیان ژن رمزکننده آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در رقم‌های محتمل متین (الف) و حساس ارلی اوربانا (ب) تحت تیمارهای مختلف در نقاط زمانی متفاوت. نماتد به تنهایی، نماتد+ عصاره پس از ۲۴ساعت، عصاره+ نماتد پس از ۲۴ ساعت، گیاه مایه زنی شده با آب مقطر. بیان همه ژن‌ها نسبت به شاهد (تیمار عصاره چریش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

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 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.



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 از۲۴ساعت، 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.

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 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 این‌ترتیب 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. به‌دلیل کاهش طول ریشه جذب مواد غذایی نیز کمتر می‌شود (۱۷).

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 وهمیشه 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 chlamydosporia var. chlamydosporia شماره ۵۰۴، ۱۱۳۱و جدایه همدان تقریبا میزان رشد یکسانی را نشان دادند و از بین این چهار جدایه، جدایه‌ی شماره ۶۷۶ عملکرد کمتری داشت. ریشهٔ گیاهان آلوده به نماتد از وزن بیشتری برخوردار بودند که در این مورد بعد از تیمار نماتد تنها، تیمار جدایه شماره‌ی۶۷۶ بیشترین وزن ریشه را نشان داد. وزن تر و طول شاخساره به‌دلیل 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 به‌رقم ارلی اوربانا به‌دست 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 احتمالا در اثر هیپرتروفیو 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).

حساسیت متفاوت گونه‌های مختلف گیاهی به مواد بازدارنده رشد می‌تواند به‌دلیل 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 ریشه داشته‌ایم اما در مقابل شاهد افزایش 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

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

حسینی نژاد (۲۳) اثرمشتقات چریش بر نماتد مولد غده *Meloidogyne javanica*درگوجه فرنگی مورد بررسی قرارداده و علی‌رغم مشاهده کاهش معنی‌دار جمعیت نهایی، تعدادگره و توده‌های تخم نماتد در تمامی تیمارهای چریش، بیشترین افزایش رشد گیاه را درمقایسه با شاهد در تیمار پودر مغزدانه چریش گزارش نموده است.

مطالعات رائو و همکاران (۲۴) نشان داد که استفاده از برگ Calotropis procera به‌همراه Glomus fasciculatum Tul. در خاک علیه نماتد غده ریشه M. incognita سبب کاهش تعداد گال و تعداد تخم در هر کیسه تخم شد و علاوه‌براین سبب بهبود رشد گیاه گوجه فرنگی و افزایش کلنیزاسیون آن توسط قارچ مایکوریز شد.

تاکنون کشاورزان به‌صورت موفقی از فرمولاسیون‌های مختلف چریش جهت مدیریت نماتدهای پارازیت گیاهی استفاده کرده‌اند. علاوه بر چریش تاثیر نماتدکشی گیاهان دیگری مثل میخک،گل جعفری افریقایی، توتون، چای، مارچوبه، زنجبیل، خرزهره و خردل مورد بررسی قرارگرفته و این گیاهان اثر قابل ملاحظه‌ای درکاهش جمعیت نماتد مولد گره داشته‌اند (۲۵). اثربازدارندگی عصاره‌ها ممکن است به‌دلیل وجود مواد شیمیایی موجود در عصاره باشد که دارای خواص جنین و تخم‌کشی می‌باشند. این موادشیمیایی یا برروی رشدجنین تاثیرگذاشته یا موجب کشته شدن جنین موجود در تخم‌ها شده و یا حتی تو ده تخم‌ها 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 می‌شوند در حالی‌که وزن خشک ریشه نسبت به وزن تر آن کاهش می‌یابد.

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

در رقم متین برخلاف رقم ارلی اوربانا وزن شاهد سالم و آلوده اختلاف معنی‌دار نداشتند. بسیاری از تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشتند و با وجود کاهش آلودگی وزن خشک تغییر معنی‌داری نداشت. غلظت‌های بالای عصاره رازیانه و کرچک و استبرق باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک شدند که با توجه به اینکه وزن خشک اندام‌های هوایی در آن گیاهان نسبت به شاهد سالم کاهش نداشته است، نمی‌توان گفت که عصاره اثر سوء بر رشد گیاه داشته است.

در رقم ارلی اوربانا وزن خشک ریشه شاهد آلوده به‌طور معنی‌داری 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 می‌دهد که حتی در یک میزبان خاص نمی‌توان انتظار نتایج ثابت و قابل پیش‌بینی داشت، چرا که در یک سیستم زنده و پویا پاسخ و عکس العمل می‌تواند کاملا متفاوت باشد.

ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی از اسیدسینامیک مشتق می‌شوند که خود اسیدسینامیک از اسیدآمینهٔ فنیل‌آلانین تشکیل شده است (۲۷). آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) واکنش تبدیل فنیل‌آلانین را به ترانس‌اسید سینامیک را هدایت می‌کند. این مرحله، اولین قدم در مسیر فنیل‌پروپانوئید است و به‌عنوان یک گلوگاه تنظیمی مهم بین متابولیسم اولیه و ثانویه است (۲۸). PAL آنزیمی القا شونده است که در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده مانند بیمارگرها، تابش اشعهٔ UV و دمای پایین القا می‌شود (۲۹).

در گیاه Arabidopsis thaliana آنزیم PAL به‌وسیلهٔ چهار ژن PAL1 تا PAL4 رمز می‌شود (۲۸). ریشه‌های گوجه فرنگی مقاوم کشت داده شده در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد دارای مجموعه‌ای از ترکیبات فنلی‌اند که به‌عنوان عوامل دفاعی عمل می‌کنند. آلودگی ریشه در ۲۷ درجه سانتی‌گراد (شرایط مقاومت) میزان فنل آزاد

کاهش و سبب افزایش فعالیت PPO و PAL می‌شود. به‌نظر می‌رسد 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 سانتی‌گراد (شرایط حساس) سبب کاهش فعالیت PAL و کاهش سریع ترکیبات فنلی می گردد. کاهش ترکیبات فنلی و PAL ریشه‌ها را برای آلودگی به نماتد مستعد می سازد (۳۰).

ژن‌های PAL1، PAL2 و PAL4 به‌مقدار زیادی در اندام‌های گل دهنده که دارای تجمع لیگنین هستند بیان می‌شوند در حالی‌که ژن PAL3 دارای بیان کمی در این اندام‌هاست. در غده‌های سیب‌زمینی که به‌وسیلهٔ قارچ بیمارگر Phytophthora infestans (Mont.) de Bary آلوده شده بودند مقدار فعالیت آنزیم PAL و همچنین فرم باند شونده و آزاد اسیدسالیسیلیک در بافت‌های آلوده شده در تعامل ناسازگار افزایش نشان دادند (۳۱). آنزیم PAL توسط عوامل زنده و غیر زنده مختلف القا می‌گردد که نتیجه آن تجمع ترکیبات فنلی؛ مثل اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها می‌باشد. 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 می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که PAL با تنظیم ترکیبات مختلف فنلی موجب مقاومت به استرس‌ها می‌شود. زمانی‌که گیاه گندم و جو به‌وسیله ایزوله غیربیمارزای بیمارگر *B. sorokiana* آلوده شدند تغییری در میزان آنزیم PAL مشاهده نشد، اما جدایه‌های بیماری‌زای این قارچ باعث القای سطوح بالای این آنزیم در گیاه گندم و جو شد (۳۲).

یافته‌های این تحقیق با نتایج بررسی انجام شده روی تاثیر گونه *M. javanica* بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در ریشه گوجه فرنگی در تعامل با قارچ عامل پژمردگی آوندی مطابقت نشان داد (۳۳). از آن‌جایی‌که فنیل آلانین آمونیالیاز، آنزیمی کلیدی در متابولیسم فنل پروپانوئید است که تبدیل L- فنیل‌آلانین به ترانس‌سینامیک اسید، اولین مرحله در متابولیسم فنولیک‌ها را برعهده دارد، این مرحله یک واکنش بیوشیمیایی کلیدی در دفاع گیاهی به‌شمار می‌رود (۳۴).

پراکسیدازها می‌توانند سوبستراهای مختلفی را در حضور پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) اکسید کنند (۶). آنزیم‌های پراکسیداز در ایزوفرم‌های متعدد در گیاهان و جانوران وجود دارند (۳۵). دیواره سلولی یکی از اولین سطوح دفاعی گیاه علیه حمله بیمارگر می‌باشد و پراکسیداز یک آنزیم کلیدی در فرآیند سنتز دیواره سلولی است. پراکسیدازها در فرآیند ساختن دیواره سلولی مثل اکسیداسیون فنل، سوبرینی‌کردن و لیگنینی‌شدن سلول گیاهی در حین دفاع علیه عامل بیماری‌زا شرکت دارند. آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مثل پراکسیداز، سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز، ترکیباتی مثل H_2O_2 را به آب تبدیل می‌کنند (۳۶) افزایش فعالیت پراکسیداز با القا مقاومت ارتباط دارد. آنزیم پراکسیداز به‌صورت ایزوفرم‌های متفاوت باعث جذب اکسیژن فعال در سلول می‌شوند (۳۷).

گزارش‌های 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، باکتری‌ها و نماتدها مشاهده شده است، گیاهان ترانس ژنیک توتون، توتون زینتی، گوجه فرنگی و ذرت بیان کننده پراکسیداز آنیونی، مقاومت بیشتری به‌عوامل بیماری‌زای گیاهی و حشرات دارند. محققین معتقدند، مقاومت با ترکیبی از سه فاکتور تولید شده از پراکسیداز حاصل می‌گردد: ۱) سخت‌تر شدن بافت، ۲)نقصان کیفیت

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، ژنP7X 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، سوبرینی کردن و لیگنینی شدن سلول گیاهی در حین دفاع برعلیه عامل بیماری زا 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 آنزیم های 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 آنزیم ها 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 آنزیم ها و سوبستراهایشان 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 می باشد (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 به‌راحتی 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 سرعت نفوذ عامل بیماری زا 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* به‌علاوه 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 به‌عنوان یکی از شاخص‌های بیماریزایی نماتد کاهش دهد. این عصاره بر روی میزان بیان ژن‌های دفاع پراکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز تاثیر مثبت گذاشته و افزایش بیان این ژن‌ها را به‌دنبال 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 به‌وضوح 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 علاوه‌براین‌که به‌صورت مستقیم اثر نماتدکشی دارد می‌تواند با تاثیر بر روی میزان بیان ژن‌های دفاعی، باعث القای آن‌ها و افزایش مقاومت گیاه در برابر بیمارگرهای

گیاهی شود، لذا پیشنهاد می‌شود که بر روی شناسایی مواد موثره این ترکیب و همچنین ایجاد فرمولاسیون‌های قابل استفاده به‌وسیله کشاورزان بیشتر مطالعه شود.

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان عصاره گیاه چریش را به‌عنوان یک ترکیب صددرصد طبیعی با خاصیت ضد نماتدی بالا معرفی نمود و بعد از رسیدن به فرمولاسیون مناسب به‌صورت 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 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 *Meloidogyneincognita*; 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

biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. Crop Protection . 2008; 27(1): 36- 43.
26. Adegbite AA, Adesiyan SO, Root extracts of plants to control root-knot nematode on edible soybean. World Journal of Agriculthral 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 PALgene 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 (*Solanummelongena* 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 tomatos 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 withBipolaris sorokinianaor treatment with its puri®ed xylanase. Journal of Phytopathology. 1995; 143: 239-245.
33. Sahebani N, Hadavi NS, Omranzadeh F. The effects of b-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.

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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ T.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, Oliae 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. Enthomology 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

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, Roustaee 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. Involvment 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.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2018; 9(1)

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