



مطالعه تاثیر Salicylic acid بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ریشه گوجه فرنگی علیه نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica*

فاطمه ناصری نسب^{۱*}، نواز الله صاحبانی^۲، حسن رضا اعتباریان^۳
گروه حشره شناسی و بیماری شناسی گیاهی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
* فاطمه ناصری نسب، fnaserinasab63@gmail.com

چکیده

اثر Salicylic acid بر القاء پاسخ های دفاعی در گیاه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y در آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. گیاهچه ها در مرحله ۴-۶ برگی توسط غلظت ۵mmol سالیسیلیک اسید و تعداد ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتد *Meloidogyne javanica* مایه زنی گردید. فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در روزهای اول تا هشتم بعد از مایه زنی با نماتد اندازه گیری شد نتایج علاوه بر کاهش شدت بیماری در گلخانه، افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز را در مقایسه با شاهد نشان داد. نتایج تغییرات در میزان آنزیم و نیز کاهش شدت بیماری در گلخانه نشان می دهد که Salicylic acid میتواند ترکیبی موثر جهت تحریک مقاومت القایی و کاهش شدت بیماری در گیاه گوجه فرنگی علیه *M. javanica* باشد. واژگان کلیدی: مقاومت القایی، Salicylic acid، *M. javanica*، پلی فنل اکسیداز

مقدمه

نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne spp* از عوامل خسارت زا بوده و دامنه وسیعی از محصولات را آلوده می کند (Xoo, 2001). به دلیل مشکل بودن مدیریت و مبارزه شیمیایی نماتدها محققان به دنبال دستیابی به راه های مناسب کنترل این نماتد هستند (Sharon, 2001). کنترل بیماری های گیاهی همراه با سلامت محیط زیست، کنترل بیولوژیک را از مقبولترین روشهای کنترل بیماریها معرفی نموده است. پدیده بیوکنترل دارای مکانیزم های مختلف از جمله القاء مقاومت می باشد (Sikora, 2003). سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنلی است که نقش مهمی در فرآیند های فیزیولوژیکی گیاهان از جمله القاء پاسخ های دفاعی گیاهی علیه پاتوژن ها دارد. هدف از این تحقیق بررسی اثر غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک (SA) بر کنترل نماتد *M. Javanica* در شرایط گلخانه ای و بررسی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y می باشد

مواد و روشها



عامل بیماری: ریشه های آلوده به نماتد مولد گره ریشه از گلخانه های خیار و گوجه فرنگی منطقه پیشوای ورامین جمع آوری شد. تکثیر نماتد با روش Single eggmass روی رقم ارلی اوربانا Y انجام و شناسایی گونه نماتد مطابق کلید جیسون صورت گرفت (Jepson, 1987). استخراج تخم ولاروسن دو با استفاده از روش Hussay & Barker (۱۹۷۳) انجام شد.

محرك شیمیایی : از اسید سالیسیلیک SA ساخت Merck با غلظت ۵ میلی مول استفاده شد.

بررسی اثر Salicylic acid بر بیماری در شرایط گلخانه:

بدور ضد عفونی شده در گلدانهای حاوی خاک سترون کشت شدند. گیاهچه ها در مرحله ۴-۶ برگگی توسط غلظت ۵ میلی مولار SA مایه کوبی شدند. ۲۴ ساعت بعد هر گیاهچه توسط جمعیت ۲۰۰۰ لارو سن ۲ M. javanica مایه زنی شد، تیمار های SA به روش خیساندن خاک + نماتد، SA اسپری روی برگ + نماتد و نماتد تنها به عنوان شاهد، اعمال شدند. پس از ۴۵ روز گیاهچه ها جهت بررسی فاکتورهای مورد نظر به آزمایشگاه منتقل شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۶ تکرار به ازاء هر تیمار انجام شد.

ارزیابی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ریشه گوجه فرنگی مایه کوبی شده با اسید سالیسیلیک تیمارها شامل: (۱) گیاه مایه زنی شده با آب مقطر استریل (۲) گیاه مایه زنی شده با SA به صورت اسپری روی برگ ها (۳) گیاه مایه زنی شده با نماتد (۴) گیاه مایه زنی شده با نماتد و SA، بودند. 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 بعد از مایه زنی با نماتد بود، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در روزهای اول تا هشتم پس از مایه زنی بررسی شد.

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره و سنجش پروتئین استاندارد

به منظور ارزیابی پروتئین موجود در عصاره و تهیه منحنی پروتئین استاندارد از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

استخراج پروتئین از بافت گیاه

نیم گرم از بافت گیاهی ریشه در هاون چینی با استفاده از ازت مایع کوبیده و له شد یک میلی لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مول با pH ۶ به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب های دو میلی لیتری منتقل و توسط میکروسانتریفوژ در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. مایه رویی برای انجام آزمایش ها جدا و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Reuveni, 1995).

تهیه عصاره آنزیمی پلی فنل اکسیداز و ارزیابی میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز

دو میلی لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای ۴۰ میلی گرم پروتئین باشد، ۲۰ میکرولیتر محلول پرولین و مقدار کافی بافر سیترات- فسفات ۲۵ میلی مول ۶/۴ pH مخلوط شد، توسط ورتکس به مدت دو دقیقه هوا دهی و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از آن صفر گردید. به مخلوط واکنش ۴۰ میکرولیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی مول افزوده و بلافاصله تغییرات جذب نور



در طول موج ۵۱۵ نانومتر به مدت یک دقیقه با فاصله ۱۰ ثانیه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات جذب نور در دقیقه بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد (Mohammadi & Kazemi, 2002).

نتایج و بحث

در بررسی گلخانه ای نتایج کاهش معنی دار (در سطح ۱٪) تعداد گال، Eggmass و تعداد تخم را نسبت به شاهد نشان داد. استفاده از سالیسیلیک اسید به صورت اسپری روی برگ های گوجه فرنگی کاهش موثرتری در میزان بیماری را نشان داد (جدول ۱). ناندی و همکاران (Nandy et al., 2003). نشان دادند که SA از طریق کاهش تعداد گال و تعداد تخم نماتد *M.javanica* روی بامیه و روی لوبیا چشم بلبلی باعث کاهش بیماری می شود. فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاهچه های مایه زنی شده با اسید سالیسیلیک نسبت به گیاه سالم و آلوده افزایش معنی داری (در سطح ۱٪) را نشان داد (جدول ۲) و بیشترین میزان فعالیت آن در روز چهارم مشاهده شد. تجمع چندین آنزیم از جمله پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیس میوتاز، پلی فنل اکسیداز و ترکیباتی شبیه به فنل به عنوان متابولیت های ثانویه که در پاسخ به استرس در گیاهان به اثبات رسیده است (Honty et al., 2005).

جدول ۱- اثر غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک بر بیماری در شرایط گلخانه

میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییرات
تعداد تخم	تعداد کیسه تخم	تعداد گال		
۶۱۲/۳۳ a	۱۵۵a	۲۷۳ a	۲	نماتد
۳۱۰/۲۳ b	۱۰۰ b	۱۳۱ b	۲	نماتد+SA اسپری
۲۷۵/۶۷ c	۵۳ c	۷۸/۵ c	۲	نماتد+SA خیساز
دن خاک				

هر عدد میانگین ۶ تکرار می باشد. میانگین هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند با هم اختلاف معنی دار دارند (آزمون دانکن $(p < 0/05)$).

جدول ۲- اثر اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (تغییرات جذب در ۵۱۵ نانومتر در دقیقه در میلی گرم پروتئین)

روز های بعد از مایه زنی نماتد								تیماز
۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
A۳/۰۸de	A۳/۹۵c	۴/۸۵b	B۵/۰۴ b	A۶/۷a	A۴/۸۲b	۳/۶۲cd	A۲/۶e	SA+N
A۳/۲c	A۳/۵c	۴/۷۵b	A۵/۸۵ a	A۶/۲۲a	۴/۷۷b	AB۳/۴cd	A۲/۹۵d	SA
A۳/۱۷ de	۳/۳۲cde	B۳/۷bcd	C۴/۰۲ b	B۴/۸۴ a	B۳/۹۵ b	۳/۸۲ bc	A۳/۰۱ e	N
B۲/۴۲c	۲/۶۵abc	۲/۸abc	D۳/۰۶ ab	۲/۷abc	C۳/۳۲a	۲/۹abc	A۲/۴۷ bc	H



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. تفاوت ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) ارائه شده اند. SA: سالیسیلیک اسید، N: نماتد (*M. javanica*)، H: گیاه سالم می باشند.
نتیجه گیری کلی:

نظر به کنترل موفق بیماری ریشه گرهی گوجه فرنگی در گلخانه و القاء مکانیسم های دفاعی گیاه توسط این محرک شیمیایی، اسید سالیسیلیک می تواند به عنوان عاملی موثر جهت القاء مقاومت و کنترل بیماری نماتد مولد گره ریشه به کار رفته شود.

منابع

1. Bradford MM. 1967. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal of Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
2. Jepson, S.B. 1987. Identification of Root – Knot nematodes. Cambrian News Ltd.
3. Nandi B, Kundu K, Banerjee N, and Babu SPS. 2003. Salicylic acid induced suppression of *Meloidogyne incognita* infestation of okra and cowpea. *Journal of Nematology* 5(5): 747 – 752.

Effect of Salicylic acid on Polyphenol oxidase activity to *Meloidogyne javanica* in tomato

Fatemeh naserinasab^{1*}, Navazallah Sahebani², Hasan Reza Etebarian³
Department of Entomology and Plant Pathology, University College of Aboureihan, The University of Tehran

*fnaserinasab63@gmail.com

Abstract

In this study tomato seedlings inoculated with 5mM Salicylic acid and 2000 of the second stage juvenile (J2). Polyphenol oxidase activity was measured on 1 to 8 days after inoculation by *M. javanica*. The results was shown that Salicylic acid caused increase in polyphenol oxidase activity that reached maximum level 4 days after nematode inoculation. Too, application of Salicylic acid could decrease the severity of disease in greenhouse. The results indicated that the Salicylic acid induced the resistance in tomato against *M. javanica*.

Keywords: Induce resistance, Salicylic acid, *M. javanica*, Polyphenol oxidase