Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 2, Summer 2022, p. 153-167

Evaluation of the *Trichoderma harzianum* BI alone and in Combination with Thiamine, Riboflavin and Hexanoic Acid Effects on Resistance Induction against *Meloidogyne javanica* in Tomato Plants

M. Kavari[1], E. Mahdikhani- Moghaddam[2]*, H. Rouhani[3]

Received: 26-08-2021
Revised: 28-09-2021
Accepted: 22-10-2021
Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:
Kavari, M., Mahdikhani- Moghaddam, E., & Rouhani, H. (2022). Evaluation of the *Trichoderma harzianum* BI alone and in Combination with Thiamine, Riboflavin and Hexanoic Acid Effects on Resistance Induction against *Meloidogyne javanica* in Tomato Plants. *Journal of Iranian Plant Protection Research 36*(2): 153-167. (In Persian with English abstract)
DOI: 10.22067/JPP.2021.72002.1045

Introduction

One of the most important problems facing modern agriculture is soil born plant pathogens control, especially root-knot nematodes. Chemical control, crop rotation and using resistance cultivar are common methods in control of most plant pathogens; however, there are low efficacy in control of root-knot nematodes regarding host wide range, long-term survival ability in soil and plant residual even in absence of host. One of the new methods in the management of root-knot nematodes is resistance induction in host using chemical compounds and microorganisms. In this method there are not any side effect. The aim of this study was to investigate the effectiveness and mechanisms involved in induced resistance by three chemical compounds (Hexanoic acid, Thiamin and Riboflavin) accompanied by *Trichoderma harzianum* BI in tomato plants against *Meloidogyne javanica*. The objectives of this study were addressed by monitoring the activity of peroxidase, polyphenol oxidase, catalase, phenylalanine ammonia lyase, accumulation of total phenolic compounds and nematode disease indexes.

Materials and methods

This study was conducted in the Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad and was performed with susceptible cultivar to root knot nematode (Early Urbana). 2-4 leaf stage tomato seedlings were transferred to 3 Liter pots filled with 2 liter sterile soil and maintained under greenhouse condition to the end of experiment. 2000 *Meloidogyne javanica* J2 larvae (N) were added to each pot. Tomato plants were treated with *Trichoderma harzianum* BI (TH) with a population of 1×10^7 spores/mL, Hexanoic acid (HX), thiamine (TI) and riboflavin (RB) with a concentration of 20 mM. Distilled water was used as control treatment. Sampling was performed at specific time points from each pot and the samples were transferred to the laboratory. Enzyme extract was extracted from tomato roots to assay the Peroxidase (POD), Poly phenol oxidase (PPO), Catalase (PAL) and Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity. Also total phenol content and nematode pathogenicity indexes were measured at the end of the growing season.

Results and Discussion

Based on the results, the highest POD and PPO enzyme activities were measured in TH + HX + N, TH + RB + N and TH + TI + N treatments, respectively, at a time point of 72 hours after treatment. The highest CAT enzyme activity was also recorded in the treatments TH + HX + N, TH + RB + N and TH + TI + N, respectively, at 96 hours after treatment application, the highest PAL enzyme activity was recorded in TH + HX + N, TH + RB + N and TH + TI + N treatments, respectively, at a time point of 120 hours after treatment. The highest total phenol content of roots were measured, respectively, in TH + RB + N, TH + HX + N and TH + TI + N

1, 2 and 3- Ph.D. Student and Professors in Plant Pathology Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mahdikhani-e@um.ac.ir)

treatments with values of 125.33, 114.67 and 109.33 mg gallic acid per gram roots. Also, nematode pathogenicity indexes including gall index, number of egg sacs and number of eggs in each egg sac were measured 45 days after the start of the experiment and a significant difference was observed in all treatments compared to the control treatment. The lowest values of pathogenicity indices were recorded in TH + HX + N, TH + RB + N and TH + TI + N treatments, respectively. Systemic resistance in plants can be induced with biotic and abiotic agents. The effects of chemical and microorganisms on plants resistance induction were investigated in many studies. However, effect of these agents on plant parasitic nematodes were considered less than other pathogens. Capability of different *Trichoderma* isolates on nematodes damage reduction are reported in many different studies. Several biocontrol mechanisms are reported for *Trichoderma*. As biocontrol ability of an isolate can be different mechanisms consequence. Effect of different chemical such as Hexanoic Acid, Thiamin and Riboflavin on plant disease have been investigated, however, there are little known about the effects of these chemicals on plant parasitic nematodes. The use of these chemicals as an enhancer of plant resistance to pathogens, due to their low risk to humans and the environment has been increasingly welcomed by researchers.

Conclusion

The results showed significant effect of used treatments on the reduction of root-knot nematode damage in tomato plants. These results justify further studies to investigate and identify the mechanisms of these compounds mode of action on increasing host resistance against this pathogen.

Keywords: Hexanoic acid, Root-knot nematode, Riboflavin, Thiamin, Tomato

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شمار ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص ۱۶۷-۱۵۳

بررسی توانایی کنترل کنندگی قارچ *Trichoderma harzianum* BI به تنهایی و در ترکیب با سه ترکیب شیمیایی تیامین، ریبوفلاوین و هگزانوئیک اسید علیه نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی

مجتبی کواری[۱]- عصمت مهدیخانی مقدم[۲*]- حمید روحانی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۳۰

چکیده

از مهمترین مسایل پیش روی کشاورزی مدرن، کنترل بیمارگرهای خاکزاد گیاهی به ویژه نماتدهای ریشه گرهی می‌باشد. این نماتدهای انگل اجباری، سالانه خسارت قابل توجهی را به محصولات کشاورزی در سرتاسر جهان وارد می‌کنند. روش‌های مرسوم در کنترل سایر بیمارگرها مانند کنترل شیمیایی، تناوب زراعی، استفاده از ارقام مقاوم با توجه به دامنه وسیع میزبانی، توانایی بقا طولانی مدت در خاک و بقایای گیاهی حتی در عدم حضور میزبان و همچنین گذراندن بیشتر مراحل زندگی درون بافت گیاه، در کنترل این بیمارگر کارایی چندانی ندارد. القای مقاومت در میزبان در برابر این بیمارگر با کاربرد ترکیبات شیمیایی و میکروارگانیسم‌های مفید با توجه به نداشتن مضرات استفاده از آفت‌کش‌ها یکی از روش‌هایی است که به تازگی در جهت مدیریت این بیمارگر مورد توجه فراوان قرار گرفته است. در این پژوهش تاثیر استفاده از جدایه BI قارچ *Trichoderma harzianum* به تنهایی و همچنین به همراه هگزانوئیک اسید، تیامین و ریبوفلاوین بر میزان فعالیت آنزیمی، محتوی فنل کل ریشه و همچنین کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد در گیاه گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، تیمار قارچ تریکودرما به همراه هگزانوئیک اسید بیشترین تاثیر را بر افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، پلی فنیل آلانین آمونیالیاز و کاتالاز و همچنین کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد نشان داد. نتایج این بررسی نشان دهنده پتانسیل بالای استفاده از این ترکیبات شیمیایی و همچنین قارچ تریکودرما در جهت مدیریت تلفیقی این بیمارگر در برنامه‌های کشاورزی پایدار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، تیامین، ریبوفلاوین، گوجه فرنگی، نماتد ریشه گرهی، هگزانوئیک اسید

مقدمه

یکی از بزرگترین چالش‌ها در کشاورزی مدرن، مدیریت بیمارگرهای خاکزاد گیاهان بخصوص نماتدهای انگل گیاهی می‌باشد. نماتدهای بیمارگر گیاهی هر ساله معادل ۸۰ میلیارد دلار آمریکا به صورت مستقیم و غیر مستقیم به محصولات کشاورزی خسارت وارد می‌کنند (Navia *et al.*, 2017). در بین نماتدهای بیمارگر گیاهی، نماتدهای ریشه گرهی (RKNs[۴]) گونه‌های جنس *Meloidogyne*، یکی از مهم‌ترین بیمارگرها در طیف وسیعی از محصولات می‌باشند که خسارات سنگینی را به تولید محصولات کشاورزی در سراسر جهان وارد می‌کنند (Ghareeb *et al.*, 2019).

در بین محصولات کشاورزی، گوجه فرنگی یکی از محصولاتی است که در سراسر جهان به صورت مزرعه‌ای و گلخانه‌ای کشت می‌شود که به شدت تحت تاثیر نماتدهای بیمارگر گیاهی و بخصوص نماتدهای ریشه گرهی می‌باشد. کشور ایران رتبه نهم را در تولید این محصول در دنیا دارا می‌باشد (FAOSTAT).

مدیریت نماتدهای بیمارگر گیاهی از طریق تناوب زراعی، کنترل زیستی با استفاده از عوامل بیوکنترل، ارقام مقاوم و متحمل، ضدعفونی خاک (از طریق سموم تدخینی یا آفتاب‌دهی خاک) و القای مقاومت صورت می‌پذیرد. محدودیت‌ها و مضرات زیست محیطی کنترل شیمیایی نماتدها سبب توجه ویژه به روش‌های جایگزین کنترل نماتدها شده است (Bernard *et al.*, 2017) که یکی از این

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استادان گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: mahdikhani-e@um.ac.ir
DOI: 10.22067/JPP.2021.72002.1045
4- Root- Knot nematodes

روش‌های جایگزین، القای مقاومت در گیاهان با استفاده از عوامل زنده و غیر زنده می‌باشد که به دلیل نداشتن مضرات زیست محیطی، به صورت گسترده مورد توجه محققین قرار گرفته است (Sahebani *et al.*, 2011). واژه مقاومت در نماتدشناسی، به توانایی گیاه در جلوگیری و یا کاهش میزان تولید مثل یک گونه از نماتد و یا کاهش خسارت آن اطلاق می‌شود. رابطه‌ی پیچیده بین نماتدهای بیمارگر و گیاه طی یک تکامل پیچیده، پیش رفته است؛ به منظور توسعه مکان‌های غذایی، نماتدهای بیمارگر گیاهی استراتژی‌های متعددی را جهت سرکوب سیستم‌های دفاعی و ایمنی گیاهان به کار می‌گیرند؛ در مقابل گیاهان نیز طیف وسیعی از مکانیسم‌های دفاعی مکانیکی و شیمیایی را در جهت تشخیص و جلوگیری از نفوذ و محدود کردن بیماری‌زایی نماتدها به کار می‌گیرند (Aryal *et al.*, 2011). فعال سازی سیستم ایمنی گیاهان به وسیله عوامل زنده و غیر زنده، که محرک نامیده می‌شوند، در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین در جهت مدیریت بیماری‌های گیاهی قرار گرفته است. مقاومت ایجاد شده در گیاه علیه یک بیمارگر تحت تاثیر عوامل محرک زنده یا غیر زنده، مقاومت سیستمیک القایی (ISR[1]) و مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR[2]) نامیده می‌شوند. عوامل محرک متعددی به عنوان القاگر مقاومت در گیاهان علیه نماتدهای بیمارگر گیاهی گزارش شده است (Fatma *et al.*, 2014). از مهمترین این عوامل، جدایه‌های متعددی از قارچ تریکودرما (*Trichoderma* spp.) می‌باشند که گزارش‌های فراوانی مبتنی بر توانایی گونه‌های این قارچ در کاهش میزان بیماری‌های نماتدی در گیاهان ارائه شده است. گونه‌های این قارچ به چندین روش میزان خسارت نماتدها را کاهش می‌دهند که می‌توان به پارازیتیسم مستقیم قارچ بر روی نماتد و تخم نماتد، القای مقاومت علیه نماتد در گیاه، افزایش رشد گیاه با تولید مواد شبه هورمونی و همچنین تجزیه دیواره تخم نماتد با تولید و ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده مانند کیتیناز و پروتئیناز اشاره کرد. (Feyisa *et al.*, 2015; Herrera-Al-Hazmi *et al.*, 2016; Parra *et al.*, 2018; Sharon *et al.*, 2009; Szabó *et al.*, 2012; Szabó *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

علاوه بر عوامل زنده، برخی از ترکیبات شیمیایی نیز به منظور القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی مورد استفاده فراوان قرار می‌گیرند. از این ترکیبات می‌توان تیامین (ویتامین B1) و ریبوفلاوین (ویتامین B2) را نام برد که به عنوان ترکیباتی جهت تحریک مقاومت در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Taheri and Tarighi, 2010; Ahn *et al.*, 2007;). مطالعات نشان داده است که مقاومت ایجاد شده توسط تیامین، یک مقاومت طولانی مدت و پایدار بوده و در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی صورت می‌پذیرد. تیامین ژن‌های مرتبط با SAR را فعال کرده و سبب جلوگیری و کاهش میزان بیماری در گیاهان می‌شود (Asensi-Fabado and Munné-Bosch, 2010; Kato and Shimizu, 1987;). یکی از این مطالعات نشان داده است که تیامین سبب فعال کردن ژن PR-1 در توتون شده که سبب ایجاد مقاومت علیه ویروس موزاییک توتون از مسیر وابسته به سالیسیلیک اسید می‌گردد (Malamy *et al.*, 1996). همچنین تحقیقات بعدی نشان داد که تیامین از طریق افزایش بیان فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) سبب افزایش سطح رسوب کالوس در آرابیدوپسیس می‌شود (Ahn *et al.*, 2007). نتایج تحقیقی در رابطه با تاثیر استفاده از تیامین بر میزان کاهش خسارت نماتد ریشه گرهی در گیاه برنج نشان داد که این ترکیب سبب تجمع هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و لیگنین در ریشه گیاه می‌شود که این امر با افزایش میزان بیان ژن‌های موثر در مسیر فنیل پروپانوئید (*OsPAl1* و *OsC4H*) مرتبط می‌باشد (Huang *et al.*, 2016).

بررسی های صورت گرفته در زمینه تاثیر استفاده از ریبوفلاوین بر کاهش خسارت بیماری‌های گیاهی نشان دهنده تاثیر این ویتامین محلول در آب بر این امر می‌باشد. به عنوان نمونه، تاثیر این ویتامین بر القای مقاومت سیستمیک در گیاه آرابیدوپسیس علیه قارچ *Peronospora parasitica* و باکتری *Pseudomonas syringae* pv. tomato و در گیاه توتون علیه قارچ *Alternaria alternate* و ویروس موزاییک توتون (TMV) به اثبات رسیده است (Dong and Zhang *et al.*, 2009;Beer, 2000;). همچنین تاثیر ریبوفلاوین و مشتقات آن در القای مقاومت علیه قارچ *Pyricularia oryzae* در گیاه برنج گزارش شده است (Aver'Yanov *el al.*, 2000). بوبکری و همکاران (Boubakri *et al.*, 2013) گزارش کردند که استفاده از ریبوفلاوین سبب کاهش خسارت سفیدک کرکی ناشی از *Plasmopara viticola* در یک رقم حساس انگور (Pinot meunier) می‌شود (Boubakri *et al.*, 2013).

هگزانوئیک اسید یکی دیگر از ترکیبات شیمیایی است که اخیرا در زمینه القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی مورد توجه قرار محققین قرار گرفته است. تحقیقات زیادی در این زمینه نشان داده است که این ترکیب سبب القای مقاومت در گیاهان علیه بیمارگرهای گیاهی می‌شود. همچنین این ترکیب طبیعی زنجیره کوتاه مونوکربوکسیلیک اسید دارای خواص آنتی میکروبیال نیز می‌باشد. نتایج یک بررسی در این زمینه نشان داد که این ترکیب سبب افزایش مقاومت گوجه فرنگی در برابر حمله قارچ *Botrytis cinerea* می‌شود (Leyva *et al.*, 2008). پژوهشی دیگر در این زمینه نشان داد که تیمار گیاه گوجه فرنگی با این ترکیب سبب افزایش میزان بیان ژن‌های *PR1* و *PR5* می‌شود و سطح مقاومت این گیاه به باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 در گیاهان تیمار شده با این ترکیب نسبت به گیاهان شاهد بالاتر می‌باشد

1- Induced Systemic Resistance
2- Systemic acquired Resistance

(Scalschi *et al.*, 2013). پژوهش دیگری در این رابطه نشان داد که تیمار گیاه گوجه فرنگی با هگزانوئیک اسید سبب افزایش رسوب کالوس و همچنین بالا رفتن سطح کافئیک اسید در گیاه پس از حمله قارچ نکرتروف *Botrytis cinerea* شده که سبب کاهش توسعه این بیماری می‌شود (Vicedo *et al.*, 2009).

این پژوهش به منظور بررسی تاثیر یک جدایه از قارچ تریکودرما (*T. harzianum* BI) به تنهایی و همچنین در ترکیب با سه ترکیب شیمیایی ریبوفلاوین، تیامین و هگزانوئیک اسید بر کاهش میزان بیماری‌زایی نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در گیاه گوجه فرنگی صورت پذیرفت. این پژوهش با تمرکز بر تغییرات میزان آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز و پلی فنل اکسیداز، اندازه‌گیری محتوای فنل کل ریشه گیاه گوجه فرنگی و همچنین شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه گرهی در گیاه گوجه فرنگی تحت تاثیر تیمارهای ذکر شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

گیاه

این تحقیق در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. آزمایش در قالب اسپلیت پلات (Split plot) فاکتوریل با سه تکرار انجام گرفت که نقطه‌های زمانی (Time points) به عنوان پلات اصلی و تیمارهای مورد استفاده به عنوان پلات فرعی در نظر گرفته شدند. جهت انجام این پژوهش از یک رقم گوجه فرنگی حساس به نماتد ریشه گرهی (Early Urbana) استفاده شد. بدین منظور بذر گوجه فرنگی در بستر کشت شامل کوکوپیت و پیت ماس (نسبت ۲ به ۱ حجمی) درون سینی نشاء کشت شد و نشاء گوجه فرنگی در مرحله ۴-۲ برگی به گلدان‌های ۳ لیتری حاوی ۲ لیتر خاک استریل (رس، ماسه و ماده آلی به نسبت ۱:۱:۲) انتقال یافتند و در شرایط گلخانه با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رژیم نوری به تاریکی ۱۶ به ۸ ساعت نگهداری و دو بار در هفته آبیاری شدند.

تهیه مایه تلقیح

در این پژوهش از جدایه BI قارچ *Trichoderma harzianum* استفاده شد. کشت تک اسپور این قارچ از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و بر روی محیط کشت PDA[1] کشت داده شد و به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس سوسپانسیون اسپوری قارچ به غلظت ۱×۱۰^{۷} اسپور بر میلی‌لیتر به روش Jansson و همکاران تهیه شد (Jansson *et al.*, 1985).

جمعیت خالص نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* بر روی رقم حساس گوجه تکثیر گردید. لاروهای سن دوم (J_2) این نماتد با نگهداری تخم نماتد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته تفریخ گردید و جهت مایه‌زنی به نشاهای گوجه فرنگی مورد استفاده قرار گرفت (Kayani *et al.*, 2001).

ترکیبات شیمیایی

مواد شیمیایی مورد نیاز در این پژوهش شامل هگزانوئیک اسید (Hexanoic Acid)، تیامین (Thiamin) و ریبوفلاوین (Riboflavin) از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich) تهیه شدند. در این پژوهش از غلظت ۲۰ میلی‌مولار این ترکیبات شیمیایی به همراه ۰/۰۲ درصد حجمی توئین ۲۰ (Tween 20- Merck) در آب مقطر استریل استفاده شد.

روش تیمار

سه عدد نشا گوجه فرنگی به ازاء هر تیمار و هر نقطه زمانی در مرحله ۲-۴ برگی با سوسپانسون اسپوری قارچ تریکودرما مایه‌زنی شدند. جهت مایه‌زنی قارچ به گیاه از روش غوطه ور نمودن ریشه در سوسپانسیون اسپوری به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. پس از آن مواد شیمیایی تهیه شده بر روی برگ‌های گیاهان اسپری شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، تعداد ۲۰۰۰ عدد لارو سن دوم نماتد به هر گلدان مایه‌زنی گردید و در شرایط گلخانه نگهداری گردید. همچنین در تیمار شاهد مثبت، آب مقطر استریل به جای عامل بیوکنترل و ترکیب شیمیایی استفاده شد و گیاه با ۲۰۰۰ عدد لارو نماتد مایه‌زنی شد. در گیاهان شاهد منفی از آب مقطر استریل به جای تمامی تیمارها و بدون مایه‌زنی لارو نماتد استفاده شد.

نمونه‌برداری

پس از مایه‌زنی نماتد به ریشه گیاهان، نمونه‌برداری ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت (همچنین ۱۹۲ ساعت فقط برای آنزیم Phenyl alanine ammonia lyase) پس از مایه‌زنی نماتد از ریشه گیاهان انجام شد. ریشه‌ها شسته و سپس خشک گردید و سپس در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. از این نمونه‌ها جهت سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده گردید. همچنین ۴۵ روز پس از مایه‌زنی نماتد نیز به منظور بررسی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد و همچنین تعیین میزان محتوای فنل کل نمونه‌برداری از گیاهان صورت گرفت.

1- Potato Dextrose Agar

سنجش فعالیت آنزیمی

استخراج منبع آنزیمی

جهت استخراج آنزیم، یک گرم از بافت ریشه در چهار میلی‌لیتر از بافر ۱۰۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH= 6.8) حاوی ۴ درصد (وزن به حجم) PVP و همچنین یک میلی‌مولار EDTA هموژنیزه شد و سپس با سرعت ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی آن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و جهت تعیین میزان پروتئین کل و همچنین سنجش آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و کاتالاز مورد استفاده قرار گرفت سنجش میزان پروتئین کل با روش برادفورد انجام شد و از سرم گاوی (Bovine serum) جهت ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش آنزیم پراکسیداز (POD)

سنجش آنزیم پراکسیداز به روش Dias و Costa صورت گرفت. بدین منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به محلول واکنش شامل ۲/۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH=7، ۰/۱ میلی‌لیتر گایکول ۲۰ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۵۰ میلی‌مولار افزوده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز با اندازه‌گیری و ثبت میزان تغییرات جذب محلول واکنش در طول موج ۴۷۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر سنجش شد. تمامی اندازه‌گیری‌های آنزیمی این پژوهش با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV/Visible spectrophotometer Biochrom Biowave II انجام گرفت. یک واحد از فعالیت آنزیمی به معنای میزان آنزیمی که برای تولید یک میکرومول تتراگایکول در هر دقیقه مورد نیاز می‌باشد، تعریف شد (DIAS and COSTA., 1983).

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز به روش Liu و همکاران با اندکی تغییر انجام شد (Liu *et al.*, 2005). ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره نزیمی به مخلوطی از ۰/۳ میلی‌لیتر کتکول (Catechol) ۰/۲ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=6.8) اضافه شد. سپس تغییرات جذب محلول واکنش در طول موج ۴۲۰ نانومتر طی دو دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی به عنوان تغییرات در جذب در هر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

سنجش فعالیت کاتالاز با روش Kato و Shimizu با اندکی تغییر انجام شد. بدین منظور، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره نزیمی به ترکیبی شامل ۰/۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) ۵۰ میلی‌مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=۷) افزوده شد و میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه و هر ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری و ثبت شد. کاهش در میزان جذب نوری به عنوان کاهش محتوای H_2O_2 که ناشی از فعالیت آنزیم کاتالاز می‌باشد، تلقی گردید. فعالیت آنزیمی با تغییرات در میزان جذب محلول واکنش در هر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد گردید (Kato and Shimizu, 1987).

سنجش آنزیم phenylalanine ammonia-lyase (PAL)

جهت استخراج عصاره آنزیمی، یک گرم از بافت ریشه پودر شده به دو میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۲) حاوی دو درصد (حجم به وزن) PVP، یک میلی‌مولار EDTA و ۵ میلی‌مولار مرکاپتواتانول افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و فاز رویی به عنوان عصاره آنزیمی جهت سنجش آنزیم PAL مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنجش فعالیت آنزیم از روش Gomez و همکاران استفاده شد. بدین منظور، ۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر ۲۵ میلی‌مولار Tris-HCl(pH=8.8) و ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل آلانین (L-Phenylalanin) ۱۰۰ میلی‌مولار افزوده شد. ترکیب واکنش به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. میزان جذب مشتقات trans-cinnamic در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد. هر واحد آنزیم به عنوان مقداری از آنزیم که جهت تولید یک میگروگرم سینامیک اسید (Cinnamic acid) در یک میلی‌لیتر از محلول واکنش مورد نیاز می‌باشد، تعریف می‌شود (Gómez *et al.*, 2004).

سنجش محتوای فنل کل

سنجش محتوای فنل با استفاده از معرف فولین- سیکالتیو (Folin-Ciocalteu) و به روش Singleton و Rossi با کمی تغییر انجام شد. ۴۵ روز پس از مایه زنی نماتد به گیاهان، سه عدد گیاه گوجه فرنگی به ازاء هر تیمار جمع‌آوری شد و یک گرم از ریشه در ۴ میلی‌لیتر از ترکیب متانول و آب (به نسبت حجمی ۴ به ۱) هموژنیزه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار گرفت. سپس به مدت ده دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و فاز رویی جهت تعیین میزان فنل کل مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین میزان فنل کل، یک میلی‌لیتر از رونشین مرحله قبل به نسبت یک به پنج رقیق شد و سپس به ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیکالتیو ۲۰۰ میلی‌مولار افزوده شد و به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس دو میلی‌لیتر سدیم کربنات اشباع (۸۵ گرم بر لیتر) به محلول واکنش افزوده شد و به مدت یک ساعت

در دمای اتاق انکوبه شد و پس از آن میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد. جهت ترسیم منحنی استاندارد فنل، از غلظت‌های مختلف گالیک اسید استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ریشه بیان گردید (Singleton and Rossi, 1965).

اندازه‌گیری شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد

۴۵ روز پس از مایه‌زنی نماتد، شاخص‌های بیماری‌زایی در گیاهان تیمار شده اندازه‌گیری شد. بدین منظور تعداد کیسه تخم، تعداد تخم درون هر کیسه تخم و شاخص گال نماتد اندازه‌گیری شد (Bridge and Page, 1980).

تجزیه و تحلیل آماری

این بررسی یک بار و با سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزارهای IBM SPSS STATISTICS v.23.0 و STATISTICA v.7.0 انجام شد.

نتایج

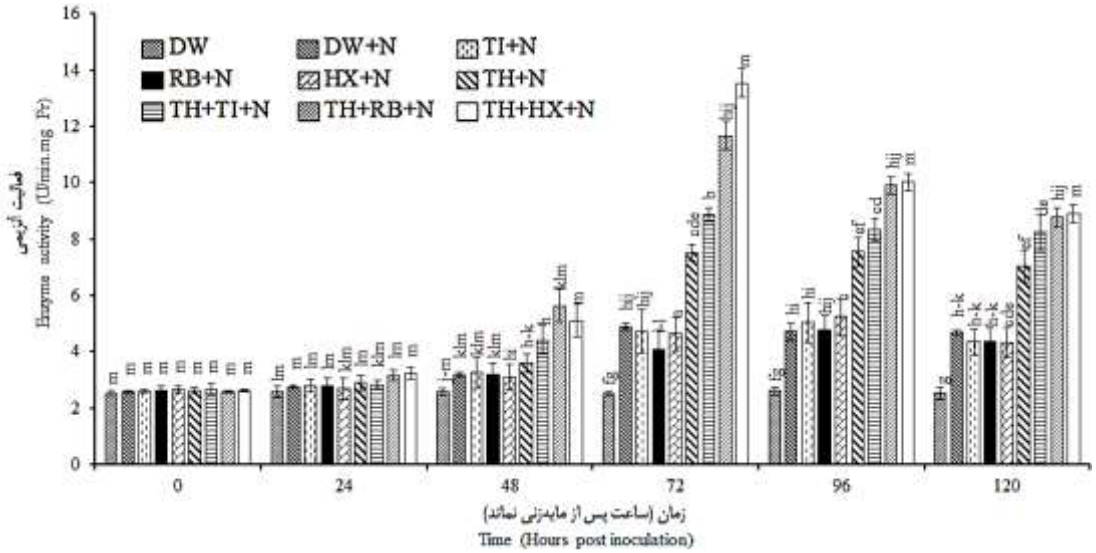
القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی یکی از استراتژی‌های مدیریت بیماری‌های گیاهی در برنامه‌های مدیریت تلفیقی بیماری‌ها می‌باشد. مطالعات فراوانی در زمینه استفاده از عوامل زنده و غیر زنده بر القای مقاومت در گیاهان علیه نماتدهای بیمارگر گیاهی انجام شده است. در این پژوهش، تاثیر جدایه BI قارچ تریکودرما (*Trichoderma harzianum*) به تنهایی و در ترکیب با سه ترکیب شیمیایی هگزانوییک اسید (HX)، ریبوفلاوین (RB) و تیامین (TI) بر القای مقاومت علیه نماتد ریشه گرهی در گیاه گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیمی

در این بررسی، فعالیت آنزیمی چهار آنزیم موثر در مقاومت به بیمارگرهای گیاهی شامل کاتالاز (Catalase)، پراکسیداز (Peroxidase)، پلی فنل اکسیداز (Polyphenol Oxidase) و فنیل آلانین آمونیالیاز (Phenylalanin Amonia Lyase) مورد بررسی قرار گرفت.

آنزیم پراکسیداز

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده در شکل ۱ آورده شده است. در تمامی تیمارهای مورد بررسی، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز پس از ۲۴ ساعت از مایه‌زنی نماتد افزایش پیدا کرد و با روند صعودی تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی نماتد ادامه پیدا کرد و پس از آن روند نزولی به خود گرفت. بر اساس این نتایج، بالاترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تحت تیمار با تریکودرما و هگزانوئیک اسید (TH+HX) و در نقطه زمانی ۷۲ ساعت (۱۳/۵۳ واحد بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) پس از مایه‌زنی نماتد اتفاق افتاد.

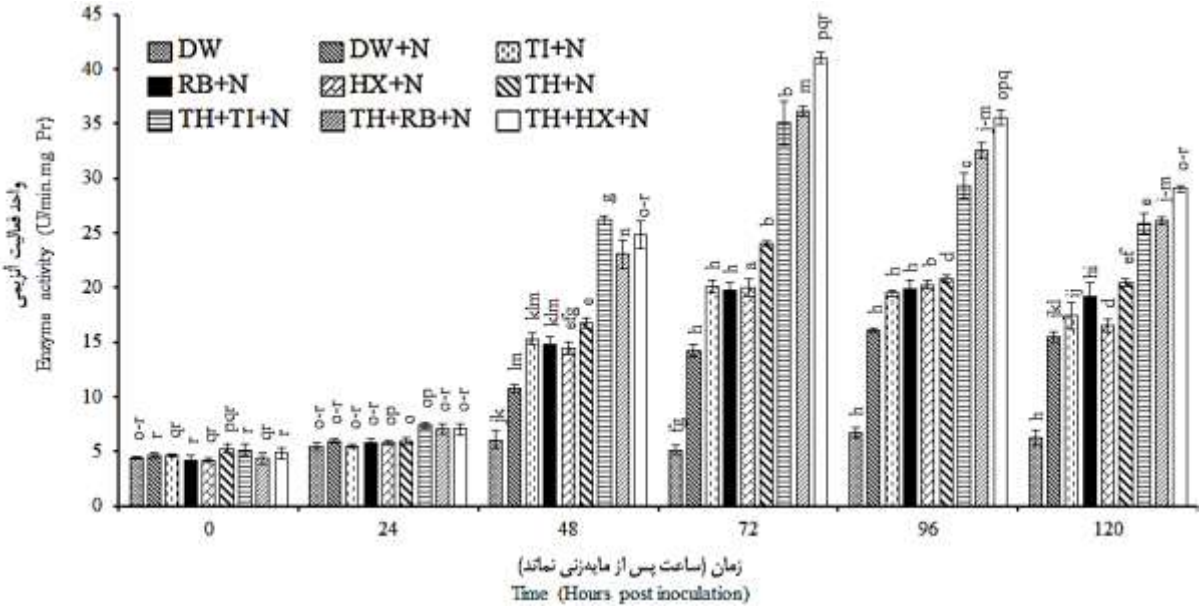


شکل ۱- فعالیت آنزیمی پراکسیداز؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانوئیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گرهی: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 1- Peroxidase Enzyme Activity: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different (P≤ 0.05). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water

آنزیم پلی فنل اکسیداز

میزان فعالیت آنزیم پلی فنیل اکسیداز در گیاهان مورد بررسی پس از مایه‌زنی نماتد تا ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی نماتد با شیب ملایم افزایش پیدا کرد ولی از نقطه زمانی ۲۴ ساعت تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی نماتد، با یک شیب تند روند صعودی پیدا کرد و پس از گذشت ۷۲ ساعت روند نزولی به خود گرفت. بالاترین میزان فعالیت آنزیمی در گیاهان تیمار شده با تریکودرما و هگزانوئیک اسید (TH+HX)، تریکودرما و ریبوفلاوین (TH+RB) و تریکودرما و تیامین (TH+TI) (به ترتیب ۴۱/۰۴، ۳۶/۱۴ و ۳۵/۰۴ واحد بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در نقطه زمانی ۷۲ ساعت پس از آلودگی مشاهده گردید (شکل ۲).



شکل ۲- فعالیت آنزیمی پلی فنل اکسیداز؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانوئیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گرهی: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 2- Polyphenol oxidase Enzyme Activity: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different (P≤ 0.05). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water

آنزیم کاتالاز

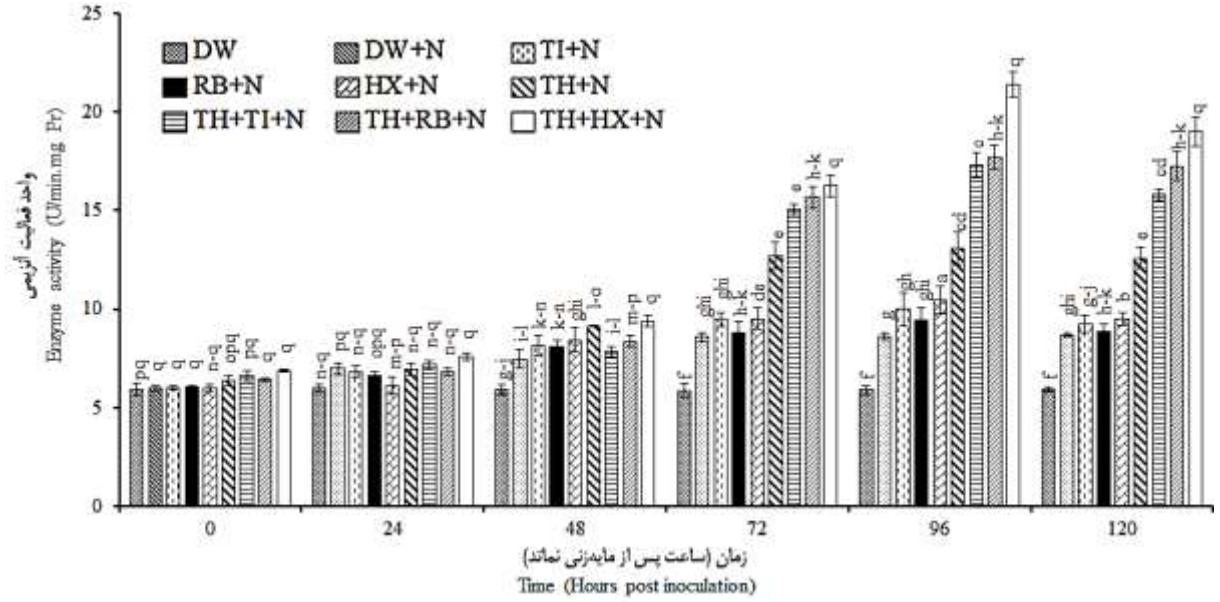
میزان فعالیت آنزیم کاتالاز پس از گذشت ۴۸ ساعت از مایه‌زنی نماتد روند صعودی پیدا کرد و در گام زمانی ۹۶ ساعت به بالاترین میزان خود رسید. بالاترین میزان فعالیت کاتالاز در گیاهان تیمار شده با تریکودرما و هگزانوئیک اسید (TH+HX)، تریکودرما و ریبوفلاوین (TH+RB) و تریکودرما و تیامین (TH+TI) و به ترتیب با مقادیر ۲۱/۳۹، ۱۷/۷۰ و ۱۷/۲۷ واحد بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین در نقطه زمانی ۹۶ ساعت مشاهده گردید (شکل ۳).

آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز پس از ۱۲۰ ساعت از ایجاد آلودگی در گیاهان تحت تیمار به بالاترین میزان خود رسید و پس از آن روند نزولی پیدا کرد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمارهای تریکودرما و هگزانوئیک اسید (TH+HX)، تریکودرما و ریبوفلاوین (TH+RB) و تریکودرما و تیامین (TH+TI) به ترتیب با مقادیر ۱۶۰/۶۵، ۱۴۰/۲۳ و ۱۱۰/۰۳ واحد فعالیت آنزیمی بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین ثبت گردید (شکل ۴).

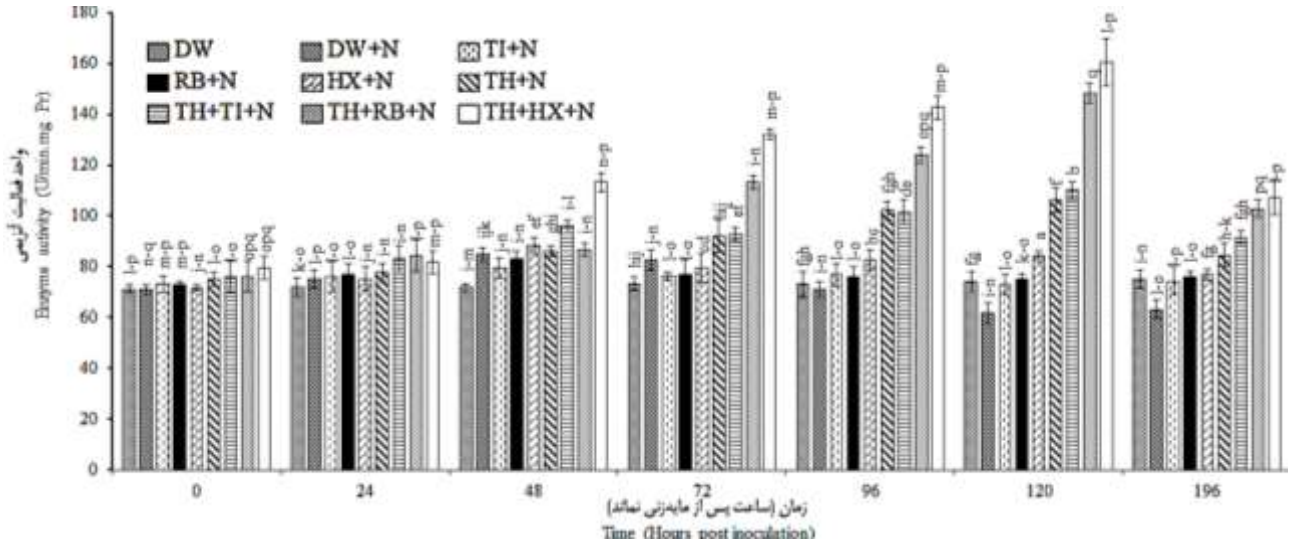
میزان فنل کل

پس از ۴۵ روز از مایه‌زنی نماتد به گیاهان تحت تیمار، میزان فنل کل در ریشه این گیاهان اندازه‌گیری شد. بر اساس این نتایج، بالاترین میزان فنل کل (۱۲۵/۳۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر یک گرم ریشه) در ریشه گیاهان تیمار شده با قارچ تریکودرما و ماده شیمیایی ریبوفلاوین (TH+RB) مشاهده گردید و پس از آن در گیاهان تیمار شده با تریکودرما و هگزانوئیک اسید (TH+HX) و تریکودرما و تیامین (TH+TI) بالاترین میزان فنل کل به ثبت رسید (شکل ۵).



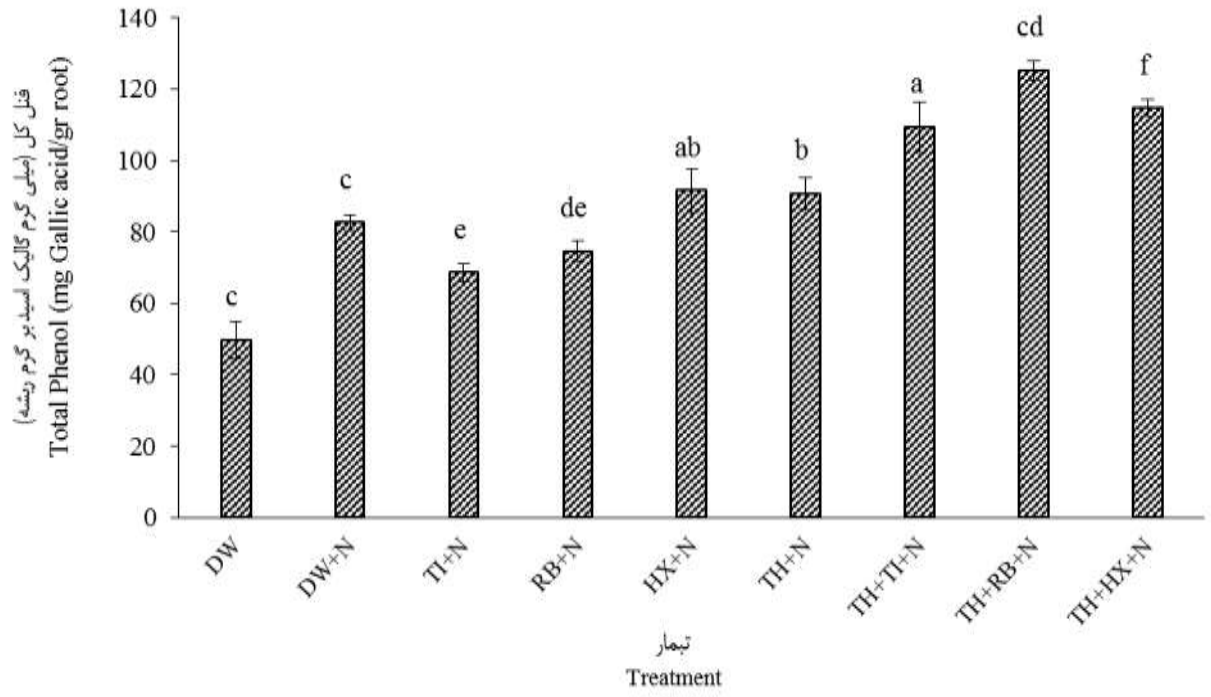
شکل ۳- فعالیت آنزیمی کاتالاز: اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانوئیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گرهی: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 3- Catalase Enzyme Activity: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different (P≤ 0.05). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water



شکل ۴- فعالیت آنزیمی فنیل آلانین آمونیالیاز؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانوئیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گرهی: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 4- Phenyl Alanin ammonia Lyase: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different (P≤ 0.05). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water



شکل ۵- میزان محتوای کل در ریشه گوجه فرنگی؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانوئیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گرهی: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 5- Total Phenol Content in tomato root: Data are means of three biological Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different (P≤ 0.05). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water

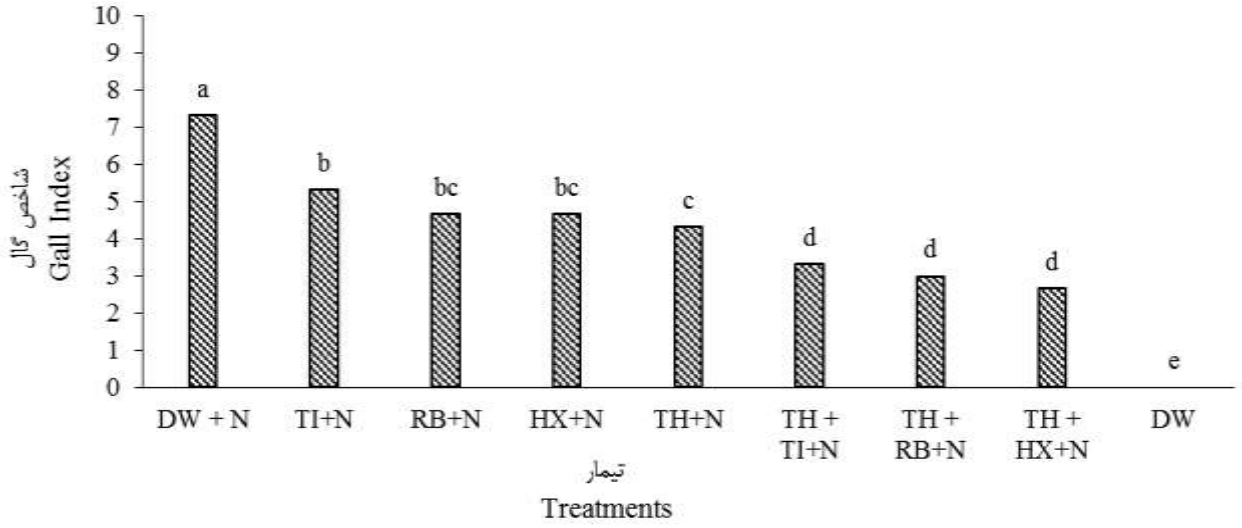
شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد

شاخص‌های بیماری‌زایی در گیاهان مورد بررسی با تیمارهای ذکر شده پس از ۴۵ روز از مایه‌زنی نماتد اندازه‌گیری شد. در گیاهان تیمار شده با تریکودرما و هگزانوئیک اسید به صورت همزمان بیشترین میزان کاهش در شاخص‌های بیماری مشاهده گردید. در تمامی تیمارها، شاخص گال نسبت به گیاهان شاهد (۷/۳۳)، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌داد. پایین‌ترین میزان شاخص گال (۲/۶۷) در گیاهان تحت تیمار تریکودرما و هگزانوئیک اسید به صورت همزمان مشاهده گردید (شکل ۶). همچنین کمترین تعداد کیسه تخم و تعداد تخم درون هر کیسه تخم به ترتیب در گیاهان تیمار شده TH+HX+N، TH+RB+N و TH+TI+N مشاهده گردید (شکل ۷ و ۸).

بحث

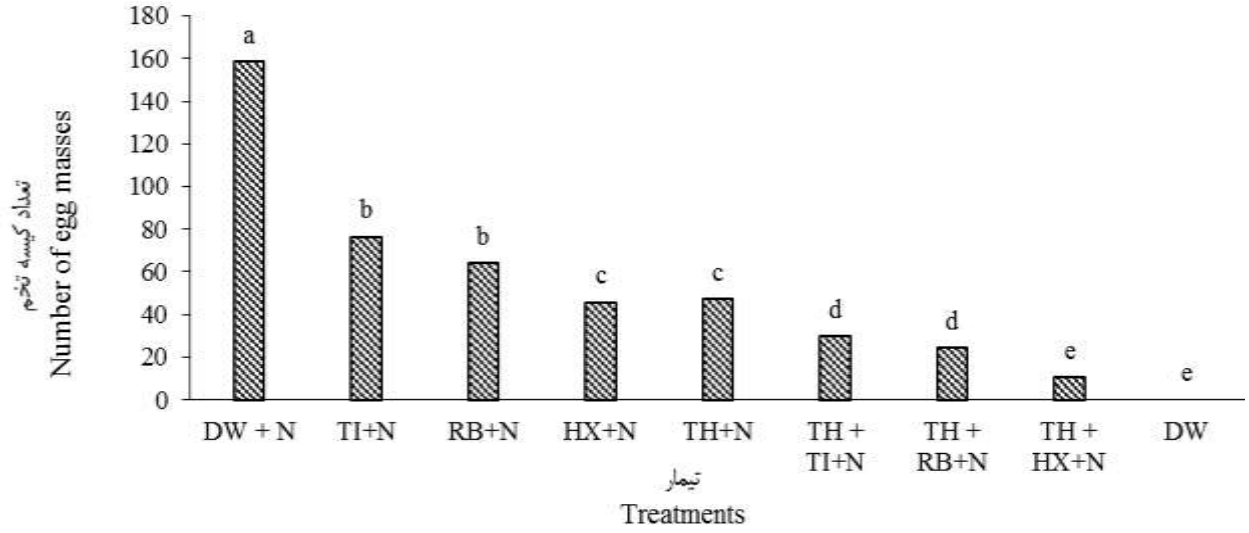
القای مقاومت سیستمیک در گیاهان می‌تواند از طریق کاربرد عوامل زنده و غیرزنده صورت پذیرد. تاثیر ترکیبات شیمیایی و میکروارگانیسم‌های متعددی بر القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است و سطوح متفاوتی از مقاومت به بیمارگرهای گیاهی تحت تاثیر این عوامل مشاهده شده است. با این وجود، تاثیر این عوامل بر القای مقاومت علیه نماتدهای انگل گیاهی کمتر از سایر بیمارگرهای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش تاثیر جدایه BI قارچ *Trichoderma harzianum* به تنهایی و همچنین در ترکیب با سه ترکیب شیمیایی تیامین، ریبوفلاوین و هگزانوئیک اسید بر میزان مقاومت گیاه گوجه فرنگی علیه نماتد ریشه گرهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد بیشترین تاثیر قارچ تریکودرما بر کاهش شاخص‌های بیماری در استفاده همزمان این قارچ با ترکیب شیمیایی هگزانوئیک اسید به دست می‌آید. توانایی جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما بر کاهش خسارت بیماری‌های نماتدی در پژوهش‌های فراوانی گزارش شده است. مکانیسم‌های بیوکنترلی متعددی برای قارچ تریکودرما در شرایط طبیعی ذکر شده است، بطوری‌که اثر بیوکنترلی یک جدایه را می‌توان نتیجه‌ی مجموعه‌ی مکانیسم‌هایی دانست که به صورت: اثر مستقیم روی بیمارگر، افزایش مقاومت گیاه به بیمارگر، اثر بر رابطه‌ی متقابل میزبان و بیمارگر و همچنین تاثیر بر رشد گیاه از طریق تولید مواد شبه هورمونی و بهبود جذب مواد غذایی صورت می‌پذیرد، اعمال

می‌شود (Zhang *et al*., 2009) در پژوهشی که توسط کواری و همکاران انجام شد، تاثیر مستقیم میزان تولید آنزیم کیتیناز خارج سلولی توسط جدایه های قارچ تریکودرما بر توانایی بیوکنترلی جدایه های این قارچ علیه نماتد ریشه گرهی به اثبات رسید که با توجه به میزان بالای کیتین موجود در دیواره تخم این نماتد، قابل درک می باشد (Kavari *et al*., 2014).



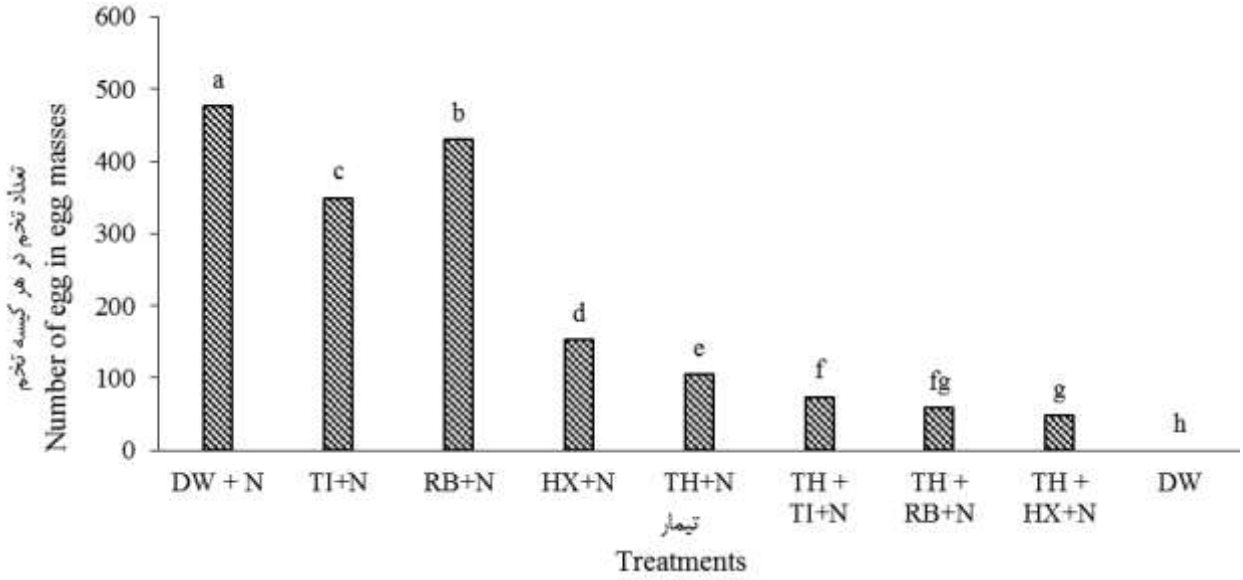
شکل ۶- شاخص گال نماتد در گیاهان تحت تیمار: اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانوئیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گرهی: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 6- Gall Index in treated tomato root: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different (P≤ 0.05). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water



شکل ۷- تعداد کیسه تخم در ریشه گوجه فرنگی؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانوئیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گرهی: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 7- Number of egg masses in tomato root: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different (P≤ 0.05). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water



شکل ۸- تعداد تخم درون هر کیسه تخم؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانوئیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گرهی: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 8- Number of eggs in egg masses in tomato root: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different (P≤ 0.05). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water

پژوهشی دیگر در این زمینه تاثیر چهار جدایه از قارچ تریکودرما بر کاهش شاخص گال نماتد، کاهش تعداد کیسه تخم و همچنین تعداد تخم موجود در هر کیسه تخم برابر با کاربرد ترکیب شیمیایی اکسامیل را نشان داد (Herrera-Parra *et al.*, 2018). همچنین در پژوهشی که توسط صاحبانی و هادوی انجام شد، توانایی کنترل زیستی جدایه BI قارچ تریکودرما علیه نماتد ریشه گرهی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد این قارچ سبب کاهش معنادار شاخص‌های بیماری و همچنین افزایش میزان تولید آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز در گیاهان تیمار شده با این قارچ می‌گردد که همسو با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر می‌باشد (Sahebani and Hadavi, 2008). آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز از آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد که در تولید لیگنین در ساختار گیاه موثر می‌باشد. افزایش میزان تولید لیگنین در ریشه گیاه، میزان مقاومت گیاه به نماتدها را افزایش می‌دهد. در ارقام حساس به نماتد سطح تولید این آنزیم تحت تاثیر حمله نماتد کاهش می‌یابد. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که تیمار گیاهان حساس به نماتد با جدایه‌های قارچ تریکودرما سبب بالارفتن سطح آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در ریشه گیاه و افزایش مقاومت به نماتد می‌شود.

پژوهش‌های زیادی در زمینه تاثیر ترکیبات شیمیایی نظیر هگزانوئیک اسید، تیامین و ریبوفلاوین بر بیمارگرهای گیاهی انجام شده است اما در زمینه تاثیر این ترکیبات بر نماتدهای بیمارگر گیاهی گزارش چندانی در دست نمی‌باشد. در پژوهشی که بر روی تاثیر ترکیب شیمیایی هگزانوئیک اسید بر القای مقاومت در گیاه گوجه فرنگی علیه قارچ *Botrytis cinerea* انجام شد مشخص گردید این ترکیب شیمیایی سبب تشکیل زخم‌های کوچکتر و رسوب کالوس بیشتر نسبت به گیاهان شاهد می‌شود در حالی که رسوب کالوس در گیاهان غیر آلوده به *Botrytis cinerea* و تیمار شده با هگزانوئیک اسید صورت نپذیرفت که این امر یکی از نمودهای القای مقاومت در گیاهان تیمار شده با هگزانوئیک اسید علیه این قارچ می‌باشد. همچنین در گیاهان تیمار شده با این ترکیب و آلوده به قارچ میزان تجمع کافئیک اسید نسبت به گیاهان شاهد به طرز معناداری افزایش پیدا کرد که در ارتباط مستقیم با محتوای فنل کل گیاه می‌باشد. این پژوهش همچنین بیان داشت که هگزانوئیک اسید در غلظت ۲ میلی‌مولار فاقد هر گونه اثر میکروب‌کشی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد (Zhang *et al.*, 2009). همچنین پژوهشی دیگر در این زمینه نشان داد که هگزانوئیک اسید با فعال کردن مسیرهای مقاومتی وابسته به جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید سبب القای مقاومت در گیاه گوجه فرنگی علیه باکتری *Pseudomonas syringae* از طریق افزایش میزان بیان ژن‌های JMT (Jasmonic acid carboxyl methyltransferase) و PR1 و PR5 می‌گردد.

گروه دیگری از ترکیبات شیمیایی که اخیرا در زمینه القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است،

ویتامین‌های گروه B شامل تیامین (ویتامین B1) و ریبوفلاوین (ویتامین B2) می‌باشند. نتایج پژوهشی که به منظور بررسی تاثیر چند ترکیب شیمیایی شامل هیومیک اسید، تیامین، هیدروژن پراکسید، گلوتامیک اسید و فنیل الانین با غلظت‌های مختلف بر کاهش خسارت نماتد *Meloidogyne incognita* در چغندر قند انجام شد، نشان داد که دو تیمار تیامین و هیومیک اسید با غلظت ۲۰۰۰ppm بیشترین تاثیر را در افزایش شاخص‌های رشدی و میزان آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز و همچنین کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد دارند (Dina *et al*,. 2013). همچنین نتایج پژوهش دیگری که در جهت بررسی تاثیر تیامین بر القای مقاومت علیه نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne graminicola*) در گیاه برنج صورت گرفت نشان داد که تیامین با افزایش تولید و تجمع H_2O_2 در گیاه سبب بالا بردن مقاومت شیمیایی گیاه در برابر نماتد می‌گردد و از طرفی با افزایش تولید آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز سبب افزایش تولید لیگنین در گیاه از مسیر فنیل پروپانوئید و به دنبال آن افزایش مقاومت ساختاری گیاه برنج به این بیمارگر می‌شود. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد تیامین به صورت مستقیم فاقد سمیت بر روی سنین مختلف این نماتد می‌باشد و تاثیر آن بر کاهش خسارت نماتد از طریق القای مقاومت می‌باشد (Huang *et al*., 2016). همچنین نتایج یک بررسی که در سال ۲۰۰۵ در زمینه بررسی تاثیر تیامین بر القای مقامت در گیاهان در برابر بیمارگرهای گیاهی انجام شد، نشان داد که این ترکیب سبب القای مقاومت علیه باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در گیاه برنج، القای مقاومت علیه قارچ *Colletotrichum lagenarium* و *Sphaerotheca fuliginea* در گیاه خیار و همچنین القای مقاومت علیه باکتری *Psudomonas syringae* pv. *syringae* در گیاه گوجه فرنگی می‌گردد (Ahn *et al*., 2005).

در پژوهشی که به منظور بررسی تاثیر چندین تیمار شیمیایی موثر بر مقاومت سیستمیک اکتسابی بر میزان تولید مثل دو نماتد *Meloidogyne javanica* و *Rotylenchulus reniformis* در آناناس انجام شد، تیمار ریبوفلاوین سبب کاهش معنی‌دار شاخص‌های بیماری‌زایی این دو نماتد و همچنین افزایش شاخص‌های رشدی در گیاه میزبان نسبت به تیمار شاهد گردید (Chinnasri and Schmitt, 2006). همچنین در یک بررسی دیگر مشخص شد تیمار گیاه برنج با ریبوفلاوین با افزایش سطح بیان ژن لیپواکسی ژناز (*LOX*) به عنوان یک ژن کلیدی در مسیر اکتادکانوئید سبب بالا بردن سرعت تولید لیگنین و به دنبال آن افزایش مقاومت به بیماری شیت بلایت ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* می‌شود (Taheri and Tarighi, 2010).

پژوهشی دیگر که در سال ۲۰۱۱ با هدف بررسی تاثیر تیمار گیاه سویا با تیامین و ریبوفلاوین بر میزان القای مقاومت علیه قارچ ساق سیاه با عامل *Macrophomina phaseolina* صورت گرفت نشان داد که تیمار این گیاه با ترکیبات ذکر شده سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های peroxidase (PO)، polyphenol oxidase (PPO)، phenylalanine ammonia lyase (PAL) و pathogenesis related (PR) protein (chitinase) نسبت به تیمار شاهد می‌گردد. این بررسی نشان داد که افزایش میزان فعالیت آنزیمی دو روز پس از مایه‌زنی تیامین و ریبوفلاوین آغاز می‌گردد و هشت روز پس از تیمار به حداکثر سطح خود می‌رسد و پس از آن روند کاهشی دارد. همچنین بیشترین میزان فنل کل و لیگنین به ترتیب شش و ده روز پس از تیمار گیاهان ثبت گردید (Abdel-Monaim, 2011). بررسی دیگری که در زمینه تاثیر استفاده از ریبوفلاوین بر کاهش میزان بیماری سفیدک داخلی انگور صورت پذیرفت نشان داد که تیمار ریبوفلاوین با غلظت ۲ میلی‌مولار یک تا سه روز قبل از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری، سبب کاهش ۸۶ درصدی میزان پیشروی بیماری می‌گردد که این کاهش بیماری ناشی از تاثیر مستقیم قارچ‌کشی این ترکیب نمی‌باشد بلکه به دنبال افزایش تولید H_2O_2، افزایش بیان ژن‌های بالادستی موثر در دفاع گیاه و همچنین افزایش میزان تولید کالوس ناشی از تیمار ریبوفلاوین در گیاه میزبان می‌باشد (Boubakri *et al*., 2013).

القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی یکی از روش‌های مدیریت بیماری‌های گیاهی می‌باشد که در کنار سایر روش‌های مدیریتی می‌تواند خسارت بیمارگرهای گیاهی را به مقدار قابل توجهی کاهش دهد. استفاده از میکروارگانیسم‌هایی همچون تریکودرما در بالا بردن سطح مقاومت گیاهان خطرات استفاده از ترکیبات شیمیایی جهت کنترل بیمارگرهای گیاهی را ندارد و یکی از کم خطرترین استراتژی‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهی در یک کشاورزی پایدار می‌باشد. همچنین کاربرد ترکیبات شیمیایی که توانایی ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاهان در برابر بیمارگرهای گیاهی را دارند نیز می‌توانند به عنوان راهکاری کم خطر در مدیریت بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد. شناخت مسیرهای مقاومتی متاثر از این ترکیبات شیمیایی یکی از ملزومات افزایش کارایی این ترکیبات در القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی می‌باشد. یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان دهنده تاثیر قبول و چشمگیر استفاده از ترکیبات شیمیایی ذکر شده به همراه جدایه BI قارچ تریکودرما بر میزان کاهش خسارت نماتد ریشه گرهی در گیاه گوجه فرنگی می‌باشد. این نتایج انجام مطالعات بیشتر به منظور بررسی و شناخت مکانیسم‌های تاثیر این ترکیبات بر افزایش مقاومت میزبان علیه این بیمارگر را توجیه می‌نماید.

منابع

1. Abdel-Monaim, M.F. (2011). Role of riboflavin and thiamine in induced resistance against charcoal rot disease of soybean. *Egyptian Journal of Phytopathology 39*(1): 1-23. https://doi.org/10.21608/EJP.2011.158587.
2. Ahn, I.P., Kim, S., & Lee, Y.H. (2005). Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiology 138*(3): 1505-1515. https://doi.org/10.1104/pp.104.058693.
3. Ahn, I.P., Kim, S., Lee, Y.H., & Suh, S.C. (2007). Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiology 143*(20): 838-848. https://doi.org/10.1104/pp.106.092627.
4. Al-Hazmi, A.S., & TariqJaveed, M. (2016). Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and Trichoderma viride against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences 23*(2): 288-292. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007.
5. Aryal, S.K., Davis, R.F., Stevenson, K.L., Timper, P., & Ji, P. (2011). Influence of infection of cotton by *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* on the production of enzymes involved in systemic acquired resistance. *Journal of Nematology 43*(3-4): 152-159.
6. Asensi-Fabado, M.A., & Munné-Bosch, S. (2010). Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends in Plant Science 15*(10): 582-592. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.07.003.
7. Aver'Yanov, A.A., Lapikova, V.P., Nikolaev, O.N., & Stepanov, A.I. (2000). Active oxygen-associated control of rice blast disease by riboflavin and roseoflavin. *Biochemistry. Biokhimiia 65*(11): 1292-1298.
8. Bernard, G.C., Egnin, M., & Bonsi, C. (2017). The Impact of Plant-Parasitic Nematodes on Agriculture and Methods of Control. *Nematology-Concepts, Diagnosis and Control* 1: 121-151. https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.68958.
9. Boubakri, H., Chong, J., Poutaraud, A., Schmitt, C., Bertsch, C., Mliki, A., Masson, J.E., & Soustre-Gacougnolle, I. (2013). Riboflavin (Vitamin B_2) induces defence responses and resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *European Journal of Plant Pathology 136*(4): 837-855. https://doi.org/10.1007/s10658-013-0211-x.
10. Bradford, Marion M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry 72.1*(2): 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
11. Bridge, J., & Page, S.L.J. (1980). Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *International Journal of Pest Management 26*(3): 296-298. https://doi.org/10.1080/09670878009414416.
12. Chinnasri, B., Sipes, B.S., & Schmitt, D.P. (2006). Effects of inducers of systemic acquired resistance on reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Rotylenchulus reniformis* in pineapple. *Journal of Nematology 38*(3): 319. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.666.22.
13. Dias, M.A., & Manuela Costa, M. (1983). Effect of low salt concentrations on nitrate reductase and peroxidase of sugar beet leaves. *Journal of Experimental Botany 34*(5): 537-543. https://doi.org/10.1093/jxb/34.5.537.
14. Dina, S.S., Ibrahim, A.H., Nour El-Deen, A.E.K., & Fatma, A.M.M. (2013). Induction of systemic resistance in sugar-beet infected with *meloidogyne incognita* by humic acid, hydrogen peroxide, thiamine and two amino acids. *Egypt Journal Agronematol 12*: 22-41.
15. Dong, H., & Beer, S.V. (2000). Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology 90*(8): 801-811. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.801.
16. FAOSTAT: http://www.fao.org/faostat/en/#data.
17. Fatma, M.A., Khalil, A.E., El Deen, N.A., & Dina, S. (2014). Induction of systemic resistance in sugar-beet against root-knot nematode with commercial products. *Journal of Plant Pathology & Microbiology 5*(3): 37-43. https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000236.
18. Feyisa, B., Lencho, A., Selvaraj, T., & Getaneh, G. (2015). Evaluation of some botanicals and *Trichoderma harzianum* for the management of tomato root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chit Wood). *Advances in Crop Science and Technology 4*(1): 2-10. https://doi.org/10.4172/2329-8863.1000201.
19. Ghareeb R.Y., Adss I.A., Bayoumi, S.R., & El-Habashy, D.E. (2019). The nematicidal potentiality of some algal extracts and their role in enhancement the tomato defense genes against root knot-nematodes. *Egyptian Journal of Biological Pest Control 29*(1): 53-63.
20. Gomez-Vasquez, R.O.C.Í.O., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J.R., & Cooper, R.M. (2004). Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Annuals of Botany 94*(1): 87-97.
21. Herrera-Parra, E., Ramos-Zapata, J., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suarez, J., & Reyes-Ramírez, A. (2018). Species of *Trichoderma* antagonistic to the root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in habanero peppers. *FYTON 87*: 7-13.
22. Huang, W.K., Ji, H.L., Gheysen, G., & Kyndt, T. (2016). Thiamine-induced priming against root-knot nematode infection in rice involves lignification and hydrogen peroxide generation. *Molecular Plant Pathology 17*(4): 614-624. https://doi.org/10.1111/mpp.12316.

23. Jansson, H.B., Jeyaprakash, A., & Zuckerman, B.M. (1985). Control of root-knot nematodes on tomato by the endoparasitic fungus *Meria coniospora*. *Journal of Nematology 17*(3): 327-329.
24. Kato, M., & Shimizu, S. (1987). Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Canadian Journal of Botany 65*(4): 729-735. https://doi.org/10.1139/b87-097.
25. Kavari, M., Mahdikhani Moghadam, E., & Rouhani, H. (2014). Survey on chitinase production by several isolates of Trichoderama and its biological control effect on tomato root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Plant Protection 29*(1): 123-133.
26. Kayani, M.Z., Sarwar, G., & Muhammad, S. (2001). Control of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato plants by using root extracts of plants. *Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics 102*(2): 143-146. https://doi.org/10.30486/IJROWA.2021.1937252.1307.
27. Leyva, M.O., Vicedo, B., Finiti, I., Flors, V., Del Amo, G., Real, M.D., García-Agustín, P., & González-Bosch, C. (2008). Preventive and post-infection control of Botrytis cinerea in tomato plants by hexanoic acid. *Plant Pathology 57*(6): 1038-1046. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01891.x.
28. Liu, H., Jiang, W., Bi, Y., & Luo, Y. (2005). Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. *Jiubao*) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology 35*(3): 263-269. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.08.006.
29. Malamy, J., Sanchez-Casas, P., Hennig, J., Guo, A., & Klessig, D.F. (1996). Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. *Molecular plant-microbe interactions:* MPMI *(*USA). https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9173.
30. Navia, D., Delgado, A., Viera, W., Báez, F., & Trevor, J. (2017). Application of Bio-Products in Ecuadorian Agriculture: Case Banana. *International Journal of Clinical and Biological Sciences 2* (2): 37-43. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120384.
31. Sahebani, N., & Hadavi, N. (2008). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry 40*(8): 2016-2020. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.011.
32. Sahebani, N., Hadavi, N.S., & Zade, F.O. (2011). The effects of β-amino-butyric acid on resistance of cucumber against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Acta Physiologiae Plantarum 33*(2):443-450. https://doi.org/10.1007/s11738-010-0564-0.
33. Scalschi, L., Vicedo, B., Camañes, G., Fernandez-Crespo, E., Lapeña, L., González-Bosch, C., & García-Agustín, P. (2013). Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology 14*(4): 342-355. https://doi.org/10.1111/mpp.12010.
34. Sharon, E., Chet, I., Bar-Eyal, M., & Spiegel, Y. (2009). Biocontrol of root-knot nematodes by Trichoderma-modes of action. *International Organisation for Biological and Integrated Control Bulletin 42*: 159-163.
35. Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture 16*(3): 144-158.
36. Szabó, M., Csepregi, K., Gálber, M., Virányi, F., & Fekete, C. (2012). Control plant-parasitic nematodes with Trichoderma species and nematode-trapping fungi: The role of chi18-5 and chi18-12 genes in nematode egg-parasitism. *Biological Control 63*(2): 121-128. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.06.013.
37. Szabó, M., Urbán, P., Virányi, F., Kredics, L., & Fekete, C. (2013). Comparative gene expression profiles of *Trichoderma harzianum* proteases during in vitro nematode egg-parasitism. *Biological Control 67*(3): 337-343. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.002.
38. Taheri, P., & Tarighi, S. (2010). Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. *Journal of Plant Physiology 167*(3): 201-208. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.08.003.
39. Vicedo, B., Flors, V., de la O Leyva, M., Finiti, I., Kravchuk, Z., Real, M.D., García-Agustín, P., & González-Bosch, C. (2009). Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions 22*(11): 1455-1465. https://doi.org/doi.org/10.1094/MPMI-22-11-1455.
40. Zhang, S., Yang, X., Sun, M., Sun, F., Deng, S., & Dong, H.(2009). Riboflavin-induced priming for pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology 51*(2): 167-174. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00763.x.
41. Zhang, S., Gan, Y., & Xu, B.(2014). Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. *BioControl 59*(3): 319-331. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01491.