نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، ص. ۴۲۵-۴۱۷

Journal of Plant Protection
Vol. 25, No. 4, Winter 2012, P. 417-425

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

فاطمه ناصری نسب [۱*]- نوازاله صاحبانی [۲]- حسن رضا اعتباریان [۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۸

چکیده

در این مطالعه اثر استفاده از کاربرد توأم سالیسیلیک اسید به‌عنوان محرک مقاومت و قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* BI بر بیماری ناشی از نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* روی گیاه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y در گلخانه و آزمایشگاه بررسی شد. گیاهچه‌ها در مرحله ۶ برگی توسط سالیسیلیک اسید با غلظت ۵ میلی مولار، سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* BI با غلظت ۱۰۶ اسپور در میلی‌لیتر و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال سن دو نماتد مایه زنی گردید. در بررسی گلخانه ای، میزان بیماری در تمامی تیمارهای تلفیقی به‌طور معنی دار ($P < ۰/۰۵$) در مقایسه با شاهد کاهش یافت. میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و مقدار فنل کل ریشه طی روزهای اول تا هشتم پس از مایه زنی با نماتد اندازه‌گیری شد. استفاده از تلفیق سالیسیلیک اسید و عامل آنتاگونیست باعث افزایش معنی دار میزان فنل کل و میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در مقایسه با شاهد شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و نیز بیشترین میزان فنل کل که به ترتیب ۰/۶۸ µg/ml و ۰/۸۴ µg/g بود در روز چهارم پس از مایه‌زنی با نماتد مشاهده شد. در بررسی آزمایشگاهی سالیسیلیک اسید و عامل آنتاگونیست به ترتیب با ۳۳/۹۶ و ۶۶/۴ درصد افزایش مرگ و میر لاروهای سن ۲ نماتد دارای اختلاف معنی دار با شاهد بودند. همچنین *T. harzianum* BI درصد تفریخ تخم‌های نماتد را به میزان ۸۴ درصد کاهش داد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که تلفیق *T. harzianum* BI و سالیسیلیک اسید علیه نماتد مولد گره ریشه، می‌تواند در مدیریت این بیماری در شرایط گلخانه روی گیاه گوجه‌فرنگی بسیار مؤثر واقع شود.

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

مقدمه

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

به‌دلیل مشکل بودن مدیریت و مبارزه شیمیایی نماتدها، محققان به دنبال دستیابی به را ه‌های مناسب کنترل این نماتد هستند. در سال های اخیر روش کنترل بیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است (۳۲). عوامل بیوکنترل مختلفی از جمله تعدادی از آنتاگونیست‌های قارچی (۲۲)، در جهت کنترل نماتدهای انگل گیاهی به کار گرفته می‌شوند. در خاک‌های ایران *Trichoderma harzianum* از بهترین آنتاگونیست‌ها شناخته شده است که پتانسیل بالایی در کنترل بیماری های خاکزاد، برگی، پس از برداشت و غیره دارد. این آنتاگونیست دارای پتانسیل بالقوه در کنترل نماتد مولد گره ریشه بوده و مکانیسم القا مقاومت این قارچ علیه بسیاری از بیمارگرها از جمله نماتدها اثبات شده است (۳۲). شارون و همکاران نشان دادند که در خاک‌های آلوده به نماتد *Meloidogyne spp.* رشد گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با جدایه *T. harzianum* 203 افزایش یافته و گال‌های ریشه در مقایسه با شاهد به میزان قابل توجهی کاهش یافته است (۳۲). طبق نتایج آتی تالا و همکاران حضور یا غیاب ژن‌های مقاومت عامل تعیین کننده در مقاومت حاصله نسبت به عوامل بیماریزا نیست، بلکه سرعت و مقدار بیان این ژن‌ها و میزان تأثیر این ترکیبات روی پاتوژن است که سبب واکنش سازگاری یا ناسازگاری می شود. احتمالاً همه گیاهان پتانسیل ژنتیکی برای القا ژن‌های مقاومت را به‌صورت بالقوه

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

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

هدف از انجام این تحقیق استفاده از *T. harzianum* BI و سالیسیلیک اسید به‌منظور به کارگیری همزمان توان بیوکنترلی قارچ عامل آنتاگونیست و تحریک سیستم دفاعی گیاه توسط محرک شیمیایی، علیه نماتد مولد گره ریشه *M. javanica*، ارزیابی میزان بیماری در گلخانه و بررسی تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و میزان فنل کل در ریشه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y و همچنین بررسی تأثیر مستقیم عامل آنتاگونیست و غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر تخم و لارو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

عامل بیماری

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

آنتاگونیست

جدایه *T. harzianum* BI از آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران پردیس ابوریحان به صورت خالص تهیه و پس از تک اسپور کردن، روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) تکثیر شد (۱۱). پس از تهیه سوسپانسیون اسپور در آب مقطر با استفاده از لام هماسیتومتر (لام گلبول شمار) غلظت موثر 10^6 اسپور در میلی‌لیتر قارچ جهت استفاده در آزمایشات تهیه شد (۳).

محرک شیمیایی

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

آزمون بررسی اثر مستقیم غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مرگ و میر لارو سن ۲ نماتد

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

آزمون اثر مستقیم *T. harzianum* BI روی مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه

در این آزمایش از کشت ۱۰ روزه قارچ روی محیط آب آگار (که از محیط PDA بر روی محیط آب آگار منتقل شده بود) استفاده شد و سوسپانسیونی از لاروهای تازه تفریخ شده و استریل نماتد با جمعیت حدود ۲۰-۳۰ لارو در یک میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه و به تشتک‌های پتری اضافه شد و سپس در ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و به ترتیب پس از گذشت زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت میزان مرگ و میر لاروها در ظروف کشت تیمار و شاهد شمارش شد. ظروف کشت فاقد قارچ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. این آزمایش با ۶ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد (۱۶).

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

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

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

ابتدا بذور گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y با وایتکس ۱۰ درصد (حاوی ۵ درصد هیپوکلریت سدیم و به مدت یک دقیقه) ضد عفونی سطحی شد و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر سترون در داخل گلدان‌های یک کیلویی حاوی خاک الک شده (شامل هوموس، خاک مزرعه، ماسه با نسبت ۱:۱:۲ و پاستوریزه شده در دمای ۸۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو) کشت گردید. در این آزمایش گیاهچه‌های گوجه فرنگی در مرحله ۶ برگی توسط مقدار ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ *T. harzianum* BI (در روش خیساندن خاک) با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر، ۲۵ میلی‌لیتر محلول اسید سالیسیلیک ۵ میلی مولار (در روش خیساندن خاک) و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال نماتد به ازاء هر گیاه مایه زنی شدند. تیمارها شامل: ۱) شاهد: گیاه مایه زنی شده با نماتد (N) ، ۲) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ به صورت روش خیساندن ریشه و سالیسیلیک اسید به روش خیساندن خاک(Trd+SAsd+N)، ۳) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ به روش خیساندن ریشه و سالیسیلیک اسید به روش اسپری روی برگ‌ها (Trd+SAsp+N) ۴) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ و سالیسیلیک اسید به روش خیساندن خاک (Tsd+SAsd+N)۵) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ به روش خیساندن خاک و سالیسیلیک اسید به روش اسپری روی برگ‌ها (Tsd+SAsp+N) بودند. برای کاهش اثر سوء سالیسیلیک اسید بر گیاه (اثر سوزندگی) تنها برگ‌های پائینی و مسن تر گیاه اسپری شدند. گیاهچه‌ها پس از مایه زنی به مدت ۴۵ روز در شرایط مساعد گلخانه (دمای ۲۴-۲۸ درجه سانتی گراد، ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور) نگهداری شدند و پس از آن ریشه‌ها برای بررسی بیماری(از شاخص‌های تعداد گال ایجاد شده، متوسط قطر بزرگترین گال‌ها، تعداد توده تخم به ازاء هر گیاه و تعداد تخم‌های درون هر توده تخم جهت بررسی بیماری استفاده شد) به آزمایشگاه منتقل شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۶ تکرار انجام شد.

ارزیابی تغییرات برخی ترکیبات دفاعی در ریشه گوجه فرنگی مایه زنی شده با نماتد ، قارچ *T. harzianum* BI و سالیسیلیک اسید

در این آزمایش نیز همانند آزمایش قبل گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تهیه، و در مرحله ۶ برگی مایه زنی گردیدند. گیاهچه‌ها توسط مقدار ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ *T. harzianum* BI (در روش خیساندن خاک) با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر، ۲۵ میلی لیتر محلول اسید سالیسیلیک ۵ میلی مولار (در روش خیساندن خاک) و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال نماتد به ازاء هر گیاه مایه زنی شدند. تیمارها شامل ۱) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ به روش خیساندن ریشه و سالیسیلیک اسید به روش اسپری روی برگ‌ها (Tsd+ SAsp+ N) ۲) گیاه مایه زنی شده با نماتد، قارچ به روش خیساندن ریشه (Tsd+ N) ۳) گیاه مایه زنی شده با نماتد، سالیسیلیک اسید به روش اسپری روی برگ‌ها (SAsp+N) ۴) گیاه مایه زنی شده با نماتد (N) ۵) گیاه مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل (H). برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. آزمایشات به صورت طرح فاکتوریل ۴× ۸ که فاکتور A شامل ۴ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل ۸ زمان نمونه برداری۱، ۲، ۳ ، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ روز بعد از مایه‌زنی با نماتد بود در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و میزان تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و نیز تغییرات میزان فنل کل در روزهای اول تا هشتم مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی میزان فنل کل و تهیه محلول پایه غلظت‌های فنل استاندارد

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

تهیه منحنی استاندارد فنل

مقدار ۰/۵ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف قبلاً تهیه شده اسید کافئیک را در هفت میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. سه دقیقه بعد از افزودن معرف فولین یک میلی لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به آن اضافه و حجم نهایی محلول با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از گذشت یک ساعت میزان جذب نور در λmax =۷۲۵nm اندازه گیری شد. این مراحل به‌طور جداگانه برای هر کدام از غلظت‌های مختلف اسید کافئیک انجام شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر از محلولی که فاقد اسیدکافئیک بود و به همان میزان آب مقطر اضافه شده بود استفاده شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین فنل کل عصاره به دست آمده در آزمایش‌ها همانند روش تهیه منحنی استاندارد عمل شد. تنها تفاوت در این بود که از ۰/۵ میلی لیتر عصاره استخراج شده گیاه استفاده شد (۳۱).

استخراج فنل گیاه

جهت استخراج ترکیبات فنلی یک گرم بافت ریشه گوجه فرنگی، درون هاون چینی و در درون نیتروژن مایع عصاره گیری شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (pH= ۲) به آن اضافه گردید، مخلوط حاصله از دو لایه پارچه ململ عبور داده شد و در شیشه‌های مک کارتی نگهداری شد. در پایان عصاره حاصل در g ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی داخل لوله‌ها حاوی ترکیبات فنلی است که از رسوب بافتی جدا شده و جهت آزمایشات بعدی در لوله های درب دار ۱۰ میلی لیتری در دمای۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۴).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

۲ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل ۱۸۰۰ میکرولیتر محلول بافر تریس اسیدی (Tris-HCl) ۰/۵ مول با pH =۶/۸ و فنیل آلانین ۶ میکرومول که به آن ۲۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی اضافه شده بود، تهیه گردید. این مخلوط به مدت ۷۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار شد. پس از پایان زمان قید شده با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسیدکلریدریک ۵ نرمال به هر لوله، واکنش متوقف شد. مقدار جذب نور برای هر لوله توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در max λ = 290 nm اندازه‌گیری شد (۱۳). برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. تجزیه آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p< ۰/۰۵$) مورد مقایسه قرار گرفت.

تهیه منحنی استاندارد آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

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

نتایج و بحث

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

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

جدول ۱- اثر غلظت‌های Salicylic acid برمرگ ومیر لارو سن ۲ *M. javanica* در آزمایشگاه

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

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

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

در بررسی میزان بیماری ناشی از نماتد مولد غده در شرایط گلخانه تمامی تیمارهای تلفیقی میزان بیماری را (تعداد گال به ازاء هر گیاه، متوسط قطر بزرگترین گال‌های هر گیاه، تعداد کیسه تخم به ازاء هر گیاه و تعداد تخم درون هر کیسه تخم) به‌طور معنی دار در مقایسه با شاهد (تیمار با نماتد) کاهش دادند. تیمارهای تلفیقی: a) عامل آنتاگونیست به روش خیساندن خاک و سالیسیلیک اسید به صورت اسپری روی برگ‌ها، b) آنتاگونیست به روش خیساندن خاک و سالیسیلیک اسید به روش خیساندن خاک به‌طور موثرتری بیماری را در مقایسه با شاهد و سایر تیمارها کاهش دادند(جدول۴). به نظر میرسد عامل آنتاگونیست در روش خیساندن خاک به نحو موثرتری توان بیوکنترلی خود را بر جلوگیری از پیش روی و نفوذ نماتد به ریشه‌ی گیاه اعمال میکند، زیرا در مقایسه با روش خیساندن ریشه که تنها سطح ریشه توسط اسپورهای قارچ پوشیده می‌شود، در این روش قارچ آنتاگونیست در سطح وسیع تری از خاک اطراف ریشه حضور دارد و در نتیجه بروز خاصیت آنتاگونیستی و ممانعت از تفریخ تخم های نماتد و پیشروی لاروهای نماتد به نحو موثرتری ممکن می‌شود.

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

تیمار	درصد لاروهای مرده بعد از ٤٨ ساعت	درصد لاروهای مرده بعد از ٩٦ ساعت
*C	۱۱/۲b	۲۳/۹۱b
*T	۵۶/۲۱a	۶۶/۴a

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

جدول۳- اثر BI *T.harzianum* بر تفریخ تخم‌های *M.javanica* در شرایط آزمایشگاهی

	درصد تخم‌های تفریخ نشده پس از ١٤ روز	
C	۲۱ b	* C
T	۸۴a	* T

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

شکل۱- پارازیته شدن تخم نماتد *M. javanica*(A)، توسط هیف های قارچ *T. harzianum BI* (B)

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

دارای اثر سینرژیستی بر فعالیت یکدیگر می‌باشند و استفاده توام از آن ها با توجه به اثر مستقیم جدایه آنتاگونیست بر نخم و لارو نماتد و محدود کردن نفوذ نماتد از طرفی و تلفیق آن با اثر غیر مستقیم سالیسیلیک اسید، یعنی تحریک سیستم دفاعی گیاه و در نتیجه آمادگی گیاه برای مقابله با پاتوژن و کاهش توان بیماریزایی آن، می تواند به‌طور موثرتری آلودگی به نماتد مولد گره ریشه را کاهش دهد. ملکی زیارتی و همکاران در بررسی اثر غلظت‌های مختلف سوسپانسیون اسپور جدایه آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* غلظت 10^6 اسپور بر میلی‌لیتر این جدایه را به‌عنوان موثرترین غلظت در کاهش قطر گال و توده تخم معرفی کردند، غلظت مذکور سبب افزایش میزان فنل کل در ریشه گوجه فرنگی شد (۴). طبق نتایج صدیقی و همکاران در کاربرد تلفیق دو عامل *T. harzianum* و *Pseudomonas fluorescens* به شکل B.sd + F.sd (قارچ به روش خیساندن خاک+ باکتری به روش خیساندن خاک) علیه نماتد مولد گره ریشه، این تیمار در وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی تأثیر معنی داری نداشت، اما توانست جمعیت نماتد را به میزان معنی داری نسبت به شاهد کاهش دهد (۳۳). در مطالعه دیگری اثر تلفیق دو عامل بیوکنترل *T. harzianum* BI و *Pseudomonas fluorescens* علیه نماتد *M. javanica* تیمار قارچ به روش خیساندن خاک + باکتری به صورت اسپری روی برگ ها به‌عنوان بهترین تیمار معرفی شد، این تیمار علاوه بر کاهش بیماری در گلخانه، سبب افزایش وزن تر ریشه و قسمت‌های هوایی شد. در استفاده دو عامل به‌صورت خاک کاربرد کاهش بیماری به‌طور موثر مشاهده شد، اما این تیمار در افزایش وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی نسبت به شاهد موثر نبود (۲). در مطالعه مشابهی جدایه Th از قارچ *T. harzianum* توانست تعداد گال‌ها را بر روی ریشه گوجه فرنگی کاهش دهد (۲۰). همچنین کاهش میزان بیماری ناشی از نماتد *M. incognita* در اثر استفاده از تلفیق *Glomus mosseae*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Bradyrhizobium japonicum* گزارش شده است (۲۹).

میزان فنل کل در تیمار تلفیقی (T+SA) در روز اول با سایر تیمارها اختلاف معنی دار نداشت، در دومین روز افزایش میزان فنل کل در این تیمار در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد و این میزان تا روز چهارم دارای روند افزایشی بود و پس از آن در حالی که همچنان دارای اختلاف معنی دار با شاهد بود به تدریج رو به کاهش گذاشت.

جدول ٤- اثر استفاده از تلفیق سالیسیلیک اسید (۵mM) و *T.harzianum* BI (غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر) بر میزان بیماری ناشی از *M. javanica* در شرایط گلخانه

تیمار	تعداد گال	قطر گال	تعداد کیسه تخم	تعداد تخم
N	۲۷۳a	۳/۵a	۱۵۶a	۶۱۲a
Trd+SAsp+N	۳۷c	۱/۳۳b	۲۶c	۲۴۷c
Trd+SAsd+N	۶۶b	۱/۳۱b	۳۱b	۳۳۲b
Tsd+SAsp+N	۱۲d	۱/۱ c	۵/۵d	۲۰۳d
Tsd+SAsd+N	۱۴d	۱/۲c	۵/۷d	۲۲۶cd

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

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

	تیمار		روزهای بعد از مایه زنی نماتد					
	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
T+ SA	e۰/۳۷A	c۰/۶۱A	b۰/۷۴A	a۰/۸۴A	a۰/۸A	c/۶۲ AB	cd۰/۵۷A	d۰/۵۳A
T	f۰/۳۸A	d۰/۵۴B	b۰/۶۸B	b۰/۷۱B	a۰/۸۱A	c۰/۶B	dc۰/۵۶A	e۰/۴۹A
SA	f۰/۴۰A	e۰/۵۱BC	b/۶۹ AB	a۰/۷۵B	c۰/۶۲B	cd۰/۵۹B	de۰/۵۴A	e۰/۵۰A
N	c۰/۴۱A	b۰/۴۸C	b۰/۴۹C	b۰/۵۱C	a۰/۶۲B	a۰/۶۶A	c۰/۴۰B	d۰/۳۳B
H	c۰/۳۴۵A	bc۰/۳۸D	b۰/۴۰D	ab۰/۴۱D	a۰/۴۶C	bc۰/۳۹C	ab۰/۴۱B	c۰/۳۴B

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

در تیمار با عامل آنتاگونیست (T) بیشترین میـزان فنـل کـل در روز پنجم مشاهده شد. در روز ۵، ۷ و ۸ اختلاف میزان فنـل کـل بـا تیمار تلفیقی معنی دار نبود. بیشترین میـزان فنـل کـل در تیمـار بـا سالیسیلیک اسید (SA)، در روز چهارم پـس از مایـه زنـی بـا نماتـد مشاهده شد و پس از آن این میزان به تدریج کاهش یافت. این تیمار بجز روز اول در روزهای بعدی دارای اختلاف معنی دار باشـاهد بـود. ملکی زیارتی نشان داد که میزان فنل کل گوجه فرنگی رقـم مقـاوم King stone پـس از تیمـار بـا قـارچ *Trichoderma harzianum* BI از روز اول پس از مایه‌زنی و طی روزهای متوالی با شاهد اختلاف معنی دار داشته و حـداکثر میـزان آن در روز هشـتم بوده، سپس در روز نهم کاهش سریع صـورت گرفـت (۵). در تیمـار مایه زنی شده همزمان قارچ تریکودرما و نماتـد *M. javanica* نیـز میزان فنل کل در روز هشتم بعد از مایه کـوبی بـه حـداکثر رسـید و سپس به تدریج کاهش یافته است. در ارتباط میزبان و عامل بیماریزا و وقتی که ارقام مقاوم و حساس با هم مقایسه می شوند، در بیشـتر موارد سرعت تجمع ترکیبات فنلی بعد از ابـتلا بـه بیمـاری در رقـم مقاوم زیادتر از رقم حساس است و یک رابطه خطی مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و مقاومت گیاه وجود دارد (۱۴).

بررسی تغییرات فعالیـت آنـزیم فنیـل آلانـین آمونیالیـاز (PAL)

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز از اولین روز پس از مایه زنی در تیمارهـای SA , T+SA دارای اخـتلاف معنـی دار بـا سـایر تیمارها بودند. در روزهای دوم و سـوم فعالیـت آنـزیم در تیمـار SA دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها بـود، فعالیـت آنـزیم در ایـن تیمار در روز سوم به بیشـترین حـد خـود رسـید و از آن پـس رو بـه کاهش گذاشت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار تلفیقی در روز چهارم مشاهده شد و پس از آن به تدریج رو به کـاهش گذاشـت. در تیمار T بیشترین میزان فعالیت آنزیم در روز چهـارم مشـاهده شـد و پس از آن فعالیت آنزیم بـا شـیب ملایمـی رو بـه کـاهش گذاشـت (جدول ۶).

با توجه به نتایج به‌دست آمده میـزان فعالیـت آنـزیم در گیاهـان تیمار شده با عامل آنتاگونیست و سالیسیلیک اسید (تلفیقـی و مجـزا) به بیش از دو برابر فعالیت آنزیم در گیاه سالم و گیاه تیمـار شـده بـا نماتد رسیده است. میزان کم فعالیت آنزیم در گیاهان تیمـار شـده بـا نماتد در مقایسه با سایر تیمارها (بجز شاهد) را می‌توان ناشی از عدم القاء سنتز آنزیم در گیاه و یا ممانعت از فعالیـت آنـزیم توسـط نماتـد دانست. آنزیم PAL توسط عوامل زنـده و غیـر زنـده مختلـف القـا میگردد که نتیجه آن تجمع ترکیبات فنلـی مثـل اسـیدهای فنلـی و فلاونوئیدها می‌باشد. فعالیت ممانعت کننـده PAL (۲- آمینـو- ۲- ایندافونیک اسید (AIP) می‌تواند فعالیت PAL را کـاهش دهـد. در نتیجه میزان محتوای فنلی به طرز محسوسی کاهش و مقاومـت بـه استرس‌ها ضعیف می‌شود. این نتایج نشـان مـی‌دهـد کـه PAL بـا تنظیم ترکیبات مختلف فنلی موجب مقاومت به استرس‌ها مـی‌گـردد (۳۵). Mitchel & Walters (۲۳) نشان دادند که تیمار برگ‌های اولیه جو با فسفات پتاسیم منجر به کاهش معنی دار آلودگی برگهای ثانویـه بـه قـارچ سـفیدک پـودری *Blumeria graminis* fsp. *hordei* می‌گردد. تیمار بـا فسـفات در بـرگ‌هـای اولیـه منجـر بـه افزایش معنی داری در فعالیت PAL، پلی فنـل اکسـیداز (POX) و لیپوکسی ژناز در برگ‌های ثانویه می‌گردد. فعالیت‌هـای آنزیمـی، بـه ویژه PAL و POX زمانی افـزایش یافـت کـه بـرگ‌هـای ثانویـه گیاهان تیمار شده با فسفات با سفیدک سطحی مایه زنی گردیدند.

جدول۶ - مقایسه میلنگین تغییرات فعالیت آنزیم PAL (میکروگرم ترانس سینامیک اسید در میلی‌لیتر عصاره) در اثر مایه زنی با نماتد *M. javanica*، *T. harzianum* BI و سالیسیلیک اسید در ریشه گوجه فرنگی

	تیمار		روزهای بعد از مایه زنی نماتد					
	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
T+ SA	A۰/۲۴ f	B۰/۳۲e	B۰/۵۹b	A۰/۶۸a	A۰/۶۱b	A۰/۵۹b	B۰/۴۲c	AB۰/۳۹d
T	B۰/۱۸ f	C۰/۲۵e	C۰/۴۸c	B۰/۶۲a	A۰/۶۰a	A۰/۵۵b	A۰/۴۷c	A۰/۴۱d
SA	A۰/۲۳g	A۰/۴۷d	A۰/۶۴a	B۰/۵۹b	B۰/۵۳c	B۰/۴۴de	B۰/۴۲e	B۰/۳۷f
N	C۰/۱۳e	D۰/۱۲e	D۰/۱۹d	C۰/۲۳c	C۰/۳۱ a	C۰/۳۰a	C۰/۲۶b	C۰/۲۲cd
H	B۰/۱۶d	D۰/۱۱e	D۰/۲bc	C۰/۲۵a	D۰/۱۷d	D۰/۲۳ab	D۰/۱۹cd	D۰/۱۸cd

هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین‌هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف بزرگ و میانگین‌هایی که در ردیف بـا یکـدیگر اخـتلاف دارند با حروف مختلف کوچک مشخص شده انـد. (آزمـون دانکـن ($P\leq0.05$)). T+ SA: سالیسـیلیک اسـید(اسـپری بـرگ) و *T. harzianum* BI (خیسـاندن خـاک) و *M. javanica*. T: *T. harzianum* BI (خیساندن خاک)، و نماتد. SA : سالیسیلیک اسید (اسپری روی برگ). N: نماتد *M. javanica* . H: گیاه سالم.

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

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از جمله کاهش میزان بیماری در شرایط گلخانه و القاء برخی مکانیسم‌های دفاع بیوشیمیایی گیاه، میتوان چنین استنباط کرد که استفاده توام قارچ آنتاگونیست (غلظت موثر 10^6) *T. harzianum* BI به همراه محرک شیمیایی سالیسیلیک اسید با غلظت ۵ میلی مولار سبب افزایش قابل توجه پتانسیل این عوامل در جهت کنترل بیماری ناشی از نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* در شرایط گلخانه میگردد.

منابع

۱- عمران زاده ف . ۱۳۸۶. القاء مقاومت به نماتد مولد گره ریشه (*M. javanica*) در خیار در گلخانه به وسیله برخی محرک‌های شیمیایی و میکروبی. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران.

۲- مختاری س. ۱۳۸۶. بررسی کنترل بیولوژیک نماتد مولد غده *Meloidogyne javanica* توسط دو عامل بیوکنترل *Pseudomonas flourescens* و *Trichoderma harzianum*. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران.

۳- ملکی زیارتی ح. ۱۳۸۵.کنترل بیولوژیک نماتد مولد غده ریشه *Meloidogyne javanica* توسط جدایه *Trichoderma harzianum* در گوجه فرنگی و بررسی تغییرات برخی مکانیزم‌های دفاع بیوشیمیایی گیاه. پایان نامه دوره کارشناسی دانشگاه تهران.

۴- ملکی زیارتی ح.، روستایی ع.، صاحبانی ن.، اعتباریان ح. و امینیان ح. ۱۳۸۸. بررسی امکان کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه گوجه فرنگی *Meloidogyne javanica* (Trube) Chitwood . به وسیلهٔ قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai در گلخانه و تغییرات کمی ترکیبات فنلی در گیاه. مجله علوم به زراعی نهال و بذر ۳ : (۲).

۵- ملکی زیارتی ح.، صاحبانی ن.، رهنما ک. و نوری ن. ۱۳۸۶. اثر قارچ *Trichoderma harzianum* در سیستمیک شدن ترکیبات فنلی ایجاد شده در گیاه گوجه فرنگی علیه نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica*. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۱۴: (۶).

۶- مهدی خانی مقدم ع.، روحانی ح. و فلاحی رستگار م. ۱۳۸۸. کنترل بیولوژیکی نماتود سیستی چغندر قند *Heterodera schachtii* به وسیلهٔ قارچ تریکودرما در آزمایشگاه و گلخانه. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۱۳ : (۴۸).

7- Abo-Elyousr K. A. M., Hashem M., and Ali E. H. 2009. Integrated control of cotton root rot disease by mixing fungual biocontrol agents and resistance inducers. Crop Protection, 28: 295-301.

8- Al-Fattah A., Dababat A., and Sikora A. 2007. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the Biological Control of *Meloidogyne incognita* on Tomato. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 3:297-309.

9- Attitalla I. H. 2004. Biological and molecular characteristics of microorganism stimulated defense response in *Lycopersicon esculentum* L. Comprehensive Summary of Uppsala Dissertation from the Faculty of Science and Technology, 943, Acta Universitatis Upsaliensis, Sweden.

10- Bera S., Purkayastha R. P. 1999. Multicomponent coordinated defence response of rice to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight. *Curr. Sci*, 76, 1376–1384.

11- Booth C. 1977. Fusarium laboratory guide to identification of major species. Common wealth mycological Institue. Kew, Surrey, England, (55pp).

12- Brants A., Brrown C. R., and Earir E. D. 2000. *Trichoderma harzianum* endochitinase dose not provide resistance to *M. hapla* in tobacco. Journal of Nematology, 32: 289-296.

13- Chen C., Belanger R. R., Benhamou N., and Paulitz T.C. 2000. Defence enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56: 13-23.

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