

## اثر پودر برگ چریش بر فعالیت کمی پراکسیداز ریشه گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتد ریشه گرهی

۱- آیت اله سعیدی زاده\* ۲- محمد حسین فتوکیان ۳- فهیمه نیاستی

۱- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

۲- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

۳- کارشناس ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

Email: saeidizadeh@shahed.ac.ir

Email: fotokian@yahoo.com

Email: fniasti95@gmail.com

### چکیده

نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne spp.*) از بیمارگرهای کلیدی روی انواع گیاهان زراعی، باغی و گلخانه‌ای محسوب می‌شوند. امروزه استفاده از بقایای گیاهی به عنوان راهکاری مناسب جهت کنترل جمعیت نماتدهای انگل گیاهی مطرح شده است. در این تحقیق اثر پودر برگ چریش بر فعالیت کمی پراکسیداز موجود در ریشه گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که وجود پودر برگ چریش در خاک موجب افزایش کمی فعالیت پراکسیداز در ریشه گیاهچه‌های گیاه میزبان گردید. بنابراین استفاده از بقایای این گیاهان جهت بهبود شرایط خاک و کاهش خسارت نماتدهای ریشه گرهی قابل پیشنهاد می‌باشد.

کلمات کلیدی: کنترل غیرشیمیایی، نماتدهای انگل گیاهان، بقایای گیاهی

### ۱. مقدمه و هدف

نماتدهای ریشه گرهی (root-knot nematodes) متعلق به جنس *Meloidogyne* دارای بیشترین پراکنش جهانی و دامنه میزبانی در میان نماتدهای انگل گیاهان می‌باشند. چهار گونه *M. arenaria*، *M. javanica*، *M. incognita* و *M. hapla* به ترتیب بیشترین فراوانی جمعیت را در خاک‌های مزارع، باغ‌ها و گلخانه‌های نقاط مختلف جهان دارا می‌باشند. از چهار گونه مهم متعلق به جنس *Meloidogyne*، گونه *M. javanica* موجب آسیب گسترده به طیف وسیعی از محصولات کشاورزی در جهان و ایران شده است [8]. گونه *M. javanica* مهمترین نماتد انگل داخلی جدا شده از ریشه گیاهان در ایران می‌باشد. از خصوصیات مهم این نماتد دامنه وسیع میزبانی، پراکندگی گسترده در سطح ایران و جهان و مستعد کردن گیاه برای آلودگی به سایر بیمارگرهای موجود در خاک می‌باشد [5]. یکی از روش‌های متداول جهت کنترل نماتدها، تیمار شیمیایی خاک می‌باشد. با این وجود بسیاری از نماتدکش‌ها از جمله ارگانوفسفاتها، کارباماتها و فومیگانت‌ها بسیار سمی بوده و دارای اثرات

نامطلوب زیست محیطی می‌باشند [12]. استفاده از ترکیبات گیاهی برای کنترل برخی از نماتدهای انگل گیاهان مورد توجه محققین قرار گرفته و در مواردی مؤثر بوده است [13,14]. با توجه به افزایش رویکرد جهانی نسبت به کشاورزی ارگانیک و اهمیت سلامت محصولات کشاورزی و خاک، جایگزینی مواد سازگار با محیط زیست به جای سموم شیمیایی صنعتی مدنظر پژوهشگران قرار گرفته است. در تحقیق حاضر مطالعه اثر نماتدکشی پودر برگ چریش (*Azadirachta indica* Jussieu)، بر فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز موجود در ریشه گیاهچه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد *M. javanica* در شرایط گلخانه مدنظر می‌باشد.

## ۲. تئوری و پیشینه تحقیق

نماتدکشی‌های به کار رفته جهت کنترل نماتدهای ریشه‌گرهی و سایر نماتدهای انگل خاکزی در اغلب موارد اثر خود را روی نماتدها از دست داده و یا بسیار سمی بوده و موجب آلودگی محیط می‌شوند. برخی از این ترکیبات شیمیایی موجب آلودگی آب-های سطحی (مانند اتیلن بروماید)، تخریب لایه ازن (مانند متیل بروماید) و عقیمی انسان و یا سرطان‌زایی (مانند اتیلن بروماید و دی‌بروموکلروپروپان) شده‌اند [12]. با توجه به اهمیت خسارت نماتدها، محققین درصدد جایگزین کردن ترکیبات سالم و سازگار با محیط زیست به جای نماتدکشی‌های شیمیایی متداول شده‌اند. مطالعات متعددی در زمینه کنترل نماتدهای ریشه‌گرهی با استفاده از مواد فرآوری شده یا مستخرج از گیاهان انجام گرفته است [4,13,14,15].

امروزه به منظور مطالعه واکنش دفاعی ارقام مختلف گیاهان در قبال حضور بیمارگرها و عوامل غیرزنده محیطی، از فاکتورهای بیوشیمیایی مختلفی استفاده می‌شود. بسیاری از آنزیم‌ها و ترکیبات فنلی از جمله این فاکتورهای بیوشیمیایی محسوب می‌شوند. برخی از آنزیم‌های موجود در گیاهان در واکنش‌های دفاعی علیه بیمارگرها نقش دارند. این آنزیم‌ها شامل آنزیم‌های اکسیدکننده مانند پراکسیداز محلول و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی است که در تشکیل لیگنین و دیگر فنل‌های اکسیدشونده مؤثرند. ترکیبات اخیر در ایجاد سدهای دفاعی برای تقویت ساختار سلولی گیاهان نقش بسزایی دارند. فعالیت پراکسیداز در بسیاری از گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است. توزیع فراوانی و عدم پیچیدگی مطالعه، این آنزیم را به عنوان یک مارکر مولکولی مناسب در مطالعات ژنتیکی، فیزیولوژیکی و بیماری‌شناسی معرفی کرده است. اگرچه این آنزیم یک کاتالیزور نسبتاً قوی است اما در واکنش‌های بیوشیمیایی کمتر اختصاصی عمل کرده و در مقابل بیمارگرهای مختلف القا می‌شود [10].

در ایران، قبادی و همکاران [3] اثر نماتدکشی عصاره الکلی و آبی گیاه رازیانه را در خاک آلوده به نماتد *M. javanica* مورد بررسی قرار دادند. همچنین میزان فعالیت برخی آنزیم‌های مرتبط با مقاومت القایی از جمله پراکسیداز و کاتالاز در گیاهچه‌های میزبان (خیار) تیمار شده با نماتد و عصاره رازیانه، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم‌های مورد نظر تا ۱۵ روز پس از مایه‌زنی نماتد و تیمار عصاره رازیانه، در گیاه میزبان رو به افزایش بوده است. همچنین رحمانی و همکاران [1] با استفاده از عصاره آبی و الکلی گیاه خرزهره در شرایط گلخانه، کاهش فعالیت نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* را بر گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی گزارش کردند.

## ۳. مواد و روشها

## ۳-۱. مایه تلقیح نماتد *M. javanica*

جهت تهیه مایه تلقیح نماتد *M. javanica* ابتدا نمونه برداری از گلخانه‌های خیار واقع در منطقه ورامین انجام پذیرفت. برای آماده‌سازی مایه تلقیح نماتد *M. javanica*، خالص‌سازی و تکثیر نماتد به روش توده تخم منفرد (single egg mass) انجام گرفت [6]. پتری‌های حاوی تخم در انکوباتور تاریک با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار داده شد. پس از این، سوسپانسیون نماتد به مدت یک دقیقه در محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم استریل نهایتا و تعداد لاروهای زنده شمارش گردید.

## ۳-۲. پودر گیاه مورد آزمایش

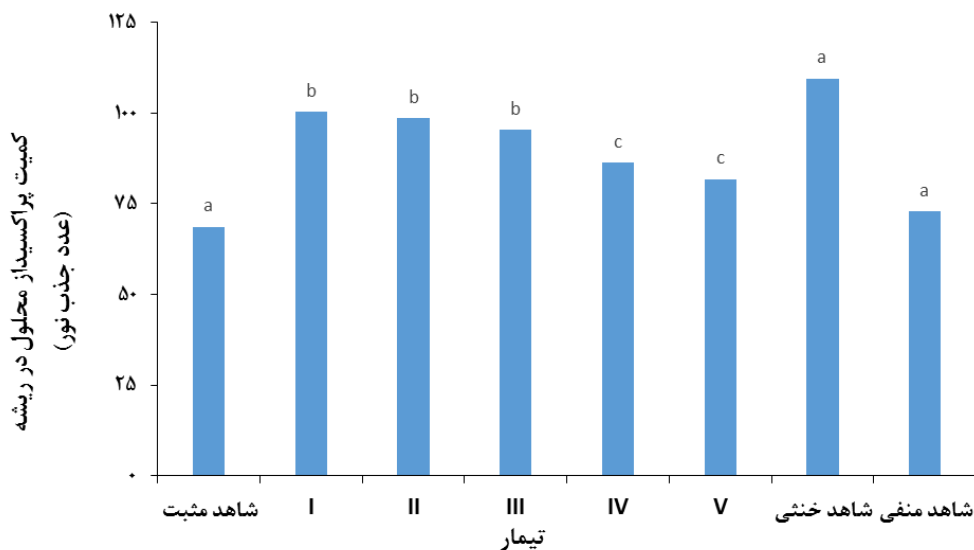
یک کیلوگرم از برگ تازه گیاه چریش از گلخانه‌های محلات تهیه شد. برگ‌ها در دمای اتاق خشک شدند. با استفاده از دستگاه آسیاب (پودرساز) برقی (Pars Khazar, ML-320P model, Iran) برگ‌های خشک شده آسیاب و به صورت پودر همگن آماده شد. از پودر برگ گیاه مورد آزمایش برای آزمون زیست‌سنجی استفاده شد [15].

## ۳-۳. آزمون زیست‌سنجی

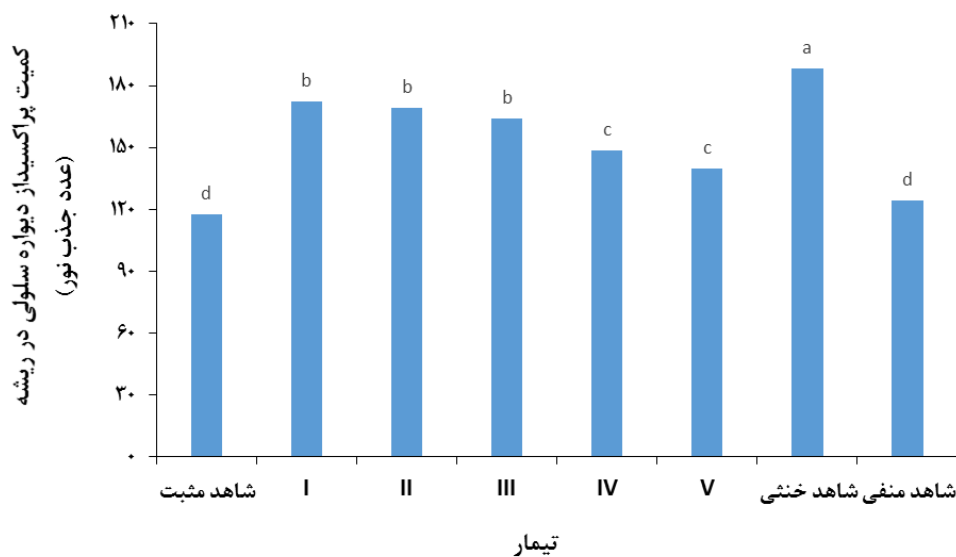
در این آزمون پنج غلظت از پودر برگ گیاه چریش شامل ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ گرم از پودر برگ در کیلوگرم خاک در نظر گرفته شد. برای انجام این آزمون ابتدا خاک استریل با سوسپانسیون نماتد (به میزان ۱۰ عدد لارو سن دوم در هر گرم خاک) مایه‌زنی شد. پس از اضافه کردن پودر گیاه چریش بر اساس غلظت‌های تعریف شده، انتقال خاک به گلدان‌ها (یک کیلوگرم خاک به ازای هر گلدان) انجام گرفت. سپس در هر گلدان یک گیاهچه چهاربرگی گوجه‌فرنگی رقم سوپرچیف کشت شد. اثر پودر گیاه چریش بر فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز در ریشه گیاه میزبان کشت شده در خاک مایه‌زنی شده با نماتد، در زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز پس از کشت گیاهچه میزبان مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون یک شاهد مثبت (بدون پودر گیاه، نماتدکش و نماتد)، یک شاهد منفی (دارای نماتد و نماتدکش با دز توصیه شده) و یک شاهد خنثی (دارای نماتد و بدون پودر گیاه و نماتدکش) در نظر گرفته شد [2]. فعالیت آنزیمی پراکسیداز محلول (SPOX: soluble peroxidase) و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی (CWPOX: cell wall peroxidase) در ریشه بطور جداگانه و بر اساس روش ارائه شده توسط جاندا و همکاران [7] از طریق کاربرد گوئیکول (Guaicol, Merk, Germany)، به عنوان پیش‌ماده این آنزیم، و دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد.

## ۴. نتایج و بحث

نتایج نشان داد که پودر برگ چریش موجب افزایش معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) فعالیت کمی پراکسیداز (افزایش عدد جذب نوری در دستگاه اسپکتروفوتومتر) شده است. بیشترین تا کمترین میزان فعالیت کمی پراکسیداز به ترتیب در تیمارهای مربوط به چریش غلظت پنجم (پراکسیداز محلول ۸۱/۸۰ و پراکسیداز دیواره سلولی ۱۳۹/۴۸)، نماتد (پراکسیداز محلول ریشه ۱۰۹/۵۲ و پراکسیداز دیواره سلولی ریشه ۱۸۸/۲۸)، نماتدکش (پراکسیداز محلول ریشه ۷۲/۸۴ و پراکسیداز دیواره سلولی ریشه ۱۲۴/۲۲) و شاهد (پراکسیداز محلول ریشه ۶۸/۶۴ و پراکسیداز دیواره سلولی ریشه ۱۱۷/۳۶) مشاهده شد (شکل ۱ و ۲). در ابتدا با افزایش زمان در معرض بودن بر میزان جذب نوری پراکسیداز افزوده شد ولی این روند به تدریج رو به کاهش نهاد به گونه‌ای که بیشترین میزان جذب نوری پراکسیداز در روز ۱۵ مشاهده شد (شکل ۳ الی ۴).

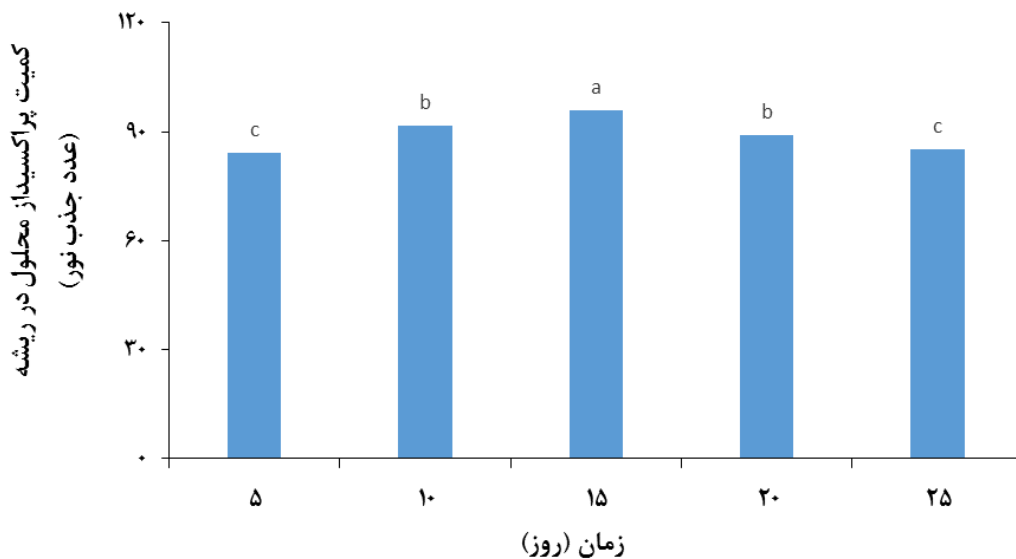


شکل ۱. اثر تیمار غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چریش، نماتد *Meloidogyne javanica* و نماتد کش بر مقدار آنزیم پراکسیداز محلول در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی تیمارهای I, II, III, IV و V به ترتیب غلظت‌های چریش (۱/۵، ۲، ۴ و ۸ گرم بر کیلوگرم خاک بستر) بوده است.

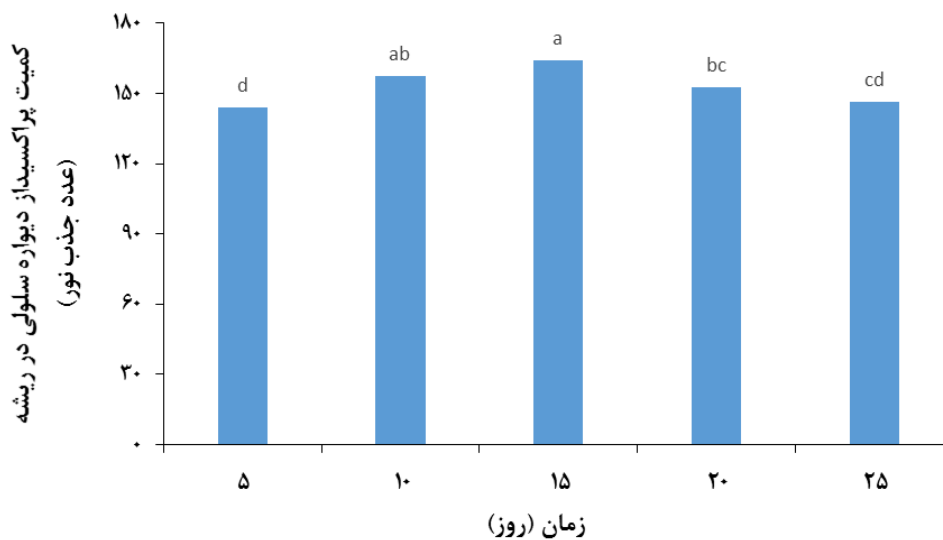


شکل ۲. اثر تیمار غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چریش، نماتد *Meloidogyne javanica* و نماتد کش بر مقدار آنزیم پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی

تیمارهای I, II, III, IV و V به ترتیب غلظت‌های چریش (۱/۵، ۲، ۴ و ۸ گرم بر کیلوگرم خاک بستر) بوده است.



شکل ۳. اثر زمان بر مقدار آنزیم پراکسیداز محلول در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چریش، نماتد *Meloidogyne javanica* و نماتد کش



شکل ۴. اثر زمان بر مقدار آنزیم پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی در ریشه گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چریش، نماتد *Meloidogyne javanica* و نماتد کش

نتایج مطالعه با یافته‌های دیگر محققین در زمینه کنترل غیرشیمیایی نماتدهای بیمارگر گیاهان از جمله نماتدهای ریشه‌گره‌ای، از طریق کاربرد عصاره، کودها و بقایای گیاهان مطابقت دارد به طوری که نشان می‌دهد استفاده از استراتژی‌های غیر شیمیایی می‌تواند راه‌حل‌های قابل قبولی برای مدیریت نماتدهای انگل گیاهان باشند [9,16]. تحقیقات گذشته نشان داده است که گیاه

چریش دارای قابلیت نماتدکشی است و محصولی به نام نیم (Neem) جهت مهار جمعیت بسیاری از نماتدهای بیمارگر ریشه گیاهان به بازار عرضه شده است [11]. امروزه به منظور مطالعه واکنش دفاعی ارقام مختلف گیاهان در قبال حضور بیمارگرها و عوامل غیرزنده محیطی، از فاکتورهای بیوشیمیایی مختلفی استفاده می‌شود. بسیاری از آنزیم‌ها و ترکیبات فنلی از جمله این فاکتورهای بیوشیمیایی محسوب می‌شوند. برخی از آنزیم‌های موجود در گیاهان در واکنش‌های دفاعی علیه بیمارگرها نقش دارند. این آنزیم‌ها شامل آنزیم‌های اکسیدکننده مانند پراکسیداز محلول و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی است که در تشکیل لیگنین و دیگر فنل‌های اکسیدشونده مؤثرند. ترکیبات اخیر در ایجاد سدهای دفاعی برای تقویت ساختار سلولی گیاهان نقش بسزایی دارند. فعالیت پراکسیداز در بسیاری از گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است. توزیع فراوانی و عدم پیچیدگی مطالعه، این آنزیم را به عنوان یک مارکر مولکولی مناسب در مطالعات ژنتیکی، فیزیولوژیکی و بیماری‌شناسی معرفی کرده است. اگرچه این آنزیم یک کاتالیزور نسبتاً قوی است اما در واکنش‌های بیوشیمیایی کمتر اختصاصی عمل کرده و در مقابل بیمارگرهای مختلف القا می‌شود [10]. در تحقیق ما، میزان عدد جذب نوری بدست آمده در مورد پراکسیداز محلول در بافت ریشه میزبان و همچنین پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی به ترتیب در تیمارهای چریش، نماتد، نماتدکش و شاهد، بیشترین تا کمترین مقدار بوده است. این پدیده نشان می‌دهد که وجود ترکیبات چریش در بستر رویش گیاه موجب تحریک افزایش میزان پراکسیداز در گیاه میزبان شده است. برای درک بهتر ظرفیت نماتدکشی مواد گیاهی، تحقیقات بیشتری لازم است، با این حال، اصلاح خاک با مواد گیاهی دارای قابلیت نماتدکشی، جهت کنترل نماتدهای ریشه‌گرهی قابل پیشنهاد می‌باشد.

## ۵. نتیجه‌گیری

بکارگیری پودر برگ چریش در خاک موجب افزایش کمی فعالیت پراکسیداز در ریشه گیاهچه‌های گیاه میزبان گردید. بنابراین استفاده از بقایای این گیاه جهت بهبود شرایط خاک و کاهش خسارت نماتدهای ریشه‌گرهی قابل پیشنهاد می‌باشد.

## ۶. قدردانی

نویسندگان از دانشگاه شاهد برای حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنند.

## ۷. مراجع

۱. رحمانی، س. ه.، رخشنده‌رو، ف. و سعیدی زاده، آ. اثر نماتدکشی عصاره خام گیاه خرزهره بر نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در ریزوسفر گوجه‌فرنگی، مجموعه خلاصه مقالات بیست و دومین کنگره گیاهپزشکی ایران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۱۳۹۵، صفحه ۲۹۵.
۲. سعیدی‌زاده، آ. و نیاستی، ف.، بررسی فعالیت کمی پراکسیداز ارقام زیتون در تعامل بین قارچ عامل پژمردگی ورتیسیلیومی *Verticillium dahliae* و نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*. دانش گیاهپزشکی ایران، شماره ۴۲(۲)، ۱۳۹۰، صفحات ۳۰۳-۳۱۳.

۳. قبادی، ن.، رخشنده‌رو، ف. و سعیدی زاده، آ.، ارزیابی مولکولی مقاومت القا شده در گیاه خیار توسط عصاره‌های آبی و الکلی گیاه رازیانه علیه نماتد مولد گره ریشه. مجموعه خلاصه مقالات بیست و دومین کنگره گیاهپزشکی ایران. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۱۳۹۵، صفحه ۳۵۸.

4. Cetintas R., and Yarba M.M., Nematicidal effects of five plant essential oils on the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* race 2. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, Vol. 9, 2010, 222-225.
5. Hosseini Nejad, S.A., and Khan, M.W., Interaction of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (race 1), on chick-pea cultivars. *Applied Entomology and Phytopathology*, Vol. 68, 2001, pp. 1-11.
6. Hussey, R.S. and Barker K.R., A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Diseases Reports*, Vol. 57, 1973, pp. 1025-1028.
7. Janda, T., et al., Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*, Vol. 164, 2003, pp. 301-306.
8. Kiriga, A.W., et al., Effect of *Trichoderma* spp. and *Purpureocillium lilacinum* on *Meloidogyne javanica* in commercial pineapple production in Kenya. *Biological Control*, Vol. 119, 2018, pp. 27-32.
9. Mennan, S. and Melakeberhan, H., Effects of biosolid amendment on populations of *Meloidogyne hapla* and soils with different textures and pHs. *Bioresource technology*, vol. 101, 2010, pp. 7158-7164.
10. Mohammadi, M., and Kazemi, H., Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, Vol. 162, 2002, pp. 401-408.
11. Mosumder, V., Nematoda, Nematodes. Pp. 129-150. In *The Neem Tree: Azadirachta indica* A. Juss. and Other Meliaceous Plants; Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management Medicine, Industry and Other Purposes (Ed. H. Schmutterer), Weinheim, Germany, V.c.B. Publications, 1995.
12. Msayleb, N. and Ibrahim, S., Treatment of Nematodes with Ozone Gas: A Sustainable Alternative to Nematicides. *Physics Procedia*, Vol. 21, 2011, pp. 187-192.
13. Naz, I., et al., In vitro and in planta nematicidal activity of *Fumaria parviflora* (Fumariaceae) against the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Pathology*, Vol. 62, 2013, pp. 943-952.
14. Ntalli, N.G. and Caboni, P., Botanical nematicides in the mediterranean basin. *Phytochemistry Reviews*, Vol. 11, 2012, pp. 351-359.
15. Oka, Y., et al., Nematicidal activity of the leaf powder and extracts of *Myrtus communis* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology*, Vol. 61, 2012, pp. 1012-1020.
16. Soheili, A. and Saeedizadeh, A., Suppression of brassicaceous tissue on *Meloidogyne javanica* in a rhizosphere. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, Vol. 19(5), 2017, pp. 1012-1018.