بررسی تغییرات کمی کاتالاز در نهال‌های زیتون آلوده به نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne javanica*)

تاریخ دریافت:۹۱/۷/۲۴
تاریخ پذیرش:۹۱/۹/۱۲

آیت اله سعیدی زاده[1*]

چکیده

نماتد ریشه گرهی، *Meloidogyne javanica*، از نهال های زیتون آلوده جداسازی شده و بعد از شناسایی گونه، روی نشاءهای گوجه فرنگی تکثیر گردید. نهال‌های یکساله زیتون ارقام کرونیکی، مانزانیلا و روغنی در بستری از خاک لومی شنی استریل به میزان ۲۰۰۰ گرم کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر اساس طرح کاملاً تصادفی در چهار تیمار با پنج تکرار انجام گرفت. میزان مایه تلقیح نماتد ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ عدد لارو سن دوم برای هر گلدان در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با نور طبیعی و دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. میزان فعالیت کمی کاتالاز در ریشه با استفاده از بافر فسفات سدیم و پراکسید هیدروژن بر حسب تغییر جذب مخلوط واکنش در ۲۴۰ نانومتر در دقیقه در میلی گرم پروتئین، در مراحل زمانی یک، پنج، ده و پانزده روز پس از مایه‌زنی، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که نماتد موجب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است به طوری که کمترین میزان آن در روز ده و پانزده پس از مایه زنی مشاهده شده است ($p \leq ۰/۰۵$).

واژه‌های کلیدی: *کاتالاز، نماتد ریشه گرهی، زیتون.*

---

[1] استادیارگروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد.
[*] نویسنده مسئول و عهده‌دار مکاتبات، Ayatsaeed314@gmail.com.

مقدمه

از میان بیمارگرهایی (pathogenes) که گیاه زیتون را تهدید می‌کنند، نماتدهای انگل از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. نماتدها تنها انگل‌های گیاهی هستند که به سلسلهٔ جانوران تعلق دارند. محصولات و فرآورده‌های کشاورزی در سراسر عالم خصوصاً در نواحی گرمسیر و نیمه گرمسیر همواره در معرض تهدید این کرم‌های انگل قرار داشته‌اند (Nickle, 1991). نماتدهای ریشه گرهی (root-knot nematodes) به عنوان مهمترین گروه از نماتدهای انگل گیاهان شناخته شده اند. گونه *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood یکی از مهمترین گونه‌های نماتد ریشه گرهی می‌باشد که به علت وسعت دامنه‌میزبانی، پراکندگی وسیع و اثرات متقابل با قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر گیاهی، دارای اهمیت اقتصادی فراوان است (Akhiani et al., 1984; Hussey and Janssen, 2002; Sasser, 1979).

در ایران اول بار نماتد *M. javanica* روی زیتون از منطقه گیلان معرفی شده است (Kheiri, 1972). بیماریزا بودن این نماتد روی زیتون توسط لامبرتی و باینس به اثبات رسیده است (Lamberti and Baines, 1969).

بسیاری از آنزیم‌های گیاهان در واکنش‌های دفاعی علیه پاتوژن‌های گیاهی مطرح و مؤثر می باشند. این آنزیم‌ها شامل آنزیم های اکسیدکننده (oxidase enzymes) مانند پراکسیداز محلول (soluble peroxidase : SPOX) و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی (cell wall-bound peroxidase : CWPOX) به طریق یونی می‌باشند که تشکیل لیگنین و دیگر فنل‌های اکسید شونده (oxidative phenols) که در ایجاد سدهای دفاعی برای تقویت ساختار سلولی نقش دارند را کاتالیز می کنند (Avdiushko et al., 1993). دیگر آنزیم‌های دفاعی شامل پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR proteins) از قبیل بتا-۳،۱-گلوکاناز (β-1,3-glucanase) و بتا-۴،۱-گلوکاناز (β-1,4-glucanase) می باشند که سبب تجزیه دیواره سلولی قارچها می شوند. همچنین الیگومرهای گلوکان (glucan)، آزاد شده در زمان تجزیه دیواره سلولی قارچ ها، به عنوان محرک (elicitor) جهت فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی گیاهان عمل می‌کنند (Frindlender et al., 1993).

مطالعات متعدد حاکی از آن است کـه آنـزیم کاتـالاز در واکـنش‌هـای بیوشـیمیایی مرتبط با مقاومت در گیاهان مختلـف ایفـای نقـش مـی‌کنـد (Chance and Maehley, 1955; Farkas and Kiraly, 1995). از آنجایی کـه کشـت ارقـام مقـاوم بـه نماتـد *M. javanica* از مؤثرترین و اقتصادی‌ترین روش‌های کنترل این بیمارگر به شمار می‌رود، در این آزمایش به منظور مقایسه عکس‌العمل دفـاع بیوشـیمیایی نهـال‌هـای زیتـون ارقـام کرونیکی، مانزانیلا و روغنی (ارقام مهم خارجی و داخلی) نسـبت بـه حضـور نماتـد *M. javanica*، تغییرات فعالیت کمی آنزیم کاتالاز، به عنـوان یکـی از مهمتـرین مارکرهـای دفاعی، در زمان‌های یک، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز پس از مایه زنـی در ریشـه ارقـام مـورد نظـر اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفت.

روشها

۱- تهیه مایه تلقیح نماتد *M. javanica*

شناسایی نماتد بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی شبکه کوتیکول انتهای بدن مـاده و با استفاده از منـابع معتبـر (Hunt, 1993; Siddiqi, 2000) انجـام گرفـت. بـرای تهیـه اسلاید میکروسکوپی دائمی بایستی محیط درونی نماتدها را به تدریج از شـرایط آب بـه شرایط گلیسرین رساند و در نهایت در گلیسرین خـالص تثبیـت نمـود. بـدین منظـور از روش ارائه شده توسط ساتی استفاده شد (Southey, 1970). جهت خالص‌سازی و تهیـه مایه تلقیح نماتد *M. javanica* از روش هوسی و بارکر از طریق بکـارگیری تـوده تخـم منفرد (single egg mass) روی گیاهچه‌های گوجه فرنگی رقم محلی حساس انجام شد. جمعیت نماتد با سه سطح (۲۰۰۰ ، ۳۰۰۰و ۴۰۰۰ عدد لارو سن دوم برای هـر گلـدان) در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون تهیه گردید. برای شمارش لاروهـای سـن دوم، نـیم سانتیمتر مکعب از سوسپانسیون لارو سن دو به صورت قطرات کوچک روی یک تشـتک پلاستیکی قرار گرفت و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ×۱۰۰ شـمارش گردیـد. برای افزایش دقت در تخمین تعداد لاروهـا، شـمارش لاروهـا سـه مرتبـه انجـام گرفـت (Hussey and Barker, 1973). بـه منظـور جداسـازی لاروهـای سـن دوم و نرهـای *Meloidogyne* از خاک از روش دگریس موسوم به روش سانتریفیوژ یـا شناورسـازی در

محلول شکر (centrifuge or sugar flotation method) استفاده شد (De Grisse, 1969).

۲-تلقیح نهال های یکساله زیتون با نماتد *M.javanica*

زیتون مورد آزمایش از قلمه‌های ساقه ارقام کرونیکی، مانزانیلا و روغنی ریشه‌دار شده در خاک لومی شنی سترون تهیه شد. در این تحقیق از آزمایش فاکتوریل به صورت شاهد (بدون مایه تلقیح) و جمعیت نماتد در سه سطح (۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ لارو سن دوم برای هر گلدان) بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و پنج تکرار مورد استفاده قرار گرفت. جهت محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل اطلاعات از نرم افزار آماری مانند SAS استفاده گردید. برای مقایسه میانگین‌ها از روش دانکن استفاده گردید. شرایط گلخانه دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد و نور طبیعی بود.

۳-ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش ارائه شده توسط چانس و ملی در زمان‌های یک، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز پس از مایه‌زنی انجام گرفت. سه میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مول و pH=7 با مقداری عصاره بافت برگ که دارای ۳۰ میکروگرم پروتئین باشد مخلوط شد. دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در کیووت بلانک صفر گردید. توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تغییرات جذب نور λ max=240nm در یک دقیقه ثبت گردید. سپس ۳۰ میکرولیتر پراکسیداز هیدروژن (H_2O_2) به مخلوط واکنش اضافه، سریعاً مخلوط نموده و بلافاصله تغییرات جذب نور به مدت یک دقیقه ثبت شد (Chance and Maehly, 1955).

نتایج و بحث

از نتایج بدست آمده چنین برمی آید که میزان فعالیت کاتالاز در ریشه نهال‌های تیمار شده با نماتد *M. javanica* در تمام تیمارها با گذشت زمان مایه‌زنی کاهش یافته است ($p\leq$ ۰/۰۵). در تیمار جمعیتی ۴۰۰۰ نماتد، اختلاف میانگین داده‌های بدست آمده مشهودتر است. در تیمار ۳۰۰۰ نماتد بیشترین میزان فعالیت کاتالاز در پنج روز پس از مایه زنی نماتد مشاهده شده است و میزان آنزیم مورد نظر در روز ۱۵ پس از مایه‌زنی اختلاف معنی‌داری با ۱۰روز پس از مایه‌زنی ندارد. مقایسه داده‌های بدست

آمده نشان داد کاهش معنی‌دار میزان کاتالاز در رقم کرونیکی کمترین و در رقم مانزانیلا از بیشترین مقدار برخوردار بوده است (جدول ۱).

جدول ۱. میزان فعالیت کاتالاز (تغییر جذب نور در دقیقه در میلی گرم پروتئین) در ریشه نهال زیتون در مراحل مختلف زمانی پس از مایه زنی با نماتد *Meloidogyne javanica*

		زمان پس از مایه زنی (روز)			
		۱	۵	۱۰	۱۵
رقم	تیمار	میانگین	میانگین	میانگین	میانگین
کرونیکی					
	شاهد	۶۰/۱a	۵۸/۷a	۵۸/۳a	۶۱/۵a
	نماتد ۴۰۰۰	۵۹/۸a	۶۲/۱a	۴۵/۲b	۴۶/۷b
	نماتد ۳۰۰۰	۶۰/۲a	۵۸/۵a	۴۸/۶b	۴۷/۸b
	نماتد ۲۰۰۰	۶۱/۴a	۶۰/۵a	۵۰/۰b	۴۸/۳b
مانزانیلا					
	شاهد	۶۱/۲a	۶۰/۴a	۵۹/۳a	۶۲/۵a
	نماتد ۴۰۰۰	۵۹/۹a	۵۳/۱b	۴۶/۲c	۴۲/۸d
	نماتد ۳۰۰۰	۵۹/۲a	۵۸/۶a	۴۸/۶b	۴۵/۸c
	نماتد ۲۰۰۰	۶۰/۳a	۶۱/۷a	۵۱/۱b	۴۹/۳b
روغنی					
	شاهد	۵۸/۴a	۶۰/۸a	۵۹/۲a	۶۰/۶a
	نماتد ۴۰۰۰	۵۹/۳a	۶۲/۰a	۴۶/۳b	۴۰/۶c
	نماتد ۳۰۰۰	۶۱/۰a	۵۸/۵a	۴۸/۵b	۴۷/۴b
	نماتد ۲۰۰۰	۵۸/۴a	۵۹/۸a	۵۳/۲b	۴۸/۷b

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ردیف با آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهند.

مطالعات بسیاری از پژوهشگران نشان داده که افزایش فعالیت کاتالاز را در برهمکنش ناسازگار میزبان-پاتوژن بیشتر از حالت سازگار است (Khan et al., 2000; Goodman and Novacky, 1994; Apostol et al., 1989).

نتایج تحقیقات اپوستول و همکاران بیانگر این است که کاتالاز ممکن است به عنوان یک ممانعت کننده از انتقال سیگنال از خارج به داخل هسته سلول های گیاهی (signal transduction) عمل کند و H_2O_2 نیز در این میان به عنوان یک ناقل سیگنال دخالت داشته باشد (Apostol et al., 1989).

نتایج مطالعات برخی محققین نشان داده است که اکسیژن معمولاً هم در بافت‌های آلوده و هم در بافت های سالم در فرآیند اکسیداتیو سلولی تولید می‌شود ولی در حضور سوپر اکسید دیس میوتاز [superoxide dismutase (SOD)] یون منفی اکسیژن بنام سوپر اکسید آنیون($O.^{-}_{2}$) به هیدورژن پراکسید (H_2O_2) تبدیل شده و در حضور کاتالاز، H_2O_2 به O_2 و H_2O تبدیل خواهد شد. ایشان دریافتند که کاتالاز در پدیده واکنش فوق حساسیت در گیاهان آلوده به بیمارگرها مؤثر بوده است (Goodman and Novacky, 1994).

مطالعات فریک اهمیت کاتالاز را در مقاومت گیاه در برابر بیمارگرها تأیید می‌کند (Fric, 1976). به طور کلی مطالعات مربوط به اعمال فیزیولوژیک آنزیم کاتالاز در گیاه نسبت به مطالعات مربوط به آنزیم پراکسیداز کمتر است. فعالیت کاتالاز در دماهای کم در مورد برخی گیاهان در ارقام مقاوم و حساس به سرما مورد بررسی قرار گرفته است (Maacrae and Fergusson, 1985). لازم به ذکر است که در مورد فعالیت آنزیم کاتالاز و نقش آن در مقاومت گیاهان نسبت به بیمارگرها گزارش‌های ضد و نقیضی وجود دارد. تحقیقات نشان داده است میزان کاتالاز در پدیده تبخیر در گندم‌های آلوده به زنگ ساقه و سفیدک پودری مؤثر بوده است (Farkas and Kiraly, 1955).

در ارتباط با فعالیت این آنزیم در ایران تحقیقات اندکی انجام شده است. نتایج بدست آمده از بررسی فعالیت کمی آنزیم کاتالاز در گندم نسبت به زنگ زرد حاکی از افزایش آن در زمان های ۷۲ و ۱۰۰ ساعت پس از مایه زنی در رقم مقاوم MV_{17} نسبت به شاهد و رقم حساس بولانی می‌باشد (بهروزین، ۱۳۷۶). علی احمد کروری (۱۳۷۲) بررسی هایی در خصوص افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه ملز از خانواده کاج داشته

است. نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر حاکی از آن است که فعالیت انگلی نماتد *M. javanica* در ریشه ارقام مورد مطالعه موجب کاهش ترشح و فعالیت کاتالاز در میزان شده است. از طرفی سرعت واکنش ارقام نیز در تغییر میزان کاتالاز در قبال آلودگی به نماتد متفاوت بوده است. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان چنین استنباط کرد که ارقامی که سرعت واکنش بیوشیمیایی قابل ملاحظه‌ای نسبت به حضور بیمارگرها از خود نشان می‌دهند را می توان به عنوان رقم مناسب جهت تهیه پایه برای ارقام مقاوم مورد توجه قرار داد و یا در طرح‌های تکثیر و تولید ارقام جدید از طریق کشت بافت و انتقال ژن بکار گرفت.

منابع

۱. بهروزین، م. (۱۳۷۶). بررسی اثر قارچ *Puccinia striiformis* (عامل بیماری زنگ زرد) روی برخی از پدیده‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و هیستولوژیکی دو رقم گندم. رساله دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۹۹صفحه.

۲. علی‌احمد کروری، س. (۱۳۷۲). تغییرات کمی و کیفی و تبادلات دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز در شاخه‌ها و بذور سه گونه مختلف Larix، مجله پژوهش و سازندگی، شماره **۲۱**، صفحه‌های ۴-۷.

3. Akhiani, A., Mojtahedi, H., and A. Naderi. (1984). Species and Physiological races of root-knot nematodes in Iran, *Iranian Journal of Plant Pathology*, **20**,1-4.
4. Apostol, I., Heinstein, P. F., and P.S. Low. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cell, *Plant Pathology*, **90**, 109-116.
5. Avdiushko, S., Aire, X. S., and J. Kuc. (1993). Detection of several enzymatic activities in leaf print of cucumber plants, *Physiological and* Molecular Plant *Pathology*, **42**,441-445.
6. Chance, B., and A.C. Maehly. (1955). Assay of catalase and peroxidase. Pp: 764-791. In: Colowick, S.P., and Kaplan. N.O.(eds.). Methods in Enzymology, Academic Press. New York.Vol 2.
7. De Grisse A. (1969). Redescription ou modifications de quelques techniques utilisées dans l'étude des nématodes phytoparasitaires. Mededlingen Rijksfaculteit der Landbouwwetenschappen Gent, **34**, 351-369.

8. Farkas, G.L, and Z. Kiraly. (1955). Studies on the respiration of wheat infected with stem rust and powdery mildew. *Physiologia Plantarum* **8**, 877-885.
9. Fric, F. (1976). Oxidative Enzymes. Pp: 617-631 In: Heitefuss. R. and Williams, P.H. (eds.). Encyclopedia of plant physiology. Vol.4, Springer-Verlag Berlin Heidelberg NewYork.
10. Frindlender, M., Inbar, J., and I. Chet. (1993). Biological control of soil-borne plant pathogens by a β-1,3-glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry*, **25**, 1211-1221.
11. Goodman R.N., and A.J. Novacky. (1994). The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. APS Press. 244pp.
12. Hunt, D.J. (1993). Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: Their Systematics and Bionomes. C. A. B. International, Hertfordshine, UK, 352 pp.
13. Hussey, R.S., and K.R. Barker. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reports*, **57**,1025-1028.
14. Hussey, R.S., and G.J.W. Janssen. (2002). Root-Knot. Nematodes: *Meloidogyne* species. Pp: 43-70. In: J.L. Starr, J.Bridge and R.Cook, (eds.). Plant resistance to parasitic nematodes. CAB1 Publishing, Walling ford, UK.
15. Khan, A., Atibalentja, N., and D.M. Eastburn. (2000). Influence of inoculum density of *Verticillium dahliae* on root discoloration of horseradish. *Plant Disease*, **84**, 309-315.
16. -Kheiri, A. (1972). A taxonomical and morphological study of Tylenchida (Nematoda) from Iran. Doctorate thesis, 246 pp.
17. Lamberti, F., and R.C. Baines. (1969). Pathogenicity of four species of *Meloidogyne* on three varieties of olive trees, *Journal of Nematology*, **1**(2), 111-116.
18. Maacrae, E.A., and I.B. Fergusson. (1985). Changes in catalase activity and hydrogen peroxidase concentration in plants in response to low temperature. *Plant Physiology*, **65**,51-36.
19. Nickle, W.R. (1991). Mannual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker. New York, 1035 pp.
20. Sasser, J.N. (1979). Pathologencity, host ranges and variability in *Meloidogyne* spp. Pp: 257–267. In: E. Lamberti and C.E. Taylor (eds.). Root–knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) systematics, biology and control Academic press, New York.
21. Siddiqi, M.R. (2000). Tyienchida parasites of plants and insects. CAB International, UK, 833 pp.

22. Southey, J.F. (1970). Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin, 5th edition, 148 pp.