مجله کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
شماره اول، ۱۳۹۱ (۷۲-۶۱)

کنترل بیولوژیک و القای سیستمیک آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز به‌وسیله قارچ *Trichoderma harzianum* در گوجه فرنگی آلوده به نماتد *Meloidogyne javanica*

حسن ملکی زیارتی[1*]، نوازالله صاحبانی[2]، حسن رضا اعتباریان[2]
۱، محقق بیماری‌های گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی استان گلستان
۲و۳- اعضای هیئت علمی دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۵ تاریخ تصویب: ۹۱/۳/۱۲)

چکیده

القای آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و سیستمیک‌شدن آن در گیاهچه گوجه فرنگی رقم کینگ‌استون آلوده به نماتد مولد گره ریشه وساقه گیاه با استفاده از تقسیم دوتایی سیستم ریشه مورد بررسی قرار گرفت. ریشه گیاهچه‌های در مرحـــله شش برگی پس از شست‌وشوی از محل ریشه اصلی به دو قسمت تقسیم و در دو گلدان مجاور قرار گرفته، سپس به‌وسیله قارچ و نماتد مایه زنی ومورد ارزیابی آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز قرار گرفتند. در تیمار اول نیمی از ریشه به وسیله سوسپانسیون اسپور قارچ تریکودرما مایه‌زنی گردید و نیمی دیگر با نماتد مایه‌زنی شد. در تیمار دوم نیمی از ریشه به‌وسیله نماتد مایه‌زنی گردید و نیمه دیگر با آب مقطر. تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در عصاره هر یک از قسمت‌های ریشه و ساقه در هر تیمار به‌مدت ۷ روز به‌طور روزانه اندازه-گیری شد. نتایج نشان داد که قارچ تریکودرما قادر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌ها در بخش‌های مختلف ریشه بوده به طوری که نه تنها در محل مایه‌زنی ریشه بلکه در بخش‌های دیگر گیاه از جمله ریشه وساقه نیز افزایش فعالیت آنزیم‌ها را موجب شد. حداکثر فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه و ساقه گیاه به ترتیب پنج و چهار روز بعد از مایه‌زنی گیاه بوده و به دنبال آن کاهش فعالیت دیده شد، ولی حداکثر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ریشه و ساقه به ترتیب شش و چهار روز بعد از مایه‌زنی اندازه گیری شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، قارچ تریکودرما دارای پتانسیل القای سیستمیک آنزیم‌های پراکسیداز ، پلی فنل اکسیداز است که در سیستم دفاعی گیاه اثر دارد و می‌تواند در مدیریت نماتد مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: تقسیم ریشه ، سوسپانسیون اسپور، حداقل فعالیت آنزیمی، مکانیزم دفاعی، کنترل بیولوژیک

* نویسنده مسئول: حسن ملکی زیارتی تلفن: ۰۹۱۱۹۶۲۲۴۸۲ E-mail: hmalekiziarati@gmail.com

مقدمه

نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* دامنه وسیعی از محصولات شامل سبزیجات،گیاهان زراعی و باغی، درختان میوه و علف‌های هرز را آلوده می کند. تاکنون حدود ۲۰۰۰ گونه گیاهی به عنوان میزبان این نماتد شناخته شده است. این نماتد انگل داخلی ساکن می‌باشد که با ورود لارو سن دوم (J_2) نماتد به داخل بافت ریشه باعث تولید سلول‌های غول‌آسا (Giant cell) می‌شود. مشخص‌ترین علایم بیماری تشکیل و ظهور گال‌هایی در سطح ریشه گیاه می‌باشد (Xu *et al*. 2001, Pedrosa *et al*.1996, Jepson 1987). به‌دلیل مشکل بودن مبارزه با این نماتد، محققین به دنبال دستیابی به راه‌های مناسب‌تری هستند، زیرا استفاده از سموم شیمیایی به خصوص افزودن آنها به خاک دارای مخاطرات زیست محیطی قابل توجهی می‌باشد، به همین علت در سال‌های اخیر تاکید زیادی روی مبارزه بیولوژیک با نماتدها از جمله در مبارزه با نماتد *M. javanica* گردیده است (Howel 2003, Hussay and Barker,1973, Robb *et al*. 1987) در این زمینه استفاده از میکروارگانیسم ها به‌خصوص آنهایی که باعث القای مقاومت در گیاه می‌شوند، از اهمیت ویژه‌ای برخورداراست که از آن جمله می‌توان به قارچ *Trichoderma harzianum* اشاره کرد. این قارچ اثرات کنترلی خوبی روی نماتدها نشان داده است. این قارچ با مکانیسم‌های مختلف از جمله پارازیته نمودن مستقیم تخم و لاروهای نماتد و القای مقاومت در گیاه میزبان باعث کنترل بیماری می‌شود. عکس العمل‌های دفاعی گیاه ممکن است به صورت موضعی و سیستمیک بروز نماید که در حالت سیستمیک، میزان برخی آنزیم‌های مرتبط با دفاع گیاه مثل پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در گیاه افزایش می‌یابند. بسیاری از آنزیم ها از جمله پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز، کیتیناز، محتویات فنلی در ارتباط با مقاومت القایی سیستمیک (Induced Systemic Resistance) می‌باشند.

آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز از جمله آنزیم‌هایی است که در اکسیداسیون فنل‌ها به کینون‌ها و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی در طول حمله بیمارگرها نقش مهمی دارند (Flott *et al*, 1989, Kerby and Somervill, 1989, Robb *et al*. 1987) و در بسیاری از محصولات دولپه و تک-لپه از جمله پنبه/ بیماری ورتسیلیومی، سیب زمینی/ فیتوفترای، باقلا/ زنگ باقلا بررسی شده است (Mohammadi and Kazemi 2002). در فرایند اکسیداسیون فنل‌ها، مولکول اکسیژن به عنوان گیرنده الکترون محسوب می‌شود. زینوویوا و همکاران فعال‌شدن مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان و همچنین بازدارنده‌های فعالیت نماتدهای انگل گیاهی را در ارتباط متقابل میزبان- نماتد (گوجه‌فرنگی- *M. incognita*) مورد بررسی قرار دادند و ثابت کردند که افزایش مقدار فیتوآلکسین، کاهش تعداد گال و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز را سبب می‌شوند (Zinovieva *et al*.1990). محمدی و کاظمی نیز در بررسی میزان مقاومت ارقام مختلف گندم به قارچ *Fusarium graminearum* و القای مقاومت فعالیت آنزیم های پراکسیداز وپلی فنل اکسیداز را مورد بررسی قرار دادند (Mohammadi and Kazemi 2002). از جمله اثرات دیگر این آنزیم‌ها، تغییراتی در ترکیبات پروتئینی هیدروکسی‌پرولین موجود در دیواره سلولی است که باعث مقاوم‌سازی آن در مقابل عوامل بیمارگر می‌گردد (Hammerschmidt and Kuc 1995) . پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی نیز در اثر حمله بیمارگر یا تغذیه حشرات، زخم، تنش‌های محیطی و هورمون‌ها مثل اتیلن، سالیسیلیک اسید در گیاه پدید می‌آیند و در مقاومت علیه بیمارگرها نقش دارند. این پروتئین‌ها به ۱۴ خانواده تقسیم‌بندی شده‌اند که PR-9 شامل پراکسیداز و پروتئین‌های شبه پراکسیداز است که در مکانیسم اکسیداسیون ترکیبات فنلی وتشکیل لیگنین دخالت دارند و به‌وسیله دو ژن *ypr, prx* در گیاه کد می‌شوند (Silva *et al*, 2004). زاچئو و همکاران نشان دادند که فعالیت آنزیم پراکسیداز و فرایند لیگنینی‌شدن ارتباط زیادی با پراکسیدازهای آنیونی دارند که در دیواره سلول‌های گیاهان موجود است و در دفاع اهمیت دارند و ثابت کردند که در ارقام مختلف گوجه فرنگی ارتباط مستقیمی بین افزایش فعالیت آنزیم

پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز گیاه و مقاومت آن به نماتد *M. javanica* وجود دارد. فعالیت این آنزیم در دمای بیشتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد و در نتیجه، مقاومت گیاه شکسته می‌شود (Zacheo *et al*.1995, Zacheo *et al*, 1993).

هدف از انجام این تحقیق بررسی توانایی قارچ *T. harzianum* جدایه BI در القای آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز به عنوان آنزیم‌های مهم در دفاع گیاهان علیه بیمارگرهای گیاهی در گوجه فرنگی رقم کینگ استون[1] و امکان سیستمیک‌شدن آن در بخش‌های مختلف گیاه از جمله دو نیمه ریشه و ساقه است.

مواد و روش ها

تهیه زادمایه نماتد و قارچ

نماتد *M. javanica* (Thorne) chitwood, 1949 از بخش نماتدشناسی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور به صورت خالص تهیه شد. نماتد مزبور روی گیاهچه های گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا و روما. وی .اف تکثیر شد. گیاهچه ها به مدت ۶۰-۴۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گلخانه نگهداری شدند. پس از چندین دوره تکثیر متوالی نماتد روی گوجه فرنگی جمعیت مورد نیاز به‌دست آمد. استخراج تخم و لارو سن دوم به روش هوسی و بارکر(Hussay and Barker 1973) انجام گرفت.

جدایه قارچ *T. harzianum* BI Rifai,1969 از دکتر حمید روحانی (دانشگاه مشهد، گروه گیاهپزشکی) دریافت شد. این قارچ روی محیط کشت تولید میسلیوم های فراوان می‌کند و با آزمایش‌های صورت‌گرفته توسط محقق در کنترل نماتد مولد گره ریشه حائز اهمیت است. پس از خالص‌سازی به روش تک‌اسپور کردن روی محیط کشت[2] PDA تکثیر شد و با استفاده از لام هموسیتومتر غلظت های مورد نیاز اسپور در میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه شد (Zafari 2001).

1. King stone
2. Potato Dexterose Agar.

بررسی امکان سیستمیک شدن فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه گیاه گوجه فرنگی آلوده نماتد به روش تقسیم ریشه

ابتدا بذور گوجه فرنگی رقم کینگ استون به وسیله هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شد و پس از شست‌وشوی با آب مقطر استریل در داخل گلدان‌های حاوی خاک الک شده (حاوی هوموس، خاک مزرعه، ماسه، به نسبت ۱:۱:۲ و پاستوریزه شده در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) کشت گردید. گیاهچه‌ها در مرحله شش برگی با دقت از گلدان خارج شده، ریشه آنها چندین بار با آب شست‌وشوی داده شد، سپس ریشه هر گیاهچه تا محل ریشه اصلی با روش تقسیم ریشه[3] به دو نیمه تقسیم گردید و هر نیمه در گلدان مجزا و مجاور یکدیگر قرار داده، با خاک پر گردید. در همین زمان یک نیمه ریشه گیاه در داخل سوسپانسیون قارچ تریکودرما با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر فرو برده شد (شکل ۱) و به نیمه دیگر جمعیت ۲۰۰۰ لارو سن دوم مایه‌زنی شد. تیمارهای آزمایش شامل ۱- گیاهچه‌هایی که نیمی از ریشه آنها به وسیله سوسپانسیون اسپور تریکودرما با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر مایه‌زنی ونیمه دیگر با آب مقطر استریل مایه‌زنی شد؛ ۲- گیاهچه‌هایی که نیمی از ریشه آنها به‌وسیله نماتد مایه‌زنی ونیمی دیگر با آب مقطر استریل مایه‌زنی شد؛ ۳- گیاهچه‌هایی که نیمی از ریشه آنها به‌وسیله تریکودرما و نیمی دیگر به‌وسیله نماتد مایه‌زنی شد؛ ۴- گیاهچه‌هایی که هر دو قسمت ریشه با آب مقطر استریل مایه‌زنی شد. به منظور حفظ درجه حرارت ثابت اطراف ریشه ها گلدان‌ها در یک ظرف بزرگ حاوی آب ۲۷درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. حرارت مورد نیاز به‌وسیله قراردادن هیتر آکواریوم تنظیم گردید. میزان آبدهی به ازای هر گیاهچه به صورت کاملا مساوی و به اندازه مصرف روزانه هر گیاه بوده است و حداکثر و حداقل حرارت موجود در گلخانه ۲۸ و۲۰ درجه بود. آزمایش به صورت

3. Split root method

فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل چهار سطح نماتد، قارچ،نماتد+قارچ و عدم مایه زنی(شاهد) و فاکتور دوم شامل زمان نمونه‌برداری که در هفت سطح (هفت روز) در نظر گرفته شد. بنابر این، نمونه برداری به مدت هفت روز متوالی و به فاصله یک روز، از بخش های (نیمه) مختلف ریشه هر گیاه و ساقه انجام شد. پس از شست‌وشوی و خشک نمودن آنها با استفاده از دستمال کاغذی، نمونه ها در بافر سیترات – فسفات در درون هاون کاملا له و همگن نموده، عصاره‌گیری شد و تا قبل از انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Mohammad and Kazemi 2002, Sahebani 2003).

تعیین پروتئین کل گیاه

پروتئین کل موجود در عصاره گیاه با روش براد فورد(Bradford,1976) انجام گرفت . صد میلی گرم پودر کوماسی بریلیانت بلو (G 250) در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد و سپس در روی شیکر، ۱۰۰میلی لیتر محلول اسید فسفریک ۸۵ درصد (W/V) قطره قطره به محلول فوق اضافه شد. رنگ محلول نهایتاً به قهوه‌ای روشن تغییر پیدا کرد. با استفاده از آب مقطر، حجم نهایی به یک لیتر رسانده شد. برای تعیین میزان پروتئین کل عصاره مورد آزمایش، مقدار پنج میکرو لیتر از عصاره هر نمونه با سه میلی‌لیتر محلول براد فورد کاملا مخلوط گردید و میزان جذب نور در طول موج λ max =۵۹۵ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد که براساس سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شده بود، محاسبه شد.

ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)

مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره ریشه که دارای ۴۰ میکروگرم پروتئین است، ۲۰میکرو لیتر گایاکول و مقدار کافی بافر سیترات- فسفات با pH ۵/۴ طوری مخلوط شدند که حجم نهایی مخلوط دو میلی لیتر گردید. این مواد در یک لوله آزمایش کاملا مخلوط شده و به عنوان محلول پایه در صفر کردن اسپکتروفتومتر استفاده شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد به مخلوط اضافه شد و از دستگاه اسپکترو فتومتر مدل spectronic 501 در طول موج ۴۷۵ نانومتر برای اندازه‌گیری جذب نور استفاده شد. بعد از انجام واکنش فعالیت آنزیم در هر ۱۰ ثانیه متوالی اندازه گیری و برای هر تکرار از ماده بازدارنده فعالیت به‌نام سیانید پتاسیم (KCN) با غلظت هفت میکرومول استفاده شد (Mohammadi and Kazemi 2002) فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در دقیقه در میلی گرم عصاره گیاه بیان گردید.

ارزیابی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

مقداری از عصاره که حاوی ۴۰ میکروگرم پروتئین است ،۲۰میکرولیترمحلول پرولین و مقدار کافی بافر سیترات- فسفات ۲۵ میلی مول با pH ۶/۴ طوری که حجم نهایی مخلوط دو میلی لیتر باشد در یک لوله آزمایش کاملا مخلوط کرده و با ورتکس هوادهی شد و دستگاه اسپکتروفتومتر با آن صفر گردید. سپس به مقدار ۴۰میکرولیتر محلول پیروکتکول به مخلوط اضافه شد. جذب نور به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر مدل اسپکترونیک ۵۰۱ در طول موج λmax=۵۱۵nm قرائت شد. پس از انجام واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به مدت یک دقیقه و با فواصل زمانی در هر ۱۰ ثانیه متوالی (از ماده بازدارنده فعالیت به نام آسکوربیک اسید با غلظت هشت میکرومول استفاده شد) (Mohammadi and Kazemi2002, Sahebani,2003) و در اسرع وقت مخلوط نموده، تغییرات جذب نور آنزیم به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. الکتروفورز پروتئین‌های محلول ریشه گوجه فرنگی در ژل پلی اکریل آمید بر طبق روش محمدی و کاظمی و روش صاحبانی انجام شد. در هر چاهک مقداری عصاره حاوی۵۰ میکروگرم پروتئین استفاده شد (Mohammadi and Kazemi 2002, Sahebani, 2003)

ظاهرشدن باندها

ولتاژ و آمپر به ترتیب در مرحله ژل متراکم‌کننده ۷۵و۲۸ و در مرحله ژل جداکننده ۱۰۰ولت و۲۲آمپر در نظر گرفته شد. برای رنگ‌آمیزی آیزوزیم های پراکسیداز ابتدا ژل از بین صفحات شیشه‌ای خارج و با آب مقطر چندین بار شست‌وشوی داده شد. سپس

در بافرسیترات- فسفات ۲۵ میلی مول با pH ۵/۴ محتوی گویاکول با غلظت نهایی پنج میلی‌مول به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن یک درصد به آن اضافه شد و پس از چند ثانیه باندهای قرمز قهوه‌ای که نشان دهنده آیزوزیم‌های پراکسیداز بودند، ظاهر شد (Mohammad and Kazemi 2002). در مورد آیزوزیم‌های پلی فنل اکسیداز ابتدا ژل Run شده از بین صفحات شیشه‌ای خارج و با آب مقطر چندین بار شست‌وشوی داده شد. سپس در بافرسیترات- فسفات ۵۰ میلی مول با pH= ۷ محتوی ۳-۴-دی هیدروکسی فنیل آلانین (L-DOPA) با غلظت نهایی ۱۰میلی مول روی شیکر قرار داده شد. پس از حدود ۳۰ دقیقه باندهای خاکستری مایل به سیاه که نشانگر آیزوزیم‌های پلی فنل اکسیداز بودند، ظاهر شد(Sahebani 2003).

نتایج

A- میزان تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در نیمه ریشه مایه‌زنی شده با نماتد در حالی که نیمه دیگر با قارچ مایه‌زنی شد.

دراین بخش (که نیمی از ریشه با نماتد مایه‌کوبی شده بود) فعالیت آنزیم تا روز سوم با نیمه دیگر ریشه بخش B بدون اختلاف معنی‌دار بود، ولی طی روزهای بعد با اختلاف معنی‌داری افزایش نشان داد. حداکثر فعالیت آنزیم در روز ششم بعد مایه‌زنی به‌دست آمد و به دنبال آن کاهش نشان داد. اختلاف معنی دار فعالیت آنزیم در این تیمار با شاهد در روز ششم و بعد از آن نیز قابل مشاهده بود که نشان دهنده القای آنزیم و سیستمیک‌شدن آن در گیاه است. (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه بررسی قابلیت سیستمیک شدن فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه آلوده به نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* به وسیله قارچ *T. harzianum*

	روزهای پس از مایه‌زنی						
بخش ریشه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
بخش A	۲۴def	۲۵,۵def	۲۷,۶ef	۳۱,۱fgh	۴۸,۲jk	۷۸,۷m	۴۱,۵ij
بخش B	۱۸bcd	۲۲,۷bcd	۲۵,۵def	۴۸,۶jk	۶۰,۲l	۵۱,۴k	۳۱fgh
بخش a	۱۵,۵bc	۲۸,۷efg	۲۹,۶bc	۴۴,۵jk	۶۲,۸l	۳۶,۵hi	۲۲,۷ced
بخش b	۷,۲a	۱۱,۹ab	۱۳,۲ab	۲۵,۸def	۲۹,۲efg	۳۶,۸ghi	۲۴,۷def

متوسط میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (Δ OD 475nm/min/mg protein)

بخش A: ارزیابی آنزیم پراکسیداز در نیمی از ریشه گیاه که بوسیله نماتد مایه زنی شده در حالی که نیمه دیگر با قارچ مایه زنی شده بود.

بخش B: ارزیابی آنزیم پراکسیداز در نیمی از ریشه گیاه که بوسیله قارچ مایه زنی شده در حالی که نیمه دیگر با نماتد مایه زنی شده بود.

بخش a : ارزیابی آنزیم پراکسیداز در نیمی از ریشه گیاه که بوسیله نماتد مایه زنی شده در حالی که نیمه دیگر با آب مقطر استریل مایه زنی شده بود.

بخش b: ارزیابی آنزیم پراکسیداز در نیمی از ریشه گیاه که بوسیله با آب مقطر استریل مایه زنی شده در حالی که نیمه دیگر با نماتد مایه زنی شده بود.

میانگین ها در هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده اند با آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند. هر عدد میانگین سه تکرار است.

B- میزان تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در نیمه ریشه مایه‌زنی شده با نماتد در حالی‌که نیمه دیگر با آب مقطر استریل مایه‌زنی شد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در بافت‌های ریشه تیمارشده با نماتد از روز اول تا پنجم نسبت به تیمار با آب مقطر استریل افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری در مقدار فعالیت آنزیم در تیمارها وجود دارد و در روز پنجم پس از تیمار ریشه مقدار فعالیت آنزیم در بافت‌های ریشه کاهش نشان داده، اختلاف بین تیمارها معنی‌دار نیست (جدول ۱).

نتایج فعالیت آنزیم پراکسیداز در ساقه گوجه فرنگی در تیمار ریشه که نیمی به‌وسیله‌ی قارچ و نیمی دیگر به‌وسیله نماتد مایه‌زنی شد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در بافت های ساقه از روزسوم نسبت

به شاهد اختلاف معنی‌دار داشت و افزایش فعالیت آنزیم در روز چهارم پس از تیمار و به دنبال آن، کاهش نشان داد در گیاهان شاهد وحداکثر فعالیت آنزیم در روزچهارم بعد از مایه‌زنی بود (جدول۲).

جدول ۲- مقایسه بررسی قابلیت سیستمیک شدن آنزیم پراکسیداز در القای گیاه آلوده به نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* به وسیله قارچ *T. harzianum* در ساقه

	روزهای پس از مایه‌زنی						
بخش ریشه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
تیمارA	۱۶,۵a	۱۹,۶a	۵۹cd	۶۳,۵d	۵۴,۲c	۳۵,۱b	۲۷,۸b
شاهدB	۱۵,۳a	۲۱,۹ab	۳۴,۴c	۵۹,۷e	۴۸,۸d	۳۲,۳c	۲۶,۹bc

متوسط میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (Δ OD 475nm/min/mg protein)

ستون هایی که با حروف یکسان نشان داده شده اند با آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند.

بخش A: ارزیابی آنزیم پراکسیداز در ساقه گیاه مایه زنی شده با نماتد *Meloidogyne javanica* و قارچ*T. harzianum* .

بخش B: ارزیابی آنزیم پراکسیداز در ساقه گیاه مایه زنی شده با نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* وآب مقطر استریل(شاهد)

A- میزان تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در نیمه ریشه مایه‌زنی‌شده با نماتد در حالی‌که نیمه دیگر با قارچ مایه‌زنی شد

دراین بخش (که نیمی از ریشه با نماتد مایه کوبی شده بود) فعالیت آنزیم تا روز سوم با نیمه دیگر ریشه بخش B بدون اختلاف معنی‌دار بود، ولی طی روز چهارم به بعد با اختلاف معنی‌داری افزایش نشان داد. حداکثر فعالیت آنزیم در روز ششم بعد از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. اختلاف معنی‌دار در گیاهچه‌های شاهد در طی روزهای متوالی قابل مشاهده بود که نشان‌دهنده القای آنزیم وسیستمیک‌شدن آن در گیاه است (جدول۳).

جدول ۳. متوسط میزان سیستمیک شدن فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در اثر قارچ *T. harzianum* بر علیه نماتد *M. javanica* در ریشه گوجه فرنگی

	روزهای پس از مایه‌زنی						
بخش ریشه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
بخش A	۱۷,۹abcd	۲۳,۴bcde	۲۵,۸bcde	۳۲,۷efg	۴۴,۹e	۵۴,۱jk	۳۸,۳gh
بخش B	۱۶,۶abc	۱۸abcd	۲۲,۹bcde	۵۰,۴ijk	۴۷,۵hij	۲۶,۷cde	۲۵,۳bcde
بخش a	۱۸,۵abcd	۲۳,۳bcde	۲۵,۹bcde	۴۴,۲hi	۶۰,۶k	۳۹,۵ghi	۳۷,۷fgh
بخش b	۷,۹۶a	۱۴,۵ab	۱۸,۳abcd	۲۹,۲defg	۲۶,۹cdef	۲۴,۶bcde	۲۳bcde

متوسط فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز(Δ OD 515nm/min/mg protein)

بخش A: ارزیابی آنزیم پلی فنل اکسیداز در نیمی از ریشه گیاه که بوسیله نماتد مایه زنی شده در حالی که نیمه دیگر با قارچ مایه زنی شده بود.

بخش B: ارزیابی آنزیم پلی فنل اکسیداز در نیمی از ریشه گیاه که بوسیله قارچ مایه زنی شده در حالی که نیمه دیگر با نماتد مایه زنی شده بود.

بخش a : ارزیابی آنزیم پلی فنل اکسیداز در نیمی از ریشه گیاه که بوسیله نماتد مایه زنی شده در حالی که نیمه دیگر با آب مقطر استریل مایه زنی شده بود.

بخش b: ارزیابی آنزیم پلی فنل اکسیداز در نیمی از ریشه گیاه که بوسیله با آب مقطر استریل مایه زنی شده در حالی که نیمه دیگر با نماتد مایه زنی شده بود.

میانگین ها در هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده اند با آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند. هر عدد میانگین سه تکرار است.

میزان تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در نیمه ریشه مایه‌زنی شده با نماتد در حالی که نیمه دیگر با آب مقطر استریل مایه‌زنی شد، میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در بافت‌های ریشه تیمار شده

با نماتد از روز اول تا پنجم نسبت به تیمار با آب مقطر استریل افزایش یافت واختلاف معنی‌داری در مقدارفعالیت آنزیم در تیمارها وجود دارد و در روز پنجم بس از تیمار ریشه مقدار فعالیت آنزیم در بافت‌های ریشه کاهش نشان داده اختلاف بین تیمارها معنی‌دار نمی‌باشد (جدول۳). نتایج فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ساقه گوجه فرنگی در تیمار ریشه که نیمی به‌وسیله قارچ و نیمی دیگر به‌وسیله نماتد مایه‌زنی شد میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در بافت‌های ساقه از روزاول با شاهد اختلاف معنی دار داشت و حداکثر فعالیت آنزیم در روز چهارم بود و به دنبال آن کاهش نشان داد. در گیاهان شاهد فعالیت آنزیم در طی روزهای متوالی اختلاف معنی‌داری داشت (جدول۴).

جدول ۴- متوسط میزان سیستمیک شدن فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در اثر قارچ *T. harzianum* بر علیه نماتد *M. javanica* در ساقه گوجه فرنگی

	روزهای پس از مایه‌زنی						
بخش ریشه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
تیمارA	۱۶٫۶bc	۲۲٫۱d	۲۷٫۵d	۵۲٫۲f	۴۷٫۶f	۲۶٫۷d	۲۵٫۳d
شاهدB	۴٫۵a	۱۳٫۳cd	۲۰٫۹cd	۴۴٫۲ef	۵۰٫۶f	۳۴٫۸e	۱۷٫۶cd

متوسط فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز(Δ OD 515nm/min/mg protein)

- اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد اختلاف معنی دار ندارند هر عدد میانگین سه تکراراست.

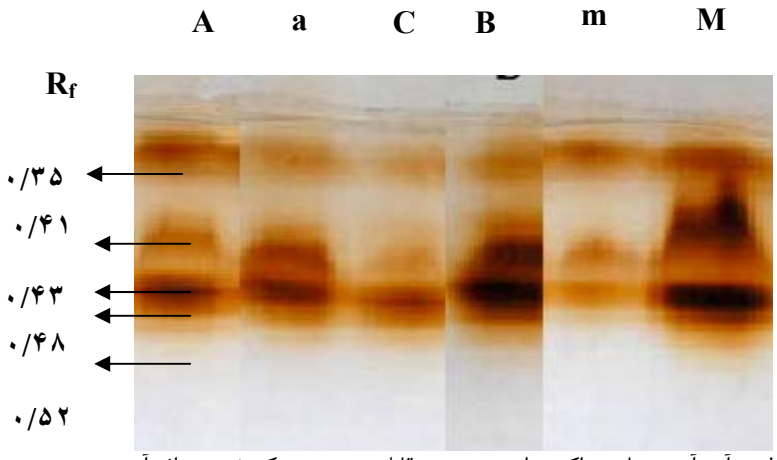
شاهد گیاهانی هستند که نیمی از ریشه با نماتد و نیمی دیگر مایه زنی با آب مقطر استریل بود.

نتایج الکترو فورز آیزوانزیم‌های پراکسیداز در بررسی میزان سیستمیک شدن درتیمار نیمی از ریشه به وسیله ی نماتد مایه‌زنی گردید و نیمه دیگر مایه‌زنی با آب مقطر استریل(A)، نشان‌دهنده آن است که آیزوآنزیم‌ها با تحریک سیستم دفاعی گیاه به‌وسیله قارچ القا شده و در مقایسه با شاهد مربوطه باندهای ۳۵،۴۱ =R_F قوی‌تر ظاهر شدند که در دفاع علیه نماتد نقش دارند (شکل۲) . در تیمار ریشه مایه‌زنی‌شده با قارچ (B) نتایج نشان‌دهنده آن است که هر پنج نوع آیزوانزیم با تراکم بالای باند پروتئینی ظاهر شدند و باند پروتینی مربوط به ۵۲ =R_F ۴۲ =R_Fو ۴۸ =R_F بیشترین تراکم را داشتند. در تیمار ساقه که نیمی از ریشه با قارچ تریکودرما و نیمی دیگربه‌وسیله نماتد مایه‌زنی شده بود (M)باندهای۴۳،۴۸،۵۲ =R_F قوی‌تر در مقایسه با شاهد ظاهر شدند (شکل ۲)، که نشان‌دهنده اثر تحریک کنندگی سیستم دفاعی گوجه فرنگی بر اثر قارچ تریکودرما است و در مقایسه با گیاه سالم نیز از بیشترین تراکم برخوردار بودند که دلیلی بر ایجاد مقاومت القایی به‌وسیله قارچ مزبور است.

نتایج الکتروفورز آیزوآنزیم های پلی فنل اکسیداز سیستمیک مربوط به تیمار گوجه فرنگی مایه‌زنی نیمی از ریشه با نماتد (A) نشان‌دهنده آن است که هر چهار آیزوآنزیم به ترتیب با R_f های ۴۲،۴۵،۵۰،۵۵ به صورت قوی در مقایسه با شاهد (D) (مایه‌زنی نیمه دیگر ریشه با قارچ) بیان شدند.

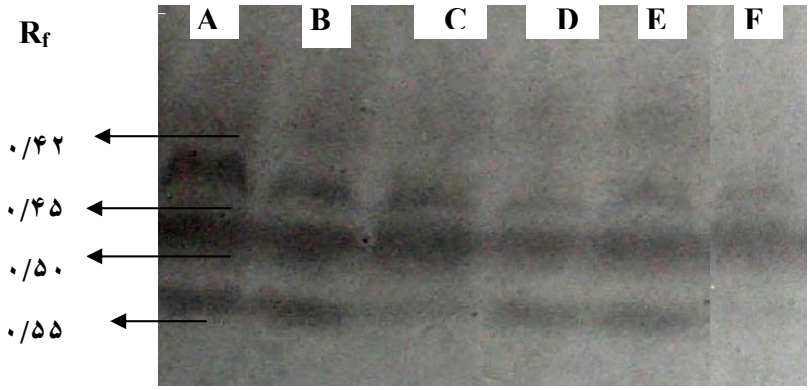
همچنین الکتروفورز آیزوآنزیم های پلی فنل اکسیداز سیستمیک در تیمار گوجه فرنگی مایه‌زنی نیمی از ریشه با قارچ (B) نیز نشان‌دهنده آن است که هر چهار آیزوآنزیم به ترتیب با R_f های ۴۲ ،۴۵، ۵۰، ۵۵ بیان شده اند و در مقایسه با شاهد خود (E) باندهای قوی‌تر مربوط به R_f های ۴۵، ۵۰ بیان شدند. در تیمار گوجه فرنگی مایه‌زنی نیمی از ریشه با نماتد، نیمه دیگر ریشه با قارچ (C) نیز نشان

دهنده آن است‌که آیزوآنزیم‌های پلی فنل اکسیداز در ساقه نیز بیان شدند و هر چهار آیزوآنزیم به ترتیب با R_f های ۴۲، ۴۵، ۵۰، ۵۵ بیان شدند و در مقایسه با شاهد (F)، تراکم باندهای قوی‌تر را ظاهر ساختند (شکل۱).



شکل ۱- مقایسه الکترو فورز آیزوآنزیم های پراکسیداز در بررسی قابلیت سیستمیک شدن و اثر آن در کاهش آلودگی گیاه برعلیه نماتد

A : تیمار نیمی از ریشه با نماتد مایه زنی شده ونیمه دیگر با آب مقطر استریل مایه زنی شده بود
B : تیمار نیمی از ریشه به وسیله قارچ تریکودرما مایه زنی شد و نیمی دیگر با آب مقطراستریل مایه زنی شده بود
C : ریشه مایه زنی شده با آب مقطر استریل
a : شاهدتیمار A
M : تیمارنیمی از ریشه با تریکودرما مایه زنی گردید و نیمی دیگر به وسیله نماتد مایه زنی شده بود(در ارزیابی فعالیت آنزیم در ساقه)
m : شاهد تیمارM



شکل۲- مقایسه الکتروفورز آیزوآنزیم‌های پلی فنل اکسیداز در بررسی سیستمیک‌شدن و اثر آن در کاهش آلودگی نماتد

A: تیمار گوجه فرنگی مایه زنی نیمی از ریشه با نماتد
B: تیمار گوجه فرنگی مایه زنی نیمی از ریشه با قارچ
C: تیمار گوجه فرنگی مایه زنی نیمی از ریشه با نماتد – نیمه دیگر ریشه با قارچ(ساقه)
D: مایه زنی نیمه دیگر ریشه با نماتد(شاهدA)
E:نیمه دیکر ریشه مایه زنی با آب مقطر استریل(شاهدB)
F: نیمی از ریشه با نماتد و نیمی دیگر مایه زنی با آب مقطر استریل بود (شاهد C)

بحث

در بررسی قابلیت سیستمیک‌شدن فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار بافت‌های ریشه (نیمی از ریشه آلوده به نماتد) چنین استنباط می شود که القای آنزیم از روز اول تا روز ششم افزایش قابل توجهی داشته است و به نظر می‌رسد که اثر مقاومت القایی سیستمیک به‌وسیله قارچ تریکودرما با نفوذ نماتد به داخل بافت گیاه افزایش یافت و باعث القای و تاثیر بر

سنتز پراکسیداز و مکانیسم های دفاعی گیاه شده است. با توجه به این‌که این آنزیم در فرایند سنتز برخی ترکیبات دفاعی از جمله پراکسید هیدروژن و لیگنینی‌شدن دیواره سلولی گیاه دخالت دارد. همچنین باعث ایجاد پل های عرضی هیدروکسی پرولین موجود در دیواره سلول‌های ریشه می‌شود که نتیجه آن، مقاوم‌سازی بافت‌های ریشه در برابر عامل بیمارگر می گردد، نشان از اهمیت این آنزیم در پروسه واکنش های دفاعی گیاه دارد. نتایج به‌دست آمده در این مورد با نتایج سیلوا وهمکاران، محمدی وکاظمی زاچئو و همکاران (Silva *et al*. 2004, Mohammadi and Kazemi 2002, Zacheo *et al*.1995) مشابهت دارد. قارچ تریکودرما همچنین در تیمار (مایه‌زنی نیمی از ریشه با قارچ) باعث افزایش القای سنتز آنزیم پراکسیداز در بافت ساقه گیاه شد و در مقایسه با شاهد آنزیم مزبور افزایش قابل توجهی دارد. افزایش فعالیت آنزیم می‌تواند دلیلی بر القای سیستمیک فعالیت این آنزیم در قارچ *T. harzianum* باشد. یدی دیا و همکاران در واکنش دفاعی گیاه خیار به‌وسیله *T. harzianum* به نتایج مشابهی دست یافتند. این نتایج با آزمایش‌هایی که سیلوا و همکاران در نتیجه تاثیر ریزوباکتری‌ها در بروز مقاومت سیستمیک در گوجه فرنگی انجام دادند مطابقت داشت. آنها نیز فعالیت آنزیم‌های مختلف از جمله پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز را موثر دانستند (Yedidia *et al*. 1999, Silva *et al*. 2004) . با توجه به نتایج گرفته شده از این طرح در مورد رابطه فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در گیاه با آلودگی نماتد مولد گره ریشه چنین استنباط می شود که در تیمارهای ریشه وساقه میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با شاهد (بدون نماتد) در میزان قابل توجهی می باشد که می‌تواند بر نماتد موثر باشد؛ اگر چه، چگونگی تاثیر مستقیم وغیر مستقیم این آنزیم بر نماتد کاملا روشن نیست و نیاز به آزمایش‌های بیشتری در آینده در این خصوص دارد. القای سیستم دفاعی گیاه به‌ویژه مکانیسم‌هایی که سبب مهار نمودن نفوذ نماتد به گیاه می‌شوند، مانند سنتز ترکیبات منهدم کننده ساختار بدن نماتد مانند پراکسید هیدروژن که نقش آنزیم پراکسیداز در همه آنها مشهود است. این مکانیسم‌ها محدودکننده دیگر بیمارگرهای گیاهی نیز می‌باشد که به‌وسیله دیگر محققان بررسی شده است. لذا با توجه به پتانسیل قارچ *T.harzianum* در القای فعالیت این آنزیم و دیگر ترکیبات دفاعی گیاه، و القای پیام دهنده‌های سیستمیکی پاسخ‌های دفاعی گیاه مانند اسید جاسمونیک، اتیلن و اسید سالیسیلیک که منجر به سیستمیک‌شدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه می‌شود (Chen *et al*.2000, Koike *et al*. 2001, Van loon and Vanstrien.1999). همچنین در بررسی سیستمیک‌شدن پلی فنل اکسیداز در ریشه آلوده به نماتد چنین استنباط می‌شود که القای آنزیم از روز اول تا روز ششم افزایش قابل توجهی داشته است و به نظر می‌رسد که اثر مقاومت القایی سیستمیک بر اثر قارچ تریکودرما با نفوذ نماتد به داخل بافت گیاه افزایش یافته و به‌نوبه خود موجب تاثیر روی مکانیسم‌های دفاعی و سنتز پراکسیداز می‌شود. این آنزیم در فرایند سنتز برخی ترکیبات دفاعی از جمله کینون ها و ترکیبات مشتق فنل مانند دی فنل و منو فنل دخالت دارند. همچنین می‌تواند باعث ایجاد پل های عرضی هیدروکسی پرولین موجود در دیواره سلولی ریشه شود که نتیجه آن، مقاوم‌سازی آن در برابر بیمارگرهاست و نشان از اهمیت این آنزیم در پروسه واکنش های دفاعی گیاه است. نتایج به‌دست آمده در این مورد با نتایج (Silva *et al*. 2004, Mohammadi and Kazemi 2002, Zacheo et al.1995) مشابهت دارد. با توجه به نتایج جدایه‌های قارچ *T. harzianum* باعث تولید هورمون‌های جاسمونیک اسید و اتیلن و تاثیر مطلوب بر رشد گیاه و فعال نمودن ژن های تولید کننده آنزیم پلی فنل اکسیداز شد و در نتیجه، مقاومت القایی سیستمیک در گیاه ایجاد می‌کند. از طرفی دیگر، این قارچ سبب تولید موادی نظیر سالیسیلیک اسید و پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی می‌شوند که نقش موثری در مقاومت گوجه فرنگی به نماتد دارند.

نتیجه گیری کلی

چنین پیشنهاد می‌شود که قارچ *T. harzianum* محرک مناسبی برای القاشدن آنزیم‌های از جمله

پراکسیداز و در نتیجه، سبب تحریک مکانیسم دفاعی گیاه گوجه فرنگی رقم کینگ استون بر علیه نماتد *M. javanica* می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک عامل کنترل کننده بیولوژیک و به عنوان یک القاکننده سیستم دفاعی گیاه در مدیریت این نماتد مورد توجه قرار گیرد.

REFERENCES

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –type binding. Anal of Biochemstry 72, 248-254.

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

Flott BE Moerschbacher, BM, Resener, H (1989) Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. New Phytologist 111: 413-421.

Hammerschmidt R, Kuc, J (1995) Induced resistance to disease in plants. Kluwer Academic Publishers, American. 183 Pp.

Harman GE Howell, CR, Viterbo, A, Chet, I, Lorito, M (2004) *Trichoderma species* - opportunistic , avirulant plant symbionts. Nature Review of Microbiology 2: 43-56.

Harman GE (2000) Changes in perception dervied from Reserch on *Trichoderma harzianum T – 22* (Myths and dogmas of biocontrol). The American Phytopathology Society. 377 – 393.

Hoitink HAJ Madden, LV, Dorrance, AD (2005) Systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum*: intractions Between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. Phythopatholgy 95: 186-189.

Howell CR (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biocontrol of plant disease : the history and Eveloution of current concepts. Plant Disease 87: 4 -10.

Hussey RS Barker, KR (1973) A comparsion of methods of collecting inocula of *Meloidogyne,.spp*.including anew technique.Plant Disease Rep. 57: 1025-1028.

Jeapson SB (1987) Identification of root-knot nematodes, *Meloidogyne* species. C.A.B International.Wallingford. 265p.

Kerby K Somervill, S (1989) Enhancment of specific intercellular peroxidase following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei.* Physiological and Molecular Plant Pathology 35: 323-337.

Koike N Hyakumachi, M, Kageyama, K, Tsuyuma, S, Doke, N (2001) Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth – promoting fungi: Lignification and superoxide generation. European Journal of Plant Pathology 107: 523-533.

Mohammadi M, Kazemi, H (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science162: 491-498.

Pedrosa FMR Hussey RS, Bopruhma HR (1996) Cellular responses of resistant and susceptible soybean genotype infected with *Meloidogyne arenaria* race1 and 2. Journal of Nematology 28: 225-232.

Robb J Powell DA, Street PFS (1987) Time course of wall- coating secretion in *Verticillium* – infected tomatoes. Physiology and Plant Pathology 31: 217-226.

Sahebani N (2003) Interaction between root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersci* and study on changes of some biochemical mechanisms defense in tomato.P.h.D thesis.Univ. Tehran, Iran.250pp.

Sharon E, Bar – Eyal M, Chet I, Herrera – Estrella A, Keleifeld O, Spiegel Y (2001) Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 91: 687- 693.

Silva HAS, Romeiro RSD, Macagnan BA, HalfeldVieria MC, Rereira B, Mountreer A (2004) Rhizobacterial Induction of systemic resistance in tomato plants: Non-specefic protection and increase in enzymes activites. Biological Control 29: 288-295.

Van loon LC, Vanstrien EA (1999) The families of pathogensis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1type Proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85-97.

Williamson VM, Hussay RS (1996) Nematode pathogenesis and resistance in plants. The Plant Cell 8: 1735-1745.

Xu J Narabu T, Mizukubo T, Hibi T (2001) A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incogenita,M. javanica* and *M. arenaria.* Phytopathology 91: 377-382.

Yedidia I Benhamou N, Chet I (1999) Induction of defense response in cucumber plans (*cucumis sativus L.*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmented Microbiology 65: 1061- 1070.

Zacheo G Orlando C, Bleve-Zacheo T (1993) Charactrization of anionic peroxidases in tomatos isolines infected by *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology 25: 249-256.

Zacheo G Bleve-Zacheo T, Pacoda D, Orlando, C Durbin, RD (1995) The assocation between heat-induced susceptiblity of tomatos to *Meloidogyne incognita* and peroxidase activity. Physiological and Molecular Plant Pathology 46: 491-50.

Zinoveiva SV Vasyukova NI, Gerasimova NG, Udalova ZHV, Chalenko, GI (1990) Induced resistance of plants to root-knot nematode. Institue of parasitol RAS.(Abst.)

Zafari D.2 002. Study of identification *Trichoderna* speices in iran. Iranian Journal of Plant Pathology 38(1,2): 21-45.

Biological Control of Pests and Plant Diseases,
No. 1, 2012

Biological Control and Systemic Induction of Peroxidase and Polyphenoloxidase by *Trichoderma harzianum* in Tomato Plants Infected with Nematode *Meloidogyne javanica*

MALEK ZIARATI H.[1] , SAHEBANI N.[2] and H R. ETEBARIAN.[2]
1, Resercher in Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Centre of Golestan Province, Gorgan, Iran
2, Asissd. Prof. of Dept Plant Protection, Abouryhan Compelex, College of Agriculture, University of Tehran.Iran.
(Received: January 5, 2012 - Accepted: June 1, 2012)

ABSTRACT

Systemic induction of peroxidase and polyphenoloxidase in tomato roots and stem followed by application of split root system method was investigated. Root system of tomato seedling in the sixth growth stage were divided in two equal sections after washing and replanted in two adjacent pots and then inoculated with nematode and fungus as fallowing treatments. The second treatment was inoculation of half root by *Trichoderma* spore suspension and half root with sterile distilled water. The first treatment was the inoculation of half of root by nematode and the second treatment was another half of root inoculated just by sterile distilled water. Inoculation of half root by *Trichoderma* and another half by nematode. Inoculation of both roots section with sterile distilled water (control). Changes of peroxidase and polyphenoloxidase enzymes activities in each root extract and stem section in each treatment were measured daily by spectrophotometer, between zero and seven days. The results showed that *Trichoderma* can increase enzymes activities not only in site of inoculation but also, in other part of plant such as root and stem. Maximum of peroxidase activity in root and stem was occurred at 5 and 4 days after inoculation. Maximum of polyphenoloxidase activity in root and stem was occurred at 6 and 4 days after inoculation, respectively. The results suggest that *Trichoderma* systemically induce plant defense mechanism and can be considered as a suitable inducer for root- knot nematode management.

Key words: Split root, suspension spore activity, defence mechanism, control

*Corresponding author: MALEK ZIARATI, H. E mail: hmalekiziarati@gmail.com