

مطالعه ی اثر قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* BI بر القای پاسخ دفاعی گیاه گوجه فرنگی علیه نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica*

فاطمه ناصری نسب*^۱، نواز الله صاحبانی^۲، حسن رضا اعتباریان^۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۴

چکیده

در این بررسی، فعالیت بیوکنترلی جدایه ی *Trichoderma harzianum* BI علیه *Meloidogyne javanica* و توانایی آن در القاء سیستم دفاعی در گیاه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y در آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. ریشه ی گیاهچه های گوجه فرنگی در مرحله ی ۶ برگی توسط سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* BI با غلظت ۱۰^۶ اسپور در میلی لیتر و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال سن دو نماتد به ازاء هر گیاه مایه زنی گردید. میزان فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و میزان فنل کل در روزهای اول تا هشتم بعد از مایه زنی نماتد، اندازه گیری شد. این جدایه، علاوه بر کاهش شدت بیماری و تعداد گال در گلخانه، افزایش درصد مرگ و میر لاروها و کاهش درصد تفریح تخم ها در آزمایشگاه، فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز را افزایش داد که این افزایش در روز چهارم بعد از مایه زنی نماتد به حداکثر میزان خود رسید. بیشترین میزان فنل کل در گیاه آلوده ی تیمار شده با جدایه ی *T. harzianum* BI در روز پنجم بعد از مایه زنی مشاهده شد. نتایج تغییرات در میزان فعالیت آنزیم ها و همچنین فنل کل طی روزهای مختلف پس از مایه زنی، نشان داد که امکان تحریک مقاومت القایی در گیاه گوجه فرنگی توسط *T. harzianum* BI علیه *M. javanica* وجود دارد.

واژه های کلیدی: کنترل بیولوژیک، ترکیبات فنلی، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز.

^۱ - کارشناس ارشد، گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۲ - استادیار گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۳ - استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول مقاله: fnaserinasab63@gmail.com

مقدمه

در دهه‌های اخیر کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها، توجه بسیاری از محققین را به‌خود جلب نموده است. تحقیقات نشان داده که معرفی آنتاگونیست‌های مختلف از جمله تریکودرما به محیط خاک و ریزوسفر، می‌تواند از خسارت بیماری تا زیر آستانه‌ی زیان اقتصادی بکاهد (اعتباریان و همکاران، ۲۰۰۵). موفقیت در کنترل بیماری‌های گیاهی همراه با سلامت محیط زیست، توانسته کنترل بیولوژیک را یکی از مقبول‌ترین روش‌های کنترل بیماری‌ها در مبارزه‌ی تلفیقی بیماری‌های گیاهی معرفی نماید. پدیده‌ی بیوکنترل دارای مکانیزم‌های مختلفی می‌باشد که به‌طور مفصل توسط دانشمندان مورد بررسی قرار گرفته است. این مکانیزم‌ها شامل پدیده‌ی آنتی بیوز، رقابت برای فضا، مواد غذایی و به‌خصوص غیرقابل جذب کردن آهن از طریق تولید سیدروفور، تولید آنزیم‌های لیزکننده و پارازیتسم، افزایش رشد گیاه و القاء مقاومت می‌باشند (Sikora et al., 2003). عوامل بیوکنترل قارچی در دو دهه‌ی اخیر اهمیت زیادی در کنترل بیماری‌های گیاهی پیدا کرده‌اند (Janisiewicz et al., 2001). آنتاگونیست‌های قارچی مانند *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) به‌طور چشمگیری برای کنترل بسیاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله بیماری‌های شبه گونه‌های *Rhizoctonia* و *Fusarium* به‌کار برده می‌شوند. این قارچ از عوامل مفیدی است که می‌تواند با پارازیت‌ها کردن تخم، لارو و ماده‌ی بالغ نماتد *M. javanica* (Treb) جمعیت این نماتد را کاهش دهد. این قارچ همچنین قادر به تحریک القاء مقاومت در مقابل نماتدها و کاهش خسارت می‌باشد (Van Loon and Vanstrien, 1999). یکی از مکانیزم‌های مهم در عمل بیوکنترل، تولید آنتی‌بیوتیک و القاء مقاومت است. بسیاری از آنتاگونیست‌ها سبب القاء مقاومت در گیاه و تغییر در میزان آنزیم‌هایی نظیر سوپر اکساید دیس موتاز، کاتالاز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و ترکیبات دیگری نظیر فنل در گیاه می‌شوند (Salehpour et al., 2005). ترکیبات فنلی به‌همراه سایر آنزیم‌ها و مواد دفاعی نظیر پراکسیدازها و پلی فنل اکسیداز، در مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی به‌خصوص نماتدها به‌صورت سیستمیک دخالت دارند و در مقدار و میزان این مواد در میزان تغییراتی پدید می‌آید (Ogallo and McClure, 1996). کلونیزه شدن سطح ریشه‌ی گیاه توسط آنتاگونیست‌ها و به‌خصوص *Trichoderma* می‌تواند با ایجاد مقاومت القایی سیستمیک منجر به کاهش حمله‌ی مستقیم عوامل بیماری‌زا شود (Kloepper et al., 1992). هدف از این تحقیق، بررسی کارایی قارچ *T. harzianum* BI برای کنترل نماتد *M. javanica* عامل گره ریشه‌ی گوجه فرنگی در شرایط گلخانه‌ای و بررسی میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و همچنین میزان ترکیبات فنل کل گیاه گوجه فرنگی رقم Early Urbana Y در اثر مایه‌زنی با نماتد و جدایه‌ی *T. harzianum* BI می‌باشد.

مواد و روش‌ها

عامل بیماری

ریشه‌های آلوده به نماتد مولد گره ریشه از گلخانه‌های خیار و گوجه فرنگی منطقه‌ی پیشوای ورامین جمع‌آوری شد. تکثیر نماتد با روش Single egg mass روی رقم ارلی اوربانا Y انجام و شناسایی گونه‌ی نماتد مطابق کلید چپسون صورت گرفت (Jepson, 1987). پس از چندین دوره تکثیر متوالی نماتد، جمعیت کافی نماتد خالص *M. javanica* ایجاد شد. استخراج تخم و لارو سن دو با استفاده از روش هوسای و بارکر (Hussay and Barker, 1973) انجام شد.

آنتاگونیست

جدایه‌ی *T. harzianum* BI از آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان به‌صورت خالص تهیه و پس از تک اسپور کردن روی محیط PDA تکثیر شد (Booth, 1997). پس از تهیه‌ی سوسپانسیون اسپور در آب مقطر، با استفاده از لام گلبول شمار غلظت موثر 10^6 اسپور در میلی‌لیتر قارچ جهت استفاده در آزمایشات تهیه شد (Maleki, 2008).

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

در این آزمایش، پلاک‌های ۵ میلی‌متری از کشت ۷ روزه‌ی قارچ *T. harzianum* BI در وسط ظروف پتری 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 تشتک‌های پتری اضافه شد. به پتری‌های شاهد نیز که فاقد قارچ بودند، به همان میزان سوسپانسیون تخم اضافه شد. سپس پتری‌ها به مدت ۱۴ روز در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، نگهداری شد و بعد از گذشت این زمان تعداد تخم‌های تفریح شده در تیمار و شاهد شمارش شد. این آزمایش با ۶ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد (Irfan et al., 2005).

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

در این آزمایش، از کشت ۱۰ روزه‌ی قارچ روی محیط آب آگار استفاده شد و سوسپانسیونی از لاروهای تازه‌ی تفریح شده و استریل نماتد با جمعیت حدود ۲۰-۳۰ لارو در یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه و به تشتک‌های پتری اضافه و سپس در ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد و به ترتیب پس از گذشت زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت میزان مرگ و میر لارو‌ها در پتری‌های تیمار و شاهد شمارش شد. پتری‌های فاقد قارچ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. این آزمایش با ۶ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد (Irfan et al., 2005).

آزمایش اثر *T. harzianum* BI بر میزان بیماری 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) ضدعفونی سطحی شد و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر سترون در داخل گلدان‌های حاوی خاک الک شده (شامل هوموس، خاک مزرعه، ماسه با نسبت ۱:۲:۱ و پاستوریزه شده در دمای ۸۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو) کشت گردید. در این آزمایش، گیاهچه‌های گوجه فرنگی در مرحله‌ی ۶ برگگی توسط ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ *T. harzianum* BI با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال نماتد به ازاء هر گیاه، مایه‌زنی شدند. تیمارها شامل: (۱) گیاه سالم، (۲) گیاه مایه‌زنی شده با نماتد، (۳) گیاه مایه‌زنی شده با نماتد و عامل آنتاگونیست به روش خیساندن ریشه (Root dip) و (۴) گیاه مایه‌زنی شده با نماتد و عامل آنتاگونیست به روش خیساندن خاک (Soil drench) بودند. گیاهچه‌ها پس از مایه‌زنی به مدت ۴۵ روز در شرایط گلخانه (دمای ۲۸-۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی) نگهداری شد و پس از آن ریشه‌ها برای بررسی بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۶ تکرار انجام شد.

ارزیابی تغییرات برخی ترکیبات دفاعی در ریشه گوجه فرنگی مایه‌زنی شده با نماتد و قارچ *T. harzianum* BI

در این آزمایش نیز همانند آزمایش قبل، گیاهچه‌های گوجه فرنگی تهیه و در مرحله‌ی ۶ برگگی مایه‌زنی گردیدند. به ازاء هر گیاهچه، تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال سن دو نماتد و ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر استریل استفاده شد. تیمارها شامل: (۱) گیاه سالم مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل، (۲) گیاه مایه‌زنی شده با عامل آنتاگونیست، (۳) گیاه مایه‌زنی شده با نماتد و (۴) گیاه مایه‌زنی شده با نماتد و آنتاگونیست، بودند. برای هر تیمار، ۴ تکرار در

نظر گرفته شد. آزمایش‌ها به صورت طرح فاکتوریل 8×5 که فاکتور A شامل ۵ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل ۸ زمان نمونه‌برداری ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ روز بعد از مایه‌زنی با نماتد بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز و نیز تغییرات میزان فنل کل در روزهای اول تا هشتم ارزیابی شد.

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره و سنجش پروتئین استاندارد

به منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره‌ی مورد آزمایش و تهیه‌ی منحنی پروتئین استاندارد، جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

استخراج پروتئین از بافت گیاه

با استفاده از ازت مایع، نیم گرم از بافت ریشه در هاون چینی کوبیده و له شد. یک میلی‌لیتر بافر نمونه‌ی فسفات سدیم ۰/۱ مول با $\text{pH}=6$ به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و توسط میکروسانتریفوژ در 13000 rpm به مدت ۲۰ دقیقه در 4°C درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایه‌ی رویی برای انجام آزمایش‌ها جدا شده و تا قبل از انجام آزمایش در دمای 20°C درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (Reuveni, 1995).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)

ارزیابی پراکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Milton Roy Company- Unterfoehring -Germany به صورت زیر انجام شد:

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای $40 \mu\text{g}$ پروتئین باشد، $20 \mu\text{L}$ میکرولیتر گوئیکول و مقدار کافی بافر سیترات- فسفات 25 mM میلی مولار با $\text{pH}=5.4$ را در یک لوله آزمایش ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج 475 nm نانومتر صفر گردید. سپس $10 \mu\text{L}$ میکرولیتر پراکسید هیدروژن 30 mM درصد به این مخلوط اضافه شد و سریعاً تغییرات جذب نور به فواصل 10 ثانیه، به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد ($\Delta\text{OD}/\text{Min}/\text{mg protein}$) (Reuveni, 1995).

تهیه‌ی عصاره‌ی آنزیمی پلی فنل اکسیداز و ارزیابی میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز (Polyphenol oxidase)

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای $40 \mu\text{g}$ میلی‌گرم پروتئین باشد، $20 \mu\text{L}$ میکرولیتر محلول پرولین و مقدار کافی بافر سیترات- فسفات 25 mM میلی مول $\text{pH}=6.4$ در یک لوله آزمایش کوچک کاملاً مخلوط شد و این مخلوط توسط ورتکس به مدت دو دقیقه هوادهی و سپس دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط صفر گردید. سپس بلافاصله $40 \mu\text{L}$ میکرولیتر محلول پیروکتکول 100 mM میلی مول به مخلوط واکنش افزوده، سریع مخلوط نموده و بلافاصله تغییرات جذب نور در طول موج 515 nm نانومتر به مدت یک دقیقه با فاصله‌ی 10 ثانیه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات جذب نور در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Mohammadi and Kazemi, 2002).

ارزیابی میزان فنل کل و تهیه‌ی محلول پایه غلظت‌های فنل استاندارد

10 mM میلی‌گرم از اسید کافئیک (Fluka, Germany) را در پنج میلی‌لیتر متانول خالص حل کرده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به 50 mL میلی‌لیتر رسانده شد. سپس مقادیر 0.5 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5 ، 6 ، 8 میلی‌لیتر از این محلول، جداگانه در لوله‌های آزمایش ریخته و حجم هر لوله با افزودن آب مقطر به 10 mL میلی‌لیتر رسانده شد. به این ترتیب هر 0.5 میلی‌لیتر از محلول در هر یک از لوله‌ها به ترتیب 80 ، 60 ، 50 ، 40 ، 30 ، 20 ، 10 ، 5 میکروگرم اسید کافئیک را داراست. برای صفر کردن دستگاه از محلول فاقد اسید کافئیک استفاده شد (Seevers et al., 1971).

تهیه‌ی منحنی استاندارد فنل

مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف تهیه شده‌ی اسیدکافئیک را در ۷ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. سه دقیقه بعد از افزودن معرف فولین، یک میلی‌لیتر 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 $\lambda_{max} = 725\text{nm}$ اندازه‌گیری شد. این مراحل به‌طور جداگانه برای هر کدام از غلظت‌های مختلف اسیدکافئیک 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 عصاره‌ی به‌دست آمده در آزمایش‌ها، همانند روش تهیه‌ی منحنی استاندارد عمل شد. تنها تفاوت در این بود که از ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره استخراج شده گیاه استفاده شد (Seever et al., 1971).

استخراج فنل گیاه

جهت استخراج ترکیبات فنلی، یک گرم بافت ریشه داخل هاون چینی و درون نیتروژن مایع عصاره‌گیری شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه گردید، مخلوط حاصله از دو لایه پارچه‌ی مملع عبور داده و در شیشه‌های مک‌کارتنی نگهداری شد. در پایان، عصاره‌ی حاصل در ۴۰۰۰ g 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 لوله‌های درب‌دار ۱۰ میلی‌لیتری در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (Mohammadi and Kazemi, 2002).

نتایج

فعالیت بیوکترول *T. harzianum* BI علیه *M. javanica* در آزمایشگاه و گلخانه

در آزمایش اثر مستقیم قارچ *T. harzianum* BI روی تفریح تخم نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه، درصد تخم‌های تفریح نشده در اثر تیمار قارچ تریکودرما ۵۸٪ بود که این میزان در مقایسه با شاهد ۲۶٪ بیشتر بود. در آزمایش اثر مستقیم *T. harzianum* BI روی مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه تریکودرما توانست تعداد لاروها را کاهش دهد. در این آزمایش، درصد مرگ و میر لاروها بعد از ۴۸ و ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شد. درصد مرگ و میر لاروها بعد از ۹۶ ساعت توسط تریکودرما ۶۶٪ در مقایسه با شاهد ۲۳ درصدی بود (جدول ۱). در آزمایش اثر *T. harzianum* BI روی بیماری در شرایط گلخانه نیز قارچ آنتاگونیست، توانست تعداد گال‌ها و تعداد کیسه‌ی تخم (Egg mass) را به‌طور معنی‌دار در مقایسه با شاهد کاهش دهد. وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی نیز اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

جدول ۱- درصد مرگ و میر لاروها توسط قارچ تریکودرما در آزمایشگاه.

تیمار	درصد لاروهای مرده بعد از ۴۸ ساعت	درصد لاروهای مرده بعد از ۹۶ 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 شده‌اند با هم اختلاف معنی‌دار دارند

(آزمون دانکن (p < ۰/۰۵). C: شاهد (فاقد آنتاگونیست)، T: تیمار با *T. harzianum* BI)

جدول ۲- اثر *T. harzianum* BI بر تفریح تخم های *M. javanica* در آزمایشگاه

درصد تخم های تفریح نشده پس از ۱۴ روز	
۲۱ b	C
۸۴a	T

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، با هم اختلاف معنی‌دار دارند

(آزمون دانکن (p<۰/۰۵): C: شاهد، T: تیمار با *T. harzianum* BI)

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

در روز اول، در گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI از نظر میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. گیاه آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست، در روز سوم در مقایسه با تیمارهای گیاه آلوده به نماتد، گیاه سالم و همین‌طور نسبت به گیاه سالم تیمار شده با آنتاگونیست، تنها دارای اختلاف معنی‌داری بود. در روز چهارم، بیشترین میزان فعالیت آنزیم همانند روز قبل در گیاه آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست دیده شد؛ در این روز بیشترین مقدار در فعالیت آنزیم در بین روزهای نمونه برداری مشاهده شد. در روز پنجم، فعالیت آنزیم در کلیه‌ی تیمارها به جز تیمار گیاه سالم کاهش پیدا کرد که البته این کاهش در تیمار گیاه آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست نسبت به روز قبل معنی‌دار نبود. در روز ششم، فعالیت آنزیم در کلیه‌ی تیمارها نسبت به روز پنجم کمتر شد. در روز هفتم و هشتم نیز این روند کاهش‌ی مانند روز ششم ادامه پیدا کرد (جدول ۳).

جدول ۳- اثر *T. harzianum* BI روی بیماری در شرایط گلخانه بر روی تعداد گال، تعداد egg mass، وزن تر ریشه و

اندام‌های هوایی.

تیمار	تعداد گالهای هر گیاه	تعداد egg mass هر گیاه	وزن تر ریشه (گرم)	وزن تر اندام‌های هوایی (گرم)
H	۰c	۰c	۹/۲a	۴۰/۵a
N	۲۷۳a	۱۵۶/۵a	۸/۶a	۳۲/۱c
N+T(Rd)	۴۶b	۳۳/۵b	۵/۲c	۲۹/۴cd
N+T(Sd)	۴۲b	۳۴/۱۷b	۷/۳b	۳۸/۶b

تجزیه‌ی آماری داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد و میانگین داده‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن (p<0.05) مورد مقایسه قرار گرفت. هر تیمار دارای ۶ تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با هم اختلاف معنی‌دار دارند (آزمون دانکن (p<۰/۰۵): T. *T. harzianum* BI: T. N و *M. javanica*: H، گیاه سالم، Rd: روش خیساندن ریشه و Sd: روش خیساندن خاک می باشند.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز

در روز اول گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست *T. harzianum* BI از نظر میزان فعالیت آنزیم نسبت به گیاه سالم و گیاه آلوده به نماتد افزایش معنی‌داری نشان دادند. ولی در مقایسه با گیاه گوجه فرنگی تیمار شده با آنتاگونیست تنها اختلاف معنی‌داری نداشت و حتی از نظر عددی نیز مقدار آن کمتر بود؛ فعالیت آنزیم در روز دوم در گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست، گیاه آلوده به نماتد و همچنین گیاه گوجه فرنگی تیمار شده با آنتاگونیست تنها، در مقایسه با گیاه سالم افزایش معنی‌داری نشان داد. در این روز، گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست، تفاوت معنی‌داری با

سایر تیمارها داشت. در روز چهارم، گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست، بیشترین مقدار فعالیت را داشت و تفاوت معنی‌داری با گیاه آلوده به نماتد، گیاه تیمار شده با آنتاگونیست تنها و گیاه سالم داشت. در این روز، بیشترین فعالیت آنزیم در بین روزهای نمونه‌برداری هم مورد مشاهده قرار گرفت. در روز پنجم، فعالیت آنزیم در کلیه‌ی تیمارها کاهش پیدا کرد که البته این کاهش در همه‌ی تیمارها به‌جز گیاه سالم نسبت به روز قبل معنی‌دار بود. در روز ششم نیز فعالیت آنزیم در کلیه‌ی تیمارها نسبت به روز پنجم کمتر شد. در روز هفتم و هشتم نیز بیشترین میزان فعالیت آنزیم در گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست بود (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه‌ی میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (تغییرات جذب در ۵۱۵ نانومتر در دقیقه در میلی گرم پروتئین) در ریشه‌ی گیاه گوجه‌فرنگی در اثر مایه‌زنی با نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* و قارچ آنتاگونیست

T. harzianum BI

روزهای بعد از مایه زنی نماتد								تیمار
۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
d۳/۴۱A	c۴/۸A	b۵/۷۷A	ab۶/۳۵A	a۶/۸۴A	c ۵/۱A	d۳/۴۶B	e۲/۵B	T+N
d۳/۲۹A	c۳/۶۶B	ab۴/۹۸B	ab۴/۹۶B	a۵/۰۱B	b ۴/۴۵B	c۳/۵۹B	e۲/۳۸B	T
d۳/۱۷A	cd۳/۳۲B	c۳/۶۷C	b۴/۰۲C	a۴/۸۴B	b۳/۹۵C	b۳/۸۲AB	d۳/۰۱ AB	N
c۲/۴۲B	abc۲/۶۵C	abc۲/۸D	ab۳/۰۶D	abc۲/۷C	a۳/۳۲D	abc۲/۹B	bc۲/۴۷B	H

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 شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) ارائه شده‌اند. T قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI و N نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* و H گیاه سالم (شاهد) می‌باشند.

بررسی میزان تغییرات مقدار فنل کل:

میزان ترکیبات فنلی در گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست *T. harzianum* BI از روز اول تا پنجم افزایش یافت؛ ولی به تدریج از روز ششم رو به کاهش گذاشت و این کاهش تا روز هشتم که آخرین روز نمونه برداری بود، ادامه داشت. در روز ششم اختلاف معنی‌دار بین میزان ترکیبات فنلی گیاه گوجه فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست و تیمار آنتاگونیست تنها وجود نداشت. در روز پنجم تیمار گیاه آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت و بیشترین مقدار فنل در بین تیمارها در این روز مشاهده شد. در کلیه‌ی روزهای نمونه برداری، کمترین میزان فنل کل مربوط به تیمار گیاه سالم بود (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه‌ی میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز ($\Delta OD 475/min/mg$) در ریشه‌ی گیاه گوجه فرنگی در اثر مایه‌زنی با نماتد مولد گره ریشه‌ی *M. javanica*، قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI

روز های بعد از مایه زنی نماتد								تیمار
۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
f۴۰/۳۷ A	e۵۶/۴A	d۶۷/۰۲A	c۸۰/۳۸A	۱۰۶/۰۷A	b ۸۸A	e۵۹/۶۸A	f۳۸/۱۲A	T+N
g۳۵/۱۲B	d۵۰/۱۳B	c۶۰/۱AB	b۶۷/۲۱B	a۹۵/۲۲B	e ۶۱B	e۴۷B	f۳۹/۱A	T
e۳۳/۱۲B	d۴۱/۲۵C	c۵۶/۴B	b۷۹/۴۶A	a۹۸/۲۳B	c۵۶/۲۵C	d۴۰/۲C	f۲۵/۱ C	N
a۳۲/۷۴B	c۲۷/۶D	b۳۰/۶۳C	a۳۳/۰۹C	a۳۳/۵۳C	c۲۸/۶۶D	c۲۷D	d۲۵/۵ C	H

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 شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) ارائه شده‌اند. T قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI و N نماتد مولد گره ریشه‌ی *M. javanica* و H گیاه سالم (شاهد) می‌باشند.

جدول ۶- مقایسه‌ی میانگین تغییرات میزان ترکیبات فنل کل (میلی گرم در یک گرم بافت ریشه) در ریشه‌ی گیاه گوجه فرنگی در اثر مایه‌زنی با نماتد مولد گره ریشه‌ی *M. javanica* و قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI

روز های بعد از مایه زنی نماتد								تیمار
۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
e۰/۴۹A	cd۰/۵۶A	c۰/۶B	a۰/۸۱A	b۰/۷۱A	b۰/۶۸A	d۰/۵۴A	f۰/۳۸A	T+N
d۰/۴۳B	c۰/۴۸B	b۰/۵۷B	a۰/۶۸B	a۰/۶۶B	a۰/۶۵A	c۰/۵۱AB	e۰/۳۶A	T
d۰/۳۳C	c۰/۴۰C	a۰/۶۷A	a۰/۶۲C	b۰/۵۱C	b۰/۴۹B	b۰/۴۸B	c۰/۴۱ A	N
c۰/۳۴۵C	ab۰/۴۱C	bc۰/۴۰C	a۰/۴۶C	ab۰/۴۱D	b۰/۴۰C	bc۰/۳۸C	c۰/۳۴۵ A	H

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 شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) ارائه شده‌اند. T قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI و N نماتد مولد گره ریشه‌ی *M. javanica* و H گیاه سالم (شاهد) می‌باشند.

بحث

نتایج آزمایش بیوکترلی قارچ *T. harzianum* BI علیه نماتد *M. javanica* در آزمایشگاه، نشان داد که این آنتاگونیست توانایی پارازیت نمودن تخم نماتد و همچنین لاروهای سن دوم در محیط کشت را داراست که این توانایی، می‌تواند در اثر تولید عوامل آنتی‌بیوتیک و متابولیت‌های ثانویه و تولید برخی آنزیم‌های لیزکننده‌ی کوتیکول نماتدها مانند پروتئاز در مقابل لاروهای سن ۲ باشد (Khan and Saxena, 1997). با توجه به وجود کیتین در لایه‌های میانی پوسته‌ی تخم نماتد با ضخامت ۰/۴ میکرومتر، به نظر می‌رسد *T. harzianum* BI توسط تولید آنزیم کیتیناز اثر خود را بر بازدارندگی از تفریح تخم‌های نماتد اعمال میکند (Brant et al., 2000). در کار مشابهی که توسط الفتاح و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد، متابولیت‌های خارج سلولی در آزمایش محیط کشت فیلتر شده‌ی تریکودرما، توانست تا ۳۰ درصد باعث مرگ و میر لارو سن دو نماتد شود (Al-Fattah et al., 2007). در آزمایش‌های گلخانه‌ای، عامل آنتاگونیست توانست تعداد گال و کیسه‌های تخم ایجاد شده بر روی ریشه‌ی گوجه فرنگی را هم به روش خیساندن ریشه (Root dip) و هم به روش خیساندن خاک (Soil drench)

کاهش دهد. با وجود معنی‌دار نبودن اختلاف، تعداد گال‌های ایجاد شده در تیمار با آنتاگونیست به روش Soil drench کمتر بود و نیز وضعیت وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی در این تیمار بهتر بود و با کاربرد قارچ به روش خیساندن ریشه اختلاف معنی‌دار داشت. به نظر می‌رسد چون در وضعیت خیساندن خاک آنتاگونیست محدوده‌ی وسیع‌تری از خاک اطراف ریشه را پوشش می‌دهد و دامنه‌ی فعالیت آن گسترده‌تر می‌باشد، می‌تواند اثر بیشتری بر بهبود رشد گیاه و جلوگیری از پیشروی نماتد بگذارد. همچنین احتمالاً در روش خیساندن ریشه با سوسپانسیون اسپور، طی مدتی که ریشه‌ی گیاه بیرون از خاک می‌ماند؛ گیاه دچار تنش شده و در نتیجه بر رشد گیاه اثر سوء داشته است. در کار مشابهی، جدایه‌ی Th از قارچ *T. harzianum* توانست تعداد گال‌ها را بر روی ریشه‌ی گوجه‌فرنگی کاهش دهد (Khattak et al., 2008). از نتایج آزمایش مربوط به فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز، چنین دریافت می‌شود که فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در گیاه آلوده‌ی تیمار شده با قارچ آنتاگونیست تریکودرما نسبت به سالم افزایش داشته است. ترکیبات فنلی ترکیبات ضد قارچی هستند و تجمع آنها در گیاهان تیمار شده به وسیله‌ی عوامل آنتاگونیست، می‌تواند دلیل کاهش حمله پاتوژن‌ها باشد (Mpiga et al., 1997). میزان فنل کل در بین ۸ روز نمونه برداری در تیمارها نسبت به شاهد سالم نیز افزایش داشته است. ارتباط بین افزایش آنزیم‌های دفاعی و مقاومت بیشتر به عوامل بیماری‌زا توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. در ارتباط میزبان و عامل بیماری‌زا وقتی که ارقام مقاوم و حساس باهم مقایسه می‌شوند، در بیشتر موارد سرعت تجمع ترکیبات فنلی بعد از ابتلا به بیماری در رقم مقاوم زیادتر از رقم حساس است و یک رابطه‌ی خطی مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و مقاومت گیاه وجود دارد (Goodman et al., 1986). چن و همکاران، افزایش آنزیم پراکسیداز در ریشه‌های خیار بعد از مایه‌زنی با باکتری سودوموناس را علیه قارچ *Pythium aphanidermatum* مورد مشاهده قرار دادند (Chen et al., 2000). تیمار بذور بادام زمینی با باکتری سودوموناس باعث تجمع سریع آنزیم‌های دفاعی مرتبط با مقاومت از قبیل کیتیناز، بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیلایز در بذور بادام زمینی در مقایسه با شاهد سالم می‌گردد (Kishore et al., 2006). عوامل بیوکنترل همراه با رشد سریع در محل ریشه، با بافت رابطه‌ی متقابل دارند و تغییرات بیوشیمیایی متفاوتی از قبیل افزایش فعالیت کیتیناز، بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، پراکسیداز و تشکیل سدهای ساختمانی و تجمع فیتوآلکسین‌ها را در زخم‌ها القاء می‌کنند (El Ghaouth et al., 1998). مهم‌ترین برتری عوامل بیوکنترلی که از مکانیزم القاء مقاومت بهره می‌برند، این است که مکانیزم‌های دیگر تنها در حضور آنتاگونیست فعال امکان‌پذیر است، در حالی‌که این نوع حفاظت وقتی جمعیت عامل آنتاگونیست در خاک به آستانه‌ی خاصی رسید مکانیزم‌های مقاومت گیاه میزبان القاء شده، حتی بعد از کاهش جمعیت آنتاگونیست نیز مقاومت ایجاد شده می‌تواند تا مدت طولانی دوام داشته باشد (Van Loon et al., 1998). از نتایج آزمایش مربوط به میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی این‌طور برداشت می‌شود که نماتد نیز فعالیت آنزیم پراکسیداز را در گیاه گوجه‌فرنگی افزایش می‌دهد، از طرفی قارچ آنتاگونیست هم باعث افزایش فعالیت پراکسیداز می‌شود. در تمام روزهای نمونه‌برداری گیاه گوجه‌فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست نسبت به شاهد آلوده با نماتد افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز را نشان دادند، یعنی فعالیت آنزیم در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست، بیشتر از شاهد آلوده است، می‌شود نتیجه گرفت که آنتاگونیست در همه‌ی روزها علاوه بر نماتد، باعث افزایش القاء آنزیم پراکسیداز در گیاه می‌گردد. همچنین میزان القاء ترکیبات دفاعی گیاه توسط نماتد، کمتر از القاء توسط عامل آنتاگونیست بوده است که می‌توان آن را به دلیل حرکت بین سلولی نماتد مولد گره ریشه و رفتار مسالمت آمیز آن با گیاه و به‌کارگیری مکانیسم‌های خاموش‌کننده‌ی پاسخ‌های دفاعی بیوشیمیایی گیاه بیان کرد. تجمع پراکسیدازها در سلول نقش مهمی در مستحکم‌سازی دیواره‌ی سلولی در طی تمایز سلولی و افزایش مقاومت به نفوذ عوامل بیمارگر دارد. از دیگر وظایف پراکسیدازها در مقاومت،

تولید رادیکال‌های آزاد، تولید لیگنین و تجمع ترکیبات فنلی است. این آنزیم در اثر تیمار گیاه با عوامل آنتاگونیست مانند تریکودرما افزایش پیدا می‌کند (Depinto and De Gara, 2004).

نتیجه‌گیری

نظر به کنترل موفق بیماری ریشه‌ی گره‌ی گوجه فرنگی در آزمایشگاه و گلخانه و همین‌طور القاء مکانیسم‌های دفاعی گیاه به وسیله‌ی این عامل آنتاگونیست، این قارچ می‌تواند به‌عنوان یک عامل بیوکنترل موفق در کنترل بیماری‌های نامتدی ریشه و به‌خصوص کنترل نماتد مولد گره ریشه به‌کار گرفته شود. همچنین با توجه به اینکه بسیاری از عوامل زراعی نظیر تناوب، افزایش مواد اصلاح‌کننده‌ی خاک، تغییرات اسیدیته‌ی محیط و تغییر بافت خاک و غیره به نفع آنتاگونیست‌ها، می‌تواند در استقرار آنتاگونیست‌ها موثر باشد و اثر آنها را افزایش یا کاهش دهد، بررسی اثر آنتاگونیست‌های مورد نظر در شرایط مزرعه‌ای و خاک غیراستریل برای شناسایی شرایط ایده‌آل در جهت بالا بردن کارایی عوامل بیوکنترل و روش‌های به‌کار گرفته شده ضروری می‌باشد.

References:

1. 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 Agricultural Sciences* 3: 297–309.
2. Booth C. 1977. *Fusarium Laboratory Guide to Identification of Major Species*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, England: CAB International. 55 p.
3. Bradford MM. 1967. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal of Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
4. Brants A, Brown CR and Earler ED. 2000. *Trichoderma harzianum* endochitinase does not provide resistance to *Meloidogyne hapla* in tobacco. *Journal of Nematology* 32: 289–296.
5. Chen C, Belanger RR, Beha AN and Paullitz TC. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Plant Pathology* 56: 13–23.
6. De Pinto MC and DeGara L. 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany* 55: 2559–2569.
7. El-Ghaouth A, Wilson CL and Wisniewski M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Journal of Phytopathology* 88: 282–291.
8. Etebarian HR, Sholberg P, Eastwell K, and Saylor R. 2005. Biological control of blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology* 51: 591–598.
9. Gong Y, Toivonen PMA, Lau OL and Wiersma PA. 2001. Antioxidant system level in Braeburn' apple is related to its browning disorder. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 42: 259–264.
10. Goodman RN, Kiraly Z and Wood KP. 1986. *Biochemical and Physiological Aspects of Plant Disease*. Second edition. USA: University of Missouri Press. 433 p.
11. Hussey RS and Barker KR. 1973. A Comparison of Methods of Collecting Inocula of *Meloidogyne* spp. Including a New Technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025–1028.
12. Irfan UD, Saifullah-Khan H and Khattak, B. 2005. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Trichoderma harzianum* and spent mushroom compost in tomato under field conditions. *Pakistan Journal of Phytopathology* 17: 144–145.
13. Janisiewicz WJ, Tworkoshi TJ and Kurtzman CP. 2001. Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherima* strains against blue mold of apple. *Phytopathology* 91: 1098–1108.
14. Jepson SB. 1987. *Identification of Root – Knot Nematodes (Meloidogyne species)*. Wallingford, UK: CAB International. 265 p.
15. Khan TA and Saxena SK. 1997. Effect of root dip treatment with fungal filtrates on root penetration, development and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. *International Journal of Nematology* 7: 85–88.
16. Khattak B and Stephen SM. 2008. Effect of some indigenous isolates of *Trichoderma harzianum* on root knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. *Sarhad Journal of Agriculture* 24: 285–288.
17. Kishore GK, Pande S and Podile R. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* GSE 18 inhibits the cell wall degrading enzymes of *Aspergillus niger* and activates defence-related enzymes of groundnut in control of collar rot disease. *Australasian Plant Pathology* 35: 259–263.

18. Kloepper J, Tuzun S and Kuc J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Journal of Biocontrol Science and Technology* 2: 347–349.
19. Malick CP and Singh MB. 1980. *Plant Enzymology and Histoenzymology*. New Delhi: Kalyani Publisher. 280 p.
20. Maleki Ziarati H, Sahebani N, Rahnema K and Noori N. 2008. Effect of fungus *Trichoderma harzianum* on induced systemic phenolic compounds against root knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato. *Journal of Agriculture Science and Natural Resources* 14: 161–168 (In Farsi).
21. 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. *Plant Science* 162: 491–498.
22. Mpiga P, Belange RR, Paulitz TC and Benhamou N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Journal of Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 301–320.
23. Ogallo JL and McClure MA. 1996. Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematode in tomato. *Journal of Phytopathology* 86: 498–501.
24. Reuveni R. 1995. Biochemical marker of disease resistance. pp. 99–114, *In* RP Singh and US Singh (eds). *Molecular Methods in Plant Pathology*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
25. Salehpour M, Etebarian HR, Roustaei A, Khodakaramian G and Aminian H. 2005. Biological control of common root rot of wheat (*Bipolaris sorokiniana*), by *Trichoderma* isolates. *Plant Pathology Journal* 4: 85–90.
26. Seevers DM, Daly JM and Catedral FF. 1971. The role of peroxidase isozyme in resistance to wheat stem rust disease. *Journal of Plant Physiology* 48: 353–360.
27. Sikora RA, Niere B and Kimenju J. 2003. Endophytic microbial biodiversity and plant nematode management in African agriculture. pp. 179–192, *In* P Neuenschwander, C Borgermeister and J Langewald (eds.). *Biological Control in IPM Systems in Africa*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
28. Van Loon LC and Vansrien EA. 1998. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Journal of Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85–97.