بررسی تغییرات فعالیت‌های آنزیمی در ریشه‌ی گیاه خربزه‌ی آلوده به عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*)

مهرداد حنیفه‌ئی[۱]، حمید دهقانی[۲*] و رجب چوکان[۳]

۱- دانش‌آموخته‌ی کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

۳- استاد پژوهشی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر.

*مسئول مکاتبه dehghanr@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۳

چکیده

بیماری پژمردگی آوندی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* یکی از بیماری‌های مهم خربزه است. به منظور یافتن منبع مقاومت به نژاد ۱.۲ فوزاریوم، واکنش تعداد ۱۸ توده خربزه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران در آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در موسسه‌ی تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر مورد ارزیابی قرار گرفتند. ریشه‌های گیاهچه‌های هر چهار توده در مرحله یک تا دو برگ حقیقی در ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر به مدت ۲-۱ دقیقه قرار گرفتند و به سینی‌های کشت برگردانده شدند. توده‌های ایزابل مقاوم، سوسکی نیمه مقاوم، قصری حساس و شادگانی بسیار حساس جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنل کل و تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌برداری‌ها از قسمت ریشه گیاهان در مراحل زمانی دو، چهار، شش و هشت روز بعد از مایه‌زنی برای بررسی تغییرات فعالیت آنزیمی و فنل کل انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در طی روزهای مختلف در توده‌های مختلف اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند. در روز چهارم و ششم حداکثر فعالیت آنزیم به ترتیب در توده‌های مقاوم و بسیار حساس ایزابل و شادگانی ثبت شد. تغییرات ترکیبات فنلی در طی روزهای چهارم، ششم و هشتم با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند. در روز شاهد (روز صفر) بیشترین مقدار فعالیت در توده شادگانی (توده بسیار حساس) ثبت گردید در حالیکه پس از گسترش عامل بیماری بیشترین مقدار آن در روز چهارم پس از مایه‌زنی در توده مقاوم ایزابل بدست آمد. در این بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و میزان ترکیبات فنلی به منزله پنج عامل اساسی دفاع بیوشیمایی در برهم‌کنش توده‌های مختلف خربزه با عامل پژمردگی آوندی افزایش می‌یابند.

واژه‌های کلیدی: خربزه، پژمردگی آوندی، فعالیت آنزیمی، ترکیبات فنلی.

مقدمه

بیماری پژمردگی آوندی خربزه که توسط قارچ خاکزی موسوم به *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *melonis* W.C. Snyder & H. N. Hans که باختصار، *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*[1] نامیده می‌شود از اهمیت بالایی در ایران و جهان برخوردار است (فیکادنتی و همکاران ۲۰۰۲، ناکازومی و هیاری، ۲۰۰۴، پرچپید و پیترات ۲۰۰۴، هرمن و پرل-تروز ۲۰۰۷، بنی‌هاشمی

[1] *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*; *Fom*

۱۳۸۹). در ایران، در سالهای همه‌گیری، خسارت بیماری به صددرصد بالغ می‌گردد. عامل بیماری پژمردگی آوندی خربزه و طالبی، در خاک، بقایای گیاهی و بذر، بصورت کلامیدوسپور پایا باقی می‌ماند (کان‌وی، ۱۹۹۶) و با جابجایی خاک، ادوات کشاورزی، همچنین از طریق بذر آلوده و حتی باد بسهولت و بسرعت در مناطق کشت گسترش می‌یابد. عامل بیماری باعث زردی، کوتولگی، پژمردگی و در نهایت مرگ گیاه می‌شود. علائم بیماری معمولا بعد از ظهور گل و تشکیل میوه ظاهر می‌شود ولی در مزارع با آلودگی بالا در مرحله چند برگی نیز علائم زردی، توقف رشد، پژمردگی و از پا افتادگی بوته‌های جوان مشاهده می‌شود. عامل بیماری می‌تواند گیاه را در تمام مراحل رشدی آلوده نماید و بیشترین حالت خسارت مربوط به گیاه بالغ می‌باشد (زیتر ۱۹۹۸). برای مبارزه با بیماری‌های خاکزاد از جمله فوزاریوم راه‌های متعددی وجود دارد. کاشت بذور عاری از بیمارگر، تناوب زراعی حداقل دو ساله با آفتابگردان، ذرت، گندم، گوجه فرنگی و عدم کاشت گیاهان حساس، زیر خاک بردن بقایای گیاهی پس از برداشت و از بین بردن علف‌های هرز می‌تواند در کنترل بیماری موثر واقع شود (گودمن و همکاران، ۱۹۸۶). کنترل شیمیایی بیماری با استفاده از سمومی نظیر متام سدیم یا کلروپیکرین انجام می‌شود ولی کاربرد این مواد به دلیل اثرات کشنده سموم روی انسان و دام، خطرات محیطی و اثرات سوء جانبی آنها برای اورگانیسم‌های غیرهدف و هزینه‌های بالا قابل توجیه نمی‌باشد (رافضی، ۱۳۹۳). از طرفی روشهای مختلف مبارزه زراعی نظیر تناوب از کارایی کمی برخوردارند. روشهای کنترل زیستی مثل آلوده سازی با سویه‌های غیر بیماریزای *F. oxysporum* f. sp. *melonis*، بکار گیری باکتری‌های آنتاگونیست نظیر سویه شماره ۱۱۵ از گونه *Stereptomyces olyvaceus* و یا استفاده از گونه‌ای از قارچ پنی‌سیلیوم بنام *Pennicillium chrysogenum* جایگزین‌های مناسبی برای روشهای شیمیایی نیستند چرا که بسیار پرهزینه بوده و نیاز به تخصص کافی و شرایط مطلوب محیطی دارند (آلابووتک و همکاران، ۱۹۸۰). در مقابلِ تمام روشهای فوق الذکر، استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم، مهم‌ترین، کم هزینه‌ترین و با صرفه‌ترین، در عین حال مطمئن‌ترین روش کنترل این بیماری بشمار می‌رود (مارتین و گاردن ۱۹۹۶) چهار نژاد شناخته شده عامل این بیماری عبارتند از: نژادهای صفر، یک، دو و ۱.۲. مکان ژنی *Fom-1* مقاومت به نژادهای صفر و دو این بیماری را در گیاه سبب می شود در حالیکه مکان *Fom-2* سبب ایجاد مقاومت به نژادهای صفر و یک می‌شود (پیتریت ۲۰۰۶). نژادهای فعال در ایران نژادهای یک و ۱.۲هستند. نژاد یک بیشتر در منطقه گرمسار، استان تهران و منطقه ورامین شایع است در حالیکه نژاد ۱.۲ در استان فارس فعالیت می‌کند (بنی‌هاشمی ۱۹۶۸). مقاومت به نژاد ۱.۲ با توجه به ماهیت کمّی مقاومت، پیچیده است. مقاومت نسبی به نژاد ۱.۲ در جمعیت‌هایی از شرق دور و بویژه در جمعیت Ogon 9 ملاحظه شده است که ریسر و رود (۱۹۷۳) در دهه‌های ۶۰ تا ۷۰ میلادی این مقاومت را به‌همراه مکان‌های Fom-1 و Fom-2 در واریته Isabelle هرمی نمود (فیکادنتی و همکاران ۲۰۰۲، پرچپید و پیترات ۲۰۰۴). فیکادنتی و همکاران (۲۰۰۲) با بهره گیری از ایزابل، لاین‌های دابل هاپلوئید مقاوم به نژاد ۱.۲، موسوم به Nad-1 و Nad-2 تولید نمودند. القاء مقاومت فرآیندی است که گیاه را برای دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا آماده می‌کند که این فرآیند با فعالیت سیستم‌های بیوشیمایی منطبق است (دگارا و همکاران ۲۰۰۳). گیاهان به‌منظور از بین بردن اثرات رادیکال‌های آزاد ناشی از استرس‌های زنده و غیر زنده، مکانیسم‌های دفاعی خود را به کار می‌گیرند. چندین آنزیم از جمله پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پلی‌فنل اکسیداز و ترکیبات فنلی به عنوان متابولیت‌های ثانویه که در پاسخ به تنش در گیاهان تجمع می‌یابند، به اثبات رسیده‌اند (الاد و چت ۱۹۸۷). تغییرات مقدار ترکیبات فنلی و نقش آن‌ها در ایجاد مقاومت در گیاهان مبتلا به بیماری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج نشان می‌دهد که تجمع مواد فنلی اغلب در ارتباط با واکنش مقاومت است (ونس و همکاران ۱۹۸۰، گودمن و همکاران ۱۹۸۶). 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 (گودمن و همکاران ۱۹۸۶). علی‌رغم نقش ترکیبات فنلی در مقاومت گیاهان، در آزمایشی بر روی ارقام جو مشخص گردید که مواد فنلی هیچ نقشی در ارتباط با مقاومت ارقام جو به زنگ قهوه‌ای دخالت نداشت. در بررسی دیگری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، تجمع مواد شبه فنلی اطراف هیف‌ها و مکینه‌های قارچ سفیدک پودری متلاشی شده در برگ‌های خیار مقاوم به بیماری نشان داده شده است (مکنالی و همکاران ۲۰۰۴). افزایش فعالیت پراکسیدازی در واکنش میزبان–انگل نیز ممکن است با مقاومت میزبان در برابر بیماری همراه باشد. ماکو و همکاران (۱۹۶۸) دخالت مستقیم پراکسیداز را در واکنش‌های دفاعی گیاه گزارش داده و نتیجه گرفتند که پراکسیداز از رشد عامل بیماری‌زا ممانعت به عمل می‌آورد. گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که فعالیت پراکسیداز باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شود و در واکنش ناسازگار، فعالیت پراکسیداز چند برابر واکنش سازگار است (یاموتو ۱۹۹۵، وان‌لون و همکاران ۱۹۹۸). نتایج تحقیقات ریونی و بازما (۱۹۸۵) نشان داد که فعالیت پراکسیداز نشان دهنده‌ی تغییرات بیوشیمیایی بوده و بخشی از واکنش مقاومت است. پلی‌فنل‌اکسیدازها گروهی از پروتئین‌های مس‌دار هستند که سبب اکسیده شدن پلی‌فنل‌ها به کوئین‌ها (ترکیبات ضد میکروبی) و لیگنینی شدن دیواره سلول‌های گیاهی طی آلودگی‌های میکروبی می‌شود و همچنین در واکنش‌های تدافعی و فوق حساسیت که سبب مقاومت به قارچ‌ها می‌شود، شرکت دارد (ری و همکاران ۱۹۹۸). افزایش فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در بافت گیاهی، بویژه در مکان‌های آلوده و اطراف آن در تعداد زیادی از بیماری‌های گیاهی مشاهده شده است. این فعالیت در خیار آلوده شده به قارچ *Pieris rapae* ثابت شده است (تیان و همکاران ۲۰۰۸). کاتالاز آنزیمی است که در تمام موجودات زنده از جمله سلول‌های گیاهی یافت شده و به عنوان یکی از مهمترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی با تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن در کاهش پراکسید هیدروژن نقش ایفا می‌نماید (پرستون و همکاران ۲۰۰۲، بلاچ و همکاران ۲۰۰۷). نتایج بدست آمده از بررسی فعالیت کمی و کیفی آنزیم کاتالاز در گندم آلوده به زنگ زرد حاکی از افزایش آن در زمان‌های ۷۲ و ۱۰۰ ساعت پس از مایه‌زنی در رقم مقاوم MV17 نسبت به شاهد و رقم حساس بولانی بود (بهروزین، ۱۳۷۶). همچنین گزارشات ماندل و همکاران (۲۰۰۸) نشانگر افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicon* L.) هنگام آلودگی با *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* بوده است. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از طریق تبدیل O_2^- به H_2O_2 از سمیت آنیون سوپراکسید کاسته و سپس پراکسید هیدروژن تجمع یافته در محیط، توسط گروهی از آنزیم‌ها بنام هیدروپراکسیدازها، سم‌زدایی می‌شود. تحقیقات زیادی در رابطه با بررسی اثر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مقاومت به عوامل بیماری‌زا انجام شده است که نشان می‌دهند مقاومت گیاه به عامل بیماری‌زا، وابسته به حضور مقادیر زیادی از آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است (احسانی مقدم و همکاران ۲۰۰۶، ماندل و همکاران ۲۰۰۸).

هدف از این پژوهش یافتن توده‌های مقاوم خربزه و طالبی بر اساس فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و ترکیبات فنل کل در ریشه‌ی گیاهچه‌های آلوده بود.

مواد وروش‌ها

تهیه زادمایه قارچ عامل بیماری

جدایه عامل بیماری (جدایه مهارلوی فارس) پژمردگی فوزاریومی خربزه از دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه شد (بنی‌هاشمی ۱۳۸۹)، سپس آزمون و تایید بیماریزایی روی لاین اینبرد شارنته‌تی (شاهد حساس) بر اساس روش فرو بردن ریشه در سوسپانسیون کنیدیوم انجام شد.

تعیین نژاد تکمیلی روی لاین‌هـای ویرگـوس و ایزابـل و ملاحظه‌ی واکنش ناسـازگاری روی لایـن اینبـرد ایزابـل در شرایط کنترل شده صورت گرفت. جهت نگهـداری جدایـه‌ی مهاجم[1]، تک اسپورهای دریافت شده در تشتک پتری حاوی محیط کشت عصاره سیب زمینی دکسـتروز آگـار[2] (PDA) (عصاره ۳۰۰ گرم سیب زمینی + ۲۰ گـرم دکسـتروز + ۱۶ گرم آگار) کشت شدند. تشتک‌ها در اتاق رشد بـا دمـای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهـداری شـده و سـپس کنیـدیوم‌هـای تولید شده با مخلوط ماسـه و کـاه گنـدم سـترون مخلـوط گردیـد. بـرای درجـه تولیـد انـدام‌هـای مقـاوم یعنـی کلامیدوسپورها، محیط‌های کشت ابتدا به مدت یـک مـاه در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گـراد و سـپس بـه مـدت چهـار تـا شش ماه در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد نگهـداری شـد تا جمعیت *Fom* به حد ثابت برسـد (بنـی‌هاشـمی و دیزیـو ۱۹۷۵). برای تهیه زادمایه قارچ عامـل بیمـاری، دو گـرم از مخلوط ماسه و کاه گنـدم حـاوی کلامیدوسـپور بـه داخـل تشتک پتری حـاوی محـیط کشـت PDA اضـافه شـد و در داخل اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گـراد زیـر نـور فلورسـنت بـه مـدت ۱۲ روز نگهـداری شـدند. جهـت تهیـه سوسپانسیون اسپور نیز از کشت‌های ۱۲ روزه قارچ عامل بیمـاری بـر روی محـیط کشـت PDA اسـتفاده شـد. بـدین منظور ابتدا سطح محیط کشت با چهار تا پنج میلی‌لیتـر آب مقطر سترون و با استفاده از لام شیشه‌ای سـترون شسـته شد و سپس بـه منظـور جداسـازی ریسـه‌هـا از اسـپورها، سوسپانسیون از پارچه ململ دو لایـه سـترون عبـور داده شد.

آزمون ارزیابی مقاومت ارقام

بـذور ۱۸ تـوده بـومی خربـزه کـه از مرکـز تحقیقـات کشاورزی استان تهران تهیـه شـده بـود، بـه همـراه ارقـام افتراقی که از موسسه‌ی اینرا[3] از فرانسـه دریافـت گردیـده بودند، پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت سه دقیقه در سینی‌های کشت حاوی مخلوط خاک رس، پیت ماس و پرلیت (۱:۱:۲) کاشته شده و گیاهان هـر روز تـا رسـیدن بـه مرحلـه‌ی ۲ برگـی آبیـاری شـدند. مشخصـات، موقعیت، وضعیت آب و هوایی و محل جمع آوری توده‌هـای خربزه و طالبی مورد بررسی در جـدول ۱ نشـان داده شـده است.

آزمون و تایید بیماریزایی جدایه‌ی عامل بیماری پژمردگـی آوندی روی لاین اینبرد شارنته‌تی (شاهد حساس) بـر اسـاس روش فرو بردن ریشه در سوسپانسیون کنیدیوم انجـام شـد. برای یاداشت‌برداری و ثبت داده‌هـا سـینی‌هـای کشـت هـر روز ارزیابی شدند و گیاهانی که به علـت شـوک نشـاکاری از بین رفته بودند، حذف گردیدند. از روز نهم علائـم ایجـاد شده روی گیاهچه‌ها یادداشـت گردیـد و بـه محـض بـروز علائم شامل زردی و پژمردگی، ساقه گیاهـان آلـوده جهـت ردیابی *Fom* روی محیط PDA کشت داده شد. نمره امتیاز دهی برمبنـای علائـم بیمـاری بـر اسـاس روش پرچپیـد و پیترات (۲۰۰۴) (جدول ۲) انجام گرفت.

تعداد کنیدیوم‌ها با استفاده از لام هماسیتومتر، شمارش شده و در نهایت غلظـت آن بـه 10^6 کنیـدیوم در میلـی‌لیتـر تنظیم گردیـد. ریشـه گیاهچـه‌هـای جـوان ۱۵-۱۲ روزه بـه آرامـی از خـاک خـارج و بـه مـدت یـک تـا دو دقیقـه در سوسپانسیون اسپور فرو برده شد و سپس در سینی‌هـای کشت حاوی مخلوط خاکی رس، پیت‌ماس و پرلیت سـترون نشا گردید (مدد خواه و همکاران ۲۰۱۲). از هر سینی کشت ۱۸ گیاهچـه بـرای هـر تـوده بـه گلـدان انتقـال داده شـد. گلدان‌های حاوی گیاهچه به گلخانه با دامنه‌ی دمای روزانـه ۲۸-۲۲ و دامنه‌ی دمای شبانه ۱۷-۱۲ درجه‌ی سـانتی‌گـراد با طول روز ۱۶ ساعت منتقل شده و هر روز آبیاری شدند. تعداد حـداقل سـه گیاهچـه بـه عنـوان شـاهد در هـر واحـد آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت، که ریشـه آنهـا در آب مقطر غوطه‌ور گردید. آزمـایش در قالـب طـرح بلـوک‌هـای کامل تصادفی با سه تکرار انجام شـد و پـنج نوبـت زمـانی نمونه برداری ریشه‌ای در روزهـای صـفر (شـاهد، قبـل از مایـه‌زنـی)، ۲، ۴، ۶ و ۸ روز پـس از مایـه‌زنـی بـرای اندازه‌گیری تغییـرات فعالیـت آنزیمـی و میـزان فنـل کـل از

[1]Aggressive
[2]Potato Dextrose Agar
[3]Institut National de la Recherche Agronomique

تعـدادی گیاهچـه در هـر واحـد آزمایشـی انجـام گرفـت. شـاخص شـدت بیمـاری (جـدول ۳) بـر اسـاس روش چیخ‌روهو و همکاران (۲۰۰۷) با اندکی تغییر، با اسـتفاده از فرمول زیـر (کامپـل و مـادن ۱۹۹۰) جهـت ارزیـابی میـزان حساسیت و مقاومت توده‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

$$DS = \frac{\sum n_i s_i}{N \times 9}$$

که: ni تعداد گیاهان در هر کلاس بیماری، si نمـره بیمـاری و N تعداد کل گیاهان است.

بررسی تغییرات بیوشیمیایی در توده‌های مقاوم، نیمـه مقاوم، حساس و بسیار حساس آلوده به عامل بیماری

پس از انجام آزمایشات گلخانـه‌ای و تعیـین تـوده‌هـای مقاوم، نیمه مقاوم، حسـاس و بسـیار حسـاس (بـر اسـاس مقیاس ۴-۱) از هر گـروه تعـداد یـک تـوده جهـت بررسـی برخی تغییرات بیوشیمیایی انتخاب شد.

استخراج پروتئین و اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه

جهت استخراج پروتئین محلول ۰/۵ گرم بافت ریشـه در حضور دو میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسـفات ۶۰ میلـی‌مـول بـا pH برابر شش آسیاب شـدند. جهـت عصـاره‌گیـری نمونـه حاصـل بـه لولـه‌هـای سـانتریفیوژ انتقـال داده شـده و در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقـه و در دمـای چهـار درجه‌ی سانتیگراد (داخـل یخچـال) سـانتریفیوژ شـد. همـه مراحـل تهیـه عصـاره آنزیمـی در دمـای چهـار درجـه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. میزان پـروتئین محلـول کـل بـه روش برادفورد (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. جهت تهیه منحنـی استاندارد از غلظت‌هـای مختلـف پـروتئین آلبـومین سـرم گاوی (Bovin Serum Albumin BSA) استفاده گردید.

فعالیـت آنـزیم‌هـا بـه روش اسـپکتروفتومتری (اسـپکتروفتومتر Jenway مـدل UV-6505) در دمـای آزمایشـگاه (۲۵±۲°C) انـدازه‌گیـری شـد. فعالیـت آنـزیم پراکسـیداز بـه روش جانـدا و همکـاران (۲۰۰۳) بـر اسـاس میزان اکسـید شـدن گایـاکول در طـول مـوج ۴۷۰ نـانومتر تعیین گردید. اندازه‌گیـری فعالیـت آنـزیم کاتـالاز بـه روش ککمک و هرست (۱۹۹۱) و بر اسـاس میـزان تجزیـه شـدن H_2O_2 در طـول مـوج ۲۴۰ نـانومتر تعیـین گردیـد. جهـت بررسی تغییرات فعالیت آنـزیم پلـی‌فنـل اکسـیداز در طـول دوره آزمایش از روش کان (۱۹۷۵) استفاده شد و تغییرات جذب نـور بـا فواصـل ۱۰ ثانیـه در طـول مـوج λ مـاکزیمم برابر با ۴۱۰ نانومتر و به مـدت ۱ دقیقـه بـر اسـاس شـدت رنگ نارنجی پورپورگالین تولید شده قرائت گردید. فعالیـت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از طریق اندازه‌گیـری توانـایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم کلراید (NBT) بـه روش گیـانوپولیتیس و رایـس (۱۹۷۷) در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسـید دیسموتاز مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که می‌توانـد تا ۵۰٪ مانع از احیـای نـوری نیتروبلـو تترازولیـوم کلرایـد گردد. مقدار فعالیت آنزیم‌های فوق بر حسب تغییرات جـذب نور بـر دقیقـه بـر میلـی‌گـرم پـروتئین (ΔOD / Min./mg. protein) بیان شد. مقـدار کـل مـواد فنلـی نیـز طبـق روش سواین و هیلیس (۱۹۵۹) اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

داده‌های یادداشت برداری شده قبـل از تجزیـه آمـاری، برای همگنی واریانس‌ها و نرمـال بـودن توزیـع اشـتباهات آزمایشـی از طریـق آزمـون کولمـوگروف-سـمیرنوف[1] (لیلیفورس ۱۹۶۷) بررسی شدند که نشاندهنده نرمال بودن توزیـع اشـتباهات آزمایشـی بـود. سـپس بـر اسـاس مـدل آماری طرح بلـوک‌هـای کامـل تصـادفی، تجزیـه واریـانس اندازه‌گیری‌های تکراری[2] جهت حذف اثـر خطـای ناشـی از مقادیر آنزیمی هر مرحله بـر روی مرحلـه بعـد انجـام شـد (کیرک ۱۹۹۵). محاسبات آماری در این پژوهش با استفاده از نرم افزارهای آمـاری SAS نسـخه 9.2 (SAS Institute Inc. 2004) و Excel انجام شد.

[1] Kolmogorov-Smirnov
[2] Repeated measure

جدول ۱- مشخصات، موقعیت و وضعیت آب و هوایی محل جمع آوری توده‌های خربزه.

شماره	ژنوتیپ	محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	میانگین دمای سالانه	ارتفاع از سطح دریا
۱	قصری	خراسان	۵۹/۰۶ شرقی	۳۵/۰۶ شمالی	۱۴°C	۹۸۴
۲	شادگانی	خوزستان	۴۹/۰۲ شرقی	۳۱/۲۶ شمالی	۲۵°C	۲۰
۳	گرگاب کوچک	اصفهان	۵۱/۴۰ شرقی	۳۲/۳۹ شمالی	۱۶°C	۱۵۷۷
۴	جلالی	سمنان	۵۳/۲۳ شرقی	۳۵/۳۴ شمالی	۱۷/۶°C	۱۱۳۶
۵	شارنته F_2	اینرای فرانسه	۵/۰۴ شرقی	۴۷/۱۸ شمالی	-	۲۶۶
۶	سوسکی	سمنان	۵۳/۲۳ شرقی	۳۵/۳۴ شمالی	۱۷/۶°C	۱۱۳۶
۷	جارجو	گنبد	۵۵/۱۰ شرقی	۳۷/۱۵ شمالی	۱۷°C	۳۸
۸	شارنته‌تی	اینرای فرانسه	۵/۰۴ شرقی	۴۷/۱۸ شمالی	-	۲۶۶
۹	CM17187	اینرای فرانسه	۵/۰۴ شرقی	۴۷/۱۸ شمالی	-	۲۶۶
۱۰	سمسوری	ورامین	۵۱/۳۸ شرقی	۳۵/۱۹ شمالی	۳۲°C	۹۲۳
۱۱	زرد ایوانکی	ایوانکی	۵۲/۰۴ شرقی	۳۵/۲۰ شمالی	۱۷°C	۱۰۷۵
۱۲	شارنته F_1	اینرای فرانسه	۵/۰۴ شرقی	۴۷/۱۸ شمالی	-	۲۶۶
۱۳	مشهدی	خراسان	۵۹/۰۶ شرقی	۳۵/۰۶ شمالی	۱۴°C	۹۸۴
۱۴	ایزابل	اینرای فرانسه	۵/۰۴ شرقی	۴۷/۱۸ شمالی	-	۲۶۶
۱۵	ویرگوس	اینرای فرانسه	۵/۰۴ شرقی	۴۷/۱۸ شمالی	-	۲۶۶
۱۶	بندرعباس	بندرعباس	۵۶/۱۶ شرقی	۲۷/۱۱ شمالی	۲۷°C	۱۱/۵
۱۷	خاقانی گرد	خراسان	۵۹/۰۶ شرقی	۳۵/۰۶ شمالی	۱۴°C	۹۸۴
۱۸	بهار	همدان	۴۸/۲۶ شرقی	۳۴/۵۴ شمالی	۱۱°C	۱۸۱۴

جدول ۲- امتیازدهی براساس علائم بیماری (پرچپید و پیترات ۲۰۰۴).

علائم بیماری	امتیاز
کاملا سالم و بدون علائم زردی ، نکروز یا پژمردگی	۱
زردی لپه ها یا اولین برگ حقیقی	۲
زردی یا پژمردگی دو برگ حقیقی اول	۳
زردی یا پژمردگی ۳ برگ حقیقی یا بیش از آن و قهوه ای شدن ساقه	۴
خشکی کامل و مرگ گیاه	۵

جدول ۳- شاخص شدت بیماری ناشی از قارچ ***F. oxysporum* f. sp. *melonis*** روی خربزه.

علائم بیماری	مقیاس
خیلی مقاوم	۱
مقاوم	۲-۱/۱
نیمه مقاوم	۳-۲
حساس	۴-۳
بسیار حساس	۴

نتایج و بحث

نه روز پس از آلوده‌سازی توده‌های مختلف خربزه در مرحله‌ی یک تا دو برگی، آلودگی با شدت‌های متفاوت در این توده‌ها بروز کرد (شکل ۱). توده‌هایی که شدت بیماری آن‌ها در مقیاس ۲-۱/۱ بود جز توده‌های مقاوم، ۳-۲ جز توده‌های نیمه مقاوم، ۴-۳ جز توده‌های حساس و توده‌هایی که شدت بیماری آن‌ها بزرگتر از ۴ بود جز توده‌های بسیار حساس طبقه‌بندی شدند (چیخ‌روهو و همکاران ۲۰۰۸).

با توجه به شدت بیماری توده‌های شادگانی، شارنته‌تی، بندرعباس، خاقانی گرد، بهار، سمسوری و CM17187 بسیار حساس به بیماری، توده‌های سوسکی، جلالی، قصری، شارنته F_2، شارنته F_1، مشهدی، جارجو و ویرگوس جز توده‌های حساس، توده‌های زرد ایوانکی و گرگاب کوچک جز توده‌های نیمه مقاوم و توده ایزابل به عنوان توده مقاوم تشخیص داده شدند.

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه توده‌های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس

نتایج تجزیه واریانس صفات مختلف نشان داد بین توده‌ها و روزهای مختلف نمونه برداری اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و فنل کل وجود دارد (جدول ۴).

نتایج بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در شکل ۲ مشاهده می‌شود. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که بین روزهای مختلف نمونه‌برداری اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد (جدول ۵). در روزهای ضفر (شاهد)، دوم، چهارم و هشتم بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری اختلاف معنی‌داری بین توده‌هااز نظر فعالیت آنزیم مشاهده گردید (شکل ۲). در گیاهان آلوده هر چهار توده، فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز چهارم بعد از آلوده سازی به حداکثر خود رسید و از این روز رو به کاهش نهاد. در توده مقاوم ایزابل که کمترین شدت بیماری را نشان داد، در مقایسه با توده بسیار حساس شادگانی در روزهای دوم و چهارم بعد از مایه‌زنی، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش بیشتری نشان داد. در روز ششم و هشتم توده‌های شادگانی، قصری و سوسکی، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش بیشتری نشان داد. در روز ششم در توده ایزابل کاهش در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مشاهده شد ولی در روز هشتم مقداری افزایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز مشاهده گردید.

بررسی فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ریشه توده‌های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس

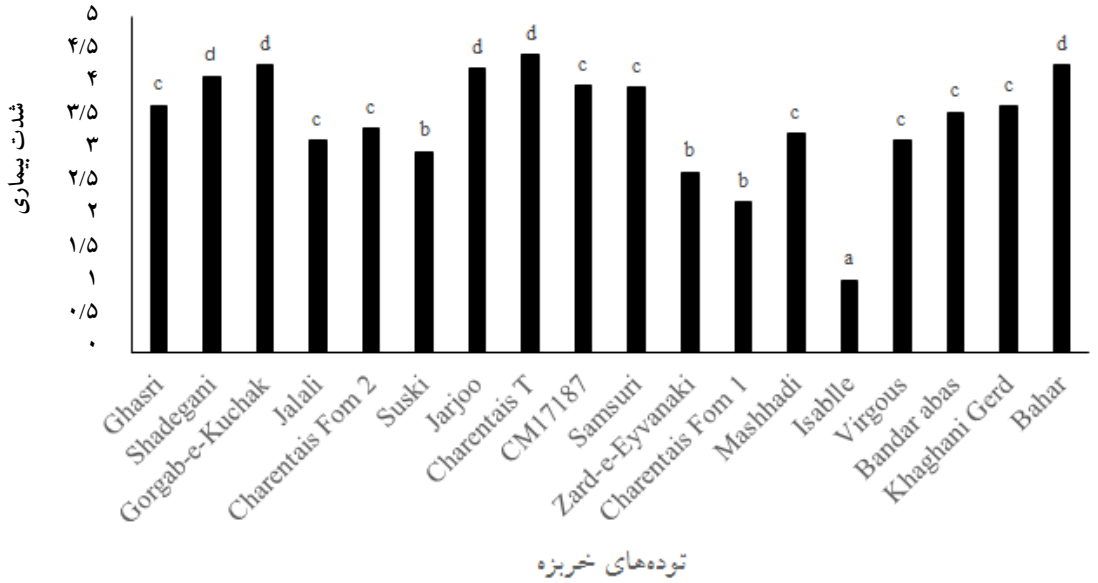
نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیدازدر روزهای دوم، چهارم، ششم و هشتم بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری وجود دارد (شکل ۳). میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تا روز چهارم پس از مایه‌زنی به تدریج در تمام توده‌ها افزایش یافت. حداکثر مقدار فعالیت آنزیم در روز چهارم برای تمام توده‌ها مشاهده شد ولی در یک کلاس آماری با روز دوم و هشتم قرار گرفتند. در گیاهان آلوده هر چهار توده، فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در روز ششم رو به کاهش نهاد ولی مجددا در روز هشتم میزان فعالیت آنزیم در تمام توده‌ها مقداری افزایش یافت. کمترین و بیشترین کاهش آنزیم در روز چهارم به ترتیب مربوط به توده‌های مقاوم ایزابل و حساس قصری بود.

بررسی تغییرات کمی ترکیبات فنلی در توده‌های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس

نتایج نشان داد به احتمال ۹۹ درصد بین مقادیر ترکیبات فنل کل، در توده‌های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد (شکل ۴). مقایسه میانگین مقادیر فنل کل روزهای مختلف نمونه‌برداری در جدول ۵ نشان داده شده است. هم‌چنانکه از شکل ۴ استنباط می‌گردد، در تمام روزهای نمونه‌برداری به غیر از روز دوم اختلاف معنی‌داری بین توده‌ها وجود دارد. در سه توده قصری، شادگانی و سوسکی میزان ترکیبات فنل کل تا روز چهارم یک روند تقریبا افزایشی

داشته و این افزایش در توده ایزابل در روز ششم به حداکثر مقدار خود رسیده و پس از آن کاهش یافته است.

در طی روزهای پس از مایه‌زنی در توده‌ها به تدریج افزایش یافته و حداکثر مقدار آن در روز ششم نسبت به روزهای دیگر مشاهده شده است. در روز هشتم میزان آنزیم کاتالاز در تمام توده‌ها کاهش یافت. کاهش میزان آنزیم در توده سوسکی نیمه مقاوم بیشتر از سایر توده‌ها بود. در روزهای دوم، چهارم، ششم و هشتم بیشترین و کمترین میزان آنزیم به ترتیب در توده‌های مقاوم ایزابل و شادگانی بسیار حساس مشاهده شد.

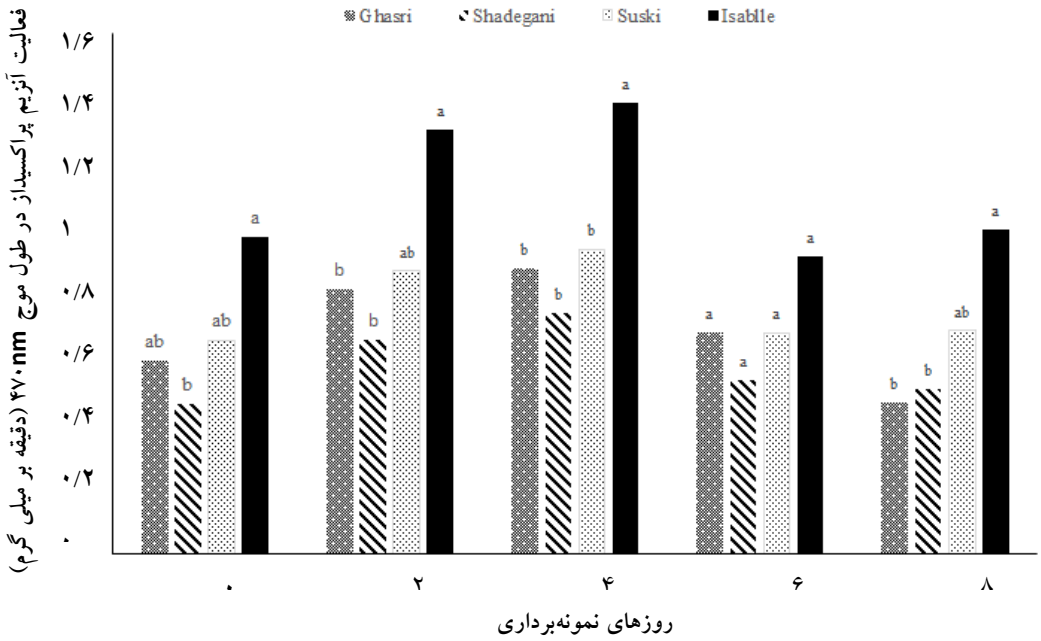


شکل ۱- میانگین شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی در توده‌های مختلف خربزه آلوده به *Fom* 1.2. اعداد نمودار میانگین سه تکرار می‌باشند. شدت بیماری بر اساس جدول ۳ می‌باشد.

جدول ۴- تجزیه واریانس اندازه‌گیری‌های تکراری صفات مورد مطالعه در توده‌های خربزه آلوده شده به فوزاریوم پژمردگی آوندی نژاد ۱.۲

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات					درجه آزادی	میانگین مربعات صفات
		پراکسیداز	پلی‌فنل اکسیداز	فنل کل	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز		شدت بیماری
تکرار	۲	۰/۰۸۵ ns	۰/۰۰۰۹۷**	۰/۱۸ ns	۰/۴۱ ns	۵/۲۹*	۲	۰/۲۵ ns
توده	۳	۰/۷۰۶**	۰/۰۱۱**	۹/۳۳**	۲۵/۴۷**	۹۸/۴۱۱**	۱۷	۲/۱۳**
زمان	۴	۰/۱۹۲**	۰/۰۰۰۸۹**	۷۷/۸۱**	۴۶/۵۵**	۵۴۵/۶۴**		-
تکرار (زمان)	۸	۰/۰۳۸ ns	۰/۰۰۰۰۳ ns	۰/۳۸۴ ns	۰/۰۵ ns	۰/۸۹۸ ns		-
توده (زمان)	۱۲	۰/۰۷۰ ns	۰/۰۰۰۰۳ns	۷/۳۲**	۲/۰۶**	۸/۷۱**		-
خطا	۳۰	۰/۰۴۵	۰/۰۰۰۱۳	۰/۷۰۳	۰/۱۸۶	۱/۳۵۶	۳۴	۰/۳۳
ضریب تبیین (٪)		۸۰	۹۰	۹۵	۹۸	۹۸		۷۶

ns، ** و *: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪.

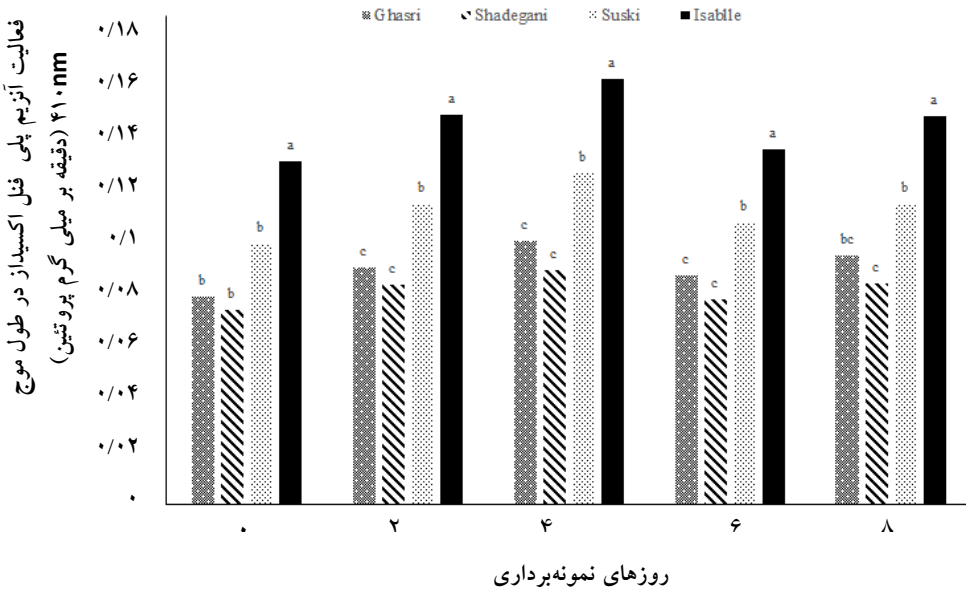


شکل ۲- میانگین میزان پراکسیداز در توده‌های مختلف خربزه در اثر آلودگی با *Fom* 1.2 در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی

جدول ۵- میانگین تاثیر بیماری پژمردگی آوندی خربزه روی فعالیت آنزیم پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، فنل کل، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز در شرایط گلخانه در مراحل مختلف بعد از مایه‌زنی.

روزهای نمونه برداری	آنزیم و فنل کل*				
	پراکسیداز	پلی‌فنل اکسیداز	فنل کل	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز
۰	۰/۶۷۷^{b}	۰/۰۹۲^{c}	۶/۱۴^{d}	۳/۶۳^{e}	۱۱/۲۷^{c}
۲	۰/۹۱۷^{a}	۰/۱۰۵^{abc}	۹/۰۶^{c}	۵/۰۵^{d}	۱۶/۵۲^{b}
۴	۰/۹۹۱^{ab}	۰/۱۱۵^{a}	۱۲/۲۰^{a}	۷/۶۸^{b}	۲۵/۱۷^{a}
۶	۰/۷۰۱^{b}	۰/۰۹۸^{bc}	۱۰/۴۶^{b}	۸/۵۱^{a}	۹/۱۶^{d}
۸	۰/۸۴۸^{ab}	۰/۱۰۶^{ab}	۶/۶۷^{d}	۵/۹۶^{C}	۹/۴۷^{d}

*: مقادیری که دارای دست‌کم یک حرف مشترک در هر ستون هستند در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

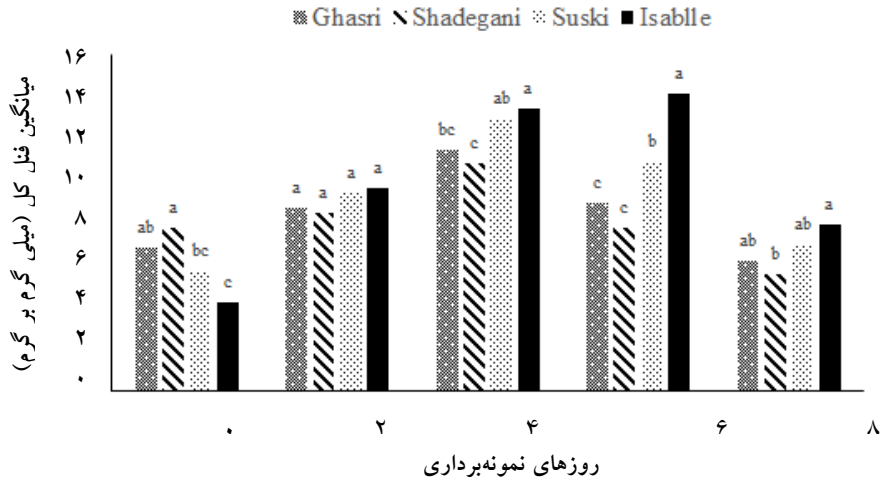


شکل ۳- میانگین میزان پلی‌فنل اکسیداز در توده‌های مختلف خربزه در اثر آلودگی با *Fom* 1.2 در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی

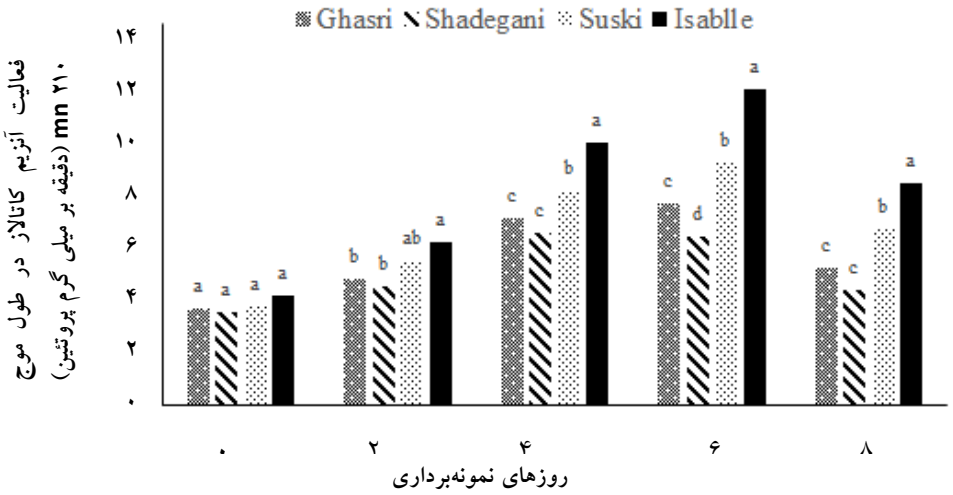
بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ریشه توده‌های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس

نتایج آزمایش نشان داد میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در روزهای صفر، دوم، چهارم، ششم و هشتم با هم اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۶). میزان آنزیم در توده‌های آلوده شده با قارچ عامل بیماری در روزهای دوم و چهارم افزایش یافت، ولی در روز ششم به شدت کاهش یافت و این کاهش در روز هشتم برای توده بسیار حساس شادگانی ادامه یافت در حالیکه در سایر توده‌ها مقداری افزایش یافت. بیشترین میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در روز چهارم بود که توده ایزابل مقاوم بیشترین میزان و توده شادگانی بسیار حساس کمترین میزان فعالیت آنزیم را داشتند.

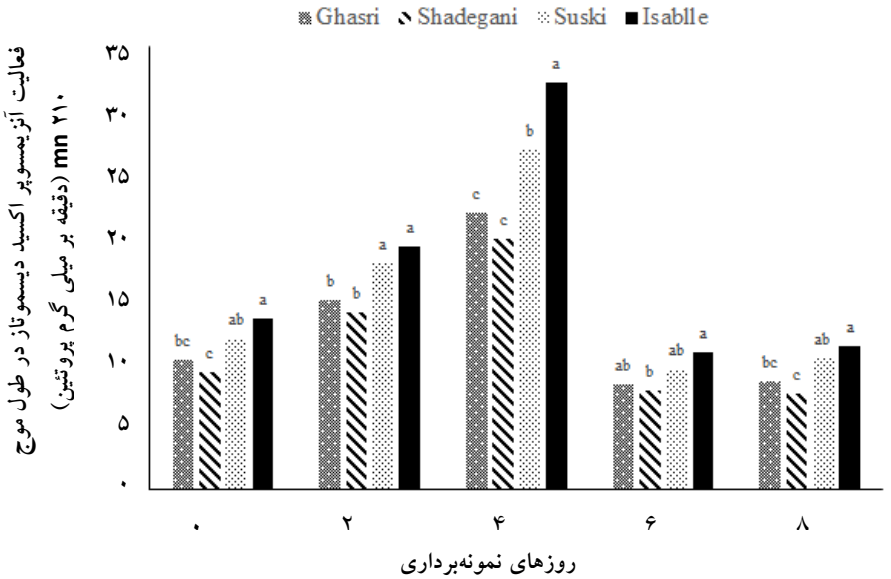
یکی از جنبه‌های مهم دفاعی گیاه میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده آن است (استینر و چونبک ۱۹۹۵). بر طبق آزمایشات گلخانه‌ای، توده‌هایی که بر اساس شدت بیماری آن‌ها مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس به عامل بیماری بودند، جهت بررسی مکانیسم مقاومت انتخاب شدند. طبق بررسی‌های ون‌لون و همکاران (۱۹۹۸) بین تیمار القا کننده و فعال شدن واکنش‌های دفاعی گیاه، فاصله زمانی ۴۸-۲۴ ساعت وجود دارد. از این رو نمونه‌برداری‌ها دو روز بعد از مایه‌زنی شروع شد و تا روز هشتم ادامه داشت. در این تحقیق مقدار کل ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به عنوان عوامل اساسی دفاع بیوشیمیایی، در برهمکنش خربزه-فوزاریوم عامل پژمردگی آوندی از طریق اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. نتایج بررسی تغییرات کمی ترکیبات فنلی در توده‌های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس خربزه نسبت به بیماری نشان داد که میزان ترکیبات فنل کل در طی هشت روز نمونه برداری یک روند افزایشی تا روز چهارم برای توده‌های نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس و تا روز ششم برای توده مقاوم ایزابل داشته و سپس کاهش تا روز هشتم داشته است. افزایش ترکیبات فنل کل در توده مقاوم ایزابل مایه‌زنی شده بیشتر از توده‌های حساس بوده است و به نظر می‌رسد که مقاومت گیاه با میزان ترکیبات فنل کل ارتباط داشته است.



شکل ۴- تغییرات میزان فنل کل (میلی‌گرم در یک گرم بافت ریشه) در توده‌های مختلف خربزه مایه‌زنی شده با *Fom* 1.2. در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی.



شکل ۵- میانگین میزان کاتالاز در توده‌های مختلف خربزه در اثر آلودگی با *Fom* 1.2 در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی.



شکل ۶- میانگین میزان کوپراکسید دیسموتاز در توده‌های مختلف خربزه در اثر آلودگی با *Fom* 1.2 در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی.

طبیعت تولید ترکیبات فنلی در گیاه آلوده به عامل بیماری در جهت دفاع و مقاومت میزبانی است، اما در مورد نتیجه حاصل از تولید یا افزایش این ترکیبات در میزبان آلوده نتایج متفاوتی در تحقیقات به دست آمده است. محققین متعددی ارتباط نقش ترکیبات فنلی و افزایش این ترکیبات را با مقاومت، در میزبان‌های مختلف در رابطه با عوامل بیماری‌زای قارچی ثابت کرده‌اند (فرایتینگ و لگراند ۱۹۹۳، استینر و چونبیک ۱۹۹۵). در بررسی واکنش ارقام خربزه و طالبی به Fom1 مشخص شد که مقدار ترکیبات فنلی در ارقام مقاوم در روز ششم به بیشترین مقدار خود رسیده و اختلاف معنی‌داری با مقدار این ترکیبات در ارقام حساس داشت (مددخواه و همکاران ۲۰۱۲). افزایش پراکسیدازها در واکنش میزبان-پارازیت ممکن است با مقاومت میزبان در برابر بیماری همراه باشد (پاتیکوسکی و همکاران ۱۹۸۸، یامتو ۱۹۹۵). نقش پراکسیدازها را در مقاومت گیاه، به توانایی این آنزیم در اکسیده کردن متابولیت‌های مهم نسبت می‌دهند. در بررسی ماکو و همکاران (۱۹۶۸) دخالت مستقیم پراکسیداز را در واکنش‌های دفاعی گیاه گزارش داده و نتیجه گرفته‌اند که پراکسیداز از رشد عامل بیماری‌زا ممانعت به عمل می‌آورد. مقادیر بالای فعالیت پراکسیداز در ارقام مقاوم در مقایسه با ارقام حساس، در موز (آگویلار و همکاران ۲۰۰۰) و گوجه فرنگی (دوچی و ماتا ۱۹۸۸) گزارش شده است. در مقایسه توده‌های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس، میزان فعالیت آنزیم در روز چهارم به حداکثر مقدار خود رسیده و در توده مقاوم ایزابل بیشتر از سایر توده‌ها بود. از نتایج آزمایش مربوط به فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز چنین استنباط می‌شود که فعالیت آنزیم در ارتباط با مقاومت میزبان در ارتباط با عامل بیماری بوده است. بررسی نتایج فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز نشان داد که الگوی افزایش میزان آنزیم در توده‌های مقاوم تا بسیار حساس یکسان بوده و بیانگر این است که حمله پاتوژن سبب افزایش فعالیت آنزیم می‌شود. این افزایش می‌تواند به دلیل آزاد شدن الیسیتورها در اثر حمله قارچ عامل بیماری باشد که پس از آزاد شدن الیسیتور و دریافت آن توسط میزبان سبب افزایش فعالیت آنزیم می‌شود. محققین متعددی نیز در مطالعات خود ارتباط نقش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و افزایش مقاومت در میزبان را ثابت

کرده‌اند (ماندال و همکاران ۲۰۰۸، مددخواه و همکاران ۲۰۱۲). محمدی و کاظمی و (۲۰۰۲) در بررسی نقش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در مقاومت گندم به بیماری فوزاریومی خوشه نشان دادند که ارتباط مستقیمی بین فعالیت این آنزیم ومقاومت به بیماری (در ارقام متحمل) وجود دارد. نتایج فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که فعالیت کاتالاز باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شود و در واکنش ناسازگار، فعالیت کاتالاز چند برابر واکنش سازگار است. نقش کاتالاز را در مقاومت گیاه، به توانایی این آنزیم در تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن و نقش آن در کاهش پراکسید هیدروژن نسبت می‌دهند (پرستون و همکاران ۲۰۰۲، بلوچ و همکاران ۲۰۰۷). نتایج آزمایش لوبینا و مورگان (۲۰۱۲) نشان داد که آلوده‌سازی کنجد با *Alternaria sesame* باعث تشدید فعالیت آنزیم کاتالاز شد. عبدل مونایم و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند، پراکسید اکسیژن در القای مقاومت به بیماری پوسیدگی زغالی در بسیاری از گونه‌های گیاهان نقش دارد. در نتیجه با توجه به نقش انتقال پیام توسط پراکسید هیدروژن در القای مقاومت به بیماری می‌توان گفت که آنزیم کاتالاز در ایجاد مقاومت نقش اساسی دارد. نتایج آزمایش در مورد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بیانگر آن است که میزان فعالیت آنزیم در روز چهارم بعد از آلودگی بیشترین مقدار را داشته و نقش آن را در ایجاد مقاومت در گیاه به توانایی آن در تبدیل O_2^- به H_2O_2 و کاهش سمیت آنیون سوپراکسید در محیط بیان شده است (اوگاوا و همکاران ۱۹۹۶). در بررسی واکنش گوجه‌فرنگی آلوده به *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم در ریشه گیاهان آلوده پس از ۴۸ ساعت ۲/۹ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت (ماندال و همکاران ۲۰۰۸). در این بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و میزان ترکیبات فنلی به منزله پنج عامل اساسی دفاع بیوشیمایی در برهم‌کنش توده‌های مختلف خربزه با عامل پژمردگی آوندی افزایش می‌یابند. همچنین توده‌های ایزابل و شادگانی به ترتیب به عنوان مقاوم‌ترین و حساس‌ترین توده‌ها به عامل پژمردگی آوندی شناخته شدند. بنابراین از توده ایزابل می‌توان به عنوان منبع دارای مقاومت به بیماری پژمردگی آوندی در تولید جمعیت‌های پایه، برای مطالعه نحوه عمل و شناسایی ژن‌های موثر در ایجاد مقاومت استفاده کرد.

منابع

بنی هاشمی ض، ۱۳۸۹. واکنش ارقام *Cucumis melo* به نژادهای *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* عامل پژمردگی فوزاریومی. مجله بیماری‌های گیاهی. جلد ۴۶ شماره ۱۴، صفحه‌های ۱۱ تا ۲۲.

بهروزین م، ۱۳۷۶. بررسی اثر قارچ *Puccinia striiformis* روی برخی از پدیده‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و هیستولوژیکی دو رقم گندم. پایان نامه دکترا در رشته بیماری شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

رافظی ر، ۱۳۹۳. زراعت خربزه و طالبی. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. ۱۰۷ صفحه.

Abdel-Monai MF, Abdel-Gaid MA and Armanious HA, 2012. Effect of chemical inducers on root rot and wilt diseases, yield and quality of tomato. International Journal of Agriculture Science 7: 211-220.

Aguilar E, Turner D and Sivasithamparam K, 2000. *Fusarium oxysporum* f. sp. c*ubense* inoculation and hypoxia alter peroxidase and phenylalanine ammonia lyase activities in nodal roots of banana cultivars (*Musa* sp.) differing in their susceptibility to Fusarium wilt. Australian Journal of Botany 48: 589-596.

Alabouvette C, Tramier R and Grouet D, 1980. Recherches sur la résistance des sols aux maladies VIII. Perspectives d'utilisation do la résistance des sols pour lutter contre les *Fusarioses vasculaires*. In Annales de Phytopathologie 12: 83-93.

Banihashemi Z, 1968a. The biology and ecology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in soil and root zones of host and non host plants. Ph. D. Thesis. Michigan State University, 114 pp.

Banihashemi Z and Dezeeuw DJ, 1975. The behavior of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in the presence and absence of host plants. Phytopathology 65: 1212-1217.

Bloch K, Shichman E, Vorobeychik M, Bloch D and Vardi P, 2007. Catalase expression in pancreatic alpha cells of diabetic and non-diabetic mice. Histochemistry and Cell Biology 127: 227-232.

Bradford MM, 1976. A rapid and susceptible method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248–254.

Cakmak I and Horst W, 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glysine max* L.). Plant Physiology 83: 463-468.

Campbell CL and Madden LV, 1990. Temporal analysis of epidemics I: description and comparison of disease progress curves. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 161-202.

Chikh-Rouhou H, Álvarez J and González-Torres R, 2007. Differential interaction between melon cultivars and race 1.2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 72: 825-829.

Conway KE, 1996. An overview of the influence of sustainable agricultural systems on plant microbial degradation of lignins. Enzyme microbial Techno 6: 434-442.

De Gara L, de Pinto M and Tommasi F, 2003. The antioxidant systems via-a-via reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. Plant Physiology and Biochemistry 41: 863-870.

De Vecchi L and Matta A, 1988. An ultrastructural and cytochmical study of proxidase, polyphenoloxidases and phenols in xylem of tomato plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* or *melonis*. Caryologia 42: 103-114.

Ehsani-Moghaddam B, Charles MT, Carisse O and Khanizadeh S, 2006. Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. Journal of Plant Physiology 163: 147-153.

Elad Y and Chet I, 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of Pythium damping-off by bacteria. Phytopathology 77: 190-195.

Ficcadenti N, Sestili S, Annibali S and Campanelli G, 2002. Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Race. 1.2 in muskmelon lines Nad-1. and Nad-2. Plant Disease 86: 897-900.

Friting B and Legrand M, 1993. Mechanisms of Plant defense Responses. Kluwer Academic Publishers. London, UK.

Giannopolitis CN and Ries SK, 1977. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. Plant physiology 59: 309-314.

Goodman RN, Király Z and Wood KR, 1986. The biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press, 433 pp.

Herman R and Perl-Treves R, 2007. Characterization and inheritance of a new source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in *Cucumis melo.* Plant Disease 91: 1180-1186.

Janda T, Szalai G, Rios-Gonzales K, Veisa O and Paldi E, 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. Plant Science 164: 301-306.

Kahn V, 1975. Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties. Journal of the Science of Food and Agriculture 26: 1319-1324.

Kirk RE, 1995. Experimental Design: Procedures for the Behavioral Sciences. 3rd ed., SAGE Publications, California, USA, 1056 pp.

Lilliefors HW, 1967. On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown. Journal of the American Statistical Association 62: 399-402.

Lubaina AS and Murugan K, 2012. Effect of growth regulators in callus induction, plumbagin content and indirect organogenesis of *Plumbago zeylanica*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 4: 334-336.

Macko V, Woodbury W and Stahman MA, 1968. The effect of peroxidase on the germination and growth of mycelium of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology 58: 1250-1254.

Madadkhah E, Lotfi M, Nabipour A, Rahmanpour S, Banihashemi Z and Shoorooei M, 2012. Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1. Science Horticalture, 135: 171-176.

Mandal S, Mitra A and Mallick N, 2008. Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Physiological and Molecular Plant Pathology 7: 56-61.

Martyn RD and Gordon TR, 1996. Fusarium wilt of melon. Compendium of cucurbit diseases. Edited by TA Zitter, DL Hopkins, and CE Thomas. APS Press, Minnesota, USA, 14-15.

McNally DJ, Wurms KV, Labbé C and Bélanger RR, 2004. Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site–specific response to fungal penetration in cucumber. Physiological and Molecular Plant Pathology 63: 293-303.

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.

Nakazumi H and Hiari G, 2004. Diallel analysis for resistance of melon (*Cucumis melo*) to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1,2y. Journal of Horticultural Research Japan 6: 65-70.

Ogawa KI, Kanematsu S and Asada K, 1996. Intra-and extra-cellular localization of “cytosolic” CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. Plant and Cell Physiology 37: 790-799.

Patykowski J, Urbanek H and Kaczorowska T, 1988. Peroxidase Activity in Leaves of Wheat Cultivars Differing in Resistance to *Erysiphe graminis* DC. Journal of Phytopathology 122: 126-134.

Perchepied L and Pitrat M, 2004. Polygenic inheritance of partial resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in melon. Phytopathology 94: 1331-1336.

Pitrat M, 2006. 2006 Gene list for Melon. CGC. NCSU. USA.

Preston TJ, Muller WJ and Singh G, 2002. Scavenging of extracellular H_2O_2 by catalase inhibits the proliferation of HER-2/Neu-transformed rat-1 fibroblasts through the induction of a stress response. Journal of Biological Chemistry 276: 9558-9564.

Ray H, Douches D and Hammerschmidt R, 1998. Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. Physiological and Molecular Plant Pathology 53: 93-103.

Reuveni R and Bothma GC, 1985. The relationship between peroxidase activity and resistance of *Sphaerotheca fuligena* in melons. Phytopathologische Zeitschrift 114: 260-267.

Risser G and Rode JC, 1973. Breeding for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Pages 37-39 in: Eucarpia: La Sélection du Melon. G. Risser, ed. INRA, Montfavet-Avignon, France.

SAS /STAT users guide. 2004. SAS 9.1 for windows update. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 668 pp.

Steiner U and Schönbeck F, 1995. Induced disease resistance in monocots. Induced Resistance to Disease in plants 4: 86-110.

Swain T and Hillis W, 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. the quantitative analysis of phenolic constituents. Journal of the Science of Food and Agriculture 10: 63-68.

Tian F, Zhu J, Sun M, Jiang J, Wang S and Zhang W, 2008. Induction and mechanism of cucumber resistance to anthracnose induced by *Pieris rapae* extract. Frontiers of Agriculture in China 2: 137-140.

Vance C, Kirk T and Sherwood R, 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Annual Review of Phytopathology 18: 259-288.

Van Loon LC, Bakker PA and Pieters CM, 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36: 453-483.

Yamamoto H, 1995. Pathogenesis and host-parasite specificity in rusts. Pathogenesis and Host Specificity in Plant Disease. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Basis 2: 203-212.

Zitter TA, 1998. Fusarium Diseases of Cucurbits. Pp. 733-737. In: Hamson AR, James DW and Topper KF (eds.) Vegetable Crops Fact Sheets. Cornell University, New York, USA.

The Study of Enzymatic Activities Changes in Roots of Cantaloupe Plant Infected with Fusarium Wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*)

Mehrdad Hanifei[1], Hamid Dehghani[2*] and Rajab Choukan[3]

[1]Former M. Sc. Student, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3]Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.
[*]Corresponding author: dehghanr@modares.ac.ir

Received: 14 Nov 2015 Accepted: 21 Feb 2017

Abstract

Fusarium wilt of cantaloupe caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*) is an important disease in the Iran and world. To find resistance source of melon, 18 landraces, collected from different parts if Iran, were evaluated against race 1.2 of *fom* in greenhouse experiment in a randomized complete block design with three replication in seed and plant improvement institute The root of seedlings in 1-2 true leaves stage were in 50ml spore suspension of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* with 10^6 concentration for 1-2 minute and were returned to trays. Between these landraces, Shadegani as most susceptible landrace and Samsuri as susceptible landrace and Suski as semi resistant landrace and Isablle as resistant landrace were selected for biochemical studies of peroxidase, poly phenol oxidase, catalase, superoxidase and the roots phenolic compounds. Root samples were taken in zero, two, four, six and eight days after inoculation, and used for study of changes enzymes activities and the total phenolic contents. Based on the results obtained, there is a significant difference in the activity of peroxidase, polyphenol oxidase, catalase and superoxide dismutase on different days and the maximum activity was recorded in the fourth and sixth day and the highest and lowest enzyme activity were in Isablle and Shadegani, respectively. Changes phenolic compounds in fourth, sixth and eighth were significant differences each other. Before infection (0 day) the greatest amount of phenolic compounds was recorded in Shadegani (very susceptible landrace), while the spread of disease agent the highest amount obtained on the fourth day after inoculation in Isablle landrace. In this study, the activity of peroxidase, polyphenol oxidase, catalase, superoxide dismutase and phenolics content increased as five factor in the interaction melon landraces with fusarium wilt.

Keywords: Cantaloupe, Fusarium wilt, Enzyme activity, Phenolic Compounds.