

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

مهرداد حنیفه‌ئی^۱، حمید دهقانی^{۲*} و رجب چوکان^۳

۱- دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد 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 ۱۰۲ 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 ۱۰^۶ 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 بیوشیمیایی در برهم‌کنش توده‌های مختلف خربزه با عامل پژمردگی آوندی افزایش می‌یابند.

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

مقدمه

^۱ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* 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

بیماری پژمردگی آوندی خربزه که توسط قارچ خاکزی *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. F. موسوم به *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* W.C. Snyder & H. N. Hans که باختصار،

^۱ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*; Fom

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 ۱۰۲. مکان ژنی *Fom-1* مقاومت به نژادهای صفر و دو این بیماری را در گیاه سبب می‌شود در حالیکه مکان *Fom-2* سبب ایجاد مقاومت به نژادهای صفر و یک می‌شود (پیتیریت ۲۰۰۶). نژادهای فعال در ایران نژادهای یک و ۱۰۲ هستند. نژاد یک بیشتر در منطقه گرمسار، استان تهران و منطقه ورامین شایع است در حالیکه نژاد ۱۰۲ در استان فارس فعالیت می‌کند (بنی‌هاشمی ۱۹۶۸). مقاومت به نژاد ۱۰۲ با توجه به ماهیت کمی مقاومت، پیچیده است. مقاومت نسبی به نژاد ۱۰۲ 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 به همراه مکان‌های *Fom-1* و *Fom-2* در واریته *Isabelle* هرمی نمود (فیکادنتی و همکاران ۲۰۰۲، پرچپید و پیتیرات ۲۰۰۴). فیکادنتی و همکاران (۲۰۰۲) با بهره‌گیری از ایزابل، لاین‌های دابل هاپلوئید مقاوم به نژاد ۱۰۲، 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 بیوشیمیایی 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

(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 کلأمیدوسپور پایا باقی می‌ماند (کانوی، ۱۹۹۶) و با جابجایی خاک، ادوات کشاورزی، همچنین از طریق بذر آلوده و حتی باد سهولت و بسرعت در مناطق کشت گسترش می‌یابد. عامل بیماری باعث زردی، کوتولگی، پژمردگی و در نهایت مرگ گیاه می‌شود. علائم بیماری معمولاً 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 (زیتز 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، نرت، 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 اورگانسیم‌های 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*، بکارگیری باکتری‌های آنتا گونیست نظیر سویه شماره ۱۱۵ از گونه *Stereomyces olynaceus* یا استفاده از گونه‌ای از قارچ پنی‌سیلیوم بنام *Penicillium chrysogenum* جایگزین‌های مناسبی برای روشهای شیمیایی نیستند چرا که بسیار پرهزینه بوده و نیاز به تخصص کافی و شرایط مطلوب محیطی دارند (آلبوتک و همکاران، ۱۹۸۰). در مقابل تمام

H_2O_2 به آب و اکسیژن در کاهش پراکسید هیدروژن نقش ایفا می نماید (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 زمان های ۷۲ و ۱۰۰ ساعت پس از مایه زنی 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 آنزیم ها بنام هیدروپراکسیدازها، سم زدایی می شود. تحقیقات زیادی در رابطه با بررسی اثر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مقاومت به عوامل بیماری زا انجام شده است که نشان می دهند مقاومت گیاه به عامل بیماری زا، وابسته به حضور مقادیر زیادی از آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است (احسانی مقدم و همکاران ۲۰۰۶، ماندل و همکاران ۲۰۰۸).

هدف از این پژوهش یافتن توده های مقاوم خربزه و طالبی بر اساس فعالیت آنزیم های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و ترکیبات فنل کل در ریشه گیاهچه های آلوده بود.

مواد و روش ها

تهیه زادمایه قارچ عامل بیماری

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

بیماری در رقم مقاوم زیادتر از رقم حساس است و یک رابطه ی خطی مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و مقاومت گیاه وجود دارد (گودمن و همکاران ۱۹۸۶). علی رغم 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 قهوه ای دخالت نداشت. در بررسی دیگری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، تجمع مواد شبه فنلی اطراف هیف ها و مکینه های قارچ سفیدک پودری متلاشی شده در برگ های 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 واکنش های دفاعی گیاه گزارش داده و نتیجه گرفتند که پراکسیداز از رشد عامل بیماری زا ممانعت به عمل می آورد. گزارش های متعددی نشان می دهد که فعالیت پراکسیداز باعث افزایش مقاومت گیاه می شود و در واکنش ناسازگار، فعالیت پراکسیداز چند برابر واکنش سازگار است (یاموتو ۱۹۹۵، وان لون و همکاران ۱۹۹۸). نتایج تحقیقات ریونی و بازما (۱۹۸۵) نشان داد که فعالیت پراکسیداز نشان دهنده ی تغییرات بیوشیمیایی بوده و بخشی از واکنش مقاومت است. پلی فنل اکسیدازها گروهی از پروتئین های مس دار هستند که سبب اکسیده شدن پلی فنل ها به کوئین ها (ترکیبات ضد میکروبی) و لیگنینی شدن دیواره سلول های گیاهی طی آلودگی های میکروبی می شود و همچنین در واکنش های تدافعی و فوق حساسیت که سبب مقاومت به قارچ ها می شود، شرکت دارد (ری و همکاران ۱۹۹۸). افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز در بافت گیاهی، بویژه در مکان های آلوده و اطراف آن در تعداد زیادی از بیماری های 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 سلول های گیاهی یافت شده و به عنوان یکی از مهمترین آنزیم های آنتی اکسیدانی با تجزیه

مدت سه دقیقه در سینی‌های کشت حاوی مخلوط خاک رس، پیت ماس و پرلیت (۱:۱:۲) کاشته شده و گیاهان هر روز تا رسیدن به مرحله‌ی ۲ برگی آبیاری شدند. مشخصات، موقعیت، وضعیت آب و هوایی و محل جمع آوری توده‌های خربزه و طالبی مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است.

آزمون و تایید بیماریزایی جدایه‌ی عامل بیماری پژمردگی آوندی روی لاین اینبرد شارنته‌تی (شاهد حساس) بر اساس روش فرو بردن ریشه در سوسپانسیون کنیدیوم انجام شد. برای یادداشت برداری و ثبت داده‌ها سینی‌های کشت هر روز ارزیابی شدند و گیاهانی که به علت شوک نشاکاری از بین رفته بودند، حذف گردیدند. از روز نهم علائم ایجاد شده روی گیاهچه‌ها یادداشت گردید و به محض بروز علائم شامل زردی و پژمردگی، ساقه گیاهان آلوده جهت ردیابی *Fom* روی محیط PDA کشت داده شد. نمره امتیاز دهی بر مبنای علائم بیماری بر اساس روش پرچپید و پیترات (۲۰۰۴) (جدول ۲) انجام گرفت.

تعداد کنیدیوم‌ها با استفاده از لام هماسیتومتر، شمارش شده و در نهایت غلظت آن به 10^6 کنیدیوم در میلی‌لیتر تنظیم گردید. ریشه گیاهچه‌های جوان ۱۵-۱۲ روزه به آرامی از خاک خارج و به مدت یک تا دو دقیقه در سوسپانسیون اسپور فرو برده شد و سپس در سینی‌های کشت حاوی مخلوط خاکی رس، پیت‌ماس و پرلیت سترون نشا گردید (مدد خواه و همکاران ۲۰۱۲). از هر سینی کشت ۱۸ گیاهچه برای هر توده به گلدان انتقال داده شد. گلدان‌های حاوی گیاهچه به گلخانه با دامنه‌ی دمای روزانه ۲۸-۲۲ و دامنه‌ی دمای شبانه ۱۷-۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد با طول روز ۱۶ ساعت منتقل شده و هر روز آبیاری شدند. تعداد حداقل سه گیاهچه به عنوان شاهد در هر واحد آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت، که ریشه آنها در آب مقطر غوطه‌ور گردید. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد و پنج نوبت زمانی نمونه برداری ریشه‌ای در روزهای صفر (شاهد، قبل از مایه‌زنی)، ۲، ۴، ۶ و ۸ روز پس از مایه‌زنی برای اندازه‌گیری تغییرات فعالیت آنزیمی و میزان فنل کل از

تعیین نژاد تکمیلی روی لاین‌های ویرگوس و ایزابل و ملاحظه‌ی واکنش ناسازگاری روی لاین اینبرد ایزابل در شرایط کنترل شده صورت گرفت. جهت نگهداری جدایه‌ی مهاجم^۱، تک اسپورهای دریافت شده در تشتک پتری حاوی محیط کشت عصاره سیب زمینی دکستروز آگار^۲ (PDA) (عصاره ۳۰۰ گرم سیب زمینی + ۲۰ گرم دکستروز + ۱۶ گرم آگار) کشت شدند. تشتک‌ها در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس کنیدیوم‌های تولید شده با مخلوط ماسه و کاه گندم سترون مخلوط گردید. برای درجه تولید اندام‌های مقاوم یعنی کلامیدوسپورها، محیط‌های کشت ابتدا به مدت یک ماه در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس به مدت چهار تا شش ماه در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد تا جمعیت *Fom* به حد ثابت برسد (بنی‌هاشمی و دیزیو ۱۹۷۵). برای تهیه زامایه قارچ عامل بیماری، دو گرم از مخلوط ماسه و کاه گندم حاوی کلامیدوسپور به داخل تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA اضافه شد و در داخل اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد زیر نور فلورسنت به مدت ۱۲ روز نگهداری شدند. جهت تهیه سوسپانسیون اسپور نیز از کشت‌های ۱۲ روزه قارچ عامل بیماری بر روی محیط کشت PDA استفاده شد. بدین منظور ابتدا سطح محیط کشت با چهار تا پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون و با استفاده از لام شیشه‌ای سترون شسته شد و سپس به منظور جداسازی ریشه‌ها از اسپورها، سوسپانسیون از پارچه لملل دو لایه سترون عبور داده شد.

آزمون ارزیابی مقاومت ارقام

بذور ۱۸ توده بومی خربزه که از مرکز تحقیقات کشاورزی استان تهران تهیه شده بود، به همراه ارقام افتراقی که از موسسه‌ی اینرا^۳ از فرانسه دریافت گردیده بودند، پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۵٪ به

^۱Aggressive

^۲Potato Dextrose Agar

^۳Institut National de la Recherche Agronomique

تعیین گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز به روش ککمک و هرست (۱۹۹۱) و بر اساس میزان تجزیه شدن H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر تعیین گردید. جهت بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در طول دوره آزمایش از روش کان (۱۹۷۵) استفاده شد و تغییرات جذب نور با فواصل ۱۰ ثانیه در طول موج λ ماکزیم برابر با ۴۱۰ نانومتر و به مدت ۱ دقیقه بر اساس شدت رنگ نارنجی پورپورگالین تولید شده قرائت گردید. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از طریق اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم کلراید (NBT) به روش گیانوپولیتیس و رایس (۱۹۷۷) در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند تا ۵۰٪ مانع از احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم کلراید گردد. مقدار فعالیت آنزیم‌های فوق بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین ($\Delta OD / Min./mg.$ protein) بیان شد. مقدار کل مواد فنلی نیز طبق روش سواين و هیلیس (۱۹۵۹) اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

داده‌های یادداشت برداری شده قبل از تجزیه آماری، برای همگنی واریانس‌ها و نرمال بودن توزیع اشتباهات آزمایشی از طریق آزمون کولموگروف-سمیرنوف^۱ (لیلیفورس ۱۹۶۷) بررسی شدند که نشان‌دهنده نرمال بودن توزیع اشتباهات آزمایشی بود. سپس بر اساس مدل آماری طرح بلوک‌های کامل تصادفی، تجزیه واریانس اندازه‌گیری‌های تکراری^۲ جهت حذف اثر خطای ناشی از مقادیر آنزیمی هر مرحله بر روی مرحله بعد انجام شد (کیرک ۱۹۹۵). محاسبات آماری در این پژوهش با استفاده از نرم افزارهای آماری SAS نسخه 9.2 (SAS Institute Inc. 2004) و Excel انجام شد.

تعدادی گیاهچه در هر واحد آزمایشی انجام گرفت. شاخص شدت بیماری (جدول ۳) بر اساس روش چیخ‌روهو و همکاران (۲۰۰۷) با اندکی تغییر، با استفاده از فرمول زیر (کامپل و ماندن ۱۹۹۰) جهت ارزیابی میزان حساسیت و مقاومت توده‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

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

که: n_i تعداد گیاهان در هر کلاس بیماری، s_i نمره بیماری و N تعداد کل گیاهان است.

بررسی تغییرات بیوشیمیایی در توده‌های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس آلوده به عامل بیماری
پس از انجام آزمایشات گلخانه‌ای و تعیین توده‌های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس (بر اساس مقیاس ۱-۴) از هر گروه تعداد یک توده جهت بررسی برخی تغییرات بیوشیمیایی انتخاب شد.

استخراج پروتئین و اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه

جهت استخراج پروتئین محلول ۰/۵ گرم بافت ریشه در حضور دو میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۶۰ میلی‌مول با pH برابر شش آسیاب شدند. جهت عصاره‌گیری نمونه حاصل به لوله‌های سانتریفیوژ انتقال داده شده و در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد (داخل یخچال) سانتریفیوژ شد. همه مراحل تهیه عصاره آنزیمی در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. میزان پروتئین محلول کل به روش برادفورد (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. جهت تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (Bovin Serum Albumin BSA) استفاده گردید.

فعالیت آنزیم‌ها به روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر Jenway مدل UV-6505) در دمای آزمایشگاه ($25 \pm 2^\circ C$) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش جاندا و همکاران (۲۰۰۳) بر اساس میزان اکسید شدن گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر

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	شارننه F ₂	ایترای 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	شارننه تی	ایترای فرانسه	۵/۰۴ شرقی	۴۷/۱۸ شمالی	-	۲۶۶
۹	CM17187	ایترای 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	شارننه F ₁	ایترای فرانسه	۵/۰۴ شرقی	۴۷/۱۸ شمالی	-	۲۶۶
۱۳	مشهدی	خراسان	۵۹/۰۶ شرقی	۳۵/۰۶ شمالی	۱۴°C	۹۸۴
۱۴	ایزابل	ایترای فرانسه	۵/۰۴ شرقی	۴۷/۱۸ شمالی	-	۲۶۶
۱۵	ویرگوس	ایترای 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).

امتیاز	علائم بیماری
۱	کاملاً سالم و بدون علائم زردی، نکروز یا پژمردگی
۲	زردی لپه‌ها یا اولین برگ حقیقی
۳	زردی یا پژمردگی دو برگ حقیقی اول
۴	زردی یا پژمردگی ۳ برگ حقیقی یا بیش از آن و قهوه‌ای شدن ساقه
۵	خشکی کامل و مرگ گیاه

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

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

نتایج و بحث

نه روز پس از آلوده سازی توده های مختلف خربزه در مرحله ی یک تا دو برگی، آلودگی با شدت های متفاوت در این توده ها بروز کرد (شکل ۱). توده هایی که شدت بیماری آن ها در مقیاس ۱-۲ بود جز توده های مقاوم، ۲-۳ جز توده های نیمه مقاوم، ۳-۴ جز توده های حساس و توده هایی که شدت بیماری آن ها بزرگتر از ۴ بود جز توده های بسیار حساس طبقه بندی شدند (چیخ روهو و همکاران ۲۰۰۸).

با توجه به شدت بیماری توده های شادگانی، شارن ته تی، بندرعباس، خاقانی گرد، بهار، سمسوری و CM17187 بسیار حساس به بیماری، توده های سوسکی، جلالی، قصری، شارن ته F₂، شارن ته F₁، مشهدی، جارجو و ویرگوس جز توده های حساس، توده های زرد ایوانکی و گرگاب کوچک جز توده های نیمه مقاوم و توده ایزابل به عنوان توده مقاوم تشخیص داده شدند.

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

نتایج تجزیه واریانس صفات مختلف نشان داد بین توده ها و روزهای مختلف نمونه برداری اختلاف معنی داری در فعالیت آنزیم های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و فنل کل وجود دارد (جدول ۴).

نتایج بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در شکل ۲ مشاهده می شود. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که بین روزهای مختلف نمونه برداری اختلاف معنی دار آماری وجود دارد (جدول ۵). در روزهای صفر (شاهد)، دوم، چهارم و هشتم بعد از مایه زنی قارچ عامل بیماری اختلاف معنی داری بین توده ها از 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 مایه زنی، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش بیشتری نشان داد. در روز ششم و هشتم توده های 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 پلی فنل اکسیداز در ریشه توده های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس

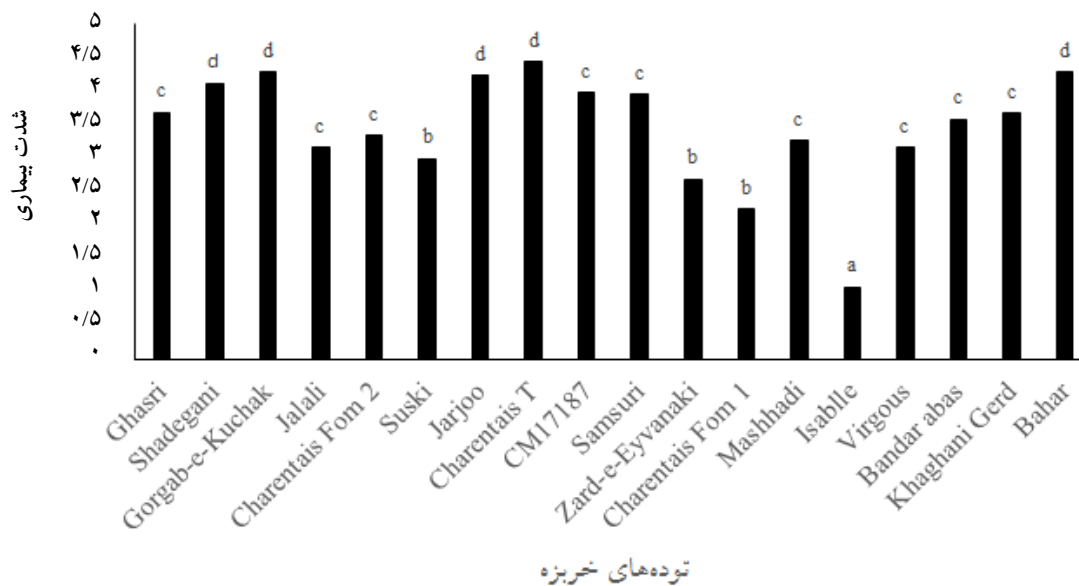
نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری از نظر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در روزهای دوم، چهارم، ششم و هشتم بعد از مایه زنی قارچ عامل بیماری وجود دارد (شکل ۳). میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز تا روز چهارم پس از مایه زنی به تدریج در تمام توده ها افزایش یافت. حداکثر مقدار فعالیت آنزیم در روز چهارم برای تمام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

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

نتایج نشان داد به احتمال ۹۹ درصد بین مقادیر ترکیبات فنل کل، در توده های مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس اختلاف بسیار معنی داری وجود دارد (شکل ۴). مقایسه میانگین مقادیر فنل کل روزهای مختلف نمونه برداری در جدول ۵ نشان داده شده است. همچنانکه از شکل ۴ استنباط می گردد، در تمام روزهای نمونه برداری به غیر از روز دوم اختلاف معنی داری بین توده ها وجود دارد. در سه توده قصری، شادگانی و سوسکی میزان ترکیبات فنل کل تا روز چهارم یک روند تقریباً افزایشی

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.

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

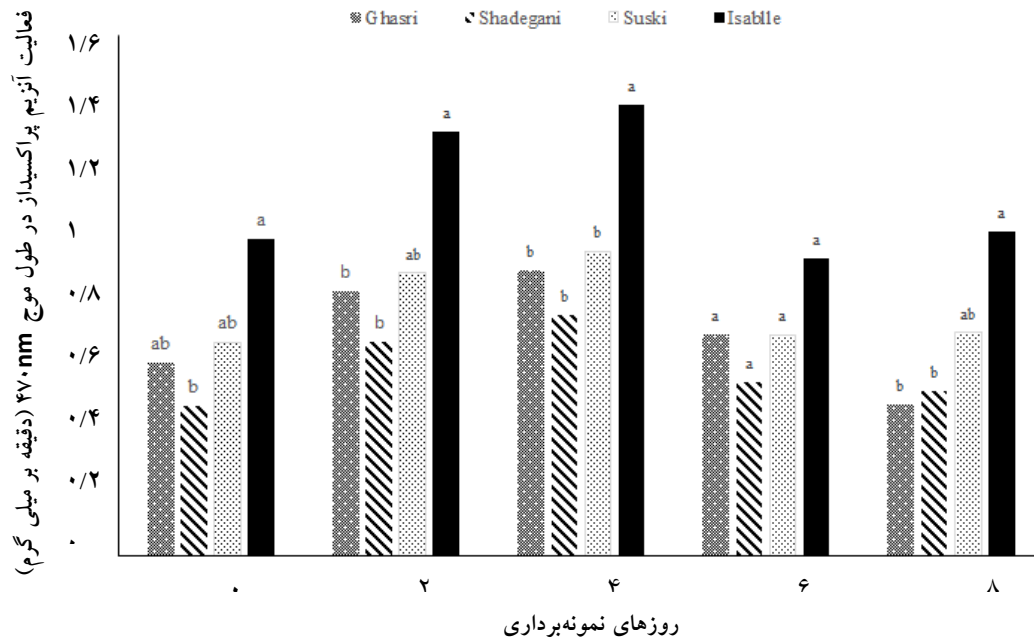


شکل ۱- میانگین شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی در توده‌های مختلف خربزه آلوده به *Fom 1.2*. اعداد نمودار میانگین سه تکرار می‌باشند. شدت بیماری بر اساس جدول ۳ می‌باشد.

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	ضریب تبیین (%)
		پراکسیداز	پلی فنل اکسیداز	فنل کل	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز		
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}	۰/۰۰۰۰۳ ^{ns}	۷/۳۲ ^{**}	۲/۰۶ ^{**}	۸/۷۱ ^{**}	-	-
خطا	۳۰	۰/۰۴۵	۰/۰۰۰۱۳	۰/۷۰۳	۰/۱۸۶	۱/۳۵۶	۳۴	۰/۳۳
		۸۰	۹۰	۹۵	۹۸	۹۸		۷۶

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

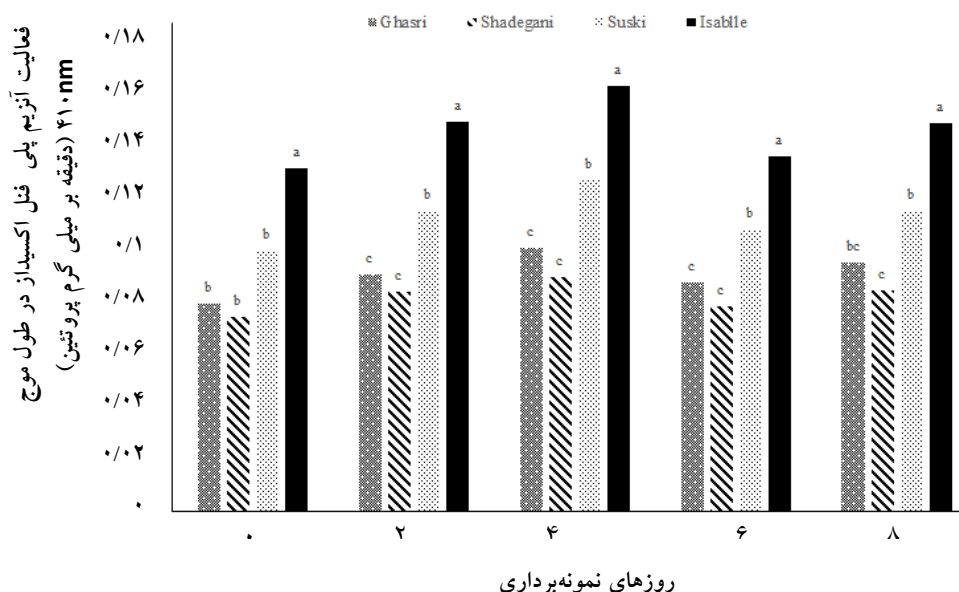


شکل ۲- میانگین میزان پراکسیداز در توده های مختلف خربزه در اثر آلودگی با *Fom 1.2* در روزهای مختلف پس از مایه زنی

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

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

*: مقادیری که دارای دست کم یک حرف مشترک در هر ستون هستند در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

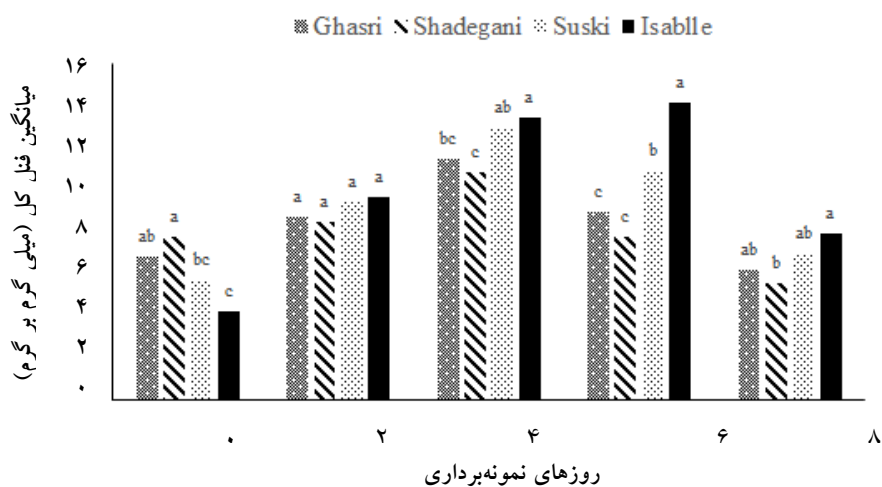


شکل ۳- میانگین میزان پلی فنل اکسیداز در توده‌های مختلف خربزه در اثر آلودگی با *Fom 1.2* در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی

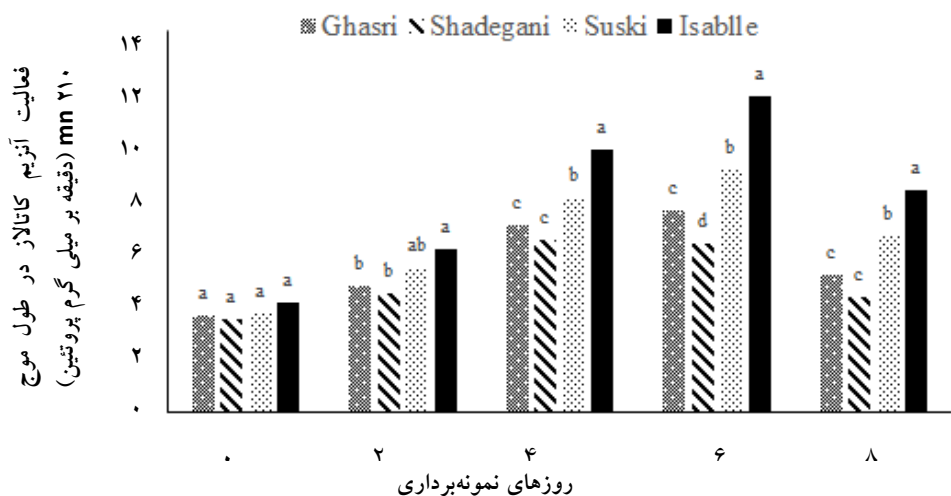
تیمار القا کننده و فعال شدن واکنش‌های دفاعی گیاه، فاصله زمانی ۲۴-۴۸ ساعت وجود دارد. از این رو نمونه برداری‌ها دو روز بعد از مایه‌زنی شروع شد و تا روز هشتم ادامه داشت. در این تحقیق مقدار کل ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به عنوان عوامل اساسی دفاع بیوشیمیایی، در برهمکنش خربزه-فوزاریوم عامل پزمردگی آوندی از طریق اسپکتروفوتومتر 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.

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.

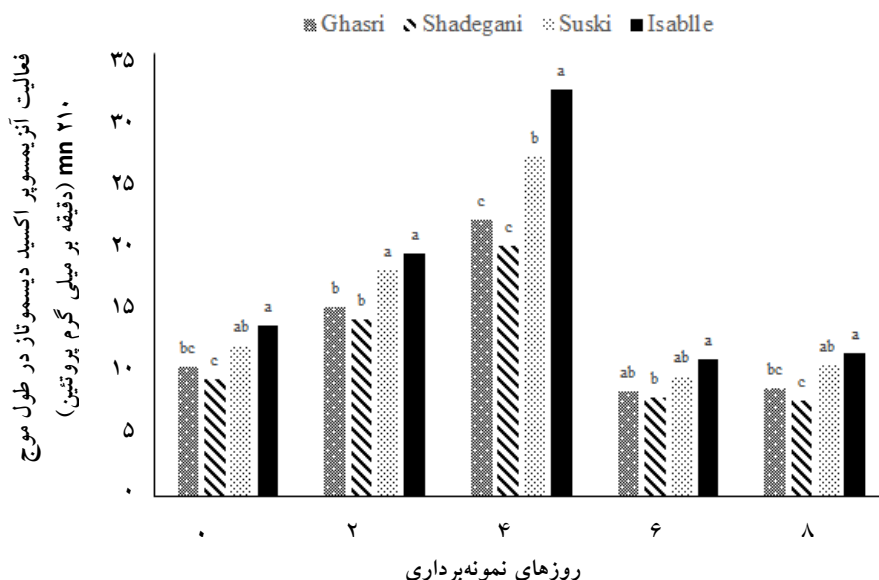
یکی از جنبه‌های مهم دفاعی گیاه میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده آن است (استینر و چونبک ۱۹۹۵). بر طبق آزمایشات گلخانه‌ای، توده‌هایی که بر اساس شدت بیماری آن‌ها مقاوم، نیمه مقاوم، حساس و بسیار حساس به عامل بیماری بودند، جهت بررسی مکانیسم مقاومت انتخاب شدند. طبق بررسی‌های ون‌لون و همکاران (۱۹۹۸) بین



شکل ۴- تغییرات میزان فنل کل (میلی گرم در یک گرم بافت ریشه) در توده های مختلف خربزه مایه زنی شده با *Fom 1.2* در روزهای مختلف پس از مایه زنی.



شکل ۵- میانگین میزان کاتالاز در توده های مختلف خربزه در اثر آلودگی با *Fom 1.2* در روزهای مختلف پس از مایه زنی.



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

پراکسیداز از رشد عامل بیماری‌زا ممانعت به عمل می‌آورد. مقادیر بالای فعالیت پراکسیداز در ارقام مقاوم در مقایسه با ارقام حساس، در موز (آگویار 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

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 اکسید 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

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 بیوشیمیایی 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.

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 و مقاومت 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 کنگد با *Alternaria sesame* باعث تشدید فعالیت آنزیم کاتالاز شد. عبدل مونايم 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

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.
- رافعی 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 Sivasithamparum K, 2000. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 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 de 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 Dezeew 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 (*Glycine 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 cytochemical study of peroxidase, 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 Horticulture, 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.
- Perchepped 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 H₂O₂ 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 fuliginea* 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 Hanifei¹, Hamid Dehghani^{2*} and Rajab Choukan³

¹Former M. Sc. Student, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

²Associate Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

³Professor, 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 of 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 Isabllle 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 Isabllle 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 Isabllle 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.