

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي
خَلَقَ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ
وَالَّذِي يُضَوِّبُ الْمَوْتَى
إِنَّ رَبَّهُ لَسَدِيدٌ
إِلَىٰ عَرْشِهِ الرَّحِيمُ
الَّذِي يُخْرِجُ الْمَوْتَىٰ
وَيُدْخِلُهُمْ فِي الْأَرْوَاحِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي
خَلَقَ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ
وَالَّذِي يُضَوِّبُ الْمَوْتَى
إِنَّ رَبَّهُ لَسَدِيدٌ
إِلَىٰ عَرْشِهِ الرَّحِيمُ
الَّذِي يُخْرِجُ الْمَوْتَىٰ
وَيُدْخِلُهُمْ فِي الْأَرْوَاحِ



دانشکده مهندسی کشاورزی
رشته زراعت گرایش بیوتکنولوژی
پایان نامه کارشناسی ارشد

مطالعه الگوی بیان ژنهای *pgip* در گیاه خیار تحت تیمار با فسفیت پتاسیم

نگارنده: سحر حیدرزاده

اساتید راهنما
دکتر شاهرخ قرنجیک
دکتر علی دهستانی کلاگر

استاد مشاور
مهندس داریوش شهریاری

شهریور ۱۳۹۵

دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

گروه: زراعت

پایان نامه کارشناسی ارشد خاتم سحر حیدرزاده دلاور به شماره دانشجویی: ۹۲۰۵۶۰۴

تحت عنوان: مطالعه الگوی بیان ژنهای *pgip* در گیاه خیار تحت تیمار با فسفیت پتاسیم

در تاریخ ۱۷.۴.۹۵ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد **بسیار تمیز** مورد ارزیابی و با درجه **بسیار عالی** مورد پذیرش قرار گرفته.

اساتید راهنما	امضاء	اساتید مشاور	امضاء
نام و نام خانوادگی: دکتر شاهرخ قرنجیک		نام و نام خانوادگی: مهندس داریوش شهریار	
نام و نام خانوادگی: دکتر علی دهستانی کلاگر		نام و نام خانوادگی:	

اساتید داور	امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء
نام و نام خانوادگی: دکتر پرویز حیدری		نام و نام خانوادگی: دکتر حسن مکاریان	
نام و نام خانوادگی: دکتر مهدیه پارسائیان			

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی
ام است .

به استوارترین تکیه گاهم ، دستان پرمهر پدرم
به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان زلال مادرم
که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی
کران مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم.

امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما
بوسه بر دستان پرمهرتان

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت‌های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از اساتید راهنمای فرهیخته و فرزانه‌ام، جناب آقای دکتر شاهرخ قرنچیک و جناب آقای دکتر علی دهستانی و همچنین استاد مشاور گرامی‌ام جناب آقای مهندس داریوش شهریاری که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی‌های کار ساز و سازنده بارور ساختند؛ تقدیر و تشکر نمایم.

با تقدیر و درود فراوان خدمت پدر و مادر بسیار عزیز، دلسوز و فداکارم که پیوسته جرعه نوش جام تعلیم و تربیت، فضیلت و انسانیت آنها بوده‌ام و همواره چراغ وجودشان روشنگر راه من در سختی‌ها و مشکلات بوده است.

با تشکر خالصانه خدمت مدیریت و کارکنان پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان که این پژوهش با حمایت مالی آنان انجام گردیده و تمام کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده‌اند.

با سپاس بی دریغ خدمت دوستان گران مایه ام خانم‌ها مریم مفید نخعی و سمیرا شعبانی که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری داده‌اند.

تعهد نامه

اینجانب سحر حیدرزاده دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه مطالعه الگوی بیان ژنهای *pgip* در گیاه خیار تحت تیمار با فسفیت پتاسیم، تحت راهنمایی دکتر شاهرخ قرنجیک و دکتر علی دهستانی کلاگر متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood of University » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده:

حمله انواع بیمارگرهای گیاهی از جمله ویروس‌ها، قارچ‌ها، نماتدها و باکتری‌ها به گیاهان و بیماری‌های ناشی از آنها موجب نقصان عملکرد و کیفیت محصولات تولیدی می‌شود. یکی از پاتوژن‌های قارچی که ریشه گیاهان خانواده کدوییان را مورد حمله قرار می‌دهد، قارچ *Fusarium oxysporum* می‌باشد. روش‌های مختلفی برای کنترل این پاتوژن وجود دارد. فسفیت پتاسیم سمی سیستمیک علیه عوامل بیماری‌زای قارچی و باکتریایی خاکزاد و هوازاد می‌باشند که دارای خاصیت پیشگیری، ایمن‌سازی و مداوا کنندگی در گیاه می‌باشد. این تحقیق به منظور بررسی تغییرات رشدی، مورفولوژیکی، آنزیمی، بیوشیمیایی و مولکولی در سطح بیان ژن‌های *pgip1* کیتیناز، دیفنسین و ۳و۱-بتاگلوکاناز گیاه خیار (*Cucumis sativus*) در پاسخ به تنش بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و ساقه خیار (*Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-cucumerinum*) تحت القای فسفیت پتاسیم انجام شد. نتایج نشان داد در مقایسه با گیاهان شاهد، میزان کلروفیل، وزن تر، فعالیت آنزیم‌های دفاعی شامل گایاکول پراکسیداز (GPX)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و متابولیت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در تیمارهای مختلف فسفیت پتاسیم افزایش معنی داری یافته است. بیشترین میزان تجمع آنزیم CAT در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم (KPhi4) در روز پنجم پس از تلقیح با قارچ مشاهده گردید که افزایش ۲/۸۱ برابری در مقایسه با شاهد (گیاه بدون تیمار قارچ) داشت. همچنین بیشترین تجمع آنزیم‌های GPX و SOD به ترتیب با ۲/۲۱ و ۱/۴۵ برابر افزایش نسبت به شاهد، در روز سوم پس از تلقیح با قارچ و در تیمار KPhi4 مشاهده شد. از طرفی میزان تجمع H_2O_2 در بافت‌ها و نیز زمان آن با آنزیم‌های دفاعی CAT، GPX و SOD همخوانی داشته و افزایش آن‌ها با هم متوازن بوده است، درحالی‌که میزان تجمع MDA در تیمار KPhi4 کمتر از سایر تیمارها بوده است که نشان دهنده کاهش صدمه بافتی و کنترل تقریبی بیماری است. همچنین افزایش ۱۶/۳ برابری ژن‌های *pgip1* در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم، ۴۵/۷ برابری ژن‌های دیفنسین در تیمار ۱ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم، ۹۱/۲ برابری ژن‌های کیتیناز در تیمار قارچ و ۴۸/۶ برابری ژن

های ۳،۱-بتاگلوکاناز در تیمارهای قارچ نسبت به کنترل (عدم تلقیح با قارچ و عدم مصرف فسفیت پتاسیم) مشاهده گردید.

کلید واژه: خیار، فسفیت پتاسیم، فوزاریوم اکسیسپوروم، *pgip*، کیتیناز، دیفنسین، ۳،۱-بتاگلوکاناز، بررسی بیان

ژن

(۱) اثر فسفیت پتاسیم بر محتوای کلروفیل و وزن تر گیاهچه‌های خیار تحت تنش *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*، چهارمین کنگره ملی کشاورزی ارگانیک و مرسوم، دانشگاه محقق اردبیلی، ۱۳۹۴/۵/۲۸

(۲) تغییرات در آنزیم‌های دفاعی گیاهان خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم تحت تنش *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*، چهارمین کنگره ملی کشاورزی ارگانیک و مرسوم، دانشگاه محقق اردبیلی، ۱۳۹۴/۵/۲۸

(۳) مطالعه تغییرات آنزیمی و بیوشیمیایی در گیاه خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم تحت تنش قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*، نشریه علوم باغبانی ایران، دانشگاه علوم و مهندسی کشاورزی تهران، ۱۳۹۵/۴/۱۲

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه و کلیات.....	۱
۱-۱ اهمیت گونه خیار (<i>Cucumis sativus</i>) و بیماری‌های آن.....	۴
۲-۱ بیماری‌های قارچی و اهمیت آن‌ها.....	۵
۱-۲-۱ بیماری پژمردگی فوزاریومی (<i>Fusarium oxysporum</i>).....	۶
۳-۱ ساختار دیواره سلولی قارچ.....	۷
۴-۱ مکانیزم‌های دفاعی گیاهان در برابر پاتوژن‌های قارچی.....	۹
۱-۴-۱ مکانیزم‌های دفاعی قبل از حمله پاتوژن.....	۹
۲-۴-۱ مکانیزم‌های دفاعی بعد از نفوذ پاتوژن.....	۱۰
۱-۲-۴-۱ مقاومت سیستمی اکتسابی.....	۱۰
۲-۲-۴-۱ ایجاد واکنش‌های فوق حساسیت.....	۱۰
۳-۲-۴-۱ تولید ترکیبات بیوشیمیایی بازدارنده.....	۱۱
۵-۱ کیتینازهای گیاهی و انواع آن‌ها.....	۱۴
۱-۵-۱ کیتینازهای کلاس ۱.....	۱۴
۲-۵-۱ کیتینازهای کلاس ۲.....	۱۴
۳-۵-۱ کیتینازهای کلاس ۳.....	۱۵
۴-۵-۱ کیتینازهای کلاس ۴.....	۱۵
۵-۵-۱ کیتینازهای کلاس ۵.....	۱۵
۶-۵-۱ کیتینازهای کلاس ۶.....	۱۶
۷-۵-۱ نقش کیتینازها در گیاهان.....	۱۶

۱۸	۶-۱ انواع مختلف پروتئین‌های ممانعت‌کننده از فعالیت پلی‌گالاکتوروناز قارچی (PGIPs).....
۱۸	۱-۶-۱ هوموگالاکتورونان (HGA).....
۱۸	۲-۶-۱ آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز.....
۲۰	۳-۶-۱ پروتئین‌های ممانعت‌کننده از فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز (PGIP).....
۲۰	۱-۳-۶-۱ عملکرد <i>PGIP</i> در دفاع علیه قارچ‌های پاتوژنیک.....
۲۲	۷-۱ تیونین‌ها و دیفنسین‌ها.....
۲۳	۱-۷-۱ نقش دیفنسین‌های گیاهی در دفاع.....
۲۵	۸-۱-۳- β -گلوکاناز.....
۲۶	۱-۸-۱ نقش ۱-۳- β -گلوکاناز گیاهی در دفاع علیه قارچ‌های پاتوژنیک.....
۲۷	۹-۱ فسفونیک اسید.....
۲۷	۱-۹-۱ نقش فسفیت پتاسیم در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی.....
۳۰	۱۰-۱ بررسی بیان ژن.....
۳۰	۱-۱۰-۱ (Reverse Transcription) RT-PCR.....
۳۱	۲-۱۰-۱ Real-Time RT-PCR.....
۳۵	فصل دوم مروری بر منابع.....
۳۶	۱-۲ نقش فسفیت پتاسیم در گیاهان و دفاع علیه قارچ‌های پاتوژنیک.....
۴۰	۲-۲ بیان ژن.....

۴۳	فصل سوم مواد و روش‌ها
۴۴	۱-۳ زمان و موقعیت جغرافیایی محل اجرای آزمایش
۴۴	۲-۳ کاشت مواد گیاهی
۴۵	۳-۳ تهیه تیمارها
۴۵	۱-۳-۳ تهیه زاد مایه قارچ عامل بیماری
۴۶	۲-۳-۳ تهیه ترکیب شیمیایی فسفیت پتاسیم
۴۶	۴-۳ تلقیح مصنوعی گیاهچه‌های خیار با تیمارهای مربوطه
۴۷	۵-۳ اندازه گیری صفات رشدی و فیزیولوژیکی
۴۷	۱-۵-۳ ارزیابی شدت پوسیدگی
۴۸	۲-۵-۳ اندازه گیری میزان کلروفیل برگ
۴۸	۳-۵-۳ اندازه گیری وزن تر ریشه و اندام هوایی
۴۹	۶-۳ نمونه گیری مواد گیاهی برای بررسی آنزیمی و بیوشیمیایی
۴۹	۷-۳ استخراج محلول آنزیمی
۵۰	۸-۳ ثبت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و متابولیت های گیاهی
۵۰	۱-۸-۳ کاتالاز
۵۰	۲-۸-۳ سوپراکسید دیسموتاز
۵۱	۳-۸-۳ پراکسیداز
۵۱	۴-۸-۳ پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دی آلدئید
۵۱	۵-۸-۳ پراکسید هیدروژن (H_2O_2)
۵۲	۹-۳ ارزیابی میزان کل پروتئین محلول و سنجش پروتئین استاندارد

۵۲.....	۱-۹-۳ تهیه منحنی استاندارد
۵۲.....	۱۰-۳ آنالیز داده‌ها.....
۵۳.....	۱۱-۳ نمونه گیری مواد گیاهی برای Real time-PCR
۵۳.....	۱۲-۳ استخراج RNA کل
۵۴.....	۱-۱۲-۳ تیمار RNA با آنزیم DNase
۵۵.....	۲-۱۲-۳ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده.....
۵۵.....	۱-۲-۱۲-۳ الکتروفورز.....
۵۵.....	۲-۲-۱۲-۳ اسپکتروفتومتری
۵۶.....	۱۳-۳ سنتز cDNA.....
۵۷.....	۱۴-۳ طراحی پرایمر.....
۵۸.....	۱۵-۳ انجام Real-Time PCR.....
۵۹.....	۱۶-۳ محاسبه داده‌های Real-time PCR.....
۶۱.....	فصل چهارم نتایج و بحث
۶۲.....	۱-۴ نتایج مورفولوژیکی و زراعی.....
۶۲.....	۱-۱-۴ اثر فسفیت پتاسیم بر خصوصیات مورفولوژیکی در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>
۶۲.....	۱-۱-۱-۴ بررسی تغییرات مقاومت گیاهچه‌های خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم، تحت تنش قارچ <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>
۶۳.....	۲-۱-۱-۴ اثر فسفیت پتاسیم بر محتوای کلروفیل گیاهچه‌های خیار تحت تنش <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>

۳-۱-۱-۴	اثر فسفیت پتاسیم بر وزن تر گیاهچه‌های خیار تحت تنش <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>radicis</i> -	۶۶
	<i>cucumerinum</i>	
۲-۴	بررسی‌های آنزیمی و بیوشیمیایی.....	۶۷
۱-۲-۴	اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ <i>F.</i>	۶۷
	<i>oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	
۱-۱-۲-۴	اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز.....	۶۸
۲-۱-۲-۴	اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز.....	۶۹
۳-۱-۲-۴	اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز.....	۷۰
۴-۱-۲-۴	اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت پراکسید هیدروژن در برگ‌های خیار تیمار شده با قارچ	۷۱
	<i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	
۵-۱-۲-۴	اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دی آلدئید در برگ‌های	۷۲
	خیار تیمار شده با قارچ <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	
۳-۴	بررسی مولکولی.....	۷۳
۱-۳-۴	استخراج RNA از بافت برگ خیار.....	۷۳
۱-۱-۳-۴	بررسی RNA پس از حذف DNA.....	۷۴
۲-۱-۳-۴	انجام PCR با cDNA.....	۷۵
۲-۳-۴	بررسی‌های بیان ژن.....	۷۶
۱-۲-۳-۴	بررسی منحنی‌های ذوب محصولات PCR.....	۷۷
۲-۲-۳-۴	الگوی تظاهر ژن <i>pgip1</i>	۸۰
۳-۲-۳-۴	الگوی تظاهر ژن کیتیناز.....	۸۱
۴-۲-۳-۴	الگوی تظاهر ژن دیفنسین.....	۸۲
۵-۲-۳-۴	الگوی تظاهر ژن ۳،۱-بتاگلوکاناز.....	۸۳

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ ساختمان دیواره *Neurospora crassa* ----- ۸
- شکل ۲-۱ نمایش شماتیک از ساختار عمومی دیواره سلولی قارچ‌ها و موقعیت قرار گیری ترکیبات مختلف سازنده‌ی آن ----- ۸
- شکل ۳-۱ نمایش شماتیک کلاس‌های کیتیناز گیاهی ----- ۱۶
- شکل ۴-۱ عملکرد *PGIP* در دفاع علیه قارچ‌های پاتوژنیک ----- ۲۲
- شکل ۵-۱ نمایش مسیر حرکت فسفیت در آوندهای گیاهی ----- ۲۹
- شکل ۶-۱ مسیر واکنش دفاعی فسفیت علیه بیمار ----- ۲۹
- شکل ۷-۱ منحنی تکثیر فازهای Real time PCR و ----- ۳۳
- شکل ۱-۳ کشت گیاه خیار در گلدان‌های پلاستیکی در شرایط کنترل شده گلخانه ----- ۴۵
- شکل ۲-۳ کشت قارچ *Fusarium. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* ----- ۴۶
- شکل ۳-۴ شدت پوسیدگی در ریشه تیمارهای مختلف گیاهان خیار ----- ۴۷
- شکل ۴-۱- شاخص درصد پوسیدگی ریشه خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم ----- ۶۳
- شکل ۴-۲ تغییرات میزان کلروفیل ----- ۶۵
- شکل ۴-۳ اندازه‌گیری وزن تر ریشه و وزن تر اندام هوایی ----- ۶۶
- شکل ۴-۴ تغییرات میزان آنزیم کاتالاز در بافت‌های گیاهان خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم ----- ۶۸
- شکل ۴-۵ تغییرات میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز در بافت‌های خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم ----- ۶۹
- شکل ۴-۶ تغییرات میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت‌های خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم ----- ۷۰

- شکل ۴-۷ اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در بافت‌های خیار تیمار شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* ----- ۷۱
- شکل ۴-۸ میزان تغییرات مالون دی آلدئید در بافت‌های گیاهان خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم طی روزهای ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* ----- ۷۳
- شکل ۴-۹ نمونه RNA استخراج شده از برخی تیمارها بر روی ژل آگارز ۱ درصد ----- ۷۴
- شکل ۴-۱۰ RNA استخراجی بعد از تیمار با DNAase بر روی ژل آگارز ۱ درصد ----- ۷۵
- شکل ۴-۱۱ محصولات PCR با cDNA حاصل از RNA جدا شده از نمونه گیاهی ----- ۷۵
- شکل ۴-۱۲ منحنی ذوب محصولات PCR ----- ۷۶
- شکل ۴-۱۳ منحنی فلورسانس نمونه‌های cDNA ----- ۷۹
- شکل ۴-۱۴ تغییرات بیان ژن *pgip1* در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تحت تیمار با فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف ----- ۸۱
- شکل ۴-۱۵ تغییرات بیان ژن *chitinase* در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تحت تیمار با فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف ----- ۸۲
- شکل ۴-۱۶ مقایسه میانگین تغییرات بیان ژن *defensin* در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تحت تیمار با فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف ----- ۸۳
- شکل ۴-۱۷ مقایسه میانگین تغییرات بیان ژن ۳،۱-بتاگلوکاناز در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تحت تیمار با فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف ----- ۸۴

فهرست جداول

- جدول ۱-۱ رده بندی علمی و جایگاه خیار-----۵
- جدول ۱-۲ طبقه بندی انواع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی بر اساس ساختار مولکولی، خواص بیولوژیک و نحوه اثر آنها-----۱۳
- جدول ۱-۳ نمونه گیری آنزیم-----۴۹
- جدول ۲-۳ ترکیبات واکنش تیمار RNA با آنزیم DNase-----۵۵
- جدول ۳-۳ ترکیبات واکنش ساخت رشته اول cDNA-----۵۶
- جدول ۳-۴ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی بیان ژن-----۵۸
- جدول ۳-۵ اجزاء مخلوط واکنش Real-time PCR-----۵۹
- جدول ۳-۶ برنامه دمایی Real-time PCR-----۵۹
- جدول ۴-۱ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات صفات درصد پوسیدگی، کلروفیل a، b، a+b، وزن تر ریشه و وزن تر ساقه-----۶۲
- جدول ۴-۲ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات صفات کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید-----۶۷
- جدول ۴-۳ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات بیان ژن-----۷۶

فصل اول

مقدمه و کلیات

حمله انواع پاتوژن‌های گیاهی از جمله ویروس‌ها، قارچ‌ها، نماتدها و باکتری‌ها به گیاهان و بیماری‌های ناشی از آنها موجب نقصان عملکرد و کیفیت محصولات تولیدی می‌شود. امروزه کنترل بیماری‌های گیاهی یکی از اهداف مهم سیستم‌های کشاورزی پیشرفته است تا حجم بالای خسارت به محصولات، چه در زمان رشد در مزرعه و چه پس از برداشت اجتناب شود. از جمله یکی از راهکارهای افزایش تولید محصولات زراعی و تامین امنیت غذایی جمعیت رو به رشد جهان، کاهش خسارات ناشی از آفات و بیماری‌های گیاهی می‌باشد. روش‌های مختلفی برای کنترل این پاتوژن‌ها از جمله پاتوژن‌های قارچی وجود دارد. اولین استراتژی دفاعی تقویت دیواره سلولی از طریق چوبی شدن و مومی شدن اپیدرم دیواره سلولی است که سد مناسبی را جهت جلوگیری از ورود پاتوژن به بافت گیاهی فراهم می‌سازد (Bowles, 1990). زمانیکه پاتوژن‌ها موفق به شکست این سد دفاعی شدند، گیاه استراتژی دفاعی دوم را بکار می‌برد. این استراتژی شامل تولید مقادیر بالایی از ترکیبات ضد میکروبی است تا از رشد پاتوژن جلوگیری نماید. این ترکیبات عمدتاً جزء گروهی از پروتئین‌های ایجاد مقاومت به پاتوژن‌ها یا PR^۱ پروتئین‌ها می‌باشند. پروتئین‌های PR ترکیبات پروتئینی هستند که توسط گیاه میزبان در پاسخ به حمله عوامل بیماری‌زا یا تنش‌های محیطی تولید می‌شوند (Van loon and Van strien, 1999). این پروتئین‌ها معمولاً به طور سیستمیک در گیاه تولید می‌شوند و سبب پدیده SAR^۲ می‌گردند در نتیجه آلودگی‌های بعدی تولید شده توسط قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها کنترل می‌شود (Odjakova and Hadjiivanova, 2001). در حال حاضر ۱۷ خانواده از این پروتئین‌ها که شامل PGIP_s، کتینازها، گلوکونازها، دیفنسین‌ها و غیره می‌باشند، شناسایی شده است.

^۱-Pathogenesis-related proteins

^۲-Systemic acquired resistance

خانواده کدویان شامل گونه‌های قابل کشت و مهم اقتصادی مانند: هندوانه (*Citrullus lanatus*)، خربزه (*Cucumis melo*)، خیار (*Cucumis sativus*) و کدو می‌باشد. خیار (*Cucumis sativus*) یکی از محصولات با ارزش در اکثر کشورهای جهان می‌باشد. فسفیت‌ها ترکیباتی با فرمول شیمیایی $(\text{H}_2\text{PO}_3^-)$ هستند که از لحاظ تعداد اکسیژن و هیدروژن با فسفات (HPO_4^{2-}) کاملاً متمایز می‌باشند. فسفیت به علت دارا بودن یک اکسیژن کمتر از فسفات، سرعت حرکت آن بسیار بیشتر بوده و طی مدت زمان کوتاهی، در سرتاسر اندام گیاهی انتشار می‌یابد و علاوه بر تحریک رشد رویشی و زایشی گیاه منجر به کنترل طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زای قارچی می‌گردد. در اوایل ۱۹۹۰ میلادی دانشمندان فسفونات را ترکیبی با قابلیت قارچ‌کشی قوی و کودی با تاثیرگذاری فوق العاده تولید و ترویج نمودند. هدف از این مطالعه بررسی الگوی بیان ژن‌های *pgip1* کیتیناز، دیفنسین و بتاگلوکاناز در گیاه خیار می‌باشد تا در آینده بتوان با تغییراتی در بیان این ژن‌ها مقاومت سیستمیک گیاه را در برابر پاتوژن‌ها افزایش داد و از مصرف سموم تا حد امکان بکاهیم که این امر هم از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است و هم از لحاظ زیست محیطی حائز اهمیت می‌باشد. برای این منظور از نمونه‌های برگ گیاه خیار استخراج RNA و سپس سنتز cDNA صورت خواهد گرفت و الگوی بیان ژن‌ها از طریق روش Real time PCR در دو شرایط مصرف و عدم مصرف فسفیت پتاسیم مورد بررسی قرار گرفت.

کلیات:

۱-۱ اهمیت گونه خیار (*Cucumis sativus*) و بیماری‌های آن

گیاهان جالیزی نقش مهمی در زراعت صیفی و درآمد ملی کشور دارند (پوستچی، ۱۳۵۰). سطح زیر کشت کدوئیان بیش از ۵۰ درصد سطح زیر کشت سبزیجات در کشور می‌باشد. گونه خیار به احتمال قوی خیار بومی آسیا و آفریقا می‌باشد. شواهد موجود نشان می‌دهد که کاشت خیار در قسمت غربی آسیا در سه هزار سال پیش انجام می‌گرفته است. بطور مسلم خیار در ایران حداقل ۱۰۰۰ سال پیش از میلاد وجود داشته است. طبق آمار فائو سطح زیر کشت جهانی این محصول در سال ۲۰۰۵، ۲۴۸۸۶۰۰ هکتار با عملکرد متوسط ۱۶/۷ تن درهکتار و تولید ۴۱۷۴۳۸۴۰ تن می‌باشد که بالاترین تولید، متعلق به کشور چین با ۲۶۵۵۹۶۰۰ تن (۶۳/۵٪) است که از سطحی معادل ۱۵۵۳۱۰۰ هکتار بدست می‌آید. متوسط عملکرد این کشور ۱۷/۱ تن در هکتار می‌باشد. ایران با تولید ۱۴۰۰۰۰۰ تن حدود ۳/۳٪ از تولید را در اختیار داشته که از سطحی معادل ۸۰۰۰۰ هکتار بدست می‌آید (سازمان جهاد کشاورزی ۱۳۹۲). کل تولید خیار در کشور ۱۷۱۵۰۲۴ تن و استان‌های مهم تولیدکننده منطقه جیرفت، کهنوج، لرستان، خوزستان و ایلام می‌باشند. منطقه جیرفت و کهنوج ۲۶٪ از تولید کشور را در اختیار دارند. خیار گیاهی یکساله و از جنس *Cucumis* با $2n=2x=14$ کروموزوم می‌باشد. ریشه خیار سطحی و گسترده است و ساقه‌های خیار خزنده و کرکدار بوده که در مقطع زاویه دار است. برگ‌ها نسبتاً پهن هستند و گل‌ها پنج قسمتی به رنگ زرد می‌باشند (پیوست، ۱۳۸۴). خیار غنی از ویتامین‌های B و C و مواد معدنی از جمله کلسیم، فسفر، آهن و پتاسیم می‌باشد. خیار معمولاً دارای عادت رشد خزنده یا بالارونده است. جوانه زنی بذر در دماهای ۲۸-۲۹ درجه سانتیگراد، در مدت ۲-۳ روز صورت می‌گیرد. روش کشت مستقیم بذر در مزرعه مرسوم است و گیاهان به ندرت نشا می‌شوند (حسن‌دخت، ۱۳۹۱). بیماری‌های عمده‌ی خیار

عبارتند از: موزاییک خیار، سفیدک دروغین، سفیدک حقیقی، آنتراکنوز، گموز خیار، پژمردگی باکتریایی و بوته میری. همانطور که ملاحظه شد، قارچها نقش مهمی در ایجاد بیماریهای خیار بر عهده دارند که هر ساله باعث ضرر و زیان گلخانه داران می‌شود.



ساقه کرکدار خیار



گل خیار



میوه خیار

جدول ۱-۱ رده بندی علمی و جایگاه خیار

Plantae (گیاهان)	Kingdom (سلسله)
Angiosperms (نهاندانگان)	Division (بخش)
Dicotyledons (دولپه‌ای)	Class (رده)
Cucurbitaceae (کدوسانان)	Order (راسته)
Cucurbitaceae (کدوییان)	Family (تیره)
Cucumis (خیار)	Genus (جنس)
C.sativus	Species (گونه)
Cucumis sativus	Common Name (نام معمول)

۲-۱ بیماری‌های قارچی و اهمیت آن‌ها:

اهمیت بیماری‌های گیاهی ناشی از خساراتی است که این بیماری‌ها با بروز اپیدمی و یا خسارات معمولی به گیاهان و محصولات آنها وارد می‌سازند (الهی نیا، ۱۳۸۴). از میان پاتوژن‌های گیاهی مختلف، قارچها از اهمیت خاصی برخوردارند. پراکندگی جغرافیایی زیاد و سازگاری به دامنه وسیعی از

شرایط زیستی، تنوع ژنتیکی بالا در سویه‌های بیماریزا، طیف وسیع بیماریزایی روی گونه‌های گیاهی مختلف و سرعت زیاد رشد و تکثیر و سرعت همه گیری موجب شده مبارزه با قارچ‌های بیماریزای گیاهی دشوار و هزینه‌بر باشد (Agrios, 2005). البته گیاهان به طور طبیعی دارای سازوکارهای مختلفی برای مقاومت در برابر قارچ‌ها و کاهش خسارت ناشی از آنها هستند که در طول مراحل تکاملی آنها تقویت شده اند (Punja, 2006). کنترل و مبارزه با پاتوژن‌های قارچی به دلیل توانایی آنها در تطابق با شرایط محیطی مختلف، وجود مکانیسم‌های کارای تولید مثل، تنوع ژنتیکی بالا، حفظ نسل در شرایط نامساعد، وجود نژادهای بیماریزای مختلف، روش‌های موثر انتشار و سرعت رشد و گسترش، بسیار مشکل می‌باشد. شناخت بهتر فیزیولوژی و ساختار قارچ‌ها برای فهم دقیق‌تر سیستم‌های دفاعی گیاه، چگونگی نفوذ پاتوژن و ایجاد آلودگی ضروری می‌باشد.

۱-۲-۱ بیماری پژمردگی فوزاریومی (*Fusarium oxysporum*):

پژمردگی ناشی از فوزاریوم در مناطق گرمسیر و خاک‌های سبک بیشتر متداول است. علائم ناشی از بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه فوزاریومی در گیاهان مختلف بسته به میزبان آلودگی، متفاوت است. خیار در تمام مراحل رشدی خود به این بیماری آلوده می‌شود. در خاک‌های آلوده و سرد، مرگ گیاهچه قبل از سبز شدن یا بلافاصله پس از سبز شدن اتفاق می‌افتد. در این مرحله ممکن است نشانه‌های بیماری با سایر قارچ‌های بیماریزا اشتباه گرفته شود. موقعی که بوته‌های جوان مورد حمله قرار می‌گیرند، پوسیدگی محور زیر لپه و مرگ گیاهچه (Damping-off) ممکن است رخ دهد. بوته‌های جوان به کندی رشد می‌کنند و کوچک باقی می‌مانند. گیاه مسن در ابتدای مراحل آلودگی پژمرده شده و گاه گاهی در شب دوباره به حالت عادی باز می‌گردد، اما معمولاً به سرعت پژمرده شده و می‌میرد. گاهی اوقات پژمردگی از یک طرف ساقه رونده شروع و با مرگ کامل بوته خاتمه می‌پذیرد. پژمردگی یک طرفه این قارچ را از سایر عوامل مانند *Pythium* و *Phytophthora* متمایز می‌سازد. در قسمت

داخلی ساقه‌های پژمرده شده در محل بافت آوندی تغییر رنگ مشاهده می‌شود. در مراحل قبل از ظاهر شدن گل‌ها، بیماری سبب زردی و خشکیدن برگ‌های تعدادی از ساقه‌ها می‌شود. از نشانه‌های این بیماری، خروج مواد ترش‌حی به رنگ قهوه‌ای متمایل به نارنجی از ساقه است. در شرایط مرطوب بافت قارچ به رنگ سفید یا صورتی در سطح بافت مرده به وجود می‌آید. در مراحل پیشرفته بیماری، ریشه ممکن است متلاشی شود. گیاهان مقاوم ممکن است آلوده شده و به کندی رشد کنند و کوتوله باقی بمانند. اساساً در پژمردگی بوته‌ها بوسیله قارچ فوزاریوم حداقل سه ماده سمی به نام‌های اسید فوزاریک^۱، اسید دی‌هیدروفوزاریک^۲ و مایکوماراسمین نقش دارند. این سموم فلزات سنگین مانند مس و آهن را به خود می‌گیرند و اختلالاتی در فعالیت کوآنزیم‌ها و اعمال متابولیسم سلول‌ها ایجاد می‌نمایند. علاوه بر سموم فوق، قارچ، آنزیم‌های پکتولیتیک^۳ و سلولولیتیک^۴ ترشح می‌کند که در ضعیف کردن دیواره آوندها و درهم ریختن آنها موثر هستند (اله‌نی، ۱۳۷۵).

۳-۱ ساختار دیواره سلولی قارچ

دیواره سلولی قارچها به طور کلی از پلی ساکاریدها (۸۰٪)، پروتئین‌ها (۲۰-۳٪)، لیپیدها، پیگمانها و نمک‌های غیرمعدنی در مقادیر اندک تشکیل شده است. دیواره قارچها علاوه بر محصور کردن پروتوپلاست و حفظ شکل کلی قارچ، در کنترل ورود و خروج مولکولها و حفاظت از قارچ در برابر تنش‌های اسمزی نقش دارد. از سوی دیگر، در صورت داشتن رنگدانه ملانین، میتواند قارچ را از گزند اشعه ماوراء بنفش حفظ کند. این دیواره همچنین محل استقرار گیرنده‌های آنزیمها و ساختارهای

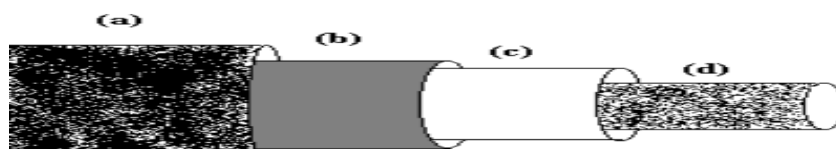
^۱ - Fusaric acid

^۲ - Dihydro Fusaric acid

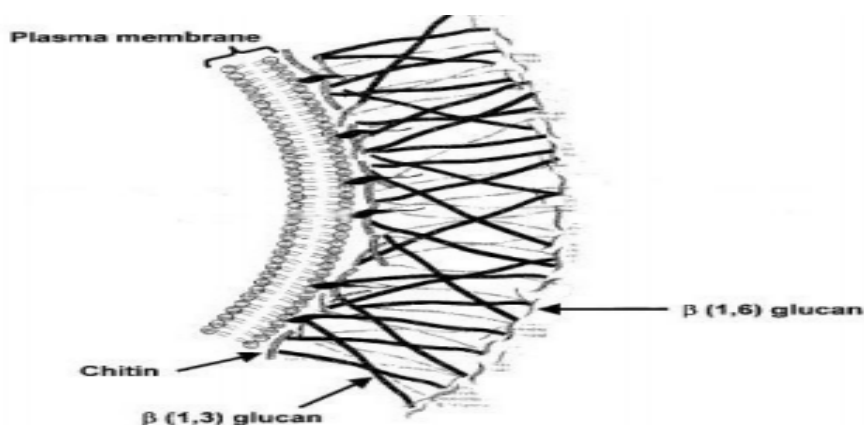
^۳ - pectolytic

^۴ - Cellulolytic

دیگری است که پیام محیط را به قارچ انتقال می‌دهند (Deacon, 1997). مطالعه ساختار دیواره قارچ *Neurospora crassa* از شاخه Ascomycota نشان می‌دهد که ترکیبات سازنده دیواره کم و بیش در چهار لایه متمرکز شده‌اند (شکل ۱-۱ و ۱-۲). در لایه نخست که خارجی‌ترین لایه دیواره را تشکیل می‌دهد، مولکول‌های بی‌شکل گلوکان قرار می‌گیرند. در زیر این لایه شبکه‌ای از گلیکوپروتئین دیده می‌شود که در ماتریسی پروتئینی محصور شده است و پس از لایه سوم که عمدتاً از پروتئین ساخته شده است، در درونی‌ترین لایه میکروفیبریل‌های کیتین مشاهده می‌شوند که در ماتریسی پروتئینی جای گرفته‌اند. مطالعه ساختمان دیواره در سایر قارچ‌ها نشان می‌دهد که تقریباً، الگوی کلی ساختمان دیواره، در رده‌های مختلف قارچ‌های کیتین‌دار مشابه بوده و تنها نسبت ترکیبات تغییر می‌کند (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱ ساختمان دیواره *Neurospora crassa*: (a) رشته‌های بی‌شکل گلوکان، (b) شبکه گلیکوپروتئینی، (c) لایه پروتئینی و (d) میکروفیبریل‌های کیتین به ترتیب از خارج به داخل قرار گرفته‌اند (Deacon, 1997).



شکل ۱-۲ نمایش شماتیک از ساختار عمومی دیواره سلولی قارچ‌ها و موقعیت قرارگیری ترکیبات مختلف سازنده آن (Ovidio et al., 2004).

۴-۱ مکانیزم‌های دفاعی گیاهان در برابر پاتوژن‌های قارچی

فرآیند آلوده سازی گیاه توسط پاتوژن‌های قارچی همواره با مکانیزم‌های دفاعی گیاه پاسخ داده می‌شود. در گونه‌های گیاهی روش‌های دفاعی متفاوتی در برابر حمله پاتوژن بکار گرفته می‌شوند؛ که ساختار خاص بافتها و اندامهای گیاهی، تغییرات تکاملی مورفولوژیک^۱، عدم تقارن دوره رشدی گیاه با اوج پراکنش پاتوژن‌ها و تولید ترکیبات بیوشیمیایی مختلف با فعالیت بازدارندگی ضد پاتوژن‌ها از جمله این سازوکارها می‌باشند (Kombrink and Somssich, 1995). مکانیزم‌های دفاعی گیاهان به دو دسته تقسیم می‌شوند:

۱-۴-۱ مکانیزم‌های دفاعی قبل از حمله پاتوژن

مکانیزم‌هایی هستند که قبل از حمله پاتوژن وجود داشته و از نفوذ و بیماریزایی آن جلوگیری میکنند. دیواره سلولی، پوشش اپیدرمی و کوتیکولی^۲ بافتها، مواد عمومی شیمیایی ضد پاتوژن مثل گلوکوزیدها^۳ و ساپونینها^۴، پروتئین‌های ضد پاتوژن، ترکیبات بازدارنده آنزیم‌های پاتوژن و غیرفعال کننده سموم آنها و گیرنده‌های تشخیص حمله و تحریک سیستم دفاعی گیاه از مهمترین مکانیزم‌های دفاعی قبل از حمله پاتوژن می‌باشند (Kombrink and Somssich, 1995).

^۱ - Morphologic evolution

^۲ - Cuticle and Epiderm

^۳ - Glucosides

^۴ - Saponins

۱-۴-۲ مکانیزم‌های دفاعی بعد از نفوذ پاتوژن

این مکانیزم‌های دفاعی در صورت نفوذ پاتوژن و شروع فرآیند بیماریزایی می‌توانند میزان خسارت را کاهش داده و از گسترش بیماری جلوگیری کنند. ایجاد واکنش‌های فوق حساسیت (^۱HR)، مقاومت سیستمی اکتسابی (^۲SAR) و تولید ترکیبات بیوشیمیایی بازدارنده از جمله مهمترین این مکانیزم‌ها هستند. هر کدام از این سیستم‌های دفاعی در زیر مختصراً توضیح داده می‌شوند.

۱-۲-۴-۱ مقاومت سیستمی اکتسابی

نوعی واکنش دفاعی در کل گیاه است که پس از آلودگی با یک پاتوژن در گیاه ایجاد میشود. مقاومت سیستمی اکتسابی توسط آلودگی‌های پاتوژنی مختلف بخصوص آنهایی که موجب نکروزه شدن بافت می‌شوند ایجاد شده و مقاومت حاصله در برابر دامنه وسیعی از پاتوژن‌ها کارایی خواهد داشت، از این رو آن را مقاومتی با دامنه وسیع ^۳ می‌دانند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که تحریک تولید ترکیبات دفاعی مختلف بخصوص پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی توسط پاتوژن و تجمع آنها در بافتهای گیاه دلیل ایجاد مقاومت عمومی می‌باشد (Ward et al., 1991).

۱-۴-۲-۲ ایجاد واکنش‌های فوق حساسیت

گاهی با حمله پاتوژن و ایجاد مراحل اولیه آلودگی، سلول‌های سالمی که در اطراف ناحیه آلوده وجود دارند سریعاً نکروزه شده و از بین می‌روند. این مرگ سریع سلولهای بافت آلوده موجب جلوگیری از

^۱ - Hypersensitive Reaction

^۲ - Systemic Acquired Resistance

^۳ - Broad spectrum

گسترش آلودگی و سرایت آن به سایر نقاط می‌شود. این نوع مکانیزم دفاعی مقاومت فوق حساسیت نامیده می‌شود که با تحریک تعدادی از ژن‌های دفاعی گیاه انجام می‌شود (Kombrink and Schmelzer, 2001).

۱-۴-۲-۳ تولید ترکیبات بیوشیمیایی بازدارنده

تولید ترکیبات شیمیایی مختلف که در فرآیندهای اعلام هشدار، ایجاد علائم شروع کننده چرخه‌های دفاعی و تجزیه ساختارهای پاتوژن نقش دارند، از مهمترین راهکارهای گیاهان برای مقاومت در برابر پاتوژنهای قارچی میباشد. این ترکیبات بسیار متنوع بوده و تقریباً در تمام گیاهان عالی تولید می‌شوند که در ذیل دو گروه ترکیبات هشداردهنده و محرک سیستم دفاعی و ترکیبات با اثر بازدارندگی مستقیم بطور خلاصه توضیح داده می‌شوند.

الف- ترکیبات محرک رهاسازی علائم تنظیمی دفاعی گیاه

پراکسید هیدروژن، اسید سالیسیلیک، اتیلن و اسید جاسمونیک از جمله این محرک‌های دفاعی می‌باشند که در مراحل اولیه واکنش گیاه به آلودگی تولید شده و موجب تحریک کل سیستم دفاعی گیاه میشوند. پراکسید هیدروژن در پاسخ سلول‌های گیاهی به آلودگی تولید شده و به طور مستقیم از رشد پاتوژن جلوگیری می‌کند. اسیدسالیسیلیک ترکیبی علامت دهنده برای فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی گیاه در مقابل آلودگی پاتوژن می‌باشد که به عنوان محرک مقاومت سیستمی اکتسابی (SAR) عمل می‌کند. اتیلن و اسید جاسمونیک احتمالاً ترکیبات علامت دهنده‌ای هستند که پس از حمله پاتوژن‌ها و به طور مستقل از پاسخ‌های مربوط به اسید سالیسیلیک عمل می‌نمایند. گیاهان جهش یافته‌ای که به اتیلن یا اسیدجاسمونیک واکنش نشان نمی‌دهند، نسبت به قارچ‌های آلوده کننده ریشه یا شاخه و برگ حساس‌تر هستند.

ب- محصولات ژنی با اثر بازدارندگی مستقیم روی رشد پاتوژن

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی یا PRP^۱ها مهمترین ترکیبات این گروه هستند که قبل، حین و یا بعد از حمله پاتوژن در پیشگیری، کنترل و یا تخفیف صدمات موثرند. این پروتئین‌ها اولین بار در گیاهان توتونی که به صورت شدید در برابر آلودگی با ویروس موزائیک توتون^۲ واکنش فوق حساسیت نشان می‌دادند شناسایی شده و از این رو پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی نامیده شدند. تحقیقات بعدی نشان داد که این ترکیبات بسیار متنوع بوده و در اثر حمله پاتوژن‌های مختلف، ترکیبات بیوشیمیایی داخلی گیاه مانند اسید سالیسیلیک، ایجاد زخم و همچنین تنش‌های محیطی تولید می‌شوند (Theis and Stahl, 2004). این ترکیبات بر اساس ساختار مولکولی، خواص بیولوژیک و نحوه اثر در 17 گروه تقسیم بندی می‌شوند (جدول ۱-۲).

^۱-Pathogenesis-related protein

^۲-Tobacco Mosaic Virus

جدول ۱-۲ طبقه بندی انواع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی بر اساس ساختار مولکولی، خواص بیولوژیک و نحوه اثر آنها (Van loon and Van strien, 1999).

شماره خانواده	نوع پروتئین دفاعی	محل اثر
PR-1	پروتئین‌های اولیه ضد قارچی	غشاء پلاسمایی
PR-2	۱.۳-β-گلوکاناز	گلوکان دیواره سلولی
PR-3	اندوکیتیناز (کلاس‌های ۱، ۲، ۴، ۶ و ۷)	کیتین دیواره سلولی
PR-4	اندوکیتیناز (پروهاوئین)	کیتین دیواره سلولی
PR-5	اسموتین و پروتئین‌های شبه تاوماتینی (TLP)	غشاء پلاسمایی
PR-6	بازدارنده پروتئیناز	پروتئین‌های پاتوژن
PR-7	پروتئیناز	نامشخص
PR-8	اندوکیتیناز (کلاس ۳)	کیتین دیواره سلولی
PR-9	پراکسیداز	تحریک سیستم دفاعی
PR-10	RNase	پاتوژن RNA
PR-11	اندوکیتیناز (کلاس ۵)	کیتین دیواره سلولی
PR-12	دیفنسین	غشاء پلاسمایی
PR-13	تیونین	غشاء پلاسمایی
PR-14	پروتئین‌های انتقال لیپید (LTP)	لیپیدها
PR-15	اگزالات-اکسیداز	غشاء پلاسمایی
PR-16	پروتئین‌های شبه اگزالات-اکسیداز	غشاء پلاسمایی
PR-17	نامشخص	نامشخص

به دلیل اهمیت ویژه *pgip*ها، کیتینازها، دیفنسین‌ها و بتاگلوکانازها در سیستم دفاعی گیاهان و ارتباط مستقیم با موضوع این پژوهش انواع، نقش و مکانیزم عمل آنها با تفصیل بیشتری توضیح داده می‌شود.

۱-۵- کیتینازهای گیاهی و انواع آن‌ها

با توجه به اینکه کیتین در گیاهان عالی وجود ندارد بررسی‌ها نشان می‌دهد که حضور آنزیم‌های کیتیناز، در گیاهان، بخشی از پاسخ ایمنی گیاه در مواجهه با عوامل بیماریزای کیتین‌دار است (Graham and Sticklen, 1994 & Botha et al., 1998) و از آنجا که تولید این آنزیم‌ها با هجوم عوامل بیماریزای قارچی و حشرات، افزایش می‌یابد، آنها را پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی می‌نامند (Schlumbaum et al., 1986). آنزیم‌های کیتیناز گیاهی را برحسب تشابه در توالی اسیدهای آمینه، دامنه‌های ژنی، مکان جاگیری آنزیم در سلولها و بافتها و سایر خصوصیات در شش دسته تقسیم بندی می‌کنند. این شش کلاس، خود در دو خانواده ۱۸ و ۱۹ از گلیکوزیل هیدرولازها (Glycosyl hydrolases) قرار می‌گیرند. خصوصیات این شش کلاس به طور خلاصه در زیر آورده شده است (Kasprzewska, 2003 & Collinge et al., 1993).

۱-۵-۱ کیتینازهای کلاس ۱

کیتینازهای این کلاس دارای دامنه‌های ژنی مختلف شامل یک توالی پپتیدی نشانه (SP)، دامنه اتصال به کیتین (CBD)، ناحیه حد فاصل دامنه‌ها (HR)، ناحیه کاتالیتیک و یک توالی اضافه در انتهای کربوکسیلی (CTE) هستند. کیتینازهای کلاس ۱ خود به دو زیرکلاس a و b تقسیم می‌شوند که تفاوت آنها در حذف ناحیه CTE در زیرکلاس b می‌باشد. این توالی شش تایی از اسیدهای آمینه در انتهای کربوکسیلی موجب هدایت و ذخیره پروتئین کیتینازی در واکوئل می‌شود. ناحیه کاتالیتیک کیتینازهای کلاس ۱ به خانواده ۱۹ گلیکوزیل هیدرولازها تعلق دارد. این کلاس نیز به گروه ۳ پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR-3) تعلق دارد.

۱-۵-۲ کیتینازهای کلاس ۲

ناحیه کاتالیتیک این کلاس مشابه کلاس ۱ بوده اما ناحیه اتصال کیتین (CBD) و ناحیه میانی (HR) در آنها وجود ندارد. این کیتینازها بیشتر در عصاره بین سلولی دیده می‌شوند که بیانگر جایگیری و ذخیره

آنها در فضای آپوپلاستی می‌باشد. این کلاس نیز به دو زیر گروه a و b تقسیم می‌شود که زیر کلاس a دارای حذف شدگی‌هایی در ناحیه کاتالیتیک می‌باشد. ناحیه کاتالیتیک کیتینازهای این کلاس به خانواده ۱۹ گلیکوزیل هیدرولازها تعلق داشته و جزء گروه PR-3 هستند.

۱-۵-۳ کیتینازهای کلاس ۳

کیتینازهایی با فعالیت دوگانه کیتینازی-لیزوزایمی هستند و از نظر توالی و ساختار با سایر کلاس‌ها مشابهتی ندارند. کیتینازهای این کلاس در عصاره بین سلولی و خارج سلولی وجود دارند. این کیتینازها فاقد دامنه اتصال به کیتین بوده و از نظر توالی با کیتینازهای مخمرها مشابهت‌های زیادی دارند. ناحیه کاتالیتیک کیتینازهای این کلاس به خانواده ۱۸ گلیکوزیل هیدرولازها تعلق دارد. این کلاس نیز در گروه ۸ پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR-8) طبقه بندی می‌شوند.

۱-۵-۴ کیتینازهای کلاس ۴

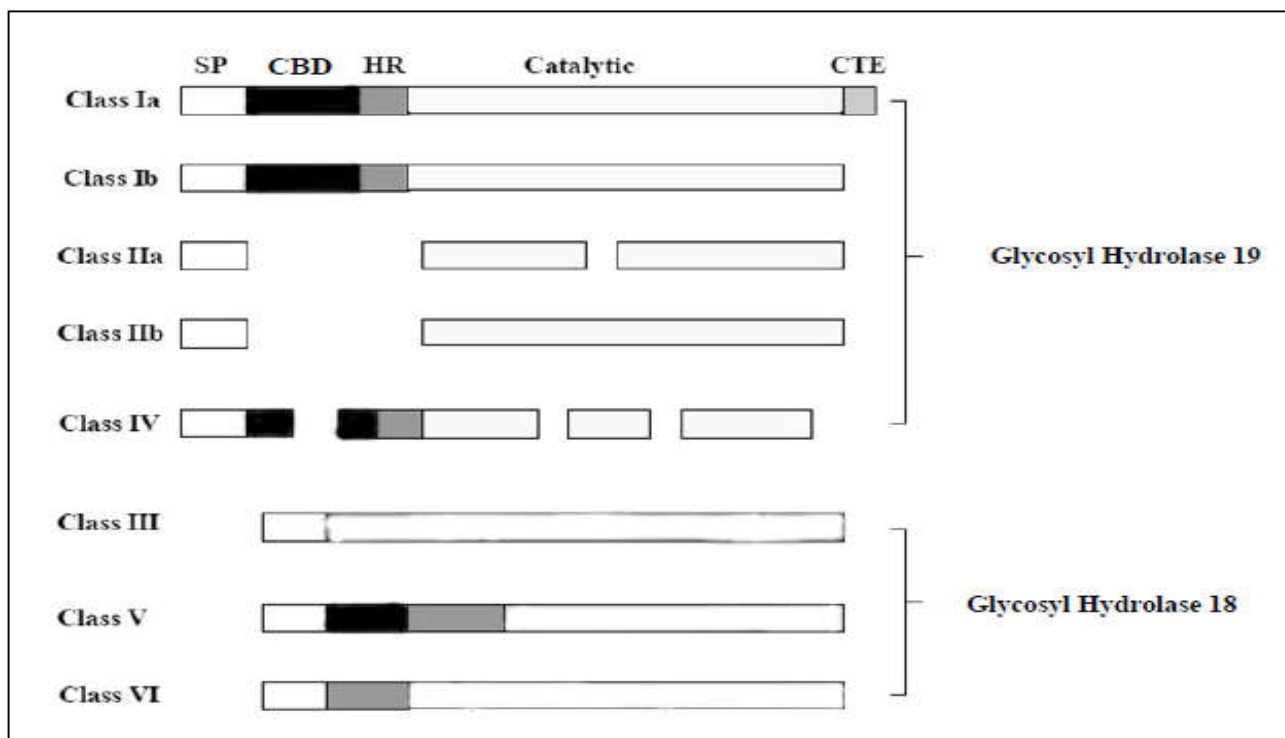
کیتینازهای کلاس ۴ دارای دامنه‌های اتصال به کیتین و ساختار کلی مشابه کیتینازهای کلاس ۱ بوده اما به دلیل چند حذف شدگی در توالی، از کیتینازهای کلاس ۱ کوچکتر هستند. همچنین ناحیه کاتالیتیک آنها نیز مشابهت‌هایی با ناحیه کاتالیتیک کیتینازهای کلاس ۲ نشان می‌دهند. ناحیه کاتالیتیک کیتینازهای این کلاس به خانواده ۱۹ گلیکوزیل هیدرولازها تعلق دارد. این کلاس نیز در گروه ۳ پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR-3) طبقه بندی می‌شوند.

۱-۵-۵ کیتینازهای کلاس ۵

این کیتینازها از نظر ساختاری با کلاس‌های ۱، ۲ و ۴ تفاوت داشته اما با اگزوکیتینازهای باکتریایی کلاس ۳ مشابهت‌هایی دارند. ناحیه کاتالیتیک کیتینازهای این کلاس به خانواده ۱۸ گلیکوزیل هیدرولازها تعلق دارد. این کلاس در گروه ۱۱ پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR11) طبقه بندی می‌شود.

۱-۵-۶ کیتینازهای کلاس ۶

کیتینازهای این کلاس نیز همانند کلاس ۵ مشابهتی با کلاس‌های ۱، ۲ و ۴ ندارند و مشابه اگزوکیتینازهای باکتریایی کلاس ۳ می‌باشند (Menis, 1994). ناحیه کاتالیتیک کیتینازهای این کلاس به خانواده ۱۸ گلیکوزیل هیدرولازها تعلق دارد و در گروه ۳ پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی قرار دارد.



شکل ۱-۳ نمایش شماتیک کلاس‌های کیتیناز گیاهی. SP: پپتید نشانه، CBD: دامنه اتصال به کیتین، HR: ناحیه حد فاصل دامنه‌ها، Catalytic: ناحیه کاتالیتیک، CTE: توالی انتهای کربوکسیلی. نواحی از نوارها که منقطع هستند بیانگر حذف شدگی‌ها هستند (Kasprzewska, 2003).

۱-۵-۷ نقش کیتینازها در گیاهان

نتایج تحقیقات اولیه نشان دهنده نقش مهم کیتینازها در سیستم دفاعی گیاه بود. در گیاهان سالم نیز همواره مقادیری از انواع کیتینازها در بافت‌های مختلف وجود دارند که با حمله پاتوژن‌های مختلف میزان تولید و تجمع کیتینازها افزایش می‌یابد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که علاوه بر حمله پاتوژن‌ها عواملی چون

تنش‌های محیطی، ایجاد زخم و بعضی مواد شیمیایی نیز موجب تحریک تولید کیتینازها می‌شوند (John, 1997). آسیب‌های فیزیکی ناشی از قارچ‌ها و حشرات در گیاهان، باعث آزاد شدن هورمون‌های اتیلن، جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید در گیاه می‌شود که این ترکیبات سبب تحریک تولید آنزیم کیتیناز در گیاه می‌گردند (Byrne et al., 2001). کیتینازها علاوه بر نقش اساسی در سیستم دفاعی گیاه، در سایر فعالیت‌های گیاهان نیز دخالت دارند. با این حال مهمترین نقش آنها در سیستم دفاعی گیاه، مقاومت در برابر پاتوژن‌ها می‌باشد. کیتینازها وظیفه دفاعی خود را با روش‌های مختلف انجام می‌دهند که ساختار مولکولی و خصوصیات بیولوژیکی کیتینازها در نحوه شرکت آنها در فعالیت‌های دفاعی مؤثر است (Iseli et al., 1996). بررسی مکانیزم عمل کیتینازهای گیاهی نشان داده است که برای ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن‌ها عمدتاً پاتوژن‌های قارچی به دو صورت عمل می‌کنند. نقش اساسی کیتینازهای آپوپلاستی در مراحل اولیه حمله پاتوژن بوده که مولکول‌های هشدار دهنده^۱ را از ساختمان پاتوژن آزاد کرده و این مولکول‌ها به نوبه خود اطلاعات مربوط به آلودگی هیف قارچی که در فضای بین سلولی نفوذ کرده است را به سیستم دفاعی گیاه منتقل کرده و موجب تحریک آن می‌شوند. از طرف دیگر این مولکول‌ها به گیرنده‌های خاصی متصل می‌شوند که فعال کننده مکانیسم‌های دفاعی هستند و می‌توانند موجب افزایش تولید ترکیبات دفاعی مانند کیتینازهای آپوپلاستی یا واکوئلی شوند. افزایش میزان کیتینازهای آپوپلاستی به نوبه خود تولید مولکول‌های هشدار دهنده را تشدید کرده و سیستم دفاعی را آماده مقابله می‌نماید. در مراحل بعدی آلودگی و زمانی که در اثر نفوذ هیف قارچ سلول صدمه دیده و غشاء پلاسمایی پاره می‌شود، کیتینازهای واکوئلی خارج شده و زنجیره‌های تازه سنتز شده کیتین را تجزیه و رشد قارچ را متوقف می‌کنند. به نظر می‌رسد کیتینازهای آپوپلاستی بیشتر در تحریک سیستم هشدار دهنده گیاه و کیتینازهای واکوئلی در تجزیه و جلوگیری از گسترش پاتوژن‌ها مؤثر هستند. بررسی‌های تکاملی و

^۱ - Elicitors

فیلوژنیک نیز نشان داده‌اند که در کیتیناز کلاس ۱ (واکوئلی) دامنه‌های کاتالیتیک که در تجزیه کیتین قوی‌تر عمل می‌کنند همراه با تغییر و تکامل قدرت بیماری‌زایی قارچ‌ها تکامل یافته و دارای تنوع توالی وسیعی هستند، در حالی که در کیتیناز نوع ۳ (آپوپلاستی) دامنه کاتالیتیک تغییر چندانی نکرده و توالی‌های آن تا حد زیادی محافظت شده‌اند و تغییرات تکاملی بیشتر در دامنه‌های غیرکاتالیتیک آنها رخ داده است (Bishop et al., 2000).

۱-۶ انواع مختلف پروتئین‌های ممانعت‌کننده از فعالیت پلی‌گالاکتوروناز قارچی (PGIPs)

۱-۶-۱ هوموگالاکتورونان (HGA)

HGA ها زنجیره‌هایی از D-گالاکتورونیک اسید (GA) با اتصالات 1β -4 می‌باشند که توسط فرم‌های PGendo/exo و همچنین لیاژها تخریب می‌شوند. هوموگالاکتورونان‌هایی که دارای درجه میتله شدن پائینی می‌باشند را پکتات (اسید پکتیک) و هوموگالاکتورونان‌هایی که دارای درجه بالایی از میتله شدن می‌باشند را پکتین می‌نامند. و اصطلاح Xylogalacturonan برای گالاکتورونان‌های غنی از گروه‌های جانبی Xylose (که به کربن ۳ اسکلت گالاکتورونان متصل شده باشند) اطلاق می‌شود (شکل ۱-۵) که بیشتر در بافت‌های مولد مثل دانه سویا، میوه سیب و گرده کاج یافت می‌شود. اگرچه عملکرد این پلی ساکارید شناخته نشده ولی حضور گزیلوز توانایی PG برای تخریب گزیلوگالاکتورونان را محدود می‌کند (Ridley, 2001).

۱-۶-۲ آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز

ترکیب دیواره نخستین سلول گیاهی از شبکه سلولزی و همی‌سلولزی در بستری ژل مانند از مواد پکتینی می‌باشد. پکتین ترکیب عمده دیواره سلولی دولپه‌ای‌ها و همچنین ترکیب اصلی تیغه میانی در سلول‌های

گیاهی است (Carpita and Gibeaut 1993). در بین پکتینازها، آنزیم‌های پلی‌گالاکتورونازی، بخصوص فرم اندوی آنها، نقش مهمی در تخریب دیواره سلول گیاهی دارند. دیگر آنزیم‌های پکتینازی از جمله پکتین متیل استراز و پکتین لیاز اغلب عملکرد سینرژیستی با PG دارند (Copper and Wood, 1975). اندوپلی‌گالاکتورونازها که بوسیله تعداد زیادی از موجودات زنده اعم از باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان تولید می‌شوند، در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی با تخریب و تغییر دیواره سلولی گیاه درگیر هستند. گیاهان از این نوع آنزیم‌ها برای پروسه‌های رشدی (Futamura et al., 2000)، نرم نمودن و رسیدن میوه، تشکیل ریشه (Peretto, 1992)، ریزش ارگان‌هایی همچون برگ، میوه، نمو گرده و یا تحریک سیستم‌های سیگنالی استفاده می‌کنند. به عنوان مثال در گوجه فرنگی^۱OG‌های تولید شده توسط فعالیت PG با درجه پلی‌مریزاسیون^۲ برابر ۶-۴، سبب تحریک تولید اتیلن می‌شوند (Simpson, 1995). بنابراین در گیاه کوچکی همچون آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) بیش از ۵۰ نوع PG شناسایی شده است (Torki et al., 2000). قارچ‌ها به منظور کلونیزاسیون موفق در بافت میزبان انواعی از CWDE^۳های دپلیمریزه کننده ترکیبات دیواره سلولی را ترشح می‌کنند. این آنزیم‌های دپلیمریزه کننده پکتینی که با سست نمودن دیواره سلولی، دیگر پلیمرها را در معرض تخریب قرار می‌دهند اغلب واجد خانواده ژنی هستند (Annis and Goodwin, 1997). ژن‌های کد کننده PG قارچی همانند PG گیاهی بصورت یک خانواده ژنی هستند بنابراین دارای درجه بالایی از چند شکلی ژنی می‌باشند (Annis and Goodwin, 1997). محصولات این ژن‌ها در قارچ‌ها اغلب به صورت ایزوآنزیم‌هایی تولید می‌شوند که دارای خواص آنزیمی متفاوتی هستند. تنوع وسیع ایزوآنزیم‌ها در پاتوژن‌ها نشان دهنده پیچیدگی مولکول‌های پکتینی در گیاهان است که سبب شده هر کدام دارای فعالیت اختصاصی،

^۱ - Oligogalacturonic acid

^۲ - Degree of polymerization

^۳ - Cell Wall-Degrading Enzymes

سوبسترای اختصاصی و pH اپتیمم خاص خود باشند. بنابراین قارچ‌ها به انواعی از PGها مجهز می‌باشند تا در شرایط متفاوت، دسترسی به سوبسترای کربنی مناسب برای آنها مشکل نباشد. البته تغییرات بعد از ترجمه از قبیل میزان گلیکوزیله شدن، افزایش مقاومت به پروتئازها و همچنین حضور و یا عدم حضور دنباله N-ترمینال در آنزیم PG در اختصاصی عمل کردن آن و میان کنش با نواحی پلیمر پکتینی موثر است. اندازه خانواده ژنی PG در اثر متقابل محدوده میزبان موثر است بطوریکه پاتوژن‌هایی که دارای خانواده ژنی بزرگ می‌باشند محدوده میزبانی آنها نیز وسیع است. به هر حال این را نباید به عنوان یک واقعیت برای همه قارچ‌ها تعمیم داد. در شرایط عادی مقداری از endoPG بیان شده در قارچ‌ها وجود دارد. این سطح پایه از فعالیت آنزیمی در فاز زودرس آلودگی به منظور رهاسازی متابولیت‌های تحریک کننده سنتز بیان PG همواره وجود دارد (Chen et al., 2002). عموماً end PGها اولیگومرهای طولی تولید می‌کنند که به تدریج با حملات بعدی به قطعات کوچکتر تبدیل می‌شود (Parenicova et al., 2000). از سوی دیگر گزارشات نشان داده که وقتی endoPG قارچی روی بافت گیاهی اثر داده شود برخی از پاسخ‌های دفاعی همچون تجمع فیتوآلکسین‌ها، سنتز لیگنین، اتیلن، مهار کننده‌های پروتئینازی و β -1,3 گلوکاناز تحریک می‌شوند (Lang and Dornenburg, 2000).

۱-۶-۳ پروتئین‌های ممانعت کننده از فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز (*PGIP*)

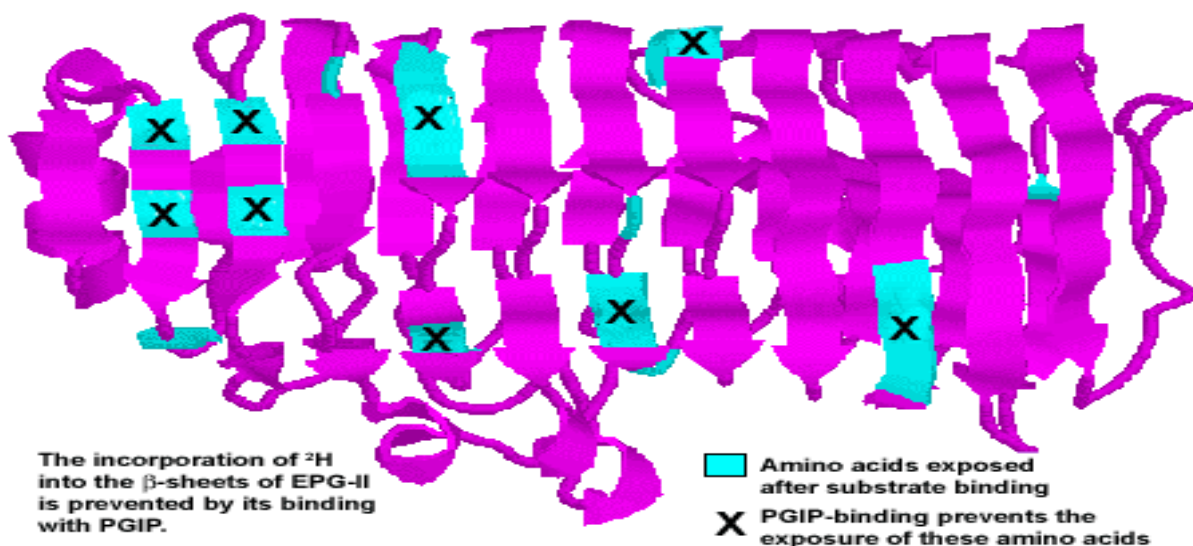
۱-۶-۳-۱ عملکرد *PGIP* در دفاع علیه قارچ‌های پاتوژنیک

نقش PG به عنوان فاکتور اصلی در آسیب رسانی به میزبان‌های گیاهی در بسیاری از قارچ‌های بیماریزا از جمله قارچ *Aspergillus flavus* (Shieh et al., 1997)، *Sclerotinia Sclerotiorum* (Di Matteo et al., 2006)، *Botrytis cinerea*، *Ralstonia solanacearum* (Huang and Allen, 2000) و *Fusarium*

oxysporum (Zamani et al., 2000) گزارش شده است. این قارچ‌های فیتوپاتوژنیک برای کلونیزاسیون موفق خودشان و همچنین رهاسازی متابولیت‌هایی که تحریک کننده سنتز بیان PG باشند، endoPG را در فاز زودرس آلودگی ترشح می‌کنند. عموماً endoPG ها با اثر روی باندهای درونی هوموگالاکتورونان‌ها که مولفه اصلی آنها نواحی صاف پکتین می‌باشند، سبب قطعه قطعه و محلول نمودن هوموگالاکتورونان‌ها و تولید قطعات OGA می‌شوند (Federici et al., 2001). این قطعات در درجه پلیمریزاسیون (DP) پائین به عنوان تحریک کننده سیستم‌های بیانی دیگر آنزیم‌های پکتینازی عمل می‌کنند اما در DP برابر ۹-۱۵ به عنوان قطعات الیگوگالاکتورونیدی فعال قادر به تحریک سیستم دفاعی میزبان می‌باشند (Shanmugam, 2005). عمر این قطعات بسیار کوتاه است و بلافاصله به قطعات کوچکتر توسط endoPG تبدیل می‌شوند. بنابراین با عملکرد endoPG ضمن اینکه منبع کربنی لازم برای قارچ فراهم می‌شود، نفوذ و کلونیزاسیون پاتوژن قارچی نیز تسهیل می‌گردد (Shanmugam, 2005). اما در همه گیاهان به راحتی این فرایند اتفاق نمی‌افتد، چراکه در آپوپلاست بسیاری از گیاهان دو لپه ای و در گیاهان تک لپه ای غنی از پکتین نظیر پیاز و تره و همچنین در آرابیدوپسیس و گل اطلسی پروتئین‌های مهار کننده اندوپلی‌گالاکتوروناز (PGIP) که از مهمترین گروه‌های مهار کننده پکتینازی هستند، شناسایی شده اند که قادرند از طریق تنظیم یا ممانعت فعالیت PG و آزادسازی قطعات الیگوگالاکتورونیدی فعال، کلونیزاسیون قارچی را محدود کنند. این LRR^۱ گلیکوپروتئین‌ها با اتصال به endoPG قارچی فعالیت آنها را تعدیل می‌کنند و مانع از تجزیه OG ها به قطعات کوچکتر می‌شوند در نتیجه اولیگوگالاکتورونیدهای فعال ایجاد شده سیستم دفاعی گیاه را تحریک می‌کنند. به این ترتیب پیام رسانی اندوژنوسی به قارچ به منظور ترشح دیگر آنزیم‌های پکتینازی را به تاخیر می‌اندازند و در نتیجه سبب به تاخیر انداختن پیشرفت هیف قارچی، کاهش پوسیدگی بافت میزبان، تحریک دیگر پاسخ‌های دفاعی بافت سالم مجاور نواحی آلوده

^۱ -Leucine-Rich Repeat glycoproteins

و در نهایت توقف کلونیزاسیون قارچی می‌گردند (De Lorenzo and Ferrari, 2002). این مهار کننده‌ها مولکول‌های گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۴۰-۵۵ کیلودالتون می‌باشند که به ماتریکس خارج سلولی سلول گیاهی با پیوندهای یونی متصل شده اند (Johnston et al., 1993).



شکل ۱-۴ قسمت‌های سبز رنگ با قرارگیری پلی‌گالاکتوروناز قارچی در برابر سوبسترایش وارد عمل می‌شوند، اما با حضور PGIP اسید آمینه‌های فوق بلوکه می‌شوند.

۱-۷ تیونین‌ها^۱ و دیفنسین‌ها^۲

این ترکیبات پروتئین‌های غیر ذخیره‌ای گیاهی هستند که پس از حمله میکروبی سنتز شده و تجمع می‌یابند (Van Loon et al., 1994). دیفنسین‌ها پپتیدهای کوچک غنی از سیستئین با وزن مولکولی پائین (۴۵ تا ۵۴ ریشه‌ی اسید آمینه) هستند که بار خالص مثبت دارند. ریشه‌های حفاظت شده در همه‌ی توالی‌ها، ۸ اسید آمینه سیستئین، ۲ اسید آمینه گلیسین در موقعیت‌های ۱۳ و ۳۴ و ریشه آروماتیک در

^۱-Thionins

^۲-Defensins

موقعیت ۱۱ و یک ریشه‌ی گلوتامیک در موقعیت ۲۹ است. تمام دیفنسین‌ها نسبتاً کوچک و دارای پپتیدهای عمومی با ساختار سه بعدی متشکل از یک β -sheet سه رشته‌ای با یک α -helix موازی می‌باشند (Fant et al. 1998). در دیفنسین‌های گیاهی معمولاً این ساختار با چهار پل دی‌سولفید تثبیت شده است. دیفنسین‌ها به عنوان ترکیبات مهم سیستم دفاعی در گیاهان در غلظت میکرو مولار رشد طیف وسیعی از قارچ‌های رشته‌ای را ممانعت می‌کند. و با تغییر در نفوذپذیری غشاء سلول‌های قارچی و جلوگیری از بیوسنتز ماکرومولکول‌ها فعالیت ضد قارچی خود را انجام می‌دهند. تولید بیش از حد معمول دیفنسین‌ها و تیونین‌ها در گیاهان در معرض آلودگی، موجب کاهش خسارت پاتوژن‌های مختلف نظیر قارچ‌های جنس‌های *Alternaria*، *Fusarium* و *Plasmodiphora* می‌شود (Gao et al., 2000). علاوه بر این، ژن‌های دیفنسین نسبتاً پاتوژن القاء هستند و سایر ترکیبات که درگیر با مقاومت‌اند می‌توانند بیان همیشگی داشته باشند (Parashina et al., 2000). این ترکیبات به نظر می‌رسد در سیستم‌های دفاعی گیاه درگیرند بصورتی که این ترکیبات می‌توانند سمیت بالا برای میکرواورگانیزم‌ها، حشرات و پستانداران داشته باشند. تجمع تیونین در دیواره سلولی سنبله‌های آلوده شده گندم ارقام مقاوم دلالت بر این دارد که تجمع این ترکیب با پاسخ‌های دفاعی به آلودگی *Fusarium culmorum* نقش دارد. همچنین دیفنسین‌های گیاهی به عنوان یک ابزار بیوتکنولوژی به منظور بهبود تولید محصول در موجودات اصلاح ژنتیکی شده، از طریق ایجاد مقاومت در برابر قارچ‌ها آزمایش شده‌اند.

۱-۷-۱ نقش دیفنسین‌های گیاهی در دفاع

گزارش‌های متعددی بیانگر این است که دیفنسین‌ها بخش جدایی ناپذیر از سیستم ایمنی ذاتی گیاه هستند و در سیستم دفاعی گیاه نقش دارند. در حال حاضر اکثر دیفنسین‌های گیاهی بعنوان یک الگوی ساختاری هستند که در مقابل حمله پاتوژن، جراحات و برخی تنش‌های زنده بیان می‌شوند (de Beer

and Vivier, 2011). ویژگی‌های متعددی بیان می‌کند که دیفنسین‌ها در دفاع گیاهان نقش دارند (Selitrennikoff, 2001). توزیع آن‌ها با نقش دفاعی آن‌ها سازگار است. آن‌ها در برگ، غده، گل، غلاف و دانه شناسایی شده اند و نقش مهمی در حفاظت از دانه‌های در حال جوانه زنی و در حال توسعه دارند (Garcia-Olmedo et al., 1998). علاوه بر این، دیفنسین‌های گیاهی در آوند چوبی، روزنه و سلول‌های روزنه‌ای، سلول‌های پارانسیم و دیگر نواحی peripheral یافت می‌شوند (Kragh et al., 1995). حضور دیفنسین‌ها در بافت‌های مختلف با نقش دفاعی این پپتیدها همخوانی داشته و اعتقاد بر این است که این مکان‌ها، جایگاهی هستند که اولین تماس با پاتوژن در آن‌ها رخ می‌دهد (Carvalho and Gomes, 2011). علاوه بر این، دیفنسین‌ها طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد میکروبی را در شرایط آزمایشگاهی نشان داده‌اند. اخیراً گزارش‌هایی بر مبنای تولید گیاهان تراریخت با بیان دیفنسین‌های خارجی بیان شد. از این رو، آن‌ها دارای تعداد زیادی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت ضد میکروبی، حشره کشی، مهار کننده سنتز پروتئین و به عنوان واسطه در تنش‌های غیر زنده نقش دارند (Carvalho and Gomes, 2009). فرانکو (۲۰۰۱) گزارش کرد که دیفنسین‌های گیاهی بر طبق طبقه بندی پروتئین‌ها، طبقه بندی می‌شوند و دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متعدد می‌باشند. برای مثال، خانواده‌ای از دیفنسین‌ها که از *Vigna unguiculata* جدا شده‌اند در اشکال مختلف همولوگ، به عنوان ضد قارچ، ضد باکتری و مهارکننده آنزیمی عمل می‌کنند (Franco, 2011). اگرچه دیفنسین‌ها نقش‌های متعددی دارند اما فعالیت ضد میکروبی آن‌ها به طور عمده در برابر قارچ‌ها مشاهده شده است.

۱-۸-۱-۳-β-گلوکاناز

آنزیم‌های دیگری که می‌توانند در سیستم دفاعی گیاه نقش داشته باشند گلوکانازها (PR2) می‌باشند. حداقل سه کلاس از بتا ۱،۳ گلوکاناز شناسایی گردیده است. کلاس α، شامل پروتئین‌های ساختاری است که در واکوئل قرار دارند. کلاس‌های π و ω شامل یکسری پروتئین‌های اسیدی می‌باشند که در فضای خارج سلولی قرار گرفتند. این گروه شامل یکسری پروتئین‌های (PR) Pathogenesis Related از نوع PR-2, PR-O, PR-N, و PR-Q و دو تا گلیکوپروتئین می‌باشد که در خامه گل موجود می‌باشند. بتا ۱،۳ گلوکاناز در چندین مرحله رشدی و فیزیولوژیکی از جمله تقسیم سلولی، تشکیل دانه گرده و جوانه زنی شرکت می‌کند. آنزیم‌های کتیناز و بتاگلوکاناز هر دو دارای ساختمان مشابهی می‌باشند ولی از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی، ساختمان اولیه، فعالیت آنزیمی، موقعیت درون سلولی و فعالیت ضد قارچی با یکدیگر متفاوت می‌باشند (Simmons, 1994). طبق بررسی‌هایی مشخص گردید زمانی که آنزیم کتیناز همراه با آنزیم بتا ۱،۳ گلوکاناز به کار برده می‌شوند اثر بازدارندگی آنها بر روی قارچ‌ها بیشتر خواهد بود به طوریکه گوجه فرنگی‌های حاوی ژن کتیناز و گلوکاناز شدت بیماری در اثر *Fusarium oxysporum* را تا ۵۸٪ کاهش دادند (Jongedijk et al., 1995). بنابراین مهندسی ژن‌های کدکننده کتیناز به همراه سایر ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ضدقارچی به گیاهان، حفاظت آنها را در برابر پاتوژن‌های قارچی افزایش می‌دهد. این مسیر می‌تواند منجر به کنترل طیف وسیعی از پاتوژن‌های قارچی گردد. در عین حال راهکارهای دیگری برای وارد کردن بازدارنده‌های اختصاصی سنتز کتین به گیاهان مانند پلی اکسین‌ها وجود دارد که گسترش پاتوژن‌های کتین‌دار را کاهش می‌دهد (Ride and Barber, 1990).

۱-۸-۱ نقش ۱،۳-β-گلوکاناز گیاهی در دفاع علیه قارچ‌های پاتوژنیک

بیماری‌های ویروسی و قارچی از جمله عواملی هستند که ضمن ایجاد خسارت به محصولات کشاورزی مانع کشت آنها در بسیاری از شرایط آب و هوایی می‌شوند. مطالعه ساختمان دیواره سلولی در قارچ‌ها نشان می‌دهد که تقریباً، الگوی کلی ساختمان دیواره سلولی (شامل مولکول‌های بتاگلوکان، شبکه ای از گلیکوپروتئین‌ها و میکروفیبریل‌های کیتین)، در اکثر رده‌های مختلف قارچ‌ها مشابه بوده و تنها نسبت ترکیبات تغییر می‌کند (Deacon, 1997). بتاگلوکان هموپلیمری از منومر دی گلوکز است که با فرم بتا به هم متصل شده و از فراوان‌ترین رده پلی‌ساکاریدهای موجود در طبیعت می‌باشند (Haran et al., 1996) و یکی از مهم‌ترین عوامل موثر در بیوکنترل استفاده از انواع آنزیم‌های هیدرولازی است که با فرو پاشیدن ساختار سلولی قارچ‌های بیماریزای گیاهی باعث نابودی آن می‌گردند (Nobe et al., 2004 و Whipps, 2001). با تشدید فعالیت آنزیم‌های گلوکاناز به ویژه ۱ و ۳- بتاگلوکاناز، بخشی از دیواره که عمدتاً از ترکیبات گلوکانی ساخته شده است به طور کلی از بین می‌رود. از سوی دیگر از آنجا که کیتین دیواره قارچ‌های بیماریزا در ماتریکسی از رشته‌های گلوکان محصور شده است، غالباً فعالیت گلوکانازی پیش از فعالیت کیتینازی مشاهده می‌شود (Haran et al., 1996). بتا گلوکانازها معمولاً بعد از حمله پاتوژن به گیاه و یا تحت استرس‌های زیستی یا غیرزیستی مختلف در گیاه القا می‌گردد و معمولاً به صورت سینرژید با آنزیم کتیناز عمل می‌کند (Simmons., 1994).

۹-۱ فسفونیک اسید

در جنگ جهانی اول کشورهای ایالت متحده امریکا و آلمان بعلت کمبود عناصر معدنی فسفره نخستین بار از منابع فسفیت بعنوان جایگزین کود شیمیایی فسفاته استفاده کردند. در سال ۱۳۸۳ ترکیب فسفیت پتاسیم با نام عمومی فسفونیک اسید بعنوان ترکیب کود_سم و در گروه سموم آلی فسفونات‌ها در ایران به ثبت رسید. در اوایل ۱۹۹۰ میلادی دانشمندان فسفونات را ترکیبی با قابلیت قارچکشی قوی و کودی با تاثیرگذاری فوق العاده تولید و ترویج نمودند. فسفیت علاوه بر تحریک رشد رویشی و زایشی گیاه منجر به کنترل طیف وسیعی از عوامل بیماریزایی قارچ‌های خانواده Oomycete می‌گردد. فسفیت بدلیل دارا بودن یک اکسیژن کمتر از فسفات سرعت حرکت بیشتری از فسفات دارد و طی زمان کوتاهی در سراسر گیاه انتشار می‌یابد (Adams and conral, 1953). با معرفی ترکیبات متنوع فسفیت پتاسیم در اواسط دهه ۱۹۹۰ میلادی، محققین پی بردند که این ترکیبات موجب پیدایش تاثیرات چشمگیر کمی و کیفی در محصولات کشاورزی می‌شوند که میتوان به موارد زیر اشاره کرد: افزایش وزن و گسترش ریشه، افزایش وزن و اندازه میوه، زودرسی محصول، بهبود و افزایش قابلیت انبار داری می‌باشد (Lavott, 1999). از دیگر نقش‌های فسفیت پتاسیم کنترل عوامل بیماریزا می‌باشد.

۹-۱-۱ نقش فسفیت پتاسیم در کنترل عوامل بیماریزای گیاهی

فسفیت پتاسیم سمی سیستمیک علیه عوامل بیماریزای قارچی و باکتریایی خاکزاد و هوازاد بوده که به صورت دو طرفه^۱ از بالا به پایین و از پایین به بالا در گیاه حرکت می‌کند. شیوه عمل فسفیت در کنترل بیماری‌های گیاهی، نخست مرتبط با تاثیر مستقیم بر روی عوامل بیماریزا می‌باشد. نتیجه تحقیقات در زمینه کنترل قارچ *Phytophthora sp.* بیانگر آن است که ترکیبات حاوی فسفیت موجب اختلال در

^۱-Symplastic ambimobility

متابولیسم فسفر و تجمع پلی فسفات^۱ و پیروفسفات^۲ درون عامل بیماریزا می گردند که مهمترین عامل موثر در برهم ریختن واکنش های آنابولیسمی پیروفسفوریلاز^۳ و تجمع پیروفسفات می باشد (Niere et al., 1994). از سوی دیگر تجمع فسفیت مانع از فعالیت چندین آنزیم در مسیر فرایند تولید گلیکوتیک پنتوز فسفات^۴ و اکسیداتیو پنتوز فسفات^۵ در قارچ فایتوفتورا می شود. فسفیت مشابه الیسیتورهای بیمارگر از طریق مسیر شیکمیک اسید^۶ گیاه را تحریک به تولید مواد دفاعی فیتوالکسین^۷ بر علیه عوامل بیماریزای گیاهی می کند. این فیتوالکسین ها ترکیبات ضد میکروبی با وزن مولکولی پایین هستند که به مقدار قابل توجه و تنها پس از تحریکات ناشی از عوامل بیماریزا و زخم های ناشی از عوامل فیزیکی و شیمیایی توسط سلول های سالم مجاور سلول های مرده و آسیب دیده پدید می آیند (Stehmann and Grant, 2000). مقاومت زمانی علیه عامل بیماریزا پدید می آید که غلظت فیتوالکسین به اندازه ای برسد که از رشد و توسعه بیمارگر ممانعت کند. در مجموع فیتوالکسین ها با ایجاد تغییرات در ساختمان دیواره سلولی میزبان، محدود نمودن دسترسی به کوآنزیم های ضروری و ایجاد تغییراتی در سرعت یا جهت متابولیسم میزبان به نحوی که گیاه در موقعیت بهتری از دفاع خود در برابر بیمارگر قرار گیرد، موجب افزایش مقاومت میزبان در برابر بیمارگر و در نهایت تقلیل میزان آلودگی می شوند. در راستای تولید فیتوالکسین ها، گیاه میزبان با تولید و انتشار اسید سالیسیلیک، موجب القاء بیان ژن و کد کردن پروتئین های مرتبط با بیماری (PRs) در درون سلول های گیاهی می شود که در طی آن مقاومت اکتسابی

^۱-Polyphosphate (Poly-P)

^۲-Pyrophosphate (PPi)

^۳-Pyrophosphorylase

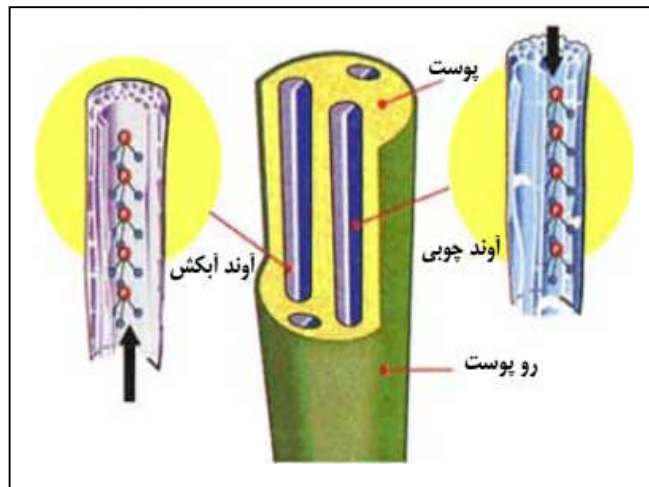
^۴-Glycolic Pentose - Phosphate

^۵-Oxidative Pentose - Phosphate

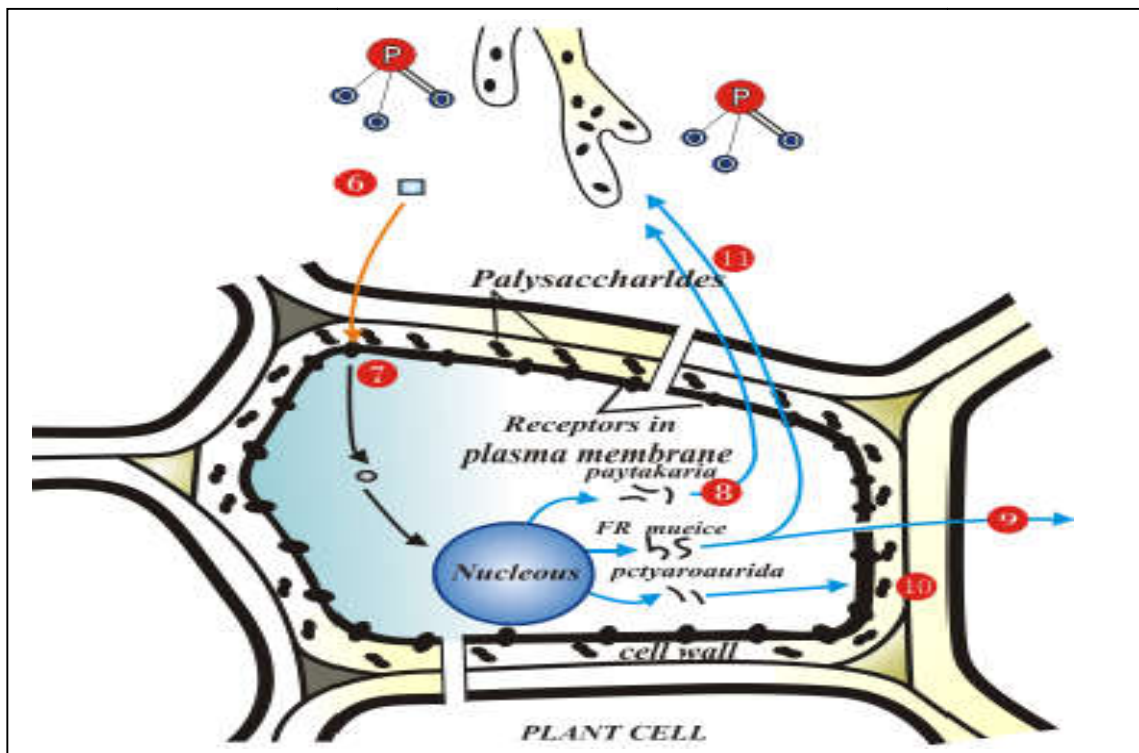
^۶-Shikmic acid

^۷-Phytoalexin

فراگیر (SAR) پدید می‌آید و بیماری در سرتاسر اندام گیاهی کنترل و محدود می‌گردد (Cervera et al., 2007).



شکل ۵-۱ نمایش مسیر حرکت فسفیت در آوندهای گیاهی



شکل ۶-۱ مسیر واکنش دفاعی فسفیت علیه بیمارگر

۱-۱۰ بررسی بیان ژن

فنوتیپ‌های متفاوت مشاهده شده در بین موجودات تک سلولی و پر سلولی از تفاوت‌های موجود در ژن‌ها و آلل‌های تشکیل دهنده ژنوم هر گونه ناشی می‌شوند. ولی اغلب سلول‌های یک موجود پرسلولی تفاوت‌های زیادی را نشان می‌دهند. این تفاوت‌ها به دلیل تغییر توالی DNA ژنوم نیست، بلکه از تفاوت بیان ژن‌های خاص سلول‌ها در حین نمو سلولی ناشی می‌شود (کریمی و زینلی، ۱۳۸۳). در مطالعه بیان ژن، چهار روش به طور معمول برای تعیین کمیت نسخه برداری مورد استفاده قرار می‌گیرند: Northern blotting, In situ hybridization (Parker and Barnes, 1999), RNase protection assays, cDNA microarrays (Sacomanno et al., 1992), و RT-PCR (Bucher, 1999). Northern analysis (1992) تنها روشی است که اطلاعاتی در مورد اندازه mRNA و بی نقص بودن نمونه‌های RNA به دست می‌دهد. روش RNase protection assays روش مناسب نقشه برداری از جایگاه‌های آغازین و پایانی و مرزهای اینترون/گزون و همچنین جهت متمایز نمودن mRNA‌های نزدیک به هم است. روش In situ hybridization پیچیده ترین روش بوده، اما تنها روشی است که امکان شناسایی مکان نسخه‌ها را در سلول‌های خاص درون یک بافت امکان پذیر می‌نماید. محدودیت اصلی این سه روش حساسیت پایین آنها است (Melton et al., 1984).

۱-۱۰-۱ (Reverse Transcription) RT-PCR

نتایج حاصل از ژل آگارز از مرحله پایانی آزمایش بدست می‌آید که بسیار وقت گیر است. نتایج بر پایه جداسازی باندها بر اساس اندازه به دست می‌آیند که ممکن است خیلی دقیق نباشد. نتایج حاصله در RT-PCR از نمونه‌ای به نمونه دیگر متغیر هستند. در حالیکه ژل‌ها ممکن است قادر به نشان دادن چنین تغییراتی در محصول PCR نباشند. Real Time PCR از حساسیت کافی برای تشخیص این تغییرات

برخوردار است. قدرت تشخیص ژل آگارز بسیار ضعیف بوده و قادر به متمایز نمودن تفاوت‌های کمتر از ۱۰ برابر نمی‌باشند، در مقابل Real Time PCR قادر به تشخیص تغییراتی در حد دو برابر است.

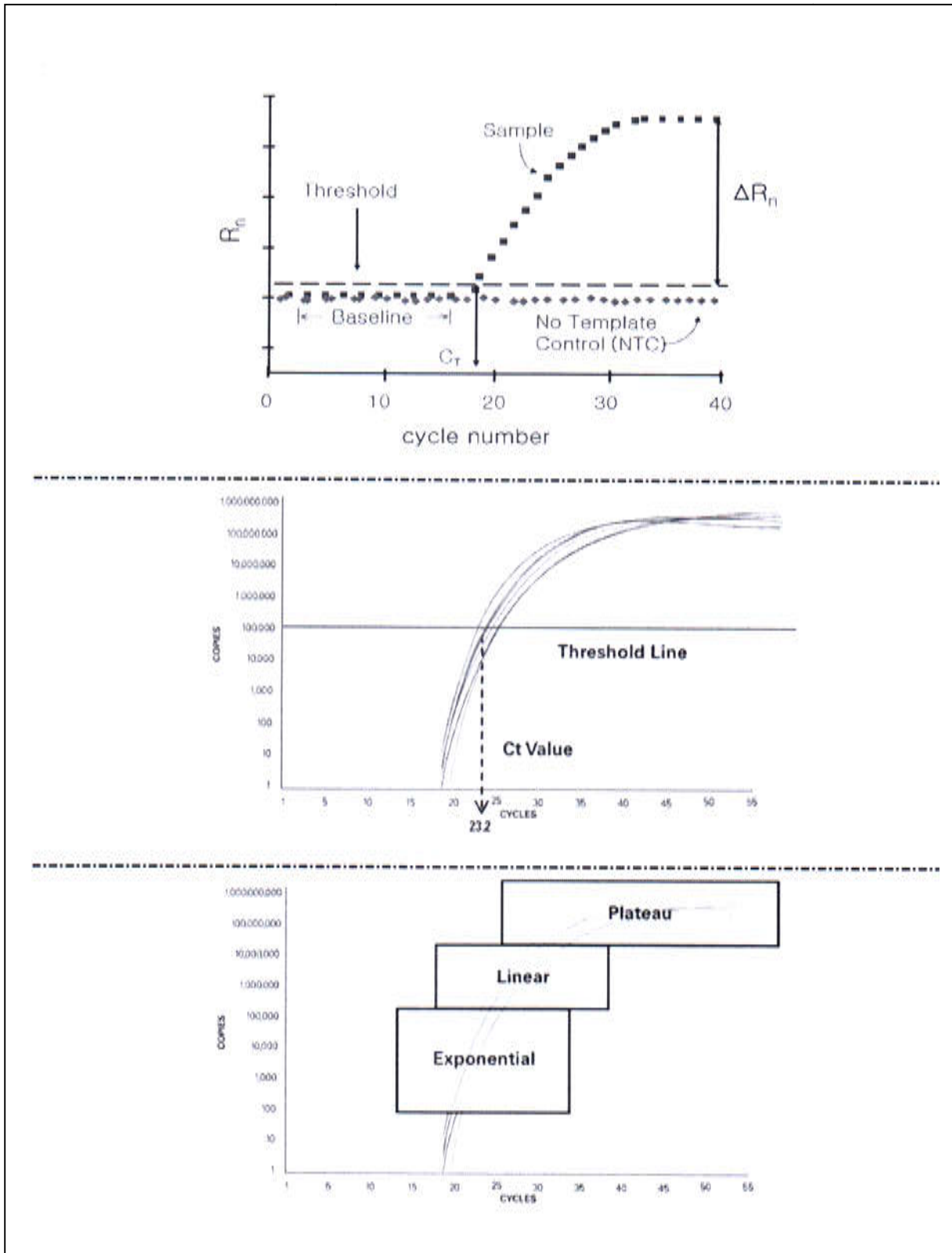
۱-۱۰-۲ Real-Time RT-PCR

پیدایش Real Time-PCR بطور قابل توجهی سنجش بیان ژن را متحول نموده است. Real Time-PCR تکنیک جمع آوری داده‌های واکنش PCR همزمان با انجام آن بوده و تکثیر و تشخیص را در یک مرحله انجام می‌دهد. این امر بوسیله انواع متنوعی از واکنش‌های شیمیایی مرتبط با نور فلورسنس انجام می‌گیرد که غلظت محصول PCR را با شدت نور فلورسنس تولیدی مرتبط می‌نمایند. فرایند شیمیایی مورد استفاده در سیستم Real Time امکان تشخیص فراورده‌های PCR را در طی فازهای ابتدایی واکنش ایجاد می‌نماید. این امر دارای مزایای زیادی در مقایسه با روش‌های PCR معمولی است. روش‌های معمولی از ژل‌های آگارز برای شناسایی محصولات PCR در فاز انتهایی یا نقطه نهایی واکنش استفاده می‌نمایند. روش‌های Real Time PCR ۱۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰۰ بار حساس‌تر از روش‌های RNase protection assay (Wong and Medrano 2005)، ۱۰۰۰ بار حساس‌تر از روش dot blot hybridization بوده و حتی قادر به تشخیص تنها یک کپی از یک نسخه برداری خاص هستند. علاوه بر آن، روش‌های Real Time PCR می‌توانند به گونه‌ای قابل اطمینان تفاوت‌هایی کوچک در حد ۲۳ درصد را در بیان ژن بین نمونه‌ها شناسایی نمایند (Gentle et al., 2001) و دارای ضرایب انحراف کوچکتر (cv) برای SYBR Green ۱۴/۲٪، Tag Man ۲۴٪ در مقایسه با روش‌های نقطه پایانی مانند دانسیتومتری باند (۴۴/۹٪) و هیبریداسیون پروب (۴۵/۱٪) هستند. Real-Time PCR همچنین قادر است بین RNAهای پیامبر (mRNAs) با توالی‌های بسیار نزدیک تفاوت قائل شود. این روش به مقادیر نمونه RNA بسیار کمتری نیاز داشته و در صورت مناسب بودن تجهیزات، مقادیر نسبتاً بالایی محصول واکنش تولید می‌نماید. واکنش Real-Time PCR را می‌توان به ۴ فاز اصلی تقسیم نمود: فاز خطی زمینه‌ای، فاز اولیه نمایی

(Exponential Phase)، فاز خطی لگاریتمی (Linear Phase) و فاز کفه (Plateau Phase) (Tichopad et al., 2003). این مراحل در شکل ۱-۷ نشان داده شده است. طی فاز خطی زمینه‌ای (معمولا ۱۰-۱۵ چرخه اول) PCR آغاز شده و انتشار فلورسنس در هر چرخه هنوز از سطح زمینه فراتر نمی‌رود. همانگونه که ذکر گردید فلورسنس پایه (Baseline floresence) در این زمان محاسبه می‌گردد. در فاز نمایی اولیه، میزان فلورسنس به سطح آستانه‌ای یا C_T می‌رسد که بطور معنی داری (معمولا ۱۰ برابر انحراف استاندارد فلورسنس پایه) بالاتر از سطوح زمینه‌ای است. چرخه‌ای که در آن این اتفاق رخ می‌دهد C_T نام دارد. تعداد چرخه‌های مورد نیاز برای رسیدن به آستانه، مقدار C_T نامیده می‌شود. اصطلاح C_T مربوط به کمپانی ABI^۲ بوده و این معیار نشانگر تعداد نسخه اولیه موجود در نمونه اصلی بوده و از آن برای محاسبه نتایج آزمایش استفاده می‌گردد (Heid et al., 1996). در فاز خطی لگاریتمی، دو برابر کردن محصول PCR پس از هر چرخه در شرایط واکنش ایده آل صورت می‌گیرد. در نهایت فاز صاف انتهایی زمانی است که اجزاء واکنش محدود می‌شوند و شدت نور فلورسنس برای محاسبه داده‌ها زیاد مناسب نمی‌باشد (Bustin, 2000).

^۱-Cycle threshold

^۲- Applied Biosystems, Foster City, CA, USA



شکل ۷-۱ منحنی تکثیر فازهای Real time PCR و اصطلاحات

فصل دوم

مروری بر منابع

۱-۲ نقش فسفیت پتاسیم در گیاهان و دفاع علیه قارچ‌های پاتوژنیک

فسفیت پتاسیم، سمی سیستمیک علیه عوامل بیماریزای قارچی و باکتریایی خاکزاد و هوازاد می‌باشد که به صورت سیمپلاستیک حرکت کرده و دارای خاصیت پیشگیری، ایمن سازی و مداوا کنندگی می‌باشد (Thao and Yamakawa, 2008). در اوایل ۱۹۹۰ میلادی دانشمندان فسفونات را ترکیبی با قابلیت قارچکشی قوی و کودی با تاثیرگذاری فوق العاده تولید و ترویج نمودند. در تحقیقی بررسی اثر تیمار فسفونیک بر روی گیاه آووکادو تحت تنش پاتوژن فیتوفتورا (عامل پوسیدگی ریشه)، نشان داد که فسفونیک باعث فعال شدن ژن‌های دفاعی در برابر پاتوژن می‌گردد. از طرفی غلظت خاصی از فسفونیک بر روی گیاه موثر است و در غلظت خاصی بعنوان قارچکش عمل می‌کند (Coffey, 1987). اشراقی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که فیتوهورمون‌های سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن در مکانیسم‌های دفاعی القاء شده توسط فسفیت درگیرند. این نشان می‌دهد که این القاگر می‌تواند مسیرهای دفاعی دیگر را از طریق تحریک مولکول‌های دفاعی فعال نماید. بنابراین، ما نمی‌توانیم بگوییم که فسفیت به تنهایی باعث مکانیسم دفاعی در سیب‌زمینی می‌گردد. گزارش شده است که اگزالات و فسفات در گیاهانی که توسط قارچ، باکتری و ویروس آلوده شده بودند منجر به القای مقاومت سیستمیکی شده و تیمار گیاهان با این ترکیبات باعث کاهش خسارت تنش می‌شود (Mucharromah, 1991). تحقیقات نشان داده است که محلول‌پاشی با فسفیت پتاسیم در سیب زمینی توانسته با القای پاسخ‌های دفاعی سیستمیک، منجر به کاهش حساسیت به قارچ‌های *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* و عفونت *Erwinia carotovora* گردد (Lobato et al., 2011). در گزارش دیگری نیز گیاهان جو که تحت حمله پاتوژن سفیدک دروغی قرار گرفتند مشاهده شد که فسفونات در گیاه متحرک بوده و باعث کاهش بیماری سفیدک دروغی و کاهش اسپورولاسیون *plasmopara* شد (Afridi, and Samiullah, 1973). در گیاهان بومی استرالیا نیز دیده شد که تیمار گیاهان تحت پاتوژن، با فسفونیک اسید، منجر به از بین رفتن

پاتوزن نمی‌شود بلکه باعث کاهش رشد در گیاه می‌شود و تیمار سالیسیلیک بعد از تیمار فسفونیک باعث شروع آبشار ترارسانی ژن‌های دفاعی می‌شود و ژن‌های PR و دیفنسین‌ها را فعال می‌کند (Hanslamberts, 2013). نتایج حاصل از تحقیقاتی که بر روی قارچ پیتیوم و فایتوفتورا انجام گرفت، نشان داد که فسفوروس اسید می‌تواند در کاهش رشد این دو قارچ از خانواده اوومیست‌ها نقش مهمی داشته باشد. این تحقیق هم در محیط درون شیشه و هم در محیط گلخانه اثر مشابهی را نشان داد (Fenn and Coffey, 1983). Guest and Grant, (1990) از تحقیقات خود نتیجه گرفتند که فسفونات‌ها در غلظت‌های پایین تولید هاگ را محدود می‌کنند. آنها پاسخ‌های دفاعی را در محل زخم میزبان، علیه پاتوزن قارچی تحریک می‌کنند. در گزارشی که بر روی گیاه *Citrus* انجام شد دیده شده که فسفونیک باعث ایجاد مقاومت در گیاه می‌شود و این مقاومت از طریق افزایش در میزان scoparon که نوعی متابولیت ثانویه در گیاه است می‌شود. فسفیت در غلظت کم باعث افزایش مکانیسم دفاعی در گیاه میزبان می‌شود و در غلظت بالاتر بطور مستقیم بعنوان متوقف کننده رشد قارچ عمل می‌کند (Afek and Sztejnberg, 1986). Rakha and Lu, (1990) به این نتیجه دست یافتند که تمام گیاهان خیاری که در تحقیقاتشان با فسفیت تیمار شده بودند، علائم بیماری پوسیدگی ریشه کمتری از خود نشان دادند. در تحقیقی گیاهان گوجه فرنگی و فلفل القا شده با فایتوفتورا که با فسفیت تیمار شده بودند، علائم بیماری کمتری نسبت به گروهی که با فسفیت تیمار نشده بودند، از خود نشان دادند (Forster et al., 1998). عمل و نحوه‌ی فعالیت قارچکش فسفیت‌دار بر روی کنترل قارچ *Phytophthora* و *Pythium* مورد آزمایش قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که وقتی غلظت‌های پایین فسفیت در بین ریشه‌ها وجود داشت، گسترش زخم ناشی از قارچ نیز کاهش معنی‌داری داشته است (Jackson et al., 2000). تحقیق رابطه‌ی فسفیت در محیط و کشاورزی، بر پاسخ‌های گیاهان، نشان داد که فسفیت‌ها به عنوان قارچکش گیاهی، منبع برتر مواد غذایی فسفر هستند. آنها با خاصیت قارچکشی خود می‌توانند، قارچ‌های خانواده اوومیست خصوصا گونه‌های *Phytophthora* و *Pythium* را از

بین بیرند (Allison et al., 2001). Hardy et al., (2001) نتایج تاثیر به کار بردن قارچکش فسفونات را بر فایتوفتورا نشان دادند. آنها دریافتند که فسفیت سبب رشد غیرعادی قارچ می‌شود یا به عبارت دیگر، فسفیت می‌تواند رشد قارچ را مختل کند. سنتا و ابیسپو (۲۰۰۱) در تحقیقاتشان نشان دادند بیماری بوته میری گیاه خیار را که توسط قارچ پیتیوم ایجاد می‌شود، می‌توان با فسفیت مهار کرد. پژوهشی دیگر نیز نشان داد که فسفیت می‌تواند به عنوان یک قارچکش قوی و موثر در برابر پیتیوم استفاده شود. فسفیت‌ها هم اثرات مستقیم بر روی قارچ دارند و هم می‌توانند مکانیسم‌های دفاعی گیاهان را تحریک کنند (Paul, 2004). کلایسون و همکاران (۲۰۰۵) یافتند که فسفیت می‌تواند سبب افزایش واکنش‌های طبیعی دفاعی در گیاه شود، رشد قارچ را به طور مستقیم محدود کند و همچنین دریافتند که قارچکش‌های مبنی بر فسفیت توانستند، بیماری‌های قارچی خیار را کنترل کنند. در تحقیقی فسفیت و فسفات پتاسیم را به محیط کشتی که قارچ پیتیوم قرار داشت، اضافه کردند. نشان داده شد، فسفیت پتاسیم از رشد قارچ جلوگیری می‌کند (Fritig, 1998). محققین اثرات فسفیت را طبق یافته‌های خود شامل: افزایش سلامتی گیاه و محدود کردن رشد قارچ‌های خانواده اوومیسیت دانسته‌اند (Ley and Anderson, 2005). تحقیقی برای اندازه‌گیری مقاومت در برابر بیماری قارچی توسط فسفیت انجام شد. مشخص شد که در گیاهان سیب زمینی که با فسفیت پتاسیم تیمار شده بودند، افزایش مقاومت پس از برداشت مشاهده شد. همچنین آنها بالاترین میزان پروتئین، فنول و فیتوالکسین‌ها را دارا بودند. در آزمایش دیگر فسفیت پتاسیم به صورت محلول پاشی برگی به پرتقال استفاده شد که نشان داد، گیاهان تیمار شده با فسفیت تعداد میوه‌ی بیشتری نسبت به شاهد داشتند (Lovatt and Mikkelsen, 2006). محققین دریافتند که بوته میری توسط قارچ پیتیوم ایجاد می‌شود، می‌تواند در گیاهان خیار و ملون‌ها ایجاد خسارت بکند. این بیماری را می‌توان توسط فسفیت پتاسیم مهار کرد (Howard and Gent, 2007). در پژوهشی که اهمیت ترکیبات فسفوروس اسید را نشان داد، مشخص شد که استفاده از فسفیت پتاسیم سبب گلدهی زود

هنگام در گیاهان می‌شود (Yaron, 2007). مطالعه‌ای که بر روی فسفوروس اسید به عنوان کود انجام شد، نشان داد که وقتی گیاه با آن تیمار می‌شود، بیشترین رشد رویشی را دارد. همچنین نشان داد که ترکیب‌های فسفیت سبب افزایش گلدهی و میوه‌دهی می‌شوند (Rickard, 2008). در تحقیقی قارچ پیتيوم که سبب سوختگی چمن شد، قارچکش حاوی فسفونات را بر روی چمن پاشیدند. دریافتند که فسفونات می‌تواند سبب سرکوب این قارچ شود (Cook and Landschoot, 2009). در آزمایشی از فسفیت پتاسیم برای کنترل بیماری بوته میری ناشی از قارچ پیتيوم در گلخانه استفاده شد. نتایج ثابت کرد استفاده از فسفوناتها می‌تواند رشد پاتوزن را در بافتهای ریشه، ساقه و برگ محدود سازد (Euodong and Datnoff, 2012). استرادا و همکاران (۲۰۱۳) طی تحقیقی اثر کود فسفیت را بر رشد، عملکرد و ترکیب میوه‌ی توت فرنگی مورد بررسی قرار دادند. آنها به این نتیجه دست یافتند که فسفیت می‌تواند کیفیت میوه، اسید آسکوربیک، آنتوسیانین و اسیدیتنه را بالا ببرد. همچنین سبب شد اولین تاریخ گلدهی نیز، زودتر اتفاق بیافتند. آریایی و همکاران (۱۳۹۳) تاثیر ترکیبات مختلف کودی را در کاهش رشد فایتوفتورا مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد فسفیت پتاسیم به طور معنی‌داری بر روی کاهش رشد قارچ موثر بود. پژوهشگران اخیرا اظهار داشتند که KPhi برای پاسخ سریع‌تر و شدیدتر به عفونت به احتمال زیاد با واسطه سالیسیلیک اسید عمل می‌کند (Machinandiarena et al., 2012). نتایج بویرجان و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که در گیاهان آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) تلقیح شده با *Phytophthora* *Palmivora* و *Phytophthora. Cinnamomi* که با فسفیت پتاسیم تیمار شده بودند، مقاومت در برابر عفونت با سرعت بیشتر و به طور کارآمدتری انجام گرفت. همچنین نتایج این محققین نشان داد که فسفیت پتاسیم نه تنها باعث افزایش تولید ROS ها می‌گردد، بلکه با افزایش ترکیبات لیگنینی در تقویت دیواره سلولی نقش دارد (Boerjan et al., 2003). مطالعات دیگر نشان داد که تیمار گیاهان سیب‌زمینی تلقیح شده با قارچ *Phytophthora infestans* منجر به افزایش ترکیبات ضد میکروبی مانند فیتوالکسین‌ها

شد (Andreu et al., 2006). نتایج آزمایشات ویکس و همکاران (۱۹۹۱) نشان داد که محصولات فسفیت در کاهش شدت لکه برگ‌ناشی از *Plectosphaerella* بر روی گیاه *Wild rocket* موثر است. تحقیقات نشان داد که کاربرد فسفیت در سیب منجر به مقاومت در برابر *Phytophthora cactorum* (Guest et al., 1995)، *Dematophora necatrix* و *Venturia inaequalis* (Heaton and Dullahide, 1990) گردید.

۲-۲ بیان ژن

محققین گزارش کردند که در میان عوامل کنترل بیولوژیکی، ژن کیتیناز و دیفنسین نقش مهمی دارند. همچنین دیفنسین‌ها پپتیدهایی با فعالیت ضد میکروبی می‌باشند که به طور گسترده‌ای در حیوانات و گیاهان وجود دارند و باعث مسمومیت طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها می‌شوند (Farrokhi et al., 2007). ژانگ و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که گیاهان گوجه فرنگی تراریخت حاوی ژن‌های دیفنسین خرگوش (NP-1)، نسبت به بیماری *Fusarium oxysporum* مقاومت نشان داده‌اند. آنورادا و همکاران (۲۰۰۸) طی گزارشی بیان کردند که انتقال ژن دیفنسین از گیاه خردل به بادام زمینی و تنباکو منجر به مقاومت به بیماری قارچی شد. محققان اظهار داشتند که ژن کیتیناز در گیاهان تراریخت منجر به افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و در نهایت منجر به افزایش مقاومت به کپک خاکستری (*gray mold*) شد (Sridevi et al., 2008). مشارکت PI^۱‌های سیب‌زمینی در القای مقاومت توسط محققین بیان شد، آن‌ها اظهار داشتند که جاسمونیک اسید در محل زخم به صورت موضعی و سیستمیک تولید شده و در نتیجه منجر به افزایش سطح PI ها می‌شود (Ozeretskovskaya et al., 2009). مطالعه بر روی گیاهان آرابیدوپسیس تلقیح شده با قارچ *Phytophthora palmivora* تحت تیمار

^۱ - Proteinase inhibitors

با فسفیت، نشان دهنده افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تجمع سریع سیتوپلاسمی بود، درحالی‌که تلقیح با قارچ *Phytophthora cinnamomi* با افزایش بیان پنج ژن دفاعی که در مسیر تولید سالیسیلیک اسید (SA)، جاسمونیک اسید (JA) و اتیلن (ET) نقش دارند، همراه بود (Daniel et al., 2006). تنظیم افتراقی^۱ اعضای متعلق به خانواده *pgip* در پاسخ به محرک‌های مرتبط با تنش برای گونه‌های مختلف از جمله آرابیدوپسیس (Ferrari et al., 2003)، یونجه (Song and Nam, 2005) و کلزا (Hegedus et al., 2008) گزارش شده است. گیاهان سیب زمینی ترا ریخت با بیان ژن دیفنسین گیاه واسابی^۲، فعالیت ضد قارچی علیه قارچ *Botrytis cinerea* نشان دادند (Khan et al., 2006). در آزمایشی که توسط ان تیو (۲۰۱۰) انجام شد انتقال ژن دیفنسین از واسابی به هندوانه ابوجهل توسط *Agrobacterium tumefaciens* صورت گرفت. نتایج نشان داد که لاین‌های ترا ریخت هندوانه ابوجهل بالاترین مقاومت را در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* و *Alternaria solani* نشان دادند. نتایج تحقیقات بنهامو و همکاران (۱۹۸۹) نشان داد که کیتیناز در ریشه گیاهان گوجه فرنگی آلوده به قارچ *F.oxysporum* در مناطقی از دیواره‌های سلول میزبان که در تماس نزدیک با قارچ بود، یافت شد. در گیاهان خربزه آلوده شده به قارچ *F.oxysporum* نیز افزایش کیتیناز کلاس ۳ مشاهده شد که می‌تواند در مقاومت گیاه نسبت به قارچ موثر باشد (Balde et al., 2006). بریست و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که افزایش میزان بیان ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در ارتباط با افزایش سطح مقاومت در درختان سیب نسبت به بیماری باکتریایی آتشک درختان دانه‌دار می‌باشد. مطالعات نشان داده است که با استفاده از یکسری مواد القا کننده که باعث افزایش بیان برخی از ژن‌های *PR* در گیاهان می‌شوند، می‌توان افزایش مقاومت نسبت به برخی عوامل بیماریزا را ایجاد نمود (Francis et al., 2009). PGIP1 و PGIP2 لوبیا قادرند مانع فعالیت پلی‌گالاکتورناز قارچ *Stenocarpella maydis* پاتوژن قارچی

^۱- the differential regulation

^۲-Wasabi

ذرت، شوند (Berger et al., 2000). بیان بالای دیفنسین‌ها و تیونین‌ها در گیاهان تراریخته باعث کاهش رشد پاتوژن‌های گوناگون شامل *Fusarium Alternaria* و *Plasmodiophara* می‌شود و مقاومت در برابر *Verticillium* در سیب‌زمینی را در شرایط مزرعه‌ای فراهم می‌کند (De Lorenzo et al., 2001). فعالیت PGIP ها در ایجاد ممانعت از تخریب دیواره و حمله قارچی توصیف شده است. پروتئین PGIP در گیاه گوجه‌فرنگی دیواره‌های سلولی را از تخریب توسط آنزیم‌های تولید شده بوسیله *Fusarium oxysporum* حفظ می‌نماید (Jones et al., 1972). افزایش حساسیت میوه‌های گلابی رسیده به قارچ‌های *D.gregaria* و *B.cinerea* با کاهش غلظت PGIP هماهنگ است (Abu-Goukh et al., 1983). در تمشک، سطح PGIP در میوه‌های سبز نارس، حداکثر است در نتیجه این میوه‌های نارس نسبت به میوه‌های رسیده در مقابل حمله قارچی مقاوم‌ترند (Johnston et al., 1993). پاول و همکارانش مؤثر بودن PGIP در دفاع گیاهی را با انتقال *pgip1* گلابی (*Pyrus communis*) به گوجه فرنگی به منظور کاهش حساسیت به پاتوژن *B. cinerea* نشان دادند (Powell et al., 2000). اهمیت ژن بتا ۳و۱ گلوکاناز جهت افزایش مقاومت گیاهان در برابر قارچ‌های بیماریزا در سال‌های اخیر توسط محققین مختلفی گزارش شده است. کوتا و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که آنزیم بتا ۳و۱ گلوکاناز بخشی از سیستم دفاعی میوه گوجه فرنگی نسبت به آلودگی قارچی (*Alternaria alternata*) می‌باشد. همچنین شتی و همکاران (۲۰۰۱) نقش آنزیم بتا ۳و۱ گلوکاناز را در ایجاد مقاومت در گیاه *Pennisetum glaucum* در مواجهه با قارچ *Sclerospora graminicola* گزارش نمودند. یوشیکاوا و همکاران (۱۹۹۳) در تحقیقات خود ژن گلوکاناز با منشاء سویا را به گیاه توتون انتقال داده و اثرات مطلوبی در نتیجه بیان این ژن در کاهش توسعه قارچ‌های *Phytophthora parasitica* و *Alternaria alternata* مشاهده نمودند. مسعود و همکاران (۱۹۹۶) ژن گلوکاناز را به گیاه یونجه انتقال دادند و در گیاهان تراریخت کاهش علائم توسعه قارچ *Phytophthora megaspore* را گزارش نمودند.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱ زمان و موقعیت جغرافیایی محل اجرای آزمایش

در این پژوهش، کشت گیاه و القای تیمارهای آزمایش در گلخانه تحقیقاتی با شرایط کنترل شده، و کارهای آزمایشگاهی در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری اجرا شد. این منطقه واقع در ۹ کیلومتری جاده خزر آباد به طول جغرافیایی ۵۳ درجه و ۱۳ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۲ دقیقه شمالی از نصف النهار گرینویچ واقع شده است و میانگین ارتفاع آن از سطح دریا ۱۴ متر است.

۳-۲ کاشت مواد گیاهی

ابتدا بذرهای خیار (رقم سلطان) با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و چند بار با آب مقطر شستشو داده شد (Thao and Yamakawa, 2008). سپس بذرها را در پتری دیش‌های حاوی یک ورق کاغذ صافی مرطوب قرار داده و پس از بستن پتری دیش‌ها با پارافیلیم، پتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و بذرها جوانه دار شدند. بذرهای جوانه دار در گلدان‌های پلاستیکی که حاوی کوکوپیت، پرلیت و پیت با نسبت ۱، ۲، ۱ بودند، کشت شدند. گلدان‌ها در سینی‌های پلاستیکی قرار گرفته و آبیاری از قسمت زیرین صورت گرفت. گیاهچه‌ها در گلخانه در شرایط کنترل شده دما (۲۴-۲۸ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۵-۱۸ درجه در شب) و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت داده شدند.

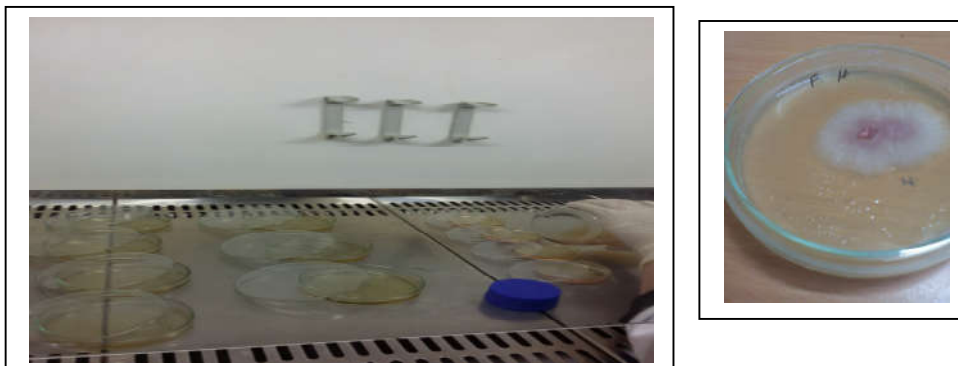


شکل ۳-۱ کشت گیاه خیار در گلدان‌های پلاستیکی در شرایط کنترل شده گلخانه

۳-۳ تهیه تیمارها

۳-۳-۱ تهیه زاد مایه قارچ عامل بیماری

به منظور تهیه زاد مایه قارچ عامل بیماری ماسه و آرد ذرت به نسبت ۹ به ۱ (۹۰ گرم ماسه و ۱۰ گرم آرد ذرت) مخلوط شده و چند میلی لیتر آب مقطر نیز جهت تامین رطوبت به آن اضافه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر در اتوکلاو ضدعفونی شدند. پس از خنک شدن مخلوط‌ها، به هر ظرف چهار قطعه به قطر پنج میلی‌متر از محیط کشت چهار روزه قارچ (تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی ورامین) اضافه شد و مخلوط‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه تا چهار هفته نگهداری شدند تا قارچ در مخلوط ماسه-آرد ذرت به طور کامل رشد کند. سپس این مخلوط با خاک ضدعفونی شده (کوکوپیت، پرلیت و پیت به نسبت ۱، ۲، ۱) به نسبت دو درصد وزنی مخلوط شد. در گلدان‌های شاهد از مخلوط ماسه و آرد ذرت استریل شده به تنهایی استفاده شد (Molavi et al., 2009).



شکل ۲-۳ کشت قارچ *Fusarium. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

۲-۳-۳ تهیه ترکیب شیمیایی فسفیت پتاسیم

جهت تهیه این ترکیب ابتدا ۴۰cc محلول ۱۰ مولار KOH و ۲۰cc محلول ۵ مولار اسید فسفرو تهیه شد. سپس با نسبت‌های معین با هم ترکیب شده و در نهایت فسفیت پتاسیم (KH_2PO_3) با $\text{pH}=6/3$ جهت اسپری برگ گیاه تهیه شد.

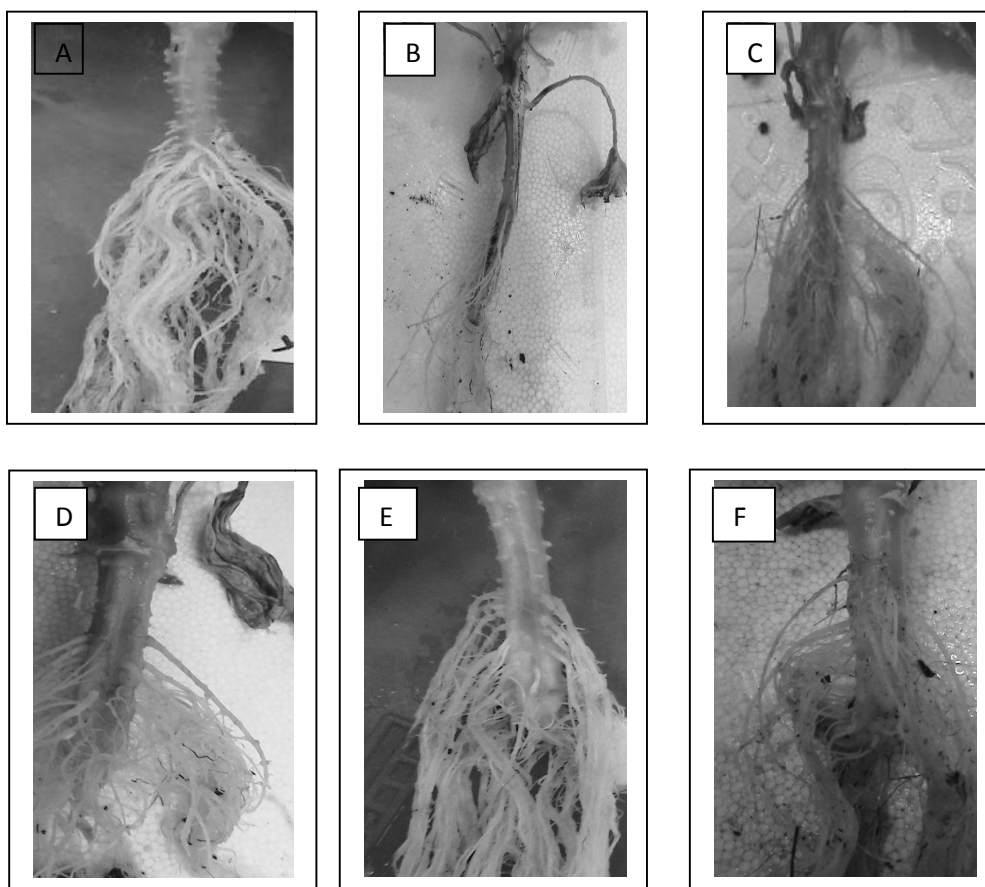
۴-۳ تلقیح مصنوعی گیاهچه‌های خیار با تیمارهای مربوطه

گیاهان در مرحله یک تا دو برگ حقیقی با فسفیت پتاسیم با غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر اسپری برگ شده و پس از ۵ روز به خاک آلوده به قارچ و شاهد منتقل شدند. در گلخانه با شرایط کنترل شده (دمای روز ۲۴-۲۸ و دمای شب ۱۴-۱۸، با رطوبت نسبی ۶۰٪ در روز و ۷۵٪ در شب و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) تا ظهور علائم بیماری نگهداری شدند.

۳-۵ اندازه گیری صفات رشدی و فیزیولوژیکی

۳-۵-۱ ارزیابی شدت پوسیدگی

برای ارزیابی شدت پوسیدگی از روش ژانک و همکاران (Zang et al., 1996) استفاده شد. در این روش نمره ۱ برای گیاهچه‌هایی که به طور کامل سالم بوده و هیچ علائمی ندارند، نمره ۲ برای پوسیدگی خفیف ریشه (کمتر از یک سوم ریشه پوسیده باشد)، نمره ۳ برای پوسیدگی متوسط ریشه (یک سوم یا دو سوم ریشه پوسیده باشد) و نمره ۴ برای پوسیدگی شدید ریشه (بیشتر از دو سوم ریشه پوسیده) و یا گیاه از بین رفته باشد (مرگ گیاهچه) در نظر گرفته می‌شود.



شکل ۳-۴ شدت پوسیدگی در ریشه تیمارهای مختلف گیاهان خیار. A: عدم تلقیح قارچ، B: قارچ، C: قارچ+فسفیت ۱ گرم بر لیتر، D: قارچ+فسفیت ۲ گرم بر لیتر، E: قارچ+فسفیت ۴ گرم بر لیتر، F: قارچ+فسفیت ۶ گرم بر لیتر

۳-۵-۲ اندازه گیری میزان کلروفیل برگ

برای اندازه گیری میزان کلروفیل برگ ۷ روز پس از اعمال تنش قارچی، ۶ عدد پانچ از برگ های خیار برداشته و در ۸ میلی لیتر متانول غوطه ور شده در تاریکی و دمای اتاق قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان نور جذبی محلول در طول موج های ۶۶۵/۲ و ۶۵۲/۴ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Analytic jena- SPEKOL 1300) خوانده و ثبت شد و در نهایت میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل به ترتیب با استفاده از روابط ۱ تا ۳ محاسبه گردیده و بر حسب میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد.

$$c_a(\mu g / ml) = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4} \quad \text{رابطه ۱-۳}$$

$$c_b(\mu g / ml) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2} \quad \text{رابطه ۲-۳}$$

$$c_{a+b}(\mu g / ml) = c_a + c_b \quad \text{رابطه ۳-۳}$$

در این رابطه ها:

به ترتیب C_a ، C_b و $C_{(a+b)}$ کلروفیل a، b و کلروفیل کل و $A_{665.2}$ ، $A_{652.4}$ ، میزان نور جذبی محلول در طول موج های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و نانومتر می باشد.

۳-۵-۳ اندازه گیری وزن تر ریشه و اندام هوایی

در هفتمین روز پس از تلقیح گیاهچه ها با قارچ اندازه گیری وزن تر ریشه و اندام هوایی با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم صورت پذیرفت.

۳-۶ نمونه گیری مواد گیاهی برای بررسی آنزیمی و بیوشیمیایی

نمونه برداری از برگ‌های شاهد و آلوده در ۵ زمان (۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ روز پس از تلقیح) و در ۳ تکرار از گیاهان شاهد (عدم تلقیح قارچ و تیمار شده با آب مقطر) و آلوده (تلقیح شده با قارچ و تیمار شده با غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم) انجام گردید.

جدول ۳-۱ نمونه گیری آنزیم

نمونه/ زمان	۱ روز	۳ روز	۵ روز	۸ روز	۱۱ روز
شاهد	A11,A12,A13	A31,A32,A33	A51,A52,A53	A81,A82,A83	A111,A112,A113
آلوده + فسفیت ۰	B11,B12,B13	B31,B32,B33	B51,B52,B53	B81,B82,B83	B111,B112,B113
آلوده + فسفیت ۱	C11,C12,C13	C31,C32,C33	C51,C52,C53	C81,C82,C83	C111,C112,C113
آلوده + فسفیت ۲	D11,D12,D13	D31,D32,D33	D51,D52,D53	D81,D82,D83	D111,D112,D113
آلوده + فسفیت ۴	E11,E12,E13	E31,E32,E33	E51,E52,E53	E81,E82,E83	E111,E112,E113
آلوده + فسفیت ۶	F11,F12,F13	F31,F32,F33	F51,F52,F53	F81,F82,F83	F111,F112,F113

(گیاه شاهد در سری اول نمونه گیری- تکرار ۱، تکرار ۲، تکرار ۳ به ترتیب: A11، A12، A13)

۳-۷ استخراج محلول آنزیمی

جهت استخراج محلول‌های آنزیمی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز ۰/۵ گرم از نمونه برگ‌گی با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع هموژن گردید و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH=۷/۵) محتوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار، اضافه شد. هموژن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰۰ در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. برای

پیشگیری از اثرات مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها، محلول آنزیمی به دست آمده به سه قسمت تقسیم و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Sairam et al., 2003).

۳-۸ ثبت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و متابولیت های گیاهی

۳-۸-۱ کاتالاز

کمپلکس واکنش شامل ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7)، ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی می‌باشد. حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. با افزودن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز می‌گردد و کاهش در جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت ۱ دقیقه ثبت گردید. تغییر جذب بدست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $36/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی از محاسبه میزان پراکسید هیدروژن تجزیه شده توسط آنزیم محاسبه گردید (Aebi, 1984).

۳-۸-۲ سوپراکسید دیسموتاز

جهت اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، از ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۵۰ میلی مولار، ۳۰۰ میکرولیتر متیونین ۱۲ میلی مولار، ۳۰۰ میکرولیتر نیتروبلوتترازولیوم کلراید ۷۵ میکرو مولار، ۳۰۰ میکرولیتر ریوفلاوین ۱ میکرومولار و ۳۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. پس از آنکه مخلوط به هم زده شد، لوله‌های آزمایش شیشه‌ای، به مدت ده دقیقه، در زیر یک لامپ فلورسنت ۱۵ وات به فاصله ۳۵ سانتی‌متر قرار داده شد. با خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. همچنین از یک لوله آزمایش حاوی مخلوط واکنش به جزء عصاره آنزیمی به عنوان بلانک استفاده گشت. یک واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار ۵۰ درصد احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم می‌گردد. (Gentle et al., 2001).

۳-۸-۳ پراکسیداز

کمپلکس واکنش شامل ۱ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH=7)، ۲۵۰ میکرو لیتر EDTA ۰/۱ میلی مولار، ۱ میلی لیتر گایاکول ۵ میلی مولار، ۱ میلی لیتر پراکسید ۱۵ میلی مولار و ۵۰ میکرو لیتر محلول آنزیمی استخراج شده می باشد. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی شروع شده و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی بر اساس میزان تتراکلایکول تشکیل شده و با استفاده از ضریب خاموشی $1.33 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ به دست آمد (Chance and Maehly, 1955).

۳-۸-۴ پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دی آلدئید

نیم گرم از برگها در ۱۰ میلی لیتر از محلول ۰/۱٪ تری کلرواستیک اسید هموژن و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. ۲ میلی لیتر از سوپرناتانت حاصل با ۴ میلی لیتر از محلول ۲۰٪ تری کلرواستیک اسید محتوی ۵/۰٪ تیوباربیتوریک اسید مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل گردید. نمونه ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. جذب نمونه ها در طول موج ۵۳۳ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسید شدن لیپیدها از اختلاف بین طول موج های جذبی در ضریب خاموشی $1.55 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ بدست آمد (Stewart and Bewley, 1980).

۳-۸-۵ پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

ابتدا ۰/۵ گرم نمونه برگی هموژن شد و سپس به آن ۵ میلی لیتر از محلول ۰/۱٪ تری کلرواستیک اسید (وزنی-حجمی) اضافه گردید و در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس کمپلکس واکنش حاوی ۰/۵ میلی لیتر از سوپرناتانت، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH=7) و یک

میلی لیتر KI یک مولار تهیه و میزان جذب آنها در طول موج ۳۹۰ نانومتر سنجش گردید. میزان پراکسید هیدروژن با استفاده از منحنی استاندارد بدست آمد (Sergiev et al., 1997).

۳-۹ ارزیابی میزان کل پروتئین محلول و سنجش پروتئین استاندارد

جهت تعمیم فعالیت آنزیم به میلی گرم پروتئین موجود در بافت، میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌ها به روش Bradford به شرح ذیل تعیین شد. ابتدا سه میلی لیتر معرف برادفورد همراه با ۳۰ میکرولیتر عصاره برگ گیاه کامل مخلوط شده و مقدار جذب نور در ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر از لوله‌های شاهد که شامل فقط سه میلی لیتر معرف برادفورد بود استفاده شد (Bradford, 1976).

۳-۹-۱ تهیه منحنی استاندارد

از سرم آلبومین گاوی برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. طبق روش Bradford مقدار پنج میلی گرم از این سرم در آب مقطر سترون حل و از آن به ترتیب ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر به لوله‌های آزمایش حاوی سه میلی لیتر معرف برادفورد اضافه شد و مقدار جذب نور مخلوط در ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. سپس بین میزان سرم و اعداد جذب به دست آمده معادله رگرسیون و منحنی مربوط به آن بدست آمد.

۳-۱۰ آنالیز داده‌ها

این تحقیق به صورت آزمایش اسپلیت پلات در زمان بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. پنج سطح تیمار فسفیت پتاسیم (غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر) به عنوان فاکتور

اصلی و پنج زمان اندازه گیری (۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ روز پس از تلقیح با قارچ) به عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد استفاده شد.

۱۱-۳ نمونه گیری مواد گیاهی برای Real time-PCR

نمونه برداری از برگ‌های شاهد و آلوده به قارچ تحت تیمار با غلظت‌های ۰، ۱ و ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم در سه تکرار و ۴ زمان (۱، ۳، ۵ و ۸ روز پس از تلقیح) انجام گردید.

۱۲-۳ استخراج RNA کل

جهت استخراج RNA کل از گیاه خیار از معرف ترایزول^۱ که حاوی فنل و گوانیدین تیوسیانات^۲ است، استفاده گردید. استخراج به شرح زیر صورت گرفت:

۱. ابتدا بافت برگ‌ها با استفاده از نیتروژن مایع در هاون پودر گردید. سپس محلول ترایزول به منظور لیز کردن سلول‌ها و دناتوره کردن پروتئین‌ها و غیر فعال نمودن نوکلئازها به مقدار ۱ میلی‌لیتر به ازای ۰/۱ گرم برگ اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت.

۲. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم به ازای هر ۱ میلی‌لیتر ترایزول اضافه شد و برای مدت ۱۵ ثانیه ورتکس کرده و بعد از آن به مدت ۳-۲ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردید.

^۱-Trizol-invitrogen

^۲-Guanidinium thiocyanate

۳. نمونه‌ها برای ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور 12000^1 rpm سانتریفوژ گردیدند.

۴. پس از تشکیل دو فاز کاملاً مشخص، فاز بالایی که شفاف و حاوی RNA بود با دقت جمع‌آوری شده و به یک تیوب جدید منتقل گردید.

۵. به هر نمونه مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با دور 12000 rpm سانتریفوژ گردیدند.

۶. پس از آن، RNA به صورت یک رسوب سفید رنگ در انتهای تیوب قابل مشاهده است و سپس محلول بالایی دور ریخته شد و سه بار با الکل اتانول ۷۵٪ شستشو داده شد.

۶. نمونه برای ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با دور 8000 rpm سانتریفوژ گردید و پس از حذف اتانول، نمونه پس از ۱۰-۵ دقیقه خشک شده و به آن آب تیمار شده با DEPC اضافه گردید.

۳-۱۲-۱ تیمار RNA با آنزیم DNase

به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی DNA از RNA، از کیت DNase I, RNase-free شرکت فرمنتاز استفاده گردید.

۱. مواد زیر به تیوب RNase-free اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد.

¹-Revolution per minute

جدول ۳-۲ ترکیبات واکنش تیمار RNA با آنزیم DNase

ماده	حجم مورد نیاز برای یک واکنش (میکرولیتر)
RNA	10
بافر آنزیم DNase I	2
آنزیم DNase I	2
آب تیمار شده با DEPC	1-6
جمع	20

۲. مقدار ۱ μg محلول EDTA ۵۰ میلی مولار به تیوب جهت غیرفعال سازی فعالیت آنزیم DNase اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد. برای تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از روش ژل آگارز و اسپکتروفتومتری استفاده شد.

۳-۱۲-۲ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده:

۳-۱۲-۲-۱ الکتروفورز

برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده، الکتروفورز انجام گردید. ۲ میکرولیتر از نمونه‌های RNA همراه با نشانگر با اندازه مولکولی ۱۰۰ bp، بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی با استفاده از اتیدیوم بروماید^۱ صورت گرفت. پس از رنگ آمیزی، با استفاده از دستگاه عکس برداری ژل، باندهای مورد نظر بررسی شدند.

۳-۱۲-۲-۲ اسپکتروفتومتری

RNA با توجه به ساختارش، حداکثر جذب را در ۲۶۰nm دارا می‌باشد. در این طول موج یک واحد جذب (OD^۲) معادل ۴۰ میکروگرم RNA در هر میکرولیتر می‌باشد. نسبت OD₂₆₀ به OD₂₈₀ درجه

^۱ - Ethidium bromide

^۲ - Optical Density

خلوص RNA را مشخص می‌نماید که این نسبت ($A_{260/280}$) تقریباً بایستی در محدوده ۲-۱/۸ باشد. در صورت وجود آلودگی‌های پروتئینی این نسبت کاهش می‌یابد. نسبت OD₂₆₀ به OD₂₃₀ میزان آلودگی به مواد فنلی و پلی ساکارید را نشان می‌دهد. در این روش از رقت ۲/۱۰۰ نمونه RNA در آب مقطر و دستگاه اسپکتوفتومتر استفاده شد. برای اندازه‌گیری غلظت RNA ابتدا دستگاه اسپکتوفتومتر با ۹۸ میکرولیتر آب دیونیزه، بلانک (استاندارد) شد. سپس ۲ میکرولیتر از RNA استخراج شده از برگ گیاه به کوت کوارتز تزریق و همگن گردید. سپس میزان جذب نوری در طول موج‌های ذکر شده اندازه‌گیری شدند.

۳-۱۳ سنتز cDNA

پنج میکرولیتر از mRNA استخراج شده در آب تیمار شده با DEPC همراه ۱ میکرولیتر آغازگر oligo(dt)₁₈ در یک میکروتیوپ مخلوط کرده (حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر) و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد. پس از پایان زمان انکوباسیون، تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شدند و پس از آن مواد لازم طبق جدول زیر به هر تیوب اضافه گردید (جدول ۳-۳)

جدول ۳-۳ ترکیبات واکنش ساخت رشته اول cDNA

ماده	برای هر واکنش (μl)	غلظت ماده
بافر آنزیم Reverse Transcriptase	۴	۵X
DNTPmix	۲	۱۰Mm
RiboLock RNase Inhibitor	۱	-
M-MUL V Reverse Transcriptase	۱	-
ترکیب RNA و پرایمر	۱۲	-
جمع	۲۰	-

تیوب‌ها به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، به منظور غیرفعال کردن آنزیم Reverse transcriptase، تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. cDNA حاصل تا زمان مصرف در ۳۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

۳-۱۴ طراحی پرایمر

بطور کلی برای طراحی پرایمر در Real-Time علاوه بر موارد مورد توجه در طراحی پرایمر معمولی، باید موارد زیر را نیز در نظر داشته باشیم:

۱- بهتر است درصد GC پرایمر در حدود ۶۰-۴۰ درصد باشد.

۲- در ۵ باز هر دو انتهای پرایمرها بیشتر از ۲ G یا C پشت سر هم نباشد.

۳- در کل طول پرایمر سه عدد C یا G و یا بیشتر پشت سر هم نباشد.

۴- تفاوت T_m دو پرایمر بیشتر از ۲ درجه نباشد.

۵- بهتر است از انتهای ۳ پرایمر Reverse باز A/T باشد.

۶- طول قطعه تکثیری بین ۱۸۰-۵۰ bp باشد.

در این آزمایش از ژن خانه‌دار اکتین به عنوان ژن مرجع استفاده گردید. برای طراحی پرایمر از نرم افزار Primer Premier ver 5.0 و Oligo Explorer ver 1.4 استفاده شد و برای سنتز به شرکت فزا پژوه فرستاده شد.

جدول ۳-۴ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی بیان ژن

نام پرایمر	توالی ۳' → ۵'	طول قطعه تکثیری
Pgip1F	TCCAATCTCGATGTTCTCGACCT	۱۶۹
Pgip1R	GGTAGAGATAAAGGACTTTTCC	
Chitinase F	GCGGTTTTGGATGGCGTTGAT	۱۴۱
Chitinase R	GTCTAGGTGAGCGTCTGGTA	
Defensin F	GAGGCGAGGGTATGCGAATC	۱۲۹
Defensin R	GCAGCGACGGCGAAATCC	
Betagluconase F	AGTTTCCACTGCGTTCCACACT	۱۵۳
Betagluconase R	TAAGGGTACAAGTTGAGGAGCA	
Actin F	GATTCTGGTGATGGTGTGAGTC	۱۵۵
Actin R	TCGGCAGTGGTGGTGAACAT	

۳-۱۵ انجام Real-Time PCR

ابتدا پرایمرهایی با غلظت ۱۰ پیکومول تهیه کرده، سپس Master Mix، پرایمرها و DEPC treated water به دمای محیط رسانیده و بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه (short spin) آماده استفاده شدند، استریپ‌های (تیوب‌های ۱۰۰ میکرولیتری متصل به هم) مخصوص دستگاه (BioRAD Real-Time PCR) بر روی یخ در زیر هود قرار داده و به آنها ۶/۵ میکرو لیتر Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر اضافه شد. در این مرحله cDNA روی یخ ذوب گردید و بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه (short spin)

آماده شد و به هر استریپ ۱ میکرولیتر اضافه گردید (جدول ۳-۵)، استریپ‌ها را در دستگاه قرار داده و PCR طبق برنامه دمایی زیر انجام شد (جدول ۳-۶).

جدول ۳-۵ اجزاء مخلوط واکنش Real-time PCR

غلظت	مقدار (μl)	ماده
-	۶/۵	Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2X)
0/3 μM	۰/۵	پرایمر Forward
0/3 μM	۰/۵	پرایمر Reverse
≤500 ng	۱	Template DNA
-	۴	آب عاری از نوکلئاز
-	۱۲/۵	جمع

جدول ۳-۶ برنامه دمایی Real-time PCR

زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	مرحله واکنش	سیکل
۱۰ دقیقه	۹۵	فعال سازی و واسرشته سازی اولیه	اول
۱۵ ثانیه	۹۵	واسرشته سازی	دوم (۴۰ تکرار)
۶۰ ثانیه	۶۰	اتصال و بسط	

۳-۱۶ محاسبه داده‌های Real-time PCR

نرخ بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) اندازه‌گیری شد. در ابتدا میانگین سیکل آستانه تکرارهای هر ژن محاسبه شد. میانگین CT ژن هدف از میانگین CT ژن خانه دار اکتین (*Actin*) کم شده و شاخص ΔCt بدست آمد. سپس ΔCt زمان صفر به عنوان کالیبره برای بقیه زمان‌ها استفاده گردید.

$$\Delta CT_{\text{sample}} = CT_{\text{target}} - CT_{\text{actin}}$$

رابطه ۳-۴

$$\Delta CT_{\text{calibrator}} = CT_{(\text{target, calibrator})} - CT_{(\text{actin, calibrator})}$$

رابطه ۳-۵

سپس ΔCT نمونه به ΔCT کالیبراتور نرمال سازی شد.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{calibrator}}$$

رابطه ۳-۶

نهایتاً بیان هر ژن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد استفاده شد.

فصل چہارم

نتایج و بحث

۱-۴ بررسی مورفولوژیکی و زراعی

۱-۱-۴ اثر فسفیت پتاسیم بر خصوصیات مورفولوژیک- زراعی در گیاهان خیار تلقیح شده با

قارچ *F. oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum*

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سطوح مختلف فسفیت پتاسیم بر روی درصد پوسیدگی، میزان کلروفیل و وزن تر ریشه و اندام هوایی خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۱-۴). در این تحقیق تیمار گیاهچه‌های خیار با فسفیت پتاسیم توانسته منجر به کاهش درصد پوسیدگی و افزایش میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل a+b، وزن تر ریشه و وزن تر اندام هوایی گردد.

جدول ۱-۴ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات صفات درصد پوسیدگی، کلروفیل a، b، a+b، وزن تر ریشه و وزن تر ساقه

میانگین مربعات							منابع تغییرات
وزن تر ساقه	وزن تر ریشه	کلروفیل a+b	کلروفیل b	کلروفیل a	درصد پوسیدگی	درجه آزادی (df)	
۱۰۱۵۳۷۳**	۴۲۰۳۴۸**	۳۶۵۴۴۶**	۰۲۱۰۷۰**	۲۱۷۰۰۰**	۲۸۸۰۹۵۲**	۷	تیمار
۰۵۲۵۷	۰۴۳۰۹	۰۲۰۴۳	۰۰۴۳۴	۰۰۹۶۵	۰۲۳۳۳۳	۱۰	خطا
۹۵۴	۱۴۹۲	۶۵۰	۹۰۹	۶۶۶	۱۷۰۴		ضریب تغییرات

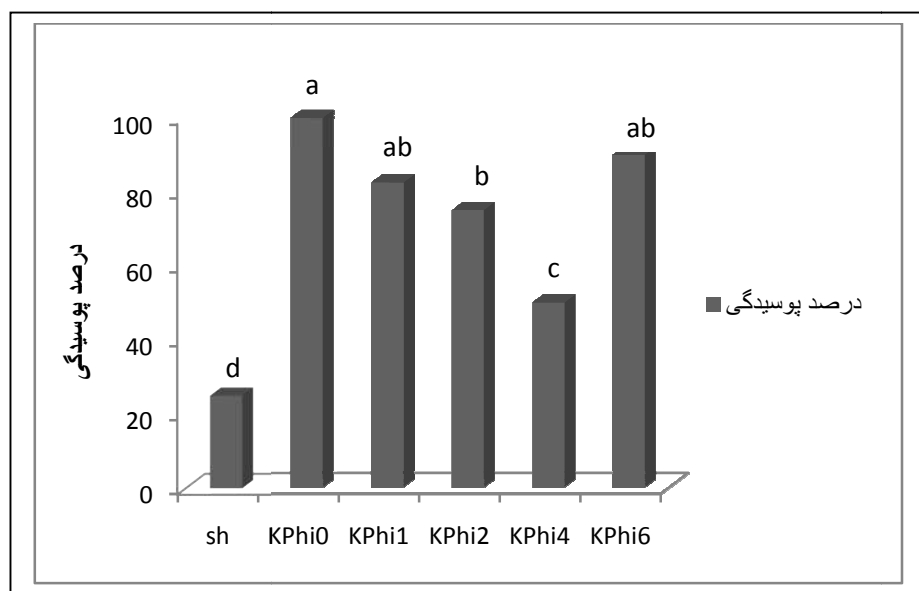
** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

۱-۱-۱-۴ بررسی تغییرات مقاومت گیاهچه‌های خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم، تحت تنش

قارچ *F. oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum*

بر اساس جدول ۱-۴ تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف این آزمایش در شاخص درصد پوسیدگی ریشه از نظر آماری در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده شد. نتایج در شکل ۱-۴ نشان می‌دهد که شاخص

درصد پوسیدگی در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم (KPhi4) نسبت به تیمار قارچ کمترین مقدار را داشته است. همچنین درصد پوسیدگی در تیمارهای KPhi0، KPhi1، KPhi2، KPhi4 و KPhi6 به ترتیب ۱۰۰، ۸۲/۵، ۷۵، ۵۰ و ۹۰ درصد مشاهده شد.



شکل ۴-۱ شاخص درصد پوسیدگی ریشه خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم ۲۱ روز پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6) به ترتیب عدم تلقیح قارچ، تلقیح قارچ+غلظت ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

۴-۱-۱-۲ اثر فسفیت پتاسیم بر محتوای کلروفیل گیاهچه‌های خیار تحت تنش *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

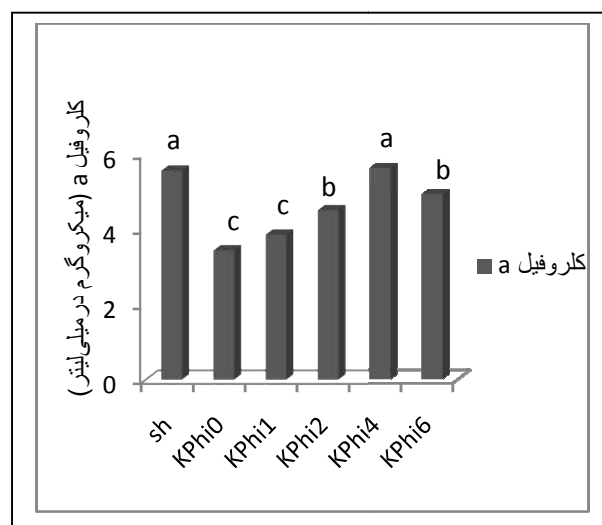
نتایج تجزیه واریانس پارامترهای فیزیولوژیکی (جدول ۴-۱) نشان داد که اثر سطوح مختلف فسفیت پتاسیم بر روی محتوای کلروفیل در برگ‌های خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل a (۵/۶۳ μg.ml)، کلروفیل b (۲/۵۴ μg.ml) و کلروفیل a+b (۸/۱۷ μg.ml) به ترتیب مربوط به تیمار KPhi4 (غلظت ۴ گرم بر لیتر فسفیت)، شاهد (تلقیح نشده با قارچ) و KPhi4 و

کمترین میزان کلروفیل a ($3/44 \mu\text{g.ml}$)، کلروفیل b ($1/83 \mu\text{g.ml}$) و کلروفیل a+b ($5/27 \mu\text{g.ml}$) مربوط به تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت) می‌باشد (شکل ۴-۱). همچنین با محلول‌پاشی فسفیت پتاسیم، در غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۶ گرم بر لیتر پس از تلقیح با قارچ، محتوای کلروفیل a به ترتیب ۳۸، ۳۰/۵، ۱۸/۸ و ۱۱/۳ درصد نسبت به گیاهان شاهد (تلقیح نشده با قارچ) کاهش یافته، در حالیکه در غلظت ۴ گرم بر لیتر ۱/۲ درصد نسبت به شاهد افزایش یافته است. این درحالی است که میزان کلروفیل a در تیمارهای ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت به ترتیب ۱۲/۲، ۳۱/۲، ۶۳/۶ و ۴۳/۳ درصد نسبت به تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت) افزایش یافته است.

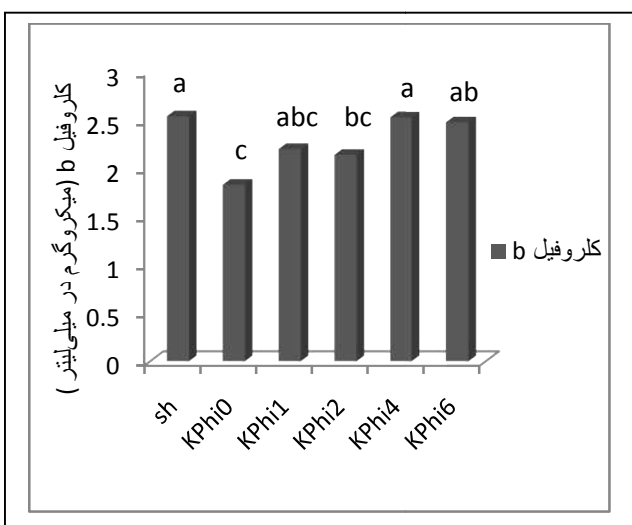
کلروفیل b نیز در گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ، تحت تیمارهای ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم به ترتیب ۲۷/۹، ۱۳/۳، ۱۵/۷، ۰/۳ و ۲/۳ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد. همچنین میزان کلروفیل b در تیمارهای ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت به ترتیب ۲۰/۲۱، ۱۶/۹، ۳۸/۲ و ۳۵/۵ درصد نسبت به تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت) افزایش یافت.

کلروفیل a+b نیز در تیمارهای ۰، ۱، ۲ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم به ترتیب ۳۴/۹، ۲۵/۱، ۱۷/۹ و ۸/۳ درصد نسبت به شاهد کاهش داشت درحالیکه تیمار ۴ گرم بر لیتر آن ۰/۸ درصد نسبت به شاهد افزایش یافته است. این درحالی است که کلروفیل a+b در تمامی تیمارهای فسفیت نسبت به تیمار قارچ افزایش یافته است.

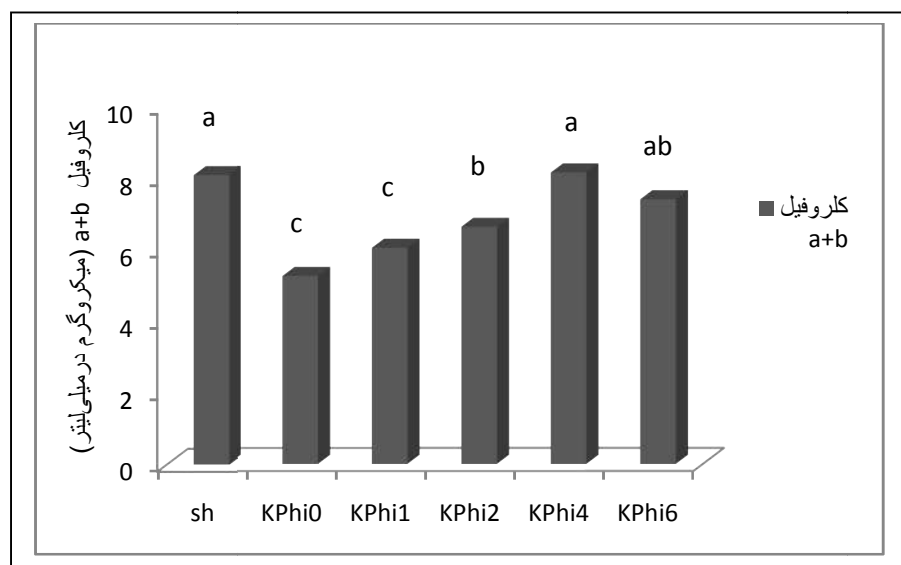
الف



ب



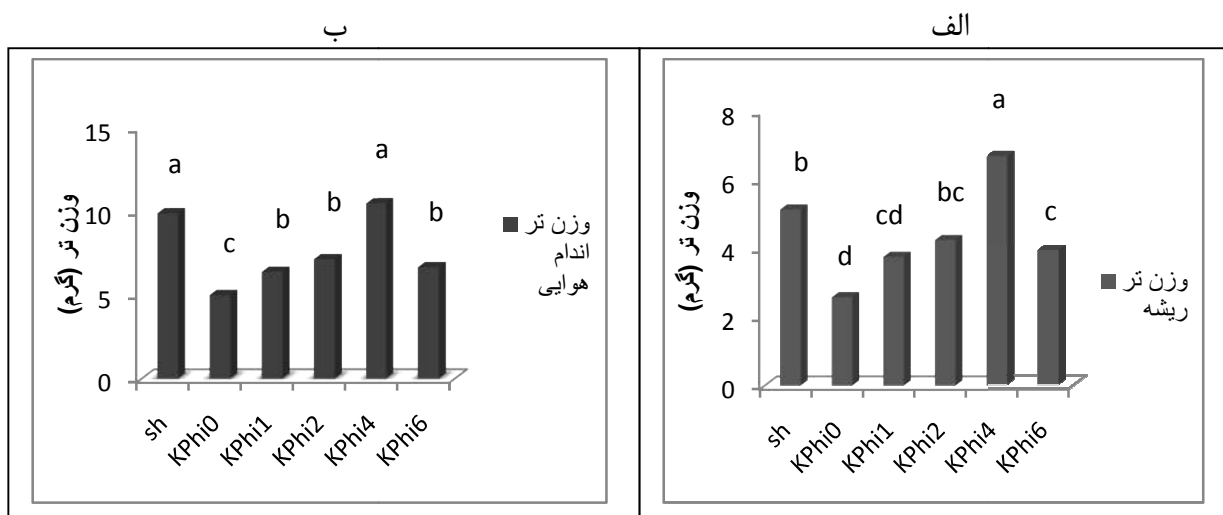
ج



شکل ۲-۴ تغییرات میزان کلروفیل a (الف)، کلروفیل b (ب) و کلروفیل a+b (ج) در بافت برگ گیاهان خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم، ۷ روز پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (sh, kPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6) به ترتیب عدم تلقیح قارچ، تلقیح قارچ+غلظت ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

۴-۱-۱-۳ اثر فسفیت پتاسیم بر وزن تر گیاهچه‌های خیار تحت تنش *F.oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

با توجه به شکل ۳-۴ سطوح مختلف فسفیت پتاسیم، وزن تر ریشه و اندام هوایی را در گیاهچه‌های خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* افزایش داد. بیشترین مقدار وزن تر ریشه (۶/۶۹ گرم) و وزن تر اندام هوایی (۱۰/۴۸ گرم) در تیمار ۴ گرم برلیتر فسفیت (KPhi4) و کمترین مقدار وزن تر ریشه (۲.۵۸ گرم) و وزن تر اندام هوایی (۵ گرم) در تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت) مشاهده شد. نتایج نشان داده است که با محلول‌پاشی فسفیت پتاسیم، در غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر میزان وزن تر ریشه به ترتیب ۰/۴، ۰/۶، ۱/۵ و ۰/۵ برابر نسبت به تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت) و وزن تر اندام هوایی به ترتیب ۰/۲، ۰/۴، ۱/۰۹ و ۰/۳ برابر نسبت به تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت) افزایش نشان داده است.



شکل ۳-۴ وزن تر ریشه (الف) و وزن تر اندام هوایی (ب) گیاهچه‌های خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم ۷ روز پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6) به ترتیب عدم تلقیح قارچ، تلقیح قارچ+غلظت ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

۲-۴ بررسی‌های آنزیمی و بیوشیمیایی

۱-۲-۴ اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان خیار تلقیح

شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سطوح مختلف فسفیت پتاسیم و اثر زمان و همچنین اثر متقابل این دو عامل بر روی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در برگ‌های خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲-۴). همچنین میزان تولید آنزیم‌های دفاعی در زمان‌های مختلف و تیمار با غلظت‌های مختلف فسفیت پتاسیم نیز تفاوت معنی‌داری نشان داده و فسفیت پتاسیم توانسته منجر به افزایش تجمع آنزیم‌های دفاعی گردد.

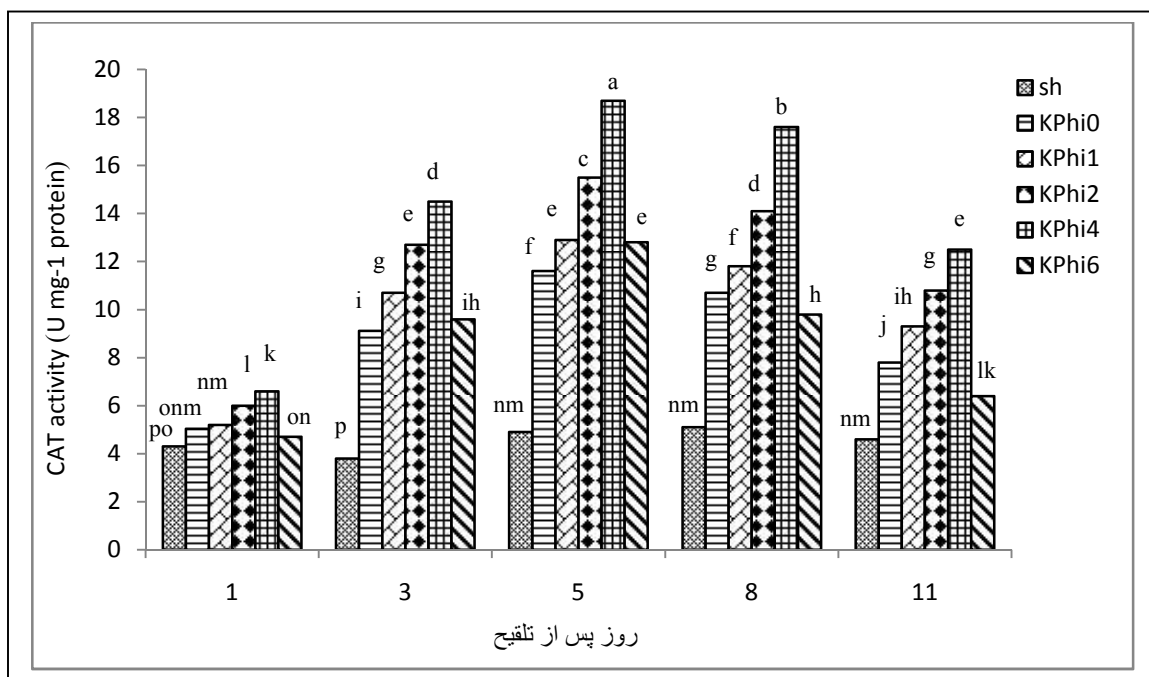
جدول ۲-۴ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات صفات کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید

میانگین مربعات					درجه آزادی (df)	منابع تغییرات
مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	سوپراکسید دیسموتاز	گایاکول پراکسیداز	کاتالاز		
۷۱۹۸.۶۵۶**	۰.۱۵۳**	۲۱.۳۷۹**	۳۰۵۹۲.۴۸۹**	۱۵۶.۴۰۱**	۵	فسفیت پتاسیم
۰.۹۵	۰.۰۰	۰.۰۰۱	۱۱.۰۰۷	۰.۱۳۷	۱۲	(Ea) خطای اصلی
۵۷۸۳.۰۳۲**	۰.۳۵۹**	۱۸.۸۹۶**	۷۰۶۵.۲۱۳**	۱۵۰.۶۹۳**	۴	زمان
۲۹۴.۵۳۳**	۰.۰۱۵**	۱.۲۱۶**	۱۲۸۵.۶۹۱**	۷.۴۶۲**	۲۰	فسفیت پتاسیم × زمان
۱.۴۳۷	۰.۰۰	۰.۰۰۰	۴.۳۸۶	۰.۱۲۶	۴۸	(Eb) خطای فرعی
۱.۳۰	۱.۲۱۹	۰.۱۷۵	۱.۸۲۵	۳.۷۱۹		ضریب تغییرات

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

۴-۲-۱-۱ اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

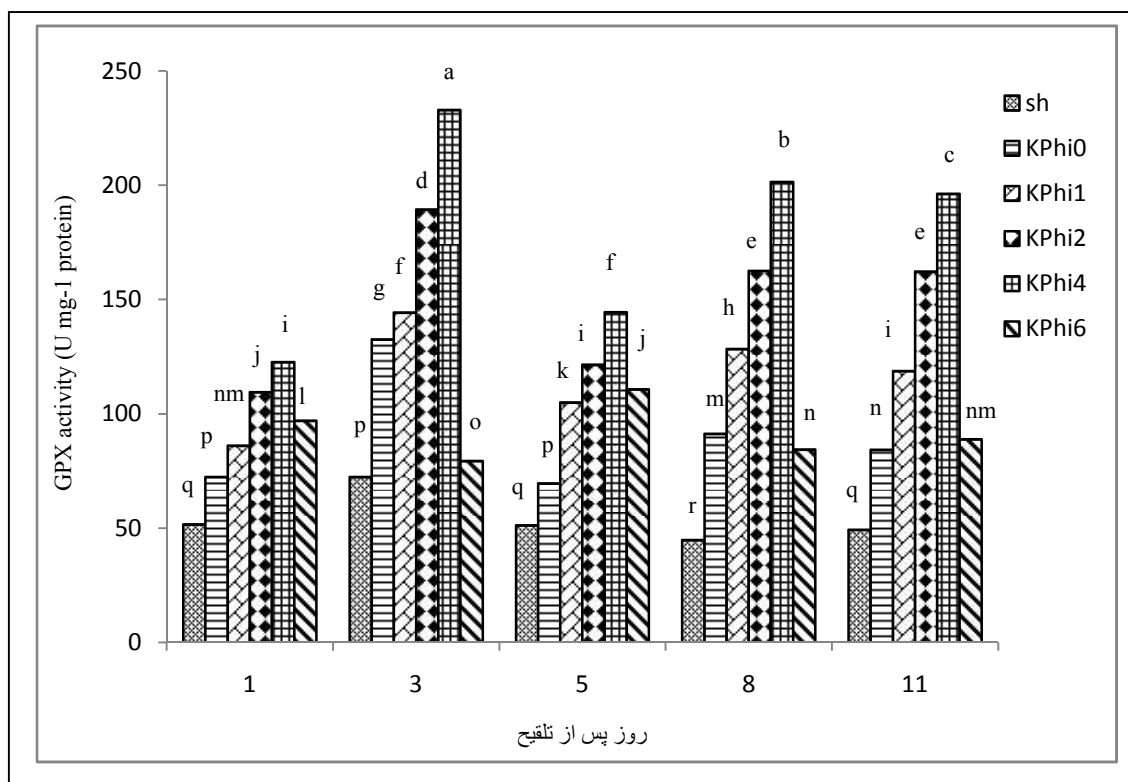
نتایج مقایسه میانگین داده‌ها برای اثر متقابل آنزیم کاتالاز (شکل ۴-۴) نشان داد که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم ($18.7 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم و بعد از ۵ روز پس از تلقیح با قارچ و کمترین میزان فعالیت آن ($3.8 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) در گیاهان شاهد (تلقیح نشده با قارچ) و در روز سوم بوده است. نتایج نشان داد که صرف نظر از زمان، با افزایش غلظت فسفیت پتاسیم تا غلظت ۴ گرم بر لیتر، فعالیت آنزیم کاتالاز نیز افزایش و پس از این غلظت کاهش می‌یابد. با محلول‌پاشی فسفیت پتاسیم، در غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فعالیت این آنزیم به ترتیب ۱/۶۳، ۲/۱۶، ۲/۸۱ و ۱/۶۱ برابر در روز پنجم نسبت به شاهد افزایش نشان داده و پس از آن سیر نزولی پیدا کرده است.



شکل ۴-۴ تغییرات میزان آنزیم کاتالاز در بافت‌های گیاهان خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم طی ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ روز پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6) به ترتیب عدم تلقیح قارچ، تلقیح قارچ+غلظت ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

۴-۲-۱-۲ اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

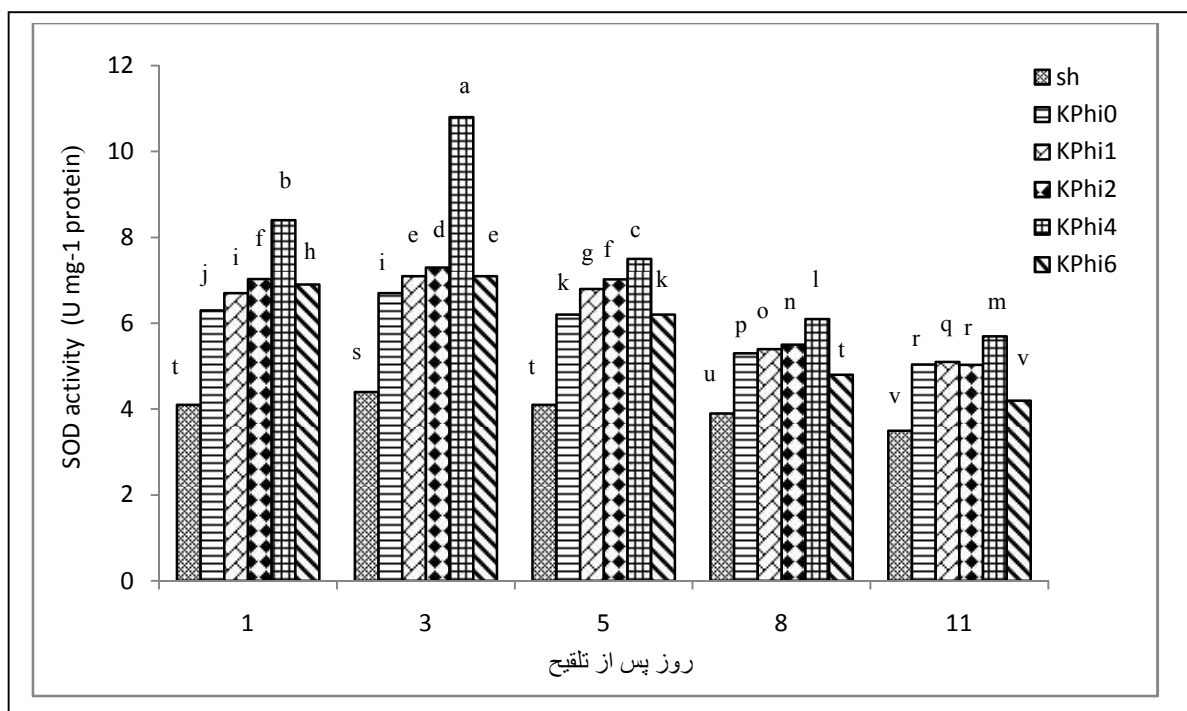
میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم در تمامی تیمارها در روز سوم پس از تلقیح با قارچ حداکثر بوده است. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم ($U\ mg^{-1}$ protein) در تیمار ۴ گرم بر لیتر در سومین روز پس از تلقیح با قارچ و کمترین میزان فعالیت این آنزیم ($44/8\ U\ mg^{-1}$ protein) در تیمار شاهد و در روز هشتم بوده است. فعالیت این آنزیم همانند فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم حداکثر بوده و با محلول پاشی فسفیت پتاسیم، در غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فعالیت این آنزیم به ترتیب ۰/۸۳، ۰/۹۸، ۱/۶۱، ۲/۲۱ و ۰/۰۹۶ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داده است (شکل ۴-۵).



شکل ۴-۵ تغییرات میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز در بافت‌های گیاهان خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم طی روزهای ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6) به ترتیب عدم تلقیح قارچ، تلقیح قارچ+غلظت ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

۴-۲-۱-۳ اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز همانند دو آنزیم آنتی‌اکسیدانی دیگر در تیمار فسفیت پتاسیم با غلظت ۴ گرم بر لیتر بیشترین مقدار ($10/8 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) را در روز سوم پس از تلقیح با قارچ و در تیمار شاهد کمترین مقدار ($3/5 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) را در روز یازدهم نشان داده است. همچنین در تمامی تیمارهای فسفیت پتاسیم با غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فعالیت این آنزیم به ترتیب ۰/۵۲، ۰/۶۱، ۰/۶۵، ۱/۴ و ۰/۶۱ برابر افزایش یافته بود (شکل ۴-۶).

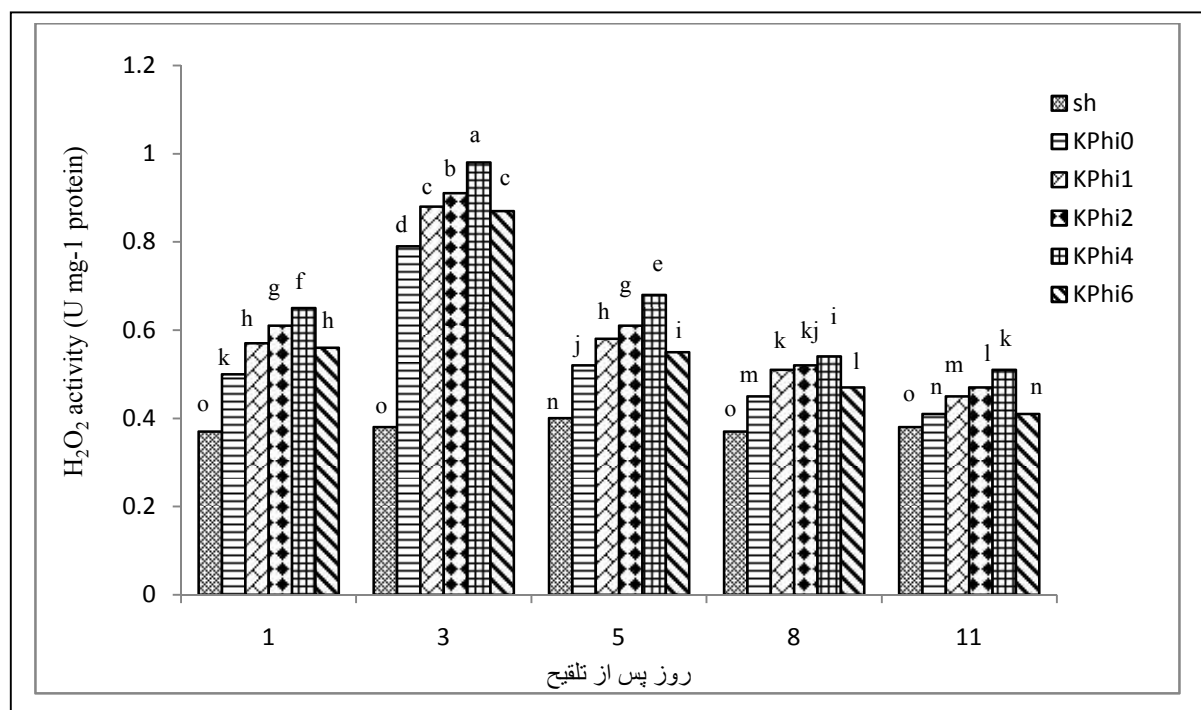


شکل ۴-۶ تغییرات میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت‌های گیاهان خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم طی روزهای ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6) به ترتیب عدم تلقیح قارچ، تلقیح قارچ+غلظت ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

۴-۱-۲-۴ اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت پراکسید هیدروژن در برگ‌های خیار تیمار شده

با قارچ *F.oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum*

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴-۲) نشان داد که اثر سطوح مختلف فسفیت پتاسیم و اثر زمان و همچنین اثر متقابل این دو عامل بر روی فعالیت پراکسید هیدروژن در برگ‌های خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها برای اثر متقابل (شکل ۴-۷) نشان داد که بیشترین میزان فعالیت پراکسید هیدروژن (U mg⁻¹ protein) در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم و ۳ روز پس از تلقیح با قارچ و کمترین میزان فعالیت آن (۰/۳۷ U mg⁻¹ protein) مربوط به گیاهان شاهد (تلقیح نشده با قارچ) و ۱۱ روز پس از تلقیح با قارچ بوده است. نتایج نشان داده است که صرف نظر از زمان، با افزایش غلظت فسفیت پتاسیم تا غلظت ۴ گرم بر لیتر، فعالیت پراکسید هیدروژن افزایش یافته است. همچنین با محلول‌پاشی فسفیت پتاسیم، در غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر در سومین روز پس از تلقیح قارچ، فعالیت پراکسید هیدروژن ۱/۰۷، ۱/۳۱، ۱/۳۹، ۱/۵۷ و ۱/۲۸ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داده است (شکل ۴-۷).

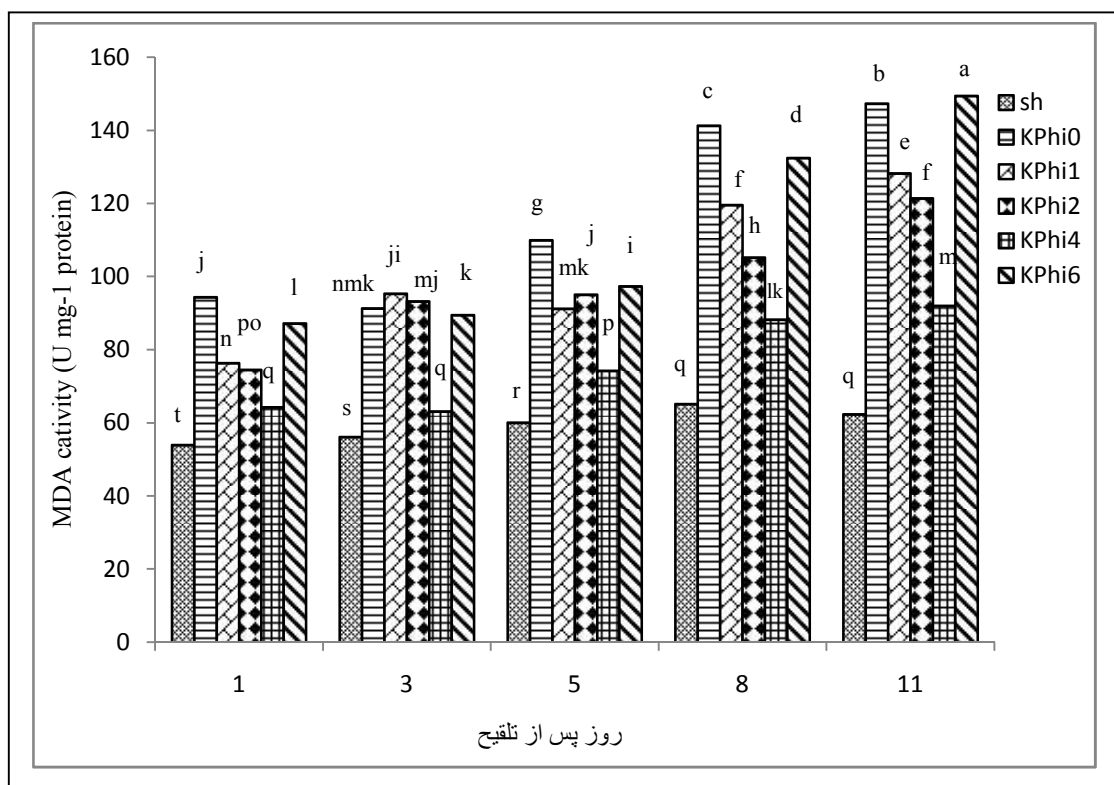


شکل ۴-۷ اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در بافت‌های خیار تیمار شده با قارچ *F.oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (sh, kPhi0, kPhi1, kPhi2, kPhi4, kPhi6) به ترتیب عدم تلقیح قارچ، تلقیح قارچ+غلظت ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

۴-۲-۱-۵ اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دی آلدئید در

برگ‌های خیار تیمار شده با قارچ *F.oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴-۲) نشان داد که اثر سطوح مختلف فسفیت پتاسیم و اثر زمان و همچنین اثر متقابل این دو عامل بر روی فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی (مالون دی آلدئید) در برگ‌های خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها برای اثر متقابل نشان داد که بیشترین مقدار مالون دی آلدئید مربوط به تیمار ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم ($149/4 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) در روز ۱۱ پس از تلقیح با قارچ و کمترین میزان آن ($53/9 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) مربوط به تیمار شاهد و در روز اول می‌باشد (شکل ۴-۸). نتایج نشان داده است که صرف نظر از زمان، با افزایش غلظت فسفیت پتاسیم تا غلظت ۴ گرم بر لیتر، میزان فعالیت مالون دی آلدئید کاهش یافته است. با محلول‌پاشی فسفیت پتاسیم، در غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فعالیت مالون دی آلدئید به ترتیب $1/36$ ، $1/05$ ، $0/94$ ، $0/47$ و $1/39$ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داده است.

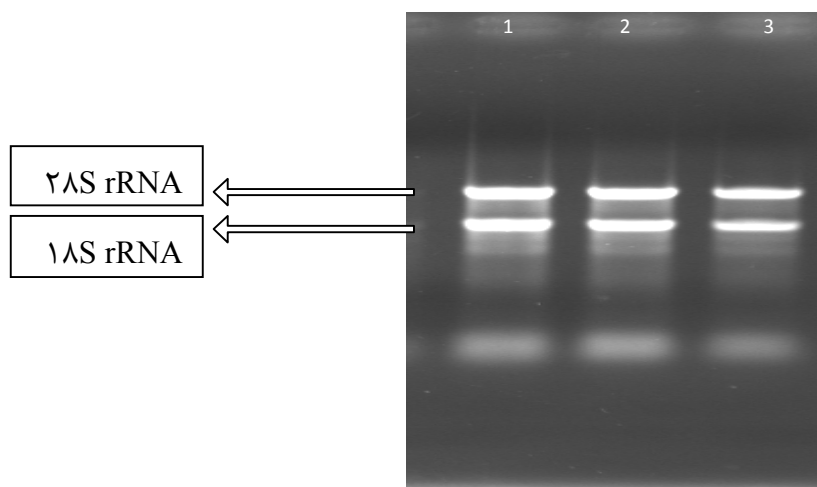


شکل ۴-۸ میزان تغییرات مالون دی آلدئید در بافت‌های گیاهان خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم طی روزهای ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6) به ترتیب عدم تلقیح قارچ، تلقیح قارچ+غلظت ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

۳-۴ بررسی مولکولی

۳-۴-۱ استخراج RNA از بافت برگ خیار

نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد و مقایسه آن با نشانگر اندازه مولکولی ۱۰۰bp نشان داده که RNA های استخراج شده از نمونه‌های بافت برگ خیار، از کیفیت مناسب جهت ساخت cDNA برخوردار هستند. در نمونه‌های یوکاریوتی RNA کل استخراج شده سالم و کامل باید دارای باندهای ۲۸S rRNA و ۱۸S rRNA واضح و مشخص بوده و شدت باند مرتبط با S ۲۸rRNA تقریباً دو برابر یا بیشتر از باند ریبوزومی دیگر باشد. این نسبت می‌تواند معیار مناسبی دال بر سالم و بی عیب بودن RNA استخراجی باشد (شکل ۴-۹).

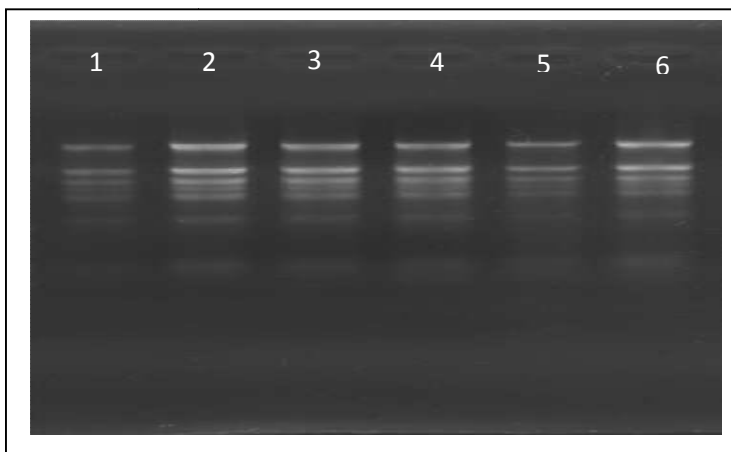


شکل ۴-۹ نمونه RNA استخراج شده از برخی تیمارها بر روی ژل آگارز ۱ درصد

کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر نیز تعیین شد. نتایج حاصل نشان داد که RNA استخراجی از کیفیت و کمیت مناسب جهت سنتز cDNA برخوردار می باشد.

۴-۳-۱ بررسی RNA پس از حذف DNA

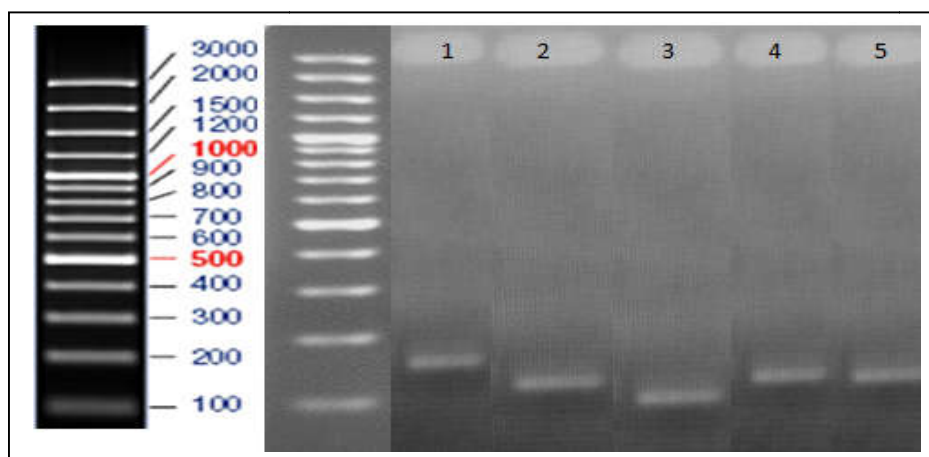
پس از استخراج RNA، به منظور اطمینان از عدم وجود DNA به همراه RNA استخراج شده، پس از اندازه گیری غلظت RNA با دستگاه اسپکتروفتومتری، طبق پروتکل مربوطه RNA با آنزیم DNAase تیمار شده و مجدداً RNA قبل از ساخت cDNA از نظر کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴-۱۰).



شکل ۴-۱۰- RNA استخراجی بعد از تیمار با DNAase بر روی ژل آگارز ۱ درصد

۴-۳-۱-۲ انجام PCR با cDNA

پارامترهای بسیار موثر در انجام PCR بهینه سازی شدند. بدین منظور غلظت‌ها و مقادیر مختلف $MgCl_2$ ، آغازگرها، DNA ژنومی و مقدار آنزیم Taq DNA polymerase جهت رسیدن به شرایط بهینه واکنش PCR مورد بررسی قرار گرفت. محصولات PCR با ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۴-۱۱). الکتروفورز بر اساس قطعه تکثیری توسط پرایمرها، باندهای حدود ۱۶۹، ۱۴۱، ۱۲۹، ۱۵۳ و ۱۵۵ (bp) ۱ به ترتیب برای PCR با پرایمرهای pgip، کیتیناز، دیفنسین، ۱،۳-بتاگلوکاناز و اکتین نشان داد.



شکل ۴-۱۱ محصولات PCR با cDNA حاصل از RNA جدا شده از نمونه گیاهی و پرایمرهای pgip(169 bp) (چاهک ۱)، chitinase(چاهک ۲)، defensin(چاهک ۳)، ۱،۳- β -گلوکاناز (چاهک ۴) و actin (155bp) (چاهک ۵)

۴-۳-۲ بررسی‌های بیان ژن

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه با تیمارهای قارچ، قارچ + غلظت ۱ گرم برلیتر و قارچ + غلظت ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم در زمان‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ روز پس از تلقیح صورت گرفت.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سطوح مختلف فسفیت پتاسیم و اثر زمان و همچنین اثر متقابل این دو عامل بر روی بیان ژن‌های *pgip* کیتیناز، دیفنسین و ۱ و ۳-بتاگلوکاناز در برگ‌های خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۳). همچنین میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در زمان‌های مختلف و تیمار با غلظت‌های مختلف فسفیت پتاسیم نیز تفاوت معنی‌داری نشان داده است.

جدول ۴-۳ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات بیان ژن‌های *pgip*، کیتیناز، دیفنسین و ۱-۳، بتاگلوکاناز

میانگین مربعات					
منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	<i>pgip</i>	کیتیناز	دیفنسین	۱-۳، بتاگلوکاناز
فسفیت پتاسیم	۲	۱۵۲/۴۲۰**	۷۳۲۶/۳۹۵**	۱۸۴۸/۵۰**	۱۱۰۳/۵۸۹**
Ea (خطای اصلی)	۶	۰/۷۸۵	۱۴/۳۴۲	۶/۹۱۵	۳/۳۶۴
زمان	۳	۱۹/۷۰۶**	۴۲۸۱/۸۹۰**	۲۷۵۷/۶۹**	۱۲۴۷/۸۶۳**
فسفیت پتاسیم × زمان	۶	۲۰/۵۹۴**	۱۱۲۷/۶۶۹**	۷۴۰/۸۸۰**	۴۳۰/۷۳۸**
Eb (خطای فرعی)	۱۸	۱/۰۷۴	۲۴/۸۱۱	۱۷/۵۹۱	۳/۹۸۵
ضریب تغییرات		۲۸/۱۳۳	۱۶/۶۱۳	۲۳/۹۶۸	۱۸/۱۲۲

- ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

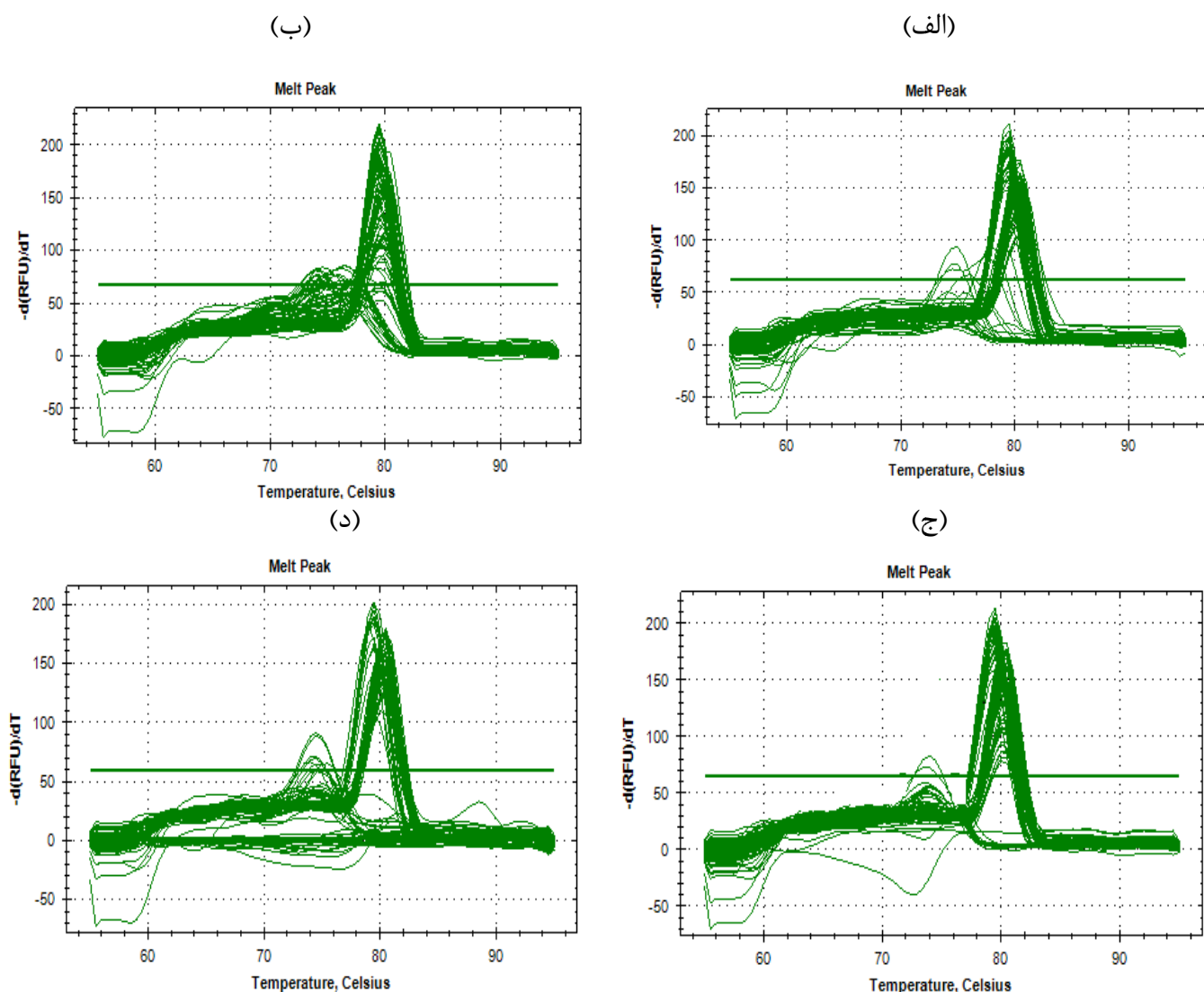
۴-۳-۲-۱ بررسی منحنی‌های ذوب محصولات PCR

از آنجایی که اختصاصی عمل نمودن آغازگرها در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی از اهمیت بالایی برخوردار است به همین منظور در پایان هر واکنش با رسم منحنی‌های ذوب برای هر آغازگر می‌توان از اختصاصی بودن آن‌ها اطمینان حاصل نمود.

مراحل انجام کار به این ترتیب است که برای رسم منحنی، دستگاه دمای نمونه‌ها را در فواصل زمانی مشخص (مثلاً هر 11 ثانیه) به مقدار معینی تغییر می‌دهد. بطور مثال ابتدا دستگاه دمای نمونه‌ها را به 94 درجه سانتی‌گراد می‌رساند. در این حالت تمام cDNA ها به صورت تک رشته‌ای هستند و میزان سایبرگرین متصل شده حداقل است. در نتیجه میزان فلورسانس ساطع شده کم می‌باشد. به تدریج دستگاه دمای نمونه‌ها را ۱/۵ درجه سانتی‌گراد کاهش داده و ۱۱ ثانیه در آن دما ثابت می‌ماند و در این مدت نور ساطع شده از نمونه‌ها توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌شود. همزمان با این عمل منحنی تغییرات فلورسانس بر حسب دما که همان منحنی ذوب است ترسیم می‌گردد. در نقطه ذوب (T_m) ۵۰ درصد پیوندهای هیدروژنی در DNA های دو رشته‌ای از هم جدا شده و میزان فلورسانس بطور ناگهانی تغییر می‌یابد. در صورت مشاهده تنها یک پیک در حدود درجه حرارت ذوب آغازگر مورد بررسی، می‌توان به اختصاصی عمل نمودن آغازگر مطمئن بود. ولی وجود بیش از یک پیک در منحنی رسم شده بیانگر تکثیر قطعات غیر اختصاصی همراه با قطعه هدف می‌باشد که در این صورت می‌بایست آغازگرهای دیگر طراحی نمود. پیک‌های نوک تیز در درجه حرارت‌های ذوب کمتر از درجه حرارت‌های ذوب محصول اختصاصی نشان دهنده جفت شدن آغازگرها به یکدیگر و پیک‌های پهن بیانگر وجود محصولات غیر اختصاصی و یا هاله^۱ هستند.

^۱ - Smear

در این بررسی نیز دمای ذوب آغازگرها در محدوده دمایی اتصال آغازگرها تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت که بررسی نمودارهای ژن مرجع (*Actin*) و ژن‌های *pgip*، دیفنسین، کیتیناز، ۱،۳-بتاگلوکاناز در فازهای مختلف واکنش حاکی از آن است که تشکیل پرایمر-دایمر یا وجود ندارد یا بسیار اندک می‌باشد و نمودار دمای ذوب آغازگرها از کیفیت مناسبی برخوردار می‌باشد (شکل ۴-۱۲).

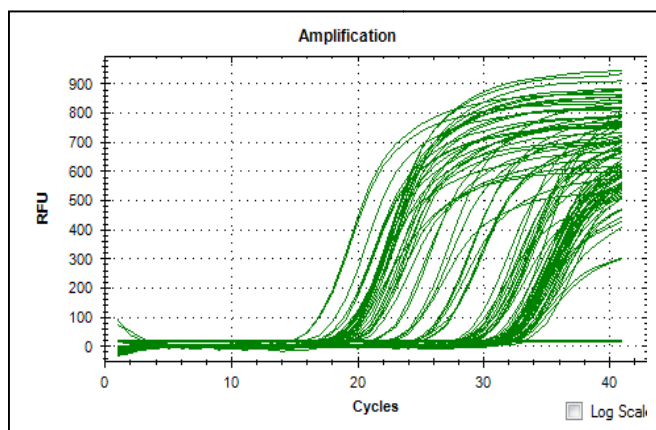
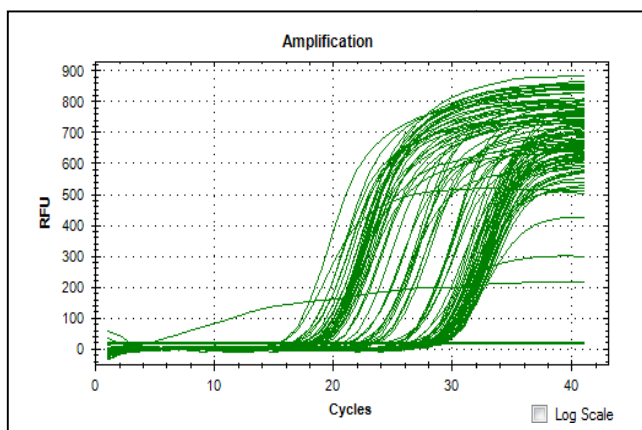


شکل ۴-۱۲ منحنی ذوب محصولات PCR برای ژن‌های دیفنسین(الف)، *pgip* (ب)، کیتیناز (ج) و ۱،۳-بتاگلوکاناز (د)

در این تحقیق بررسی تغییر میزان بیان ژن‌های کد کننده *pgip1* کیتیناز، دیفنسین و ۳،۱-بتاگلوکاناز در بازه زمانی معین بین تیمارهای مختلف فسفیت پتاسیم و شاهد (عدم مصرف فسفیت) مورد ارزیابی قرار رفت. آنالیز منحنی کمیت بیان نشان داد که امپلیکون‌های مورد نظر برای همه‌ی این ژن‌ها با کارایی بسیار بالا تکثیر گردیده است (شکل ۴-۱۳).

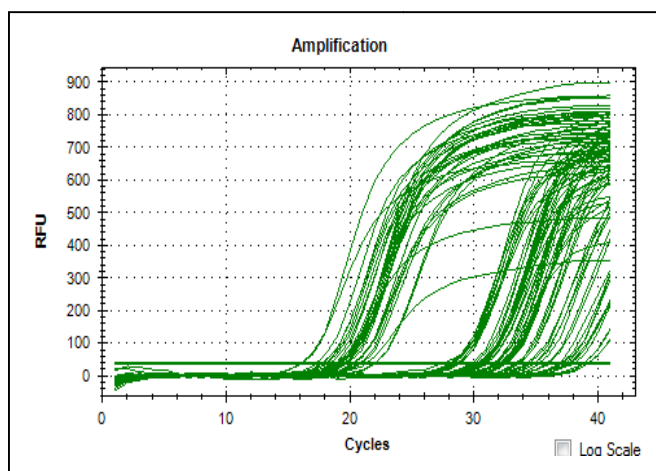
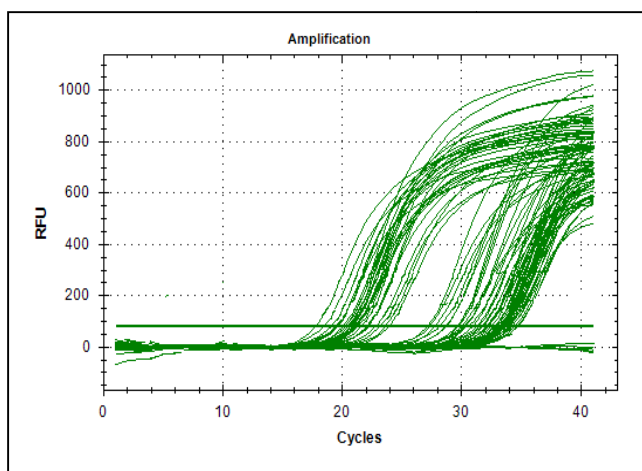
ب

الف



د

ج

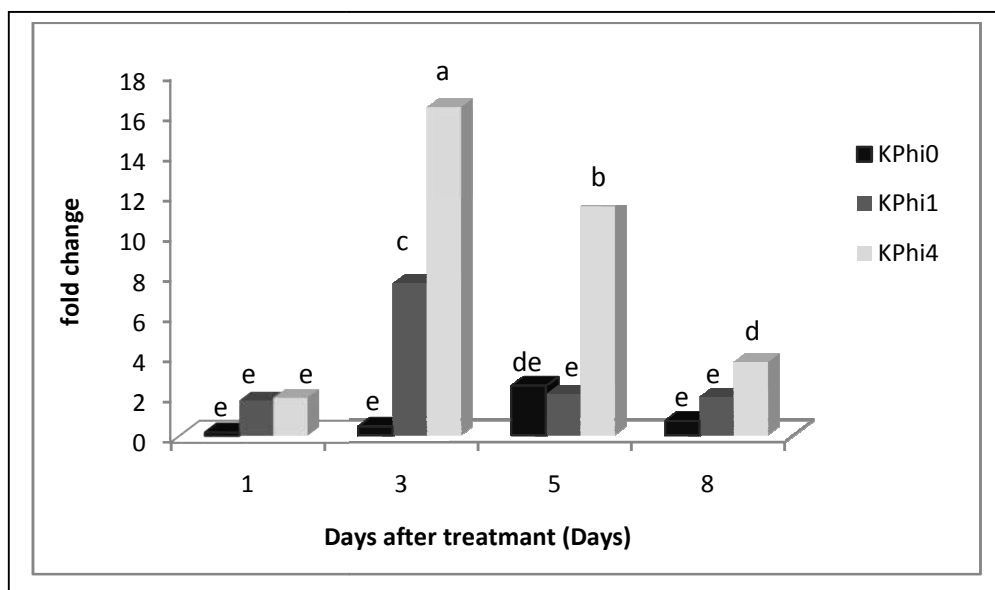


شکل ۴-۱۳ منحنی فلورسانس نمونه‌های cDNA ژن‌های *pgip1* (الف)، کیتیناز (ب)، دیفنسین (ج) و ۳،۱-بتاگلوکاناز (د)

۴-۳-۲-۲ الگوی تظاهر ژن *pgip1*

بررسی روند تغییرات بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (2) نشان داد که به طور کلی بیان ژن در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم در تمام زمان‌ها بیشتر از تیمار ۱ گرم بر لیتر و تیمار قارچ بوده است. همچنین در تیمار *kphi1* و *kphi4* در روز سوم پس از تلقیح با قارچ حداکثر تجمع ژن *pgip* مشاهده شد و پس از آن به تدریج میزان بیان این ژن کاهش یافته است اما در تیمار *kphi0* (تیمار قارچ-عدم مصرف فسفیت پتاسیم) بیشترین تجمع ژن *pgip* در روز پنجم پس از تلقیح با قارچ مشاهده شد (شکل ۴-۱۴).

همچنین الگوی بیان ژن‌های کد کننده پروتئین *PGIP1* در طی چهار بازه زمانی پس از آلوده‌سازی با عامل بیماری فوزاریومی در تیمارهای *kphi0*، *kphi1* و *kphi4* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج *Real time PCR* تایید کرد که بیان این ژن در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم در تمام زمان‌ها به طور قابل توجه و معنی داری بیشتر از تیمار ۱ گرم بر لیتر و تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت) بوده است. بررسی روند تغییرات بیان این ژن نشان می‌دهد که سطح تظاهر این ژن‌ها در زمان‌های مختلف پس از آلودگی در تمام تیمارها متفاوت می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل تغییرات در تظاهر ژن در نتیجه آلودگی به عامل بیماری فوزاریومی نشان داد که رونوشت ژن *pgip1* در روز اول افزایش می‌یابد و در روز سوم به حداکثر مقدار خود می‌رسد. تیمار *kphi1* و *kphi4* در روز سوم پس از آلودگی با میزان بیان ۷/۵ و ۱۶/۳ برابری نسبت به کنترل اختلاف معنی داری را در سطح یک درصد نشان داد (شکل ۴-۱۴).

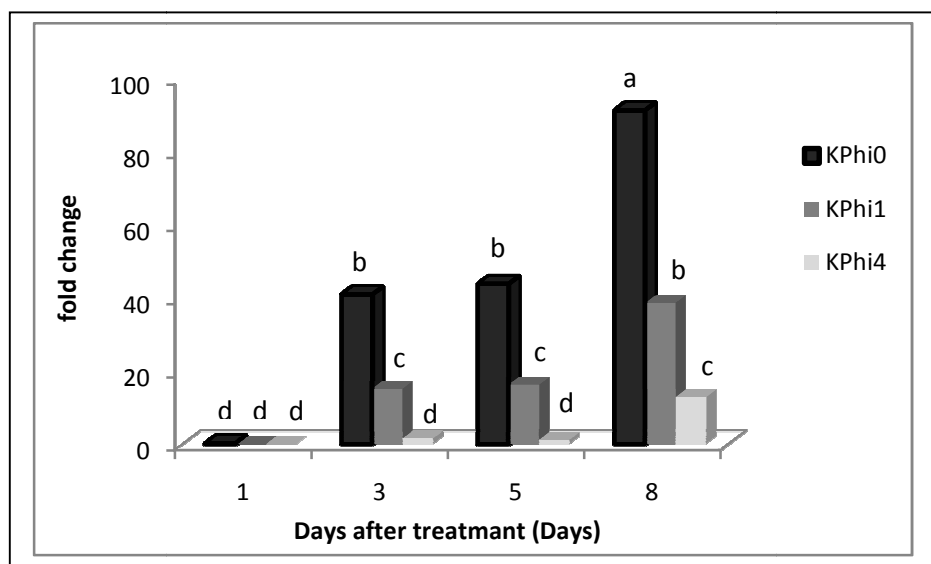


شکل ۴-۱۴ تغییرات بیان ژن *pgip1* در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تحت تیمار با فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف

۴-۳-۲-۳ الگوی تظاهر ژن کیتیناز

روند تظاهر ژن کیتیناز در تیمار قارچ و قارچ + فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف در شکل ۴-۱۵ نشان داده شده است. همانگونه که در این شکل مشاهده می‌شود روند بیان این ژن در بازه‌های زمانی مختلف بعد از اعمال تیمار فسفیت پتاسیم با دو غلظت مختلف نسبت به تیمار قارچ متفاوت است. همچنین بیان ژن کیتیناز در زمان‌های نمونه‌گیری روند افزایشی داشته و میزان تغییرات بیان ژن در تیمارهای *kphi1* و *kphi4* نسبت به تیمار قارچ (*kphi0*) از روز سوم به بعد به طور معنی‌داری کاهش و در هر سه تیمار نسبت به کنترل افزایش یافته است. تیمارهای *kphi0*، *kphi1* و *kphi4* در روز هشتم پس از آلودگی با افزایش میزان بیان $91/2$ ، $38/5$ و $12/8$ برابری نسبت به کنترل (گیاه فاقد قارچ و تیمار فسفیت پتاسیم) اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان داد. تیمار قارچ بیشترین مقدار و تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم کمترین میزان بیان را داشته است. نتایج آزمایش حاکی از رابطه مثبت میزان

بیان با میزان نمو گیاه بود که این افزایش بیان را می‌توان با همبستگی بالای بیان این ژن و رشد و نمو گیاه توجیه کرد. بررسی روند تغییرات بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (2) نشان داد که به طور کلی بیان ژن در تیمار قارچ در تمام زمان‌ها بیشتر از تیمار ۱ گرم بر لیتر و ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم بوده است.

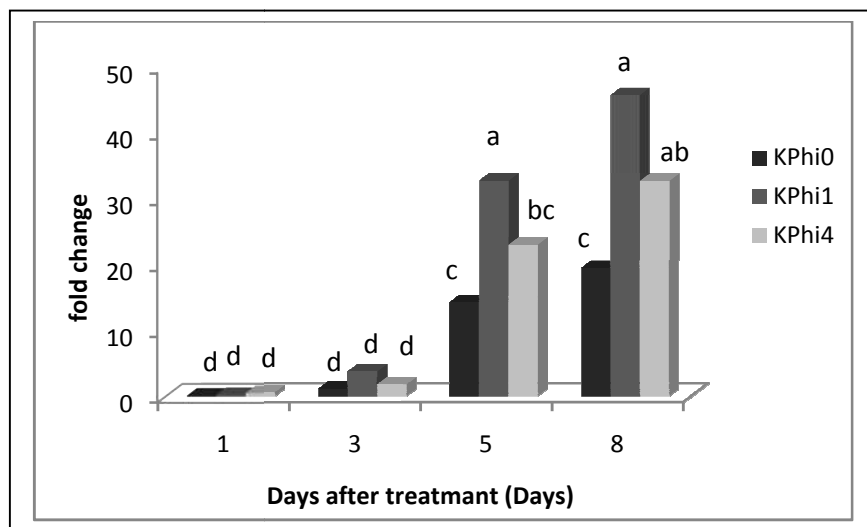


شکل ۴-۱۵ تغییرات بیان ژن *chitinase* در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تحت تیمار با فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف

۴-۳-۲-۴ الگوی تظاهر ژن دیفنسین

روند تظاهر ژن دیفنسین در تیمار قارچ و قارچ + فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف در شکل ۴-۱۶ نشان داده شده است. همانگونه که در این شکل مشاهده می‌شود روند بیان این ژن بعد از اعمال تیمار فسفیت پتاسیم با دو غلظت مختلف در روزهای پنجم و هشتم پس از آلودگی با قارچ عامل بیماری نسبت به تیمار قارچ تفاوت معنی‌داری نشان داد. همچنین بیان ژن *defensin* در کلیه زمان‌های نمونه‌گیری روند افزایشی داشته و میزان تغییرات بیان ژن نسبت به کنترل افزایش یافته است. بررسی روند تغییرات بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (2) در تیمارهای *kphi0*، *kphi1* و *kphi4* در روز هشتم پس از آلودگی با افزایش

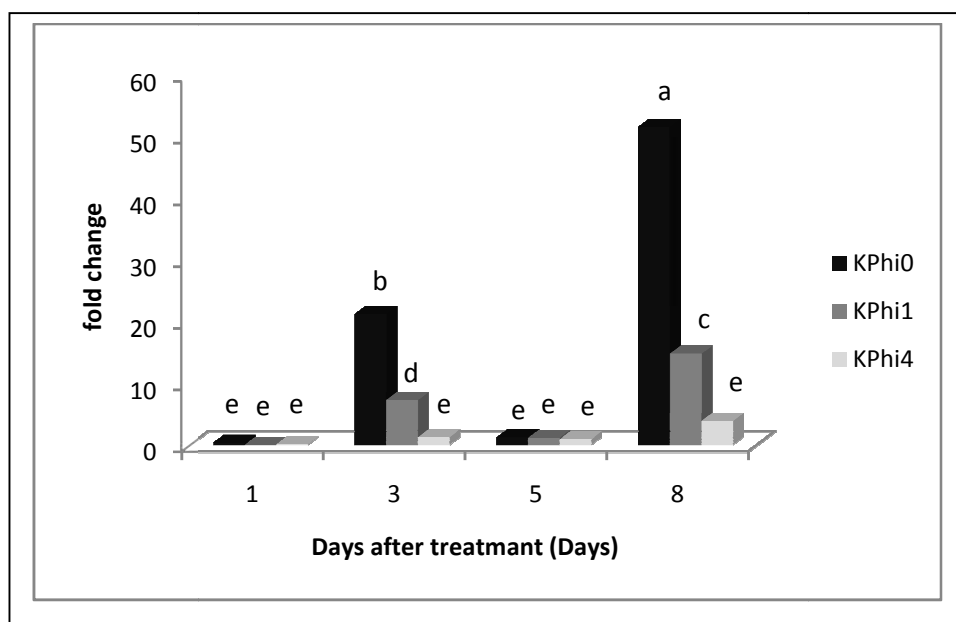
میزان بیان بیان ۱۹/۴، ۴۵/۷ و ۳۲/۷ برابری نسبت به کنترل اختلاف معنی داری را در سطح یک درصد نشان داد.



شکل ۴-۱۶ مقایسه میانگین تغییرات بیان ژن *defensin* در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis* تحت تیمار با فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف

۴-۳-۲-۵- الگوی تظاهر ژن ۳،۱-بتاگلوکاناز

روند تظاهر ژن ۳،۱-بتاگلوکاناز در تیمار قارچ و قارچ + فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف در شکل ۴-۲۰ نشان داده شده است. همانگونه که در این شکل مشاهده می‌شود روند بیان این ژن در روزهای سوم و هشتم پس از آلودگی بعد از اعمال تیمار فسفیت پتاسیم با دو غلظت مختلف نسبت به تیمار قارچ تفاوت معنی‌دار نشان داده است. همچنین تیمارهای *kphi0*، *kphi1* و *kphi4* در روز هشتم پس از آلودگی با افزایش میزان بیان ۴۸/۶، ۱۷/۲ و ۵/۹ برابری نسبت به کنترل اختلاف معنی داری را در سطح یک درصد نشان دادند (جدول ۴-۳). همچنین بیان ژن ۳،۱-بتاگلوکاناز در هشتمین روز پس از تیمار با قارچ حداکثر میزان را نشان داده است. بررسی روند تغییرات بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ نشان داد که به طور کلی بیان ژن در تیمار قارچ در تمام زمان‌ها بیشتر از تیمار ۱ گرم بر لیتر و ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم بوده است.



شکل ۴-۱۷ مقایسه میانگین تغییرات بیان ژن ۳،۱-بتاگلوکاناز در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تحت تیمار با فسفیت پتاسیم در زمان‌های مختلف

بحث

گیاهان موجودات بی تحرک اند که دائما در معرض انواع تنش‌های محیطی می‌باشند. این عوامل باعث آسیب به سلول‌های گیاهی و منجر به بروز تنش‌های ثانویه مانند تنش‌های اسمزی و اکسایشی می‌شود. گیاهان قادر به اجتناب از قرار گرفتن در معرض این عوامل نیستند. بنابراین با به کارگیری سایر سازوکارها، سازش مورفولوژی و فیزیولوژیکی با این شرایط پیدا کرده‌اند. همه این تنش‌ها باعث القاء تولید پروتئین‌های تحت القاء تنش می‌شوند. ترکیبات بیوشیمیایی مختلفی در گونه‌های گیاهی شناسایی شده اند که در واکنش مستقیم یا غیر مستقیم گیاه با پاتوژن‌ها دخالت دارند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی از مهم‌ترین این ترکیبات هستند که در گونه‌های گیاهی مختلف تولید شده و نقش اصلی آنها در ارتباط با محافظت گیاه در برابر پاتوژن‌ها است. این ترکیبات ممکن است به صورت همیشگی در بافت‌ها وجود

داشته باشند یا در اثر حمله پاتوزن تولید شوند. بسیاری از این پروتئین ها علاوه بر نقش اصلی خود ممکن است در زندگی گیاه نقش‌های دیگری نیز داشته باشند. این پژوهش به منظور بررسی خصوصیات رشدی، مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، آنزیمی و مولکولی گیاهچه‌های خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم تحت تنش قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* اجرا شد. با توجه به نتایج این آزمایش شاخص درصد پوسیدگی در تیمارهای فسفیت نسبت به تیمار قارچ کاهش یافته بود. لاندسکوت و کوک (۲۰۰۵) نیز در آزمایشی فسفیت و فسفات پتاسیم را به محیط کشتی که قارچ پیتیوم قرار داشت، اضافه کردند، نتایج آنها نشان داد که فسفیت پتاسیم از رشد قارچ جلوگیری می‌کند. همچنین آریایی و همکاران (۱۳۹۳) تاثیر ترکیبات مختلف کودی را در کاهش رشد قارچ *Phytophthora nicotianae* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه درختان زردآلو مورد مطالعه قرار دادند، نتایج آنها نشان داد کود حاوی فسفیت پتاسیم به طور معنی‌داری بر کاهش رشد این قارچ موثر بود. در اواسط دهه ۱۹۹۰ میلادی محققین با معرفی ترکیبات متنوع فسفیت پتاسیم پی بردند که این ترکیبات موجب پیدایش تاثیرات چشمگیر کمی و کیفی در محصولات کشاورزی مانند افزایش تعداد برگ، میزان فتوسنتز، وزن تر و گسترش ریشه می‌شوند. در تحقیق حاضر میزان کلروفیل a، ۶۳/۶ درصد و کلروفیل b، ۳۸/۲ درصد در گیاهان آلوده به قارچ *F.oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تحت تیمار با فسفیت پتاسیم نسبت به تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت پتاسیم) افزایش یافته است. همچنین مور و همکاران در سال ۲۰۰۹ یافتند که فسفیت باعث افزایش کیفیت میوه با تولید اسیدآسکوربیک و آنتوسیانین شده است (Moor et al., 2009). ریکارد در سال ۲۰۰۰ گزارش کرد که اسپری برگی با فسفیت عملکرد و کیفیت را در چند رقم افزایش می‌دهد (Rickard, 2008). در این تحقیق نیز تیمار فسفیت پتاسیم منجر به افزایش وزن تر ریشه و اندام هوایی گردید. به عبارت دیگر فسفیت پتاسیم با کاهش درصد پوسیدگی و افزایش میزان کلروفیل و افزایش وزن تر توانسته موجب افزایش خصوصیات کمی و کیفی و در نتیجه افزایش مقاومت به بیماری

پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی در گیاه خیار گردد. مطالعات اخیر نشان داده که فسفیت‌ها اثر ضدقارچی نیز دارند و می‌توانند اثر مستقیم روی پاتوژن و یا اثر غیر مستقیم با تحریک پاسخ‌های دفاعی میزبان داشته باشند (Deliopoulos et al., 2010). اثرات مستقیم شامل مهار رشد قارچ و کاهش یا تغییر سوخت و ساز پاتوژن و اثر غیر مستقیم شامل تحریک مکانیسم‌های دفاعی گیاه مانند افزایش تولید فیتوالکسین و گونه‌های اکسیژن فعال (¹ROS)، القای PR² ها، و تقویت دیواره سلولی می‌باشد (Lobato et al., 2008). تنش‌های مختلف محیطی شامل تنش‌های زنده و غیر زنده سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند. رادیکال‌های هیدروکسیلی که عامل وقوع تنش اکسیداتیو هستند، به وسیله فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کنترل می‌شوند (Selote and Khanna-Chopra, 2004). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن از طریق یکسری واکنش‌های پیچیده ایفا می‌کنند. این واکنش‌ها شامل تبدیل اکسیژن مولکولی (O₂) به پراکسید هیدروژن توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و سمیت‌زدایی پراکسید هیدروژن به وسیله آنزیم‌های متعددی از جمله پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گلوکاتیون ردوکتاز است (Neto et al., 2005). نتایج بخش آنزیمی و بیوشیمیایی این تحقیق نیز نشان داد که میزان آنزیم‌های دفاعی CAT، GPX، SOD و میزان متابولیت H₂O₂ در گیاهان آلوده شده به قارچ *F.oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تحت تیمار با فسفیت پتاسیم به ترتیب ۲/۸، ۲/۲، ۱/۴ و ۱/۵ برابر نسبت به شاهد (تلقیح نشده با قارچ) و ۶۱/۲، ۷۵/۸، ۶۱/۱ و ۲۴ درصد نسبت به تیمار KPhi0 (عدم مصرف فسفیت پتاسیم) افزایش یافته است. این درحالی است که میزان پراکسیداسیون لیپیدی (MDA)، ۴۷/۷ درصد نسبت به شاهد افزایش و ۳۷/۵ درصد نسبت به تیمار KPhi0 کاهش یافته است. MDA در اثر تخریب پراکسیدهای اسیدهای چرب اشباع نشده، به وجود می‌آید که به عنوان شاخصی برای مشخص کردن مقدار صدمات اکسیداتیو به لیپیدها به

¹ - Reactive oxygen species

^۲ - Pathogenesis-related protein

کار می‌رود و مقدار آن بسته به میزان شدت تنش زیستی یا غیر زیستی متفاوت می‌باشد. میزان MDA بعنوان یک نشانگر جهت ارزیابی وضعیت درون سلول در شرایط تنش استفاده می‌گردد. کاهش معنی‌دار MDA در تیمار KPhi4 (غلظت ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم) نسبت به تیمار KPhi0 (عدم مصرف فسفیت پتاسیم) می‌تواند نشان‌دهنده کاهش صدمه بافتی و کنترل تقریبی بیماری باشد. تنش قارچی باعث تنش اکسیداتیو شده که نتیجه آن تجمع گونه‌های اکسیژن فعال مانند H_2O_2 و O_2^- می‌باشد (Turkan and Demiral, 2009)، که با تغییراتی در فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز (Morkunas and Gemerek, 2007)، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز جهت دفاع در برابر ROS ها همراه است. در این تحقیق نیز آنزیم‌های جمع آوری کننده پراکسید هیدروژن (کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) که در سم‌زدایی این متابولیت سمی نقش دارند در تمامی تیمارهای فسفیت پتاسیم بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافتند. از طرفی با توجه به افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تیمار تنش قارچ بدون اعمال فسفیت پتاسیم (KPhi0) به نظر می‌رسد افزایش این آنزیم‌ها یکی از سازوکارهای تحمل به تنش قارچی می‌باشد. از سوی دیگر، تیمار فسفیت پتاسیم نیز به طور موثر سبب افزایش قابل ملاحظه‌ی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه خیار شد. که احتمال دارد سازوکار عمل فسفیت پتاسیم برای حفاظت از تنش ناشی از پاتوژن قارچی *F.oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* از همین طریق باشد. نتایج این بخش از تحقیق با نتایج بویرجان و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد. نتایج این محققین نشان داد که در گیاهان *Arabidopsis thaliana* تلقیح شده با *Phytophthora. Palmivora* و *Phytophthora. Cinnamomi* که با فسفیت پتاسیم تیمار شده بودند، مقاومت در برابر عفونت با سرعت بیشتر و به طور کارآمدتری انجام گرفت. همچنین آنها اظهار داشتند که فسفیت پتاسیم نه تنها باعث افزایش تولید ROS ها می‌گردد، بلکه با افزایش ترکیبات لیگنینی در تقویت دیواره سلولی نقش دارد (Boerjan et al., 2003). در هر حال، افزایش مشاهده شده در فعالیت آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدانی در اثر کاربرد فسفیت پتاسیم، نقش این ترکیب را بعنوان یک سامانه تنظیم کننده آنزیم‌های یاد شده نشان می‌دهد. تحقیقات پیشین نشان داده است که تیمار فسفیت پتاسیم منجر به افزایش تجمع H_2O_2 و O_2^- در گیاهان سیب‌زمینی تلقیح شده با قارچ *Phytophthora* شده و در نتیجه افزایش مقاومت به این عامل بیماری مشاهده شد (Machinan et al., 2012). در مطالعه حاضر نیز میزان تجمع H_2O_2 در بافت‌ها و نیز زمان تجمع آن با آنزیم‌های دفاعی CAT، GPX و SOD همخوانی داشته و افزایش آن‌ها با هم متوازن بوده است. احتمالاً تولید H_2O_2 به نوعی پیش‌ساز سنتز آنزیم‌های دفاعی است و افزایش تولید H_2O_2 در طی تنش می‌تواند به عنوان یک سیگنال برای فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی عمل نماید (Desikin et al., 2001). بنابراین اکسیژن فعال می‌تواند به عنوان یک شاخص سلولی برای تنش در نظر گرفته شود و نقش یک پیام‌رسان ثانویه را در مسیر انتقال پیام بازی نماید. مطالعات دیگر نشان داد که تیمار گیاهان سیب‌زمینی تلقیح شده با قارچ *Phytophthora infestans* با فسفیت پتاسیم منجر به افزایش ترکیبات ضد میکروبی مانند فیتوالکسین‌ها می‌شود (Andreu et al., 2006). صرف نظر از تیمارهای مختلف فسفیت پتاسیم، میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری متفاوت بود فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید به ترتیب در روزهای ۵، ۳، ۳، ۳ و ۱۱ پس از تلقیح با قارچ حداکثر بوده است. در مطالعه حاضر، فسفیت پتاسیم در غلظت‌های مختلف منجر به تغییرات تجمع آنزیم‌های دفاعی در گیاهچه‌های خیار شده است. در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم، با افزایش غلظت، میزان آنزیم‌ها نسبت به شاهد بیشتر شده اما در غلظت ۶ گرم بر لیتر کاهش در میزان آنزیم‌ها مشاهده شد. این موضوع بیانگر این است که فسفیت پتاسیم تا غلظت خاصی می‌تواند در افزایش تجمع آنزیم‌های دفاعی نقش داشته باشد و بیشتر از آن غلظت اثر بازدارنگی خواهد داشت. نتایج مشابهی مبنی بر اثر غلظت‌های مختلف فسفیت پتاسیم با اثر قارچ‌کشی آنها وجود دارد. در تحقیقی نحوه و عمل فعالیت

قارچکش فسفیت‌دار بر روی کنترل قارچ *Phytophthora* و *Pythium* مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که وقتی غلظت‌های پایین فسفیت در بین ریشه‌ها وجود داشت، گسترش زخم ناشی از قارچ نیز کاهش معنی‌داری داشته است (Jackson et al., 2000). تغییرات در تجمع آنزیم‌های دفاعی، نتیجه تغییرات بیان PR پروتئین‌ها می‌باشد. پروتئین‌های PR، مولکول‌هایی سبک با وزن مولکولی ۴۰-۱۰ کیلودالتون می‌باشند که به مقدار کم در گیاهان توزیع شده‌اند اما میزانشان در پاسخ به استرس یا حمله پاتوژن‌ها ب میزان زیادی افزایش می‌یابد. جالب توجه است که اندام‌های مختلف گیاهی از جمله برگ‌ها، بذر و ریشه‌ها ممکن است انواع و میزان مختلفی از PRها را تولید کنند. با توجه به نتایج این آزمایش، پس از تلقیح گیاهچه‌های خیار تیمار شده با غلظت‌های ۰، ۱ و ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم با قارچ *F.oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*، بیان ژن‌های PGIP1 و دیفنسین در تیمارهای فسفیت پتاسیم نسبت به تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت پتاسیم) افزایش یافته است. این در حالی است که بیان ژن‌های کیتیناز در تیمارهای فسفیت نسبت به تیمار قارچ کاهش یافت. ژن کیتیناز بعنوان یکی از ژن‌های مهم رمزکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌باشد. گزارشات متعدد حاکی از واکنش شدید این ژن بعنوان یک ژن دفاعی عمومی نسبت به طیف گسترده‌ای از بیماری‌های مختلف مخصوصاً قارچ‌های بیماری‌زا در گیاهان می‌باشد (Mallard et al., 2008). بیان ژن‌های کیتیناز در گیاهان پس از حمله عوامل بیماری‌زا و ایجاد زخم و آسیب‌های مکانیکی و استرس‌های محیطی افزایش می‌یابد (Rasmussen, R. P. 2001). نتایج تحقیقات بنهامو و همکاران (۱۹۸۹) نشان داد که کیتیناز در ریشه گیاهان گوجه فرنگی آلوده به قارچ *F.oxysporum* در مناطقی از دیواره‌های سلول میزبان که در تماس نزدیک با قارچ بود، یافت شد. با توجه به نتایج این آزمایش میتوان نتیجه گرفت که نفوذ قارچ در گیاهان تلقیح شده با قارچ که با فسفیت پتاسیم تیمار شده بودند کمتر بوده در نتیجه بیان ژن‌های کیتیناز نسبت به تیمار قارچ کاهش یافته است. همچنین در مراحل رشدی مختلف و در بافت‌ها و اندام‌های خاصی

تولید کیتینازها زیاد می‌شود. مشخص شده است که میزان تجمع کیتینازها در بافت‌های پیرتر بیش از بافت‌های جوان است و میزان کلی کیتینازهای گیاه با افزایش سن بیشتر می‌شود (Hanfrey et al., 1996). که این موضوع با نتایج این پژوهش همخوانی داشته و در این پژوهش نیز با گذشت زمان و افزایش سن گیاه میزان بیان ژن‌های کیتیناز در هر سه تیمار افزایش یافته است. ۳،۱-بتاگلوکاناز (یکی از اعضای خانواده PR2) در تجزیه دیواره سلول قارچ‌ها نقش داشته و بعد از حمله بیمارگر در گیاه القا شده و باعث هیدرولیز کردن بتاگلوکان که یکی از اجزای اصلی دیواره سلول قارچی است، می‌شود. این ژن نقش مهمی در دفاع از گیاه بازی می‌کند (Doxey et al., 2007). بیان ژن ۳،۱-بتاگلوکاناز همانند ژن کیتیناز در تیمارهای ۱ و ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم نسبت به تیمار قارچ در تمام زمان‌ها کمتر بوده است که این مطلب می‌تواند بیان کننده کاهش نفوذ قارچ در گیاهان تیمار شده با فسفیت باشد. همچنین میزان بیان این ژن در روز هشتم پس از تیمار با قارچ در تمامی تیمارها نسبت به کنترل بیشترین مقدار را دارا بود. نتایج تحقیقات وان خان و همکاران (۱۹۹۲) نشان داد که تعداد نسخه‌های mRNA ۳،۱-بتاگلوکاناز در برگ‌های گوجه‌فرنگی آلوده به پاتوژن قارچی *Cladosporium fulvum* به مقدار زیادی تجمع پیدا کرده است که نشان دهنده‌ی نقش این آنزیم در مقابله با پاتوژن می‌باشد. فعالیت ضد قارچی کیتیناز و ۳،۱-بتاگلوکاناز به وسیله‌ی محققان اثبات شد، بطوریکه آنها پس از خالص‌سازی و قرار دادن این پروتئین‌ها در محیط کشت حاوی پاتوژن‌های قارچی گیاهی مشاهده کردند که رشد این قارچ‌ها در نواحی که این پروتئین‌ها حضور دارند، محدود می‌شود که این دلیل خوبی برای تاثیر مستقیم این PR پروتئین‌ها بر روی پاتوژن‌ها می‌تواند باشد (Saikia et al., 2005). کیتیناز و ۳،۱-بتاگلوکاناز علاوه بر هیدرولیز دیواره سلولی گلوکان و کیتین، توانایی این را هم دارند که با رهاسازی محرک‌هایی از دیواره سلولی قارچ‌ها مکانیسم‌های دفاعی مختلفی را در گیاهان تحریک کنند (Ren and West, 2001). نتایج این تحقیق نیز حاکی از افزایش بیان این ژن در تیمار قارچ نسبت به شاهد می‌باشد. در تحقیق دیگری نیز تلفیق بیان

کیتیناز و گلوکوناز در هویج، گوجه‌فرنگی و تنباکوی تراریخته در جلوگیری از توسعه بیماری نسبت به تک تک آنها موثرتر بوده است (Jongedijk et al., 1995). همچنین افزایش مشابه بیان ژن‌های کیتیناز و ۳،۱-بتاگلوکاناز در تیمارهای قارچ، فسفیت ۱ و فسفیت ۴ گرم بر لیتر، تایید کننده فعالیت سینرژیستی این دو آنزیم در القای مقاومت می‌باشد.

در این تحقیق بیان ژن‌های PGIP1 و دیفنسین در تیمارهای فسفیت پتاسیم نسبت به تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت پتاسیم) افزایش یافته است که بیان ژن PGIP1 در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم و بیان ژن دیفنسین در تیمار ۱ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم بیشترین مقدار را نسبت به تیمار قارچ داشته است. پروتئین‌های PGIP از مهمترین انواع پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی هستند که به صورت موثر و اختصاصی به پلی‌گالاکتورونازهای قارچی متصل شده و از فعالیت آنها ممانعت می‌کنند. در نتیجه واکنش پروتئین‌های PGIP و پلی‌گالاکتورونازهای قارچی ترکیبات الیگوساکاریدی تولید می‌گردند. الیگوساکاریدهای مشتق شده از پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی در نقش تحریک کننده حتی در غلظت‌های کم (نانومول) باعث القای واکنش‌های دفاعی در گیاه می‌گردند (Robertson, 1986). اولین ژن کدکننده *pgip* از لوبیا جدا گردید (Cervone et al., 1987)، اما امروزه حضور ژن PGIP در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش گردیده است. فراری و همکاران در سال ۲۰۱۱ ژن *Pvpgip2* از گیاه لوبیا را به گندم انتقال دادند. گندم‌های تراریخت با قارچ *Fusarium graminearum* تلقیح شده و کاهش معنی‌داری را از علائم بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم نشان دادند. در تحقیق حاضر تغییرات بیان ژن PGIP1 در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم در سومین روز پس از القای تنش قارچی بیشترین مقدار را نسبت به کنترل نشان داد. فعالیت PGIP ها در ایجاد ممانعت از تخریب دیواره و حمله قارچی توصیف شده است. پروتئین PGIP در گیاه گوجه‌فرنگی دیواره‌های سلولی را از تخریب توسط آنزیم‌های تولید شده بوسیله *Fusarium oxysporum* حفظ می‌نماید (Jones et al., 1972). در این تحقیق نیز

کاهش شاخص پوسیدگی و تخریب دیواره سلولی در تیمارهای فسفیت نسبت به تیمار قارچ مشاهده شده که می‌تواند نتیجه افزایش بیان ژن‌های *pgip* باشد. نتایج مشابهی نیز از افزایش فعالیت ژن‌های *pgip* در دفاع علیه پاتوژن‌های قارچی گزارش شده است. برای مثال، در گوجه فرنگی و انگور تراریخت حامل ژن‌های *pgip* گلابی که با قارچ *Botrytis cinerea* تلقیح شده بودند، میزان صدمات قارچی محدود شد (Powell et al., 2000). PGIPها بعنوان یک منبع گیاهی می‌توانند به طور متفاوتی مانع فعالیت PGها از منابع قارچی مختلف و متفاوت شوند و بنابراین می‌توانند بین PGها تمایز قائل شوند و نیز PGIPها از گونه‌های گیاهی مختلف احتمالا در واکنش بازدارندگی و نیز اختصاصی بودن PG هدف، متغیر هستند. بنابراین بیان PGIPهای هترولوگ در گیاهان به صورت بالقوه می‌تواند برای بهبود مقاومت گیاهان زراعی مورد بهره برداری قرار گیرد (Stotz et al., 1993). همچنین PGIPهای گیاهان مختلف می‌توانند فعالیت‌های بازدارندگی علیه PGهای قارچی که طی تکامل در معرض آن قرار نگرفته‌اند نشان دهند. برای مثال PGIP1 و PGIP2 لوبیا قادرند مانع فعالیت پلی گالاکتروناز قارچ *Stenocarpella maydis* پاتوژن قارچی ذرت، شوند (Berger et al., 2000). که با شناسایی چنین بازدارنده‌هایی و انتقال آنها به گیاهان حساس می‌توان گیاهی تقریبا مقاوم بدست آورد. همچنین نقش PGIP در دفاع گیاهی به وسیله کاهش علائم بیماری در گیاهانی که ژنهای PGIP را بیشتر بیان می‌کنند، ثابت شده است (Sella et al., 2004) و در توتون که *Pvpgip2* را بیان می‌کند مشاهده شده است (De Lorenzo and Ferrari, 2002). در مطالعه حاضر ژن‌های دیفنسین همانند ژن‌های کیتیناز با گذشت زمان و نمو گیاه بیان آن افزایش یافته و در تیمار ۱ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم بالاترین نسبت بیان را در مقایسه با تیمار ۴ گرم بر لیتر و قارچ (عدم مصرف فسفیت پتاسیم) داشته است. دیفنسین‌های گیاهی گروهی از پپتیدهای ضد میکروبی با وزن مولکولی در محدوده ۵ کیلودالتونی می‌باشند که تقریبا در تمام گیاهان یافت شده‌اند. فعالیت ضد میکروبی (Segura et al., 1998) و ضد حشرات (Chen et al., 2002) تمام دیفنسین‌ها در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده است. دیفنسین‌ها

بعنوان ترکیبات مهم سیستم دفاعی در گیاهان در غلظت میکرومولار رشد طیف وسیعی از قارچ‌های رشته‌ای را ممانعت می‌کنند. همچنین محققان نشان داده‌اند که گیاهان ترانس‌ژنیک که ژن‌های دیفنسین را بطور دائم بیان می‌کنند افزایش مقاومت نسبت به پاتوژن‌های گیاهی نشان می‌دهند (Lay and Anderson., 2005). دیفنسین‌ها به وسیله تغییر نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی قارچی و یا محدود کردن بیوسنتز ماکرومولکول‌ها می‌توانند فعالیت ضد قارچی اعمال کنند. بیان بالای دیفنسین‌ها در گیاهان تراریخته باعث کاهش رشد پاتوژن‌های گوناگون شامل *Fusarium Alternaria* و *Plasmodiophara* می‌شود و مقاومت در برابر *Verticillium* در سیب‌زمینی را در شرایط مزرعه‌ای فراهم می‌کند (Gao et al., 2000). در مطالعه حاضر نیز افزایش بیان ژن‌های دیفنسین در تیمارهای فسفیت پتاسیم در مقایسه با تیمار قارچ (عدم مصرف فسفیت پتاسیم) منجر به مقاومت نسبی در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* گردید. توجه به این نکته که با وجود اینکه ردیابی تغییرات در بیان ژن‌های مورد مطالعه، در بافت برگ‌ی انجام شده است، در حالیکه ریشه گیاهان در معرض مستقیم آلودگی قرار داشتند، تایید کننده این مطلب است که تغییرات بیان ژن‌های PR مورد نظر به صورت سیستمیک بوده است یعنی با تحریک یک نقطه از گیاه، پاسخ در تمام بافتها مشاهده شده است. با توجه به تغییرات مشاهده شده در الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه و نقش ژن‌های کیتیناز، PGIP1، دیفنسین و ۳-ا-بتاگلوکاناز در آلودگی قارچی، تصور می‌شود که این ژن‌ها در ارتباط با پاسخ‌های دفاعی خیار نسبت به پاتوژن قارچی فوزاریوم اوکسیسپورریم کوکومرینوم باشند و می‌توانند بعنوان یکی از کاندیدها، برای مطالعه بیشتر در جهت تولید ارقام مقاوم که دارای سطح بیان بیشتری از این ژن را داشته باشند محسوب شوند. همچنین تیمار فسفیت پتاسیم بعنوان یک القاگر جهت تحریک بیان این ژن‌ها و تغییر تجمع آنزیم‌های دفاعی و متابولیت‌های گیاهی و در نهایت کاهش شاخص پوسیدگی و خسارت ناشی از پاتوژن نقش موثری خواهد داشت. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد

که القاء و افزایش تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه در حضور فسفیت پتاسیم می‌تواند به عنوان یک پاسخ دفاعی در برابر قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* در گیاه خیار باشد. در عین حال مطالعات گسترده تری جهت بررسی ارتباط بین این آنزیم‌ها و مکانیسم عمل فسفیت پتاسیم مورد نیاز است.

نتیجه گیری

✓ تیمار گیاهان با فسفیت پتاسیم و تلقیح با قارچ *F.oxysporum* باعث القا تولید ROSها و

افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نظیر CAT، POX و SOD

✓ افزایش میزان این فاکتورها غیر از مالون دآلدئید، در گیاهان تیمار با فسفیت پتاسیم

✓ نقش کلیدی فسفیت پتاسیم در القا مقاومت و در نتیجه کاهش پوسیدگی و آسیب قارچی

✓ افزایش بیان ژن‌های دیفنسین و *pgip1* در گیاهان تحت تیمار فسفیت پتاسیم نسبت به تیمار

(KPhi 0)

✓ بیان کمتر ژن کیتیناز و ۱-۳-بتاگلوکاناز در گیاهان تحت تیمار فسفیت نسبت به تیمار (KPhi 0)

پیشنهادات

- ✓ بررسی متابولیت‌های مرتبط با مقاومت در تنش قارچی *F.oxysporum*
- ✓ بررسی سایر القاگرها از نظر مکانیزم ایجاد مقاومت
- ✓ بررسی ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در استحکام بافت‌ها و لیگنینی شدن
- ✓ بررسی تفصیلی ژن‌های کیتیناز ۳ و بتاگلوکاناز
- ✓ بررسی نقش سایر ژن‌های دخیل در مقاومت در تعامل خیار با عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گیاه
- ✓ اندازه گیری میزان فعالیت سایر فاکتورهای آنزیمی و بیوشیمیایی و بررسی ارتباط بین این آنزیم‌ها و مکانیسم عمل فسفیت پتاسیم
- ✓ استفاده از این ژن‌های مقاومت به بیماریزایی در مهندسی ژنتیک برای تولید گیاهان مقاوم به بیماری پوسیدگی ریشه گیاه

منابع

- آریایی الف. م. اسکندری م. فضل‌ح. و پیرنیا م. (۱۳۹۳). تاثیر ترکیبات مختلف در کاهش رشد فایتوفتورا عامل پوسیدگی ریشه و طوقه درختان زردآلو. مجله علمی و پژوهشی کشاورزی، سال دوازدهم، شماره ۷ ص ۲۰-۲۲.
- الهی نیا س. ع. (۱۳۸۴). کتاب بیماریهای گیاهان زراعی و روشهای مبارزه با آنها. انتشارات دانشگاه گیلان، ص ۵۲۰.
- الهی نیا ع. (۱۳۷۵). قارچ شناسی و بیماری‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه گیلان، چاپ سوم، ص ۲۸۷.
- پوستچی ا. (۱۳۵۰). جالیز و جالیزکاری. موسسه فرانکلین، ص ۳۴۰.
- پیوست غ. ع. (۱۳۸۴). سبزیکاری. انتشارات دانش پذیر، ص ۴۸۷.
- حسن‌دخت م. ر. (۱۳۹۱). تکنولوژی تولید سبزیها. انتشارات سلسله، ص ۵۷۶.
- کریمی م و زینلی س. (۱۳۸۳). در ترجمه PCR مبانی و کاربردهای آزمایشگاهی، مک فرسون، ام، جی. مولر، اس، جی (مؤلف). انتشارات اندیشه ظهور، ص ۳۵۹.

Abu-Goukh A.A., Strand L.L., Labavitch J.M. (1983). Development-related changes in decay susceptibility and polygalacturonase inhibitor content of Bartlett pear fruit. *Physiol Plant Pathol.*, 23, 101-109.

Abu-Goukh A. A., Greve L. C., and Labavitch J. M.. (1983). Purification and partial characterization of "Bartlett" pear fruit polygalacturonase inhibitors. *Physiological Plant Pathology.*, 23, 111-122

Adams F. and conral J.P. (1953). Transition of phosphate to phosphit i soil. *soil science.*, 75, 361-371.

Aebi H. E. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology.*, 105, 121-126.

Afek U. and Szejnberg A.(1986).A citrus phytoalexin, 6,7- dimethoxy-courmarin, as a defense mechanism against *Phytophthora citrophthora*, and influence of Aliette and phosphorous on its production. *Phytoparasitica* 14:246.

Afridi M. M. and Samiullah R. K. (1973). A comparative study of the effect of soil and leaf applied phosphorus on the yield of barley (*Hordeum vulgare* L.). *New Phytol.*, 72, 113- 116.

Agrios G.N. (2005). plant pathology, 5th edition. Elsevier Academic Press, San Diego, California

Andreu A., Guevara M., Wolski E., Daleo G. and Caldiz D. (2006). Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Management Science*, 62, 162–70.

Annis S.L. and Goodwin P.H. (1997). Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 1–14

Anuradha T. S., Divya K., Jami S. K., Kirti P. B. (2008). Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.*, 27(11), 1777-1786.

Balde J.A., Francisco R., Queiroz A., Regalado A.P., Ricardo C.P., Veloso M.M., (2006). "Immunolocalization of a class III chitinase in two muskmelon cultivars reacting differently to *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis." *J. Plant. Physiol.*, 163, 19-25.

Benhamou N, Jean G, Alain A, Michel L. (1989). Immunogold localization of b-1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. *Plant Cell.*, 1,1209–21.

Berger D.K., Oelofse D., Arendse M.S., Du plessis E. and Dubery A. (2000). Bean polygalacturonase inhibitor protein (PGIP-1) inhibits polygalacturonases from *Stenocarpella maydis*. *Physiological and molecular plant pathology.*, 57, 5-14.

Bishop J.G., Dean A.M. and Mitchell-Olds T. (2000). Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 97, 5322-5327.

Boerjan W., Ralph J. and Baucher M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–46.

Botha A.M., Nagel M.A.C., Van der Westhuizen A.J. and Botha F.C. (1998). Chitinase isoenzymes in near-isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene, and mechanical wounding. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 39, 99-106.

Bowles D.J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Ann.Rev.Biochem.* vol 59, pp, 873-907

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitative titration of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.*, 72, 248-254.

Bucher p. (1999). Regulatory elements and expression profiles. *Current Opinion in Structural Biol.*, 9, 400-407.

Bustin S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology.*, 25, 169- 193.

Byrne N. D., Duxbury M., and Sharpe N. (2001). The determination of chitinase activity of grapes: an introductory enzyme assay. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 29, 144-146.

Carpita N. C. and Gibeaut D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, 3, 1–30.

Carvalho A. O. and Gomes V. M. (2011). Plant defensins and defensin-like peptides – biological activities and biotechnological applications. *Curr. Pharm. Design.*, 17, 4270–4293.

Carvalho A. O. and Gomes V. M. (2009). Plant defensins – prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides.*, 30, 1007–1020.

Cervera M, Cautin R. and Jeria G. (2007). Evaluation of calcium phosphit, magnesium phosphate and potassium phosphate in control of phytophthora cinamomi in Hass Avocado trees grown in container, proceeding .5.world Avocado congress. Vina Del Mar, Chile. 12-16 nov.

Cervone F., De Lorenzo G., Degra L., Salvi G. and Bergami M. (1987). Purification and characterization of polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.*, 85, 631–637.

Chance B. and Maehly A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 11, 764-755.

Chen K.C., Lin C.Y., Kuan C.C., Sung H.Y. and Chen C.S. (2002). A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 50,7258–7263.

Clayson SH., Miller J., Porter L. and Olsea N. (2005). Efficacy of phosphate based fungicide for controlling pink rot and lateblight. Presented at the Idaho Potato Conference January., 4, 19-20.

Coffey M.D. (1987). *Phytophthora* root rot of avocado—an integrated approach to control in California. *Plant Disease.*, 71, 1046-1052.

Cook J. and Landschoot P. (2009). Inhibition of pythium and suppression of pythium blight of turfgrasses with phosphonate fungicides. *Plant physiology.*, 45, 56-59.

Copper R. M. and Wood R. K. S. (1975). Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.*, 5, 135–156.

Cota I.E.R., Troncoso-Rojas R., Sotelo-Mundo R., Sánchez-Estrada A. and Tiznado-Hernández M.E. (2007). Chitinase and β -1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties, *Sci. Hortic.*, 112, 42–50.

Daniel R and Guest D. (2006). Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 67, 194–201.

Deacon, J.W. & Saxena, G. (1997). Orientated attachment and cyst germination in *Catenaria anguillulae*, a facultative endoparasite of nematodes. *Mycological Research.*, 101, 513–522.

de Beer A. and Vivier M. A. (2011). Four plant defensins from an indigenous South African *Brassicaceae* species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Res. Notes* 4:459.

Deliopoulos T. Kettlewell PS. and Hare, MC. (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. *Crop Protection.*, 29,1059–1075.

De Lorenzo G., D'Ovidio R., Cervone F., (2001). The role of polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 39, 313–335.

De Lorenzo G. and Ferrari S. (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi, *Current Opinion in Plant Biology.*, 5, 295-299.

Desikin R., Mackerness S., Hancock J. and Neill S.J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Journal of Plant Physiology.*, 127, 159-172.

Di Matteo A., Bonivento D., Tsernoglou D., Federici L. and Cervone F. (2006). Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in plant defence: a structural view. *Phytochemistry*, 67,528-533.

Doxey AC., Yaish MW., Moffatt BA., Griffith M. and McConkey BJ. (2007). Functional divergence in the *Arabidopsis* beta-1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Molecular biology and evolution.*, 24(4),1045–55.

Eshraghi L., Anderson J., Aryamanesh N., Shearer B., McComb J. and Hardy GES, et al. (2011). Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol.*, 60,1086–95.

Estrada E., Trejo L., Gomez F., Nunez F. and Sandoval M. (2013). The effects of phosphate on strawberry yield and fruit quality. *Soil science and plant nutrition.*, 13, 72-78.

Euodong m. and Datnoff L. (2012). Are phosphorous and phosphonic acids equal phosphorous sources for plant growth?. *Plant physiology.*, 13, 35-37.

Fant F., Vranken W., Broekaert W. and Borremans F. (1998). Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by ¹H NMR. *Journal of Molecular Biology.*, 279, 257–270.

Farrokhi N, Whitelegge JP, Brusslan JA. (2007). Plant peptides and peptidomimics. *Plant Biotechnol. J.* 6(2), 105-134.

Federici L., Caprari C., Mattei F., Savino C., Di Matteo A., De Lorenzo G., Cervone F. and Tsernoglou F., (2001). Structural requirements of *endo*-polygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 98, 13425–13430.

Fenn M. and Coffey M. (1983). Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of fosetyl-al and phosphorous acid. *Plant physiology.*, 34, 134-138.

Ferrari S., Vairo D., Ausubel F.M., Cervone F. and De Lorenzo G. (2003). Arabidopsis polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIP) are regulated by different signal transduction pathways during fungal infection. *Plant Cell.*, 15, 93-106.

Forster H., Adaskareq J., Kim D. and Stanghellini M. (1998). Effect of phosphate on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to phytophthora root and crown rot in hydroponic culture. *Plant physiology.*, 12, 46-49.

Franco O.L. (2011). Peptidepromiscuity: anevolutionary concept for plant defense. *FEBS Lett.* 585, 995–1000. doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.008

Francis M.L., Redondo A., Burns JK. and Graham JH. (2009). Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *European Journal of Plant Pathology.* 124:283–292.

Fritig B., Heitz T. and Legrand M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.*, 10,16-22.

Futamura N., Mori H., Kouchi H. and Shinohara K. (2000). Male flower-specific expression of genes for polygalacturonase, pectin methylesterase and beta-1,3-glucanase in a dioecious willow (*Salix gilgiana* Seemen). *Plant Cell Physiol.*, 41, 16-26.

Gao A.-G., Hakimi S.M., Mittanck C.A., Wu Y., Woerner B.M., Stark D.M., Shah D.M., Liang J. and Rommens C.M.T. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.*, 18, 1307–1310

- Garcia-Olmedo F., Molina A., Alamillo J. M. and Rodriguez-Palenzuela P. (1998).** Plant defense peptides. *Biopolymers.*, 47, 479–491.
- Gentle A., Anastasopoulos F. and Mc Brien N. A. (2001).** High resolution semi quantitative real time PCR without the use of a standard curve. *Bio Techniques.*, 31, 502-508.
- Graham L.S. and Sticklen M.B. (1994).** Plant chitinases. *Can. J. Bot.*, 72, 1057-1083.
- Guest D. and Grant B. (1990).** The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Plant physiology.*, 34, 159-160.
- Guest D. I., Pegg K. G. and Whiley, A. W. (1995).** Control of *Phytophthora* diseases of tree crops using trunk-injected phosphonates. *Hortic. Rev.*, 17, 299-330.
- Hanfrey C., Fife M. and Buchanan-Wollaston V. (1996).** Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant. Mol. Biol.*, 30,597-609.
- Hanslambers. (2013).** phosphorus nutrition of phosphorus-sensitive Australian native plants: threats to plant communities in a global biodiversity hot spot. *Conservation physiology.*, 1, 1-21.
- Haran S., Schickler H. and Chet I. (1996).** Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology.*, 142, 2321-2331.
- Hardy G. Barrett S. and Shearer B. (2001).** The future of phosphate as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Plant pathology.*, 30, 133-139.
- Heaton J. B. and Dullahide S. R. (1990).** Efficiency of phosphonic acid in other pathogen systems. *Aust. Plant Pathol.*, 19,133-134.
- Hegedus D.D., Buchwaldt L., Parkin I., Whitwill S., Coutu C., Bekkaoui D., Roger Rimmer S. (2008).** *Brassica napus* possesses an expanded set of polygalacturonase inhibitor protein genes that are differentially regulated in response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection, wounding and defense hormone treatment. *Planta.*, 228, 241-253.
- Heid C. A., Stevens J., Livak k. J., and William P. M. (1996).** Real time quantitative PCR. *Genome. Res.*, 6, 986-994.
- Herron S.R., Benen J.A.E., Kester H.C.M. and Visser J. (2000).** Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 97, 8762–8769.

Howard F. and Gent D. (2007). Damping-off and seedling blight cucumber, melon, pumpkin, squash and zucchini. *Plant physiology.*, 23, 457-459.

Huang Q. and Allen C. (2000). Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 57, 77–83.

Iseli B., Armand S., Boller T., Neuhaus J.M. and Henrissat B. (1996). Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett.*, 382, 186-188.

Jackson T. T., Burgess I. Colquhoun and G. Hardy. (2000). Action of the fungicide phosphate on eucalyptus marginata inoculated with *phytophthora cinnamomi*. *Plant pathology.*, 15, 235-238.

John M., Röhrig H., Schmidt J., Walden R. and Schell J. (1997). Cell signalling by oligosaccharides. *Trends Plant Sci.*, 2,111-115.

Johnston D.J., Ramanathan V. and Williamson B., (1993). A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other micro-organisms. *J. Exp. Bot.*, 44, 971–976.

Jones T.O., Anderson A.J. and Albersheim P., (1972). Host pathogen interactions IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersci*. *Physiological Plant Pathology*, 2, 153–166.

Jongedijk E., Tigelaar H., Van Roekel J.S.C., Bres-Vloemans S.A., Dekker I., Van den Elzen P.J.M., Cornelissen B.J.C. and Melchers, L.S. (1995). Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica.*, 85, 173–180.

Kasprzewska A. (2003). Plant chitinases: Regulation and Function. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 8,809-824.

Khan RS, Nishihara M, Yamamura S, Nakamura I, Mii M. (2006). Transgenic potatoes expressing wasabi defensin peptide confer partial resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Biotechnol.*, 23,179–183.

Kombrink E. and Somssich I.E. (1995). Defense responses of plants to pathogens. In JH Andrews, IC Tommerup, eds, *Advances in Botanical Research* (incorporating *Advances in Plant Pathology*). Academic Press, London., 21, 1-34.

Kombrink E. and Schmelzer E. (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107,69-78.

Kragh K. M., Nielsen J. E., Nielsen K. K., Dreboldt S. and Mikkelsen J. D. (1995). Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Betavulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8,424–434. doi: 10.1094/MPMI-8-0424.

Landschoot P. and Cook J. (2005). Sorting out the phosphonate products. *Plant physiology*, 12, 73-74.

Lang C. and Dornenburg H. (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 366-375.

Lavott C.J. (1999). Timing citrus and avocado foliar nutrient application to increase fruit set and size. *Hort tech.*, 9, 607-612.

Lay F, Anderson M. (2005). Defensins – Components of the Innate Immune System in Plants. *Current Protein and Peptide Science*, 6, 85-101.

Livak K. J., and Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.*, 25, 402-408.

Lobato M. C., Olivieri F. P., Wolski E. A., Daleo G. R., Caldiz D. O. and Andreu A. B. (2008). Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 349–358.

Lobato M.C., Machinandiarena M.F., Tambascio C., Dosio G.A.A., Caldiz D.O., Daleo G.R., Andreu A.B., Olivieri F.P., (2011). Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. *Eur. J. Plant Pathol.*, 130, 155-163.

Lovatt C.J. and Mikkelsen R.L. (2006). Phosphite fertilizers: what are they? *Better crops.*, 90, 20-26.

Machinan D., Lobato M.C. Feldman M.L. Rauldaleo G. and Andreu A.B. (2012). Potassium phosphate primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Plant physiology*, 70, 120-123.

Machinandiarena M.F., Lobato M.C., Feldman M.L., Daleo G.R., Andreu A.B. (2012). Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *J. Plant Physiol.*, 169, 1417-1424.

Mallard S, Negre S, Pouya S, Gaudet D, Lu ZX, Dedryver F. (2008). Adult plant resistance related gene expression in Camp Remy wheat inoculated with *Puccinia striiformis*. *Mol Plant Pathol.*, 22, 13-25.

Masoud S.A., Zhu Q., Lamb C. and Dixon R.A. (1996). Constitutive expression of an inducible β -1,3-glucanase in alfalfa reduces disease severity caused by the oomycete pathogen *Phytophthora megasperma* f. *spmedicaginis*, but does not reduce disease severity of chitin-containing fungi. *Biomedical and Life Sciences*, 5(5), 313-323.

Melton D. A., Krieg P. A., Rebagliati M. R., Maniatis T., Zinn k., and Green M. R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization

probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.*, 12, 7035-7056.

Menis F.Jr., Fritig B.J., Linthorst H. J. M., Mikkelsen J. D., Neuhaus J.-M. and Ryals J.(1994). Plant chitinase genes. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 12, 22-28.

Molavi E., Aminian H., Etebarian H. R. and Shahriari D. (2009). Investigation the resistance of greenhouse-cucumber cultivars to *Fusarium* stem and root rot disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*). *Journal of Agriculture*, 11, 177-189.

Moor U. Polldma P. Tonutare T. Karp K. Starast M. Vool E. (2009). Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Sci. Hortic.*, 119, 264-269.

Morkunas I. and Gemerek J. (2007). The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupin embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiology.*, 164, 497–506.

Mucharromah E. (1991). oxalat and phosphonat induce systemic resistance against disease caused by fungi, bacteria and virus in Cucumber. *Crop protection.*, 10, 265-270.

Neto A.D., Prisco J.T., Eneas-Filho J., Abreu C.E.B. and Gomes-Filho E. (2005). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and saltsensitive maize genotypes. *Environ Experimental Botany*, 56, 87-94.

Niere J.O. DeAngelis G. and Grant B.R. (1994). the effect of phosphonat on the acid soluble phosphorus component in the genus *phytophthora*. *Microbiology*, 140, 1661-1670.

Nobe R., Sakakibara Y., Ogawa K. and Suiko M. (2004). Cloning and expression of a novel *Trichoderma viride* laminarinase AI gene (lamAI). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (10), 2111-2119.

Ntui V.O., Thirukkumaran G., Azadi P, Khan R.S., Nakamura I. and Mii M. (2010). Stable Integration and Expression of Wasabi Defensin Gene in “Egusi” Melon (*Colocynthis citrullus* L.) Confers Resistance to *Fusarium* wilt and *Alternaria* Leaf Spot. *Plant Cell Reports.*, 29, 943-954.

Odjakova M. and Hadjiivanova C. (2001). The complexity of pathogen defense in plants. *Plant Physiol.*, 27, 101-109.

Ovidio D., Raiola A., Capodica C., Devoto A., Pontiggia D., Roberti S., Galletti R. (2004). Characterization of the complex locus of *Phaseolus vulgaris* encoding polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) reveals sub-functionalization for defence against fungi and insects. *Plant Physiol.*, 135, 2424–2435.

Ozeretskoykaya O.L., Vasyukova N.I., Chalenko G.I., Gerasimova N.G., Revina T.A., Valueva T.A., (2009). Wound healing and induced resistance in potato tubers. *Appl. Biochem. Micro.*, 45, 199-203.

Parashina EV., Serdobinskii LA., Kalle EG., Lavorova NA., Avetisov VA., Lunin VG. and Naroditskii BS. (2000). Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene. *Russian Journal of Plant Physiology*, 47, 417-423.

Parenicova L., Benen J.A.E., Kester H.C.M. and Visser J. (2000). pgA and pgB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal.*, 345, 637–644.

Parker R. M. and Barnes N. M. (1999). mRNA: detection by in situ and northern hybridization. *Methods in Mol Bio.*, 106, 247-283.

Paul V. (2004). Resistance to phosphate fungicide. *Plant pathology.*, 15, 209-214.

Peretto R., Favaron F., Bettini V., De Lorenzo G., Marini S., Alghisi P., Cervone F. and Bonfante P., (1992). Expression and localization of polygalacturonase during the outgrowth of lateral roots in *Allium porrum*L. *Planta.*, 188, 164-172.

Pitson, S. M., Seviour, R. J., and McDougall, B. M. 1993. Noncellulolytic Fungal β -Glucanases: Their Physiology and Regulation. *Enzyme Microbiology and Technology* 15, 178-192.

Powell A.L.T., Van Kan J., ten Have A., Visser J., Greve L.C., Bennett A.B., and Labavitch J.M. (2000). Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant–Microbe Interact.*, 13, 942–950.

Punja Z. K. (2006). Recent developments toward achieving fungal disease resistance in transgenic plants. *Can. J. plant pathol.*, 28, 298-308.

Rakha M. and S. Lu. (1990). Evaluation of phosphate rates against phytophthora root rot disease on cucumber. *Plant physiology.*, 20, 57-59

Rasmussen R. P. (2001). Quantification on the Ligh Cycler. In rapid cycle Real-Time PCR, methods and applitions. Springer Press, Heidelberg., 21-34.

Ren Y.Y., and West C.A. (1992). Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiology.*, 99, 1169-1178.

Rickard D. (2008). Review of phosphorus acid and its salts as fertilizer materials. *Plant nutrition.*, 23, 161-180.

Ride J.P and Barber M.S. (1990). Purification and charactrization of multiple forms of endochitinase from wheat leaves. *Plant Science.*, 71, 185-197.

Ridley B. L., O'Neill M. A. and Mohnen D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry.*, 57,929-967.

Robertsen B. (1986). Elicitors of the production of lignin-like compounds in cucumber hypocotyls. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 28, 137–148.

Rogers LA. and Campbell MM. (2004). The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytol.*, 164, 17-30.

Saccomanno C. F., Bordonaro M., Chen J. S. and Nordstrom L. L. (1992). A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques.*, 13, 846-850.

Saikia R., Pratab Singh B., Kumar R. and Arora, K. (2005). Detection of pathogenesis-related proteins chitinase and β -1,3-glucanase in induced chickpea. *Current Science.*, 89(4), 659-663.

Sairam R.K., Rao K.V. and Srivastava G.C. (2003). Differential response wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science.*, 163, 1037-1046.

Santa B. and Obispo L. (2001). Damping-off disease. *Agriculture and natural resources.*, 12, 35-38.

Segura A., Moreno M., Molina A. and Garcia-Olmedo F. (1998). Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*) *FEBS Letters.*, 435, 159–162.

Selitre C.P. (2001). Antifungal Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2883–2894.

Sella L., Castiglioni C., Roberti S., D'Ovidio R. and Favaron F. (2004). An endopolygalacturonase (PG) of *Fusarium moniliforme* escaping inhibiting protein (PGIPs) provides new insights into the PG-PGIP interaction. *FEMS Microbiology Letter.*, 240,117-124.

Selote D.S. and Khanna-Chopra R. (2004). Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defense in rice panicles. *Plant Physiology.*, 121, 462-471.

Sergiev V., Alexieva E. and Karanov E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare Sciences*, 51, 121-124.

Shanmugam V. (2005). Role of extracytoplasmic leucine rich repeat proteins in plant defence mechanisms. *Microbiological Research.*, 160, 83-94.

Shetty H.S., Vasanthi N.S., Sarosh B.R., Kini K.R. (2001). Inheritance of downy mildew resistance, β -1,3-glucanases and peroxidases in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] crosses. *Theor Appl Genet* 102:1221–1226.

Shieh M.T., Brown R.L., Whitehead M.P., Cary J.W., Cotty P.J., Cleveland T.E. and Dean R.A., (1997). Molecular genetics evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton balls. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3548–3552.

Simmons C.R. (1994). The physiology and molecular biology of plant 1,3-b-d-glucanases. 1994. *Crit Rev. Plant Science.*, 13, 325-387.

Simpson C.G., MacRae E. and Gardner R.C. (1995). Cloning of a polygalacturonase inhibiting protein from Kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *Plant Physiol.*, 108, 17–48.

Sridevi G., Parameswari C., Sabapathi N., Raghupathy V. and Karuppannan V. (2008). Combined expression of chitinase and -1,3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. *Plant Sci.* 175(3), 283-290.

Stehmann C. and Grant B.R. (2000). Inhibition of the glycolytic pathway and Hexosmonophosphat bypass by phosphonate. *Pesticide Biochemistry.*, 67,13-24.

Stewart R. R. C. and Bewley J. D. (1980). Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiology.*, 65, 245-248.

Stotz H.U., Powell A.L.T., Damon S.E., Greve L.C., Bennett A.B. and Labavitch J.M. (1993). Molecular characterization of a polygalacturonase-inhibiting from *Pyrus communis* L. CV. Bartlett. *plant physiology.*, 102, 133-138.

Thao H.T.B. and Yamakawa T. (2008). phosphite:fungicide fertilizer or biostimulator . *soil CI.plant.NUtr.*, 55,228-234.

Theis T. and Stahl U. (2004). Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61,437-455.

Torki M., Mandaron P., Mache R and Falconet D. (2000). Characterization of a ubiquitous expressed gene family encoding polygalacturonase in *Arabidopsis thaliana*. *Gene.*, 242 , 427-436.

Turkan I. and Demiral T. (2009). Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Exprimantal Botany*, 67, 2–9.

Van Kan J.A.L., Joosten M.H.A.J. and Wagemakers C.A.M. (1992). Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and a virulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Molecular Biology.*, 20, 513-527.

Van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T. and Conejero V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter.*, 12, 245-264.

Van loon L. C. and Van strien E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol and mol plant pathol.*, 55, 85-97.

Ward E.R., Uknes S.J., Williams S.C., Dincher S.S., Wiederhold D.L., Alexander D.C., Ahl-goy P., Metraux J.P. and Ryals J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell.*, 3, 1085-1094.

Weis J. H., Tan S. S., Martin B. K. and Wittwer C. T. (1992). Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends in Genetics.*, 8, 263-264.

Whipps J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 52, 487-511.

Wicks T.J., Magarey P.A., Wachtel H.F. and Fresham A.B. (1991). Effect of post infection application of phosphonic acid on *Plasmopara citricola* on grapevine. *Plant Dis.*, 75, 40e43.

Wong M. L. and Medrano J. F. (2005). Real-Time PCR for mRNA quantitation. *Bio Techniques.*, 39, 63-68.

Yaron Y. (2007). The importance of phosphorous for plants. *Plant physiology.*, 10, 22-24.

Yoshikawa M., Tsuda M., and Takeuchi Y. (1993). Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, B-1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften.*, 80, 417-420.

Zamani M.R., M. Motallebi and Arefpour M.A. (2000). Comparative study of polygalacturonase activity from different Iranian isolates of *Fusarium oxysporum*. *Iranian J. Agri. Sci.*, 31, 293-302.

Zang w., Dick W. A. and Hoitink H. A. J. (1996). Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. *Phytopathology.*, 86, 1066-1070.

Zhang X.H., Guo D.J. and Zhang L.M. (2000). The research on the expression of rabbit defensin (*NP-1*) gene in transgenic tomato. *Acta Gen. Sinica.*, 27, 953-958.

Abstract

The quantity and quality of Agricultural goods is prone to huge losses due to the attack of various pathogens, e.g. viruses, fungi, nematodes and bacteria. *Fusarium oxysporum* is one of the major cucurbits pathogens which mostly damages the plant roots. There are several strategies to control this pathogen. Potassium phosphite is a systemic fungicide against soil and aerial bacterial and fungal pathogens which has preventative, curative and immunization effects. This study was conducted to study changes in growth and morphologic traits, and enzymatic, biochemical and molecular responses (expression of *pgip1*, *defensin*, *chitinase* and *beta 1,3-glucanase* genes) of Potassium phosphite-treated cucumber plants against *Fusarium* wilt of cucumber root and stem (*Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-cucumerinum*). Results revealed that compared to control plants, fresh weight, chlorophyll content, the activity of defense enzymes, e.g., Guaiacol peroxidase (GPX), Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and metabolite Hydrogen peroxide (H₂O₂) were increased in the tissues of the treated plants compared to controls. The highest CAT content was recorded for 4 gr/L Potassium phosphite at 5 days post-inoculation which revealed a 2.81 fold increase compared to control. The highest concentration of GPX and SOD were recorded for 4 gr/L Potassium phosphite 3 days post inoculation which showed 1.45 and 2.21 fold increase for GPX and SOD, respectively. In 4 gr/L Potassium phosphite treatment, there was a harmony between H₂O₂ content and activities of CTA, GPX and SOD in plant tissues, while MDA accumulation was reduced which can be attributed to reduced tissue damage and improved disease control. Gene expression analysis revealed a 16.3 fold increase for *pgip1* gene at 4 gr/L Potassium phosphite, 45.7 fold increase for *Defensin* gene at 1 gr/L Potassium phosphite, 91.2 fold increase for *Chitinase* gene in pathogen-inoculated plants and 48.6 fold increase for *1,3-beta glucanase* gene in pathogen-inoculated plants, compared to control plants.

Keywords: Cucumber, Potassium phosphite, *Fusarium oxysporum*, *pgip*, *chitinase*, *defensin*, *1,3- beta glucanase* , Gene expression



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

MSc thesis in Agriculture of Biotechnology

Expression profile study of *pgip* genes in cucumber plants treated with potassium phosphite

By: Sahar Heidarzadeh

Supervisor:

Dr. Sh. Garanjik

Dr. A. Dehestani

Advisor:

D. Shahriari

September 2016