

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

ارزیابی الگوی بیان برخی از ژن‌های مقاومت در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و سالسیلیک اسید در مقابله با پاتوژن خاک زاد عامل بیماری پوسیدگی ریشه ی خیار (*Fusarium solani*)

نگارنده: صدرا رضائی

اساتید راهنما

دکتر شاهرخ قرنچیک

دکتر شیده موجرلو

تیر ماه ۱۳۹۸

شماره: ۲۰۰۰-۴
تاریخ: ۱۳۹۸ / ۴ / ۲۳

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد آقای صدرا رضایی با شماره دانشجویی ۹۴۰۸۲۱۴ رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی تحت عنوان ارزیابی الگوی بیان برخی از ژن های مقاومت در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و سالیسیک اسید در مقابله با پاتوزن خاکزاد عامل بیماری پوسیدگی ریشه ی خیار (*Fusarium solani*) که در تاریخ ۱۰ تیر ۱۳۹۸ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

<input type="checkbox"/> مردود <input checked="" type="checkbox"/> قبول (با درجه: عالی...)			
<input checked="" type="checkbox"/> عملی <input type="checkbox"/> نظری			
امضاء	مرتبه علمی	نام و نام خانوادگی	عضو هیأت داوران
	استاد یار	دکتر شاهرخ قرنجیک	۱- استاد راهنمای اول
	استادیار	دکتر شیده موجرلو	۲- استاد راهنمای دوم
			۳- استاد مشاور
	دانشیار	دکتر حسن مکاریان	۴- نماینده تحصیلات تکمیلی
	استاد یار	دکتر امین ابراهیمی	۵- استاد ممتحن اول
	استاد یار	دکتر پرویز حیدری	۶- استاد ممتحن دوم

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمد رضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مقطع مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تعهد نامه

اینجانب صدرا رضایی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد (دکتری) رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه "ارزیابی الگوی بیان برخی از ژن‌های مقاومت در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و سالیسیلیک اسید در مقابله با پاتوژن خاک زاد عامل بیماری پوسیدگی ریشه ی خیار (*Fusarium solani*)" تحت راهنمایی دکتر شاهرخ قرنچیک و دکتر شیده موجرلو متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان‌نامه 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 پایان‌نامه 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 می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

ده تیر ماه ۱۳۹۸

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 صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود . استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

بیمارگر *Fusarium solani* f. Sp. *cucurbitae* عامل پوسیدگی ریشه، میوه و طوقه کدوئیان است که در سال‌های اخیر مشکل اقتصادی زیادی برای پرورش‌دهندگان این محصولات ایجاد کرده است. هدف از تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی بیمارگر *Fusarium solani* f. Sp. *cucurbitae* عامل پوسیدگی ریشه، طوقه و میوه در مزارع کدوئیان و سپس بررسی پاسخ آنزیمی و مولکولی رقم حساس (رقم نگین) و رقم مقاوم (رقم خسیب) گیاه خیار (*Cucumis sativus*) در اثر آلودگی با این بیمارگر بود. نتایج این تحقیق نشان داد که *Fusarium solani* f. Sp. *cucurbitae* به‌عنوان گونه‌ی غالب و نژاد یک به‌عنوان نژاد غالب در مزارع نمونه‌گیری شده می‌باشند. با تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن مشخص شد که سطح رونوشت‌های ژن *pr-1* در گیاهان شاهد و رقم مقاوم در مقایسه با رقم حساس در روزهای سوم، هفتم و دهم به ترتیب ۱۲۳/۵، ۴/۱۱ و هفت برابر بالاتر می‌باشد. این در حالی است که ژن فنیل آلانین آمونیلیاز (*pal*) در گیاهان شاهد رقم حساس نسبت به رقم مقاوم به میزان ۱/۱۹، ۶۴/۱۵ و ۱/۱۴ برابر به ترتیب در روزهای سوم، هفتم و دهم بیان بالاتری داشت. همچنین افزایش بیان هر دو ژن در روز دهم پس از مایه‌زنی با قارچ نسبت به گیاهان شاهد در رقم مقاوم (۱/۵ و ۱۲/۲۸ برابر به ترتیب برای ژن *pal* و *pr1*) مشاهده شد. پیش تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید موجب افزایش بیان هر دو ژن در رقم حساس و مقاوم در مقایسه با گیاهان تلقیح شده با قارچ شد به‌طوری‌که بیشترین تأثیر این پیش تیمار در رقم مقاوم خسیب در روز سوم (ژن *pr1* به میزان ۲۲/۱۲ برابر و ژن *pal* ۵۳/۶۶ برابر) و در رقم نگین در روز دهم (ژن *pr1* به میزان ۵۳/۵ برابر و ژن *pal* ۱۷۳ برابر) مشاهده شد. نتایج نشان داد آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز در اثر مایه‌زنی گیاهان رقم خسیب با قارچ در روز سوم و هفتم (به ترتیب ۴/۰۵ و چهار برابر فعالیت آنزیم در گیاه شاهد) افزایش فعالیت بیشتری در مقایسه با رقم حساس نگین (۲/۳۳ و ۱/۹ برابر فعالیت آنزیم در گیاه شاهد) نشان می‌دهد. همچنین تیمار سالیسیلیک اسید موجب افزایش فعالیت کاتالاز در رقم خسیب شد به طوری که در روز سوم فعالیت این آنزیم ۲/۸۵ برابر حالت شاهد گردید و تیمار فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار با افزایش فعالیت کاتالاز در رقم نگین همراه بود (۳/۴ برابر فعالیت آنزیم در حالت شاهد در روز سوم). فعالیت آنزیم PAL در رقم نگین در اثر تیمارها و مایه‌زنی با قارچ تغییر معناداری نسبت به گیاهان شاهد نشان نداد در صورتی‌که رقم مقاوم، تنها در روز هفتم افزایش معناداری در تعدادی از تیمارها از جمله پیش تیمار با سالیسیلیک اسید (۲/۴۹ برابر گیاه شاهد) داشت. بنابر نتایج این آزمایش تیمارهای سالیسیلیک اسید (با غلظت دو میلی مولار) و فسفیت پتاسیم (با غلظت ۲۰ میلی مولار و ۳۶ میلی مولار) می‌توانند باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی و افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با تنش‌های زنده و افزایش مقاومت گیاه به بیمارگر *F. Solani* f. Sp. *Cucurbitae* گردد.

کلمات کلیدی: خیار، سالیسیلیک اسید، فسفیت پتاسیم، بیان ژن، فعالیت آنزیم

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

1- Rezaee S, Gharanjik S, Mojerlou S. Identification of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races using morphological and molecular approaches. JCP. 2018; 7 (2) :161-170

۲- رضائی صدرا؛ قرنجیک شاهرخ؛ موجرلو شیده، 1396، بررسی این سیلیکو ناحیهی پرموتور ژن های دخیل در برهمکنش رقابتی و غیر رقابتی بین میزبان -بیمارگر، دومین همایش بین المللی و دهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی، کرج، ایران

فهرست مطالب

۵	فهرست جداول
۹	فهرست اشکال
۱	فصل ۱: مقدمه
۷	فصل ۲: مروری بر منابع
۸	۱-۲ فوزاریوم سولانی
۸	۱-۱-۲ ریخت‌شناسی بیمارگر فوزاریوم سولانی
۹	۲-۱-۲ نژادهای فیزیولوژیک بیمارگر فوزاریوم سولانی
۱۱	۳-۱-۲ فوزاریوم سولانی در ایران
۱۱	۴-۱-۲ شناسایی بیمارگر
۱۲	۵-۱-۲ کنترل بیماری
۱۴	۲-۲ دفاع سطحی در گیاهان و متابولیت‌های ثانویه
۱۵	۳-۲ مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR)
۱۵	۴-۲ سالیسیلیک اسید (SA)
۱۶	۱-۴-۲ بیوسنتز سالیسیلیک اسید و مسیر پیام‌رسانی مرتبط با آن
۱۹	۵-۲ فسفیت
۲۱	۶-۲ روش Real Time

- ۲۲..... Real Time در روش‌های نشانه‌گذاری در ۱-۶-۲
- ۲۲..... Real time PCR با مفاهیم تخصصی در روش ۲-۶-۲
- ۲۳..... Real time PCR تجزیه و تحلیل داده‌های ۳-۶-۲
- ۲۳..... تغییرات بیان ژن دفاعی گیاه در برابر بیمارگر ۷-۲
- فصل ۳: مواد و روشها**
- ۲۷
- ۲۸..... ۱-۳ جداسازی بیمارگر ۱-۳-۲۸
- ۲۸..... ۲-۳ خالص‌سازی بیمارگر، شناسایی و نگهداری آن ۲-۳-۲۸
- ۲۸..... ۳-۳ شناسایی مقدماتی جدایه‌های قارچی ۳-۳-۲۸
- ۲۹..... ۴-۳ شناسایی مولکولی قارچ ۴-۳-۲۹
- ۲۹..... ۱-۴-۳ استخراج DNA از قارچ ۱-۴-۳-۲۹
- ۳۰..... ۲-۴-۳ تکثیر قطعه‌ی TEF-1 α قارچ با استفاده از PCR ۲-۴-۳-۳۰
- ۳۰..... ۳-۴-۳ شناسایی نژاد قارچ فوزاریوم سولانی ۳-۴-۳-۳۰
- ۳۱..... ۵-۳ طرح آماری ۵-۳-۳۱
- ۳۱..... ۶-۳ تهیه‌ی بذرهای گیاه خیار ۶-۳-۳۱
- ۳۱..... ۷-۳ بستر کشت گیاهان ۷-۳-۳۱
- ۳۲..... ۸-۳ کاشت مواد گیاهی ۸-۳-۳۲
- ۳۲..... ۹-۳ تهیه ترکیب شیمیایی فسفیت پتاسیم ۹-۳-۳۲
- ۳۳..... ۱۰-۳ تهیه ترکیب شیمیایی سالیسیلیک اسید ۱۰-۳-۳۳
- ۳۳..... ۱۱-۳ تهیه زاد مایه قارچ عامل بیماری ۱۱-۳-۳۳
- ۳۳..... ۱۲-۳ مایه‌زنی گیاهچه‌های خیار در اتاقک رشد و آزمون بیماری‌زایی ۱۲-۳-۳۳
- ۳۴..... ۱۳-۳ کاشت گیاهان برای بررسی تغییرات بیان ژن و فعالیت آنزیمی ۱۳-۳-۳۴
- ۳۴..... ۱۴-۳ نمونه‌گیری مواد گیاهی ۱۴-۳-۳۴

۳۴ ۱۵-۳ استخراج RNA کل
۳۵ ۱-۱۵-۳ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده
۳۵ ۱۶-۳ سنتز cDNA
۳۶ ۱۷-۳ طراحی آغازگر
۳۷ ۱۸-۳ واکنش Real time PCR
۳۸ ۱-۱۸-۳ تجزیه و تحلیل داده‌های Real time PCR
۳۸ ۱۹-۳ بررسی تغییرات فعالیت آنزیمها
۳۸ ۱-۱۹-۳ آنزیم کاتالاز
۳۹ ۲-۱۹-۳ PAL آنزیم
۳۹ ۲۰-۳ تجزیه و تحلیل داده‌های فعالیت آنزیم
۴۲	فصل ۴ : نتایج و بحث
۴۳ ۱-۴ جمع‌آوری نمونه‌های آلوده و شناسایی اولیه‌ی عامل بیماری
۴۵ ۲-۴ شناسایی مولکولی گونه‌های جنس فوزاریوم
۴۶ ۳-۴ شناسایی مولکولی نژاد جدایه‌های فوزاریوم سولانی
۴۶ ۴-۴ شناسایی جدایه‌ی فوزاریوم سولانی نژاد یک با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی
۴۷ ۵-۴ آزمون بیماری‌زایی بیمارگر فوزاریوم سولانی نژاد یک
۵۰ ۶-۴ بررسی مولکولی
۵۰ ۱-۶-۴ استخراج RNA از برگ
۵۰ ۲-۶-۴ انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با cDNA
۵۲ ۳-۶-۴ بررسی تغییرات بیان ژن pr1
۵۸ ۴-۶-۴ بررسی تغییرات بیان ژن pal
۶۳ ۷-۴ بررسی فعالیت آنزیمی

۶۳.....۱-۷-۴ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان رقم حساس نگین

۶۵.....۲-۷-۴ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان رقم مقاوم خسیب

۶۷.....۳-۷-۴ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم PAL در گیاهان رقم حساس نگین

۶۸.....۴-۷-۴ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم PAL در گیاهان رقم مقاوم خسیب

۷۰..... ۸-۴ بحث

۷۶

فصل ۵ : منابع

فهرست جداول

- جدول ۱-۲: خانواده‌های PR پروتئین‌ها
- جدول ۱-۳: آغازگرهای مورد استفاده به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌ها و برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز
- جدول ۲-۳: آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی مولکولی نژاد یک و دو قارچ فوزاریوم سولانی
- جدول ۳-۳: ترکیبات واکنش ساخت رشته اول cDNA
- جدول ۴-۳: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی تغییرات بیان ژن
- جدول ۵-۳: اجزاء مخلوط واکنش Real time PCR
- جدول ۶-۳: برنامه دمایی Real time PCR
- جدول ۱-۴: فهرست ۵۰ جدایه عامل بیماری جداسازی شده از مزارع جالیز

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: توزیع سطح برداشت گروه محصولات جالیزی ایران در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ ۲
- شکل ۱-۲: درصد توزیع میزان تولید گروه محصولات جالیزی در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ ۳
- شکل ۱-۲: ماکروکنیدی (الف) و میکروکنیدیهای (ب) فوزاریوم سولانی (Leslie and Summerell) ۸
- شکل ۲-۲: پژمردگی برگ‌های بوته‌ی خیار در اثر بیماری فوزاریوم سولانی (الف) میسیلیوم سفیدرنگ قارچ در اطراف گیاه آلوده (ب) (Lloyd et al. 2015) ۱۰
- شکل ۳-۲: بیوسنتز سالیسیلیک اسید در گیاهان (Vlot et al. 2009) ۱۷
- شکل ۴-۲: مدلی از فعال شدن مسیر پیام‌رسانی سالیسیلیک اسید در سلول‌های گیاهی (Kumar) ۱۸
- شکل ۱-۳: پرورش گیاهچه‌ها در اتاقک رشد در شرایط کنترل شده ۳۲
- شکل ۱-۴: قارچ‌های ریزوکتونیا (الف)، آلترناریا و فوزاریوم (ج و د)، جداسازی شده از میوه‌های خیار آلوده در تحقیق حاضر ۴۳
- شکل ۲-۴: الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای TEF-Fs4f و TEF-Fs4r روی ژل آگارز یک درصد. خط کش ژنومی یک کیلو جفت بازی (M) نمونه‌ی کنترل منفی (N) و جدایه‌های مطالعه شده (چاهک‌های ۱ تا ۱۴) ۴۵
- شکل ۳-۴: الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نژاد ۱ (Fsc1 EF1/Fsc1) و ۲ (EF2) بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. M: خط کش ژنومی یک کیلو جفت بازی، N: کنترل منفی، ۱ و ۲ جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق. ۴۶
- شکل ۴-۴: ماکروکنیدی‌های ۵ قسمتی نژاد یک فوزاریوم سولانی با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر (الف) و ۱۰۰ برابر (ب) ۴۷
- شکل ۴-۵: علائم بیماری در ریشه و قسمت‌های پایینی ساقه در اثر بیماری فوزاریوم سولانی (الف) و گیاه شاهد (ب). ۴۸
- شکل ۴-۶: علائم بیماری در اطراف ریشه‌ی گیاهان تلقیح شده (الف) و شاهد (ب). علائم بیماری به صورت قهوه‌ای شدن ریشه و ابتدای ساقه در گیاه تلقیح شده با فلش مشخص شده است. ۴۹
- شکل ۴-۷: رشد قارچ فوزاریوم سولانی در اطراف ریشه‌ی گیاهان تلقیح شده رقم خسیب (الف) و رقم نگین (ب) و عدم رشد آنها در اطراف ریشه‌های گیاهان شاهد رقم خسیب (ج) و نگین (د). ۴۹
- شکل ۴-۸: نمونه‌ی RNA استخراج شده از برخی تیمارها بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد. خط کش ژنومی یک کیلو جفت بازی (M) و نمونه‌های RNA (چاهک‌های ۱ تا ۷) ۵۰
- شکل ۴-۹: محصول واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز با DNAهای مکمل با استفاده از آغازگرهای ژن آلفا توبولین با تکثیر قطعه‌ی ۱۹۱ جفت بازی (الف)، pal با تکثیر قطعه‌ی ۱۰۴ جفت بازی (ب) و pr1 با تکثیر قطعه‌ی ۱۷۵ جفت بازی (ج). خط کش ژنومی یک کیلو جفت بازی (M) نمونه‌ی کنترل

- منفی (N)، چاهک شماره یک محصول PCR با cDNA و چاهک شماره دو محصول PCR با DNA
- ۵۱..... ژنومی.
- شکل ۴-۱۰: بررسی تغییرات بیان ژن pr1 در رقم حساس نگین در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه‌زنی با قارچ. میانگین‌ها حاصل سه تکرار بیولوژیک است. بارها نشان‌دهنده
- ۵۴..... خطای استاندارد می‌باشند.
- شکل ۴-۱۱: بررسی تغییرات بیان ژن pr1 در رقم مقاوم خسیب در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه‌زنی با قارچ. میانگین‌ها حاصل سه تکرار بیولوژیک است. بارها نشان‌دهنده
- ۵۷..... خطای استاندارد می‌باشند.
- شکل ۴-۱۲: بررسی تغییرات بیان ژن pal در رقم حساس نگین در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه‌زنی با قارچ. میانگین‌ها حاصل سه تکرار بیولوژیک است. بارها نشان‌دهنده
- ۶۰..... خطای استاندارد می‌باشند.
- شکل ۴-۱۳: تغییرات بیان ژن pal در رقم مقاوم خسیب در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه‌زنی با قارچ. میانگین‌ها حاصل سه تکرار بیولوژیک است. بارها نشان‌دهنده خطای
- ۶۲..... استاندارد می‌باشند.
- شکل ۴-۱۴: تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان رقم حساس نگین. الف: روز سوم، ب: روز هفتم، ج: روز دهم. میانگین‌ها حاصل سه تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است. زمان‌های متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری شده‌اند.
- ۶۴.....
- شکل ۴-۱۵: بررسی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان رقم مقاوم خسیب. الف: روز سوم، ب: روز هفتم، ج: روز دهم. میانگین‌ها حاصل سه تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است. زمان‌های متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری
- ۶۶..... شده‌اند.
- شکل ۴-۱۶: بررسی تغییرات فعالیت آنزیم PAL در گیاهان رقم حساس نگین. الف: روز سوم، ب: روز هفتم، ج: روز دهم. میانگین‌ها حاصل سه تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است. زمان‌های متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری
- ۶۸..... شده‌اند.
- شکل ۴-۱۷: بررسی تغییرات فعالیت آنزیم PAL در گیاهان رقم مقاوم خسیب. الف: روز سوم، ب: روز هفتم، ج: روز دهم. میانگین‌ها حاصل سه تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است. زمان‌های متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری
- ۶۹..... شده‌اند.
- شکل ۴-۱۸: همبستگی رونوشت ژنها با فراوانی پروتئینها در بافتهای مختلف گیاه ذرت (Jia et al, 2017): PC: همبستگی مثبت بین رونوشت ژنها و فراوانی پروتئینها، LC: همبستگی پایین بین رونوشت ژنها و فراوانی پروتئینها NC: همبستگی منفی بین رونوشت ژنها و فراوانی پروتئینها.
- ۷۴.....

شکل ۴-۱۹ ارتباط بین mrna و فراوانی پروتئینها در سلولهای انسانی. (Vogel and Marcotte,

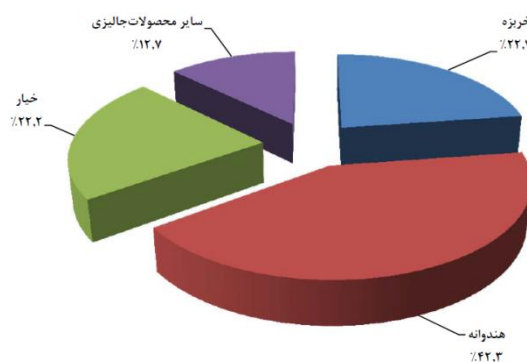
2012) ۷۵

فصل ۱ : مقدمه

خیار با نام علمی *Cucumis sativus* از خانواده‌ی کدوئیان (Cucurbitaceae) می‌باشد. خیار از نظر اقتصادی و وسعت کشت یکی از مهم‌ترین صیفی‌جات مصرفی در جهان و ایران است که به‌شدت در معرض تهدید بیماری‌های قارچی قرار دارد. از میان بیماری‌های قارچی نیز پوسیدگی ریشه، طوقه و میوه یکی از شایع‌ترین بیماری‌های خیار در سطح جهان است. با این وجود، مطالعات انجام‌شده بر روی عوامل این بیماری در ایران بسیار محدوده بوده و اکثر ظرفیت عظیم ژنتیکی ژرم پلاسما خیار برای کنترل این بیماری ناشناخته مانده است. مطالعات نشان داده است که اکثر گونه‌های زراعی مهم این خانواده به انواع بیماری‌ها حساس بوده و متحمل خسارات زیادی می‌شوند (Olczak-Woltman *et al.* 2011).

در حال حاضر مبارزه شیمیایی شایع‌ترین راهکار کنترل بیماری‌های گیاهی می‌باشد که به دلیل مصرف بی‌رویه سموم، مقاومت آفات و بیماری‌ها را به دنبال داشته است. به‌طوری‌که سالانه خسارت‌های زیادی در اثر حمله بیماری‌های گیاهی به کشاورزان وارد می‌شود. علاوه بر این وجود باقیمانده مواد شیمیایی در محصولات تولیدی به مسئله‌ای اساسی تبدیل شده است که سلامتی جامعه مصرف‌کنندگان را تهدید می‌کند. به همین دلیل امروزه استفاده از ترکیبات قارچ‌کش به دلیل عدم کارایی صد در صد، آلودگی محیط زیست و ایجاد مقاومت در بیمارگر به‌شدت به چالش کشیده شده است (Paulus *et al.* 1976). برای غلبه بر این مشکل راه‌های متعددی برای کنترل بیماری‌های گیاهی پیشنهاد و اجرا شده است که از جمله آن‌ها روش‌های زراعی، مبارزه بیولوژیک و شناسایی ژنو تیپ‌های مقاوم و یا عوامل ژنتیکی مؤثر در مقاومت و ایجاد ارقام متحمل‌تر برای کشت‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای می‌باشد. ایجاد ارقام مقاوم یکی از راه‌های سنتی مورداستفاده است که استراتژی‌های اصلاح کلاسیک از طریق تلاقی و انتخاب ارقام مقاوم از جمله راهکارهای مورداستفاده در این روش‌ها است (Nagao *et al.* 1994).

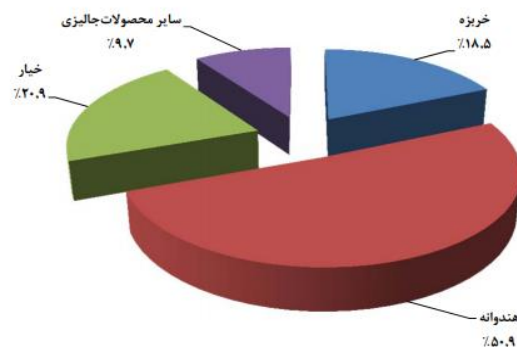
بنابر آخرین آمارنامه‌ی وزارت جهاد کشاورزی ایران، در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴، حدود ۳۲۶ هزار هکتار برابر با ۲/۷۷ درصد از سطح برداشت زراعی کشور به انواع محصولات جالیزی اختصاص داشته است. از بین سطح برداشت محصولات جالیزی هندوانه با ۴۲/۳، خربزه با ۲۲/۷ و خیار با ۲۲/۲ درصد رتبه‌ی اول تا سوم سطح محصولات جالیزی کشور را دارا هستند و سایر محصولات جالیزی جمعاً حدود ۱۲/۷ درصد از میزان سطح برداشت این گروه از محصولات را به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱: توزیع سطح برداشت گروه محصولات جالیزی ایران در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴

از بین استان‌های کشور بیشترین سطح برداشت محصولات جالیزی آبی متعلق به استان‌های خراسان رضوی با ۱۷/۱، جنوب استان کرمان با ۱۲/۲، سیستان و بلوچستان و فارس با ۹/۸ و خوزستان با ۹/۱ درصد می‌باشد و کمترین سطح برداشت محصولات جالیزی آبی متعلق به استان چهارمحال و بختیاری با ۵ هکتار می‌باشد (بی‌نام، ۱۳۹۵).

کل میزان تولید محصولات جالیزی کشور حدود ۸ میلیون تن معادل ۹/۷ درصد از کل تولیدات زراعی می‌باشد. از این مقدار تولید اراضی کشت آبی ۹۶/۷ درصد و اراضی کشت دیم ۳/۳ درصد است. از بین میزان تولید محصولات جالیزی هندوانه با ۵۰/۲، خیار با ۲۰/۹ و خربزه با ۱۸/۵ درصد رتبه اول تا سوم میزان تولید محصولات جالیزی کشور هستند (شکل ۱-۲) و سایر محصولات جالیزی جمعاً حدود ۹/۷ درصد از میزان تولید این گروه محصولات را به خود اختصاص داده‌اند (بی‌نام، ۱۳۹۵).



شکل ۲-۱ درصد توزیع میزان تولید گروه محصولات جالیزی در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴

بیمارگرهای مختلفی باعث ایجاد بیماری در کدوئیان می‌شوند که در ادامه به مهم‌ترین آن‌ها اشاره می‌شود. فیتوفتورا^۱ جنس مهمی از بیمارگرهای رده ی //میست^۲ است. این جنس بیش از ۹۰ گونه مورفولوژیک دارد که به‌استثنای گونه‌ی آبی و ساپروفیت *Phytophthora gonapodyides* همگی آن‌ها از بیمارگرهای مهم گیاهی و از عوامل پوسیدگی ریشه، ساقه، برگ و میوه روی طیف وسیعی از گیاهان میزبان (بیش از هزار گونه) در جهان هستند و سالانه موجب میلیاردها دلار خسارت در سراسر دنیا می‌گردند (Cooke and Little 2002). قارچ *رایزوکتونیا* نیز یک بیمارگر خاکزی است که در سراسر دنیا پراکنش دارد و عامل پوسیدگی ریشه، شانکر، مرگ ناگهانی، تخریب میوه و حتی بیماری اندام هوایی گیاه می‌باشد (Asaka and Shoda 1996). آلترناریا بیمارگر دیگری است که عمدتاً باعث بیماری لکه‌برگی در کدوئیان می‌شود. این قارچ یکی از جنس‌های مهم قارچ‌های آسکومیست است. میزبان‌های مهم برای آلترناریا شامل گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و بادنجان می‌باشد (Pscheidt 1986)، سایر میزبان‌های بیماری شامل گزنه، فلفل قرمز و گیاهان غیر از خانواده بادنجانیان مانند خیار و گل

^۱ Phytophthora

^۲ oomycetes

آهار می‌باشد (Neergaard 1945). کشور ایران از نظر شرایط اقلیمی به‌گونه‌ای است که گونه‌های قارچی آلترناریا دارای تنوع بوده و مطالعات اخیر شش گونه قارچی *آلترناریا* را در ایران شناسایی کرده است. شبه جنس *فوزاریوم* یکی از مهم‌ترین قارچ‌های خاک زاد است که پراکنش جهانی داشته و از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. بسیاری از گونه‌های *فوزاریوم* بیماری‌زا بوده و بیماری‌های مهمی را در گیاهان زراعی از جمله کدوئیان ایجاد می‌کنند. برخی مولد پوسیدگی در انواع سبزیجات، بعضی عامل مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه، طوقه و شانکرهای ساقه هستند و بعضی عامل پژمردگی آوندی می‌باشند. تنوع گونه‌های این جنس و قدرت سازگاری آن‌ها با شرایط اقلیمی گوناگون موجب شده است که این قارچ در نواحی گوناگون جهان مانند خاورمیانه، ژاپن، تایوان، اروپا، جنوب آمریکا، کانادا، مکزیک و ایالات متحده خسارات فراوانی به محصولات کشاورزی وارد سازد. بعضی از گونه‌های این قارچ به‌شدت زهرابه تولید کرده و از این‌رو به حیات وحش، دام‌ها و انسان خسارت وارد می‌کنند (Nelson et al. 1983).

بیماری خاک زاد پوسیدگی ریشه در اثر *فوزاریوم سولانی* از زمان اولین گزارش در آفریقای جنوبی در سال ۱۹۳۷ (Doidge 1937) تا به امروز در بسیاری از مناطق جهان از جمله در سال ۱۹۴۱ در ایالات متحده آمریکا (Snyder and Hansen 1941) و در سال ۱۹۸۷ در ژاپن (Kinjo et al. 1989) جداسازی و شناسایی شده است. در سال‌های ۱۹۹۵ و ۱۹۹۶ در مناطق مختلف کشور اسپانیا علائم زردی و پژمردگی در برگ‌های کدو مشاهده می‌شد که پس از مدتی با مرگ کامل گیاه همراه بود. این علائم مشابه علائم گزارش شده توسط توسان و اسنایدر برای نژاد یک *فوزاریوم سولانی* بود. از این رو این بیماری برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ در اسپانیا گزارش شد (Armengol et al. 2000). این بیماری مشکل اقتصادی بزرگ برای کشاورزان کالیفرنیا به‌عنوان بزرگ‌ترین منطقه‌ی تولید کدوئیان در آمریکا است و سالانه حداقل ۳۰ درصد از محصول کدو را از بین می‌برد (Mehl and Epstein 2007). بیمارگر *فوزاریوم سولانی* همچنین در سال‌های متمادی باعث آسیب جدی به محصول گلخانه‌های خیار در کشور مصر بوده است (Bourbos et al. 1997). در ایران، عراقی و همکاران با بررسی عامل پوسیدگی طوقه و ریشه در مزارع کدوئیان گزارش کردند که *فوزاریوم سولانی* در تمام مراحل رویشی از گیاهچه تا میوه دهی قابل جداسازی است و در سراسر منطقه‌ی شاهرود، میامی و بیارجمند پراکنش وسیعی دارد (عراقی و همکاران ۱۳۹۲)، همچنین این بیمارگر در استان کرمانشاه (Chehri et al. 2011) و خراسان رضوی (تیموری و همکاران ۱۳۹۲) به‌عنوان بیمارگر غالب عامل پوسیدگی ریشه و طوقه کدوئیان معرفی شدند.

به‌منظور دستیابی به ارقام مقاوم و منابع ژنتیکی مقاومت، درک مکانیسم مولکولی و عوامل دخیل در پاسخ گیاهان به عوامل بیماری‌زا ضروری می‌باشد. بیمارگرهای گیاهی اغلب به دو گروه بیوتروف^۱ و نکروتروف^۲ تقسیم‌بندی می‌شوند. بیوتروف‌ها از بافت‌های زنده میزبان تغذیه می‌کنند درحالی‌که

^۱ biotroph

^۲ Necrotrophic

نکروتروف ها میزبان خود را می کشند و بافت های مرده را مورد استفاده قرار می دهند. در اثر بیمارگر بیوتروف، مسیر پیام رسانی وابسته به سالیسیلک اسید فعال شده و گیاه با ایجاد پاسخ فوق حساسیت، منابع غذایی اطراف بیمارگر را محدود می کند. از آنجاکه این پاسخ دفاعی می تواند به گسترش بیمارگرهای نکروتروف کمک کند، مسیر پیام رسانی جایگزینی در گیاهان به وجود آمده است که به واسطه ی هورمون های جاسمونیک اسید و اتیلن انجام می شود (Glazebrook 2005).

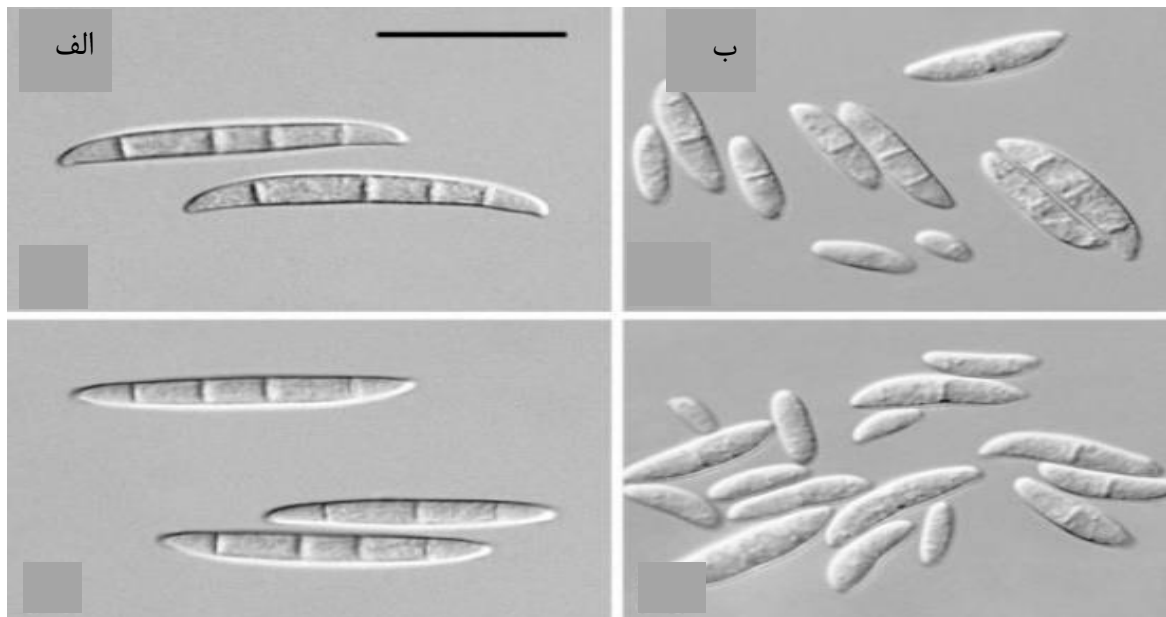
تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ژن و همچنین مطالعات بیوشیمیایی از مهم ترین راهکارهای مورد استفاده برای مطالعه مکانیسم های مولکولی درگیر در پاسخ گیاهان به بیمارگرهای مختلف می باشند. از این رو این تحقیق باهدف جداسازی و شناسایی عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه در مزارع جالیز شاهرود، ورامین و جیرفت و سپس بررسی پاسخ مولکولی و آنزیمی گیاه خیار در پاسخ به بیمارگر انجام شد. همچنین تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم بر میزان بیان ژن های دفاعی گیاه خیار مورد ارزیابی قرار گرفت.

فصل ۲ : مروری بر منابع

۲-۱ فوزاریوم سولانی

۲-۱-۱ ریخت‌شناسی بیمارگر فوزاریوم سولانی

در سال‌های اخیر، افزایش بیماری‌های قارچی خاک‌زاد به کدوئیان خسارت زیادی را تحمیل نموده است. بیمارگر فوزاریوم سولانی یک قارچ خاک‌زاد است که پوسیدگی میوه‌ی ناشی از آن یکی از بیماری‌های شایع خیار محسوب می‌شود. پرگنه این قارچ دارای ظاهر پنبه‌ای شکل و میسلیم جدایه‌ها به رنگ سفید تا سفید مایل به کرم می‌باشد. میزان رشد پرگنه در محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از گذشت ۷۲ ساعت در تاریکی ۲-۲/۵ سانتی‌متر است (عراقی و همکاران ۱۳۹۲). بر روی محیط PDA به سرعت رشد کرده و اغلب میسلیم هوایی تشکیل می‌دهند. پس از مدت کوتاهی سطح محیط کشت با اسپوردوکیوم‌های مخلوط پوشیده می‌شود که ممکن است به رنگ‌های کرم، سبز-آبی یا آبی دیده شود اما هیچ‌وقت به رنگ نارنجی مشاهده نخواهد شد. بعضی از پرگنه‌ها رنگ‌دانه‌های تیره تولید می‌کنند. ماکروکنیدی‌ها به فراوانی حضور داشته و دارای دیواره‌ی ضخیم و ظاهری استوانه‌ای هستند. ماکروکنیدی‌ها نسبتاً پهن، مستقیم و محکم و همچنین سه تا هفت‌قسمتی می‌باشند. میکروکنیدی‌ها بیضی‌شکل و یک یا دو و نهایتاً سه‌قسمتی و در میسلیم‌های هوایی به فراوانی یافت می‌شوند (Leslie and Summerell 2008) (شکل ۲-۱).



شکل ۲-۱: ماکروکنیدی (الف) و میکروکنیدی‌های (ب) فوزاریوم سولانی (Leslie and Summerell 2008)

۲-۱-۲ نژادهای فیزیولوژیک بیمارگر فوزاریوم سولانی

تاکنون دو نژاد از این قارچ شناسایی شده است. نژاد یک این بیماری باعث پوسیدگی تاج، میوه و ریشه‌ی گیاه می‌شود (Snyder and Hansen 1941). در خاک، کلامیدوسپور نژاد یک فوزاریوم سولانی می‌تواند چندین سال زنده بماند. کلامیدوسپور ها و کنیدی‌ها در سطح میوه‌هایی که با خاک مرطوب تماس دارند جوانه می‌زنند. بعد از نفوذ به سطح و گوشت میوه، به سمت حفره‌ی دانه رشد می‌کنند. در حفره‌ی دانه، قارچ به داخل دانه نفوذ می‌کند و بین پوشش دانه و کوتیلدون باقی می‌ماند. به‌طور کلی فوزاریوم سولانی کوکوریتا به کوتیلدون حمله نمی‌کنند و زنده ماندن دانه^۱ را کاهش نمی‌دهد. توسان و سیندر (Tousson and Snyder 1961) نژاد دو این بیمارگر را شناسایی کردند. این نژاد تنها باعث پوسیدگی میوه می‌شود درحالی‌که نژاد یک به میوه، تاج و ریشه حمله می‌کند. جدایه‌های هر دو نژاد در صورت برداشته شدن کوتیکول گیاه، در همهی بخش‌های گیاه ایجاد بیماری می‌کنند (Hawthorne *et al.* 1994). بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی ماکروکنیدی‌ها، می‌توان بین این دو نژاد تمایز قائل شد. در نژاد یک ماکروکنیدی‌های غالباً پنج‌قسمتی هستند درحالی‌که ماکروکنیدی‌های نژاد دو، سه‌قسمتی بوده و پنج میکرون عرض دارند (Matuo and Snyder 1973). اولین نشانه‌ی بیماری ناشی از نژاد یک، پژمرده شدن برگ‌های تمام گیاه است (شکل ۲-۲ الف) و نشانه‌های اولیه در تاج شامل ناحیه‌ای بارنگ روشن و آبکی است که پس از گذشت چند روز تیره‌تر می‌شود. اطراف نواحی آلوده‌ی گیاه، میسلیم قارچ به رنگ سفید تا صورتی بر روی سطح خاک قابل‌مشاهده است (شکل ۲-۲ ب). در صورتی‌که خاک منبع آلودگی باشد، میوه‌هایی که با خاک مرطوب در تماس هستند ممکن است علائم بیماری را نشان دهند (Lloyd *et al.* 2015).

^۱ seed viability



شکل ۲-۲: پژمردگی برگ‌های بوته‌ی خیار در اثر بیماری فوزاریوم سولانی (الف) میسیلیوم سفیدرنگ قارچ در اطراف گیاه آلوده (ب) (Lloyd et al. 2015)

در سال ۲۰۱۵ محققان دانشگاه کالیفرنیا با توجه به مشکلاتی که بیماری فوزاریوم سولانی کوکوروبیتا نژاد یک در سال‌های اخیر ایجاد کرده بود، گزارش کوتاهی از علائم و بیماری‌زایی و همچنین مدیریت آن منتشر کردند (Lloyd et al. 2015). در این گزارش نشانه‌های بیماری شامل این موارد ذکر شده است: پژمردگی برگ‌های تمام گیاه و به دنبال آن مرگ گیاهچه، وجود رنگ‌های روشن در تاج گیاه و نواحی مرطوب که پس از مدتی تیره می‌شوند، گیاه علائم پوسیدگی را در قسمت‌های نزدیک به سطح خاک یا قسمت‌های زیرخاک نشان می‌دهد، جداسازی گیاهان آلوده پس از مدتی با بوی نامطبوعی از گیاه همراه است که به بیماری‌گر مربوط نیست و در اثر باکتری‌های ثانویه است که در بافت‌های پوسیده رشد می‌کنند، اطراف گیاهان آلوده میسیلیوم‌های قارچی به رنگ سفید یا صورتی مشاهده می‌شود و در صورتی که خاک منبع آلودگی باشد، میوه‌هایی که با سطح خاک در تماس هستند علائم پوسیدگی را در سطح خود نشان می‌دهند. گیاهان و میوه‌ها در هر سنی می‌توانند آلوده شوند اما هر چه گیاه مسن‌تر می‌شود به بیماری‌گر حساسیت کمتری نشان می‌دهد. همچنین شدت بیماری به میزان رطوبت و غلظت مایه تلقیح بستگی دارد. برای مدیریت این بیماری‌گر دو راه‌کار ارائه شده است. راه اول تناوب زراعی است که با توجه به این‌که بیماری‌گر به مدت دو تا سه سال قادر است در خاک زنده بماند بنابراین توصیه می‌شود به مدت چهار سال در خاک مزرعه‌ی آلوده، گیاهی از خانواده‌ی کدوئیان کشت

نشود و پس از آن بذرهای صدغفونی شده از کدوئیان کشت شوند. همچنین ضدغفونی بذر با قارچ کش به عنوان دومین راه کار مقابله با بیماری معرفی شده است (Lloyd et al. 2015).

۲-۱-۳ فوزاریوم سولانی در ایران

مهم ترین بیمارگر که باعث پوسیدگی ریشه و ساقه‌ی کدوئیان می شود مربوط به گونه های فوزاریوم هستند (Pivonia et al. 1997). با جداسازی و شناسایی عامل پوسیدگی ریشه و ساقه‌ی مزارع کدوئیان استان کرمانشاه مشخص شد که عامل بیماری مربوط به گونه های *F. Oxysporum* شناسایی عوامل قارچی مولد این بیماری در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ از مزارع جالیزی در منطقه‌ی شاهرود، میامی و بیارجمند مشخص کرد که گونه های بیماری زا شامل *F. Oxysporum* f. *Fusarium solani* *F. Oxysporum* f. *Sp. Niveum* *Sp. Melonis* *F. Oxysporum* f. *Sp. Niveum* می باشد (عراقی و همکاران ۱۳۹۲). همچنین قارچ های *F. Solani* *F. Oxysporum* *F. Equiseti* *F. Acuminatum* و عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه خربزه در استان خراسان معرفی شدند (تیموری و همکاران ۱۳۹۲).

۲-۱-۴ شناسایی بیمارگر

شناسایی قارچ ها ابتدا از روی خصوصیات ریخت شناسی انجام می شد که کاری مشکل بود و به تجربه و مهارت بالایی نیاز دارد، از این رو روش های دیگری برای این منظور توسعه یافته است. شناسایی مولکولی قابلیت تسهیل تشخیص گونه های شناخته شده و همچنین کشف گونه های ناشناخته را دارد. پیش از پیدا شدن روش های شناسایی مولکولی، شناسایی تنها با استفاده از روش های ریخت شناسی انجام می شد. استفاده از ویژگی های ریخت شناسی برای طبقه بندی گونه ها حتی ممکن است برای قارچ شناسان باتجربه هم مشکل باشد به این دلیل که همیشه گروه بندی دقیقی را در یک چارچوب تکاملی ارائه نمی دهد به ویژه در سطح گونه. تفاوت در توالی DNA ژن ها برای شناسایی گونه های قارچ از جمله فوزاریوم استفاده می شود. آنالیز فیلوژنتیکی بر روی توالی DNA را می توان به منظور تشخیص و بررسی روابط ژنتیکی بین گونه های نزدیک به هم استفاده کرد (Abarenkov et al. 2010).

در چند سال گذشته چندین ژن هدف به منظور طبقه بندی مولکولی و شناسایی قارچ ها مورد استفاده قرار گرفته است. ناحیه‌ی internal transcribed spacer (ITS) از DNA ریبوزومی (Gräser et al. 2008)، بتاتوبولین (Rezaei-Matehkolaei et al. 2014) و کیتین سنتاز (Hirai et al. 2003) از جمله این ژن های هدف هستند. توالی ژن translation elongation factor 1- α (Tef-1 α) که بخشی از سیستم ترجمه‌ی پروتئین را کد می کند، در ارتباط با قارچ ها، اولین بار در فوزاریوم به کار گرفته شد. این ژن تک کپی بوده و میزان بالایی از چندشکلی را در بین گونه های مرتبط دارد بنابراین به عنوان جایگزینی برای DNA ریبوزومی در نظر گرفته می شود (O'Donnell 2000). مطالعات فیلوژنتیکی

انجام شده روی قارچها ثابت کرد Tef-1a یک نشانگر ژنتیکی مناسب برای تمایز بین گونه‌ها است (O'Donnell *et al.* 1998; Seifert and Lévesque 2004).

روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز راهی مطمئن و کم‌هزینه برای شناسایی گونه‌های قارچی است اما نیاز به طراحی آغازگرهای اختصاصی گونه و نژاد دارد. در نتیجه تلاش‌هایی برای طراحی آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی قارچها صورت گرفت. مهل و اپستین در سال ۲۰۰۷ از روی توالی ژن فاکتور طویل سازی ترجمه (Tef-1a) آغازگرهای اختصاصی نژاد یک و دو فوزاریوم سولانی را طراحی و گزارش کردند. آغازگر نژاد یک قطعه‌ی ۵۰۵ جفت بازی و آغازگر نژاد دو، قطعه‌ی ۴۲۵ جفت بازی را تکثیر می‌کنند. آغازگرهای آن‌ها تا به امروز به فراوانی برای شناسایی نژادهای فوزاریوم سولانی در تحقیقات استفاده شده است (Mehl and Epstein 2007). علیمنش و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از این آغازگر ابتدا قارچ موردنظر را از کدوئیان استان‌های فارس، خراسان شمالی و خراسان رضوی، شناسایی و سپس تنوع ژنتیکی آن‌ها را با کمک نشانگرهای RAPD و RFLP بررسی کردند (Alymanesh *et al.* 2007). جابر و همکاران با کمک این آغازگرها اولین گزارش از جداسازی و شناسایی نژادهای یک و دو فوزاریوم سولانی در کدوئیان کشور عراق را ارائه کردند (Juber and Hussein 2014). علاوه بر این آریف و همکاران در سال ۲۰۱۱ از روی توالی ژن فاکتور طویل سازی ترجمه فوزاریوم سولانی جفت آغازگری را طراحی کردند که می‌توان بین فوزاریوم سولانی و گونه‌های دیگر فوزاریوم تمایز قائل شد. این آغازگر قطعه‌ی ۶۵۸ جفت بازی از ژن *tef* در گونه فوزاریوم سولانی را تکثیر می‌کند (Arif *et al.* 2012).

۲-۱-۵ کنترل بیماری

کنترل بیماری‌های خاک زاد حتی به وسیله‌ی سموم شیمیایی مشکل بوده و در بسیاری از مواقع ناموفق است. مهم‌ترین راهکار برای کنترل آن‌ها استفاده از ارقام مقاوم و همچنین پیوند زدن ارقام حساس به ارقام مقاوم است (Nagao *et al.* 1994).

اولین بررسی‌های مربوط به ارقام مقاوم خانواده‌ی کدوئیان به نژاد یک بیمارگر فوزاریوم سولانی کوکوریبتا به اواخر قرن ۲۰ میلادی بازمی‌گردد. ناگاو و همکاران در سال ۱۹۹۷ شش جدایه فوزاریوم سولانی را به شش میزبان از کدوئیان شامل سه رقم کدوی طنبل (*Cucurbita maxima*)، یک رقم کدوی تخمه کاغذی (*Cucurbita pepo*)، یک رقم کدوی موسچاتا (*Cucurbita moschata*) و یک رقم خیار (*Cucumis sativus*) تلقیح کردند و پس از گذشت ۴۰ روز، شدت بیماری بر گیاهان اندازه‌گیری شد و شاخص بیماری^۱ برای هر یک تعیین گردید (Nagao *et al.* 1994). استفاده از مهندسی ژنتیک یکی از روش‌های کارآمد جهت تولید گیاهان مقاوم به بیمارگرها می‌باشد (Lillemo *et al.* 2008). در این میان ژن‌های مقاومت به خصوص ژن‌های سنتز کننده پروتئین‌های

^۱ Disease index

مرتبط با بیماری‌زایی (prs) بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند و می‌توانند در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به عوامل تنش‌زا استفاده شوند (Kogel and Langen 2005). PR ها گروه متنوعی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در پاسخ به حمله بیمارگرها بیان می‌شوند. پروتئین‌های تولیدشده توسط این دسته از ژن‌ها، موجب تخریب دیواره‌های سلول قارچی، ایجاد اختلال در غشاهای سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماری‌زایی و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می‌شوند. این پروتئین‌ها معمولاً در شرایط نرمال به مقدار کم در گیاهان بیان می‌شوند اما میزانشان در پاسخ به تنش یا حمله بیمارگرها به میزان زیادی افزایش می‌یابد. (Dahleen *et al.* 2001) جدول (۲-۱). در میان همه PR پروتئین‌ها، PR1 از مهم‌ترین آن‌ها در مقاومت به بیمارگرهای مختلف می‌باشد. این پروتئین بیشترین میزان را در میان سایر پروتئین‌های خانواده PR به خود اختصاص داده و دارای اثرات ضد قارچی است. بتا گلوکانازها که تحت عنوان PR2 شناخته می‌شوند، دومین گروه از PR پروتئین‌ها می‌باشد که بعد از حمله بیمارگر به گیاه و یا تحت تنش‌های زیستی یا غیر زیستی مختلف در گیاه القا می‌گردند و معمولاً به صورت سینرژیکی با آنزیم کیتیناز عمل می‌کند. علاوه بر این، از دیگر پروتئین‌هایی که مانع فعالیت قارچی می‌شوند پروتئین‌های PR5 می‌باشند. پروتئین‌های متعلق به این خانواده به دلیل شباهت توالی و ساختاری با پروتئین گیاهی *Thaumatooccus daniellii*، به پروتئین‌های شبه تاماتین هم معروف هستند (Linthorst *et al.* 1991).

جدول ۲-۱: خانواده‌های PR پروتئین‌ها

خانواده	پروتئین‌ها	عملکرد
Pr-1	Pr-1 a, pr-1 b, and pr-1 c	Antifungal
Pr-2	β -1,3-Glucanases	Cleaves β -1,3-glucans
Pr-3	Chitinase types I, II, IV, V, VI, and VII	Endochitinase
Pr-4	Chitinase types I and II	Antifungal and chitinase
Pr-5	Thaumatin-like proteins	Antifungal
Pr-6	inhibitor I Tomato proteinase	Proteinase inhibitor
Pr-7	Tomato endoproteinase P	Endoproteinase
Pr-8	Cucumber chitinase	Chitinase III
Pr-9	Tobacco lignin-forming peroxidase	Peroxidase
Pr-10	Parsley "PR-1" Bet v 1, Mal d 1, Api g 1, and Dau c 1	Ribonuclease-like
Pr-11	Tobacco chitinase type V	Chitinase

Pr-12	Radish Rs-AFP3	Defensin
Pr-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin
Pr-14	Lipid transfer proteins	Shuttling of phospholipids and fatty acids
Pr-15	Barley oxoa	Oxalate oxidase
Pr-16	Barley oxolp	Oxalate-like oxidase
Pr-17	Tobacco prp27	Unknown

۲-۲ دفاع سطحی در گیاهان و متابولیت های ثانویه

همه‌ی بخش‌های گیاهی که در معرض هوا قرار دارند از لایه‌هایی از جنس مواد لیپیدی پوشیده شده‌اند که سبب کاهش هدر رفتن آب می‌شوند و به‌عنوان سدی در برابر ورود باکتری‌ها و قارچ‌های بیمارگر عمل می‌کنند. اصلی‌ترین مواد تشکیل‌دهنده‌ی این پوشش عبارت‌اند از سوبرین در بخش‌های هوایی گیاه و کوتین معمولاً در بخش‌های زیرزمینی، ساقه‌های چوبی و زخم‌های درمان یافته. موم‌ها نیز همراه کوتین و سوبرین وجود دارند. هم‌چنین وجود کرک و خار روی تنه و برگ‌های گیاهان نیز از آن‌ها تا حدود زیادی محافظت می‌کند (Taiz and Zeiger, 2002).

متابولیت های ثانویه ترکیباتی در گیاه هستند که هیچ نقش مستقیمی در فرایندهایی مانند فتوسنتز، تنفس، انتقال مواد، تمایز و یا تشکیل کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها یا لیپیدها ندارند و در حقیقت فرآورده‌ی جانبی در جریان تولید متابولیت های اولیه در داخل سلول‌های گیاهی هستند. این ترکیبات برخلاف متابولیت های اولیه (آمینواسیدها، نوکلئوتیدها، قندها و اسیدهای چرب) انتشار محدود در قلمرو گیاهان دارند و به عبارت دیگر متابولیت های ثانویه‌ی خاص، اغلب فقط در یک‌گونه، یا گیاهان مرتبط با آن‌گونه یافت می‌شوند. نقش‌های مهم این ترکیبات عبارت‌اند از؛ حمایت از گیاهان در برابر گیاه‌خواران، جلوگیری از آلوده شدن با بیمارگرهای میکروبی و ایجاد جاذبه برای جانورانی که در گستراندن دانه‌ها و گرده‌افشانی نقش دارند (Taiz and Zeiger, 2002).

ترکیبات فنلی شامل گروه کثیری از متابولیت‌های ثانویه‌ی است که بسیاری از ترکیبات حلقوی مثل ترکیبات فنلی، فلاون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، لیگنین‌ها و حتی اسیدهای آمینه حلقوی مانند تربیتوفان، تیروزین و پرولین را شامل می‌شوند. به‌طور کلی فنل‌ها مجموعه‌ای از پلیمرهای محلول (تانن‌ها) و منومرها (اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها) هستند. واژه اسید فنلی معمولاً به مولکول‌های ساده مشتق از بنزوئیک یا سینامیک اسیدها اشاره می‌نماید. ترکیبات فنلی نسبت به ترپنوئیدها حلالیت بیشتری در آب دارند. بیوسنتز این ترکیبات از مسیر فنیل پروپانوئید و از فنیل آلانین صورت می‌گیرد. این همان مسیر بیوسنتز کومارین‌ها، اسیدهای فنلی و لیگنین‌ها می‌باشد. درصد بالایی از ترکیبات فنلی منشأ فنیل آلانین دارند و برخی منشأ تیروزین دارند. کلیدی‌ترین آنزیم این مسیر فنیل آلانین آمونیالیاز

است (Hussain *et al.* 2012). با توجه به گزارش‌هایی مبنی بر دخالت مشتقات مسیر بیوشیمیایی فنیل پروپانویید در مواجهه با انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی (Campbell and Ellis 1992; Dixon *et al.* 2002) می‌توان به بررسی تغییرات آنزیم‌های این مسیر از جمله فنیل آلانین آمونیالیاز (pal) اشاره کرد. ژن pal از طریق دخالت در مسیرهای سنتز فنیل پروپانوییدها و ایزوفلاونوییدها که فعالیت فیتوآلکسینی دارند، در مقاومت گیاه نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. این ژن در مسیر بیوسنتز اسید سالیسیلیک و دیگر ترکیبات وابسته دفاعی دخیل بوده و یک ترکیب سیگنال دهی کلیدی برای فعال‌سازی ژن‌های وابسته دفاعی، کاتالیز کننده‌ها و فاکتورهای رونویسی است (Stotz *et al.* 2009).

۳-۲ مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR)

در سال ۱۹۰۱ گزارش شد که گیاهانی که قبلاً توسط بیمارگرها آلوده شده بودند، مقاومت بیشتری به بیمارگرهای جدید نشان می‌دهند. در طول ۳۰ سال پس از این گزارش‌ها، مطالعات بسیاری پدیده‌ی القای مقاومت به بیماری‌ها را در گیاهان پیشنهاد کردند که خلاصه‌ای از این مطالعات در سال ۱۹۳۳ توسط چستر تهیه شد (Chester 1933). یکی از مهم‌ترین پدیده‌های القای مقاومت امروزه با عنوان مقاومت سیستمیک اکتسابی نامیده می‌شود. این پدیده به دنبال آلوده شدن بسیاری از گیاهان توسط بیمارگرهای مختلف بخصوص آن‌هایی که موجب نکروزه شدن بافت می‌شوند ایجاد شده که باعث ممانعت از گسترش بیمارگر در اندام‌های آلوده نشده می‌گردد. گیاه در حالت مقاومت سیستمیک اکتسابی برای پاسخ سریع و تأثیرگذار به بیمارگر آمادگی دارد. از سال ۱۹۹۰ ارتباط احتمالی بین تجمع سالیسیلیک اسید و مقاومت سیستمیک اکتسابی مطرح شد (Malamy *et al.* 1990; Métraux *et al.* 1990). اهمیت سالیسیلیک اسید در القای مقاومت سیستمیک اکتسابی توسط آزمایش بر روی گیاهان تراریخته‌ای که بیان بالایی از ژن سالیسیلات هیدروکسیلاز را نشان می‌دادند، اثبات شد (Gaffney *et al.* 1993; Delaney *et al.* 1994).

۴-۲ سالیسیلیک اسید (SA)

سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنولی است که در طیف وسیعی از موجودات پروکاریوت و یوکاریوت از جمله گیاهان تولید می‌شود. سالیسیلیک اسید و مشتقات آن بیشتر به‌عنوان داروی ضد درد و تب و درمان التهاب در بین مردم جهان شناخته می‌شوند. امروزه ۳۶ گیاه از خانواده‌های مختلف به‌عنوان منبعی از سالیسیلیک اسید شناخته می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهد که این هورمون نقش‌های مهمی را در تنظیم رشد و توسعه‌ی گیاه از جمله بسته شدن روزنه‌ها، جوانه‌زنی بذر، گل‌زایی، برهم‌کنش با موجودات دیگر، پاسخ به تنش‌های محیطی و همچنین القای مقاومت به بیماری‌های گیاهی (Raskin 1992) بر عهده دارد. در گیاهان، سالیسیلیک اسید در مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) و مقاومت

^۱ Systemic acquired resistance

اكتسابی موضعی (LAR^۱) در پاسخ به تهاجم بیماری‌گرهای مختلف نقش دارند. سالیسیلیک اسید یک هورمون گیاهی است و مسیر سیگنال‌رسانی حاصل از آن برای پاسخ سیستمی اکتسابی گیاه به‌ویژه علیه بیماری‌گرهای بیوتروف ضروری است. از سال ۱۹۹۰، سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک پیام‌داخل سلولی گیاهان در مواجهه با تنش‌های زنده شناخته شده است (Malamy *et al.* 1990). تحقیقات اولیه این یافته را در گیاه تنباکو اثبات کردند. سپس در سال ۱۹۹۱ مشخص شد که بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت سیستمیک اکتسابی که با روش نیمه کمی اندازه‌گیری شده بودند در اثر تیمار سالیسیلیک اسید افزایش می‌یابد (Ward *et al.* 1991). امروزه مشخص شده است که این تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی در برهم‌کنش گیاه با بیماری‌گرهای بیوتروف نقش اصلی را بازی می‌کند (Gutjahr and Paszkowski 2009).

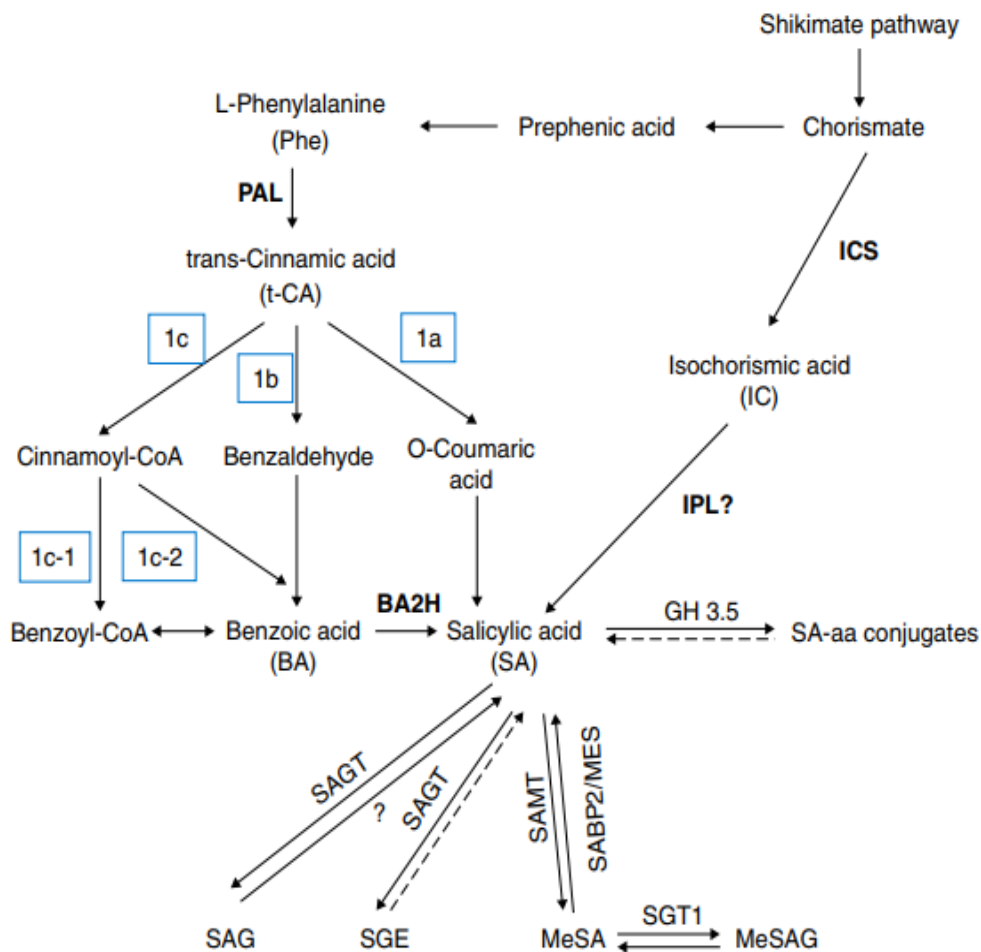
۲-۴-۱ بیوسنتز سالیسیلیک اسید و مسیر پیام‌رسانی مرتبط با آن

سالیسیلیک اسید از طریق دو مسیر مجزا در گیاهان سنتز می‌شود که هر دو به کوریسمات^۲ به‌عنوان یک متابولیت اولیه وابسته هستند (شکل ۲-۳). ابتدا مسیر فنیل آلانین آمونیلاز است که در سیتوپلاسم قرار دارد. PAL اولین و مهم‌ترین آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئید است که یکی از مشتقات کوریسمات یعنی فنیل آلانین (Phe) را به واسطه‌ی بنزوات یا کوماریک اسید، تحت تنش‌های زنده و غیرزنده به سالیسیلیک اسید تبدیل می‌کند. آنزیم PAL، فنیل‌الانین را از طریق یک واکنش دآمیننه کردن غیر اکسیداتیو به ترانس-سینامیک اسید (t-CA) و NH₃ تبدیل می‌کند. در آرآبیدوپسیس چهار ژن pal وجود دارد که آنزیم‌هایی با ویژگی‌های متنوع را -سنتز می‌کنند. همان‌طور که در شکل ۲-۳ مشاهده می‌کنید، سالیسیلیک اسید بسته به گونه‌ی گیاه می‌تواند از t-CA با *ortho-coumaric acid* (مسیر 1a) یا بنزوئیک اسید (BA) (مسیر 1b و 1c) تولید شود. T-CA یک پیش‌ساز برای سنتز ترکیبات فنولیک متنوع است که در گیاهان از طریق سه مسیر به بنزوئیک اسید، اکسیده می‌شود. اولین مسیر بتا اکسیداسیون cinnamoyl-coa (مسیر 1C-1)، دومین مسیر غیر اکسیداتیو از cinnamoyl-coa (مسیر 1C-2) و سومین مسیر غیر اکسیداتیو از t-CA به BA (مسیر 1b). مطالعات نشان داده که سالیسیلیک اسید در آفتابگردان، سیب‌زمینی، نخود، تنباکو آلوده به ویروس موزاییک تنباکو (TMV) و خیار با مسیر 1c-1 ساخته می‌شود (Ribnicky *et al.* 1998; Jarvis *et al.* 2000). درحالی‌که سالیسیلیک اسید در گوجه‌فرنگی پس از آلوده شدن با *Agrobacterium tumefaciens* با مسیر 1a شکل می‌گیرد. بررسی‌ها مشخص کردند که آرآبیدوپسیس آلدئید اکسیداز ۴ (AAO4) تبدیل بنزوآلدئید به BA را در توسعه‌ی دانه‌ی آرآبیدوپسیس کاتالیز می‌کند. این دور از انتظار نیست که هیدروکسیله شدن حلقه‌ی آروماتیک BA که با فعالیت بنزوئیک-اسید-۲-هیدروکسیلاز (BA2H) کاتالیز می‌شود، به شکل‌گیری سالیسیلیک اسید منجر شود. در تنباکو فعالیت BA2H در مواقع

^۱ localized acquired resistance

^۲ Chorismate

آلودگی با TMV، قرار گرفتن در معرض UV یا تیمار با BA یا پراکسید هیدروژن القا می‌شود که خالص‌سازی جزئی آن مشخص می‌کند یک مونوکسیژناز P450 است (Zhao, et al. 2017). کوریسمات همچنین در بعضی از باکتری‌ها می‌تواند از طریق ایزوکوریسمات در دو مرحله که با ایزوکوریسمات سنتتاز (ICS) و ایزوکوریسمات پیروات لیاز (IPL) کاتالیز می‌شود، به سالیسیلیک اسید تبدیل شود. سالیسیلیک اسید که با مسیر ایزوکوریسمات تولید می‌شود نقش مهمی را در دفاع گیاهان آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی و *Nicotiana benthamiana* علیه حمله‌ی بیمارگر و همچنین تیمار با ازن و UV دارد (Ogawa et al. 2005; An and Mou 2011).



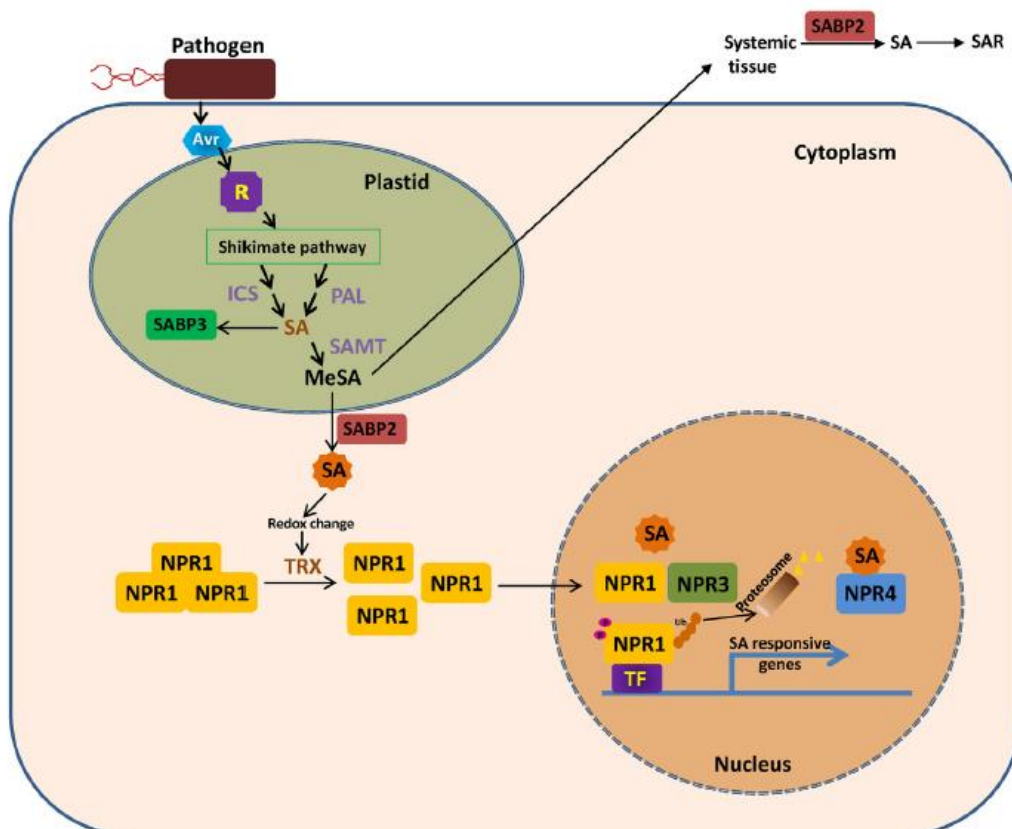
شکل ۲-۳: بیوسنتز سالیسیلیک اسید در گیاهان (Vlot et al. 2009).

اختصارات شکل:

PAL, phenylalanine ammonia lyase; BA2H, benzoic acid-2-hydroxylase; ICS, isochorismate synthase; IPL, isochorismate pyruvate lyase; GH3.5, acyl-adenylate/thioester-forming enzyme; SAGT, SA glucosyltransferase; SAMT, SA methyltransferase; SABP2, SA-binding protein 2; MES, methyl esterase; SAG, SAO- β -glucoside; SGE, salicyloyl glucose ester; MeSA, methyl salicylate; MeSAG, methyl salicylate O- β -glucoside.

سالیسیلیک اسید از طریق فرایندهای گلیکولیزه شدن، متیله شدن، اتصال آمینواسید، هیدروکسیله شدن و غیره به مشتقات دیگری تبدیل می‌شود که اکثر آن‌ها ترکیبات غیرفعالی هستند. حالت گلیکولیزه شده‌ی آن (SAG) به صورت غالب در گیاهان حضور دارد که با فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز می‌تواند به سالیسیلیک اسید آزاد تبدیل شود. سالیسیلیک اسید متیله (meSA) به صورت غیرفعال است، اما حالت فرار داشته و به سرعت از طریق غشا منتشر می‌شود. SABP2 یکی از پروتئین‌های سلولی است که به سالیسیلیک اسید متصل شده و با آن برهمکنش می‌کند (Kumar 2014).

حمله‌ی بیمارگر منجر به افزایش بیوسنتز سالیسیلیک اسید با مسیر ICS/PAL در پلاستید می‌شود (شکل ۲-۴). سالیسیلیک اسید متیل ترانسفراز (SAMT) باعث تبدیل سالیسیلیک اسید به متیل سالیسیلیک اسید شده که در سیتوپلاسم پخش و با فعالیت استرازای SABP2 دوباره به سالیسیلیک اسید تبدیل می‌شود. افزایش میزان سالیسیلیک اسید در سیتوپلاسم باعث درهم گسیختن الیگومر NPR1^۱ به منومرهایش می‌شود. NPR1 یک پروتئین با تکرار آنکرین و دمین BTB/POZ است. این پروتئین پس از آن به هسته رفته و رونویسی از ژن‌های دفاعی پاسخ به سالیسیلیک اسید از جمله ژن‌های pr را فعال می‌کند. NPR1 طی برهمکنش با فاکتورهای رونویسی فسفریله شده و با واسطه‌ی پروتئازوم تخریب می‌گردد (Kumar 2014) (شکل ۲-۴).



شکل ۲-۴: مدلی از فعال شدن مسیر پیام‌رسانی سالیسیلیک اسید در سلول‌های گیاهی (Kumar 2014)

^۱ Non-expression of PR genes1

سالیسیلیک اسید باعث فعال شدن ژن‌های *pr* و در نتیجه تولید *PR* پروتئین‌ها و در نهایت مرگ سلولی می‌شود. با توجه به این که نکروتروف‌ها از بافت‌های مرده تغذیه می‌کنند این پاسخ میزبان، به رشد و گسترش آن‌ها کمک می‌کند. در نتیجه مسیر دفاعی متفاوتی در گیاهان شکل گرفته که مستقل از سالیسیلیک اسید بوده و با برهم‌کنش اتیلن و جاسمونیک اسید هدایت می‌شود. از این رو سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید اثر آنتاگونیستی بر هم دارند که برهم‌کنش بین این‌ها پاسخ به بیمارگر خاص را تعیین می‌کند. *Mpk4* اولین ژن دخیل در برهم‌کنش این دو هورمون است که شناخته شد. این ژن در حالت جهش یافته، باعث تجمع سالیسیلیک اسید و *PR* پروتئین‌ها در گیاه می‌شود. *Mpk4* بر ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی جاسمونیک اسید مانند *pdf1.2* اثر می‌گذارد و با ممانعت از تجمع سالیسیلیک اسید، باعث پاسخ به نکروتروف‌ها می‌شود. ژن‌های *pdf1.2* و *vsp2* ژن‌های نشانگر برای مسیر پیام‌رسانی جاسمونیک اسید محسوب می‌شوند. این دو ژن توسط *npr1* مهار می‌شود که تنظیم‌کننده‌ی اصلی در مسیر سالیسیلیک اسید است. این موضوع اثر آنتاگونیستی سالیسیلیک اسید بر سطح رونویسی ژن‌های دخیل در مسیر جاسمونیک اسید را نشان می‌دهد (Zarei et al. 2011). فاکتور رونویسی *WRKY70* نقش مهمی در برهم‌کنش بین این هورمون‌ها بازی می‌کند به طوری که افزایش بیان آن منجر به پاسخ به بیوتروف‌ها و فعال شدن مسیر سالیسیلیک اسید می‌شود. اعمال تیمار جاسمونیک اسید و سپس مواجه‌ی گیاه با بیمارگر نکروتروف با افزایش حساسیت گیاه به بیمارگر همراه است (Li et al. 2004). بیمارگرها برهم‌کنش بین دو هورمون را به نفع خود دست‌کاری می‌کنند. به عنوان مثال بیمارگر *Pseudomonas syringae* که بیوتروف است با تولید سم کروناتین که آنالوگ جاسمونیک اسید است، باعث سرکوب مسیر سالیسیلیک اسید شده و به رشد و گسترش خود ادامه می‌دهد. از سویی دیگر بیمارگر *Botrytis cinerea* که نکروتروف است، سمی به نام بتا - (۱ و ۳) (۱ و ۶) - دی - گلوکان را تولید می‌کند و این ترکیب در مسیر سالیسیلیک اسید بوده و باعث فعال شدن آن می‌شود و مسیر جاسمونیک اسید سرکوب شده تا بیمارگر بتواند به رشد خود ادامه بدهد (Pieterse et al. 2012).

۲-۵ فسفیت

از سال ۱۸۰۰ میلادی استفاده از سموم شیمیایی با اثر ضد قارچی، باعث کاهش قابل توجه بیماری‌های گیاهی و در نتیجه افزایش تولیدات کشاورزی شده است (Gianessi et al. 2006). مقاومت عوامل بیماری به قارچ‌کش‌ها از ۱۹۷۰ میلادی گزارش شد که این اتفاق باعث کاهش تولیدات کشاورزی و در نتیجه تلاش برای جبران آن شده است. پس از آن استفاده از سموم شیمیایی روز به روز افزایش یافته به طوری که ژاپن در سال ۱۹۹۶ درآمدی در حدود ۵/۹ میلیارد دلار از این صنعت به دست آورده است. اثر سموم شیمیایی بر عامل بیماری مورد نظر تخصصی نبوده و جانداران دیگر از جمله کرم‌های خاکی و ریزسازواره‌های مفید را هم از بین می‌برند. این ترکیبات دیرتجزیه می‌شوند و آب‌وخاک را به مدت طولانی آلوده می‌کنند. از این رو روش‌های جایگزین مورد توجه قرار گرفته است که با وجود اثرات

ممانعت کنندگی برای عوامل بیماری، آسیب کمتری به محیطزیست وارد سازد. استفاده و تقویت سیستم‌هایی که در طول تکامل درون گیاه به منظور مقاومت به تنش‌های زنده شکل گرفته و تقویت آن‌ها می‌تواند راهکاری مؤثر برای کنترل بیماری‌ها باشد. یکی از این سیستم‌ها مقاومت سیستمیک اکتسابی است. این مقاومت نوعی واکنش دفاعی در کل گیاه است که پس از آلودگی با یک بیمارگر در گیاه ایجاد می‌شود. مقاومت سیستمی اکتسابی می‌تواند توسط دسته‌ای از ترکیبات از جمله سالسیلیک اسید و فسفیت در گیاه فعال شود و مقاومت حاصله در برابر دامنه وسیعی از بیمارگرها را افزایش دهد (Stamatis *et al.* 2010).

فسفر یکی از مواد غذایی ماکرو است که تمام موجودات زنده به آن نیاز دارند و این عنصر ۰/۲ درصد از وزن خشک گیاهان را شامل می‌شود. علاوه بر نقش آن در مسیرهای متابولیسمی، در ساختمان ماکرو مولکول‌های حیاتی مانند DNA، RNA، پروتئین‌ها، فسفولیپیدها، قند فسفات‌ها، آنزیم‌ها و ترکیبات پرانرژی مانند ATP و NADP حضور دارند. همچنین در پیام‌رسانی سلولی و فسفریله شدن و دفسفریله شدن برای محافظت از سلول، دفاع، فعالیت ژن‌ها و متابولیسم اهمیت دارد. از آنجاکه فسفر یک عنصر خیلی فعال است، به سرعت با عناصر دیگر از جمله هیدروژن و اکسیژن ترکیب شده و ترکیباتی با درجات مختلف اکسیداسیون را شکل می‌دهند. یکی از اشکال اکسیدشده‌ی آن فسفیت ($H_2PO_4^-$, Pi) است. به استثنای تعداد کمی از گونه‌ی باکتری‌ها، همه‌ی موجودات زنده قادرند از فسفیت برای فعالیت سلولی و متابولیسم خود استفاده کنند. فسفر در فرم فسفیت به خاطر واکنش با کلسیم و آهن در خاک به صورت غیر متحرک قرار دارد و این امکان را برای گیاه به وجود می‌آورد که بیشتر توسط گیاه جذب شود. باکتری‌های خاکزی به سرعت فسفیت را به فرم آلی آن تبدیل می‌کنند که قابل جذب برای گیاهان نیست؛ بنابراین اعمال فسفیت اضافه، راهکاری مؤثر برای افزایش رشد گیاهان است. فسفیت برای کنترل بیماری‌های قارچی کشنده در کشاورزی می‌تواند به کار گرفته شود مانند بیمارگر عامل سفیدک دروغی که گیاهان زراعی و غیر زراعی مهمی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Cook *et al.* 2009). اسپری کردن با فسفیت، شدت بیماری بلایت دیررس را در سیب‌زمینی کاهش می‌دهد (Cooke and Little 1996). تیمار با فسفیت همچنین از بوته میری در گیاه خیار ممانعت می‌کند (Abbasi and Lazarovits 2005). تیمار فسفیت به برگ، عامل بیماری سفیدک دروغی در ذرت (*Peronosclerospora*) (Panicker and Gangadharan 1999)؛ و انگور (*Plasmopara viticola*) را مهار می‌کند (Speiser *et al.* 2000). بیماری پوسیدگی قهوه‌ای (*Phytophthora citrophthora*) در دو گونه‌ی سیتروس یعنی *Volkamer citrus* و *Rangpur lime* پس از تیمار با فسفیت به گونه‌ی مؤثری بهبود یافت (Oren and Yogev 2002). چندین مکانیسم برای اثر ممانعت کنندگی فسفیت پیشنهاد شده است. سمیت فسفیت برای قارچ‌ها احتمالاً به خاطر افزایش میزان پلی فسفات غیر آلی است که ممانعت کننده‌ی کلیدی برای فسفریله شدن در آن‌ها است. فسفیت همچنین بر آدنیلات سنتتاز تأثیر می‌گذارد (Griffith *et al.* 1990). مطالعات بعدی نشان داد که فسفیت برای اتصال به جایگاه فعال آنزیم‌های فسفریله کننده با Pi رقابت می‌کند (Barchietto *et al.* ۲۰

1992). بسیاری از قارچ‌کش‌ها در آمریکا و اروپا از فسفیت به‌عنوان یک جز فعال استفاده می‌کنند. فسفیت به‌عنوان قارچ‌کش عالی برای کنترل بیماری‌گرهای گیاهی شناخته می‌شود. فسفیت علاوه بر تأثیر مستقیم ضد قارچی احتمالاً باعث افزایش بیان برخی از ژن‌های دفاعی در گیاه می‌شود. رمضانی و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که پیش‌تیمار گیاه خیار با فسفیت پتاسیم با افزایش بیان ژن‌های *thaumatin-like protein (TLP)*، *Ribosome-inactivating protein (RIP)* و دیفنسین در پاسخ به بیماری‌گر *Pseudoperonospora cubensis* همراه است (Ramezani et al. 2017). علاوه بر این افزایش بیان ژن *pr1* تحت تیمار با فسفیت در حضور و عدم حضور بیماری‌گر *Phytophthora cinnamomi* در میزبان *Arabidopsis thaliana* مشاهده شده است (Eshraghi et al. 2011).

اشراقی و همکاران در سال ۲۰۱۱ تأثیر فسفیت را بر چند خصوصیت گیاه آرابیدوپسیس از جمله بیان ژن‌های مسیر سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در تنش بیماری‌گر *Phytophthora cinnamomi* بررسی کردند. آلوده کردن گیاه با بیماری‌گر ابتدا باعث ایجاد زخم‌هایی بر روی برگ گیاهان در هر دو رقم حساس و مقاوم گردید. تیمار گیاهان با فسفیت با غلظت ۲۰ میلی مولار باعث کاهش معناداری ناحیه‌ی زخم رقم حساس می‌شود. در رقم مقاوم این تیمار تفاوت معناداری را باحالت شاهد نشان نداد. در برگ‌های شاهد رقم حساس تجمع پراکسید هیدروژن تنها محدود به نواحی اطراف زخم است اما در حالت تیمار شده در نواحی دورتر هم قابل مشاهده است و در رقم مقاوم تجمع آن زودتر قابل تشخیص است. با اتصال پروموتور ژن *pr1* به ژن گزارشگر بتا - گلوکورونیداز (*GUS*) مشخص شد که این ژن در حالت شاهد تنها در اطراف محل آلودگی اما در حالت تیمار شده با فسفیت در تمام برگ بیان می‌گردد. درنهایت با بررسی کمی بیان ژن‌های مسیر سالیسیلیک اسید (*pr1* و *pr5*) و جاسمونیک اسید (*th12.1* و *pdf1.2*) مشخص شد که ژن *pr1* با افزایش غلظت فسفیت، افزایش بیان نشان می‌دهد. همچنین تیمار گیاه با فسفیت بدون مایه‌زنی با قارچ باعث افزایش ۵۶۱ و ۳۸۴۱ برابری بیان این ژن می‌گردد (Eshraghi et al. 2011).

۲-۶ روش Real Time

ایده‌ی اولیه این روش، ابتدا توسط هیگوچی و همکاران ارائه شد که به مفهوم مشاهده‌ی لحظه‌به‌لحظه واکنش بر اساس میزان فلورسانت ساطع شده از واکنش و مشاهده و ثبت آن در یک آشکارگر می‌باشد. از آنجایی که اسید نوکلئیک تکثیر یافته و مراحل تشخیص در یک محیط بسته انجام می‌شود، خطر آلودگی محیطی و واکنش‌های بعدی را به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به روش‌های کلاسیک و معمولی پی سی آر کاهش می‌دهد. سرعت در انجام آزمایش، حذف مرحله‌ی ردیابی محصول پس از پی سی آر، مشاهده‌ی لحظه‌به‌لحظه واکنش و قطع آن در هر زمان، حساسیت و اختصاصیت بالا و انجام واکنش کمی و به دست آوردن میزان دقیق ژنوم و الگوی اولیه در روش Real Time باعث تحول عظیم در تشخیص مولکولی میکروارگانیزم‌ها، بررسی بیان ژن‌ها، ارزیابی درمان، تشخیص جهش‌ها، افتراق آلی و بسیاری از کاربردهای دیگر شده است (Heid et al. 1996).

۲-۶-۱ روش‌های نشانه‌گذاری در Real Time

روش‌های نشانه‌گذاری که در Real Time مورد استفاده قرار می‌گیرد را می‌توان در دودسته‌ی کلی مورد مطالعه و بررسی قرار داد. اولین روش، مبتنی بر استفاده از رنگ‌های سایبر گرین، اوا گرین و YO-PRO-1 است. این رنگ‌ها با اتصال و جایگزین شدن در شیار کوچک DNA در مرحله‌ی اتصال و تکثیر DNA هم‌زمان با افزایش دورشته‌ی DNA، نور فلورسنت ساطع می‌کنند و توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌شود. از آنجاکه این رنگ‌ها به‌تنهایی قادر به تمایز بین محصولات اختصاصی و غیراختصاصی نیست، باید منحنی ذوب با توجه به هر نمونه رسم گردد. روش دوم استفاده از شناساگرها است که میزان حساسیت و اختصاصیت افزایش می‌یابد. تفاوت شناساگر در این است که یک رنگ فلورسنت به نام گزارشگر و رنگ فلورسنت دیگری به نام خاموش‌کننده تعبیه می‌شود. هنگامی که گزارشگر و خاموش‌کننده در فاصله‌ی نزدیکی از هم قرار دارند (در حالت عادی شناساگر)، اگر نوری ساطع شود توسط خاموش‌کننده جذب شده و ثبت نمی‌گردد، ولی به محض جدا شدن این دو رنگ (در نتیجه تکثیر و شکسته شدن شناساگر) نور ساطع شده توسط خاموش‌کننده قابل جذب نیست و توسط دستگاه به‌صورت فلورسنت قابل ارزیابی و اندازه‌گیری است (کشاورز و همکاران ۱۳۹۶).

۲-۶-۲ آشنایی با مفاهیم تخصصی در روش Real time PCR

۱-۲-۶-۲ CT و کنترل داخلی

اگر منحنی میزان تکثیر محصول در Real Time یا پی سی آر برحسب چرخه‌های پی سی آر ترسیم گردد، می‌توان دریافت که این منحنی شامل سه فاز است که عبارت است از: فاز خطی^۱، فاز لگاریتمی^۲ و فاز سکون^۳. در فاز لگاریتمی میزان محصول دو رشته‌ای در هر چرخه دو برابر می‌شود، بنابراین میزان محصولات به‌صورت نمایی افزایش می‌یابد. حال می‌توان به‌صورت توافقی چرخه‌ای که در آن واکنش Real Time وارد فاز نمایی می‌شود را به‌عنوان سیکل مرجع در نظر گرفت. در تکنیک Real Time به این سیکل مرجع به‌اصطلاح سیکل آستانه یا CT^۴ گویند. CT به این مفهوم است که در چه سیکلی محصولات از یک حد آستانه فراتر می‌رود (Schmittgen and Livak 2008). در واکنش Real time PCR، CT کمتر به معنای بیان بیشتر است؛ اما باید به این نکته توجه کرد که درست بودن این شرط به شرایط بسیاری وابسته است از جمله یکسان بودن کیفیت RNA استخراج شده، یکسان بودن حجم cDNA مورد استفاده در واکنش و یکسان بودن کیفیت cDNA ساخته شده.

^۱ Linear

^۲ Log liner phase

^۳ Plateau phase

^۴ Cycle of threshold

بروز خطاهای آزمایشگاهی سبب می‌شود که نتوان به CT به‌عنوان یک پارامتر جهت مقایسه دو نمونه اعتماد نمود. برای حل مشکل فوق ما می‌توانیم از ژن‌هایی استفاده کنیم که اثبات شده است بیان آن‌ها در تمام نمونه‌ها یکسان است مانند ژن‌های اکتین و توبولین. از آنجایی که بیان این ژن‌ها در تمام نمونه‌ها باید یکسان باشد در صورتی که بین CT این ژن‌ها در نمونه‌های مختلف اختلافی مشاهده گردد، به این معنی است که شرایط آزمایش برای همه نمونه‌ها یکسان نبوده و با توجه به این ژن‌ها می‌توان Ct مربوط به ژن مورد بررسی خود را اصلاح نمود. به این ژن‌ها، ژن‌های کنترل داخلی (ژن مرجع) گویند (Rebrikov et al, 2006).

ویژگی‌های ژن کنترل داخلی عبارت‌اند از: در همه‌ی سلول‌ها تعداد کپی‌های یکسانی دارند، در همه‌ی سلول‌ها بیان می‌شوند، بیان ژن مرجع و ژن هدف باید متناسب باهم باشند، اگر ژن موردنظر به میزان کم بیان می‌شود نباید ژن مرجعی را انتخاب کنیم که بیان آن زیاد است، در این صورت مقایسه‌ی یک مقدار زیاد با یک مقدار کم باعث افزایش خطای کار می‌شود و در نهایت این که از تیمارگرهای واکنش نباید تأثیر پذیرد (Wong et al 2005).

۲-۶-۳ تجزیه و تحلیل داده‌های Real time PCR

دو روش مختلف برای تجزیه و تحلیل داده‌های Real Time وجود دارد. کمیت سنجی مطلق^۱ که تعداد کپی‌های اولیه‌ی رونوشت‌ها را مشخص می‌کند. روش دوم کمیت سنجی نسبی^۲ است که تغییرات بیان ژن‌های هدف را نسبت به ژن مرجع اندازه‌گیری می‌کند. در حال حاضر روش کمیت سنجی نسبی دقیق‌ترین روش برای بررسی تغییرات بیان ژن است. در این روش تعداد مهم نیست و فقط کاهش یا افزایش بیان ژن مهم است. این کاهش یا افزایش را با یک استاندارد یا ژن مرجع مقایسه می‌کنند این استاندارد به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته می‌شود. این ژن عموماً یک ژن خانه‌دار^۳ است (Livak and Schmittgen 2001).

۲-۷ تغییرات بیان ژن دفاعی گیاه در برابر بیمارگر

ایکبال و همکاران (۲۰۰۴) برهمکنش فوزاریوم سولانی و گیاه سویا را بررسی کردند (Iqbal et al. 2005). این بیمارگر مانند میزبان خود، در کدوئیان نیز به ریشه گیاه حمله می‌کند و باعث مرگ ناگهانی^۴ (SDS) در آن می‌شود. آن‌ها دو رقم حساس و مقاوم را با بیمارگر مایه‌زنی کردند و فراوانی رونوشت ۱۹۱ توالی بیان‌شده‌ی برچسب دار (EST) را در پنج زمان مختلف بعد از مواجهه با بیمارگر

^۱ Absolute quantification

^۲ Relative Quantification

^۳ Housekeeping

^۴ Sudden death syndrome

مورد بررسی قرار دادند. رقم مقاوم حاوی شش مکان ژنی صفات کمی (QTL) مرتبط با مقاومت است که رقم حساس فاقد آن‌ها می‌باشد. بیشتر ژن‌ها در مراحل اولیه‌ی آلودگی کاهش سطح رونوشت‌های خود را نشان دادند. در روز هفتم پس از مایه‌زنی، ژن‌های دفاعی گیاه افزایش بیان داشتند. ژن‌های مرتبط با پاسخ متابولیکی به بیمارگر از جمله ژن pal که اولین آنزیم مسیر فنیل پروپانویید یعنی فنیل آلانین آمونی لیاز را کد می‌کند، در مراحل اولیه پس از آلودگی افزایش بیان نشان داد که حاکی از نقش آن در مراحل اولیه‌ی آلوده شدن گیاه از جمله مرحله‌ی شناسایی بیمارگر است. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در رقم مقاوم افزایش بیان قابل‌توجهی را نشان دادند در حالی که pr1 و pr5 در رقم حساس تغییری نداشتند.

ایکبال و همکاران (۲۰۱۶) برهم‌کنش سویا و فوزاریوم سولانی را از نظر پروتئین مورد بررسی قرار دادند (Iqbal et al. 2016). دو رقم حساس و مقاوم سویا را با بیمارگر مایه‌زنی و با استفاده از الکتروفورز دوبعدی تغییرات پروتئومیک را اندازه‌گیری کردند. تفاوت رقم حساس و مقاوم در لوکوس Rhg1/Rfs2 است که باعث مقاومت نسبی به بیماری می‌شود. در مجموع ۱۸ پروتئین از جمله PR1 با بیان متفاوت در دو رقم شناسایی شدند. آنالیز عملکرد این پروتئین‌ها مشخص کرد که در مسیرهای پیام‌رسانی که تحت تأثیر قارچ هستند شامل مسیرهای مقاومت به بیماری، تحمل استرس و متابولیسم دخیل می‌باشند. بنابراین ژن pr1 هم در سطح رونویسی و هم در سطح پروتئین، در برهم‌کنش ناسازگار با این بیمارگر افزایش بیان دارد در حالی که در برهم‌کنش سازگار در هیچ سطحی بیان نمی‌شود.

پیش تیمار برگ‌های گیاه خیار با اسپینزولا-اس-متیل^۱ به‌عنوان یک محرک مقاومت اکتسابی عمومی، با افزایش بیان ژن pr1 همراه است و همچنین پیش‌تیمار گیاه و تلقیح با قارچ *Colletotrichum orbiculare* باعث افزایش بیان ژن pr1 و pal1 شد (Cools and Ishii 2002).

پیش تیمار گیاه خیار با بتا آمینوبوتیریک اسید (BABA) با القای مقاومت در گیاه همراه است. در تحقیقی القای مقاومت توسط این ترکیب علیه قارچ *Pseudoperonospora cubensis* در گیاه خیار بررسی شده است. این ترکیب قادر به کاهش معناداری در شدت بیماری از طریق القای مقاومت می‌باشد. بررسی کمی بیان ژن‌های pr1 و lox1 با روش پی‌سی آر کمی بیانگر افزایش بیان ژن pr1 است که دلالت بر القای مسیر مقاومت وابسته به سالیسیلیک اسید دارد. بررسی بیان ژن‌های کیتیناز و بتا-۱ و ۱-گلوکاناز نشان داد که BABA باعث ایجاد حالت آماده باش در بیان این ژن‌ها می‌شود که پس از تلقیح بیمارگر بیان این ژن‌ها افزایش معناداری نسبت به شاهد نشان می‌دهد (علیزاده و سالاری ۱۳۹۳).

در تحقیق دیگری اثر کیتوزان در بیان تعدادی از ژن‌ها و تغییرات چند آنزیم از جمله فنیل آلانین آمونیا لیاز در بیماری بوته میری خیار آلوده به قارچ *Pythium aphanidermatum* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام به روش کاربرد اسپری برگی مورد استفاده

^۱ acibenzolar-S-methyl

قرار گرفت. بررسی پیشرفت بیماری نشان داد که شدت بیماری‌زایی در گیاهان تیمار شده با کیتوزان نسبت به شاهد به‌طور معناداری کاهش می‌یابد. ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاهان تحت تنش نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی می‌شود. بررسی تغییرات بیان ژن با روش پی‌سی‌آر کمی نشان داد که هر دو غلظت کیتوزان استفاده‌شده در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آلودگی باعث افزایش سطح بیان ژن‌های دفاعی می‌شود. نتایج این تحقیق به‌وضوح نشان داد که استفاده از کیتوزان می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مدیریتی کارآمد، سالم و بی‌خطر برای محیط زیست برای کنترل بیماری بوته میری خیار در گلخانه مورد استفاده قرار گیرد (صباغ و همکاران ۱۳۹۴).

رضانی و همکاران در سال ۲۰۱۷ برهم‌کنش گیاه خیار و بیمارگر *Pseudoperonospora cubensis* و تیمار فسفیت پتاسیم را بررسی کردند (Ramezani et al. 2017). نتایج نشان داد که رونویسی از ژن *pr1* در حالت پیش تیمار و پس تیمار، ۷۲ ساعت پس از تلقیح افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند. در حالی که ۹۶ ساعت پس از تلقیح، بیان این ژن افت می‌کند. همچنین ژن دیفنسین ۴۸ ساعت پس از تلقیح افزایش قابل توجهی، ۱۹ برابر در مورد پیش تیمار و ۱۷ برابر در مورد پس تیمار، نشان می‌دهد. در گیاهانی که فقط با قارچ تلقیح شده بودند، افزایش بیان ژن دیفنسین در هیچ‌یک از نمونه‌ها دیده نشد. میزان فعالیت آنزیم PAL در حالت پیش تیمار افزایش قابل توجهی را نشان داد. مولوی و همکاران ۲۰ رقم خیار را با بیمارگر فوزاریوم/اکسیسپوروم مایه‌زنی کردند و واکنش حساسیت و مقاومت را در آن‌ها مقایسه کردند. ده روز پس از مایه‌زنی، شاخص شدت بیماری به همراه وزن تر و خشک‌ریشه و اندام هوایی (ساقه و برگ‌ها) ارقام مختلف ارزیابی شد. همچنین آماربرداری تا ۳۰ روز بعد از مایه‌زنی ادامه یافت. در نهایت ارقام 2120118، Ayat، FD-C101، Festival، Khassib، Jakie، Storm، SR36-45007، SR36-456642 و متحمل و ارقام 232-PV، 8-Ayat، CB61688222، Negeen، Nasco، Janette، Nicoo 100 2، PSR3647112، 2Rubah-1، Rubah-s و Soltan حساس تا نیمه حساس به بیماری شناخته شدند (مولوی و همکاران ۱۳۸۸).

فصل ۳ : مواد و روش‌ها

۳-۱ جداسازی بیمارگر

طی بازدیدهایی که در فصل پاییز سال ۱۳۹۵ از مزارع جالیز (هندوانه، خیار و کدو) اطراف شاهرود انجام شد، نمونه‌های هر مزرعه در پاکت‌های تمیز قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل گردید. علاوه بر این نمونه‌هایی از ناحیه‌ی ورامین و جیرفت به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌برداری از گیاهان دارای علائم پژمردگی، زردی، پوسیدگی ریشه و طوقه انجام شد. پس از انتقال نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه، قسمت‌های آلوده گیاه شامل ریشه، طوقه و ساقه گیاهان بیمار در زیر جریان ملایم آب شستشو شدند. سپس قطعات یک سانتی‌متری از حدفاصل بافت آلوده و سالم تهیه شد و پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۲ تا ۳ دقیقه، سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند و روی کاغذ صافی سترون در زیر هود خشک و روی محیط کشت PDA (سیب‌زمینی دکستروز آگار) قرار گرفته و در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند (Sinclair and Dhingra 2017).

۳-۲ خالص‌سازی بیمارگر، شناسایی و نگهداری آن

با توجه به این‌که فوزاریوم سولانی یکی از گونه‌های دارای اسپور است، خالص‌سازی نمونه‌ها با روش تک اسپور انجام گرفت (عراقی و همکاران ۱۳۹۲). ابتدا با لوپ اسپورها را از سطح محیط کشت برداشته و در لوله‌آزمایشی که حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون بود، ریخته و سپس هم زده و سوسپانسیون اسپور تهیه شد و دوباره یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون در داخل لوله‌آزمایش دیگر اضافه شد و بعد از هم زدن، محیط یکنواختی تهیه شد. بعد از تهیه سوسپانسیون، چند قطره از آن با لوب در سطح پتری، محتوی لایه‌نازکی از محیط کشت آب آگار دو درصد پخش شد. سپس در داخل انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و ۲۴ ساعت بعد پتری‌ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. اسپورهای جوانه‌زده مشخص گردیدند. با سوزن سترون، قطعه حاوی اسپورهای جوانه‌زده به پتری حاوی محیط PDA انتقال داده و در انکوباتور برای رشد نگهداری شد. برای نگهداری به‌صورت کوتاه‌مدت، تشتک‌های پتری جدایه‌های کشت‌شده در یخچال نگهداری شدند.

۳-۳ شناسایی مقدماتی جدایه‌های قارچی

برخی از ویژگی‌هایی که در شناسایی قارچ فوزاریوم استفاده می‌شود مانند شکل، اندازه و رنگ پرگنه و همچنین ویژگی‌های ریخت‌شناسی ماکروکنیدی‌ها به‌منظور شناسایی اولیه‌ی جدایه‌ها موردتوجه قرار گرفتند.

۳-۴ شناسایی مولکولی قارچ

به منظور تهیه میسلیوم قارچی برای استخراج DNA، چند قرص آگار از کشت هفت‌روزه جدایه های قارچی رشد داده شده روی محیط PDA به ظرف های ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع PDB منتقل شد. ارلن های حاوی قارچ به مدت هفت روز در انکوباتور شیکردار (۱۳۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سلسیوس) قرار داده شدند. سپس میسلیوم به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی و پمپ خلأ جدا شد و با آب مقطر سترون شست و شو داده شدند تا باقیمانده محیط مایع از روی سطح میسلیوم شسته شود. بافت های میسلیومی قارچ در فالكون های استریل جمع آوری شده و در فریزر در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس برای استفاده های بعدی نگه داری شد (آشنگرف ۱۳۹۱).

۳-۴-۱ استخراج DNA از قارچ

استخراج DNA ژنومی جدایه ها مطابق روش صفایی و همکاران (Safaei *et al.* 2005) انجام شد. ابتدا ۴۰ تا ۵۰ گرم از توده میسلیومی فریز شده هر یک از جدایه ها، درون هاون چینی قرار داده شده و پس از افزودن نیتروژن مایع، ساییده شد. سپس مراحل زیر به ترتیب انجام شد:

۱- مقدار ۴۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج (تریس ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۵ میلی مولار، سدیم کلرید ۱/۴ مولار) به میسلیوم پودر شده اضافه شد.

۲- محتویات میکروتیوب به خوبی مخلوط شد

۳- میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در طول این مدت دو تا سه بار میکروتیوب ها به آرامی تکان داده می شوند.

۴- پس از انتقال میکروتیوب ها بر روی یخ (به مدت پنج تا ده دقیقه)، محتویات میکروتیوب با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۵- محلول رو نشین به میکروتیوب تمیز و سترون دیگری منتقل شده و هم حجم بافر استخراج، ایزوپروپانول سرد اضافه گردید.

۶- میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز بالایی دور ریخته شد.

۷- رسوب حاصل در معرض هوای اتاق قرار گرفت تا باقیمانده‌ی الکل تبخیر شود. سپس ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه سترون به رسوب DNA اضافه و یک‌شب در یخچال نگهداری شد تا DNA در آب حل گردد.

برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده پنج میکرولیتر از محلول DNA روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد. همچنین به‌منظور بررسی کمیت DNA استخراج‌شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد.

۳-۴-۲ تکثیر قطعه‌ی TEF-1 α قارچ با استفاده از PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌منظور تکثیر ژن TEF-1 α با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش، ۱ میکرولیتر آغازگر پیشرو، یک میکرولیتر آغازگر معکوس، دو میکرو لیتر DNA الگو با غلظت ۵۰ نانوگرم و حجم باقی‌مانده آب دیونیزه انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. این آغازگرها در جدول ۳-۱ آورده شده‌اند.

جدول ۳-۱: آغازگرهای مورد استفاده به‌منظور شناسایی مولکولی جدایه‌ها و برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Arif et al. 2012)

آغازگر	توالی آغازگر (۵' - ۳')	ژن	طول قطعه (bp)	اختصاصیت	برنامه واکنش
TEF-Fs4f	ATCGGCCACGTCGACTCT	TEF-1 α	658	<i>F. Solani</i>	۴۰ چرخه شامل ۹۴
TEF-Fs4r	GGCGTCTGTTGATTGTTAGC				درجه سلسیوس برای یک دقیقه، ۵۸ درجه سلسیوس برای یک دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس برای دو دقیقه
Fc-1	CATACCACTTGTTCCTC	ITS	315	<i>F. Oxysporum</i>	
Fc-2	ATTAACGCGAGTCCCACC				

۳-۴-۳ شناسایی نژاد قارچ فوزاریوم سولانی

به منظور شناسایی نژادهای قارچ فوزاریوم سولانی از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی استفاده شد. تفکیک نژادهای یک و دو این قارچ بر اساس طبقه‌بندی ماتوو و اسنایدر (Matuo and Snyder 1973)، با استفاده از شکل ماکروکنیدی‌ها انجام شد. شناسایی مولکولی با استفاده از آغازگرهای

اختصاصی نژاد یک و دو انجام شد. این آغازگرها برای ژن TEF-1 α و توسط مهل و اپستین (Mehl and Epstein 2007) طراحی شده‌اند. آغازگرهای مورداستفاده در جدول ۲-۳ معرفی شده‌اند.

جدول ۲-۳ آغازگرهای مورداستفاده برای شناسایی مولکولی نژاد یک و دو قارچ فوزاریوم سولانی

آغازگر	توالی آغازگر (۵'-۳')	ژن	طول قطعه (bp)	نژاد	برنامه واکنش
Fsc1-EF1	GCTAACAATCATCTACAGAC	TEF-1 α	۵۰۵	یک	۹۴ درجه سلسیوس برای ده دقیقه و ۳۵
Fsc1-EF-2	GACGGATGAGAGAGCAAC				چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس برای یک دقیقه، ۵۵ درجه سلسیوس برای یک دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس برای یک دقیقه
Fsc2-EF1	GTTGGTGACATATCTCCC	TEF-1 α	۴۲۵	دو	
Fsc2-EF3	GAGTGAGAGACATGACGG				

۳-۵ طرح آماری

این آزمایش در قالب فاکتوریل به طریق طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در این آزمایش از دو رقم حساس و مقاوم استفاده شد. برای بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید (با یک غلظت) و فسفیت پتاسیم (با دو غلظت متفاوت) بر گیاهان شاهد و مایه‌زنی شده با قارچ، برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

۳-۶ تهیهی بذرهای گیاه خیار

بذرهای گیاه خیار رقم حساس (نگین) و مقاوم (خسیب) به ترتیب از شرکت سبزگستر کرج و بهرویش اصفهان تهیه شد. این بذرها وارداتی بوده و رقم نگین محصولی از شرکت انزادان هلند (Enza Zaden) و همچنین رقم خسیب محصول شرکت رکزوان هلند (Rijk Zwaan) است.

۳-۷ بستر کشت گیاهان

برای تهیهی بستر کشت گیاهان، ابتدا خاک از مزرعهی دانشکدهی کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود برداشته شد. سپس این خاک الک شد تا مواد زائد آن جدا شده و خاک یکدست باقی بماند. در نهایت

ترکیب خاک + پرلیت + کوکوپیت به نسبت‌های ۱:۱:۱ تهیه و به‌منظور استریل شدن، دو بار اتوکلاو شد. پس‌از آن ترکیب ذکر شده در گلدان‌های کوچک توزیع شد.

۳-۸ کاشت مواد گیاهی

ابتدا بذره‌های خیار (رقم نگین و خسیب) با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و چند بار با آب مقطر شستشو داده شد. پس از استریل کردن تشتک پتری و کاغذ صافی، بذرها در تشتک پتری های حاوی یک ورق کاغذ صافی مرطوب قرار گرفتند. بذره‌های جوانه‌دار در گلدان‌های پلاستیکی که حاوی خاک، پرلیت و کوکوپیت با نسبت ۱:۱:۱ بودند، کشت شدند. گیاهچه‌ها در اتاقک رشد در شرایط کنترل‌شده دما ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی/هشت ساعت تاریکی کشت داده شدند (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱: پرورش گیاهچه‌ها در اتاقک رشد در شرایط کنترل‌شده

۳-۹ تهیه ترکیب شیمیایی فسفیت پتاسیم

جهت تهیه این ترکیب ابتدا ۴۰ cc محلول ۱۰ مولار KOH و ۲۰ cc محلول ۵ مولار اسید فسفرو تهیه شد. سپس با نسبت‌های معین باهم ترکیب‌شده و درنهایت فسفیت پتاسیم (KH_2PO_3) با $\text{pH}=6/3$ و غلظت‌های ۲۰ و ۳۶ میلی مولار جهت اسپری برگی تهیه شد (حیدرزاده و همکاران ۱۳۹۶).

۳-۱۰ تهیه ترکیب شیمیایی سالیسیلیک اسید

سالیسیلیک اسید محصول شرکت مرک (Merck) تهیه شد. برای تهیه‌ی نیم لیتر محلول سالیسیلیک اسید دو میلی مولار، ابتدا ۰/۱۳۸ گرم سالیسیلیک اسید در یک میلی‌لیتر اتانول حل شد و سپس تا حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر به آن آب مقطر استریل اضافه شد.

۳-۱۱ تهیه زاد مایه قارچ عامل بیماری

ابتدا پتری‌های حاوی کشت یک هفته‌ای بیمارگر با آب مقطر استریل حاوی توئین ۲۰ درصد به‌منظور جمع‌آوری کنیدی‌ها شستشو داده شدند. تعداد اسپورها در مایه تلقیح قارچ با استفاده از لام نئوبار شمارش و در حدود 2×10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر محلول آب توئین ۲۰ درصد تنظیم شد (Bourbos *et al.* 1997).

۳-۱۲ مایه‌زنی گیاهچه‌های خیار در اتاقک رشد و آزمون

بیماری‌زایی

برای بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی، سه روش مایه‌زنی مورد آزمایش قرار گرفت. در روش اول بذره‌های استریل شده در تشتک پتری که کف آن با کاغذ صافی استریل پوشیده شده بود قرار گرفت. پس از مرطوب کردن کاغذ صافی، پتری‌ها در محل تاریکی قرار داده شد تا بذرها جوانه بزنند. سپس سوسپانسیون قارچی بر روی بذره‌های تازه جوانه‌زده اسپری شدند. این کار دو بار تکرار شد و پس از آن بذرها داخل گلدان‌ها کشت شدند (Navi and Yang 2005). در روش دوم، دو هفته پس از جوانه‌زنی گیاهان، با استفاده از تیغ اسکارپل استریل خراش کوچکی در نواحی ابتدایی ساقه و طوقه ایجاد شد. سپس سوسپانسیون قارچ به محل خراش تزریق شد و این محل با پارافیلیم بسته شد (Rajput *et al.* 2008). در روش سوم، بذره‌های جوانه‌زده در داخل مخلوط خاک، کوکوپیت و پرلیت استریل کاشته شدند و پس از دو هفته، سوسپانسیون قارچ در محل ریشه‌های آن‌ها به خاک اضافه شد (Bourbos *et al.* 1997).

پس از تلقیح قارچ، گیاهان در اتاقک رشد به مدت چهار روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. علائم آلودگی در بافت‌های تیمار شده بعد از گذشت این مدت مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این ریشه‌های گیاهان مایه‌زنی شده پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱٪ روی محیط PDA کشت داده شدند.

۳-۱۳ کاشت گیاهان برای بررسی تغییرات بیان ژن و فعالیت

آنزیمی

با مشخص شدن بهترین روش تلقیح، بذرها پس از جوانه‌زنی در کاغذ صافی، به تعداد کافی (۱۰۸ گیاه برای هر رقم) در گلدان‌ها کشت شدند. تیمار فسفیت پتاسیم با غلظت‌های ۲۰ و ۳۶ میلی مولار (Eshraghi *et al.* 2011) سه روز قبل از تلقیح قارچ و تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت ۲ میلی مولار (Abo-Elyousr *et al.* 2009)، دو روز قبل از تلقیح بر روی برگ گیاهان اسپری شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. در نهایت دو هفته پس از جوانه‌زنی بذرها، سوسپانسیون قارچ به خاک گیاهان اضافه شد.

۳-۱۴ نمونه‌گیری مواد گیاهی

پس از تلقیح قارچ، نمونه‌گیری از گیاهان در روزهای سوم، هفتم و دهم صورت گرفت. گیاهان شاهد، تلقیح شده با قارچ در زمان‌های ذکر شده با تیغ اسکارپل استریل از اوایل ساقه برش داده شد و پس‌ازاین که در داخل پاکتی از فویل آلومینیومی قرار گرفت، در ازلت مایع نگهداری شد. پس از نمونه‌گیری از تمام گیاهان، نمونه‌ها داخل فریزر ۸۰- نگه‌داری شدند.

۳-۱۵ استخراج RNA کل

استخراج RNA با روش سانچس و کارباجوزا (Oñate-Sánchez and Carbajosa 2008) انجام شد. ابتدا ۳۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی در هاون کوچک حاوی ازلت مایع کاملاً خرد شد. بافت خرد شده به میکرو تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و ۳۰۰ میکرو لیتر از بافر شماره یک (2% SDS، سدیم سیترات 68 mm، سیتریک اسید 132 mm، 1mm EDTA) به آن اضافه شد. سپس به مدت کوتاهی ورتکس شد تا همگن شود و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه ۱۰۰ میکرو لیتر از بافر شماره دو (4 M nacl، 16 mm sodium citrate، 32 mm citric acid) اضافه و به آرامی مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از این، محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. سپس رانشین به میکروتیوب جدید انتقال یافت و ۳۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه گردید و به مدت پنج دقیقه بر روی یخ نگهداری شد. میکروتیوب‌ها به مدت چهار دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و رانشین حذف گردید. رسوب با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و در ۲۵ میکرو لیتر آب DEPC حل گردید. به منظور حذف آلودگی‌های DNA، به میزان سه میکرو لیتر بافر (10x dnase) و دو میکرو لیتر dnase اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. پس از این به میزان ۷۰ میکرو لیتر آب DEPS،

۵۰ میکرو لیتر محلول آمونیوم استات و ۴۰۰ میکرو لیتر اتانول ۱۰۰ درصد به ۳۰ میکرو لیتر RNA اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. در پایان با یک میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو صورت گرفت و بر روی دستمال کاغذی استریل خشک شد و در ۲۰ میکرو لیتر آب DEPC حل گردید.

۳-۱۵-۱ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

۳-۱۵-۱-۱ الکتروفورز

کیفیت RNA استخراج شده، با انجام الکتروفورز تعیین شد. ۵ میکرو لیتر از نمونه های RNA همراه با نشانگر با اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت باز، بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت. پس از رنگ آمیزی، با استفاده از دستگاه عکس برداری ژل، باندهای مورد نظر بررسی شدند.

۳-۱۵-۱-۲ بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با نانودراپ

با توجه به ساختار RNA، حداکثر جذب آن در ۲۶۰ نانومتر است. در این طول موج یک واحد جذب (OD) معادل ۴۰ میکروگرم RNA در هر میکرو لیتر است. نسبت OD₂₆₀ به OD₂₈₀ درجه خلوص RNA را مشخص می نماید که این نسبت (A_{260/280}) تقریباً باید در محدوده ۲-۱/۸ باشد. در صورت وجود آلودگی های پروتئینی این نسبت کاهش می یابد. نسبت OD₂₆₀ به OD₂₃₀ میزان آلودگی به مواد فنلی و پلی ساکراید را نشان می دهد. در این روش از رقت $\frac{1}{25}$ نمونه RNA در آب مقطر و دستگاه نانودراپ استفاده شد.

۳-۱۶ سنتز cDNA

سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت Gene All کشور کره ی جنوبی انجام شد. سه میکرو لیتر از RNA استخراج شده را در سه میکرو لیتر آب تیمار شده با DEPC همراه ۰/۵ میکرو لیتر آغازگر oligo(dt) و ۰/۵ میکرو لیتر dntp در یک میکروتیوب مخلوط کرده (حجم نهایی ۷ میکرو لیتر) و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر نگهداری شد. پس از پایان زمان انکوباسیون، تیوب ها به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ نگهداری 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

نام و غلظت ماده	مقدار برای هر واکنش (μl)
10x rtase reaction buffer	۱
0.1 M DTT	۱
U/μl) Hyperscripttm Reverse Transcriptase (200	۰/۵
Zymalltm rnase Inhibitor	۰/۵

تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم Reverse transcriptase، تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. CDNA حاصل تا زمان مصرف در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

۳-۱۷ طراحی آغازگر

در این تحقیق، طراحی آغازگر برای بررسی تغییرات بیان ژن به روش exon-exon junction انجام شد. همچنین از ژن خانه‌دار آلفا توبولین به‌عنوان ژن مرجع استفاده گردید. برای طراحی آغازگر از نرم‌افزار پرایمر بلاست سایت NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و Oligo analyzer (IDT) و (<https://www.idtdna.com/site/account/login>) (returnurl=/site/home/home) استفاده شد و توالی‌های طراحی‌شده، برای سنتز به شرکت پیشگام فرستاده شدند.

جدول ۳-۴ مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی تغییرات بیان ژن

نام آغازگر	توالی (۵′-۳′)	طول قطعه تکثیر (bp)
TUB-F	CGTCTTGTATCCCAGGTCAT	۱۹۱
TUB-R	GTGATTTTCAGCCACTGAGAG	
PR1-F	TGCCTTGTGATGAAGTAGGA	۱۷۵
PR1-R	AAGTCTTGAGGTGAGTCTGT	
PAL1-F	CACTCTACTTCAGGTTTTGGAT	۱۰۴
PAL1-R	TAAGGGCATAGCGATCTTGT	

۱۸-۳ واکنش Real time PCR

ابتدا آغازگرها با غلظت ۵ پیکومول تهیه شده، سپس مخلوط واکنش، آغازگرها و آب تیمار شده با DEPC به دمای محیط رسانیده و بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه^۱ آماده استفاده شدند، استریپ‌های (تیوب‌های ۱۰۰ میکرو لیتری متصل به هم) مخصوص دستگاه Real Time بر روی یخ در زیر هود قرار گرفت و به آن‌ها ۵ میکرو لیتر مخلوط واکنش، ۰/۵ میکرو لیتر از هر آغازگر و ۲ میکرو لیتر آب اضافه شد. در این مرحله cDNA روی یخ ذوب گردید و بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه آماده شد و به هر استریپ ۲ میکرو لیتر اضافه گردید (جدول ۳-۵)، استریپ‌ها را در دستگاه قرار داده و PCR طبق برنامه دمایی ارائه شده در جدول ۳-۶ انجام شد.

جدول ۳-۵ اجزاء مخلوط واکنش Real time PCR

ماده	مقدار (μl)	غلظت
مخلوط واکنش Maxima SYBR (2X) Green/high ROX qpcr	۵	-
آغازگر رفت	۰/۵	0.15 μm
آغازگر برگشت	۰/۵	0.15 μm
الگو DNA	۲	≤100 ng
آب عاری از نوکلئاز	۲	-
جمع	۱۰	-

جدول ۳-۶: برنامه دمایی Real time PCR

سیکل	زمان	دما (درجه سلسیوس)	مرحله واکنش
۱	۱۰ دقیقه	۹۵	فعال سازی و واسرشته سازی اولیه
۳۵	۱۵ ثانیه	۹۵	واسرشته سازی
	۳۰	۵۸	اتصال
	۳۰	۷۲	بسط

^۱ short spin

۳-۱۱-۱ تجزیه و تحلیل داده‌های Real time PCR

برای مقایسه‌ی میزان بیان ژن در تیمارهای مختلف، MNE (Mean normalized expression) هر یک از آن‌ها محاسبه شد. بیان نرمال شده‌ی هر ژن^۱ با استفاده از فایل اکسل مربوط به نرم‌افزار Q-gene محاسبه شد.

۳-۱۹ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌ها

۳-۱۹-۱ آنزیم کاتالاز

به منظور بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز ابتدا محلول آنزیمی مطابق روش ابی و همکاران (Aebi et al, 1984)، استخراج شد. مواد و محلول‌های مورد نیاز برای تهیه‌ی بافر استخراج عبارت‌اند از ده میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدین (PVP^۲)، فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH=7 و سدیم متابیسولفیت یک میلی مولار.

در این روش هاون سرد را روی یخ قرار داده و یک گرم بافت برگ که در فریزر °C ۸۰ - نگهداری شده بود در هاون قرار گرفت و با اضافه کردن نیتروژن مایع بافت برگ ساییده شد. بعد از اینکه بافت برگ کمی خرد شد، ۱۰۰ میلی گرم پلی وینیل پیرولیدین اضافه نموده و مخلوط حاصل دوباره ساییده شد. سپس سه میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه شد. پس از اینکه نمونه‌ها به خوبی له شدند، عصاره گیاهی حاصل به فالكون منتقل و در ۱۰۰۰۰ rpm و دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ رومیزی، سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ کردن فاز شفاف بالایی جدا شد. فعالیت آنزیم کاتالاز به روش ابی و همکاران (۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش عبارت بود از: ۲۵۰ میکرو لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7)، ۵۰۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل و ۲۵۰ میلی لیتر پراکسید هیدروژن.

سپس مخلوط در یک سل کوارتزی ریخته شده و به وسیله آن اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر بلنک شد. سپس ۲۰ میکرو لیتر عصاره‌ی آنزیمی به آن اضافه شد و فعالیت آنزیم کاتالاز در مدت زمان ۶۰ ثانیه اندازه‌گیری و ثبت شد.

^۱ Normalized Expressions

^۲ Polyvinil pirolidin

۳-۱۹-۲ آنزیم PAL

اندازه‌گیری آنزیم PAL با روش کین و همکاران (Qin *et al.* 2003) و با کمی تغییرات انجام شد. جهت استخراج عصاره‌ی آنزیمی ۰/۱ گرم برگ با ۵۰۰ میکرولیتر بافر بورات سدیم ۵۰ میلی مولار با $\text{pH}=8.8$ و حاوی پنج میلی مولار بتامرکاپتواتانول و ۰/۰۱ گرم پلی وینیل پیرولیدین در داخل هاون چینی سرد خرد شد و به‌صورت مخلوط یکنواخت درآمد. مخلوط حاصل بلافاصله در ۹۵۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس سانتریفیوژ شد و روشناور به همراه یک میلی‌لیتر بافر بورات سدیم ۵۰ میلی مولار، $\text{pH}=8.8$ و ۲۵۰ میکرولیتر ال- فنیل آلانین ۲۰ میلی مولار در یک میکروتیوب ریخته شد و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت. سپس واکنش با ۰/۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک شش نرمال متوقف شد. فعالیت آنزیم PAL با تولید سینامیات تعیین می‌شود. میزان تولید سینامات با اندازه‌گیری جذب محلول در طول موج ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر صورت گرفت. نمونه شاهد حاوی تمام محتویات محلول به‌جز عصاره آنزیمی استخراج شده بود.

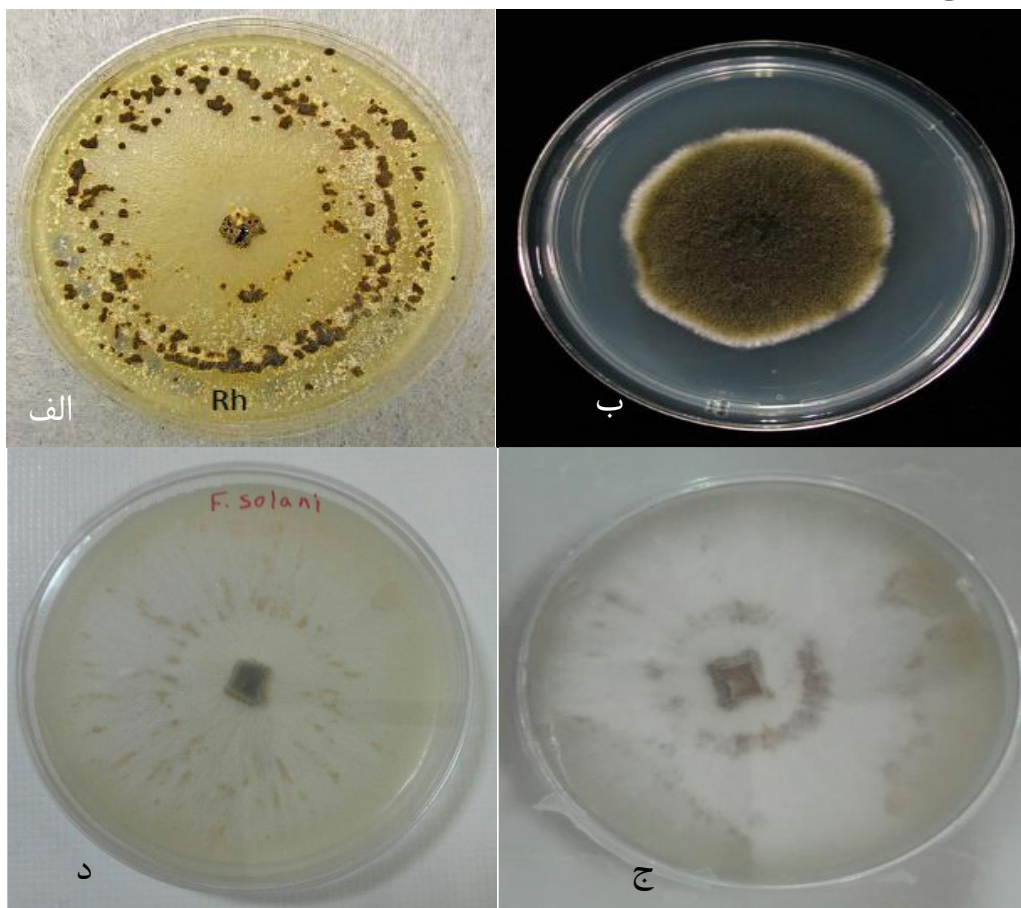
۳-۲۰ تجزیه و تحلیل داده‌های فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم در تمام نمونه‌های تیمار شده و مایه‌زنی شده با قارچ و همچنین گیاهان شاهد (تمام نمونه‌هایی که بیان ژن آن‌ها در آزمایش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفته بود) اندازه‌گیری شد. آنالیز تجزیه‌ی واریانس داده‌ها و مقایسه‌ی میانگین با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد. مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به فعالیت آنزیمی با استفاده از آزمون دانکن انجام شد. در نهایت نمودار فعالیت‌های آنزیمی با استفاده از نرم‌افزار EXCEL رسم شد.

فصل ۴ : نتایج و بحث

۴-۱ جمع آوری نمونه‌های آلوده و شناسایی اولیه‌ی عامل بیماری

در مجموع از گیاهان دارای علائم آلودگی، ۵۰ جدایه جداسازی شد. جدایه‌های جمع آوری شده شامل جنس‌های *آلترناریا*، *رایزوکتونیا* و *فوزاریوم* بود (شکل ۴-۱). جنس *آلترناریا* دارای کنیدی‌های قهوه‌ای روشن تا تیره، صاف تا زگیل‌دار و به شکل‌های کروی، تخم‌مرغی و بیضوی و همچنین دارای یک یا دو دیواره‌ی عرضی است. رنگ پرگنه‌ی *آلترناریا* زیتونی تیره است (اقبالی و همکاران ۱۳۹۶). پرگنه‌های جنس *رایزوکتونیا* در محیط کشت PDA در ابتدا بی‌رنگ و تقریباً کرم رنگ است و با گذشت زمان به زرد و قهوه‌ای تغییر می‌کند (عراقی و همکاران ۱۳۹۲). گونه‌های جنس *فوزاریوم* ماکروکنیدی‌های بی‌رنگ با چندین دیواره عرضی تولید می‌کنند که دارای سلول انتهایی نوک تیز است و ممکن است میکروکنیدی نیز داشته باشد. رشد پرگنه جنس *فوزاریوم* بر روی محیط کشت PDA سریع بوده و پس از ده روز به بیشتر از هفت سانتیمتر می‌رسد. این جنس میسیلیوم‌های هوایی فراوانی تولید می‌کند که ابتدا سفید رنگ بوده و با مسن‌تر شدن ممکن است رنگ آن تغییر کند (عظیمی و همکاران ۱۳۸۴).



شکل ۴-۱: قارچ‌های *رایزوکتونیا* (الف)، *آلترناریا* و *فوزاریوم* (ج و د)، جداسازی شده از میوه‌های خیار آلوده در تحقیق حاضر

از بین جدایه‌ها، جنس *فوزاریوم* بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. خالص‌سازی جدایه‌های *فوزاریوم* با توجه به اسپوردار بودن این قارچ، به روش تک اسپور انجام گرفت. جدایه‌ها با استفاده از

ویژگی‌های متمایزکننده در دو گروه فوزاریوم سولانی و فوزاریوم اکسیسپوروم قرار گرفتند. این ویژگی‌های متمایزکننده شامل ریخت‌شناسی ماکروکنیدی و پرگنه‌های کرم، سبز-آبی و آبی در محیط کشت PDA بودند (Leslie and Summerell, 2008). به این ترتیب از بین ۵۰ جدایه اولیه، بیشترین جنس مربوط به فوزاریوم با ۴۶ درصد (۲۳ جدایه) بود (جدول ۴-۱).

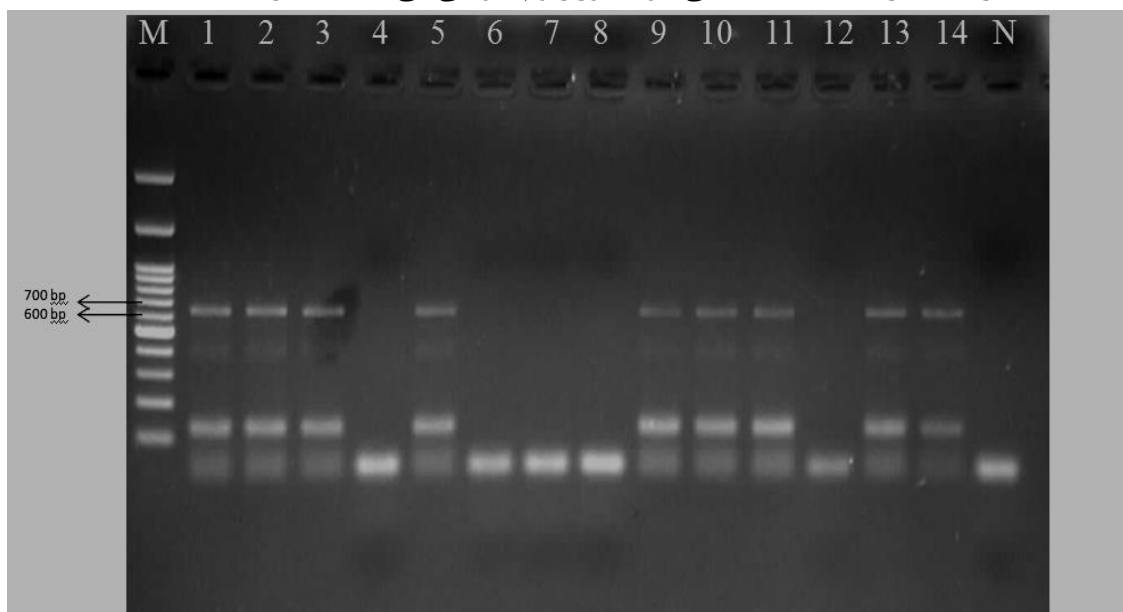
جدول ۴-۱: فهرست ۵۰ جدایه عامل بیماری جداسازی شده از مزارع جالیز

شماره	کد	منطقه	میزبان	شماره	کد	منطقه	میزبان
۱	۱-۱	شاهرود	کدو	۲۶	۴-۸	شاهرود	خیار
۲	۲-۱	شاهرود	کدو	۲۷	۵-۸	شاهرود	خیار
۳	۳-۱	شاهرود	کدو	۲۸	۶-۸	شاهرود	خیار
۴	۴-۱	شاهرود	کدو	۲۹	۷-۸	شاهرود	خیار
۵	۵-۱	شاهرود	کدو	۳۰	۹-۸	شاهرود	خیار
۶	۶-۱	شاهرود	کدو	۳۱	۱۰-۸	شاهرود	خیار
۷	۷-۱	شاهرود	کدو	۳۲	۱۱-۸	شاهرود	خیار
۸	۱-۲	شاهرود	هندوانه	۳۳	۱۲-۸	شاهرود	خیار
۹	۲-۲	شاهرود	هندوانه	۳۴	۱۳-۸	شاهرود	خیار
۱۰	۳-۲	شاهرود	هندوانه	۳۵	۱۴-۸	شاهرود	خیار
۱۱	۴-۲	شاهرود	هندوانه	۳۶	۱۵-۸	شاهرود	خیار
۱۲	۵-۲	شاهرود	هندوانه	۳۷	۱۶-۸	شاهرود	خیار
۱۳	۶-۲	شاهرود	هندوانه	۳۸	۱۷-۸	شاهرود	خیار
۱۴	۷-۲	شاهرود	هندوانه	۳۹	۱۸-۸	شاهرود	خیار
۱۵	۸-۲	شاهرود	هندوانه	۴۰	۱۹-۸	شاهرود	خیار
۱۶	۹-۲	شاهرود	هندوانه	۴۱	۱-۹	شاهرود	کدو
۱۷	۱-۵	جیرفت	خیار	۴۲	۲-۹	شاهرود	کدو
۱۸	۲-۵	جیرفت	خیار	۴۳	۳-۹	شاهرود	کدو
۱۹	۱-۶	ورامین	خیار	۴۴	۴-۹	شاهرود	کدو
۲۰	۲-۶	ورامین	خیار	۴۵	۵-۹	شاهرود	کدو

کدو	شاهرود	۶-۹	۴۶	خیار	ورامین	۳-۶	۲۱
کدو	شاهرود	۷-۹	۴۷	خیار	ورامین	۴-۶	۲۲
کدو	شاهرود	۸-۹	۴۸	خیار	شاهرود	۱-۸	۲۳
کدو	شاهرود	۹-۹	۴۹	خیار	شاهرود	۲-۸	۲۴
کدو	شاهرود	۱۰-۹	۵۰	خیار	شاهرود	۳-۸	۲۵

۲-۴ شناسایی مولکولی گونه‌های جنس فوزاریوم

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی DNA ژنومی هر جدایه و با استفاده از آغازگرهای TEF-Fs4f و TEF-Fs4r انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز نشان داد که در ۹ جدایه قطعه‌ی ۶۵۸ جفت بازی تکثیر شد که اختصاصی گونه فوزاریوم سولانی می‌باشد (شکل ۲-۴).

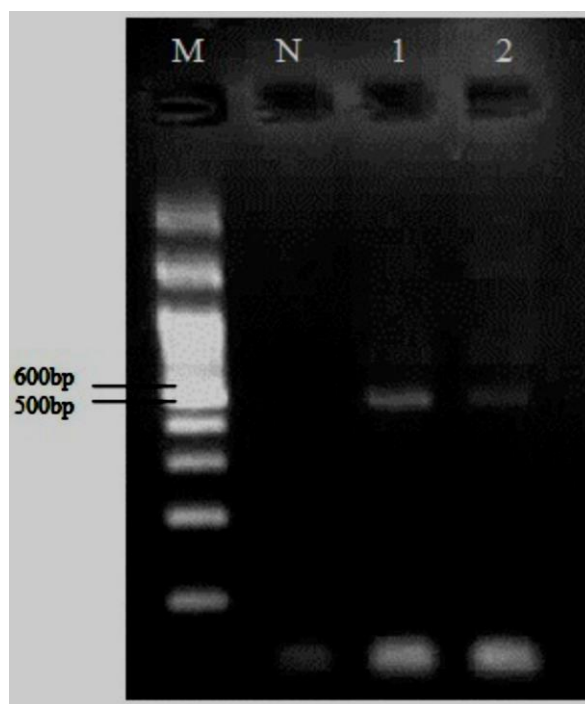


شکل ۲-۴: الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای TEF-Fs4r و TEF-Fs4f روی ژل آگارز یک درصد. خط کش ژنومی یک کیلو جفت بازی (M) نمونه‌ی کنترل منفی (N) و جدایه‌های مطالعه شده (چاهک‌های ۱ تا ۱۴)

DNA مربوط به این جدایه‌ها با آغازگرهای اختصاصی گونه‌ی فوزاریوم/اکسیسپوروم (Fc-1 و Fc-2) در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قرار گرفتند و هیچ‌کدام از آن‌ها باندی تکثیر نکردند. با توجه به مشخص شدن گونه، این نه جدایه برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

۳-۴ شناسایی مولکولی نژاد جدایه های فوزاریوم سولانی

شناسایی مولکولی نژاد یک و دو فوزاریوم سولانی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر نژاد انجام شد. محصول PCR مربوط به دو جدایه از ۹ جدایه بر روی ژل آگارز، الکتروفورز شدند. این دو جدایه با استفاده از آغازگر مربوط به نژاد یک Fsc1 EF1/Fsc1 EF2 در واکنش PCR، قطعه‌ای در محدوده‌ی ۵۰۵ جفت بازی تکثیر داشتند که نشان می‌دهد این جدایه مربوط به نژاد یک این گونه است (شکل ۳-۴).



شکل ۳-۴: الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نژاد ۱ (Fsc1 EF1/Fsc1 EF2) بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. M: خط کش ژنومی یک کیلو جفت بازی، N: کنترل منفی، ۱ و ۲ جدایه های مورد بررسی در این تحقیق.

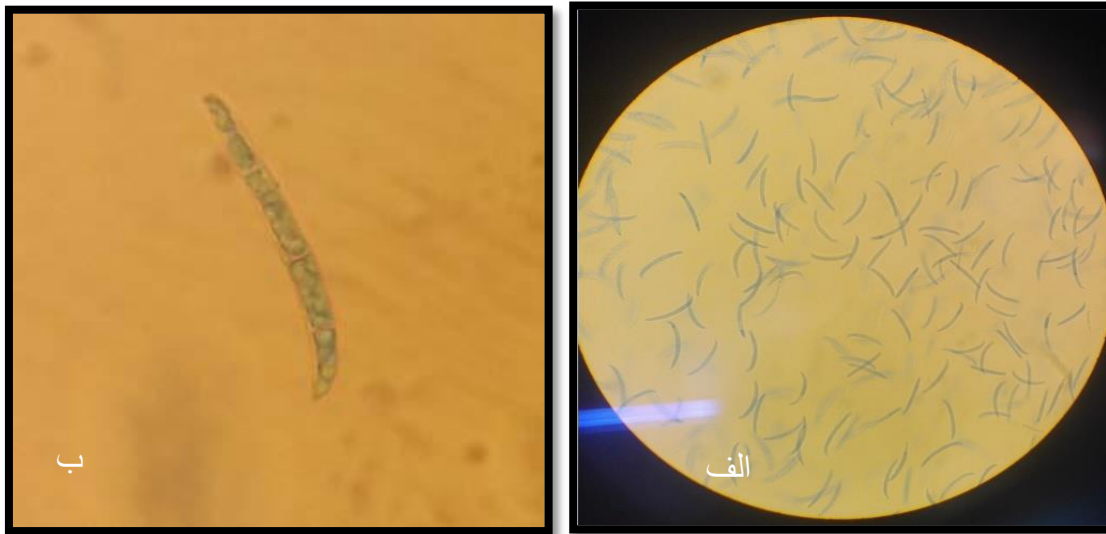
به منظور تائید نتایج بدست آمده، واکنش PCR با DNA این جدایه و آغازگر اختصاصی نژاد دو (Fsc2-EF3/Fsc2-EF1) نیز انجام شد، اما قطعه‌ای تکثیر نشد.

۴-۴ شناسایی جدایه ی فوزاریوم سولانی نژاد یک با استفاده از

خصوصیات ریخت‌شناسی

به منظور بررسی ریخت‌شناسی ماکروکنیدی جدایه ی شناسایی شده به عنوان نژاد یک، از پرگنه آن اسلاید تهیه و با استفاده از لاکتوفنول کاتن بلو رنگ‌آمیزی شدند. اسلایدها در زیر میکروسکوپ نوری قرار گرفته و ویژگی آن‌ها بر اساس منابع (Matuo and Snyder 1973) بررسی شد. نژاد یک این قارچ با ماکروکنیدی های پنج‌قسمتی از نژاد دو آن قابل تمایز است. همان‌طور که در شکل ۴-۴ مشاهده

می‌شود ماکروکنیدهای پنج‌قسمتی در این جدایه به‌صورت غالب می‌باشند. نتایج بررسی‌های ریخت‌شناسی با نتایج بررسی‌های مولکولی مطابقت دارند.



شکل ۴-۴: ماکروکنیدی های ۵ قسمتی نژاد یک فوزاریوم سولانی با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر (الف) و ۱۰۰ برابر (ب)

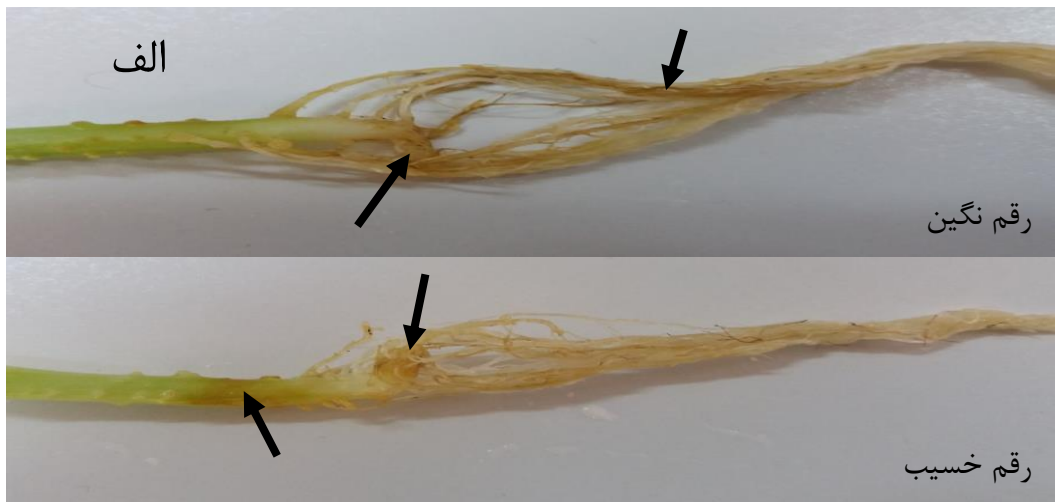
۴-۵ آزمون بیماری‌زایی بیمارگر فوزاریوم سولانی نژاد یک

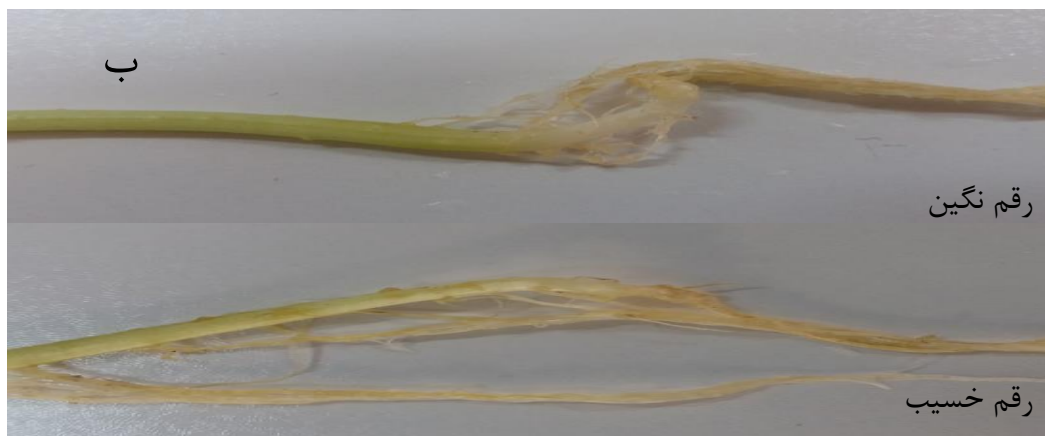
به‌منظور تعیین بهترین روش برای آزمون بیماری‌زایی، تلقیح گیاه با بیمارگر به سه روش انجام شد. در روش اول سوسپانسیون قارچی بر روی بذرهای تازه جوانه‌زده اسپری شدند و بذرها در خاک قرار گرفتند و چهل روز بعد از نظر علائم بیماری ارزیابی شدند (Navi and Yang 2005). نتایج این روش نشان داد که خصوصیات ظاهری گیاهان مایه‌زنی شده با گیاهان شاهد تفاوت نداشتند. برای بررسی بیشتر قطعات کوچکی از ریشه‌ی گیاهان تلقیح شده با قارچ پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، در محیط کشت PDA قرار گرفتند و به مدت یک هفته در انکوباتور در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس نگهداری شدند، اما پرگنه قارچ پس از یک هفته نیز اطراف قطعات ریشه تشکیل نشد. نتایج نشان داد که این روش تلقیح مؤثر واقع نشده است. روش دوم نیز که با ایجاد خراش در ابتدای ساقه‌ی گیاه و تلقیح از این محل همراه بود (Rajput *et al.* 2008)، مانند روش اول در ایجاد بیماری مؤثر نبود.

در روش سوم یعنی اضافه کردن سوسپانسیون اسپور به خاک اطراف ریشه گیاهچه‌های دوهفته‌ای (Bourbos *et al.* 1997)، گیاهان پس از چهل روز علائم بیماری را در ریشه‌هایشان نشان دادند (شکل ۴-۵). ریشه‌ی گیاهان در اثر بیمارگر به رنگ قهوه‌ای درآمد (شکل ۴-۶ الف) درحالی‌که گیاهان شاهد این تغییر را نشان ندادند (شکل ۴-۶ ب).



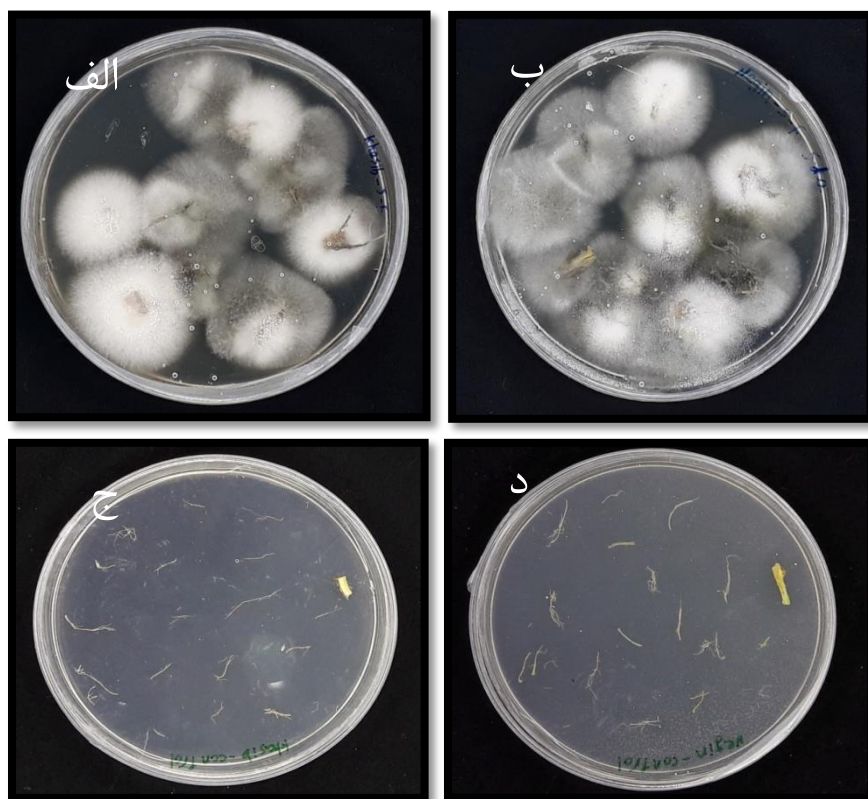
شکل ۴-۵ علائم بیماری در ریشه و قسمت‌های پایینی ساقه در اثر بیمارگر فوزاریوم سولانی (الف) و گیاه شاهد (ب).





شکل ۴-۶ علائم بیماری در اطراف ریشه‌ی گیاهان تلقیح شده (الف) و شاهد (ب). علائم بیماری به صورت قهوه‌ای شدن ریشه و ابتدای ساقه در گیاه تلقیح شده با فلش مشخص شده است.

علاوه بر این ریشه‌ی این گیاهان پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد در محیط کشت PDA حاوی تتراسایکلین (باغلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) (Juber and Hussein 2014) قرار گرفتند. پس از یک هفته اطراف بافت گیاهی پرگنه‌های سفیدرنگ قارچ تشکیل شدند (شکل ۴-۷). پس از رنگ‌آمیزی اسپورهای این قارچ با لاکتوفنول کاتن بلو و تهیه‌ی اسلاید، مشاهده در زیر میکروسکوپ نشان داد که این قارچ دارای ماکروکنیدی‌های پنج‌قسمتی متعلق به نژاد یک فوزاریوم سولانی است.

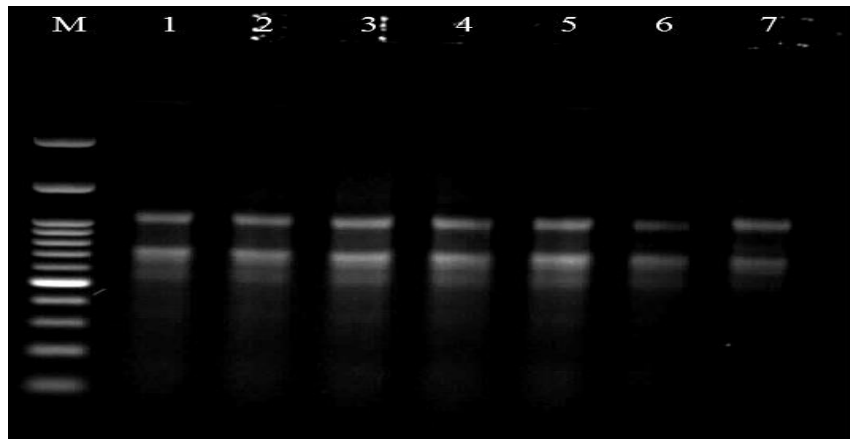


شکل ۴-۷: رشد قارچ فوزاریوم سولانی در اطراف ریشه‌ی گیاهان تلقیح شده رقم خسیب (الف) و رقم نگین (ب) و عدم رشد آن‌ها در اطراف ریشه‌های گیاهان شاهد رقم خسیب (ج) و نگین (د).

۴-۶ بررسی مولکولی

۴-۶-۱ استخراج RNA از برگ

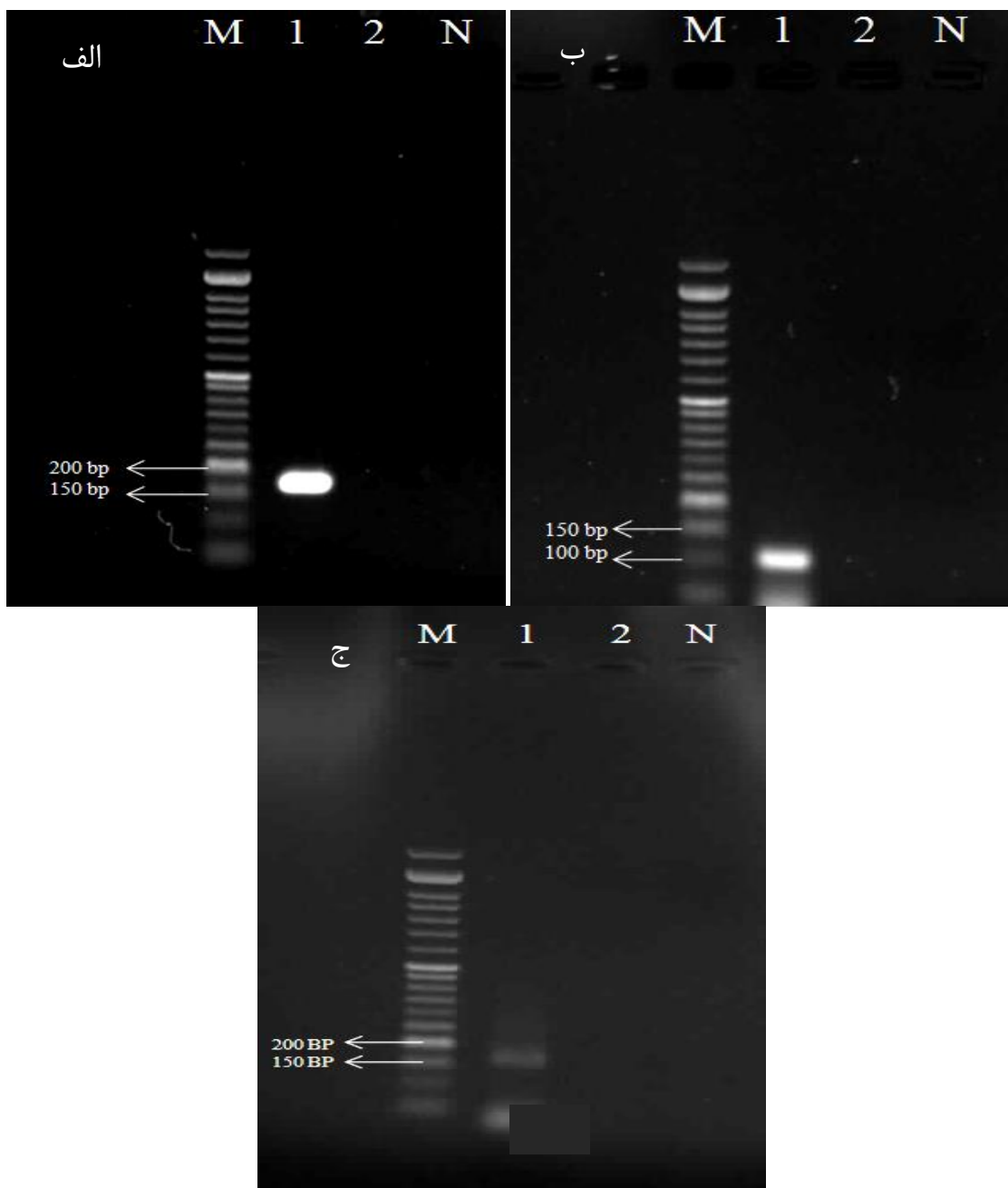
نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و مقایسه آن با خط کش ژنومی یک کیلو جفت بازی نشان داد که RNA های استخراج شده از نمونه‌های بافت برگ خیار، از کیفیت مناسب برخوردار هستند و باندهای ۲۸S rRNA و ۱۸S rRNA قابل مشاهده بود (شکل ۴-۸).



شکل ۴-۸: نمونه‌ی RNA استخراج شده از برخی تیمارها بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد. خط کش ژنومی یک کیلو جفت بازی (M) و نمونه‌های RNA (چاهک‌های ۱ تا ۷)

۴-۶-۲ انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با cDNA

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های آلفا توپولین، pr1 و pal انجام شد. جهت رسیدن به شرایط تکثیر مطلوب، پارامترهای واکنش مانند دمای اتصال، غلظت cDNA و غلظت آغازگر بهینه‌سازی شدند. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۴-۹).



شکل ۴-۹: محصول واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز با DNAهای مکمل با استفاده از آغازگرهای ژن آلفا توپولین با تکثیر قطعه‌ی ۱۹۱ جفت بازی (الف)، pal با تکثیر قطعه‌ی ۱۰۴ جفت بازی (ب) و pr1 با تکثیر قطعه‌ی ۱۷۵ جفت بازی (ج). خط کش ژنومی یک کیلو جفت بازی (M) نمونه‌ی کنترل منفی (N)، چاهک شماره یک محصول PCR با cDNA و چاهک شماره دو محصول PCR با DNA ژنومی.

۴-۶-۳ بررسی تغییرات بیان ژن pr1

۴-۶-۳-۱ بررسی تغییرات بیان ژن pr1 در رقم حساس نگین در اثر تیمار با

سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه‌زنی با قارچ

همان‌طور که در شکل ۴-۱۰ مشاهده می‌شود تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید باعث افزایش بیان ژن pr1 در روز سوم و هفتم نسبت به حالت شاهد (تیمار شده با آب مقطر) شد و در روز دهم به بیش از شش برابر گیاهان شاهد رسید. در گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار (ph20) میزان بیان این ژن در روز سوم نسبت به شاهد چهار برابر افزایش یافت و پس از آن در روز هفتم با کاهش بیش از سه برابری مواجه شده و در روز دهم به بیشترین میزان خود رسیده است (۹/۷۵ برابر حالت شاهد). تیمار گیاهان با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار (ph36) با افزایش بیان ژن pr1 به میزان ۱۰۴/۴ برابر گیاهان شاهد همراه بود. پس از اوج میزان بیان در روز سوم، افزایش بیان در روزهای هفتم و دهم با میزان خفیف‌تری مشاهده شد (شکل ۴-۱۰).

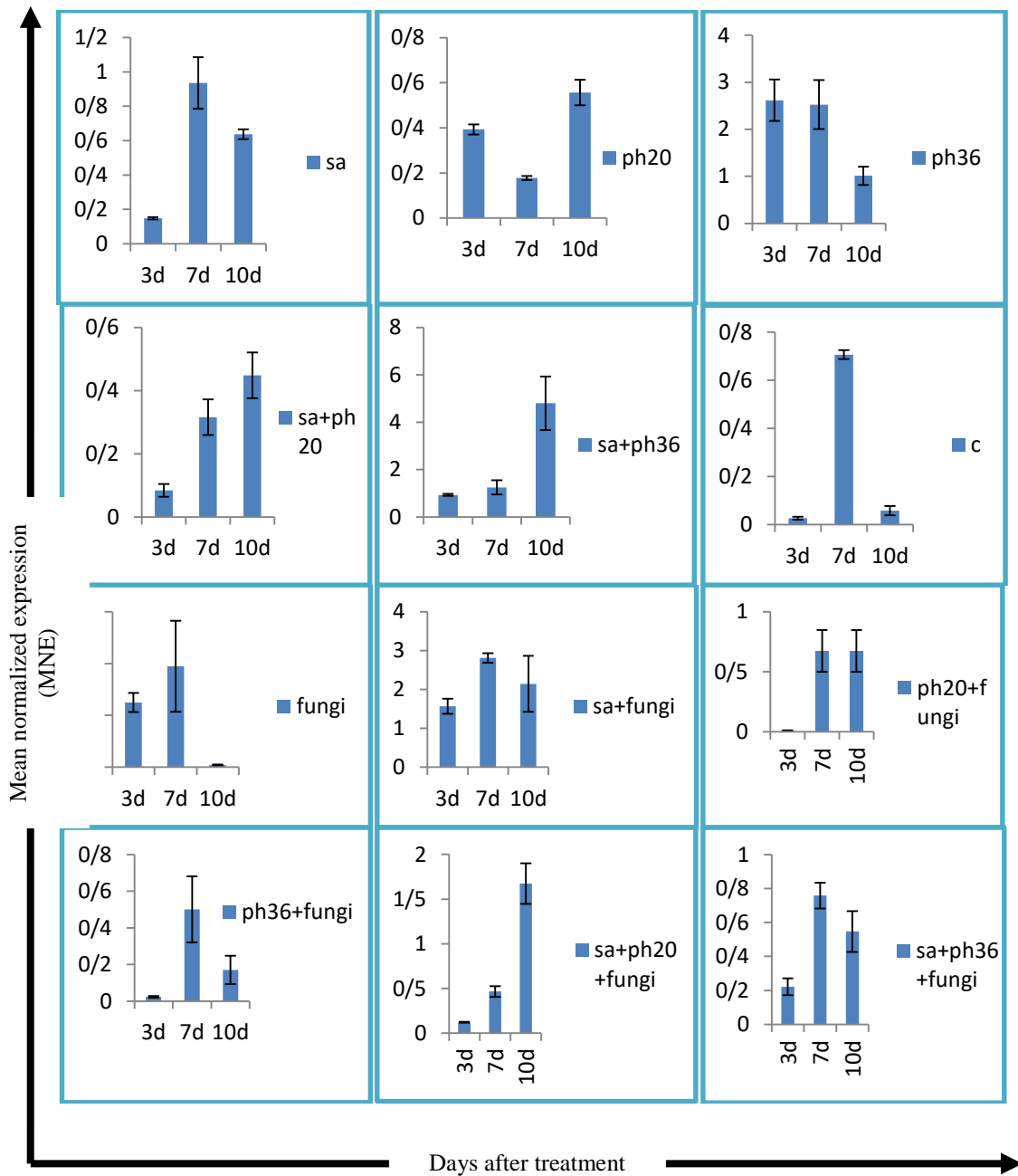
تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار (sa+ph20) تا روز هفتم تغییر قابل‌توجهی در بیان ژن pr1 در مقایسه با شاهد نشان نداد در حالی که این تیمار با کاهش بیان ژن در روز هفتم همراه بود (نصف حالت شاهد) و پس از آن در روز دهم به ۷/۸ برابر گیاهان شاهد افزایش یافت. تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار (sa+ph36) باعث افزایش سطح رونوشت‌های ژن pr1 در روز سوم شد و پس از آن در روز هفتم تا سطح گیاهان شاهد کاهش یافت و در نهایت در روز دهم به ۸۴ برابر گیاهان شاهد رسید (شکل ۴-۱۰). بیان ژن در گیاهان تحت تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار در مقایسه با تیمار سالیسیلیک اسید در روزهای سوم، هفتم و دهم به ترتیب ۱/۷، ۲/۹ و ۱/۴ برابر کاهش یافت در صورتی که تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار بیان ژن را در روزهای سوم، هفتم و دهم به ترتیب به میزان ۳/۶، ۱/۳ و ۷/۵ برابر نسبت به گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید افزایش داد (شکل ۴-۱۰).

بررسی الگوی بیان ژن pr1 در رقم حساس نگین در تعامل با بیمارگر فوزاریوم سولانی نشان داد که بیان این ژن در روز سوم و هفتم پس از مایه‌زنی با قارچ به ترتیب ۴۹/۶ و ۲/۷ برابر نسبت به گیاهان شاهد (مایه‌زنی شده با آب مقطر) افزایش یافته است. در حالی که در روز دهم، کاهش اندکی در میزان بیان ژن نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۴-۱۰).

الگوی بیان ژن pr1 در گیاهان پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید تا روز دهم پس از مایه‌زنی مشابه گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ بود اما در روز دهم سطح رونوشت‌های ژن نسبت به حالت شاهد ۳۷/۵ برابر افزایش یافت. همچنین بیان ژن در گیاهان پیش تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار در روز سوم و هفتم پس از مایه‌زنی در سطح گیاهان شاهد باقی ماند و تنها در روز دهم ۱۱/۸ برابر نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد (شکل ۴-۱۰). پیش تیمار گیاهان با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار

تا روز هفتم پس از مایه‌زنی تغییری در میزان بیان ژن نسبت به گیاهان شاهد ایجاد نکرد و تنها در روز دهم پس از مایه‌زنی به بیش از ۲/۹ برابر گیاهان شاهد رسید.

الگوی بیان ژن در گیاهان پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار در روز سوم و هفتم پس از مایه‌زنی افزایش قابل توجهی را نسبت به گیاهان شاهد نشان نداد در حالی که در روز دهم بیان این ژن به ۲۹/۲ برابر حالت شاهد رسید (شکل ۴-۱۰). سطح رونوشت‌های ژن pr1 در گیاهان پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار سه روز پس از مایه‌زنی نسبت به گیاهان شاهد ۸/۸ برابر افزایش یافت در صورتی که در روز هفتم تا سطح رونوشت‌های گیاهان شاهد کاهش و مجدداً در روز دهم افزایش (۹/۵ برابر گیاهان شاهد) یافت. به‌طور کلی پیش تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید بیشترین تأثیر را در بین پیش تیمارهای مختلف بر بیان ژن داشته است به طوری که پیش تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم سطح رونوشت‌ها را به صورت قابل توجهی در مقایسه با پیش تیمار سالیسیلیک اسید (شکل ۴-۱۰) کاهش داده است.



شکل ۴-۱۰: بررسی تغییرات بیان ژن pr1 در رقم حساس نگین در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه زنی با قارچ. میانگین‌ها حاصل سه تکرار بیولوژیک است. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشند.

اختصارات شکل: C: کنترل، sa: سالیسیلیک اسید، ph20، فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، ph36، فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار، fungi: قارچ، 3d: روز سوم، 7d: روز هفتم، 10d: روز دهم

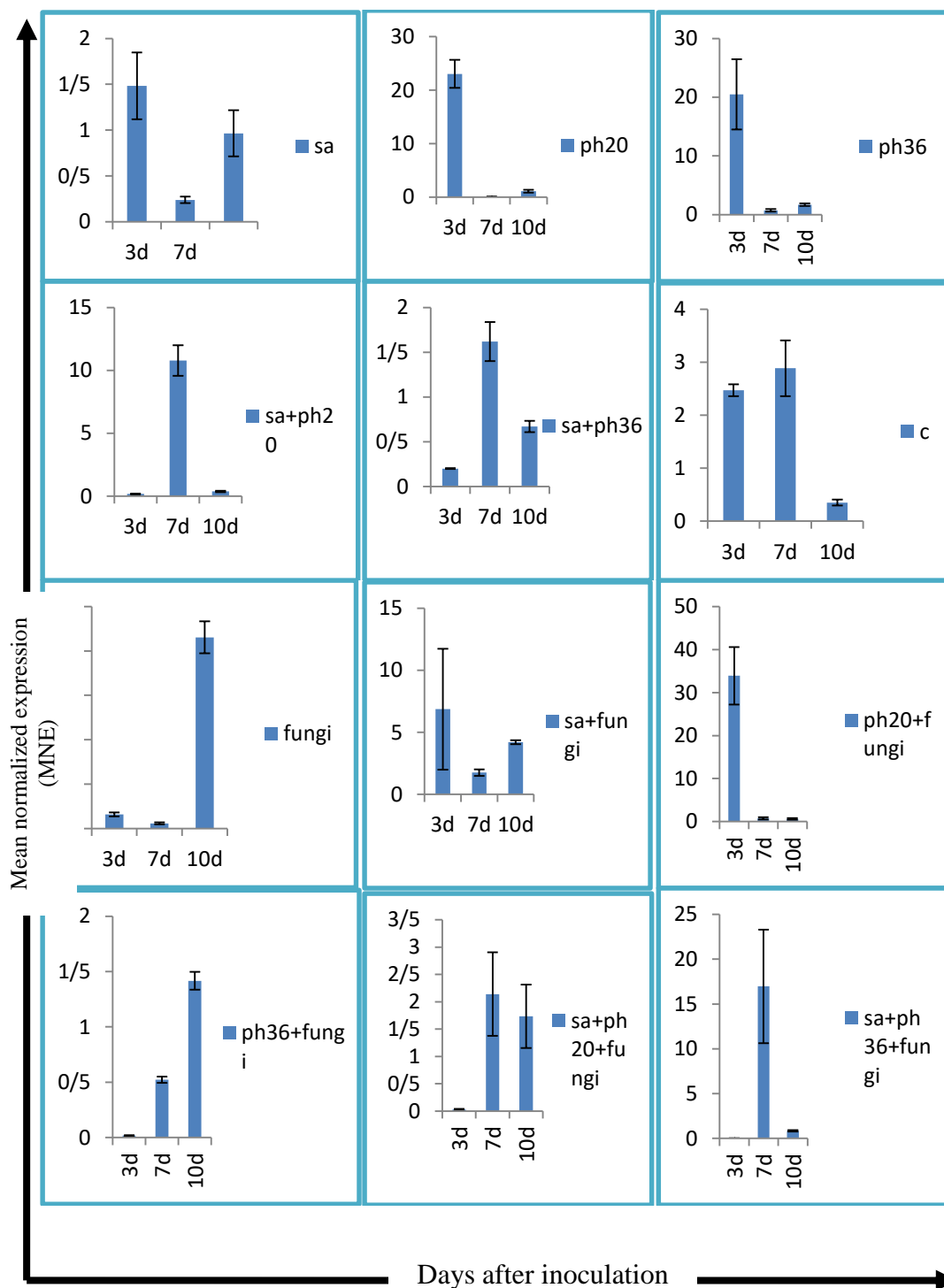
۴-۶-۳-۲ بررسی تغییرات بیان ژن pr1 در رقم مقاوم خسیب در اثر تیمار با

سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه‌زنی با قارچ

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن pr1 در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید بیانگر این بود که در روز سوم تغییر قابل توجهی در سطح بیان این ژن نسبت به شاهد مشاهده نمی‌شود و در روز هفتم میزان بیان نسبت به حالت شاهد ده برابر کاهش یافته و در نهایت در روز دهم با افزایش بیان این ژن به ۲/۷ برابر گیاهان شاهد رسیده است (شکل ۴-۱۱). در گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار میزان بیان این ژن در روز سوم افزایش قابل توجهی نسبت به گیاهان شاهد داشته (ده برابر) و پس از آن در روز هفتم نسبت به گیاه شاهد کاهش یافته و در نهایت در روز دهم به سه برابر گیاه شاهد رسیده است. همچنین در گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار الگوی بیان ژن مشابه با الگوی بیان ژن در گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار بود. بیان ژن pr1 در اثر تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار فقط در روز هفتم افزایش قابل توجهی را نشان داد (۳/۷ برابر حالت شاهد) و پس از آن در روز دهم به سطح بیان در گیاه شاهد رسید. همچنین در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار، سطح رونوشت‌های ژن pr1 در روز سوم نسبت به گیاهان شاهد ۱۲ برابر کاهش یافت پس از آن در روز هفتم و دهم به سطح گیاهان شاهد رسید (شکل ۴-۱۱). تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار در روزهای سوم و دهم بیان ژن را در مقایسه با تیمار سالیسیلیک اسید به ترتیب ۸/۶ و ۲/۵ برابر کاهش داد، در صورتی که در روز هفتم باعث افزایش ۴۵ برابری شد. به صورت مشابهی تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید و فسفیت ۳۶ میلی مولار در مقایسه با تیمار سالیسیلیک اسید سطح رونوشت‌های ژن را در روزهای سوم و دهم به میزان ۷/۴ و ۱/۴ برابر کاهش و در روز هفتم ۶/۷ برابر افزایش داد (شکل ۴-۱۱).

همان‌طور که در شکل ۴-۱۱ مشاهده می‌شود، در گیاهان تلقیح شده با بیمارگر، بیان ژن pr1 در روزهای سوم و هفتم بعد از مایه‌زنی نسبت به گیاهان شاهد به ترتیب ۷/۸ برابر و ۲۴/۶ برابر کاهش یافت در حالی که در روز دهم افزایش بیان قابل توجهی (۱۲/۲ برابر حالت شاهد) را نشان داده است. بیان ژن pr1 در گیاهان پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید به صورت قابل توجهی در روز دهم پس از مایه‌زنی افزایش (۱۲ برابر سطح رونوشت‌ها در گیاه شاهد) یافت. پیش تیمار گیاهان با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار باعث افزایش ۱۳ برابری بیان ژن نسبت به گیاهان شاهد در روز سوم پس از مایه‌زنی شد. نرخ بیان ژن پس از روز سوم کاهش یافت و در روز هفتم و دهم تا میزان بیان در گیاهان شاهد رسید. همچنین در گیاهان پیش تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار میزان بیان ژن در روز سوم کاهش قابل توجهی را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد (۱۳۰ برابر کمتر از گیاهان شاهد) و پس از آن در روز هفتم تا یک‌پنجم گیاهان شاهد رسید در حالی که در روز دهم به چهار برابر حالت شاهد افزایش یافت.

بیان ژن pr1 در گیاهان پیش تیمار شده توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار در روز سوم پس از مایه‌زنی نسبت به گیاه شاهد کاهش یافته (۸۵ برابر کمتر از گیاهان شاهد) و در روز هفتم به سطح بیان ژن در گیاه شاهد رسید و پس از آن در روز دهم افزایش پنج برابری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داده است. درحالی‌که پیش تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار باعث کاهش بیان ژن در روز سوم پس از مایه‌زنی نسبت به گیاهان شاهد شده و در روز هفتم به بیشترین میزان خود (۵/۸ برابر گیاهان شاهد) رسیده است. نرخ بیان ژن در روز دهم پس از مایه‌زنی در این گیاهان به ۲/۳ برابر سطح گیاهان شاهد رسیده است. پیش تیمار توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار و به‌صورت مشابه پیش تیمار توأم گیاهان با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار با کاهش بیان ژن در روزهای سوم و دهم و افزایش بیان در روز هفتم در مقایسه با تیمار سالیسیلیک اسید (شکل ۴-۱۱) همراه بودند. به‌طور کلی سطح رونوشت‌های ژن سه روز پس از مایه‌زنی با قارچ در گیاهان پیش تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار در بالاترین میزان خود قرار داشت (شکل ۴-۱۱).



شکل ۴-۱۱: بررسی تغییرات بیان ژن pr1 در رقم مقاوم خسیب در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه‌زنی با قارچ. میانگین‌ها حاصل سه تکرار بیولوژیک است. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشند.

اختصارات شکل: C: کنترل، sa: سالیسیلیک اسید، ph20، فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، ph36، فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار، fungi: قارچ، 3d: روز سوم، 7d: روز هفتم، 10d: روز دهم

۴-۶-۴ بررسی تغییرات بیان ژن pal

۴-۶-۴-۱ بررسی تغییرات بیان ژن pal در رقم حساس نگین در اثر تیمار با

سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه‌زنی با قارچ

با بررسی بیان ژن pal در روز سوم مشخص شد که سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار باعث کاهش میزان رونوشت‌های ژن نسبت به شاهد شده‌اند، در صورتی که تیمار فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار سطح رونوشت‌ها را ۲/۱ برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش داده است (شکل ۴-۱۲). همچنین کاربرد توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم (با هر دو غلظت) با کاهش فعالیت ژن نسبت به گیاهان شاهد در روز سوم همراه بود (شکل ۴-۱۲).

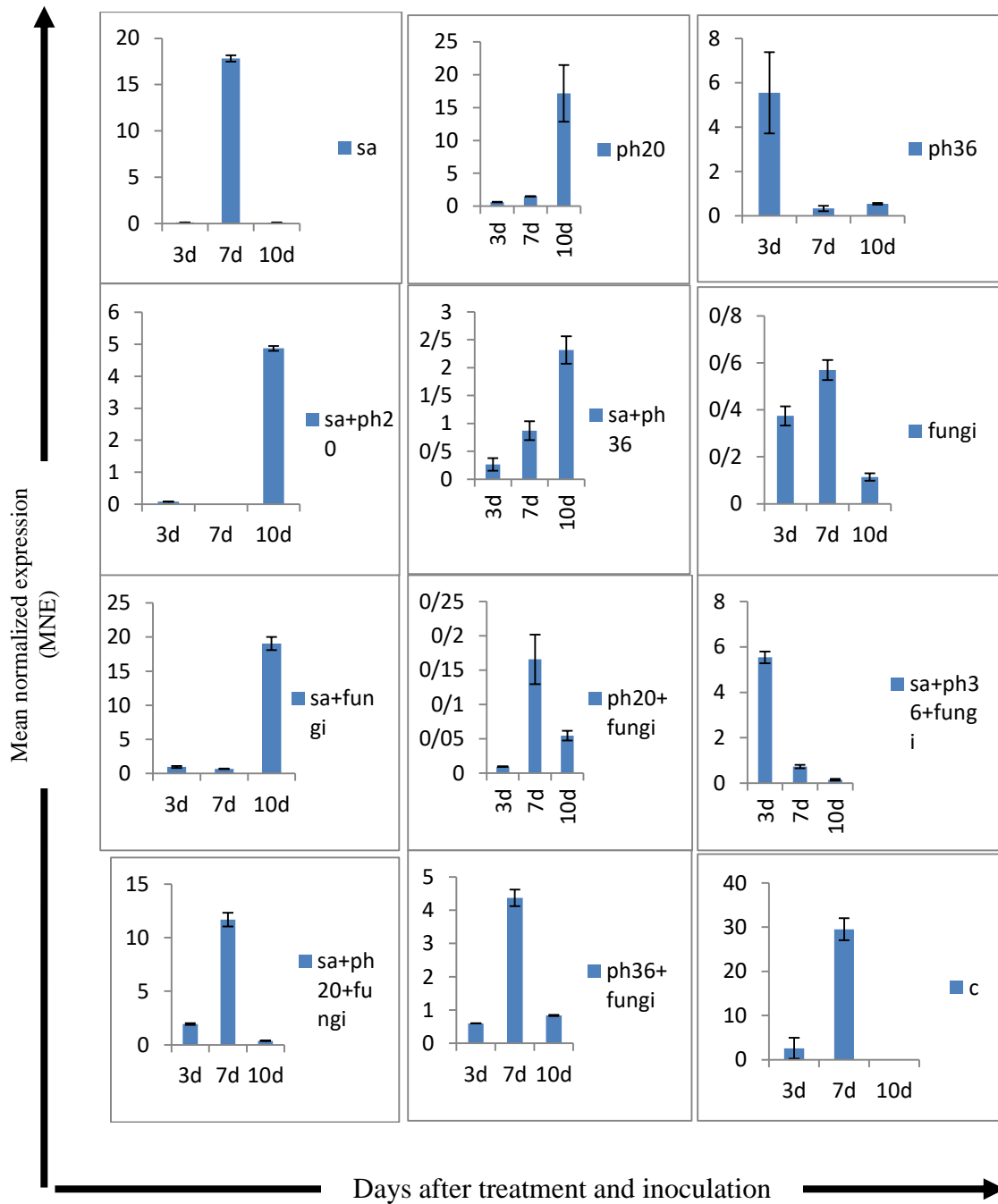
سه روز پس از مایه‌زنی گیاهان با قارچ میزان بیان ژن نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت به طوری که در این نقطه زمانی، میزان بیان ژن در گیاهان شاهد شش برابر گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ بود. کاربرد سالیسیلیک اسید، فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار به‌عنوان پیش تیمار، باعث کاهش بیان ژن در مقایسه با حالت شاهد در روز سوم پس از مایه‌زنی شد. همچنین پیش تیمار توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار سطح رونوشت‌های ژن را در مقایسه با گیاهان شاهد داد درحالی که پیش تیمار توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار باعث شد بیان این ژن به دو برابر گیاهان شاهد افزایش یابد.

در روز هفتم میزان بیان ژن pal در گیاهان تیمار شده و مایه‌زنی شده با قارچ کاهش قابل توجهی نسبت به گیاهان شاهد داشت. کاهش سطح رونوشت‌ها در اثر تیمار سالیسیلیک اسید در مقایسه با دیگر تیمارها خفیف‌تر بود (سطح رونوشت‌های ژن در این نقطه زمانی در گیاهان شاهد ۱/۶ برابر از گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید بیشتر بود) (شکل ۴-۱۲).

با بررسی فعالیت ژن pal در روز دهم مشخص شد که گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار افزایش بیان ژن را نسبت به گیاهان شاهد نشان ندادند درحالی که تیمار فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار باعث افزایش ۱۷ برابری بیان ژن نسبت به گیاهان شاهد شد. تیمار توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار با افزایش پنج برابری و تیمار توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار باعث افزایش دو برابری سطح رونوشت‌ها نسبت به حالت شاهد شد. همچنین ده روز پس از مایه‌زنی گیاهان با قارچ میزان بیان ژن کاهش قابل توجهی نسبت به گیاهان شاهد داشت و تنها پیش تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید باعث افزایش ۱۹ برابری بیان ژن نسبت به شاهد شد.

همان‌طور که در شکل ۴-۱۲ مشاهده می‌شود، سطح رونوشت‌های ژن pal در اثر تیمار توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار در مقایسه با تیمار سالیسیلیک اسید، در روزهای سوم و هفتم کاهش یافته در صورتی که در روز دهم افزایش نشان داد (۴۳ برابر میزان بیان ژن در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید). تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار

باعث افزایش بیان ژن در مقایسه با تیمار سالیسیلیک اسید در روزهای سوم و دهم به ترتیب با میزان ۲/۲ و ۲۰ برابر و همچنین کاهش بیان ژن به میزان ۲۰ برابر در روز هفتم شد. تأثیر پیش تیمارها بر بیان ژن به گونه‌ای بود که پیش تیمار سالیسیلیک اسید و همچنین پیش تیمار با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار باعث افزایش بیان ژن نسبت به گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ در هر سه نقطه زمانی شد، اما پیش تیمار فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار باعث کاهش میزان بیان ژن در روز سوم، هفتم و دهم شد (شکل ۴-۱۲).



شکل ۴-۱۲ بررسی تغییرات بیان ژن pal در رقم حساس نگین در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه‌زنی با قارچ. میانگین‌ها حاصل سه تکرار بیولوژیک است. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشند.

اختصارات شکل: C: کنترل، sa: سالیسیلیک اسید، ph20، فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، ph36، فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار، fungi: قارچ، 3d: روز سوم، 7d: روز هفتم، 10d: روز دهم

۴-۶-۲ بررسی تغییرات بیان ژن pal در رقم مقاوم خسیب در اثر تیمار با

سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه‌زنی با قارچ

با بررسی تغییرات بیان ژن pal در گیاهان رقم مقاوم خسیب در روز سوم مشخص شد که سه تیمار سالیسیلیک اسید، فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار و همچنین کاربرد توأم این تیمارها با کاهش فعالیت ژن نسبت به حالت شاهد همراه بوده است (شکل ۴-۱۳). سه روز پس از مایه‌زنی گیاهان با قارچ نیز فعالیت ژن ۳۱ برابر نسبت به حالت شاهد کاهش یافت. پیش تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید با افزایش سطح رونوشت‌ها به میزان ۱/۵ برابر گیاهان شاهد همراه بود درحالی‌که پیش تیمار با فسفیت پتاسیم (با هر دو غلظت) باعث کاهش بیان ژن نسبت به شاهد شد. علاوه بر این پیش تیمار توأم گیاهان با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار در روز سوم منجر به کاهش فعالیت ژن و پیش تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار منجر به افزایش ناچیز بیان ژن نسبت به گیاهان شاهد شد.

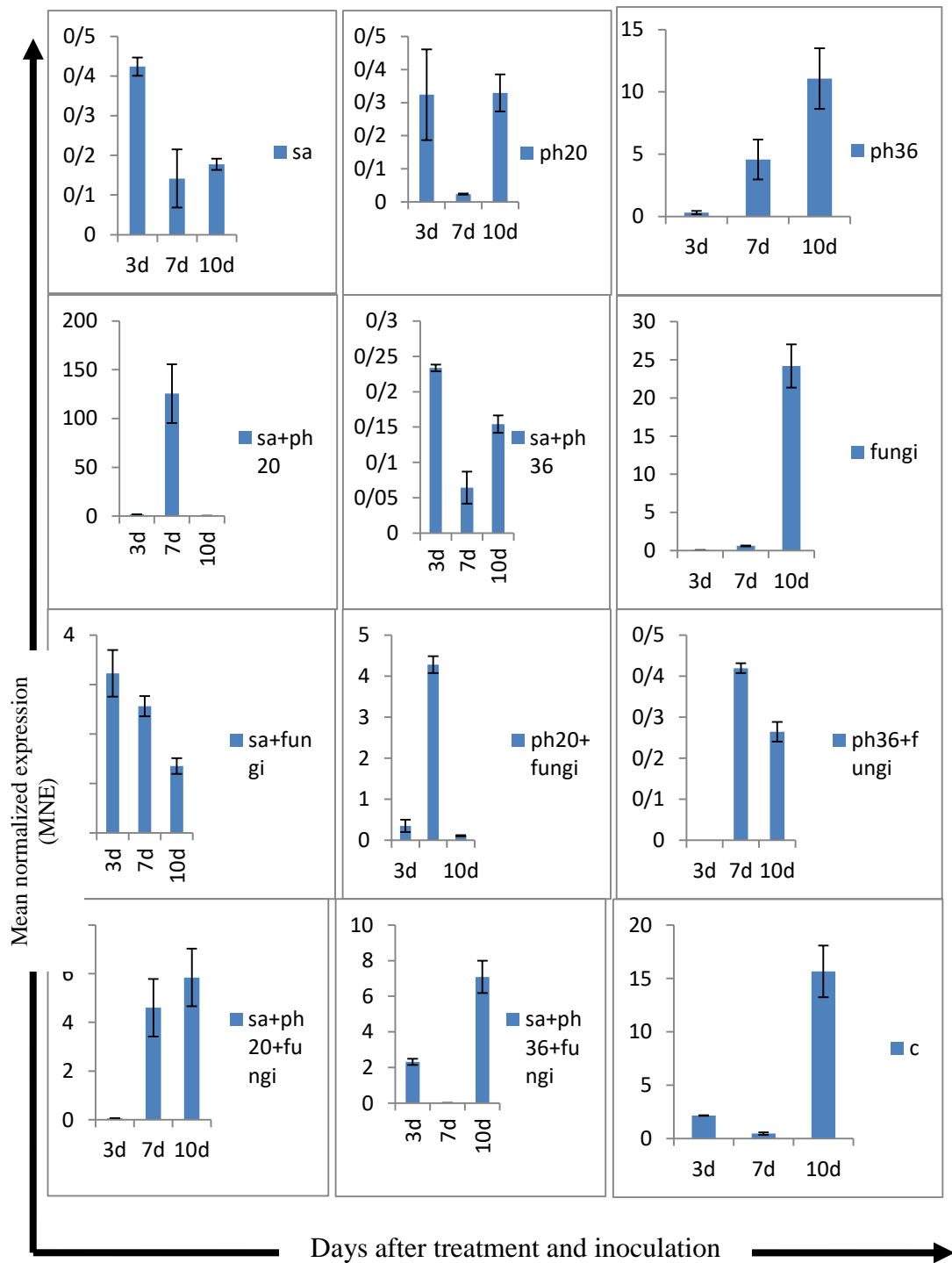
در روز هفتم، تیمارهای سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار باعث کاهش بیان ژن نسبت به گیاهان شاهد شدند درحالی‌که گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار افزایش ده برابری بیان ژن را نسبت به شاهد نشان دادند. همچنین تیمار توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار منجر به افزایش ۲۷۰ برابری سطح رونوشت‌ها نسبت به شاهد در روز هفتم شد اما تیمار توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار سطح رونوشت‌ها را در مقایسه با شاهد کاهش داد. هفت روز پس از مایه‌زنی گیاهان با قارچ نیز فعالیت ژن افزایش ناچیزی داشت، درحالی‌که پیش تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید باعث افزایش پنج برابری و پیش تیمار گیاهان با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار باعث افزایش بیان نه برابری نسبت به گیاهان شاهد شد. پیش تیمار با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار تأثیر قابل‌توجهی بر بیان ژن نداشت همچنین پیش تیمار توأم گیاهان با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، بیان ژن را تا ده برابر گیاهان شاهد در روز هفتم افزایش داد. این در حالی است که پیش تیمار توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار با کاهش بیان ژن در روز هفتم پس از مایه‌زنی در مقایسه با شاهد همراه بود.

در روز دهم، تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید، فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار و همچنین کاربرد توأم آن‌ها با کاهش بیان ژن در مقایسه با گیاهان شاهد همراه بود. مایه‌زنی گیاهان با بیمارگر باعث افزایش ۱/۵ برابری بیان ژن نسبت به گیاه شاهد شد. درحالی‌که گیاهان پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم (با هر دو غلظت) و همچنین گیاهان

پیش تیمار شده به صورت توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم کاهش سطح رونوشت‌های ژن را در مقایسه با حالت شاهد نشان دادند.

به‌طور کلی تأثیر تیمارها بر روی بیان ژن pal نشان داد که تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار باعث افزایش سطح رونوشت‌ها به میزان ۴/۱، ۸۹۰ و ۱/۹ برابر به ترتیب در روزهای سوم، هفتم و دهم در مقایسه با تیمار سالیسیلیک اسید می‌شود. این در حالی است که تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار با کاهش میزان بیان ژن در سه نقطه زمانی نسبت به گیاهان تحت تیمار سالیسیلیک اسید شد.

تأثیر پیش تیمار بر الگوی بیان ژن به‌گونه‌ای بود که پیش تیمار با سالیسیلیک اسید و همچنین پیش تیمار با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار باعث افزایش در روزهای سوم و هفتم و کاهش بیان ژن در روز دهم نسبت به گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ شد. این در حالی است که بیان ژن در اثر پیش تیمار با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار در مقایسه با مایه‌زنی گیاهان با قارچ باعث کاهش بیان ژن در هر سه نقطه زمانی شده است (شکل ۴-۱۳).



شکل ۴-۱۳ تغییرات بیان ژن pal در رقم مقاوم خسیب در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم و مایه زنی با قارچ. میانگین‌ها حاصل سه تکرار بیولوژیک است. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشند. اختصارات شکل: C: کنترل، sa: سالیسیلیک اسید، ph20: فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، ph36: فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار، fungi: قارچ، 3d: روز سوم، 7d: روز هفتم، 10d: روز دهم

۷-۴ بررسی فعالیت آنزیمی

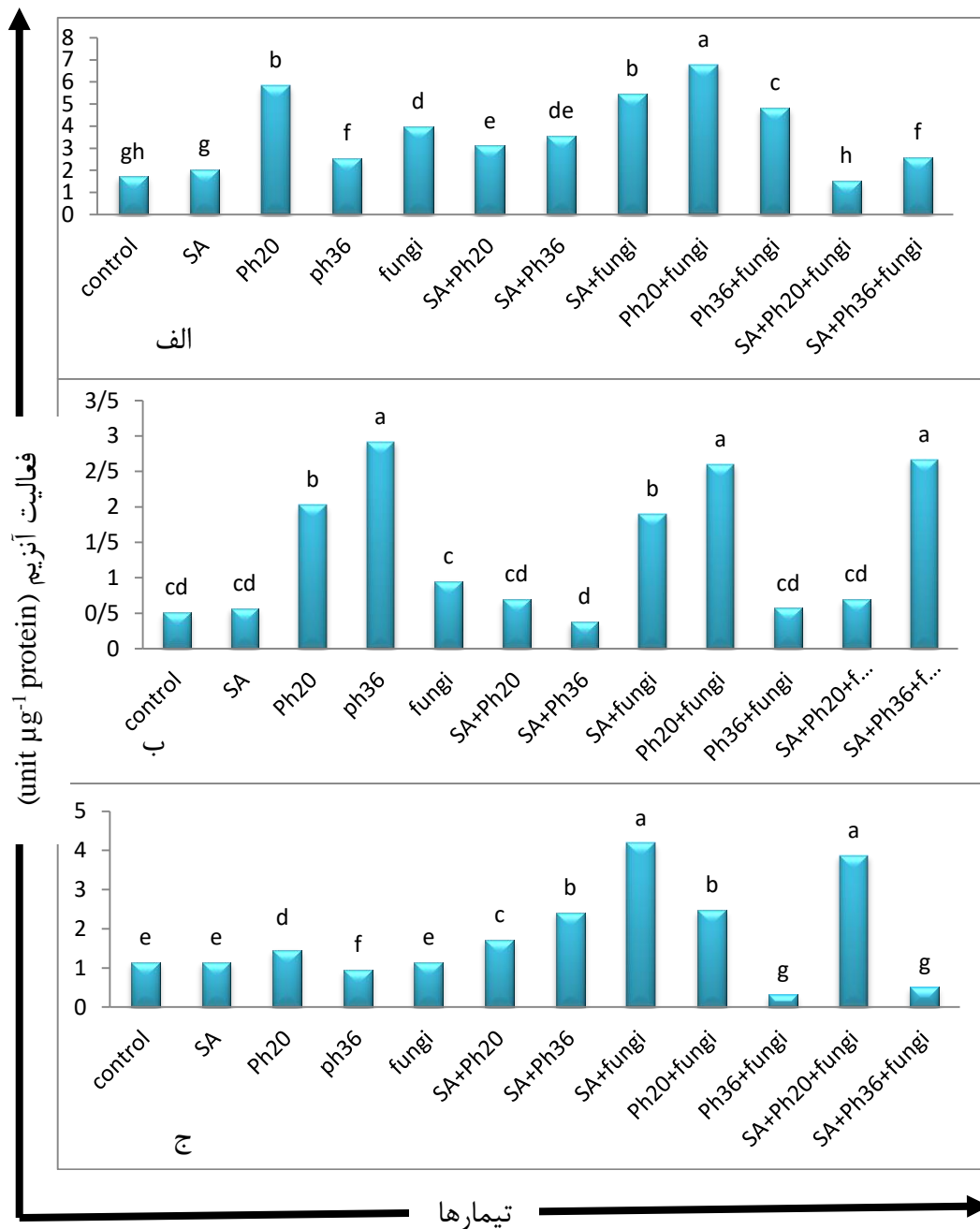
۱-۷-۴ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان رقم حساس

نگین

فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان رقم حساس نگین تفاوت معناداری ($P \leq 0.01$) در تیمارهای مختلف نشان داد (شکل ۴-۱۴). با مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به فعالیت آنزیمی در روز سوم مشخص شد که گیاهان تیمار شده اختلاف معناداری را نسبت به گیاهان شاهد نشان می‌دهند. بیشترین فعالیت آنزیم در روز سوم در گیاهان پیش تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار مایه‌زنی شده با قارچ مشاهده شد به طوری که فعالیت آنزیم در این گیاهان چهار برابر گیاهان شاهد بود. این در حالی است که فعالیت آنزیم با پیش تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار مایه‌زنی شده با قارچ نیز نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۴-۱۴ الف).

در روز هفتم فعالیت آنزیم در گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار، گیاهان پیش تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار مایه‌زنی شده با قارچ و همچنین گیاهان پیش تیمار شده توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار مایه‌زنی شده با قارچ، بیشترین افزایش فعالیت را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند (به ترتیب ۵/۷ برابر، ۵/۱ برابر و ۵/۲ برابر گیاهان شاهد). گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید، گیاهان تیمار شده توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، گیاهان پیش تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار و گیاهان پیش تیمار شده توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار تغییر معناداری را نسبت به گیاهان شاهد نداشتند (شکل ۴-۱۴ ب).

در روز دهم، بالاترین فعالیت آنزیم در گیاهان پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید و همچنین در گیاهان پیش تیمار شده توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار مشاهده شد (به ترتیب ۳/۶ برابر و ۳/۳ برابر گیاهان شاهد) در حالی که آنزیم کاتالاز در گیاهان پیش تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار فعالیت کمتری نسبت به گیاهان شاهد داشت (فعالیت آنزیم در گیاه شاهد ۳/۶ برابر از فعالیت آنزیم در این تیمار بیشتر بود) (شکل ۴-۱۴ ج).



شکل ۴-۱۴ تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان رقم حساس نگین. الف: روز سوم، ب: روز هفتم، ج: روز دهم. میانگین‌ها حاصل سه تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است. زمان‌های متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری شده‌اند.

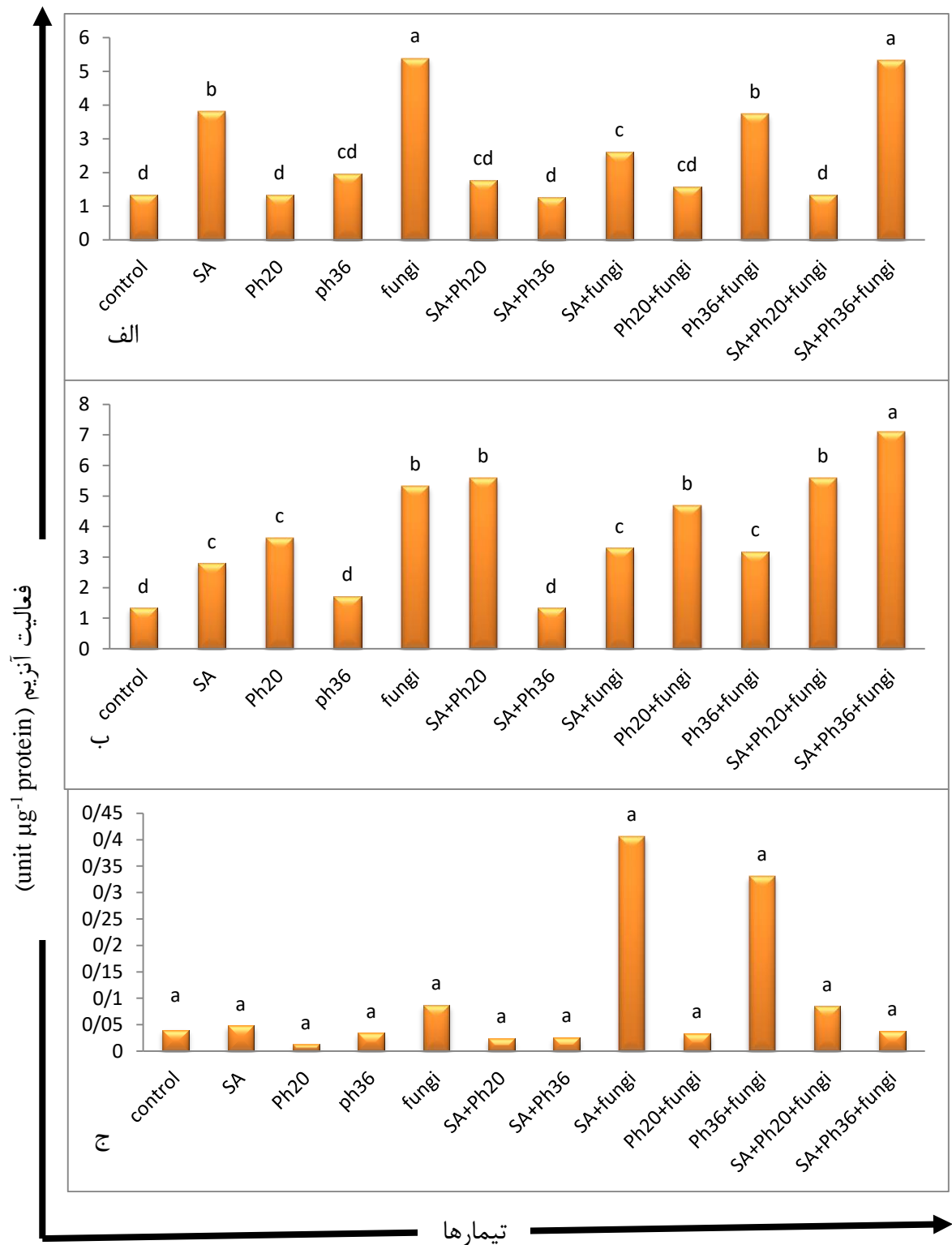
اختصارات شکل: C: کنترل، sa: سالیسیلیک اسید، ph20، فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، ph36، فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار، fungi: قارچ.

۴-۷-۲ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان رقم مقاوم

خسیب

در گیاهان رقم خسیب، تیمارهای مختلف از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح یک درصد با هم اختلاف معناداری داشتند. در روز سوم بیشترین افزایش فعالیت آنزیم در گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ و گیاهان پیش تیمار شده توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار مشاهده شد به گونه‌ای که آنزیم کاتالاز در این گیاهان چهار برابر گیاهان شاهد فعالیت داشت. گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، گیاهان تیمار شده توأم سالیسیلیک اسید + فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار و همچنین گیاهان پیش تیمار شده توأم سالیسیلیک اسید + فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، تغییر معناداری را در فعالیت آنزیم کاتالاز در روز سوم نسبت به گیاهان شاهد نشان ندادند (شکل ۴-۱۵ الف).

در روز هفتم، فعالیت آنزیم در گیاهان پیش تیمار شده توأم سالیسیلیک اسید + فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار بیشترین افزایش را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد (فعالیت آنزیم در این گیاهان ۵/۳ برابر از گیاهان شاهد بیشتر بود). گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار و گیاهان تیمار شده توأم سالیسیلیک اسید + فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار تغییر معناداری را در فعالیت آنزیم نسبت به گیاهان شاهد نشان ندادند (شکل ۴-۱۵ ب). در روز دهم، گیاهان تیمار شده افزایش یا کاهش معناداری را در فعالیت آنزیم نسبت به گیاهان شاهد نشان ندادند (شکل ۴-۱۵ ج).



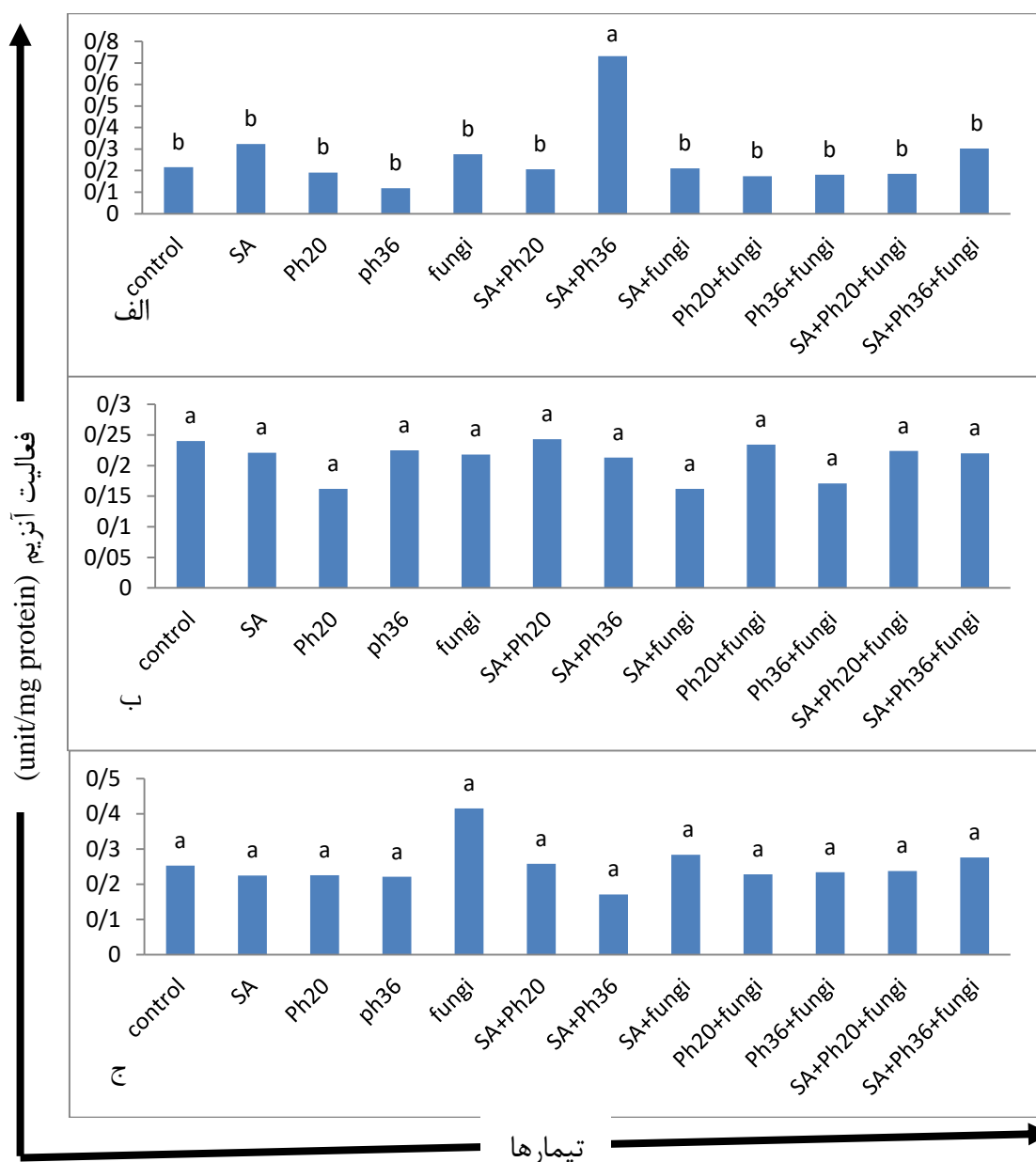
شکل ۴-۱۵ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان رقم مقاوم خسیب. الف: روز سوم، ب: روز هفتم، ج: روز دهم. میانگین‌ها حاصل سه تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است. زمان‌های متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری شده‌اند.

اختصارات شکل: C: کنترل، sa: سالیسیلیک اسید، ph20، فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، ph36، فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار، fungi: قارچ.

۳-۷-۴ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم PAL در گیاهان رقم حساس

نگین

با مقایسه‌ی میانگین داده‌ها در روز سوم مشخص شد که فعالیت آنزیم PAL در گیاهان رقم حساس نگین تنها در اثر تیمار توأم سالیسیلیک اسید با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار افزایش معناداری نسبت به شاهد داشته است به طوری که فعالیت آنزیم PAL در این گیاهان ۳/۳ برابر از گیاهان شاهد بیشتر بوده است (شکل ۴-۱۶ الف). این در حالی است فعالیت آنزیم در روزهای هفتم و دهم در اثر هیچ کدام از تیمارها افزایش یا کاهش معناداری را نسبت به شاهد نشان نداده است (شکل ۴-۱۶ ب و ج).



شکل ۴-۱۶ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم PAL در گیاهان رقم حساس نگین. الف: روز سوم، ب: روز هفتم، ج: روز دهم. میانگین‌ها حاصل سه تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است. زمان‌های متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری شده‌اند.

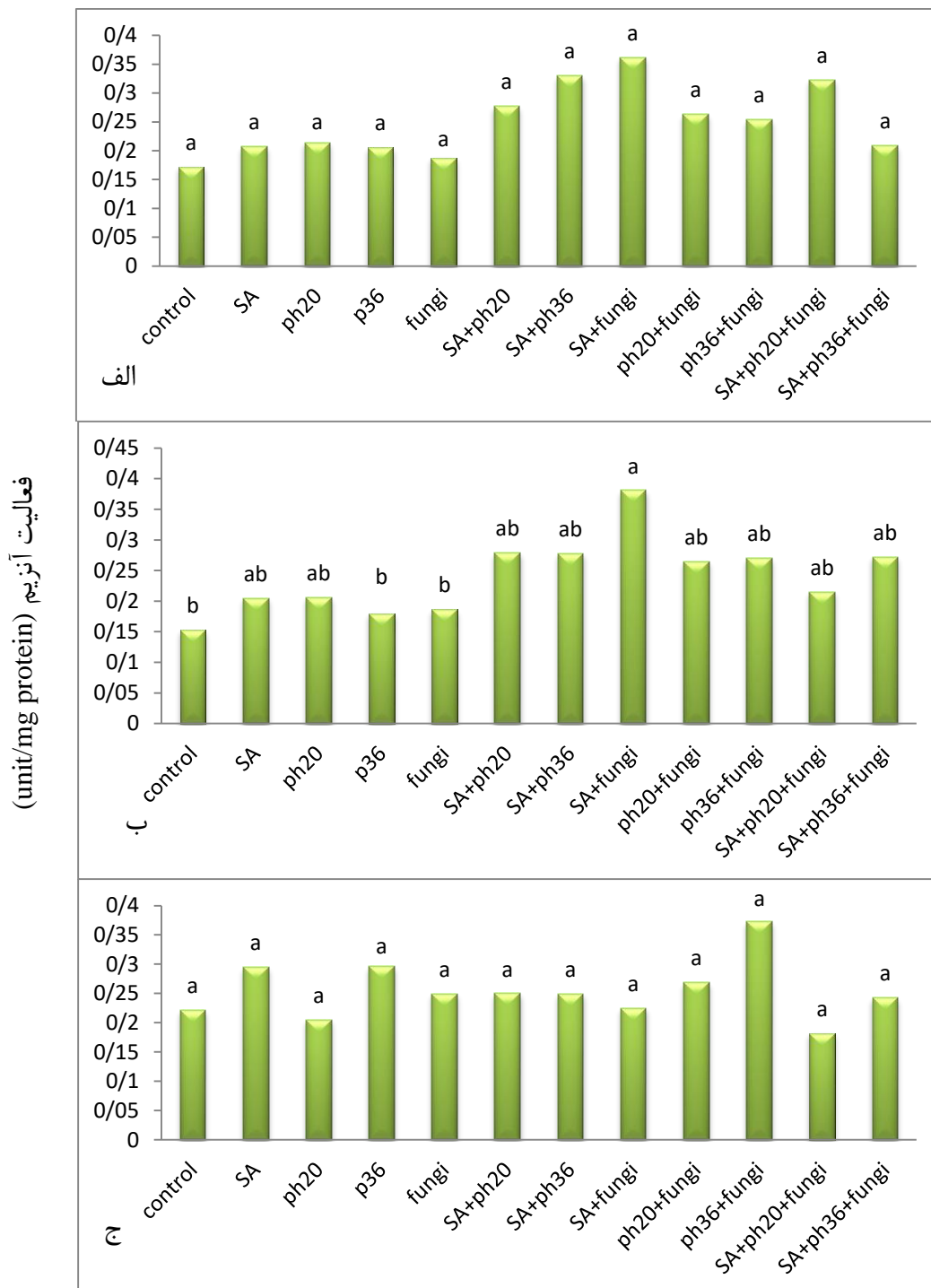
اختصارات شکل: C: کنترل، sa: سالیسیلیک اسید، ph20، فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، ph36، فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار، fungi: قارچ.

۴-۷-۴ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم PAL در گیاهان رقم مقاوم

خسیب

با بررسی فعالیت آنزیم PAL در رقم خسیب مشخص شد که در روز سوم، هیچ‌کدام از گیاهان تیمار شده تغییر معناداری را نسبت به شاهد نشان نداده‌اند (شکل ۴-۱۷ الف)، درحالی‌که در روز هفتم تیمارهای مختلف، تغییر معناداری را در فعالیت آنزیم باعث شده‌اند. در روز هفتم گیاهان پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید بیشترین میزان فعالیت آنزیم را نسبت به شاهد نشان داده‌اند (۲/۴ برابر بیشتر از گیاهان شاهد). گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار و همچنین گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ نیز در روز هفتم تغییر معناداری را نسبت به گیاهان شاهد نشان ندادند (شکل ۴-۱۷ ب).

با مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیم PAL در روز دهم مشخص شد که هیچ‌کدام از تیمارها باعث تغییر معناداری در فعالیت آنزیم نسبت به گیاهان شاهد نشده است (شکل ۴-۱۷ ج).



تیمارها →

شکل ۴-۱۷ بررسی تغییرات فعالیت آنزیم PAL در گیاهان رقم مقاوم خسیب. الف: روز سوم، ب: روز هفتم، ج: روز دهم. میانگین‌ها حاصل سه تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است. زمان‌های متفاوت به‌طور مجزا مقایسه و حروف گذاری شده‌اند.

اختصارات شکل: C: کنترل، sa: سالیسیلیک اسید، ph20، فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، ph36، فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار، fungi: قارچ.

۴-۸ بحث

گیاهان در محیط زیست خود همواره با تنش‌های زیستی مختلفی مانند حشرات و بیمارگرها مواجه می‌شوند. سیستم‌های دفاعی چندلایه برای مقابله با این تنش‌ها در گیاهان به وجود آمده است. گیاهان با استفاده از سازوکارهای ساختاری و قابل القا در برابر بیمارگرها از خود دفاع می‌کنند. سازوکارهای ساختاری شامل پوششی ضخیمی از کوتیکول است که از دسترسی بیمارگرها به سلول‌های زنده ممانعت می‌کند و متابولیت‌های ثانویه که از رشد بیمارگرها ممانعت می‌کند. سازوکار-های قابل القا با شناسایی الگوهای مولکولی وابسته به بیمارگر^۱ توسط گیرنده‌های شناسایی الگو^۲ آغاز می‌شود. پس از آن آبشار کینازی در سلول ایجاد می‌شود که در نهایت به برنامه‌ریزی مجدد رونویسی از ژن‌ها^۳ منجر می‌شود (Boller and Felix 2009).

بیمارگرهای بیوتروف، در بافت‌های زنده گیاهی، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره را تولید می‌کند و پس از آن با استفاده از هیف‌های خود مواد غذایی را جذب می‌کند. گیاهان پس از شناسایی بیمارگرهای بیوتروف توسط ژن‌های مقاومت، مسیر پیام‌رسانی سالیسیلیک اسید را فعال می‌کنند که نتیجه آن ایجاد پاسخ فوق حساسیت و مرگ سلول‌ها است تا از پیش روی بیمارگر جلوگیری شود (Jones and Dangl 2006). استفاده از مهندسی ژنتیک یکی از روش‌های کارآمد جهت تولید گیاهان مقاوم به بیمارگرها می‌باشد. در این میان ژن‌های مقاومت به‌خصوص ژن‌های سنتزکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (prs) بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند که می‌توان از آن‌ها در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به عوامل تنش‌زا استفاده کرد. پروتئین‌های PR تولیدشده توسط این دسته از ژن‌ها، موجب تخریب دیواره‌های سلول قارچی، ایجاد اختلال در غشاهای سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماری‌زایی و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می‌شوند. بیان این پروتئین‌ها در گیاه در برابر بیمارگرهای مختلف به‌صورت اختصاصی انجام می‌شود (Thomma *et al.* 1998). تاکنون ۱۷ خانواده از ژن‌های pr شناسایی شده است. مطالعات بسیاری pr1 را به‌عنوان ژن شاخص مسیر پیام‌رسانی وابسته به سالیسیلیک اسید معرفی کرده‌اند (Eshraghi *et al.* 2011; Betsuyaku *et al.* 2017).

بیمارگر فوزاریوم سولانی یک بیمارگر همی بیوتروف است که بسته به شرایط محیطی ممکن است رفتار بیوتروف یا نکروتروف از خود نشان دهد. در بررسی حاضر، در گیاهان حساس و مقاوم تیمار شده با سالیسیلیک اسید، بیان ژن pr1 افزایش قابل توجهی نشان نداد. پیش تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید باعث افزایش بیان ژن pr1 در رقم حساس نگین شد. سالیسیلیک اسید خاصیت ضد قارچی ندارد بلکه باعث فعال شدن مسیرهای دفاعی و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌شود (Durrant

۱ Pathogen-associated molecular patterns

۲ Pattern recognition receptors

۳ transcriptome reprogramming

and Dong 2004). ضغیمی نژاد و سیرچی با بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر بیان ژن *pr1* در پاتوسیستم *Podosphaera xanthi* - گیاه کدو بیان کردند که حداکثر بیان ژن مورد نظر در ۲۴ تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ مشاهده می‌شود (ضغیمی نژاد و سیرچی ۱۳۹۲). همچنین حکمتی و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی برهمکنش بین گیاه برنج و بیمارگر عامل بلاست گزارش کردند که بیان ژن *pr1* تنها در رقم مقاوم (خزر) در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار افزایش پیدا می‌کند در حالی که رقم حساس (هاشمی) افزایش بیان قابل توجهی را نشان نمی‌دهد. در گیاهان توتون پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید بیان ژن *pr1*، ۴۸ ساعت پس از مواجهه با بیمارگر بیوتروف *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* به صورت قابل توجهی افزایش یافت (فرج‌اللهی و همکاران ۱۳۹۷).

تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن نشان داد که تیمار گیاهان با فسفیت پتاسیم تأثیر قابل توجهی بر بیان ژن *pr1* دارد. در رقم مقاوم خسیب، سه روز پس از تیمار با فسفیت پتاسیم ۲۰ و ۳۶ میلی مولار، بیان ژن بیش از ده برابر افزایش یافت، در حالی که در رقم حساس نگین فقط فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار باعث افزایش بیان اندکی در روز سوم شد. پس از آن در روزهای هفتم و دهم میزان بیان ژن در گیاهان هر دو رقم کاهش یافت. افزایش بیان ژن *pr1* در اثر تیمار فسفیت پتاسیم بیانگر تأثیر مثبت این ماده در فعال کردن سیستم دفاعی گیاه برای مقابله با بیمارگرها است. در این تحقیق تیمار توأم فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار و سالیسیلیک اسید فقط در رقم حساس نگین، ده روز پس از مایه‌زنی باعث افزایش میزان بیان ژن شد. پیش تیمار گیاهان رقم مقاوم خسیب با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار و سپس مایه‌زنی گیاه با بیمارگر بیشترین تأثیر را بر بیان ژن *pr1* در بین همه‌ی تیمارها و زمان‌های نمونه‌گیری داشت. این نتیجه با نتایج اشراقی و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی دارد. در مطالعه‌ی آن‌ها، پیش تیمار گیاهان آرابیدوپسیس با فسفیت پتاسیم و سپس مایه‌زنی با بیمارگر *Phytophthora cinnamomi* با افزایش چشمگیر بیان ژن *pr1* در روز سوم همراه بود (Eshraghi et al. 2011). همچنین مطالعات نشان داده است که فسفیت پتاسیم علاوه بر فعال کردن سیستم‌های دفاعی در گیاه، خود اثر ضد قارچی دارد. لاندسکوت (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 (Landschoot 2005).

بر اساس مطالعات انجام‌شده، PAL آنزیم اولیه در مسیر فنیل پروپانوئید است که با حذف آمونیاک منجر به تبدیل فنیل آلانین به اسید ترانس-سینامیک می‌شود. PAL در فعالیت متابولیکی بسیاری از گیاهان نقش دارد و آنزیم کلیدی در سنتز چندین ترکیب ثانویه مرتبط با دفاع، مانند فنول‌ها و لیگنین است (Hemm et al. 2004). در بررسی حاضر با تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن *pal* در رقم حساس نگین مشخص شد که پیش تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید می‌تواند سطح رونوشت‌های ژن را در مقایسه با گیاهانی که تنها با قارچ مایه‌زنی شده‌اند در روز سوم، هفتم و دهم افزایش دهد. به صورت مشابه نتایج نشان داد که پیش تیمار با فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار و همچنین پیش تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، موجب افزایش بیان ژن *pal* در مقایسه

با گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ شد. با مقایسه‌ی داده‌های بیان ژن در گیاهان رقم مقاوم خسیب مشخص شد که مایه‌زنی با قارچ باعث افزایش قابل‌توجه بیان ژن pal در روز دهم پس از مایه‌زنی می‌شود، این در حالی است که پیش تیمار با سالیسیلیک اسید و همچنین فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، بیان ژن را در روزهای سوم و هفتم پس از مایه‌زنی در مقایسه با گیاهانی که تنها با قارچ مایه‌زنی شده‌اند افزایش می‌دهند، اما در روز دهم باعث کاهش آن می‌شوند. با توجه به نتایج، سالیسیلیک اسید در القای بیان ژن pal بعد از مواجهه با بیمارگر مؤثر می‌باشد. این نتیجه با نتیجه‌ی تحقیق عبدخانی و همکاران (۱۳۹۳) بر روی بررسی بیان ژن pal گیاه ریحان در اثر تیمار سالیسیلیک اسید همخوانی دارد. سطح بالای بیان ژن pal در گیاهان شاهد در روزهای سوم و هفتم در رقم حساس در مقایسه با رقم مقاوم با نتیجه‌ی بررسی مظاهری لقب و همکاران (۱۳۹۷) هم‌خوانی نداشت. آن‌ها سطح بالای بیان ژن pal در گیاهان ذرت رقم مقاوم نسبت به رقم ذرت حساس را گزارش کردند. علاوه بر این برخلاف نتایج تحقیق حاضر، در بررسی آن‌ها مشخص شد که ژن pal پس از زمان صفر، ابتدا در رقم حساس بیشتر از رقم مقاوم بیان می‌شود اما در نهایت در سطح پایین‌تری نسبت به گیاهان رقم مقاوم قرار می‌گیرد. این نتایج متناقض می‌تواند ناشی از اختلاف بیمارگر و همچنین اختلاف میزبان باشد.

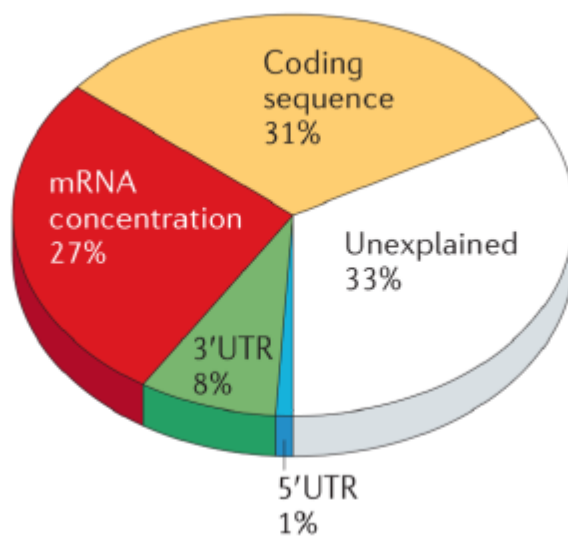
در مطالعات مختلف که تاکنون انجام شده، ژن pr-1 به‌عنوان نشانگر برای مسیر پیام‌رسانی وابسته به سالیسیلیک اسید و یا مقاومت اکتسابی عمومی گزارش شده است. همچنین بسیاری از مطالعات نشان داده که فعالیت ژن pal در گیاهانی که با بیمارگر مواجه هستند افزایش می‌یابد. ژن pal اولین و کلیدی‌ترین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئیدی است که منجر به بیوسنتز فیتوالکسین‌ها، پیش‌سازهای لیگنین و ترکیبات فنولی می‌شود. آنزیم PAL یکی از دو مسیر مرتبط با سنتز سالیسیلیک اسید را کاتالیز می‌کند (Vlot et al. 2009) و با توجه به ارتباط ژن pr-1 و مسیر پیام‌رسانی وابسته به سالیسیلیک اسید، انتظار می‌رود این دو ژن در اثر مایه‌زنی گیاهان با بیمارگر بیوتروف افزایش بیان را نشان دهند.

نتایج این تحقیق نشان داد که ژن pr-1 در گیاهان شاهد رقم خسیب در مقایسه با گیاهان شاهد رقم نگین بیان بالاتری دارد، این در حالی است که ژن pal در گیاهان شاهد هر دو رقم در روز سوم بیان برابری داشت و پس از آن در روز هفتم در رقم نگین و در روز دهم در رقم خسیب بیان بالاتری را نشان داد. ژن pr-1 در اثر مایه‌زنی گیاهان رقم نگین با قارچ در روز سوم و هفتم افزایش بیان داشت اما در روز دهم کاهش یافت و به میزان بیان در گیاه شاهد رسید. اما برخلاف این مشاهده، رقم مقاوم خسیب در روز سوم و هفتم پس از مایه‌زنی، کاهش بیان و در روز دهم افزایش بیان را نسبت به شاهد نشان داد. ژن pal در رقم حساس نگین در روزهای سوم و هفتم و دهم پس از مایه‌زنی با قارچ نسبت به گیاهان شاهد کاهش بیان داشت، درحالی‌که در رقم خسیب در روز سوم نسبت به شاهد کاهش یافته و به تدریج در روز هفتم اندکی نسبت به شاهد بیشتر شده و نهایتاً در روز دهم افزایش بیان قابل‌توجهی را نسبت به شاهد نشان داده است. افزایش بیان ژن pr-1 از روز سوم تا دهم پس از

مایه‌زنی گیاهان رقم خسیب نسبت به شاهد مشاهده شد و به‌صورت هماهنگ ژن pal نیز در این بازه-ی زمانی افزایش بیان داشت. بنابراین، افزایش بیان pr-1 می‌تواند در اثر افزایش سالیسیلیک اسید سنتر شده در اثر افزایش فعالیت ژن pal باشد.

تنش‌های مختلف محیطی شامل تنش‌های زنده و غیر زنده سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند. رادیکال‌های هیدروکسیلی که عامل وقوع تنش اکسیداتیو هستند، به‌وسیله فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کنترل می‌شوند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن از طریق واکنش‌های پیچیده ایفا می‌کنند. این واکنش‌ها شامل تبدیل اکسیژن مولکولی به پراکسید هیدروژن توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و سمیت زدایی پراکسید هیدروژن به‌وسیله آنزیم‌های متعددی از جمله پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گلوکاتایون ردوکتاز است (Azevedo Neto et al. 2006). با بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز مشخص شد که تیمار سالیسیلیک اسید تأثیر قابل‌توجهی بر میزان فعالیت این آنزیم در رقم حساس نگین نداشته است، درحالی‌که در رقم مقاوم خسیب افزایش قابل‌توجهی را در روز سوم باعث شده است. در گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار، فعالیت آنزیم در روز سوم افزایش قابل‌توجهی را در رقم نگین نشان داد. در تحقیقی مشخص شد که پیش تیمار گیاهان خیار با فسفیت پتاسیم و سپس مایه‌زنی با بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Radicis-cucumerinum* باعث افزایش چشمگیر فعالیت آنزیم کاتالاز در روز پنجم می‌شود (حیدرزاده و همکاران ۱۳۹۶). در بررسی حاضر مشاهده شد سه روز پس از مایه‌زنی قارچ، فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم خسیب افزایش چشمگیری پیدا می‌کند، درحالی‌که در رقم حساس نگین تأثیر کمتری مشاهده شد. این یافته با نتیجه‌ی تحقیق خاکساری و همکاران (۱۳۹۶) همخوانی ندارد زیرا در بین سه رقم مرکبات، تنها رقم حساس لیموترش لایم کوآت در مواجهه با بیمارگر بیوتروف *Pseudomonas syringae* افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز را نشان داد. اختلاف در نتایج این تحقیق و تحقیقات گذشته می‌تواند ناشی از اختلاف گیاه میزبان و بیمارگر نیز باشد.

فعالیت آنزیم PAL در رقم حساس نگین در اثر تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم ۳۶ میلی مولار در روز سوم افزایش معناداری را نشان داد، اما دیگر تیمارها تأثیر معناداری بر فعالیت این آنزیم نداشت. در رقم مقاوم فعالیت آنزیم در روز هفتم اختلاف معناداری را در بین تیمارهای مختلف نشان داد. با توجه به نتایج مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیمی در روز هفتم مشخص شد که تیمار سالیسیلیک اسید و همچنین تیمار فسفیت پتاسیم ۲۰ میلی مولار و تیمار توأم سالیسیلیک اسید و فسفیت پتاسیم منجر به افزایش معنادار فعالیت آنزیم شده است. همچنین در اثر مایه‌زنی با قارچ، فعالیت آنزیم در روز هفتم افزایش داشت و این افزایش فعالیت در پیش تیمار سالیسیلیک اسید به اوج خود رسید. در بررسی‌های گذشته مشخص شده است که سالیسیلیک اسید باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL در روزهای سوم، هفتم و دهم پس از آلودگی گیاه کدو با بیمارگر *Podosphaera fuliginea* می‌شود (ضغیمی‌نژاد و سیرچی ۲۰۱۳). همچنین در اثر آلودگی گیاه کنجد با بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *Sesame* فعالیت آنزیم PAL در روزهای نمونه‌برداری دو، چهار، شش،



شکل ۴-۱۹ ارتباط بین mRNA و فراوانی پروتئین‌ها در سلول‌های انسانی. (Vogel and Marcotte, 2012)

فصل ٥ : منابع

آشنگرف م (۱۳۹۱) "جداسازی و شناسایی سویه بومی قارچی *Aspergillus niger ZRS14* با قابلیت تحمل پذیری بالا به یون روی و کاربرد سوپرناتانت آن در سنتز خارج سلولی نانو ذره اکسید روی." زیست‌شناسی میکروارگانیسم ها ۲(۷): ۲۹-۴۴.

اقبال ف. بابای اهری ا. ارزنلو م (۱۳۹۶) "شناسایی و بررسی بیماری‌زایی گونه‌های قارچی همراه با بیماری لکه برگ *Cucumis sativus L*. خیار در استان آذربایجان شرقی". پژوهش‌های کاربردی در گیاهپزشکی ۶(۱): ۱-۱۳.

فلاح پوری ا. امینیان ح. صاحبانی ن. اسمعیل زاده ع (۱۳۹۲) "ارزیابی مقاومت ۲۰ ژرم پلاسما کنگد نسبت به بوته میری فوزاریومی با عامل *Fusarium oxysporum f. Sp. Sesami* در استان یزد و بررسی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) در ژرم پلاسما های مقاوم و حساس به این بیماری." بیماری‌های گیاهی ۴۹(۴).

تیموری س. رهنما ک. حاجیان شهری م. افضلی ح (۱۳۹۲) "شناسایی، پراکنش و بیماری‌زایی گونه‌های قارچ فوزاریوم جدا شده از ریشه و طوقه ی طالبی و خریزه در استان خراسان رضوی." دو فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی ۱(۴): ۳۵-۴۶.

حیدرزاده س. قرنچیک ش. دهستانی د. شهریار د (۱۳۹۶) "بررسی تغییرات آنزیمی و بیوشیمیایی در گیاه خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم در شرایط تنش قارچ *Fusarium oxysporum f. Sp. Radicis-cucumerinum*" علوم باغبانی ایران ۴۸(۳): ۶۰۱-۶۱۱.

حکمتی ژ، اعلمی ع و سوهانی م (۱۳۹۳) "بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر الگوی بیان برخی از ژن‌های مرتبط با سازوکارهای دفاعی در برنج." ژنتیک نوین ۹(۳): ۳۶۳-۳۷۲.

خاکساری م. بابایی زاد و. رحیمیان ح. بیگی ف (۱۳۹۶) "بررسی بیان نسبی ژن پراکسیداز و فعالیت آنزیمی در سه گونه و رقم مرکبات در برابر باکتری عامل بلاست مرکبات *Pseudomonas syringae pv. Syringae*" مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۹(۳): ۴۱-۶۰.

صباغ ک، صباغ ا، آبخوج، مصطفوی ف (۱۳۹۴) "تأثیر کیتوزان بر القاء مقاومت سیستمیک در خیار به بوته میری ناشی از *Pythium aphanidermatum*." مطالعات حفاظت گیاهان ۳۰(۲): ۲۱۹-۲۲۹.

ضغیمی نژاد ر. سیرچی غ، (۱۳۹۲). "بررسی بیان ژن‌های مرتبط به بیمارگر و فعالیت آنزیم‌های مؤثر در القای مقاومت به سفیدک پودری کدو توسط اسید سالیسیلیک." مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۵(۱): ۹۷-۱۱۰.

مظاهری لقب ح. سلطانلو ح. مساوات ا (۱۳۹۷) "تجمع رونوشت ژن‌های PAL و PR-1 قبل از مواجهه با آلودگی پوسیدگی بلال در ذرت، عاملی مؤثر در مقاومت به قارچ فوزاریوم." مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۲): ۱۴۵-۱۶۴.

عبدخانی س. سلوکی م. شیری ی (۱۳۹۳) "تأثیر هورمون‌های اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن فنیل‌آلانین‌آمونیلایز (PAL) در مراحل مختلف رشد. *Ocimum basilicum L*" فصلنامه علمی - پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی ۴(۸): ۲۱-۳۰.

عراقی ز. رهنما ک. ممرآبادی م. امتی ف (۱۳۹۲) "شناسایی و بیماری‌زایی عوامل قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه برخی گیاهان جالیزی در منطقه شاهرود." تحقیقات بیماری‌های گیاهی ۲. ۲(۲): ۱-۱۲
 عظیمی ص. فرخی نژاد ر. موسوی جرف ع (۱۳۸۴) "شناسایی و بررسی بیماری‌زایی فوزاریوم‌های همراه با طوقه و ریشه باقلا در استان خوزستان." گیاه پزشکی. ۲۸(۱): ۱۴۹-۱۶۲
 عزیزاده ح. سالاری خ (۱۳۹۳) "القای مقاومت توسط بتا آمینوبوتریک اسید (BABA) علیه بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه خیار." دانش گیاهپزشکی ایران ۴۵(۲): ۲۹۹-۳۰۷
 فرج اللهی ف. بابایی‌زاد و. رحیمیان ح (۱۳۹۷) "القای بیان چند ژن مرتبط با بیماری‌زایی در گیاه توتون تیمار شده با هورمون‌های اسید سالیسیلیک و جاسمونیک اسید به دنبال آلودگی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*" مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۹(۴): ۱۲۹-۱۵۰.
 کشاورز م. کربلایی نیا م. توکلی ا. کیوانی ح. کچویی محقق‌ی یعقوبی ع (۱۳۹۶) "مروری بر انواع روش‌های Real-time PCR و بهینه‌سازی آن." مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین ۲۱(۳): ۷۶-۹۱

مولوی ا. امینیان ح. اعتباریان ح. شهریاری د. (۱۳۸۸) "بررسی مقاومت ارقام خیار گلخانه ای به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه (*Fusarium oxysporum* f. *Sp. Radicis-cucumerinum*)." کشاورزی ۱۱(۱): ۱۷۷-۱۸۹.

Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., Sen, R. (2010). "The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives." *New Phytologist* **186**(2): 281-285.

Abbasi, P. And G. Lazarovits. (2005). "Effects of AG3 phosphonate formulations on incidence and severity of Pythium damping-off of cucumber seedlings under growth room, microplot, and field conditions." *Canadian journal of plant pathology* **27**(3): 420-429.

Abo-Elyousr, K. A., Hussein, M. A. M., Allam, A. D. A., Hassan, M. H. (2009). "Salicylic acid induced systemic resistance on onion plants against *Stemphylium vesicarium*." *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **42**(11): 1042-1050.

Aebi, H. (1984). *Catalase in vitro. Methods in enzymology*, Elsevier. **105**: 121-126.

Alymanesh, M., Falahati, R. M., Jafarpour, B., Mahdikhanimoghadam, e. (2007). "Identification of *Fusarium Solani* f. *Sp. Cucurbitae* race 1 on cucurbit plants from khorasan razavi, northern khorasan and some regions of fars provinces, using classic and molecular methods." *Agricultural Sciences and Technology* **21**(1): 49-56.

An, C. And Z. Mou. (2011). "Salicylic acid and its function in plant immunity." *Journal of integrative plant biology* **53**(6): 412-428.

Arif, M., Chawla, S., Zaidi, M. W., Rayar, J. K., Variar, M., Singh, U. S. (2012). "Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. Solani* using rdna sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene." *African Journal of Biotechnology* **11**(2): 444-447.

- Armengol, J., Jose, C. M., Moya, M. J., Sales, R., Vicent, A., García-Jiménez, J. (2000). "*Fusarium solani* f. Sp. *Cucurbitae* race 1, a potential pathogen of grafted watermelon production in Spain." *Eppo Bulletin* **30**(2): 179-183.
- Asaka, O. And M. Shoda. (1996). "Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14." *Applied and environmental microbiology* **62**(11): 4081-4085.
- Barchietto, T., Saindrenan, P., Bompeix, G. (1992). "Physiological responses of *Phytophthora citrophthora* to a subinhibitory concentration of phosphonate." *Pesticide Biochemistry and Physiology* **42**(2): 151-166.
- Betsuyaku, S., Katou, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Nomura, N., Fukuda, H. (2017). "Salicylic acid and jasmonic acid pathways are activated in spatially different domains around the infection site during effector-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*." *Plant and Cell Physiology* **59**(1): 8-16.
- Boller, T. And G. Felix. (2009). "A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors." *Annual review of plant biology* **60**: 379-406.
- Bourbos, V. A., Skoudridakis, M. T., Darakis, G. A., & Koulizakis, M. (1997). Calcium cyanamide and soil solarization for the control of *Fusarium solani* f. Sp. *Cucurbitae* in greenhouse cucumber. *Crop Protection*, **16**(4), 383-386.
- Campbell, M. M. And B. E. Ellis. (1992). "Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: III. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase." *Plant physiology* **98**(1): 62-70.
- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K. R. N., Abbasi, S. (2011) "Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran." *Saudi journal of biological sciences* **18**(4): 341-351.
- Chester, K. S. (1933). "The problem of acquired physiological immunity in plants." *The Quarterly Review of Biology* **8**(3): 275-324.
- Cook, P. J., Landschoot, P. J., Schlossberg, M. J. (2009). "Inhibition of *Pythium* spp. And suppression of *Pythium* blight of turfgrasses with phosphonate fungicides." *Plant disease* **93**(8): 809-814.
- Cooke, L. R., Little, G. (2002). The effect of foliar application of phosphonate formulations on the susceptibility of potato tubers to late blight. *Pest Management Science*, **58**(1), 17-25.
- Cools, H. And H. Ishii. (2002). "Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**(5): 273-280.
- Dahleen, L. S., Okubara, P. A., Blechl, A. E. (2001). "Transgenic approaches to combat *Fusarium* head blight in wheat and barley." *Crop Science* **41**(3): 628-637.
- De Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C. E. B., Gomes-Filho, E. (2006). "Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation

- in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes." *Environmental and Experimental Botany* **56**(1): 87-94.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Ryals, J. (1994). "A central role of salicylic acid in plant disease resistance." *Science* **266**(5188): 1247-1250.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S., Wang, L.(2002). "The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective." *Molecular plant pathology* **3**(5): 371-390.
- Doidge, E. (1937). "Some South African Fusaria." *Bothalia* **3**(2): 331-482.
- Durrant, W. E. And X. Dong. (2004). "Systemic acquired resistance." *Annual Review of Phytopathology*. **42**: 185-209.
- Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., mcombc, J., Hardy, G. S., o'brien, P. A. (2011). "Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*." *Plant Pathology* **60**(6): 1086-1095.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ryals, J. (1993). "Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance." *Science* **261**(5122): 754-756.
- Gianessi, L., & Reigner, N. (2006). The importance of fungicides in US crop production. *Outlooks on Pest Management*, **17**(5), 209.
- Glazebrook, J. (2005). "Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens." *Annual Review of Phytopathology*. **43**: 205-227.
- Gräser, Y., Scott, J., Summerbell, R.. (2008). "The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach." *Mycopathologia* **166**(5-6): 239.
- Griffith, J. M., Smillie, R. H., & Grant, B. R. (1990). "Alterations in nucleotide and pyrophosphate levels in *Phytophthora plamivora* following exposure to the antifungal agent potassium phosphonate (phosphite)." *Microbiology* **136**(7): 1285-1291.
- Gutjahr, C. And U. Paszkowski. (2009). "Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**(7): 763-772.
- Hawthorne, B. T., Ball, R. D., Rees-George, J. (1994). "Genetic analysis of variation of pathogenicity in *Nectria haematococca* (*Fusarium solani*) on *Cucurbita* sp." *Mycological Research* **98**(10): 1183-1191.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996). "Real time quantitative PCR." *Genome research* **6**(10): 986-994.
- Hemm, M. R., Rider, S. D., Ogas, J., Murry, D. J., Chapple, C. (2004). "Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots." *The Plant Journal* **38**(5): 765-778.

- Hirai, A., Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., Hasegawa, A. (2003) "Molecular taxonomy of dermatophytes and related fungi by chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences." *Antonie Van Leeuwenhoek* **83**(1): 11-20.
- Hussain, M. S., Fareed, S., Saba Ansari, M., Rahman, A., Ahmad, I. Z., & Saeed, M. (2012). "Current approaches toward production of secondary plant metabolites." *Journal of pharmacy & bioallied sciences* **4**(1): 10.
- Iqbal, M. J., Yaegashi, S., Ahsan, R., Shopinski, K. L., Lightfoot, D. A. (2005). "Root response to *Fusarium solani* f. Sp. *Glycines*: temporal accumulation of transcripts in partially resistant and susceptible soybean." *Theoretical and Applied Genetics* **110**(8): 1429-1438.
- Iqbal, M. J., Majeed, M., Humayun, M., Lightfoot, D. A., Afzal, A. J. (2016). "Proteomic profiling and the predicted interactome of host proteins in compatible and incompatible interactions between soybean and *Fusarium virguliforme*." *Applied biochemistry and biotechnology* **180**(8): 1657-1674.
- Jarvis, A. P., Schaaf, O., Oldham, N. J. (2000). "3-Hydroxy-3-phenylpropanoic acid is an intermediate in the biosynthesis of benzoic acid and salicylic acid but benzaldehyde is not." *Planta* **212**(1): 119-126.
- Jia, H., Sun, W., Li, M., Zhang, Z. (2018). Integrated analysis of protein abundance, transcript level, and tissue diversity to reveal developmental regulation of maize. *Journal of proteome research*, *17*(2), 822-833.
- Jones, J. D. And J. L. Dangl (2006). "The plant immune system." *Nature* **444**(7117): 323.
- Juber, K. S. And S. N. Hussein. (2014). "First report of identification *Fusarium solani* f. Sp. *Cucurbitae* race 1 and 2 the causal agent of crown and root rot disease of watermelon in Iraq". *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. **3**(4):
- Kinjo, K., Matsuo, T., Tokashiki, I. (1989). "*Fusarium solani* f sp *cucurbitae* race 1 isolated from root stocks of withered balsam pear grafted on squash." *bulletin of the Agricultural Experiment Station of Nebraska* **13**: 95-98.
- Kogel, K. H. And G. Langen. (2005). "Induced disease resistance and gene expression in cereals." *Cellular Microbiology* **7**(11): 1555-1564.
- Kumar, D. (2014). "Salicylic acid signaling in disease resistance." *Plant Science* **228**: 127-134.
- Landschoot, P. (2005). "Sorting out the phosphonate products." *GCM* **73**: 73-77.
- Leslie, J. F. And B. A. Summerell. (2008). *The Fusarium laboratory manual*, John Wiley & Sons.
- Li, J., Brader, G., Palva, E. T. (2004). "The WRKY 70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense." *The Plant Cell* **16**(2): 319-331.

- Lillemo, M., Asalf, B., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Chen, X. M., He, Z. H., Bjørnstad, Å. (2008). "The adult plant rust resistance loci Lr34/Yr18 and Lr46/Yr29 are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar." *Theoretical and Applied Genetics* **116**(8): 1155-1166.
- Linthorst, Huub JM, and L. C. Van Loon. (1991) "Pathogenesis-related proteins of plants." *Critical reviews in plant sciences* **10** (2): 123-150.
- Livak, K. J. And T. D. Schmittgen. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method." *methods* **25**(4): 402-408.
- Lloyd, M., Solano, S., Counties, Y. "Fusarium Crown and Foot Rot of Squash and Pumpkin *Fusarium solani* f. Sp. *Cucurbitae* Race". *University of California*.
- Lodish, H., Darnell, J. E., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Matsudaira, P. (2008). *Molecular cell biology*. Macmillan.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., Raskin, I. (1990). "Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection." *Science* **250**(4983): 1002-1004.
- Matuo, T. And W. C. Snyder. (1973). "Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*." *Phytopathology* **63**(5): 562-565.
- Mehl, H. And L. Epstein. (2007). "Identification of *Fusarium solani* f. Sp. *Cucurbitae* race 1 and race 2 with PCR and production of disease-free pumpkin seeds." *Plant Disease* **91**(10): 1288-1292.
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Inverardi, B. (1990)." Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber." *Science* **250**(4983): 1004-1006.
- Nagao, H., Sato, K., Ogiwara, S. (1994). "Susceptibility of *Cucurbita* spp to the cucurbit root-rot fungus, *Fusarium solani* f sp *cucurbitae* race1" *Agronomie* **14**(2): 95-102.
- Navi, S. And X. Yang. (2005). Seedling inoculation screening technique to identify resistance to soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. Sp. *Glycines*. Proceedings of the Global Conference II on Plant Health—Global Wealth, Iowa State University
- Navi, S. S. And X.-B. Yang. (2005). "Seedling inoculation screening technique to identify resistance to *Fusarium solani* f. Sp. *Glycines* a causal agent of soybean sudden death syndrome". Proceedings of the Global Conference II on Plant Health—Global Wealth. Iowa State University
- Neergaard, P. (1945). "Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*." Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. CAB Direct
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Marasas, W. F. O. (1983). "Fusarium species: an illustrated manual for identification". The Pennsylvania state University press.
- O'Donnell, K. (2000). "Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*-*Fusarium solani* species complex." *Mycologia*. **92**(5): 919-938.

- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Casper, H. H. (1998). "Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*." *Fungal Genetics and Biology* **23**(1): 57-67.
- Ogawa, D., Nakajima, N., Sano, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Saji, H. (2005). "Salicylic acid accumulation under O₃ exposure is regulated by ethylene in tobacco plants." *Plant and cell physiology* **46**(7): 1062-1072.
- Olczak-Woltman, H., Marcinkowska, J., Niemirowicz-Szczytt K. (2011). "The genetic basis of resistance to downy mildew in *Cucumis* spp.—latest developments and prospects." *Journal of applied genetics* **52**(3): 249-255.
- Oñate-Sánchez, L. And J. Vicente-Carbajosa. (2008). "DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana* ,including seeds and siliques." *BMC research notes* **1**(1): 93.
- Oren, Y. And E. Yogev. (2002). "Acquired resistance to Phytophthora root rot and brown rot in citrus seedlings induced by potassium phosphite. *Journal of Plant Diseases and Protection*: 109: 279-285.
- Pandey, D., Rajendran, S. R. C. K., Gaur, M., Sajeesh, P. K., Kumar, A. (2016). "Plant defense signaling and responses against necrotrophic fungal pathogens." *Journal of plant growth regulation* **35**(4): 1159-1174.
- Panicker, S. And K. Gangadharan. (1999). "Controlling downy mildew of maize caused by *Peronosclerospora sorghi* by foliar sprays of phosphonic acid compounds." *Crop Protection* **18**(2): 115-118.
- Paulus, A. O., Brendler, R. A., Nelson, J., Whitaker, T., Hall, B. J. (1976). "Fungicides for control of cucurbit powdery mildew." *California Agriculture* **30**: 8-13
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S. C. (2012). "Hormonal modulation of plant immunity " *Annual review of cell and developmental biology* **28**: 489-521
- Pivonia, S., Cohen, R., Kafkafi, U., Ze'ev, I. B., Katan, J. (1997). "Sudden wilt of melons in southern Israel: fungal agents and relationship with plant development." *Plant Disease* **81**(11): 1264-1268.
- Pscheidt, J. (1986). "Epidemiology and control of Potato early blight, caused by *Alternaria Solani* (forecasting, *solanum tuberosum* L., fungicide timing, spore trapping. Ph. D. Dissertation. University of Wisconsin.
- Qin, G. Z., Tian, S. P., Xu, Y., Wan, Y. K. (2003). "Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**(3): 147-154.
- Rajput, N. A., Pathan, M. A., Jiskani, M. M., Rajput, A. Q., Arain, R. R. (2008). "Pathogenicity and host range of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., causing dieback of Shisham (*Dalbergia sissoo* Roxb.)." *Pakistan Journal of Botany* **40**(6): 2631-2639.
- Ramezani, M., Rahmani, F., Dehestani, A. (2017). "The effect of potassium phosphite on PR genes expression and the phenylpropanoid pathway in cucumber (*Cucumis sativus*) plants inoculated with *Pseudoperonospora cubensis*." *Scientia Horticulturae* **225**: 366-372.

- Raskin, I. (1992). "Role of salicylic acid in plants." *Annual review of plant biology* **43**(1): 439-463.
- Rebrikov, D. V., and D. Yu Trofimov. (2006) "Real-time PCR: a review of approaches to data analysis." *Applied biochemistry and microbiology* **42**(5): 455-463.
- Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H., Makimura, K., de Hoog, G. S., Satoh, K., Najafzadeh, M. J., Shidfar, M. R. (2014). "Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes." *Medical mycology* **52**(7): 674-688.
- Ribnicky, D. M., Shulaev, V., Raskin, I. (1998). "Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco." *Plant Physiology* **118**(2): 565-572.
- Safaei, N., Alizadeh, A. A., Saeidi, A., Adam, G., Rahimian A. (2005). "Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat headblight". *Iranian Journal of Plant Pathology*. **41**(2): 171-182.
- Schmittgen, T. D. And K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method." *Nature protocols* **3**(6): 1101.
- Seifert ,K. A. And C. A. Lévesque. (2004). *Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi*, Springer: 449-471.
- Sinclair, J. B. And O. D. Dhingra. (2017). *Basic plant pathology methods*, CRC press.
- Snyder, W. C. And H. Hansen. (1941). "The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*." *American Journal of Botany* **28**(9): 738-742.
- Speiser, B., Berner, A., Häseli, A., Tamm, L. (2000). "Control of downy mildew of grapevine with potassium phosphonate: effectivity and phosphonate residues in wine." *Biological agriculture & horticulture* **17**(4): 305-312.
- Stamatis, N., Hela, D. And Konstantinou, I. (2010). Occurrence and removal of fungicides in municipal sewage treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*, **175**: 829-835
- Stotz, H. U., Thomson, J., & Wang, Y. (2009). "Plant defensins: defense, development and application." *Plant signaling & behavior* **4**(11): 1010-1012.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. 3rd. *England*: Sinauer Associates.
- Thomma, B. P., Eggermont, K., Penninckx, I. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P., Broekaert, W. F. (1998). "Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(25): 15107-15111.
- Toussou, Synder. (1961). "The pathogenicity, distribution, and control of two races of *Fusarium* (*Hypomyces*) *solani* f. Sp. Cucurbitae." *Phytopathology* **51**: 17-22.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). "Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease." *Annual review of phytopathology* **47**: 177-206.
- Vogel, C., Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews genetics*, **13**(4), 227.

Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ryals, J. A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, **3**(10), 1085-1094.

Wong, Marisa L., and Juan F. (2005) "Real-time PCR for mrna quantitation." *Biotechniques* **39** (1): 75-85.

Zarei, A., Körbes, A. P., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A., Memelink, J. (2011). "Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1. 2 promoter in Arabidopsis." *Plant molecular biology* **75**(4-5): 321-331.

Zhao, P., Lu, G. H., Yang, Y. H. (2017). "Salicylic acid signaling and its role in responses to stresses in Plants." *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress 1*: 413-441.

Abstract

Fusarium solani f. Sp.*cucurbitae* is the causal agent of root, crown and fruit rot of Cucurbitaceae and was considered as an economic problem for growers in recent years. In this study, we aimed to isolate and identification of *Fusarium solani* f. Sp. *Cucurbitae* causes root, crown and fruit rot of Cucurbitaceae and study of the molecular and enzymatic response of susceptible (Negin) and resistance (Khasib) cultivars of cucumber to this pathogen. Result revealed that *F. Solani* f. Sp.*cucurbitae* is dominant species and race 1 is the dominant race in studied region. Analysis of gene expression data revealed that level of pr-1 expression in control plants of resistance cultivar is more than that of susceptible cultivar (123.5, 4.11 and seven times higher at 3, 7 and 10 dpi days respectively), whereas Phenylalanine ammonia-lyase (pal) gene was more up-regulated in susceptible cultivar than resistance cultivar (1.19, 64.15 and 1.14 times higher at 3, 7 and 10 dpi respectively). Ten days after inoculation of fungi, pr1 and pal were upregulated compared to control plants in Khasib cultivar (1.5 and 12.28 times higher for pal and pr1, respectively). Pretreatment of plants by salicylic acid causes increase in the level of pal and pr1 transcripts as compared to inoculated plant by fungi, so that in Khasib cultivar up-regulated dramatically three days after inoculation (22.12 times higher for pr1 and 53.66 times higher for pal) and in Negin cultivar they were up-regulated dramatically ten days after inoculation (53.5 times higher for pr1 and 173 times higher for pal). It is demonstrated that catalase activity was increased in Khasib and Negin, three and seven days after fungi inoculation (4.05 and four times higher in Khasin and 2.33 and 1.9 times higher in Negin as compared to control plants). The salicylic acid treatment causes increase in enzyme activity in Khasib cultivar especially at 3 dpi day (2.85 times higher than control plants) and phosphite potassium (20 mm) treatment increased catalase activity in Negin cultivar especially at 3 dpi (3.4 times higher than control plants). The activity of pal enzyme had no significant changes in Negin cultivar after treatments and inoculation of fungi, whereas it was activated significantly after some of treatments and inoculation of fungi only at 7 dpi especially with pretreatment of the plant by salicylic acid (2.49 times higher than control plants). Results revealed that salicylic acid (2 mm) and phosphite potassium (20 mm and 36 mm) increase defense genes expression and activity of the related enzyme to biotic stresses and subsequently increase resistance to *F. Solani* f. Sp. *Cucurbitae*.

Keywords: *Cucumis sativus*, Salicylic acid, phosphite potassium, gene expression, enzyme activity



**Shahrood University of
Technology**

Faculty of Agricultural Engineering

M.Sc Thesis in Agricultural biotechnology

Assessment the expression of resistance genes in cucumber treated with potassium phosphite and salicylic acid on the soil-born pathogens of cucumber root rot disease
(*Fusarium solani*)

By: Sadra Rezaee

Supervisors:
Dr. Shahrookh Gharanjik
Dr. Shideh Mojerlou

July 2019