

مقایسه میزان فنل کل و آنزیم پراکسیداز در دو رقم متحمل و حساس خیار سالم و مایه

زنی شده با دو سویه *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*

الهام مولوی^{۱*}، حشمت‌اله امینیان^۲، حسن رضا اعتباریان^۳، داریوش شهریاری^۴

*- نویسنده مسئول: دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران (emolavi@gmail.com)

۲- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۳- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۴- عضو هیئت علمی بخش بیماری‌های گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی ورامین، تهران

تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۲۰

چکیده

در بررسی واکنش مقاومت و حساسیت ۲۰ رقم مختلف خیار گلخانه‌ای در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*، ارقام 32-PV، Nasco، Janette، Sultan، Negeen، 100، Rubah-1، PSR 36-، PSR 36-، Jakie، Festival، حساس به بیماری و ارقام Rubah-s، PSR36-47112، 8-Ayat، CB- 61688222، Khassib، SR36-45664، FD-C101، Storm، 120118، Ayat، 45007 که رقم حساس Negeen و متحمل Festival جهت بررسی‌های بیوشیمیایی ترکیبات فنل کل و آنزیم پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهچه‌های هر دو رقم بعد از رشد در مخلوط پیت ماس و پرلیت سترون در مرحله حساس یک تا دو برگی به خاک سترون حاوی مخلوط ماسه و آرد ذرت آلوده به دو جدایه قارچ عامل بیماری و برای گیاهان شاهد حاوی مخلوط ماسه و آرد ذرت سترون بود انتقال داده شدند. نمونه برداری‌ها از قسمت طوقه و ریشه گیاهان در مراحل زمانی یک، سه، پنج، هفت و ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی انجام گرفت. بعد از استخراج ترکیبات فنلی و آنزیم پراکسیداز بر طبق روش‌های توصیه شده، و اندازه‌گیری تغییرات جذب نور این ترکیبات توسط اسپکتروفوتومتر مقدار و فعالیت این ترکیبات در میلی‌گرم بافت گیاه ارزیابی شد. بر اساس نتایج به دست آمده، تغییرات ترکیبات فنلی در طی روزهای مختلف در ارقام متحمل و حساس اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشت ولی فعالیت آنزیم پراکسیداز طی روزهای سه و پنج با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشت و در رقم متحمل آلوده به قارچ، میزان آنزیم بیشتر از رقم حساس بود.

کلید واژه‌ها: پراکسیداز، ترکیبات فنلی، خیار، *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*

مقاومت

مقدمه

ابتدا روی گیاهان حدوداً یک ماهه ظاهر شده و پوسیدگی یقه و سپس پوسیدگی هیپوکوتیل را به دنبال دارد. با پیشرفت آلودگی، پوسیدگی هیپوکوتیل شدیدتر شده و رشد سفید قارچ روی بافت آلوده ظاهر می‌شود. ریشه اولیه و ریشه‌های ثانویه هم پوسیده و در قسمت قاعده ساقه تغییر رنگ قهوه‌ای

پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه خیار ایران از سال ۸۲-۱۳۸۱ در گلخانه‌های جیرفت، یزد و ورامین شروع به گسترش کرده و باعث خسارات شدید شده است (۲). این قارچ از مرحله خزانه تا پایان دوره رویشی خسارت می‌زند. علایم

بیماری بررسی شدند و نتایج نشان داد که ارقام Amazing, Sienna و Dominica حساسیت بیشتری به عامل بیماری داشتند و ارقام Euphoria و Korinda, Aviance از متحمل‌ترین ارقام در برابر بیماری بودند و ۱۲ رقم باقیمانده نیز حساسیت یا مقاومت بینابینی داشتند (۲۷). در بررسی دیگری که توسط شهرداری و زارع صورت گرفت واکنش ۲۸ رقم تجاری تحت شرایط طبیعی گلخانه نسبت به بیماری ارزیابی گردید و در نتیجه ۱۰ رقم- Tkwl-52, Tkwl-45, Tkwl-87, Tkwl-127, Tkwl-228, Astoria, Number one, Rubah-s, Columvia, Festival Sultn, PSR36-45007, PSR036-45009, Tkwl-2-9, Rubah-L, Evergreen, Cashmere, Parma, PSR36-47112, PSR36-45664, TKW1-97, TKW1-96 TKW1-80, TKW1-68, PSR36-44326, PX36-46330, Bs036-41491, tkwl-110 حساس به بیماری مشاهده گردید (۲).

تغییرات مقدار ترکیبات فنلی و نقش آن‌ها در ایجاد مقاومت در گیاهان مبتلا به بیماری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج نشان می‌دهد که تجمع مواد فنلی اغلب در ارتباط با واکنش مقاومت است (۱۴، ۲۶، ۳۶). در بیشتر موارد سرعت تجمع ترکیبات فنلی بعد از ابتلا به بیماری در رقم مقاوم زیادتر از رقم حساس است و یک رابطه خطی مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و مقاومت گیاه وجود دارد (۱۴)، اما اعتباریابان مواد فنلی را در ارتباط با مقاومت ارقام جو به زنگ قهوه‌ای دخیل ندانست (۱۰). محقق دیگری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تجمع مواد شبه فنلی اطراف هیف‌ها و مکینه‌های قارچ سفیدک پودری متلاشی شده در برگ‌های خیار مقاوم به بیماری را نشان داده است (۱۹). افزایش پراکسیدازها در واکنش میزبان-پارازیت نیز ممکن است با مقاومت میزبان در برابر بیماری همراه باشد. ماکو و همکاران دخالت مستقیم

در آوندها مشاهده می‌شود. گیاهان آلوده کوتوله و پژمرده می‌شوند و طی چند هفته می‌میرند (۳۲). برای مبارزه با بیماری‌های خاک‌زاد از جمله فوزاریوم راه‌های متعددی وجود دارد. کاشت بذور عاری از بیماری، تناوب زراعی حداقل دو ساله و عدم کاشت گیاهان حساس، زیر خاک کردن بقایای گیاهی پس از برداشت و از بین بردن علف‌های هرز می‌تواند در کنترل بیماری مؤثر واقع شود. کاربرد سموم تدخینی و محلول‌پاشی خاک با سموم مؤثر می‌تواند مفید باشد. روش مؤثر و قطعی برای مواجهه این بیماری در طول کشت وجود ندارد. روش معمول مبارزه در مورد این بیماری توسط زارعین استفاده از سموم قارچ کش سیستمیک است ولی کاربرد این ترکیبات با خطرات مسمومیت انسانی و زیست محیطی همراه است و از نظر اقتصادی نیز قابل توجیه نمی‌باشد. از طرفی روش‌های مختلف مبارزه زراعی نظیر تناوب از کارایی کمی برخوردارند، بنابراین استفاده از روش‌های غیرشیمیایی و بیولوژیک از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. در حال حاضر از بهترین راه‌های مبارزه با بیماری‌های خاک‌زاد از جمله فوزاریوم‌ها علاوه بر مبارزه بیولوژیک توسط گونه‌های تریکودرما و ریزو باکترها، کاربرد ارقام مقاوم یا ارقام دارای مقاومت نسبی می‌باشد که مهم‌ترین، سالم‌ترین و با صرفه‌ترین روش مدیریتی در امر کنترل این بیماری شناخته شده است. بر طبق بررسی‌های پارکر^۱، از میان ۲۴ رقم خیار و پنج رقم طالبی آلوده شده با عامل بیماری ارقام Escape, Flamingo, Luberon, Mustang و Seram از گونه خیار long English حساس به بیماری و ارقام Calypso و Imagine متحمل به بیماری و دیگر ارقام حساسیت و مقاومت بینابینی داشتند (۲۱). در یک آزمایش دیگر نیز ۱۸ رقم خیار جهت ارزیابی مقاومت و حساسیت به این

1- Parker

آزمون ارزیابی مقاومت ارقام

در این آزمون از ۲۰ رقم خیار گلخانه‌ای (Rubah-s, PSR36-47112, 8-Ayat, CB- 61688222, Sultan, Janette, 32-PV, Nasco, Rubah-I, Nicoo 100, Negeen, Khassib, PSR 36-45007, Jakie, Festival, SR36-45664, FD-C101, Storm, 120118, Ayat) استفاده شد و برای آلوده سازی از دو جدایه قارچ J_1 , P_1 که در آزمایش اثبات بیماری‌زایی توسط نگارنده بیشترین درجه بیماری‌زایی را نشان داده بودند استفاده شد و آلوده‌سازی به روش خاک آلوده به قارچ صورت گرفت. سی روز بعد از آلوده‌سازی و ظهور کامل علائم، شاخص شدت بیماری (جدول ۱) و وزن تازه و خشک اندام هوایی (ساقه و برگ‌ها) و ریشه ارقام مختلف ارزیابی و میزان حساسیت و مقاومت ارقام مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶۰ تیمار و سه تکرار و سه شاهد برای هر تیمار انجام شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS 9,0 و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام شد.

بررسی تغییرات بیوشیمیایی در ارقام مقاوم و

حساس آلوده به عامل بیماری

آلوده سازی و شرایط رشد گیاه

پس از انجام آزمایشات گلخانه‌ای و تعیین ارقام متحمل و حساس (بر اساس مقیاس ۳-۰)، از دو رقم فستیوال و نگین و دو جدایه قارچ J_1 , P_1 جهت بررسی برخی تغییرات بیوشیمیایی استفاده شد. در این آزمایش مایه‌زنی به روش خاک آلوده به قارچ انجام گرفت. گیاهچه‌های ارقام متحمل و حساس در مرحله یک تا دو برگ حقیقی به گلدان‌های حاوی خاک آلوده و خاک سترون به عنوان شاهد منتقل شدند. ترکیب خاک گلدان شامل ماسه، کمپوست برگ، پرلیت و خاک مزرعه به نسبت ۱:۱:۱:۱:۲:۱، سترون بود. جهت حفظ دمای ریشه، گلدان‌ها درون حمام آب با هیتر تنظیم کننده دما (متوسط دمای روزانه ۲۸ درجه و متوسط دمای شبانه ۲۰

پراکسیداز را در واکنش‌های دفاعی گیاه گزارش داده و نتیجه گرفته‌اند که پراکسیداز از رشد عامل بیماری‌زا ممانعت به عمل می‌آورد (۱۶). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد فعالیت پراکسیداز باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شود و در واکنش ناسازگار فعالیت پراکسیداز چند برابر واکنش سازگار است (۸، ۱۲، ۳۰، ۳۳، ۴۰). البته در بعضی موارد افزایش فعالیت پراکسیداز در واکنش سازگار بیش از واکنش ناسازگار بوده است (۳۹). نتایج تحقیقات روونی و همکاران^۱ نشان می‌دهد که فعالیت پراکسیداز نشان دهنده تغییرات بیوشیمیایی بوده و بخشی از واکنش مقاومت است (۲۳ و ۲۴). هدف از این بررسی ارزیابی مقاومت برخی ارقام خیار گلخانه‌ای به پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه و بررسی برخی مکانیسم‌های بیوشیمیایی مقاومت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه زادمایه قارچ عامل بیماری

به این منظور طبق روش ریکر^۲ ماسه و آرد ذرت به نسبت ۹ به ۱ مخلوط شده و ۱۰ میلی لیتر آب مقطر نیز جهت تأمین رطوبت به آن اضافه شد و سپس دو مرتبه در اتوکلاو سترون شدند. چند قطعه به قطر ۵ میلی‌متر از محیط کشت ۴ روزه قارچ به مخلوط حاصل اضافه شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳-۴ هفته نگهداری شدند. سپس این مخلوط با خاک سترون شده به نسبت ۲-۱/۵ درصد وزنی مخلوط شد (۲۵). در گلدان‌های شاهد از مخلوط ماسه و آرد ذرت سترون استفاده شد و گیاهان در مرحله یک تا دو برگ حقیقی به خاک آلوده و شاهد منتقل شده و در گلخانه با متوسط دمای روزانه ۳۰-۲۸ و متوسط دمای شبانه ۱۷-۱۵ درجه سانتی‌گراد تا ظهور علائم نگهداری شدند.

1- Reuveni et al.

2- Ricker

جدول ۱- شاخص شدت بیماری قارچ *F. oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum* روی خیار (۳۲)

مقیاس ۰-۳	علائم بیماری
۰	بدون علائم
۱	پوسیدگی ابتدایی تا متوسط روی ریشه اصلی، ریشه های ثانویه و طوقه و کمی تغییر رنگ آوندی در ساقه
۲	پوسیدگی شدید روی ریشه اصلی، ریشه های ثانویه و طوقه همراه با پژمردگی یا کوتولگی و تغییر رنگ آوندی در ساقه
۳	مرگ گیاهچه

ها به روش برادفورد^۲ به شرح ذیل تعیین شد (۶). ابتدا سه میلی لیتر معرف برادفورد همراه با ۳۰ میکرو لیتر عصاره ریشه گیاه به صورت کامل مخلوط شده و مقدار جذب نور در ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر از لوله های شاهد که شامل فقط سه میلی لیتر معرف برادفورد بود استفاده شد (۶).

تهیه منحنی استاندارد

از سرم آلبومین گاوی^۳ برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. طبق روش برادفورد مقدار پنج میلی گرم از این سرم در آب مقطر سترون حل و از آن به ترتیب ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۴۰ میکرو لیتر به لوله های آزمایش حاوی سه میلی لیتر معرف برادفورد اضافه شد و مقدار جذب نور مخلوط در ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. سپس بین میزان سرم و اعداد جذب به دست آمده معادله رگرسیون و منحنی مربوط به آن به دست آمد (۶).

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

مخلوط واکنش شامل ۴۰ میکروگرم پروتئین تام و ۲۰ میکرو لیتر معرف گوایکل^۴ ۲۰۰ میلی مولار بود که حجم آن توسط بافر فسفات-سیترات ۲۵ میلی-مول با اسیدیته ۵/۴ به ۲ میلی لیتر رسانده شد و دستگاه با استفاده از آن صفر شد. سپس مقدار ۱۰

درجه سانتی گراد) قرار گرفتند. آزمایش دراردیبهشت ماه و با نور طبیعی و بر پایه طرح فاکتوریل ۶×۵ در قالب کاملاً تصادفی در سه تکرار تنظیم شد که شامل شش تیمار و پنج نوبت زمانی نمونه برداری بود. تیمارها شامل شاهد سالم در هر دو رقم (بدون مایه زنی با قارچ) و ارقام متحمل و حساس مایه زنی شده با دو جدایه قارچ بود. نمونه ها در روزهای یک، سه، پنج، هفت و ۱۰ روز پس از مایه زنی جمع آوری شد.

استخراج پراکسیداز

جهت استخراج پراکسیدازهای محلول در سیتوپلاسم به روش مادایان و همکاران^۱ از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (pH=6) استفاده شد (۱۷). ریشه های نمونه برداری شده آب گیری شد و مقدار نیم گرم از آن توسط ازت مایع در هاون به صورت هوموژن درآمد. سپس مقدار ۱ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار سرد به آن اضافه شد. عصاره حاصل برای مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰×g در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و بخش روئی جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ارزیابی میزان کل پروتئین محلول و سنجش پروتئین استاندارد

جهت تعیین فعالیت آنزیم به میلی گرم پروتئین موجود در بافت، میزان پروتئین تام موجود در نمونه

2- Bradford

3- Bovine serum albumin=BSA

4- Guaiacol

1- Madhaiyan et al.

اضافه شد. بلافاصله بعد از ظهور آیزوزایم‌های پراکسیداز (باند‌های قرمز رنگ) و شاخص Rf آیزوزایم‌ها که عبارت است از فاصله طی شده به وسیله آیزوزایم تقسیم بر فاصله طی شده بوسیله رنگ برم فنل بلو تعیین شد (۱۷).

استخراج ترکیبات فنل کل

جهت استخراج ترکیبات فنلی طبق روش مالیک و سینگ^۵ از متانول ۸۰ درصد (pH=2) استفاده شد. ریشه‌های نمونه برداری شده آب‌گیری شد و مقدار نیم گرم از آن همراه با هشت میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد درون هاون عصاره‌گیری شد. مخلوط حاصله صاف شده و در $4000 \times g$ به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. بخش روپی داخل لوله‌های سانتریفوژ حاوی ترکیبات فنلی است که از رسوب بافتی جدا شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۸).

ارزیابی میزان فنل کل ریشه

برای اندازه‌گیری مقدار کل مواد فنلی در عصاره ریشه طبق روش مالیک و سینگ از معرف فولین^۶ با اندکی تغییرات استفاده گردید (۱۸). یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی به‌دست آمده با پنج میلی‌لیتر آب مقطر در لوله آزمایش ریخته و کاملاً مخلوط شدند. سپس مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از معرف فولین به لوله اضافه و مجدداً محتویات لوله با هم مخلوط و پس از سه دقیقه یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به لوله اضافه و یک میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از یک ساعت نگهداری در دمای اتاق مقدار جذب نور در طول موج ۷۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. لوله‌های شاهد شامل آب و معرف بود.

میکرولیتر پراکسید هیدروژن^۱ ۳۰ درصد به مخلوط واکنش اضافه گردید و مقدار جذب نور در ۴۷۵ نانومتر با فواصل زمانی ۱۰ ثانیه‌ای به مدت یک دقیقه قرائت شد و منحنی تغییرات جذب نور در مدت یک دقیقه رسم شد. سپس عدد شیب خط مربوط به معادله رگرسیون به‌عنوان فعالیت آنزیم در ثانیه در نظر گرفته شد و عدد مذکور با محاسبات معمولی به فعالیت آنزیم به‌صورت تغییرات جذب در ۴۷۵ نانومتر در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین تام تبدیل شد.

بررسی آیزوزایم‌های پراکسیداز محلول به روش الکتروفورز ناپیوسته بومی (Native-PAGE)

در این روش از ژل پلی‌اکریلامید^۲ (شامل دو قسمت ژل متراکم کننده شش درصد و ژل جدا کننده ۱۲ درصد) طبق روش سیورز و همکاران^۳ استفاده شد (۲۸). مقداری از عصاره روز پنجم نمونه برداری (با توجه به معنی‌دار بودن میانگین‌ها و میزان افزایش آنزیم در آن روز) که حاوی ۲۰ میکروگرم پروتئین بود در چاهک‌ها ریخته شد و حجم آن با افزودن بافر نمونه به ۸۰ میکرولیتر رسانده شد. سیم‌های اتصال به منبع تغذیه طوری نصب شد که تانک بالا به قطب منفی و تانک پایین به قطب مثبت وصل شود. ولتاژ در مرحله ژل متراکم کننده ۷۵ ولت و در مرحله ژل جدا کننده ۱۰۰ ولت در نظر گرفته شد.

رنگ آمیزی آیزوزایم‌های پراکسیداز

ابتدا ژل چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد و سپس در بافر سیترات - فسفات ۲۵ میلی‌مول با اسیدیته ۵/۴ حاوی گوایکل با غلظت نهایی پنج میلی‌مول به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر^۴ قرار گرفت. سپس مقدار یک درصد پراکسید هیدروژن به آن

1- H2O2

2- Polyacrylamide gel

3- Seevers *et al.*

4- Shaker

5- Malick & Sing

6- Folin-ciocalteu's reagent

تهیه منحنی استاندارد اسید کافئیک

برای تهیه منحنی استاندارد از اسید کافئیک^۱ طبق روش سیورز و همکاران^۲ استفاده شد و جذب نور نمونه‌ها در ۷۲۰ نانومتر قرائت شد. معادله رگرسیون خطی بین مقدار اسید کافئیک موجود در نمونه‌ها و جذب نور برقرار شد. در نهایت میزان فنل کل نمونه‌ها بصورت میلی گرم اسید کافئیک در هر گرم وزن تر گیاه نشان داده شد (۲۸).

نتایج

ارزیابی مقاومت ارقام خیار

چهار هفته پس از آلوده‌سازی ارقام مختلف خیار در مرحله یک تا دو برگ حقیقی با دو جدایه قارچ عامل بیماری، آلودگی با شدت‌های متفاوت در این ارقام بروز کرد (شکل ۱). ارقامی که شدت بیماری آنها در مقیاس صفر و یک بود جزء ارقام مقاوم تا متحمل و ارقامی که مقیاس دو و سه را نشان دادند جزء ارقام نیمه حساس تا حساس طبقه بندی شدند (۲ و ۳).

با توجه به شدت بیماری و وزن تازه و خشک ریشه و اندام هوایی، ارقام Nasco، 32-PV، Negeen، Janette، Sultan، Nicoo 100، Rubah-1، PSR36-8، Ayat، CB- 61688222، Rubah-s، 47112، نیمه حساس تا حساس به بیماری و ارقام Jakie، Festival، PSR 36-، FD-C101، Storm، 120118، Ayat، 45007، Khassib، SR36-45664 مقاوم تا متحمل تشخیص داده شدند. طبق محاسبات انجام شده در رابطه با شاخص‌های شدت بیماری و وزن تازه و خشک ریشه و اندام هوایی، مشخص شد که ضریب همبستگی شدت بیماری با سایر فاکتورها منفی بود و با افزایش شدت بیماری، شاخص‌های رشدی وزن تازه و خشک ریشه و اندام هوایی کاهش یافت.

بقیه شاخص‌ها با یکدیگر همبستگی مثبت و معنی‌دار نشان دادند.

تغییرات دفاع بیوشیمیایی در ارقام متحمل و

حساس به بیماری پوسیدگی فوزاریومی

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول در ریشه

ارقام متحمل و حساس خیار

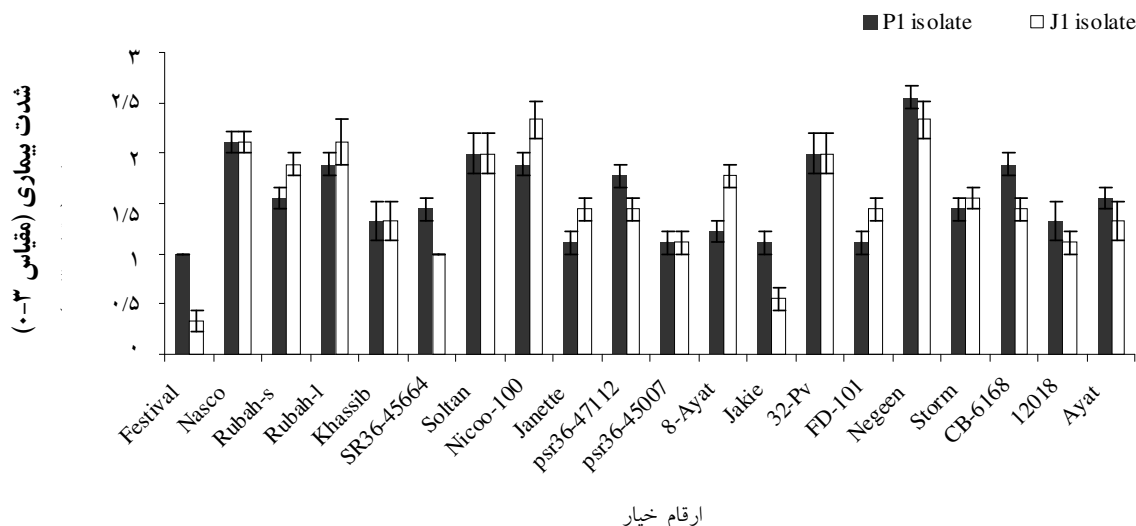
نتایج نشان داد بین تیمارها، در روزهای مختلف نمونه برداری و اثر متقابل آنها در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0/01$) وجود دارد. نتایج بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول در جدول ۲ و شکل ۲ مشاهده می‌شود. در روز سوم و پنجم بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده گردید. در گیاهان سالم در هر دو رقم متحمل و حساس، فعالیت آنزیمی بیش از ۵۰ درصد افزایش نشان داد. در گیاهان آلوده هر دو رقم، فعالیت پراکسیداز در روز پنجم بعد از آلوده سازی قارچ عامل بیماری به حداکثر خود رسید و از این روز به بعد فعالیت آن رو به کاهش نهاد. در رقم حساس نگین، آلوده شده با جدایه P1 که در آزمون گلخانه‌ای بیشترین شدت بیماری را نشان داده بود، در مقایسه با جدایه J1 در روز اول و سوم بعد از مایه‌زنی میزان پراکسیداز افزایش بیشتری نشان داد در حالی که در روز پنجم جدایه J1 باعث افزایش در حد ۵۰ واحد پراکسیداز در رقم حساس شد و جدایه P1 تفاوت چندانی نسبت به روز سوم نشان نداد. در روز هفتم و دهم در تمام تیمارها کاهش در میزان پراکسیداز مشاهده شد و این کاهش در رقم حساس در مورد جدایه P1 کمی بیشتر از جدایه J1 بود. در رقم متحمل فستیوال، در تیمار آلوده شده با جدایه P1 افزایش سریع‌تر و بیشتری در فعالیت آنزیم در روز پنجم بعد از مایه‌زنی مشاهده شد، در حالی که در مورد جدایه J1 که در آزمون گلخانه‌ای کمترین شدت بیماری را در رقم متحمل نشان داده بود، افزایش فعالیت آنزیم در روز

1- Caffeic acid

2- Seevers *et al.*

آنزیم در روز پنجم در رقم متحمل، بیشتر از رقم حساس بود. در روز هفتم و دهم بعد از مایه‌زنی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد.

سوم سریع‌تر بود و بعد از آن افزایش و کاهش در میزان فعالیت آنزیم نسبت به جدایه P1 کندتر بود و بعد از روز پنجم نیز روند کاهشی کندتری نشان داد. در مقایسه رقم متحمل و حساس، میزان فعالیت



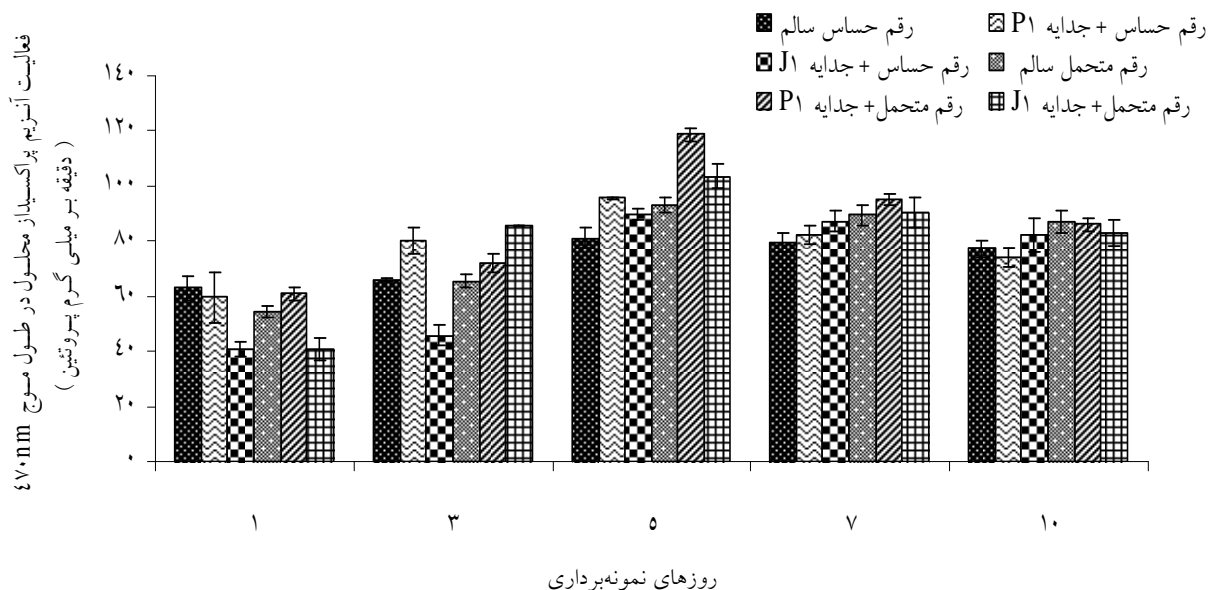
شکل ۱- مقایسه میانگین شدت بیماری در ارقام مختلف خیار در اثر دو جدایه قارچ عامل بیماری

اعداد نمودار میانگین سه تکرار \pm SE (خطای استاندارد) می‌باشند. شدت بیماری بر اساس جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر قارچ عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه خیار روی فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول در ارقام حساس نگی و متحمل فستیوال در شرایط گلخانه با متوسط دمای ۲۵ و نور طبیعی در مراحل مختلف بعد از مایه زنی

LSD (P=۰/۰۰۵)	روزهای نمونه برداری					تیمارهای آزمایشی
	۱۰	۷	۵	۳	۱	
۱۶/۵۹	ab ۷۷/۳ A	a ۷۹/۵ A	a ۸۱/۱۶ C	ab ۶۶ B	b ۶۲/۹ A	ConNeg
۲۵/۹۶	ab ۷۴/۳ A	ab ۸۲/۲۵ A	a ۹۵/۸ BC	ab ۸۰/۰۸ AB	b ۵۹/۶ A	P1+Neg
۱۸/۳	a ۸۲ A	a ۸۷/۱۶ A	a ۸۹/۹ BC	b ۴۵/ ۵۸ C	b ۴۰/۷۵ A	J1+Neg
۱۴/۵۲	a ۸۷ A	a ۸۹/۵ A	a ۹۳/۱۶ BC	b ۶۵/۵ B	b ۵۴/۵ A	Con Fes
۱۱/۴۹	b ۸۶ A	b ۹۵/ ۲۵A	a ۱۱۸/۶۶ A	c ۷۱/۹۱ AB	c ۶۰/۹۱ A	P1+Fes
۱۷/۳	a ۸۳ A	a ۹۰/۵۸ A	a ۱۰۳/۶ B	a ۸۵/۵ A	b ۴۰/۹۱ A	J1+Fes
	n.s.	n.s.	۱۵/۳	۱۵/۹	n.s.	LSD (P=۰/۰۰۳)

اعداد جدول میانگین سه تکرار می‌باشند. Neg: رقم حساس نگی، Fes: رقم متحمل فستیوال. con: شاهد سالم. میانگین‌ها به روش LSD و بعد از تصحیح Bonferoni مقایسه شده‌اند. n.s. معنی دار نیست. اعدادی که در هر ستون با حروف مختلف بزرگ نشان داده شده‌اند در سطح $P=۰/۰۰۳$ اختلاف معنی‌دار دارند و اعدادی که در هر سطر با حروف مختلف کوچک نشان داده شده‌اند در سطح $P=۰/۰۰۵$ اختلاف معنی‌دار دارند.



شکل ۲- فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول در ارقام متحمل و حساس خیار در اثر دو جدایه قارچ عامل بیماری

اعداد نمودار میانگین سه تکرار \pm SE (خطای استاندارد) می‌باشند. رقم حساس: نگین، رقم متحمل: فستیوال

آلوده به جدایه P1، در روز پنجم نسبت به تیمارهای دیگر مقداری افزایش نشان داد، در صورتی که در تیمارهای دیگر ضعیف‌تر بود. آیزوزایم‌های P₂ و P₃ نیز در تیمارهای گیاه متحمل و حساس آلوده به جدایه P1 نسبت به تیمارهای دیگر افزایش بیشتری نشان دادند. آیزوزایم‌های P₂ و P₃ در تیمار گیاه متحمل آلوده به جدایه J1 نیز نسبت به تیمارهای متحمل و حساس شاهد و حساس آلوده به جدایه J1 افزایش بیشتری نشان داده بود. به طور کلی الگوی آیزوزایمی نشان داد که تجمع آنزیم در روز پنجم در تیمارهای آلوده به قارچ، بیشتر از تیمارهای شاهد و در رقم متحمل آلوده بیشتر از رقم حساس آلوده بود (شکل ۳).

بررسی الگوی آیزوزایمی آنزیم پراکسیداز محلول در ریشه ارقام متحمل و حساس آلوده به قارچ و شاهد به روش Native - PAGE عصاره خام گیاهانی که فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول آنها بررسی شده بود در روز پنجم بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری جهت بررسی فعالیت آیزوزایمی آنزیم پراکسیداز محلول به روش الکتروفورز عمودی^۱ مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که ریشه‌های خیار در این آزمون حاوی سه آیزوزایم پراکسیداز بودند که به صورت، P₁(Rf=0/12)، P₂(Rf=0/55) و P₃(Rf=0/57) در نظر گرفته شدند. آیزوزایم P₁ آیزوزایم بازی بود که در ژل متراکم کننده باقی ماند در حالی که آیزوزایم‌های P₂ و P₃ آیزوزایم‌های اسیدی بودند که در ژل جدا کننده از هم تفکیک شدند. نتایج نشان داد آیزوزایم P₁ در تیمارهای گیاه متحمل و حساس

1- Native polyacrylamide gel electrophoresis

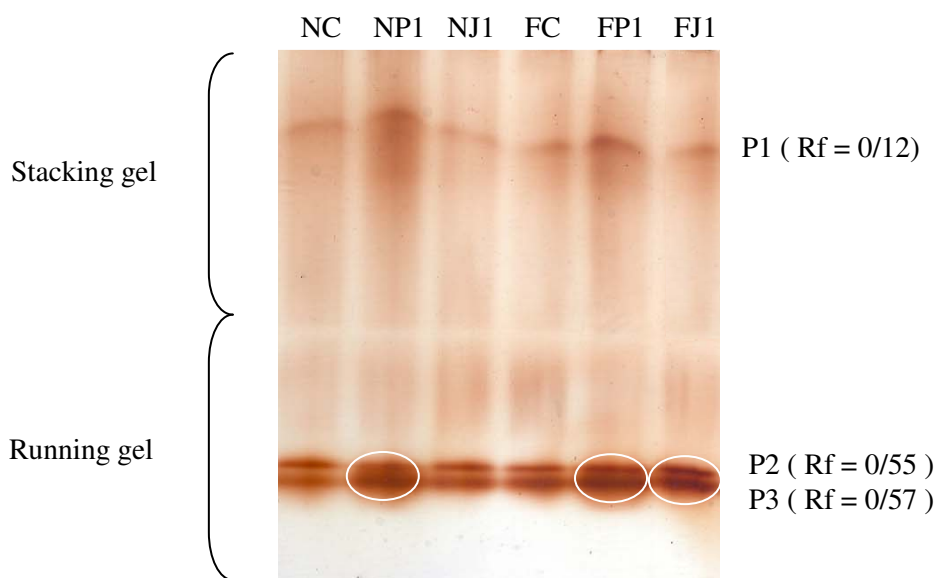
تیمارهای مایه‌زنی شده هر رقم بیشتر از شاهد آن بوده، ولی بین رقم متحمل و حساس این افزایش اختلاف چندانی نداشته است.

بحث

یکی از جنبه‌های مهم دفاعی گیاه میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده آن است (۳۱). بر طبق آزمایشات گلخانه‌ای قبل ارقامی که بیشترین تحمل و بیشترین حساسیت را نسبت به عامل بیماری نشان دادند، جهت بررسی مکانیسم مقاومت انتخاب

بررسی تغییرات کمی ترکیبات فنلی در ارقام متحمل و حساس

نتایج نشان داد به احتمال ۹۹/۹ درصد بین مقادیر ترکیبات فنل کل، در ارقام متحمل و حساس و شاهد‌های مربوطه اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مقایسه میانگین مقادیر فنل کل در جدول ۳ و شکل ۴ نشان داده شده است. هم‌چنانکه از این جدول استنباط می‌گردد، در بین تمام روزهای نمونه‌برداری فقط در روز اول اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد. همان‌طور که دیده می‌شود در هر دو رقم چه سالم و چه مایه‌زنی شده میزان ترکیبات فنل کل یک روند تقریباً افزایشی داشته و این افزایش در



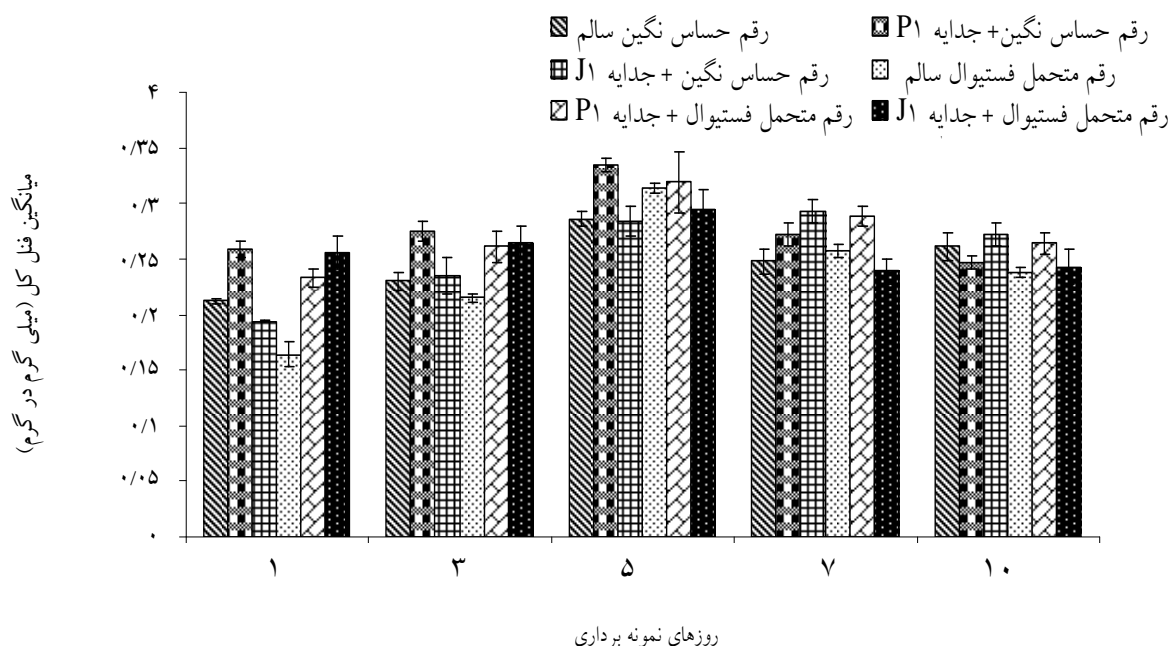
شکل ۳- بررسی الگوی آیزوزایمی آنزیم پراکسیداز محلول در ریشه‌های ارقام متحمل و حساس خیار در روز پنجم پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری.

FC: شاهد رقم متحمل فستیوال، NC: شاهد رقم حساس نگین، FP1: رقم متحمل آلوده به جدایه P1، FJ1: رقم متحمل آلوده به جدایه J1، NP1: رقم حساس آلوده به جدایه P1، NJ1: رقم حساس آلوده به جدایه J1، شاخص Rf = مسافت طی شده بوسیله آیزوزایم تقسیم بر مسافت طی شده بوسیله رنگ برم فنل بلو

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر قارچ عامل بیماری روی محتوای ترکیبات فنل کل در ریشه (میلی گرم اسید کافئیک در هر گرم وزن تر ریشه) در ارقام حساس و متحمل خیار به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه

تیمارهای آزمایشی	روزهای نمونه برداری					LSD (P=۰/۰۰۵)
	۱	۳	۵	۷	۱۰	
ConNeg	b ۰/۲۱۲ B	b ۰/۲۳۰ A	a ۰/۲۸۶ A	ab ۰/۲۴۸ A	ab ۰/۲۶۱ A	۰/۰۴۶
P1+Neg	b ۰/۲۵۹ A	b ۰/۲۷۵ A	a ۰/۳۳۵ A	b ۰/۲۷۲ A	b ۰/۲۴۷ A	۰/۰۴۲
J1+Neg	b ۰/۱۹۴ B	ab ۰/۲۳۵ A	a ۰/۲۸۴ A	a ۰/۲۹۳ A	a ۰/۲۷۲ A	۰/۰۰۶
Con Fes	c ۰/۱۶۴ B	b ۰/۲۱۵ A	a ۰/۳۱۴ A	b ۰/۲۵۷ A	b ۰/۲۳۸ A	۰/۰۳۶
P1+Fes	b ۰/۲۳۳ A	ab ۰/۲۶۱ A	a ۰/۳۱۹ A	ab ۰/۲۸۹ A	ab ۰/۲۶۴ A	۰/۰۸۱
J1+Fes	a ۰/۲۵۶ A	a ۰/۲۶۵ A	a ۰/۲۹۵ A	a ۰/۲۳۹ A	a ۰/۲۴۳ A	n.s.
LSD (P=۰/۰۰۳)	۰/۰۴۸	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

اعداد جدول میانگین سه تکرار می باشند. Neg: رقم حساس نگین، Fes: رقم متحمل فستیوال. con: شاهد سالم. میانگین ها به روش LSD و بعد از تصحیح Bonferoni مقایسه شده اند. اعدادی که در هر ستون با حروف مختلف بزرگ نشان داده شده اند در سطح $P=۰/۰۰۳$ اختلاف دار دارند، و اعدادی که در هر سطر با حروف مختلف کوچک نشان داده شده اند در سطح $P=۰/۰۰۵$ اختلاف معنی دار دارند. n.s. معنی دار نیست.



شکل ۴- تغییرات میزان فنل کل (میلی گرم در یک گرم بافت تازه ریشه) در ارقام متحمل و حساس خیار در اثر دو جدایه قارچ عامل بیماری

اعداد نمودار میانگین سه تکرار $\pm SE$ (خطای استاندارد) می باشند. رقم حساس: نگین، رقم متحمل: فستیوال

نیز در مطالعات خود ارتباطی بین مقدار ترکیبات فنلی با مقاومت گیاه مشاهده نکرده‌اند (۸، ۱۰، ۱۵، ۲۹). در این آزمایش نیز بین مقاومت رقم فستیوال و ترکیبات فنلی بجز روزهای ابتدایی بعد از مایه‌زنی که مربوط به تجمع سریع ترکیبات فنلی در پاسخ به آلودگی می‌شود، در روزهای بعد ارتباطی مشاهده نشد. افزایش پراکسیدازها در واکنش میزبان-پارازیت ممکن است با مقاومت میزبان در برابر بیماری همراه باشد (۱۱، ۲۲، ۲۸، ۳۵، ۳۸ و ۴۰). نقش پراکسیدازها را در مقاومت گیاه، به توانایی این آنزیم در اکسیده کردن متابولیت‌های مهم نسبت می‌دهند. ماکو و همکاران^۲ دخالت مستقیم پراکسیداز را در واکنش‌های دفاعی گیاه گزارش داده و نتیجه گرفته‌اند که پراکسیداز از رشد عامل بیماری‌زا ممانعت به عمل می‌آورد (۱۶). گزارش‌های متعدد وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت پراکسیداز باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شود و در واکنش ناسازگار فعالیت پراکسیداز چند برابر واکنش سازگار است (۹، ۱۲، ۳۰، ۳۴ و ۴۰). در مقایسه رقم متحمل و حساس، میزان فعالیت آنزیم در روز پنجم در رقم متحمل بیشتر از رقم حساس بود. در روز هفتم و دهم بعد از مایه‌زنی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. بررسی نتایج الگوی الکتروفورزی آیزوایمی پراکسیداز و نتایج آماری نشان داد که، در هر دو رقم حساس و متحمل، گیاهان شاهد بر خلاف گیاهان آلوده الگوی مشابه فعالیت آنزیمی را نشان می‌دهند که بیان‌گر این است که حمله پاتوژن سبب تغییر فعالیت آنزیم می‌شود. این تغییر می‌تواند به دلیل آزاد شدن الیستورها در اثر حمله قارچ عامل بیماری باشد که پس از آزاد شدن الیستور و دریافت آن توسط میزبان تفاوت‌ها در الگوی فعالیت آنزیم در رقم متحمل و حساس مشاهده می‌شود. به نظر می‌رسد

شدند. طبق بررسی‌های ون لون و همکاران^۱ بین تیمار القاء کننده و فعال شدن واکنش‌های دفاعی گیاه فاصله زمانی ۴۸ - ۲۴ ساعت وجود دارد (۳۴)، از این رو نمونه برداری‌ها یک روز بعد از مایه‌زنی شروع شد و تا روز دهم ادامه داشت. در این تحقیق مقدار کل ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان دو عامل اساسی دفاع بیوشیمیایی، در برهم-کنش خیار - فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه و ساقه از طریق اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. نتایج بررسی تغییرات کمی ترکیبات فنلی در ارقام متحمل و حساس خیار نسبت به بیماری نشان داد در هر دو رقم چه تیمار شاهد و چه تیمار مایه‌زنی شده با قارچ، میزان ترکیبات فنل کل در طی ۱۰ روز نمونه‌برداری یک روند تقریباً افزایشی تا روز پنجم و سپس کاهش تا روز دهم داشته است و این افزایش در تیمارهای مایه‌زنی شده هر رقم بیشتر از شاهد آن بوده، ولی بین رقم متحمل و حساس این افزایش اختلاف چندانی نداشته است. نتیجه اصلی اینکه مقدار فنل کل بر حسب میلی‌گرم در یک گرم وزن تازه ریشه، در بافت‌های آلوده هر دو رقم کمی بیشتر از بافت‌های سالم آن‌ها بوده ولی بین رقم حساس و متحمل در این تحقیق تفاوت معنی‌داری در میزان فنل کل دیده نمی‌شود و به نظر می‌رسد در اینجا مقاومت گیاه ارتباطی با میزان ترکیبات فنل کل نداشته است. طبیعت تولید ترکیبات فنلی در گیاه آلوده به عامل بیماری در جهت دفاع و مقاومت میزبانی است، اما در مورد نتیجه حاصل از تولید یا افزایش این ترکیبات در میزبان آلوده نتایج متفاوتی از تحقیقات مختلف به دست آمده است. محققین متعددی ارتباط نقش ترکیبات فنلی و افزایش این ترکیبات را با مقاومت، در میزبان‌های مختلف در رابطه با عوامل بیماری‌زای قارچی ثابت کرده‌اند (۱، ۳، ۴، ۷، ۱۱، ۱۳، ۲۰، ۳۱ و ۳۷). برخی از محققین

2- Macko *et al.*1- Van Loon *et al.*

جدایه‌های مختلف قارچی که بیماری‌زایی متفاوت داشته‌اند نیز در الگوی فعالیت پراکسیداز مؤثر بوده‌اند. در مورد رقم حساس، با توجه به اینکه جدایه J1 توانسته بیماری‌زایی کمتری را به وجود بیاورد، مطابق با گزارش آتیتال^۱ که اگر جدایه J1 به هر دلیل با تأخیر نسبت به جدایه P1 وارد گیاه شده باشد، می‌توان نتیجه گرفت به دلیل وقفه زمانی پیش آمده و به دلیل توسعه مکانیسم‌های مقاومت میزبان در بازه زمانی حاصل مقاومت نسبی به جدایه J1 به وجود آمده و فعالیت آنزیم در این تیمار متفاوت با دیگر تیمارها در طی زمان خواهد شد (۵). هر چند به نظر می‌رسد کاهش میزان فعالیت آنزیم بعد از روز پنجم در رقم متحمل آلوده به جدایه P1 سریع‌تر از رقم حساس است، احتمالاً افزایش روز پنجم نمونه‌برداری به اندازه کافی قادر به ایجاد موانع دفاعی در برابر عامل بیماری بوده تا سبب عدم دسترسی عامل بیماری به بافت‌های حساس از طریق واکنش فوق حساسیت^۲ شود و یا اینکه افزایش پراکسیداز توانسته با رسوب ترکیبات فنلی و لیگنین در دیواره سلولی گیاه فعالیت آنزیم را به دلیل عدم توسعه عامل بیماری و تولید سیگنال‌های محرک بعد از روز پنجم کاهش دهد و این کاهش از روز پنجم به روز هفتم بیان‌گر این است که در این گیاهان ممکن است محدود شدن عامل بیماری سبب عدم تحریک فعالیت‌های دفاعی توسط آن و محدود شدن عامل بیماری شده باشد. بنابراین نتایج نشان می‌دهد نوع جدایه قارچ عامل بیماری می‌تواند در نوع بروز واکنش‌های دفاعی گیاه دخیل باشد. الگوی آیزوزایمی پراکسیداز نشان داد که تجمع آنزیم در روز پنجم در تیمارهای آلوده به قارچ، کمی بیشتر از تیمارهای شاهد و در رقم متحمل آلوده بیشتر از رقم حساس آلوده بود. رقم متحمل به دلیل پتانسیل دفاعی که آن را در حالت دفاع قبل از حمله

عامل بیماری قرار می‌دهد، بعد از رخنه عامل بیماری از خود واکنش‌های دفاعی شدیدتری را نسبت به شاهد غیر آلوده نشان می‌دهد (۵). از طرفی اگر مقاومت رقم مذکور سبب شده باشد که عامل بیماری به میزان کمی توانسته باشد به درون گیاه رخنه کند، با توجه به این نکته که ایجاد بیماری به وسیله پاتوژن مستلزم میزان رخنه در حد آستانه‌ای است و مقاومت ممکن است سبب کاهش رخنه شده باشد این مسأله می‌تواند مرتبط با میزان افزایش پراکسیداز حاصله باشد. در مورد رقم حساس آلوده به جدایه P1 که شدت بیماری بیشتری را در این رقم به همراه داشت، آیزوزایم پراکسیداز مربوطه نیز واضح‌تر از جدایه J1 بود. این نتایج تأکید می‌کند که حمله عامل بیماری و ایجاد آلودگی جهت بروز واکنش‌های مقاومت ضروری می‌نماید، به عبارت دیگر مقاومت گیاه زمانی بروز می‌کند که عامل بیماری توانسته باشد گیاه را مورد حمله قرار دهد ولیکن چون حمله عامل بیماری و سرعت گسترش آن سریع‌تر از واکنش‌های دفاعی گیاه رخ داده بنابراین گیاه نتوانسته است به موقع واکنش‌های دفاعی خود را بروز داده و از شدت بیماری بکاهد. بنابراین می‌توان احتمال داد که تفاوت رقم حساس و متحمل در این آزمایش در این است که سرعت واکنش‌های دفاعی در رقم متحمل بیشتر می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری مرکز تحقیقات کشاورزی ورامین در اجرای پروژه و جمع‌آوری نمونه‌ها و ارقام مورد آزمایش، سپاس‌گزاری می‌شود. این تحقیق با همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام گرفته است که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

1- Attitalla

2- Hyper Sensitivity Reaction (HR)

منابع

۱. بهروزین، م. ۱۳۷۶. بررسی اثر قارچ *Puccinea striiformis* روی برخی از پدیده‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و هیستولوژیکی دو رقم گندم. پایان‌نامه دکترا در رشته بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس. تهران، ۱۹۹ ص.
۲. شهریار، د. و زارع، ر. ۱۳۸۵. پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه خیار گلخانه‌ای. هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ص ۱۹۱.
۳. کاظمی، ه. ۱۳۷۶. بررسی فعالیت و نقش آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در مکانیسم مقاومت گندم به بیماری فوزاریومی خوشه و امکان القاء مقاومت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۱۱۷ ص.
4. Arora, Y.K., and Bajaj, K.L. 1985. Peroxidase and polyphenoloxidase associated with induced resistance of mung bean to *Rhizoctonia solani* kuhn. *Phytopathology* 11: 325-331.
5. Attitalla, I.H. 2004. Biological and molecular characteristics of microorganism stimulated defense response in *Lycopersicon esculentum* L. Comprehensive Summary of Uppsala Dissertation from the Faculty of Science and Technology, 943, Acta Universitatis Upsaliensis, Sweden.
6. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
7. Carrasco, A., Boudet, A.M., and Marigo, E. 1974. Enhanced resistance of tomato plants to fusarium by controlled stimulation of their natural phenolic production. *Plant Pathology*, 12: 225-232.
8. Daly, J.M., Ludden, P., and Seevers, P. 1971. Biochemical comparisons of resistance to wheat stem rust disease controlled by the sr6 or sr11 alleles. *Physiological Plant Pathology*, 1: 397-407.
9. Daly, J.M., Sayre, R.M., and Pazur, J.H. 1957. The hexose monophosphate shunt as the major respiratory pathway during sporulation of rust of safflower. *Plant Physiology*, 32: 44-48.
10. Etebarian, H.R. 1981. Studies of host-parasite interaction between *Puccinia hordei* Oth. and *Hordeum vulgare* L. Ph.D. Thesis, Department of Agricultural Biology, The University of Newcastle, Upon Tyne.
11. Farkas, G.L., and Kiraly, Z. 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant disease and disease resistance. *Phytopathology*, 44: 105-150.
12. Fric, F., and Fichs, W.H. 1970. Veränderungen der aktivitat einiger enzyme in weizenblatt in abhangigkeit von der temperaturlabilen ver traglichkeit fur *Puccinia graminis tritici*. *Phytopathologisch Zeitschrift*, 67: 161-174.

13. Friting, B., and Legrand, M. 1993. Mechanisms of plant defense responses. Kluwer Academic Publishers. London, England.
14. Goodman, R.N., Kiraly, Z., and Wood, K.P. 1986. Biochemical and physiological aspects of plant disease. University of Missouri Press, 433 p.
15. Hartley, R.D., Harris, P.J., and Russell, G.E. 1978. Degradability and phenolic components of cell walls of wheat in relation to susceptibility to *Puccinea striiformis*. Annals of Applied Biology, 88: 153-158.
16. Macko, V., Woodbury, W., and Stahman, M.A. 1968. The effect of peroxidase on the germination and growth of mycelium of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. Phytopathology, 58: 1250-1254.
17. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Senthikumar, M., Seshadri, S., Chung, H., Yong, J., Sundram, S., and Sa, T. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa*) by *Methylobacterium* spp. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45: 315-324.
18. Malick, C.P., and Sing, M.B. 1980. Plant Enzymology and Histo- Enzymology. Kalyani Publisher, New Delhi, 280 p.
19. McNally, D.J., Wurms, K.V., Labbé, C., and Bélanger, R.R. 2004. Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site – specific response to fungal penetration in cucumber. Physiological and molecular plant pathology, 63: 293 – 303.
20. Nicholson, R.L., and Hammerchmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual Review of Phytopathology, 30: 369-389.
21. Parker, M. 1997. *Fusarium* root and stem rot of greenhouse cucumbers in British Columbia - host range, epidemiology and disease control. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in the Department of biological sciences. Simon Fraser University, 146 p.
22. Patykowski, Y., Urbanek, A., and Kaczorowska, T. 1988. Peroxidase activity in leaves of wheat cultivars differing in resistance to *Erysiphe graminis* DC. Journal of phytopathology, 122: 126-134.
23. Reuveni, R., and Bothma, G.C. 1985. The relationship between peroxidase activity and resistance of *Sphaerotheca fuliginea* in melons. Phytopathologische Zeitschrift, 114: 260.
24. Reuveni, R. 1995. Biochemical marker of disease resistance. In: Singh, R. P., and Singh, U. S., eds. Molecular methods in plant pathology, pp: 99-114.
25. Ricker, A.S. 1963. Introduction to research plant diseases. CRC Press. London, England.
26. Rohringer, R., Kim, W.K., Samborski, D.J., and Howes, N.K. 1977. Calcofluor: an optical brightener for fluorescens microscopy of fungal plant parasite in leaves. Phytopathology, 67: 808-810.

27. Rose, S., and Punja, Z.K. 2004. Greenhouse cucumber cultivars differ in susceptibility to *Fusarium* root and stem rot. Journal of American society for horticultural science. Hort Technology, 14:240- 242.
28. Seevers, D.M., Daly, J.M., and Cathedral, F.F. 1971. The role of peroxidase isozyme in resistance to wheat stem rust disease. Plant Physiology, 48: 353- 360.
29. Seevers, P.M., and Daly, J.M. 1970. Studies on wheat stem rust resistance controlled at the sr6 locus 1 – the role of phenolic compounds. Phthopathology, 60:1322-1328.
30. Simons, T.Y., and Ross, A.F. 1970. Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco. Phytopathology, 60: 383-384.
31. Steiner, U., and Schonbeck, F. 1995. Induced disease resistance in monocots. In Hammerschmidt, R. and Kuc, J. (eds.). Induced resistance to disease in plants. Kluwer Academic Publishers. London. England, pp: 86-103.
32. Vakalounakis, D.J. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*. Plant Disease, 80: 313-316.
33. Van Loon, L.C., and Geelen, J.L.M. 1971. The relation of poly-phenoloxidase and peroxidase to symptom expression in tobacco var. "Samsun N" after infection with tobacco mosaic virus. Acta Phytopathology, 6: 9-20.
34. Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., and Pieters, C.M. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 36: 453-483.
35. Vance, C.P., Anderson, J.O., and Sherwood, R.T. 1976. Soluble and cell wall peroxidase in reed canary grass in relation to disease resistance and localized lignin formation. Plant Physiology, 57: 920-922.
36. Vance, C.P., Kirk, T.K., and Sherwood, R.T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Annual Review of Phytopathology, 18: 259-288.
37. Vidhyasekaran, P. 1988. Physiology of disease resistance in plants. 1 and 2. CRC Press. London. England.
38. Wood, K.R. 1971. Peroxidase isozyme in leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars systemically infected with the W strain of cucumber mosaic virus. Physiological Plant Pathology, 1: 133-140.
39. Wood, K.R., and Barbara, D.J. 1971. Virus multiplication and peroxidase activity in leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivar systemically infected with W strain of cucumber mosaic virus. Physiological Plant Pathology, 1: 73-81.
40. Yamamoto, H. 1995. Pathogenesis and host-parasite specificity in rusts. In: Kohmoto, K., Singh, V., and Singh, R.P., eds. Plant disease histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. II. Eukaryots. Pergam, p: 407.