نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹، ص ۲۶۸-۲۵۸

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 3, Fall 2010, p. 258-268

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیدازالقاء شده توسط *Trichoderma harzianum* Bi در گیاهچه خیار و اثر آن در کنترل پوسیدگی ریشه و طوقه دراثر *Pythium aphanidermatum*

حمیده مرتضی نیا[۱*]- حمید روحانی[۲]- نوازا.. صاحبانی[۳]

تاریخ دریافت:۸۷/۱۲/۲۰
تاریخ پذیرش:۸۸/۱۲/۱۱

چکیده

Pythium aphanidermatum یکی از عوامل مهم پوسیدگی ریشه و طوقه خیار بخصوص در آب و هوای گرم و مرطوب می باشد. از جمله راه های مبارزه با این بیماری روش‌های بیولوژیک و القاء مقاومت گیاه بوسیله میکروارگانیسم‌ها و یا بعضی ترکیبات شیمیائی می‌باشد. بدین منظور از گونه *Trichoderma harzianum* Bi جهت القاء مقاومت در خیار بر علیه بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه استفاده شد. ابتدا بهترین زمان استفاده از قارچ مزبور در کنترل بیماری با انجام آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان دادند که بیشترین مقاومت القاء شده و در نتیجه کمترین درصد پوسیدگی ریشه و بیشترین وزن تر ریشه درگیاهچه های مایه زنی شده با *P.aphanidermatum* در روز هفتم بعد از تیمار ریشه بوسیله *T. harzianum* Bi بوجود می آید. بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز، آیزوزایم های آن و پروتئین های محلول در عصاره ریشه که می توانند بوسیله *T. harzianum* Bi درگیاهچه خیار القاء شوند با استفاده از روش های کالریمتری و الکتروفورز بومی، در گیاهچه های خیار تیمار شده با قارچ *T. harzianum* Bi، قبل و بعد از مایه زنی با *P. aphanidermatum* نشان داد که القاء مقاومت توسط جدایه *T. harzianum* Bi در ارتباط با حداکثرفعالیت آنزیم پراکسیداز می باشد. ازریابی فعالیت پراکسیداز براساس اکسیداسیون گوئیکول در حضور پراکسید هیدروژن و تغییر رنگ محلول به نارنجی متمایل به قرمز و با استفاده از اندازه گیری تغییرات جذب نور در دقیقه بر حسب میلی گرم پروتئین محلول در عصاره ریشه انجام شد. در بررسی مشابهی مشخص شد که قارچهای تریکودرما و پیتیوم هر یک به تنهائی می توانند باعث القاء مقاومت در گیاهچه خیار گردند. ولی مقاومت القاء شده توسط هر دو قارچ به همراه یکدیگر بیشتر، پایدارتر و طولانی مدت تر می باشد.

واژه‌های کلیدی: *Pythium aphanidermatum*، *Trichoderma harzianum* Bi، پوسیدگی ریشه و طوقه، مبارزه بیولوژیک، مقاومت القائی، پراکسیداز

مقدمه

در بین گونه های پیتیوم، *Pythium aphanidermatum* از جمله بیمارگرهای مهم گیاهی و عامل پوسیدگی ریشه و طوقه خیار، با گسترشی جهانی و دامنه میزبانی وسیع بخصوص در مناطق گرم و گلخانه‌ها می باشد (۱). از جمله راه های مبارزه با این بیماری، کنترل بیولوژیک آن است. اخیراً تحقیقات بسیاری پیرامون مقاومت القایی گیاه که توسط محرک های خارجی در گیاه اعمال می‌شود، صورت گرفته است (۷). بطورکلی پس از شناسائی بیمارگر(یا عوامل غیر بیمارگر) توسط میزبان، مکانیزم های دفاعی آن به صورت موضعی یا سیستمیک، فعال می شوند. تاکنون عوامل متعددی در گیاهان به عنوان مکانیزم های دفاعی شناخته شده اند. از جمله سنتز و ترشح ترکیبات فنلی داخل و خارج سلول، سنتز فیتوالکسین‌ها، پروتئین های مرتبط با بیماری زایی، سنتز گلیکوپروتئین‌های غنی از اسیدهای آمینه غیر معمول مانند هیدروکسی پرولین (HPRG) یا هیدروکسی گلیستین (HGRG) وغیره (۲۳،۱۷ و۲۴).

از جمله پروتئین های مرتبط با بیماری زایی، می توان به پراکسیدازها (خانواده PR-9) اشاره کرد (۲۲). برای اولین بار مِکو (۱۹۶۸) دخالت آنزیم پراکسیداز را در واکنش‌های دفاعی، و

۱و۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول:Email: asadeh_m@yahoo.com)
۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران (پردیس ابوریحان)

لِهِرر(۱۹۶۹) اثر بازدارندگی پراکسیداز را روی رشد عوامل بیماری زا اثبات کردند. آنزیم پراکسیداز در قسمتهای مختلف سلول از جمله هسته، میتوکندری، ریبوزوم، دیواره سلولی و غشاء سلولی یافت می‌شود و تاکنون چندین آیزوزایم[1] پراکسیداز شناخته شده است (۱۱).

این آنزیم در شماری از عملکردهای متابولیکی اولیه و ثانویه مختلف از جمله، در تنفس گیاهان عالی، از طریق اکسیداسیون متابولیتها با واسطه پراکسید هیدروژن به عنوان پذیرنده الکترون (۱۱)، تنظیم کشیدگی سلول[2] (۱۴)، ایجاد پل‌های عرضی[3] مونومرهای اگستنسین[4] و پلی ساکاریدهای فرولویلاته[5] در دیواره سلولی (۱۲ و۲۷)، لیگنیفیکاسیون(۸،۱۶و۳۲)، اکسیداسیون فنول (۲۷ و۳۱) و رسوب مواد فنولی بر روی دیواره‌های سلولی در طی واکنش‌های مقاومت (۱۵)، التیام دادن زخم‌ها[6] (۹) نقش دارند. بعلاوه پراکسیدازها در مقاومت گیاه اثر مستقیم داشته و از طریق تولید رادیکال آزاد (۲۰) و پراکسید هیدروژن (۲۵)، که برای بعضی بیمارگرها سمی هستند، منجر به مقاومت گیاه در برابر بیمارگر (۱۸) می‌شوند.

اینطور به نظر می‌رسد که پراکسیداز زودتر از ترکیبات دیگر در پراکسیداسیون مولکولهای سوبسترا درگیر شود و نهایتاً منجر به تجمع بالای ترکیبات سمی یعنی ترکیبات فنلی اکسید شده (مانند کینون‌ها[7]) گردد. این ترکیبات در مقاومت گیاه از طریق پتانسیل ضد قارچیشان شرکت می‌کنند (۳۳). نکته قابل توجه این است که همیشه افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز همراه با واکنش ناسازگار بین گیاه و بیمارگرنمی باشد (۳۴)، اما در اغلب موارد فعالیت پراکسیداز در موقعیت ناسازگاری بیشتر از حالت سازگاری است (۶،۱۰و۲۹). در این راستا یدیدیا و همکاران (۳۵) برای اولین بار مدارکی ارائه دادند که قارچ (T-203) *T. harzianum* می تواند به سیستم ریشه گیاه خیار نفوذ کند، و بدون آنکه خسارت قابل توجهی به گیاه وارد کند،باعث تحریک آن به تولید ترکیبات ناپایداری از جمله PR-پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی مانند پراکسیداز و کیتیناز گردد، که این ترکیبات نقش مهمی در واکنش‌های دفاعی میزبان به عهده دارند. ساری، نیز افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز را در گندم‌های مایه‌کوبی شده با *Bacillus pumillus* 7Km و *Pseudomonas fluorescens* (جدایه CHAO) و نقش آن را در مقاومت علیه بیماری پاخوره گندم گزارش کرد (۲).

1- Isozyme
2- Regulation of cell elongation
3- Cross-linking
4- Extensin
5- Feruloylated
6- Wound-healing
7- Quinones

در این تحقیق تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه های خیار تیمار شده با *Trichoderma harzianum* Bi، قبل و بعد از مایه زنی با *Pythium aphanidermatum* مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

تهیه مایه تلقیح *Pythium aphanidermatum*

قارچ*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitz از بخش گیاهشناسی مؤسسه تحقیقات کشاورزی تهران تهیه گردید. جهت تهیه مایه تلقیح از روش رامرتی و همکاران (۲۶) با کمی تغییرات استفاده شد. در این روش۲۰۰ سانتی متر مکعب از خاک باغچه (دارای بافت لوم شنی)، ۲۰۰ سانتی متر مکعب ماسه بادی شسته شده،۴۰ گرم آرد ذرت و۸۰ میلی لیتر آب مقطر، در یک ارلن مایر ۱۰۰۰ میلی لیتری به خوبی مخلوط شد، و دو مرتبه ، به فاصله ۲۴ ساعت، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر به مدت۳۰ دقیقه استریل شد. سپس چهار قطعه محیط کشت حاوی کشت سه روزه *Pythium aphanidermatum* روی CMA، به قطر دو سانتی متر به ارلن مایراضافه شد و به مدت سه هفته در دمای ۲۷±۲ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از رشد کامل قارچ، محتوی ارلن مایر به هم زده شد و به نسبت پنج در صد به عنوان اینوکولوم با خاک گلدان ها مخلوط گردید(۱۰ گرم اینوکولوم در۲۰۰ گرم خاک گلدان شامل خاک مزرعه، پیت، پرلیت و ماسه به نسبت ۲-۲-۱-۱).

تهیه مایه تلقیح*Trichoderma harzianum* Bi

استرین *Trichoderma harzianum Bi* به طور آماده از بانک ژن گروه گیاهپزشکی ،دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد دریافت شد. پس از تک اسپور و خالص کردن، قارچ (قابلیت این استرین در تحریک مقاومت گیاه قبلاً توسط ملکی (۳) اثبات شده بود) روی محیط کشت PDA کشت داده شد. بعد از ۱۰ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد، سطح ظروف کشت حاوی اسپور پنج روزه، با استفاده از پیپت پاستور خم شده و۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی یک قطره Tween 20 به خوبی شسته و توسط پارچه ململ استریل صاف شد. با استفاده از لام هموسیتومتر تعداد اسپورها شمارش و با استفاده از آب مقطر استریل رقت آنها به ۱×۱۰^{۷} عدد در میلی لیتر رسانده شد. جهت افزایش چسبندگی آن به میزان ۰/۷ درصد کربوکسی متیل سلولاز[8] با غلظت بالا به سوسپانسیون اضافه گردید.

8- Carboxy Methyl Cellulose (CMC)

بررسی تغییرات مقاومت گیاهچه خیار نسبت به *P. Aphanidermatum* بعد از تلقیح آن بوسیله *T. harzianum* Bi

این بررسی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۸ تیمار و ۳ تکرار در شرایط گلخانه (۲±۲۷) به اجرا در آمد. تیمار های آزمایش عبارت بودند از ۸ زمان نمونه برداری از گیاهچه هائی که بوسیله قارچ *T.harzianum* Bi (آنتاگونیست) و سپس بوسیله *P.aphanidermatum* (عامل بیماری) آلوده شده بودند. برای این منظور ۹۶ بدر خیار رقم سوپردومینوس (متحمل به پیتیوم) در ۲۴ گلدان ۲۰۰ میلی لیتری حاوی پرلیت کاشته شد. گلدان ها بطور یک روز در میان بوسیله ۵۰ میلی لیتر محلول غذائی هوگلند آبیاری شدند. ۷ روز بعد که گیاهچه ها به مرحله سه برگی رسیدند، به دقت از پرلیت خارج و پس از شستشوی ریشه آنها با آب شهری، به مدت ۲ دقیقه در سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۷}$ اسپور *T. harzianum* Bi که به میزان ۰/۷ درصد کربوکسی متیل سلولز به آن اضافه شده بود (برای بالا بردن چسبندگی اسپورها به ریشه) قرار داده شدند. برای تیمار شاهد بجای سوسپانسیون اسپور از آب مقطر حاوی ۰/۷ درصد کربوکسی متیل سلولز استفاده شد. گیاهچه ها بلافاصله به گلدان های ۲۰۰ گرمی حاوی خاک اتوکلاو شده گلدان انتقال و مورد آبیاری قرار گرفتند. صفر، ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و۱۱ روز بعد از آغشته سازی ریشه گیاهچه ها بوسیله سوسپانسیون *T. harzianum* Bi و انتقال آنها به گلدانهای ۲۰۰ گرمی، هر گلدان با اضافه کردن ۱۰ گرم اینوکولوم *P. aphanidermatum* و مخلوط کردن آن با خاک سطحی گلدانها مایه زنی گردیدو بلافاصله آبیاری گردید. به این ترتیب ۸ تیمار به شرح زیر تهیه شد: تیمار شاهد(C) مایه زنی شده با *P. aphanidermatum* و بدون تیمار با *T. harzianum* Bi ، تیمار (T) که در آن آغشته سازی ریشه گیاهچه ها بوسیله *T.harzianum* Bi و مایه زنی آنها بوسیله*P.aphanidermatum* در یک روز صورت گرفت،و بالاخره تیمارهای ۱dPt، ۳ dPt، ۵ dPt، ۷ dPt و ۹ dPt و ۱۱ که به ترتیب بین ۱ تا ۱۱ روز بعد از آغشته سازی ریشه گیاهچه ها با*T.harzianum* Bi ، بوسیله *P. aphanidermatum* مایه زنی شدند. ۷ روز بعد از مایه زنی آخرین تیمار (تیمار۱۱ dPt) بوسیله *P. aphanidermatum* ، گیاهچه ها به آرامی از گلدانها خارج و پس از شستشوی ریشه آنها با آب شهری، از نظروزن تر ریشه و شدت علائم پوسیدگی در منطقه طوقه و ریشه مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای ارزیابی شدت پوسیدگی از روش ژانگ و همکاران (۳۶) استفاده شد. در این روش نمره ۱ برای گیاهچه هائی که به طور کامل سالم بوده و هیچ علائمی ندارند، نمره ۲ برای پوسیدگی خفیف ریشه (کمتر از یک سوم ریشه پوسیده باشد.)، نمره ۳ برای پوسیدگی متوسط ریشه (یک سوم یا دو سوم ریشه پوسیده باشد.)، و نمره ۴ برای پوسیدگی شدید ریشه (بیشتر از دو سوم ریشه پوسیده) و یا گیاه از بین رفته باشد (مرگ گیاهچه) در نظر گرفته می شود. برای محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده ها از دو برنامه نرم افزاری MINI TAB 13 و MSTATCI، و برای رسم نمودارها، از برنامه نرم افزاری excel استفاده گردید.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسید از القاء شده توسط قارچ*T. harzianum* Bi در گیاهچه خیار

با توجه به نتایج آزمایش قبلی که نشان داد بیشترین مقاومت گیاهچه ها مقابل *P. aphanidermatum* درروز هفتم بعد از تیمار آنها با قارچ تریکودرما بروز میکند، آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل در دو سطح، ۲۴ تیمارو ۴ تکراردر شرایط گلخانه به اجرا در آمد. فاکتور اصلی شامل گیاهچه های آغشته شده و آغشته نشده به تریکو درما ، و فاکتورهای فرعی شامل ۶ تیمار مربوط به ۶ نوبت نمونه برداری در مدت ۶ روز پی در پی پس از آغشته سازی ریشه گیاهچه ها بوسیله قاچ تریکودرما بود. برای انجام این آزمایش ۴ بذر خیار رقم سوپر دومینوس (متحمل به پیتیوم) در ۴۸ گلدان ۲۰۰ گرمی حاوی پرلیت کاشته شد و یک روز در میان بوسیله ۵۰ میلی ایتر محلول غذائی هوگلند آبیاری شدند. ۷ روز بعد گیاهچه ها از پرلیت خارج وریشه نیمی از آنها (گیاهچه های ۲۴ گلدان) ، مانند آنچه در آزمایش قبلی توضیح داده شد، بمدت ۲ دقیقه در سوسپانسیون $۱۰^{۷}$اسپور تریکودرما حاوی ۰/۷ در صد کربوکسی متیل سلولزقرار داده شد ند. برای نیمی دیگر از محلول ۰/۷ در صد کربوکسی متیل سلولز بدون سوسپانسیون اسپور تریکودرما در آب مقطراستفاده شد. گیاهچه های تیمار شده بلافاصله به گلدانهای ۲۰۰ گرمی حاوی خاک گلدان اتوکلاو شده انتقال داده شد ند (مانند روش قبلی). آبیاری گلدان ها در حد معمول بطور یک روز در میان از کناره گلدانها صورت پذیرفت. اولین نمونه برداری جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز دوم بعد از آغشتگی گیاهچه ها با قارچ تریکودرما بود(شامل ۴ گلدان آغشته شده و ۴ گلدان آغشته نشده بعنوان شاهد). نمونه برداریهای دوم تا هفتم یک تا ۶ روز بعد از نمونه برداری اول انجام شد. پس از نمونه برداری ریشه گیاهچه ها به ملایمت شسته وجهت تعین فعالیت آنزیم پراکسیداز در -۲۰^{oC} نگهداری شدند.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز القاء شده توسط *T. harzianum* Bi ، *P. aphanidermatum* و مخلوط این دو در گیاهچه های خیار

این بررسی در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل

شامل ۴ فاکتور اصلی و ۶ فاکتور فرعی با۴ تکرار در شرایط گلخانه انجام شد.فاکتور های اصلی عبارت بودند از: ۱- گیاهچه های تیمار شده با قارچ تریکودرما ۲- گیاهچه های تیمار شده با قارچ پیتیوم ۳- گیاهچه های تیمار شده با هر دو قارچ ۴- گیاهچه های بدون تیمار (شاهد). فاکتور های فرعی عبارت بودند از: ۶ زمان نمونه برداری بین ۹ تا ۱۴ روز بعد از تیمار گیاهچه ها با قارچ تریکودرما، مصادف با ۲ تا ۷ روز بعد از تلقیح گیاهچه ها با قارچ پیتیوم. برای این منظور ۴ بذر خیار رقم سوپر دومینوس (متحمل به پیتیوم) در ۹۶ گلدان ۲۰۰ گرمی حاوی پرلیت کاشته شد. پس از یک هفته، مانند آنچه که در آزمایش اول توضیح داده شد، گیاهچه ها از پرلیت خارج و بعد از آغشته سازی ریشه نیمی از آنها (۴۸ گلدان)بوسیله سوسپانسیون 10^7 اسپور در هر میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰.۷ درصد کربوکسی متیل سلولز ونیمی دیگر با محلول ۰.۷ درصد کربوکسی متیل سلولز گیاهچه ها به گلدانهای ۲۰۰ گرمی حاوی خاک اتوکلاو شده گلدان انتقال یافتند.بعد از ۷ روز ۱۰ گرم اینوکولوم به ۴۸ گلدان شامل ۲۴ گلدان تیمار شده با قارچ تریکودرما و ۲۴ گلدان بدون هیچ تیمار اضافه شد وبلافاصله با خاک قسمت سطحی گلدانها مخلوط و مورد آبیاری قرار گرفتند. به ۴۸ گلدان باقی مانده ۱۰ گرم بستر اینوکولوم بدون *P.aphanidermatum* اضافه شد. نمونه برداری ازگیاهچه ها برای تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز در روزهای ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲و ۱۴ بعد از آغشته سازی ریشه گیاهچه ها بوسیله تریکودرما صورت گرفت. این روزها مصادف با ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۸ روز بعد از مایه زنی گیاهچه ها با *P.aphanidermatum* بود. برای این کار گیاهچه ها از گلدان ها خارج و پش از شتشوی ریشه آنها با آب شهری، تا اندازه گیری فعالیت آنزیم پر اکسیداز در -20^oC نگهداری شدند.

استخراج عصاره پروتئینی از ریشه جهت بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز

استخراج عصاره پروتئینی نمونه‌ها جهت بررسی فعالیت پراکسیدازهای محلول در سیتوپلاسم به روش کن و همکاران (۵) با تغییراتی صورت گرفت. برای تهیه بافرهای مورد نیاز در مراحل مختلف تحقیق از روش استول و بلانچارد (۳۰) استفاده شد.

مقدار ۰/۵ گرم از ریشه‌های نمونه برداری شده پس از آب گیری سطحی با دستمال کاغذی، در هاون چینی سرد با استفاده از ازت مایع بصورت پودر نرمی ساییده شد. سپس یک میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (pH = ۶) به آن اضافه و بخوبی یکنواخت گردید. عصاره حاصل به میکروتیوب ۲ میلی لیتر منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g به وسیله میکرو سانتریفوژ یخچالدار در دمای ۴ درجه سانتریفوژ گردید و رونشست[1] آن به عنوان عصاره پروتئینی جدا و در۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

ارزیابی مقدار کل پروتئین محلول در عصاره ریشه

جهت تعمیم فعالیت آنزیم به واحد میلی گرم پروتئین موجود در بافت گیاه، میزان پروتئین کل موجود در عصاره ریشه نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد (۴) محاسبه گردید. برای انجام این کارابتدا ۹ گروه سه تایی (سه تکرار) لوله آزمایش کوچک (۵ میلی لیتری) آماده و در هر لوله مقدار سه میلی لیتر محلول برادفورد ریخته شد. سپس مقادیر ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰و ۷۰ میکرولیتر از محلول پروتئین استاندارد (BSA) به ترتیب و به طور جداگانه به هر گروه از لوله‌های آزمایش اضافه شد و پس از اختلاط کامل، بلافاصله میزان جذب نور در λ_{max} = ۵۹۵nm (محدوده نور آبی) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر[2] قرائت شد. لوله حاوی صفر میکرولیتر محلول پروتئین استاندارد جهت صفر کردن دستگاه استفاده شد. میانگین ارقام قرائت شده برای هر مقدار پروتئین استاندارد، برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد.

جهت تعیین مقدار کل پروتئین محلول نمونه های گیاهی، مطابق روش مذکور و با استفاده از ۱۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، میانگین جذب نور عصاره محاسبه و به کمک منحنی استاندارد، مقدار کل پروتئین محلول در هر نمونه گیاهی بصورت میلی گرم پروتئین در هر گرم بافت تازه ریشه گیاه محاسبه گردید.

ارزیابی فعالیت پراکسیداز در عصاره ریشه گیاه

ارزیابی فعالیت پراکسیداز بر اساس اکسیداسیون گوئیکول و تغییر رنگ محلول به رنگ نارنجی متمایل به قرمزو به روش جنینگز و همکاران (۱۹) با کمی تغییرات انجام شد. دو میلی لیتر محلول واکنش شامل مقدار کافی بافر سیترات فسفات ۲۵ میلی مول (pH=۵/۴)، مقداری از عصاره پروتئینی گیاه که حاوی۳۰ میکروگرم پروتئین باشد و۳۰ میکرولیتر گوئیکول[3] ۲۰۰ میلی مول، پس از اختلاط کامل در کیووت اسپکتروفتومتر ریخته و بر اساس آن دستگاه مزبور روی صفر تنظیم شد. دستگاه اسپکتروفتومتر برای یک برنامه کینتیک[4] تنظیم گردید که به مدت یک دقیقه و در فواصل۱۰ ثانیه، تغییر در میزان جذب نور محلول را ثبت کند. سپس پنج میکرولیتر پراکسید هیدروژن[5] ۳۰٪ به محلول درون کیووت اضافه شد، پس از اختلاط مختصر بلافاصله در دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت یک دقیقه و در

1- Supernatant

2- UV\Visible 160-A Shimadzu
3- Guaiacol
4- Kinetic program
5- H_2O_2

فواصل۱۰ ثانیه، تغییر میزان جذب نور در طول موج حداکثر۴۷۵ نانومتر ثبت شد. سپس معادله رگرسیون بین تغییر جذب نور و زمان محاسبه و شیب تغییر میزان جذب برای هر میلی گرم پروتئین و هر گرم بافت تازه ریشه گیاه محاسبه گردید.

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

در این تحقیق بررسی آیزوزایم‌های پراکسیدازهای محلول به روش گارفین و همکاران (۱۵) با استفاده از ژل جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۶ درصد، صورت گرفت. همچنین برای بارگذاری، مقداری از عصاره پروتئینی گیاه حاوی ۲۰ میکروگرم پروتئین، تهیه و حجم آن با افزودن بافر نمونه ناواسرشت[1] به۸۰ میکرولیتر رسانده شد و پس از اختلاط کامل توسط سوزن همیلتون در چاهک مورد نظر تخلیه شد. شدت جریان در ژل متراکم کننده برابر۷۵ ولت و در ژل جدا کننده برابر۱۰۰ ولت تنظیم گردید. شدت جریان ابتدا ۲۱ میلی آمپر و به تدریج به ۹ میلی آمپر رسید. در تمام مدت Run شدن ژل، سیستم در حالت سرد نگه داشته شد.

رنگ آمیزی ژل به روش جنینگز و همکاران (۱۹) تغییر یافته توسط محمدی (۲۱) انجام شد. ابتدا ژل Run شده از بین صفحات شیشه ای خارج و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد، سپس در بافر سیترات فسفات ۲۵ میلی مول pH=۵/۴ حاوی گوئیکول با غلظت نهایی پنج میلی مول به مدت۳۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. سپس پراکسید هیدروژن۳۰٪ به غلظت نهایی یک درصد به بافر اضافه گردید تا جایی که باندها دیده شوند. ظرف کمتر از۳۰ ثانیه نوارهای قرمز قهوه ای ظاهر شدند که نشان دهنده آیزوزایم‌های پراکسیداز بودند. آنگاه ژل از بافر خارج و با آب مقطر شستشو شد. بلافاصله پس از شستشوی ژل شاخص Rm[2] آیزوزایم‌ها تعیین و محاسبه شد و از ژل عکس برداری به عمل آمد. لازم به ذکر است که ژل مربوطه را می توان بین دو عدد تلق همراه با آب مقطر در دمای چهار درجه سانتی گراد (یخچال) تا زمان عکس برداری نگهداری کرد.

کلیه آزمایش ها در گلخانه با دمای حداکثر ۳۰ و حداقل۲۰ درجه سانتیگراد و در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. در تمام موارد برای محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده ها از دو برنامه نرم افزاری MINI TAB 13 و MSTATCI، و برای رسم نمودارها، از برنامه نرم افزاری excel استفاده گردید.

1- Native sample buffer
2- Rate of mobility

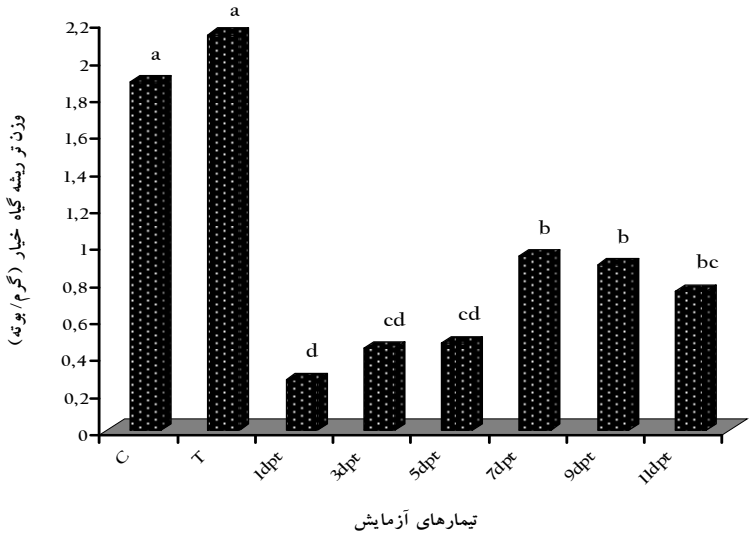
نتایج و بحث

بررسی تغییرات مقاومت گیاهچه خیار نسبت به *P.aphanidermatum* بعد از تلقیح آن بوسیله *T.harzianum* Bi

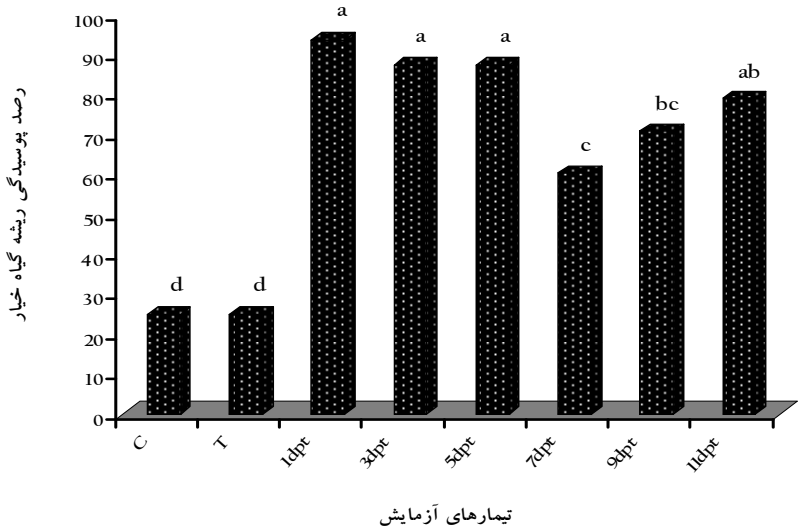
به این منظور دو شاخص وزن تر ریشه و درصد پوسیدگی ریشه گیاهچه‌های خیار به ترتیب مورد بررسی قرار گرفت. بین تیمارهای مختلف این آزمایش در شاخص وزن تر ریشه گیاه از نظر آماری تفاوت معنی دار ($P\leq0.01$) مشاهده شد. نتایج در شکل۱ مشاهده می‌شود. وزن تر ریشه در دو تیمار T وC بیشترین مقدار را دارا بود. پس از این دو تیمار، تیمار (روز هفتم) بیشترین مقدار وزن تر ریشه را نشان داد. اگرچه این میزان اختلاف معنی داری با مقدار وزن تر ریشه گیاهچه‌های مایه‌کوبی شده با *P. aphanidermatum* در روزهای نهم و یازدهم پس از تیمار با *T. harzianum* Bi نشان نداد. نکته قابل توجه در این آزمایش اختلاف معنی دار در وزن تر ریشه گیاهچه‌های مایه‌کوبی شده با *P. aphanidermatum* در روزهای پنجم پس از تیمار با *T. harzianum* Bi، با روز هفتم پس ازتیمار با *T. harzianum* Bi بود.

بین تیمارهای مختلف این آزمایش در شاخص درصد پوسیدگی ریشه گیاه از نظر آماری تفاوت معنی دار ($P\leq0.01$) مشاهده شد. نتایج در شکل۲ مشاهده می‌شود. شاخص درصد پوسیدگی ریشه در دو تیمار T وC کمترین مقدار را دارا بود. پس از این دو تیمار، تیمار (روز هفتم) کمترین درصد پوسیدگی را نشان داد. اگرچه این میزان اختلاف معنی داری را با درصد پوسیدگی ریشه گیاهچه‌های مایه‌کوبی شده با *P. aphanidermatum* در روز نهم پس از تیمار با*T.harzianum* Bi نشان نداد. بیشترین میزان خسارت و درصد پوسیدگی مربوط به گیاهچه‌های مایه‌کوبی شده با*P.aphanidermatum* در روزهای اول، سوم، پنجم و یازدهم پس از تیمار با *T. harzianum* Bi بود.

بنابراین با توجه به تشابه شکل های ۱ و ۲ از نظر آماری، به نظر می رسد که روز هفتم پس از تیمار با *T. harzianum Bi* بهترین زمان برای مایه‌کوبی گیاهچه‌ها با *P. aphanidermatum* جهت کاهش معنی دار میزان بیماری نسبت به دیگر تیمارهای آزمایش می‌باشد که این نتایج با نتایج بدست آمده توسط چن و همکاران (۵) در بررسی اثر ریزوباکتری‌های مختلف بر کنترل *Pythium aphanidermatum* در خیار، همخوانی دارد. به نظر می‌رسد که القاء صورت گرفته در گیاهچه خیار توسط *T. harzianum Bi* ، همانند PGPRها، پس از هفت روز بهترین اثر خود را در کنترل عامل مرگ گیاهچه خیار بروز می‌دهد.



شکل۱- مقایسه میانگین وزن تر ریشه گیاهچه های خیار که در روزهای مختلف پس از آغشته سازی ریشه آنها بوسیله *T. harzianum* Bi ،توسط *P.aphanidermatum* مایه کوبی شده اند. C: شاهد بدون تریکودرما T: مایه کوبی همزمان گیاهچه‌ها بوسیله هر دو قارچ (روز صفر). 1dpt تا 11dpt : مایه کوبی گیاهچه ها بوسیله پیتیوم در فاصله های ۱ تا۱۱ روز بعد از آغشتگی ریشه آنها به تریکودرما. هرعدد، میانگین سه تکرار می‌باشد. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون دانکن با احتمال P=0.05 دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند.



شکل۲- مقایسه میانگین‌های شاخص درصد پوسیدگی ریشه گیاهچه‌های خیار که در روزهای مختلف پس از آغشته سازی ریشه آنها بوسیله *T. harzianum*Bi ،توسط *P.aphanidermatum* مایه کوبی شده اند. C: شاهد بدون تریکودرما T: مایه کوبی همزمان گیاهچه‌ها بوسیله هر دو قارچ (روز صفر). 1dpt تا 11dpt : مایه کوبی گیاهچه ها بوسیله پیتیوم در فاصله های ۱ تا۱۱ روز بعد از آغشتگی ریشه آنها به تریکودرما. هرعدد، میانگین سه تکرار می‌باشد. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون دانکن با احتمال P=0.05 دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند.

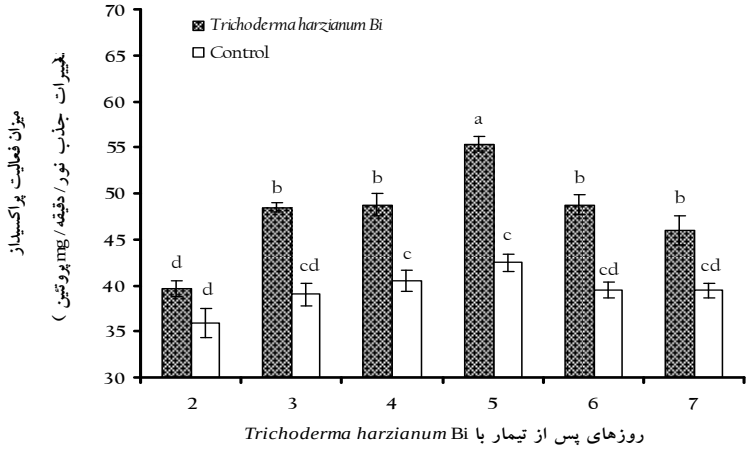
بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسید از القاء شده توسط قارچ تریکودرما در گیاهچه خیار

نتایج بدست آمده نشان دادند که در آزمون F، بین تیمارها، بین روزهای نمونه برداری و اثر متقابل آنها در فعالیت پراکسیدازهای محلول اختلاف معنی دار ($P\leq0.01$) وجود دارد (شکل ۳). فعالیت آنزیم پراکسیداز از روز سوم بعد از تیمار ریشه با *T. harzianum* Bi نسبت به شاهد سالم افزایش نشان داد. این افزایش در روز پنجم به حداکثر میزان خود رسید و سپس رو به کاهش گذاشت اما همچنان نسبت به شاهد سالم در روزهای بعدی دارای اختلاف معنی دار بود.

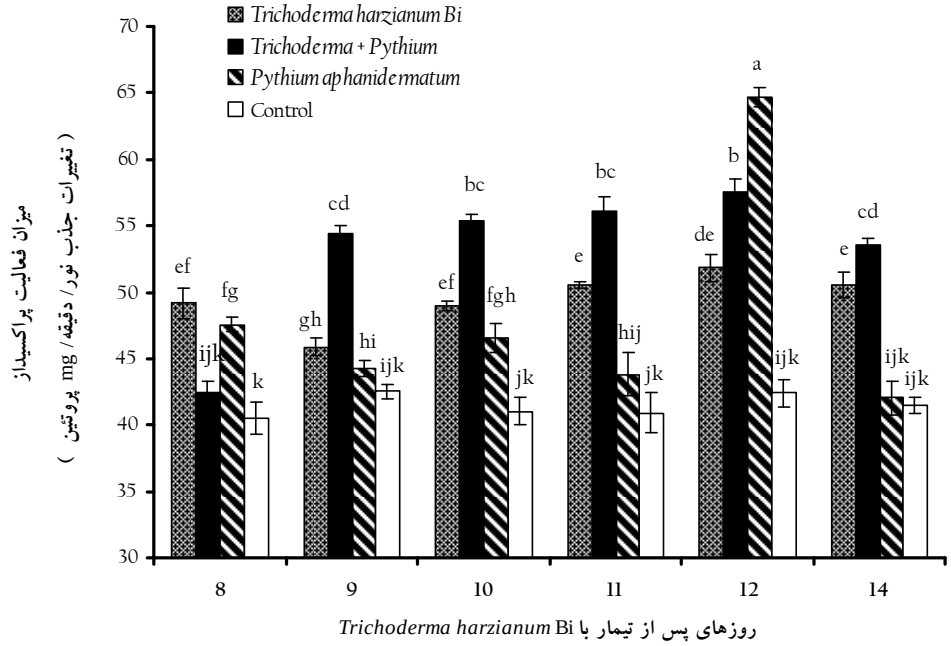
بررسی های یدیدیا و همکاران (۳۵) نشان می دهد که آنزیم پراکسیداز در روز دوم پس از مایه‌کوبی با جدایه *T.harzianum* (T-203) به حداکثر میزان خود رسیده است که با نتایج این تحقیق تفاوت دارد. در حالی که مطالعات چن وهمکاران (۵) روی اثر ریزوباکتری‌های مختلف بر کنترل *Pythium aphanidermatum*، و اثر آن ها در القاء آنزیم پراکسیداز و زمان به حداکثر رسیدن میزان آن با نتایج این تحقیق هماهنگ است. بدین ترتیب که در جدایه‌های مختلف ریزو باکترها، افزایش معنی دار آنزیم پراکسیداز ۲ تا ۵ روز پس از مایه‌کوبی باکتری صورت گرفت که در این بین، *Pseudomonas corrugata* جدایه 6328، در روز پنجم، دارای حداکثر میزان می‌باشد.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز القاء شده توسط *T. harzianum* Bi ، *P. aphanidermatum* و مخلوط این دو در گیاهچه های خیار

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، نمونه برداری ها وآنالیز دادها از روز هشتم پس از تیمار با *T. harzianum* Bi و یک روز پس از مایه‌کوبی با *P. aphanidermatum* صورت گرفته است. نتایج بدست آمده نشان داد که بین تیمارها، بین روزهای نمونه برداری و اثر متقابل آنها در فعالیت پراکسیداز اختلاف معنی دار ($P \leq 0.01$) وجود دارد. فعالیت پراکسیداز با مقاومت در برابر بیماری در گیاهان مرتبط بوده (۱۸) و به دنبال مایه‌کوبی بیمارگر در گیاهان میزبان افزایش می‌یابد (۲۸). در تأیید این اظهارات و باتوجه به نتایج به دست آمده در آزمایش قبلی، پس از مایه‌کوبی *Pythium aphanidermatum*، بطور کلی در دو تیمار گیاهچه های تیمار شده و تیمار نشده با *T. harzianum* Bi، میزان فعالیت آنزیم افزایش یافته و در روز پنجم پس از مایه‌کوبی *Pythium aphanidermatum*، دارای حداکثر میزان می‌باشد. در تأیید این نتیجه چن و همکاران (۵) نیز حداکثر میزان فعالیت پراکسیداز را ۶ روز پس از مایه‌کوبی *P. aphanidermatum* به تیمارهای مایه‌کوبی شده با ریزوباکتری‌ها، دانستند. بطور کلی گیاهان مایه‌کوبی شده توسط *T. harzianum* Bi، که با *P. aphanidermatum* نیز مایه‌کوبی شده اند، نسبت به گیاهانی که تنها با*P.aphanidermatum* مایه‌کوبی شده اند روند پایدارتری را در بالا نگاه داشتن میزان پراکسیداز نشان دادند که این نشان از کنترل قابل ملاحظه بیماری در این تیمار دارد. این روند مشابه با روند فعالیت پراکسیداز در گیاهان مایه‌کوبی شده با جدایه CH33 از ریزوباکتری *Pseudomonas corrugate* و *P. aphanidermatum* در تحقیق چن و همکاران (۵) می‌باشد. از نظر مورفولوژی نیز این گیاهان از سلامت بیشتری برخوردار بودند و تا روز آخر علائم بیماری در اندام‌های هوائی کمتر دیده شد. کاهش قابل ملاحظه در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه‌های گیاهان مایه زنی شده با *P.aphanidermatum* به تنهایی، به نظر می‌رسد که بیانگر مسدود شدن ریشه‌ها و از بین رفتن بوته‌ها می‌باشند. همچنین در گیاهان مایه‌کوبی شده با *T. harzianum* Bi و *P.aphanidermatum* کاهش مشاهده شده در میزان فعالیت آنزیم که البته همچنان دارای اختلاف معنی دار با تیمار تریکودرما تنها بود، به نظر می‌رسد نشان از شروع زوال در القاء صورت گرفته در این تیمار دارد. باید توجه داشت که روال ثابت شکل شاهد سالم نشان از صورت نگرفتن القاء در این تیمار نسبت به تیمارهای دیگر دارد.



شکل۳- اثر قارچ *Trichoderma harzianum* Bi در مقایسه با گیاه شاهد سالم، روی فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول در ریشه خیار. اعداد مربوط به شکل، میانگین چهار تکرار و خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (SE ±) می‌باشد. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون دانکن با احتمال $P = 0.05$ دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند. فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب نور در ۴۷۵ نانومتر در دقیقه در میلی گرم پروتئین نشان داده شده است.



شکل٤- اثر *Trichoderma harzianum* Bi ، *Pythium aphanidermatum* و مخلوط آنهاروی فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول در ریشه خیار. اعداد مربوط به شکل، میانگین چهار تکرار و خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (SE ±) می‌باشد. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون دانکن با احتمال P = 0.05 دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند. فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب نور در ۴۷۵ نانومتر در دقیقه در میلی گرم پروتئین نشان داده شده است.

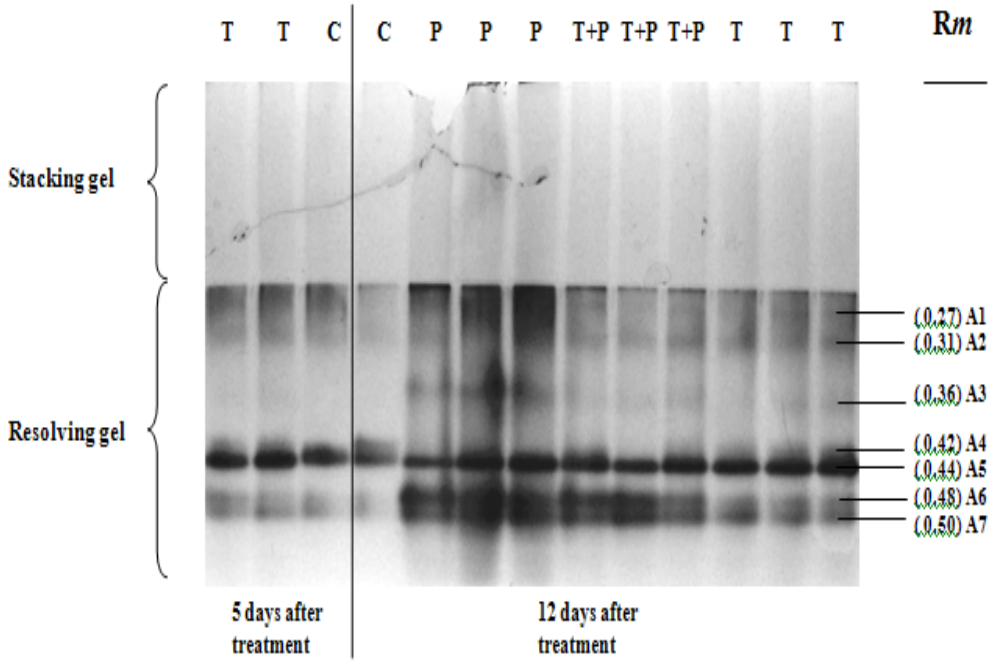
نتایج مربوط به بررسی الگوی آیزوزایمی آنزیم پراکسیداز در ریشه گیاهان شاهد سالم، تیمار شده با *T. harzianum* Bi، مایه زنی شده با *P.aphanidermatum* عامل مرگ گیاهچه خیار و گیاهان مایه‌کوبی شده با هر دو میکروارگانیسم، نشان داد که فعالیت پراکسیدازهای محلول در عصاره ریشه در روز پنجم پس از تیمار گیاهچه با *T. harzianum* Bi به تنهایی و در روز دوازدهم پس از تیمار گیاهچه با *T. harzianum* Bi به اضافه مایه زنی با*P.aphanidermatum* (مصادف با روز پنجم پس از مایه‌کوبی با *P. aphanidermatum*)، با استفاده از Native-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. عصاره ریشه‌های خیار حاوی هفت آیزوزایم پراکسیداز بودند که بصورت ۷ باند آنیونی (اسیدی) شامل A1 (Rm= 0.27)، A2 (Rm= 0.31)، A3 (Rm= 0.36)، A4 (Rm= 0.42)، A5 (Rm= 0.44)، A6 (Rm= 0.48)، A7 (Rm= 0.50) در ژل جداکننده از هم تفکیک شدند. در این آزمون هیچ گونه آیزوزایم بازی پراکسیداز در عصاره ریشه‌های خیار در ژل متراکم کننده مشاهده نشد.

ایزوپراکسیدهای القاء شده بوسیله *T. harzianum* Bi و*P.aphanidermatum* در ریشه گیاه خیار از نوع آیزوزایم‌های آنیونی هستند. این نتیجه مطابق با نتیجه تحقیق صورت گرفته توسط چن و همکاران (۵) در بررسی اثر ریزوباکتری‌های مختلف بر کنترل*P. aphanidermatum*، می‌باشد. همچنین باندهای ایجاد شده در مورد *P. aphanidermatum* با باندهای مشاهده شده توسط چن و همکاران مشابهت داشتند. آیزوزایم‌های A6 و A7 در گیاهان مایه زنی شده به وسیله *P. aphanidermatum* به تنهایی (P) و مایه زنی شده به وسیله هر دو قارچ*P.aphanidermatum* و *T. harzianum* Bi (T+P) در مقایسه با گیاهان تیمار شده با*T. harzianum* Bi به تنهایی (T)، به میزان بیشتر در روز دوازدهم القاء شده است و می توان پذیرفت که القاء این دو آیزوزایم بیشتر تحت تأثیر عامل بیمارگر *P.aphanidermatum* بوده است. به نظر می‌رسد آیزوزایم‌های5A، A6 و A7 دارای فعالیت مشابهی در سیستم دفاعی گیاهان مایه زنی شده با P وT+P می باشند و از آنجا که آیزوزایم A5 در شاهد سالم (C) نیز با تراکم زیادی ظاهر شده است می توان نتیجه گرفت که این آیزوزایم در فرایند القاء نقش مؤثری نداشته باشد. همچنین عدم وجود آیزوزایم A4 در گیاهان مایه زنی شده با P وT+P، می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که پس از ورود عامل بیماری به گیاه، این آیزوزایم کاهش می‌یابد، یعنی ممکن است در سیستم گیاهی به طور طبیعی و نیز در حضور قارچ آنتاگونیست و غیاب عامل بیمارگر، آیزوزایمی ساخته شود که پس از ورود عامل بیماری مرگ گیاهچه ساخت این آیزوزایم در گیاه متوقف شده است. از طرفی

آیزوزایم‌های القاء شده در تیمارهای P، T و T+P مشابه بوده و به نظر می‌رسد تنها در میزان و تراکم بین سه تیمار با یکدیگر متفاوت باشند. در نتیجه می‌توان فرض کرد که مقاومت القاء شده در هر سه تیمار، از مکانیزم مشابهی در ریشه گیاه خیار تبعیت می‌کنند و آن مقاومتی می‌باشد که در برابر بیمارگر القاء می‌شود و به مقاومت اکتسابی معروف است.

سپاسگزاری

به این وسیله از حمایت های بخش گیاهشناسی موسسه تحقیقات کشاورزی تهران و گروه های صنایع غذایی، علوم دامی و به ویژه گروه محترم بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد که بخشی از هزینه های این تحقیق را متقبل شده است تشکر و قدردانی می گردد.



شکل۵- بررسی الگوی آیزوزایمی آنزیم پراکسیداز محلول در عصاره ریشه‌های خیار در روز پنجم پس از تیمار با *Trichoderma harzianum* Bi و در روز دوازدهم پس از تیمار با *Trichoderma harzianum* Bi (مصادف با روز پنجم پس از مایه‌کوبی با *Pythium aphanidermatum*) C: گیاه شاهد سالم، T: گیاهانی که تنها با *T. harzianum* Bi تیمار شده اند، P: گیاهانی که تنها با *P. aphanidermatum* مایه کوبی شده اند، T+P: گیاهان تحت تیمار *T. harzianum* Bi و *P. aphanidermatum* شاخص Rm = مسافت طی شده بوسیله آیزوزایم تقسیم بر مسافت طی شده بوسیله رنگ برم فنل بلو

منابع

۱- صارمی ح.، پیغامی ا. و پژوهنده م. ۱۳۸۰. اصول قارچ شناسی، ویرایش چهارم (ترجمه). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.۶۸۰ ص.

۲- ساری الف. ۱۳۸۶. ارزیابی برخی جدایه‌های آنتاگونیستی Bacillus , Pseudomonas , Trichoderma در کنترل بیولوژیکی پاخوره غلات و بررسی برخی از مکانیزم‌های آنتاگونیستی علیه قارچ عامل بیماری *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. پایان نامه کارشناسی ارشد، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران. ۲۶۱ ص.

۳- ملکی ح. ۱۳۸۵. کنترل بیولوژیک نماتد مولد غده ریشه *M. javanica* توسط جدایه *T.harzianum* در گوجه فرنگی و بررسی تغییرات برخی مکانیزم‌های دفاعی بیوشیمیایی گیاه. پایان نامه کارشناسی ارشد، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران. ۱۱۶ ص .

4- Bradford M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72:248-254.

5- Chen C., Belanger R.R., Benhamou N., and Paulitz T.C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56: 13-23

6- Daly J.M., Ludden P., and Seevers P.M. 1971. Biochemical comparisons of resistance to wheat stem rust disease controlled by the Sr11 alleles. Physiological plant pathology, 1: 397- 407.
7- Edreva A. 2004. A novel strategy for plant protection: Induce resistance. Journal of cell and Molecular Biology, Vol.3: 61-69.
8- Egca C., Ahmed A.S., Candela M., Candela M.E. 2001. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. Journal of Plant Physiology, 158: 151-8.
9- Espelie K.E., Franceschi V.R., Kolattukudy P.E. 1986. Immuno-cytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. Plant Physiology, 81: 487-492
10- Fric F., and Fuchs W.H. 1970. Veranderungen der aktivitat einiger enzyme imweizenblatt in abhangigkeit von der temperaturlabilen. Vertraglichkeit fur *Puccinia graminis* tritici. Phytopathological Zeitschrift, 67: 161–174.
11- Fric F. 1976. Oxidative enzymes. In: Heitefuss, R. & P. H. Williams (Eds.), Encyclopedia of plant physiology, Vol. 4, Springer-verlag Berlin Hidelberg New York. Pp. 617 - 631.
12- Fry S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Annuale Review of Plant Physiology, 37: 165-186
13- Garfin D. 1990. Methods in enzymology,128: 425-441.
14- Goldberg R., Imberty A., Liberman M., Prat R. 1986. Relation-ships between peroxidatic activities and cell wall plasticity. In H Grepin, C Penel, T Gaspar, eds, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. University of Geneva, Geneva, Switzerland, Pp. 208-220
15- Graham M.Y., and Graham T.L. 1991. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f.sp. glycinea wall glucan. Plant Physiology, 97: 1445-1456.
16- Grisebach H. 1981. Lignins. In EE Conn, ed, The Biochemistry of Plants, Vol 7. Academic Press, New York, Pp. 457-478.
17- Hammand-Kosack E., and Jones D.G.J. 1996. Resistance gene- dependent plant defense responses. The Plant Cell. 8:1773- 1791.
18- Hammerschmidt R.,and Kuc J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber, Physiological Plant Pathology, 20: 61–69.
19- Jennings P.H., Brannaman B.L., and Zscheile F.P. 1969. Peroxidase & polyphenol oxidase activity associated with Helminthosporium leaf spot of maize. Phytopathology, 59: 963–967.
20- Mader M., and Amberg Fisher V. 1982. Plant Physiol. 70: 1128-1131
21- Mohammadi, M. 1994. The early decline in nitrogen fixation capacity in soybean root nodules is correlated with the activation of host defense responses induced by Bradyrhizobium japonicum. Ph.D. dissertation, University of Missouri-Columbia, MO, USA, 595pp.
22- Odjakova M., and Hadjuvanova C. 2001. The compelexity of pathogen defense in plants. Bulgarian Plant Physiology, 27: 101-109.
23- OkaY., Chet I., and Spiegel Y. 1997. Are pathogenesis-related proteins induced by Meloidogyne javanica or Heterodera avenae invasion? J. Nematol. 29: 501-508.
24- Paxton J.D. 1981. Phytoalexins-a working redefinition. Phytopathol. 101: 106.
25- Peng M., and Kuc J.A. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in virto and on tobacco leaf disks. Phytopathology, 82: 696–699.
26- Ramoorthy V., raguchander T., and Samiyappan R. 2002. Enhancing Resistance of tomato and hot peper to Pythium disease by seed treatment with fluorescent Pseudomonas. European Journal of Plant Pathology,108: 429-441.
27- Schmid P.S., and Feucht W. 1980. Tissue specific oxidation of browning of polyphenols by peroxidase in cherry shoots. Gartenbauwissenschaft, 45: 68-73.
28- Scott-Craig J.S., Kerby K.B., Stein B.D., and Somerville S.C. 1995. Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis* f.sp. hordei). Physiological and Molucular of Plant Pathology, 47: 407-418.
29- Simons T.J., and Ross A.F. 1970. Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco, Phytopathology, 60: 383–384.
30- Stoll V.S., and Blanchard J.S. 1990. Buffers: Principles and practice. Pp. 24 – 38 in M.P. Deutscher (Edi.). Methods in Enzymology, Vol. 182: Guide to protein purification. Academic Press, San Diego.

31- Strivastava O.P., Van Huystee R.B. 1977. An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase, and polyphenoloxidase from peanut cells. Canadian Journal of Botany, 55: 2630-2635
32- Walter M.H. 1992. Regulation of lignification in defense. In T. Boller. and F. Meins (eds.), Genes Involved in Plant Defenses, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Pp. 327-352.
33- Ward E.W.B. 1986. Biochemical mechanisms involved in resistance of plants to fungi, Pp. 107-131. In J.A. Baily (ed.), Biology and molecular biology of plant pathogen interactions. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
34- Wood K.R., and Barbara D.J. 1971. Virus multiplication and peroxidase activity in leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars systemically infected with the W strain of cucumber mosaic virus. Physiological and Plant Pathology, 1: 73–81.
35- Yedidia I., Benhamou N., and Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1061-1070.
36- Zang W., Dick W.A., and Hoitink H.A.J. 1996. Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to Pythium root rot and anthracnose. Phytopathology, 86: 1066-1070.