نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، ص. ۴۶۶-۴۵۹

Journal of Plant Protection
Vol. 28, No. 4, Winter 2015, P. 459-466

بررسی ارتباط مکانیزم‌های آنزیمی و متابولیت‌های ثانویه با مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی(*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race1) در توده‌های خربزه و طالبی

اسمعیل مددخواه[۱]- مصطفی ناصرترابی[۲]- ماریه شوروئی[۳]- اسحاق مقبلی[۴*]- محمود لطفی[۵]- ضیاءالدین بنی‌هاشمی[۶]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۲/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۲۴

چکیده

تولیدات اقتصادی خربزه و طالبی در جهان به مقدار زیادی تحت تأثیر پژمردگی فوزاریومی است. پاتوژن *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1(*Fom1*) یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای این محصول است که در ایران خسارت اقتصادی زیادی به تولید وارد می‌کند. برای یافتن منابع مقاومت در خربزه و طالبی نسبت به نژاد یک این قارچ تعداد ۴۵ توده و لاین اصلاح شده از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری گردیده و در برابر نژاد یک این قارچ غربال شدند. در مرحله یک برگ حقیقی دانهال‌ها با سوسپانسیون $۱۰^{۶}$ اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل تلقیح شدند. ارزیابی مقاومت این گیاهان تا ۲۵ روز پس از تلقیح با سیستم نمره‌دهی ۴-۰ انجام گرفت. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها اختلاف معنی‌داری را در بین توده‌ها نشان داد. ۵ نمونه از مقاوم‌ترین و ۵ نمونه از حساس‌ترین توده ها با عامل بیماری تلقیح شدند و نمونه ریشه آن‌ها به مدت ۸ روز جمع آوری گردیدند. فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، مقدار ترکیبات فنلی و کوکوربیتاسین نمونه‌ها اندازه گیری و امکان ارتباط بین مقاومت به بیماری و این ترکیبات مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه مقاوم فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز و مقدار ترکیبات فنلی در پاسخ به تلقیح پاتوژن به طور معنی‌داری افزایش یافت اما در گروه حساس تغییرات معنی‌داری وجود نداشت. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که ارتباط مستقیمی بین کوکوربیتاسین D با مقاومت به این بیماری وجود دارد، در حالی‌که ارتباطی بین کوکوربیتاسین E و مقاومت به این بیماری دیده نشد.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی فوزاریومی، مکانیزم‌های مقاومت، کوکوربیتاسین، پلی‌فنل‌اکسیداز، ترکیبات فنلی

مقدمه

پژمردگی فوزاریومی که به وسیله قارچ *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. meloni ایجاد می‌شود از مهم‌ترین پاتوژن‌های خاک‌زاد است که در سراسر جهان وجود دارد و می‌تواند باعث ایجاد بیماری روی شمار زیادی از ارقام خربزه و طالبی شود (۱۶). به دلیل باقی ماندن پاتوژن در خاک و بقایای گیاهی به شکل کلامیدوسپور کنترل آن بسیار مشکل است. تاکنون هیچ یک از روش‌های شیمیایی و کشت نتوانسته‌اند در کنترل این بیماری مفید واقع شوند. بنابراین موثرترین راه کنترل آن را استفاده از ارقام مقاوم معرفی کرده‌اند (۲۰ و ۲۵).

تاکنون چهار نژاد صفر، ۱، ۲ و ۱/۲ از این قارچ شناسایی شده است (۱۸). این بیماری در ایران در سال ۱۳۴۷ برای اولین بار از مشهد گزارش شد و نژاد عامل بیماری نژاد ۲ تعیین شد. نژاد ۱ این قارچ نیز در گرمسار شیوع دارد (۱). در خربزه و طالبی دو ژن مقاومت شامل Fom-1 و Fom-2 تاکنون شناخته شده‌اند. Fom-1 باعث مقاومت نسبت به نژاد صفر و ۲ پاتوژن و Fom-2 باعث مقاومت نسبت به نژاد صفر و ۱ این پاتوژن می‌شود (۱۸). این دو ژن در برنامه‌های به‌نژادی برای تولید ارقام مقاوم به بیماری بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرند. به نژادگران معمولا از روش تلقیح مصنوعی برای ارزیابی مقاومت ژنتیکی نسبت به پاتوژن‌ها استفاده می‌کنند. عواملی که در میزان توسعه پژمردگی فوزاریومی دخالت دارند شامل، قدرت بیماری زایی پاتوژن، عوامل محیطی و ژنتیک گیاه می‌باشند (۱۵).

توسعه سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی تدافعی در گیاه سبب محافظت آن در برابر خسارات ناشی از تنش‌های اکسیداتیو می‌شود، و در واقع

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشگاه تبریز
۲ و ۳- دانشجویان دکتری گروه علوم باغبانی، پردیس کرج، دانشگاه تهران
۴- دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email:emoghbeli84@gmail.com)
۵- دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
۶- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مانع از تولید گونه‌های اکسیژن فعال[1] یا از بین بردن آن‌هایی که پیش از این ساخته شده‌اند می‌شوند (۴). آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مختلفی مانند پراکسیداز، سوپر اکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در طی حمله پاتوژن در متابولیسم گونه‌های اکسیژن فعال سهیم هستند. در بسیاری از موارد همبستگی نزدیکی مابین فعالیت افزایش یافته پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز و غلظت مواد فنلی از یک سو و مقاومت گیاه از سوی دیگر یافت شده است (۹). پلی‌فنل‌اکسیداز سبب اکسیده شدن پلی‌فنل‌ها به کوئین‌ها[2] (ترکیبات ضد میکروبی) و لیگنینی شدن دیواره سلول‌های گیاهی طی آلودگی‌های میکروبی می‌شود و همچنین در واکنش‌های تدافعی و فوق حساسیت که سبب مقاومت به قارچ‌ها می‌شود شرکت دارد (۱۱ و ۱۷).

در ارتباط میزبان و عامل بیماری‌زا وقتی که ارقام مقاوم و حساس با هم مقایسه می‌شوند، 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 (۹). گودمن و همکاران (۹) در آزمایشی در ذرت مایه زنی شده با *F. graminearum* نشان دادند که غلظت ترکیبات فنولی در بافت سیلک[3]، در کولتیوارهای مقاوم ذرت نسبت به ارقام حساس به طور معناداری افزایش یافت.

کوکوربیتاسین‌ها ترکیبات تتراسیکلیک تری‌ترپنوئیدی هستند که در شمار زیادی از گیاهان اعضاء کدوئیان وجود دارد و سبب ایجاد طعم تلخ در این گیاهان می‌باشند. این ترکیبات معمولاً به صورت آزاد در بافت‌های گیاهی حضور ندارد، زمانی‌که بافت‌های گیاهی دچار آسیب می‌شوند محتوای β-گلیکوزید آن‌ها افزایش می‌یابد در نتیجه سبب ترمیم بافت از طریق افزایش تقسیم سلولی در محل آسیب دیده می‌گردد. همین عمل آن‌ها سبب بروز مقاومت به برخی از آفات می‌گردد (۲۳).

در این میان می‌توان به اثر ممانعت کننده قوی که کوکوربیتاسین C روی رشد قارچ *Phythophto racactorum* داشته اشاره نمود. این ترکیب در غلظت $10\ mgml^{-1}$ مانع فعالیت این قارچ می‌شود (۵). کوکوربیتاسین D نیز عمل آنتاگونیست روی هورمون‌های استروئیدی حشرات داشته، در شرایط آزمایشگاهی روی رشد باکتری‌های همزیست نماتدهای پارازیت حشرات دخالت می‌نماید (۵).

هدف از این تحقیق شناسایی عوامل ایجاد مقاومت به *Fom* 1 در بین ۴۵ توده خربزه و طالبی بر پایه فعالیت‌های آنزیمی و مقدار کوکوربیتاسین‌ها مشخص شود.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاهان: در این تحقیق از ۴۵ توده خربزه و طالبی که اکثرا از نقاط مختلف ایران جمع آوری شده بود جهت ارزیابی مقاومت به بیماری پژمردگی آوندی خربزه و طالبی استفاده کردیم (جدول ۱). توده‌های مورد استفاده از آزمایشگاه ژنتیک گروه تولیدات گیاهی پردیس ابوریحان و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت‌مدرس تهیه شدند. قبل از کاشت بذرها با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی سطحی شده و سپس به وسیله آب مقطر استریل شسته شدند. بذرها در گلدان‌هایی حاوی ماسه، پیت و پرلیت (۱-۱-۱) اتوکلاو شده و برای هر توده ۱۰ گیاهچه کاشته شد. گلدان‌ها به گلخانه با متوسط دمای روزانه ۲۸- ۲۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نوری ۱۰۰۰۰ لوکس منتقل شده و هر روز آبیاری شدند.

ایزوله‌های پاتوژن و شرایط رشد: دو جدایه قارچ *Fom*1 (نژاد غالب ایران) M263 و Msh به ترتیب متعلق به مناطق گرمسار و مشهد از آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز تحویل گرفته شد. ایزوله ها روی محیط PDAقرار گرفت و در داخل انکوباتور در دمای (۱±۲۲) و فتوپریود ۱۴ ساعت، به مدت ۱۴ روز نگهداری شد.

تلقیح گیاهان: برای این منظور از کشت ۱۴ روزه قارچ عامل بیماری استفاده شد. سطح محیط کشت با ۴ تا ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون و با استفاده از اسکارپل شسته شد. به منظور جداسازی محیط کشت، سوسپانسیون از پارچه ململ دو لایه سترون عبور داده شد. شمارش اسپور سوسپانسیون با لام هماسیتومتر صورت گرفت و با آب مقطر سترون رقیق سازی شد تا رقت معادل با 1×10^{6} اسپور به دست آمد. در مرحله یک یا دو برگ حقیقی، گیاهچه‌ها از خاک بیرون آورده شده و ریشه آن‌ها با آب مقطر سترون به طور کامل شسته شدند. ریشه‌ها به مدت یک تا دو دقیقه در سوسپانسیون اسپور قرار گرفت. ریشه گیاهچه‌های شاهد نیز در آب مقطر سترون قرار گرفت. دانهال‌ها در گلدان‌های حاوی ماسه، پیت و پرلیت (۱:۱:۱) سترون کاشته شده و به گلخانه با متوسط دمای روزانه ۲۸- ۲۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نوری ۱۰۰۰۰ لوکس منتقل شدند (۱۴).

اندازه‌گیری شدت بیماری: شدت آلودگی بوته‌ها بر اساس مقیاس ۴-۰ انجام شد (صفر (۰): بدون علائم، یک (۱): شروع زردی یا پژمردگی، دو (۲): تحت تأثیر قرار گرفتن شدید برگ‌ها، سه (۳): پایداری ساقه و پژمردگی کامل برگ‌ها، چهار (۴): مرگ کامل گیاه) و یادداشت برداری به مدت ۴ هفته انجام گرفت (۷).

اندازه گیری پلی‌فنل‌اکسیداز و ترکیبات فنلی: تغییرات آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز و مقدار ترکیبات فنلی در ریشه توده‌های حساس و مقاوم در روزهای صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ بعد از تلقیح انجام گرفت.

1-Reactive oxygen species(ROS)
2-Quinons
3-Silk

جدول ۱-توده‌های مورد استفاده در آزمون ارزیابی مقاومت، منطقه جمع‌آوری و گروه‌بندی آن‌ها

کد	توده‌ها	منطقه جمع‌آوری	گروه	کد	توده‌ها	منطقه جمع‌آوری	گروه
۱	عموچی	اصفهان	Inodorous	۲۴	اگن	تجاری	Cantalupensis
۲	گوشت نارنجی	اصفهان	Inodorous	۲۵	گرمک	اصفهان	Cantalupensis
۳	چروک زرد	خراسان	Inodorous	۲۶	سمسوری	اصفهان	Cantalupensis
۴	جیم آبادی	خراسان	Inodorous	۲۷	طالبی ساوه	اصفهان	Cantalupensis
۵	کله گرگی	خراسان	Inodorous	۲۸	ریش بابا	کاشان	Cantalupensis
۶	کاشفی	خراسان	Inodorous	۲۹	سمسوری	ورامین	Cantalupensis
۷	خاقانی	خراسان	Inodorous	۳۰	دستنبو بزرگ	آران بیدگل	Dudaim
۸	خاتونی	خراسان	Inodorous	۳۱	دستنبو کوچک	آران بیدگل	Dudaim
۹	مشهدی	خراسان	Inodorous	۳۲	دستنبو	دزفول	Dudaim
۱۰	مشهدی کوچک	خراسان	Inodorous	۳۳	خیارچنبر	قزوین	Flexosus
۱۱	صابونی	خراسان	Inodorous	۳۴	سبز	خمینی شهر	-
۱۲	زلف عروس	خراسان	Inodorous	۳۵	شادگانی	خوزستان	-
۱۳	سمنانی	سمنان	Inodorous	۳۶	قراملکی	آذربایجان	-
۱۴	زرد جلالی	سمنان	Inodorous	۳۷	علمداری	آذربایجان	-
۱۵	زردشتری	سمنان	Inodorous	۳۸	خربزه	بیرجند	-
۱۶	احمدی	شیراز	Inodorous	۳۹	توسرخ	اصفهان	-
۱۷	شاه آبادی	شیراز	Inodorous	۴۰	سوسکی زری	ایوانکی	-
۱۸	امیر پنجی	نهاوند	Inodorous	۴۱	سفیدک	زابل	-
۱۹	هانی دیو	تجاری	Inodorous	۴۲	قلعه حاتم	بروجرد	-
۲۰	اسپانیش	تجاری	Inodorous	۴۳	برگ نی	کاشان	-
۲۱	سوئیت هرت	تجاری	Inodorous	۴۴	محلی	مازندران	-
۲۲	زرد قناری	تجاری	Inodorous	۴۵	چروک طالبی	–	-
۲۳	آناناسی	تجاری	Cantalupensis				

استخراج و خالص‌سازی عصاره بر طبق روش جاندا (۱۰) انجام گرفت و عصاره خالص شده در دمای ۸۰- نگهداری شد. میزان پروتئین موجود در عصاره بر اساس روش برادفورد (۳) اندازه‌گیری شد. ارزیابی فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز بر اساس روش ارائه شده توسط چن و همکاران (۶) با کمی تغییرات انجام شد. فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در ۵۱۵ نانومتر در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر مدل Perkin Elmer Lambda 25 محاسبه شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی: میزان ترکیبات فنلی به صورت میلی‌گرم کافئیک اسید در ۰/۵ گرم وزن ریشه و میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر در ۷۲۵ نانومتربر اساس روش اسواین و هیلیس (۲۲) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کوکوربیتاسین‌ها: جهت استخراج کوکوربیتاسین‌ها از روش بولکمابومستراو همکاران (۲) با کمی تغییرات استفاده شد. مقدار یک گرم از هر نمونه ریشهٔ مربوط به هر توده از هر سه تکرار، در بوته چینی با کمک ازت مایع پودر شد. سپس مقدار ۰/۵ گرم به ویال‌های دو میلی‌لیتری منتقل گردید. به هر ویال مقدار یک و نیم میلی‌لیتر متانول اضافه شد. سپس ویال‌ها در ۱۴۰۰۰ گرم و دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به ویال‌های جدیدی منتقل شد و به باقی‌مانده ویال‌ها مجدداً یک و نیم میلی‌لیتر متانول اضافه شد و دوباره سانتریفیوژ با شرایط بالا انجام شد تا باقی‌مانده کوکوربیتاسین از بافت ریشه جدا شود. مایع برداشته شده با کمک سرنگ انسولین از فیلترهای ۲۰ میکرومتری عبور داده شد تا ناخالصی‌های آن جدا شود و به ستون HPLC صدمه‌ای وارد نشود.

دستگاه HPLC مورد استفاده در این آزمایش مدل Knauer، مجهز به چهار پمپ، دو آشکارگرUV و فلوئورسانس با امکان استفاده هم‌زمان چهار طول موج مختلف، ۹۶ چاهک و ستون: C18 (125nm×4nm, Nucleosil-100,5µm) می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری: طرح آماری به کار رفته طرح آلفالاتیس (صفر و یک) در قالب ۵ بلوک خرد شده با نه توده در هر یک از بلوک‌های خرد شده و سه تکرار بود. از هر توده در هر تکرار ۱۰ عدد بذر و در هر لیوان یک عدد کشت شد.

جدول ۲- مقایسه میانگین شدت بیماری توده‌های مختلف نسبت به *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1

میانگین شدت بیماری		توده ها	میانگین شدت بیماری		توده ها
MSH	M263		MSH	M263	
۳/۴۵ abcdefg	۳/۲ efghij	هانی دیو	۳/۶۶ abcde	۴ a	شاه آبادی
۲/۱۳ lm	۳/۲ efghij	گرمک	۴a	۳/۹۱ ab	زرد قناری
۲/۱۹ lm	۳/۱۴ fghijk	کله گرگی	۴ a	۳/۹ abc	اسپانیش
۲/۰۵ m	۳/۱۱ ghijkl	مشهدی کوچک	۳/۶۵ abcde	۳/۸۷ abc	دستنبو بزرگ
۲/۵۴ ijklm	۳/۱ ghijkl	سبز	۳/۲۲ bcdefghi	۳/۸۵ abc	دستنبو دزفول
۱/۹۹ m	۳/۰۲ hijkl	زلف عروس	۳/۵۹ abcdef	۳/۸۵ abc	برگ نی
۲/۵۴ ijklm	۲/۸۶ ijklm	سمسوری	۲/۱۵ lm	۳/۷۶ abcd	گوشت نارنجی
۳/۷۷ abcd	۲/۸۵ijklm	زرد جلالی	۲/۸۱ ghijkl	۳/۷۵ abcd	قلعه حاتم
۲/۲۳ lm	۲/۷۷ jklm	مشهدی	۳/۸۶ ab	۳/۷۵ abcd	ریش بابا
۳/۲۳ bcdefgh	۲/۷۴ klm	سمنانی	۳/۶۶ abcde	۳/۶۵ abcde	خیارچنبر
۲/۴ klm	۲/۶۹ lmn	احمدی	۳/۸۶ ab	۳/۶۴ abcde	دستنبو کوچک
۲/۱۱ m	۲/۶۸ lmn	قراملکی	۲/۴۸ jklm	۳/۵۷ abcde	شادگانی
۳/۲۵ m	۲/۴۶ nm	کاشفی	۳/۰۳ efghijk	۳/۵ bcdefg	آناناسی
۲/۰۸ m	۲/۴۶ nm	خاقانی	۲/۵۲ jklm	۳/۴۸ bcdefgh	طالبی ساوه
۳/۳۷ abcdefg	۲/۳ n	صابونی	۲/۰۵ m	۳/۴۵ cdefgh	عموچی
۲/۹۳ ghijk	۲/۲۷n	جیم آبادی	۳/۱ cdefghij	۳/۳۸ defgh	سفیدک
۱/۱۱ n	۱/۸۶ o	چروک طالبی	۳/۸ abc	۳/۳۶ defgh	سوسکی زری
۱/۳۸ n	۱/۸۵ o	زردشتری	۲/۶۵ hijklm	۳/۳۳ defgh	توسرخ
۱/۲۶ n	۱/۶۳ op	محلی مازندران	۳/۰۹ defghijk	۳/۲۷ efghi	علمداری
۱/۱۷ n	۱/۳۷ op	خاتونی	۲/۵۲ jklm	۳/۲۵ efghi	سمسوری اصفهان
۰/۴۳ o	۰/۸۸ p	چروک زرد	۳/۸ abc	۳/۲۵ efghi	خربزه بیرجند
۰/۷۹ no	۰/۵۱ q	اگن	۲/۹۶ efghijk	۳/۲۱ efghij	امیر پنجی
			۳/۴ abcdefg	۳/۲ efghij	سوئیت هرت

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش دانکن ($p\leq0.05$) صورت گرفت.

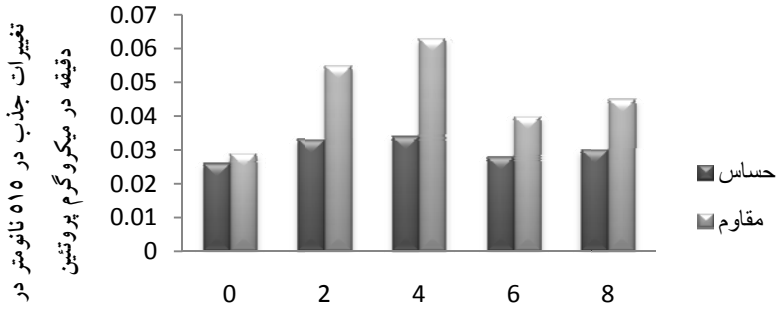
نتایج

پاسخ توده‌ها به *Fom*1: علائم بیماری در توده های حساس ۵-۷ روز پس از تلقیح مشاهده شد و دانهال‌های حساس معمولاً بعد از ۱۰-۱۵ روز به طور کامل از بین رفتند. در گیاهان مقاوم تنها مقداری زردی و کاهش در رشد مشاهده شد (شکل ۱). تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری در بین توده‌ها از نظر حساسیت و مقاومت به بیماری نشان داد. بر طبق مقایسه میانگین حساس‌ترین توده‌ها نسبت به نژاد M263 شامل توده‌های شاه‌آبادی، زرد قناری، اسپانیش، دستنبو بزرگ، دستنبو دزفول و مقاوم‌ترین توده ها شامل توده‌های اگن، چروک زرد، خاتونی، محلی مازندران و زردشتری بود. همچنین حساس‌ترین توده‌ها نسبت به نژاد Msh شامل توده‌های زرد قناری، اسپانیش، ریش بابا، دستنبو کوچک، شاه‌آبادی و مقاوم‌ترین توده‌ها شامل توده‌های چروک زرد، اگن، چروک طالبی، خاتونی و محلی مازندران بود (جدول ۲). از ایزوله M263 و توده‌های مقاوم و حساس مربوط به آن برای تعیین مکانیسم مقاومت به پاتوژن استفاده شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، مقدار ترکیبات فنلی و کوکوییتاسین‌ها: تجزیه واریانس نشان داد که فعالیت آنزیم پلی-فنل‌اکسیداز در بین توده‌های مقاوم و حساس تفاوت معنی‌داری دارد. فعالیت این آنزیم پس از تلقیح در بین روزهای دوم و چهارم افزایش یافت و بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در روز چهارم مشاهده شد، در حالی‌که کم‌ترین میزان فعالیت در گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۲). بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در اگن (۰/۰۶) و کم‌ترین میزان آن در دستنبو (۰/۰۲۴) مشاهده شد (جدول۳).

مقدار ترکیبات فنلی بعد از تلقیح در گیاهان افزایش یافت. تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری بین توده‌های مقاوم و حساس نشان داد. در حالی‌که در گیاهان شاهد مقدار این ترکیبات در توده‌های حساس بیشتر از توده‌های مقاوم است اما بعد از تلقیح مقدار این ترکیبات به طور معناداری در توده‌های مقاوم نسبت به توده‌های حساس افزایش می‌یابد.

شکل ۱-مقایسه نمونه‌های حساس و مقاوم با شاهد بعد از ۱۵ روز

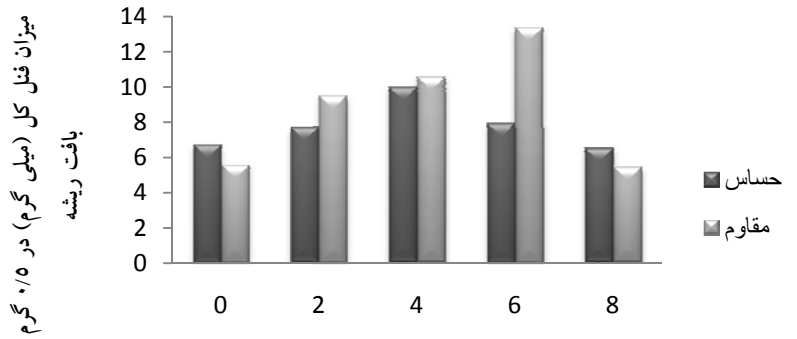


شکل۲- فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در توده‌های مقاوم و حساس در روزهای مختلف بعد از مایه‌زنی. اعداد مربوط به نمودارها، میانگین فعالیت آنزیم پلی-فنل‌اکسیداز در توده‌های مقاوم و حساس است. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P\leq0.05$) ارائه شده‌اند.

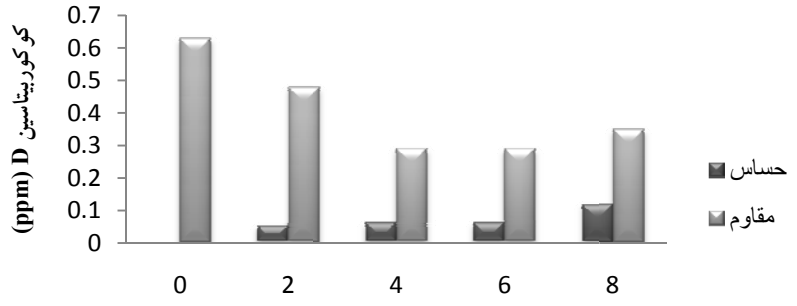
جدول ۳- فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، مقدار ترکیبات فنلی و کوکو بیتاسین‌های D و E در توده‌های مقاوم و حساس مایه‌زنی شده با *Fom* 1ایزوله M263

توده‌ها	مقایسه میانگین آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (ΔOD 515/min/mg/protein)	مقایسه میانگین ترکیبات فنولی (mg/0/5gRT)	مقایسه میانگین کوکوربیتاسین E (ppm)	مقایسه میانگین کوکوربیتاسین D (ppm)
محلی مازندران(R)	B†۰/۰۵۲	A۹/۴۷	A۲/۲۹	C۰/۲۷
خاتونی(R)	CD۰/۰۴۴	BC۸/۶۱	E۰/۹۴	C۰/۲۶
زردشتری(R)	BC۰/۰۴۵	AB۹/۳	E۰/۹۸	AB۰/۵
اگن(R)	A۰/۰۶	C۸/۵۵	F۰/۸۳	B۰/۴۸
چروک زرد(R)	BC۰/۰۴۸	AB۹/۰۷	G۰/۲۷	A۰/۵۴
زردقناری(S)	EF۰/۰۳۵	DE۷/۸۲	B۱/۶۱	F۰
شاه آبادی(S)	DE۰/۰۳۸	DE۷/۷۶	D۱/۰۷	D۰/۱۸
دستنبو دزفول(S)	G۰/۰۲۴	CD۸/۴۱	F۰/۷۵	F۰
دستنبو بزرگ(S)	G۰/۰۲۷	E۷/۶۶	F۰/۸۳	E۰/۱۳
اسپانیش(S)	FG۰/۰۳	F۶/۴۶	C۱/۳۶	F۰

هر عدد میانگین ۳ تکرار است. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P\leq0.05$) ارائه شده‌اند. (R: توده‌های مقاوم. S: توده‌های حساس).



شکل۳- تغییرات ترکیبات فنلی در توده‌های مقاوم و حساس در روزهای مختلف بعد از مایه‌زنی. اعداد مربوط به نمودارها، میانگین مقدار ترکیبات فنلی در توده‌های مقاوم و حساس است. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P\leq0.05$) ارائه شده‌اند.



شکل ٤- تغییرات مقدار کوکوربیتاسین D (بر حسب پی‌پی‌ام) در توده‌های مقاوم و حساس در روزهای مختلف بعد از مایه‌زنی. اعداد مربوط به نمودارها، میانگین مقدار کوکوربیتاسین D در توده‌های مقاوم و حساس است. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P\leq0.05$) ارائه شده‌اند.

در توده‌های حساس بیش‌ترین مقدار این ترکیبات در روز چهارم مشاهده شد و سپس تا روز هشتم کاهش یافت در حالی‌که در توده-های مقاوم بیش‌ترین مقدار در روز ششم مشاهده شد (شکل ۳). بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنلی در توده محلی (۹/۴۷) و کم‌ترین مقدار آن در در دستنبو ۱ (۶/۴۶) مشاهده شد (جدول ۳). در اندازه‌گیری کوکوربیتاسین‌ها نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در مقدار کوکوربیتاسین E تفاوت معنی داری بین توده‌های حساس و مقاوم وجود ندارد. بیشترین مقدار کوکوربیتاسین E در توده محلی (۲/۲۹) و کم‌ترین مقدار آن در چروک زرد (۰/۲۷) مشاهده شد (جدول۳).

در اندازه‌گیری مقدار کوکوربیتاسین D مقایسه میانگین تفاوت معنی‌داری در توده‌های مقاوم نسبت به توده‌های حساس نشان داد. کوکوربیتاسین D در توده‌های حساس زرد قناری، اسپانیش و دستنبو دیده نشد و هم‌چنین این کوکوربیتاسین در توده‌های حساس در گیاهان شاهد مشاهده نشد. مقدار کوکوربیتاسین D بعد از تلقیح در توده‌های مقاوم تا روز ششم کاهش یافت و سپس تا روز هشتم افزایش یافت اما در توده‌های حساس این افزایش تا روز هشتم ادامه داشت (شکل ۴). بیش‌ترین مقدار کوکوربیتاسین D در توده چروک زرد (۰/۵۴) مشاهده شد (جدول۳).

ضریب همبستگی (R) بین میانگین‌های پلی‌فنل‌اکسیداز، مقدار ترکیبات فنلی، کوکوربیتاسین D، کوکوربیتاسین E با ایندکس بیماری به ترتیب ** ۰/۸۹۴-، * ۰/۷۲۲-، ** ۰/۸۷۴- و ۰/۱۸۲ تعیین گردید که برای کوکوربیتاسین E این ضریب معنی‌دار نبود.

بحث

در آزمایشات گلخانه‌ای تنوع معنی‌داری بین توده‌های خربزه و طالبی مشاهده شد و توده‌های مقاوم و حساس شناسایی شد (جدول ۲). نتایج نشان داد که فعایت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، مقدار ترکیبات فنلی و کوکوربیتاسین D در توده‌های مقاوم پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری افزایش معنی‌داری نسبت به توده‌های حساس داشت.

تا به حال منابع زیادی برای مقاومت نسبت بـه نـژاد ۱ در جهـان گزارش شده است. چیخ روهـو و همکـاران (۷) بـا اسـتفاده از آزمـون ارزیابی مقاومـت رقـم‌هـای مقـاوم pickling melon، PI161375، (Galia) F65 و I4-6-2-B نسبت به نژاد یک قارچ معرفـی کردنـد. مقاومت به چندین پاتوژن گیاهی با حداکثر مقدار ترکیبـات فنـولی در گیاه ارتباط دارد (۱۲). القاء فعالیت پلی‌فنل‌اکسـیداز بـه‌واسـطه حملـه پاتوژن در گیاهان مختلف تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای گزارش شده است (۶). مقدار ترکیبات فنولی در روزهـای بعـد از تلقـیح در تـوده‌هـای مقـاوم نسبت به توده‌های حساس بیشـتر بـود، بنـابراین نتـایج مـا پیشـنهاد می‌کند که مقدار ترکیبات فنولی یک نقش کلیدی در توده‌های خربزه و طالبی نسبت به *Fom* 1 دارد. استری شـدن سـریع ترکیبـات فنلـی مانند فولیک اسید در دیواره سلولی گیاهان، اولین و متداول‌ترین پاسخ به حمله قارچ است که نتیجه آن افزایش مقاومت به نفوذ پاتوژن است (۲۱). بنابراین بعید نیست که افزایش مقدار ترکیبات فنولی در گیاهان مقاوم بعد از تلقیح با محدود شدن نفوذعامل بیماری مرتبط باشد.

نتایج به دست آمده از ارزیابی فعالیت آنزیم پلـی‌فنـل‌اکسـیداز بـه طور شفاف نشان می‌دهد که مقاومت به *Fom*1 در توده‌های خربزه و طالبی با افزایش فعالیت این آنزیم پس از تلقیح مـرتبط اسـت. نقـش مستقیم دفاعی این آنزیم در کاهش خسـارت و افـزایش مقاومـت بـه بـاکتری *Pseudomonas syringae* نشـان داده شـده اسـت (۱۳). افـزایش فعالیـت پلـی‌فنـل‌اکسـیداز در بافـت گیـاهی، مخصوصـا در مکان‌های آلودگی و اطراف آن در تعداد زیادی از بیماری‌های گیـاهی مشاهده شده است. این فعالیت در سیب‌زمینی شیرین آلـوده شـده بـه وسیله قارچ *Ceratocystisfimbriata*، ثابت شده است (۲۴). ارتبـاط نزدیکی بین افزایش فعالیت آنزیم های پراکسیداز، پلی‌فنـل‌اکسـیداز و مقدار ترکیبات فنلی با مقاومت گیاهان وجود دارد (۱۱).

درباره کوکوربیتاسین‌ها نتایج ما نشان داد که در توده‌هـای مقـاوم مقدار کوکوربیتاسین D افزایش معنی‌داری نسبت به توده‌های حساس در روزهای بعد از تلقیح *Fom* 1 داشته است. بر طبق نتایج ما ارتبـاط معنی‌داری بین مقاومت به این بیماری و کوکوربیتاسین E دیده نشـد. تنوع زیادی در مقدار کوکوربیتاسین E در توده های مختلف دیده شد. کوشاوا و نـاران (۱۲) نشـان دادنـد کـه کوکوربیتاسـین B و D بـرای *Drosophil amelanogaster* خاصـیت آنتاگونیسـتی دارنـد. مقـدار کوکوربیتاسین D در ارقـام مقـاوم کـاهش معنـی‌داری تـا روز هشـتم داشت با این حال مقدار اولیه آن ممکن است یک نقش محدود کننده در جلوگیری از آلودگی داشته باشد. ایـن کوکوربیتاسـین در روز صـفر (کنترل) در توده‌های حساس دیده نشـد. کوکوربیتاسـین هـای A، B، C، D و E باعـث توقـف رشـد قـارچ *Phytophthora cactorum* مـی‌شـوند (۱۶). ایـن نتـایج بـا ایـن فرضـیه کـه افـزایش در مقـدار کوکوبیتاسین D می‌تواند منجر به افزایش مقاومت در توده‌های خربزه شودسازگاراست.

نتیجه‌گیری

در بین ژنوتیپ‌های خربزه و طالبی تفاوت معنـی‌داری در واکـنش به *Fom* 1 دیده شد و می‌توان با استفاده از ارقام مقاوم باعث کـاهش خسارات ناشی از این قارچ گردید. نقش آنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه در مقاومت گیاهان به بیماری‌ها ثابت شده است، بنابراین می‌تـوان بـا مطالعه مسیرهای متابولیسم سنتز آنزیم‌ها و متابولیت‌هـای ثانویـه، بـا استفاده از مواد القاء کننده‌ای مانند سالسیلیک‌اسید و جاسمونیک‌اسـید باعث افزایش سنتز ترکیباتی در گیاه شد کـه از طریـق فعـال نمـودن سیستم دفاعی گیاه فشار بیماری را کاهش دهند.

منابع

۱- بنی‌هاشمی ض. ۱۳۶۸. وجود نژاد یک *Fusarium oxysporumSchlecht* f.sp. *melonis* عامل پژمردگـی آونـدی خربـزه در گرمسـار و عکس‌العمل ارقام خربزه و طالبی به آن. نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، صفحه ۹۱.

2- Balkema-Boomstra A., Zijlstra S., Verstappen F., Inggamer H., mercke P., Jongsma M., and BouwmeesterH. 2003. Role of cucurbitacin C in resistance to spider mite (*Tetranychusurticae*) in cucumber. Jornal of chemical ecology, 29 (1).

3- Bradford M.M., 1976. A rapid and susceptible method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem, 72: 248–254.

4- Cavalcanti F.R., ResendeM.L., LimaS.P., Silveira J.A., and OliveiraJ.T. 2007. Activities of antioxidantenzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonasvesicatoria*. Physiol Mol Plant Pathol, 68: 198-208.

5- Chao Chen J., Hua Chiu M., Lin Nie R., cordell G.A., and Qiu S.X. 2005. Ccurbitacins and cucurbitan glycosides, structures and biological activities, The Royal Society of Chemistry, 22:386-399.

6- Chen C., Belanger R.R., Benhamou N., Paullitz T.C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR). Physiol. Mol. Plant Pathol, 56: 13–23.

7- Chik-Rouhou H., Alvarez J.M., González Torres R. 2007. Differential interaction among melon cultivars and race 1.2 of *Fusariumoxysporum* f.sp. *melonis*. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 72:11-

21.
8- Gordon T.R., and Martyn R.D. 1997. The evolutionary biology of *Fusariumoxysporum*. Annu Rev Phytopathol, 35: 111-128.
9- Goodman R.N., Kiraly Z., and Wood K.P. 1986. Biochemical and physiological aspects of plant disease. University of Missouri Press. 433pp.
10- Janda T., Szalai G., Rios-Gonzales K., Veisa O., Paldi E. 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. Plant Science, 164:301–306.
11- Kosuge T. 1969. The role of phenolics in response to infection, Ann. Rev, Phytopathol, 7:195-222.
12- Kushwaha K.P.S., and Narain U. 2005. Biochemical changes to pigeon pea leaves infected with Alternaria tenuissinia. Annals of Plant Protection Sciences, 13: 415–417.
13- Li L., Steffens J.C. 2002. Over expression of PPO in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Planta, 215: 239–247.
14- Moretti A., Belisario A., Tafuri A., Ritieni A., Corazza L., Logrieco A. 2002. Production of beauvericin by different races of *Fusariumoxysporum* f. sp. *melonis*, the Fusarium wilt agent of muskmelon. European Journal of Plant Pathology, 108: 661–666.
15- Namiki F., Shiomi T., Nishi K., Kayamura T., Tsuge T. 1998.Pathogenic and genetic variation in the Japanese strains of*Fusariumoxysporum* f.sp *melonis*. Phytopathology, 88: 804–10.
16- Nes W.D., and Patterson G.W. 1981. Effects of tetracyclic and pentacyclic triterpenoids on growth of Phytophthoracactorum. Journal of Natural Products, 44: 215-220.
17- Retig N. 1974. Changes in peroxidase and polyphenoloxidase associated with natural and induced resistance of tomato to Fusarium wilt. Physiol. Plant Pathology, 4: 145-150.
18- Risser G., Banihashemi Z., and Davis D.W. 1976. A proposed nomenclature of *Fusariumoxysporum* f. sp. *melonis* races and resistance genes in Cucumis melo. Phytopathology, 66:1105-1106.
19-Schroeder H.W., Christensen J.J. 1963. Factors affectingresistance of wheat to scab caused by *Gibberellazeae*. Phytopathology, 53: 831–838.
20- Snyder W.C., and Hansen H.N. 1949. The species concept in Fusarium. American Journal of Botany, 27:64-67.
21- Stadnik M.J., Buchenauer H. 2000. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeriagraminis* f. sp. *tritici*. Physiol. Mol. Plant Pathology, 57: 25–34.
22- Swain T., and Hillis W.E. 1959. The phenolic constituents of Prunus domestica I, The quantitative analysis of phenolic constituents. Journal of the Science of Food and Agriculture, 10: 63–68.
23- Teuscher E., and Lindequist U. 1994. Triterpene. In: Biogene Gifte – Bio-logie, Chemie, Pharmakologie, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York. pp 159-175.
24- Uritani I. 1965. Molecular pathology in the plant field with special regard to defence action of the host. Deut. Akad. Landwirtschaftswiss. Berlin DDR. Tagungsber, 74:201-218.
25- Zuniga T.L., Zitter T.A., Gordon T.R., Schroeder D.T., and Okamoto D. 1997. Characterization of pathogenic races of *Fusariumoxysporum* f. sp. *melonis* causing Fusarium wilt of melon in New York. Plant Disease Journal, 81:592-596.