مقاله پژوهشی

نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال شانزدهم، شماره ۶۳، پاییز ۱۴۰۰ / صفحات: ۱۰۰-۸۷
Doi: 10.30495/iper.2021.679543 ***Dor: 20.1001.1.76712423.1400.16.63.4.6***

پاسخ دفاع بیوشیمیایی خیار گلخانه‌ای (*Cucumis sativus* L.) به بیماری کمپلکس نماتد ریشه‌گرهی و قارچ پژمردگی فوزاریومی

مهدی محمدیان سرچشمه[۱]، سعید رضائی[۱*]، علیرضا ایرانبخش[۲]

[۱]گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
[۲]گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۲

چکیده

بیماری کمپلکس نماتد ریشه‌گرهی، *Meloidogyne javanica* و پژمردگی فوزاریومی خیار گلخانه‌ای *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* کشت خیار را در ایران محدود کرده است. لذا دستیابی به رقم مقاوم به نماتد در کنترل بیماری نقش اساسی دارد. سنجش ترکیبات دفاعی گیاهی در بیماری کمپلکس در دستیابی به مکانیسم‌های مولکولی مقاومت و تولید ارقام مقاوم به نماتد کمک می‌کند. به همین دلیل بعد از تلقیح گیاه به شیوه اسپکتروفتومتری سنجش فعالیت پراکسیداز و ترکیبات فنلی در بیماری در شرایط گلخانه انجام گردید. آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با ١٤ تیمار طرح‌ریزی و شامل تیمارهای شاهد، قارچ تنها، نماتد تنها در چهارسطح تلقیح (١٥٠٠، ٣٠٠٠، ٤٥٠٠ و ٦٠٠٠ لارو سن‌دو نماتد)، قارچ+نماتد به طور همزمان و تیمار تلقیح قارچ یک‌هفته بعد از تلقیح نماتد با چهار تکرار بود. افزایش٥٤/٧٤٪ و ٩٢/٣٤٪ ترکیبات فنلی و ٥٠/٦٤٪ و ٦٣/٣١ ٪ میزان فعالیت پراکسیداز در تیمارهای تلقیح گیاه با قارچ به تنهایی و تلقیح نماتد به تنهایی (٦٠٠٠ لارو) نسبت به شاهد نشان داد این مواد از ترکیبات دفاعی در خیار می‌باشند. نتایج نشان داد که افزایش جمعیت نماتد در تلقیح گیاه در افزایش ترکیبات دفاعی تاثیر دارد. بیماری کمپلکس (تلقیح قارچ بعد از تلقیح نماتد (٦٠٠٠ لارو) منجر به افزایش ٨٠ درصدی ترکیبات فنلی و ٥٤/٤٨ درصدی فعالیت پراکسیداز نسبت به شاهد گردید که ممکن است ناشی از اثرات سینرژیستی پاتوژن‌ها باشد. قارچ بیش از نماتد در افزایش فعالیت پراکسیداز نسبت به ترکیبات فنلی نقش داشت که نشان دهنده واکنش‌های پیچیده پارازیتیسم نماتد در تعامل نماتد-گیاه بود. کاهش ترکیبات دفاعی در رقم نگین (حساس به فوزایوم) و افزایش آن در ارقام خصیب (متحمل به فوزاریوم) و دستجردی (متحمل به نماتد) نشان داد تولید ترکیبات دفاعی ممکن است با مقاومت خیار به عوامل بیماریزا ارتباط داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: برهمکنش، پراکسیداز، ترکیبات فنلی، خیار، فوزاریوم، نماتد ریشه‌گرهی

*نویسنده مسئول: srezaee@srbiau.ac.ir

مقدمه

خیار (*Cucumis sativus* L.) یکی از مهمترین محصولات گلخانه‌ای استان یزد می‌باشد که در سال‌های اخیر به دلایلی چون خشکسالی‌های مکرر، مصرف بهینه آب درکشاورزی و صادرات محصول، کشت گلخانه‌ای آن در استان یزد گسترش یافته است به‌طوری‌که درحال حاضر این استان مقام دوم سطح زیرکشت محصولات گلخانه‌ای کشور را دارد. بیماری‌های متعددی تولید خیار گلخانه‌ای را محدود می‌کنند که در میان آنها عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی خیار *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* و نماتد ریشه‌گرهی، *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 از مخربترین عوامل بیماریزای خیار گلخانه‌ای هستند (Moosavi et al., 2006; Shahriari et al., 2011). نماتدهای ریشه‌گرهی، اقتصادی‌ترین خسارت را در میان نماتدهای پارازیت گیاهی دارند و همچنین دارای پراکندگی جهانی هستند (Jones et al., 2013). شیوع و شدت این دو بیماری به‌طور همزمان و به‌صورت کمپلکس در سال‌های اخیر افزایش قابل توجهی داشته است (Mohamadian-Sarcheshmeh and Ahmadi, 2014). نماتدهای ریشه‌گرهی به روش‌های مختلف با میزبان خود تعامل دارند. آنها با بیان ژن‌های گسترده گیاه و نماتد و تمایز مجدد سلول‌های ریشه، سلول‌های تغذیه‌ای نماتد یا سلول‌های غول‌آسا را تشکیل می‌دهند که برای توسعه و تغذیه نماتدهای ریشه گرهی ضروری می‌باشند (Portillo et al., 2013). نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* SPP.) ممکن است با عوامل بیماریزای گیاهی دیگر همراه شده و یک بیماری کمپلکس ایجادکنند. آنها قادرند با تولید مولکول‌های افکتور روی پارازیتیسم نماتد و فیزیولوژی سلول گیاهی تأثیر بگذارند (Gheysen and Mitchum, 2011; Portillo et al., 2013). نماتدها در بافت‌های گیاهی موجب انواع پاسخ‌های دفاعی میزبان می‌شوند. این واکنش‌ها شامل تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مثل آنیون سوپراکسید (O_2^-)، اکسیژن سینگلت (O_2)، هیدروژن پروکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسید (OH^-) می‌باشد (Teixeira et al., 2016; Zhou, 2018). مواد شیمیایی درگیاهان شامل متابولیت‌های اولیه و متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. متابولیت‌های اولیه گیاهی مستقیما در رشد، نمو و یا تکثیر گیاه دخالت دارند و شامل قندها، آمینو اسیدها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشند. متابولیت‌های ثانویه دردفاع شیمیایی گیاهان نقش دارند و شامل ترپنوئیدها، مواد فنلی و آلکالوئیدها هستند (Arnao and Hernández-Ruiz, 2019). ترکیبات فنلی گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند که توسط گیاهان در دفاع در برابر پاتوژن از مسیرهای شیکمیک اسید و مالونیک اسید تولید می‌شوند. ترکیبات فنلی، ترکیبات ضد قارچی طبیعی با ساختارهای متفاوت هستند (Molinari, 1995). این ترکیبات مرتبط با دفاع شامل فلاونوئیدها، آنتی‌سیانین‌ها، فیتوآلکسین‌ها، تنین‌ها، لیگنین و فورانوکومارین‌ها می باشند. فلاونوئیدها یکی از بزرگترین دسته‌های مواد فنلی هستند که در ریشه آلوده به نماتد القاء می‌شوند و در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس بیشتر تولید می‌شوند. فلاوونوئیدها در توسعه مکان‌های تغذیه‌ای نماتد، جذب شیمیوتاکتیک نماتد به سمت ریشه و یا دفع نماتد از ریشه، در دفاع عمومی و مقاومت گیاه در برابر نماتد و در تکتیر نماتد نقش دارند (Chin, 2018; Gheysen and Mitchum, 2011; Sato, 2015). تعدادی از بررسی‌ها نشان داده که تجمع زیاد و قابل توجه ترکیبات فنلی ناشی از افزایش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز می‌تواند منجر به تقویت دفاع میزبان برای

محدودسازی حمله پاتوژن و حفاظت گیاه در برابر عوامل بیماریزای گیاهی شود (Mohammadi and Kazemi, 2002). به‌طورکلی زیرخانواده پراکسیدازها براساس ساختار به سه دسته تقسیم می‌شوند (Jin, 2011). دسته اول شامل پروتئین‌های داخل سلولی هستند که عمدتاً آب اکسیژنه مازاد را سم زدایی وخنثی می‌کنند (Shigeoka, 2002). دسته دوم پروکسیدازها منحصرا باعث تجزیه بقایای گیاهی در خاک توسط قارچ‌ها می‌شوند (Martinez, 2005). پراکسیدازهای دسته سوم در گیاهان یافت می‌شوند و شامل پپتیدهای سیگنال ان-ترمینال برای ترشح در دیواره سلولی یا واکوئل‌ها هستند. این آنزیم‌ها در فرایندهای فیزیولوژیکی و نمو گیاهان شامل اتصال عرضی اجزاء دیواره سلولی در تشکیل و تقویت دیواره سلولی و تغییر دیواره سلولی، لیگنینی شدن، چوب پنبه‌ای شدن، کاتابولیسم اکسین، اکسیداسیون فنل ها، تشکیل موانع دفاعی برای تقویت ساختار سلول، جلوگیری از حمله عامل بیماری، تولید اکسیژن فعال و ایجاد شرایط مضر و ناسازگار برای پاتوژن و شروع مسیرهای سیگنالینگ پایین دستی برای ایجاد مکانیسم‌های دفاعی دخالت دارند (Almagrol, 2009; Bolwell and Daudi, 2009; Cosio, 2009; Siddique et al., 2014; Simonetti, 2009; Torres, 2006) . ترکیبات دفاعی گیاهان شامل ترکیبات فنلی، پراکسیداز و فعالیت آنها درتعدادی گیاهان در پاسخ به عفونت ناشی از عوامل بیماریزای قارچی و نماتد القاء می‌شوند (Gheysen and Mitchum, 2011). تغییر در ترکیبات دفاعی گیاهان و بویژه آنزیم‌های دفاعی آنها (عمدتاً پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و پروتئاز) توسط محققین مختلف در بافت‌های گیاهی آلوده به قارچ و نماتد در واریته‌های حساس و مقاوم گیاهان مختلف بررسی شده است. براساس بازبینی مقالات گذشته، آلودگی گیاه به نماتد ریشه‌گرهی، میزان آنزیم‌های پراکسیداز، ترکیبات فنلی و پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز را در ریشه گیاهان قهوه، لوبیا چشم بلبلی، برنج و زیتون افزایش داده است (Eisenback, 1985; Gheysen and Mitchum, 2011; Hiraga, 2001; Hussey and Barker, 1973; Jing, 2011; Maehly and Chance, 1954; Malick, 1980; Mazzafera et al., 1989; sahebani, 2011). تغییرات در فعالیت کمی پراکسیداز در برهمکنش‌های مختلف بین قارچ *Verticilium dahli* و نماتد *Meloidogyne javanica* در زیتون و بین نماتد *Meloidogyne javanica* و قارچ پژمردگی فوزاریومی درگوجه فرنگی، *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersicum* به ترتیب توسط Saeedizadeh و همکاران (۲۰۰۹) و Sahebani و همکاران (۲۰۰۸) بررسی گردید. همچنین تغییرات کمی ترکیبات فنلی در واریته‌های خربزه در برهمکنش قارچ پژمردگی طالبی، *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* و نماتد ریشه گرهی، *Meloidogyne javanica* توسط Shokoohi و همکاران (۲۰۰۳) بررسی شد. فهم پاسخ‌های دفاعی میزبان در تعلاملات قارچ-نماتد-گیاه به دستیابی به راهبردهای کنترل بیماری کمپلکس کمک خواهد کرد (Sato, 2019). باتوجه به هزینه‌های بالای کنترل شیمیایی و همچنین آلودگی محیط زیست و نیز توسعه کشاورزی پایدار، تولید و دستیابی به ارقام مقاوم خیار به نماتد ریشه‌گرهی یکی از مهمترین روش‌های کنترل این عامل بیماریزا محسوب می‌شود. تولید ارقام مقاوم به دلیل کمبود داده‌های کاربردی در بیولوژی سلولی و مولکولی در تعامل نماتد-قارچ-گیاه، عدم کشف مکانیسم‌های دقیق دفاع ومقاومت گیاهان به نماتد ریشه‌گرهی ناموفق بوده است. به طوری که امروزه ارقام موجود در بازار تجاری غالبا حساس به نماتد و یا متحمل به آن هستند که با

حضور قارچ و ایجاد بیماری کمپلکس شدت بیماری افزایش می‌یابد. در این بررسی اثر تغییرات فعالیت کمی پراکسیداز و ترکیبات فنلی روی برهمکنش بین نماتد ریشه‌گرهی و قارچ پژمردگی خیار به صورت تلقیح نماتد و یا قارچ به تنهایی و تلقیح با فاصله و همزمان با یکدیگر و ایجاد بیماری کمپلکس بررسی شد. در بررسی حاضر تعاملات بین قارچ-نماتد-گیاه در ترکیبات سازگار و غیر سازگار عوامل بیماریزا با گیاهان در ارقام مختلف خیار حساس به قارچ فوزاریوم (رقم نگین)، خیار متحمل به نماتد ریشه‌گرهی (رقم دستجردی) و خیار متحمل به قارچ فوزاریوم (رقم خصیب) بررسی شد. این بررسی می‌تواند به شناخت و فهم بیشتر مکانیسم‌های پیچیده تعامل بین عوامل بیماریزا – گیاه دربیماری کمپلکس و در نتیجه بهره‌گیری از آن برای تولید ارقام مقاوم و دوام مقاومت آنها در شرایط کمپلکس کمک کند. این بررسی همراه با مطالعات ژنومیک و مولکولی دیگر در آینده، می تواند مسیر کشف مکانیسم‌های مولکولی دفاع گیاه و در نتیجه ژن‌های دخیل در مقاومت گیاه خیار به نماتد و ایجاد خیارهای مقاوم به نماتد ریشه‌گرهی را تسهیل نماید.

مواد و روش‌ها

تهیه مایه تلقیح نماتد: نماتد ریشه‌گرهی، *Meloidogyne javanica* به کار رفته در این بررسی از ریشه‌های خیار آلوده به نماتد از گلخانه‌های خیار در استان یزد جداسازی گردید. توده تک تخم برای تهیه و تکثیر جمعیت نماتد روی واریته روتگرز گوجه فرنگی به کاررفت. توده تخم نماتد بیشتر در گلخانه ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد تولید شد. جدایه نماتد از طریق بررسی الگوی انتهای نماتد ماده و بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و مورفومتری تایید و به عنوان *M. javanica* شناسایی گردید (Eisenback, 1985; Moosavi et al., 2006; Taylor and Netscher, 1974). جهت جمع‌آوری تخم، ریشه‌های آلوده به نماتد درجریان شیرآب شسته و به قطعات ۲-۳ اینچی بریده و در بطری حاوی هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. تخم‌های جدا شده جهت حذف هیپوکلریت-با آب شیرشستشو شدند. استخراج کیسه‌های تخم از ریشه‌های گال‌دار صورت گرفت (Hussey and Barker, 1973). تعداد تخم‌های نماتد در سوسپانسیون آبی با ظرف شمارش مشخص گردید. متوسط تعداد شمارش شده تخم به عنوان میانگین تعداد تخم در یک میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. لاروهای آزمایش از کیسه‌های تخم و تخم‌های نگهداری شده در ۲۲ درجه سانتی‌گراد بدست آمد.

جدایه‌های قارچی: ۱۵ جدایه قارچی از ریشه‌های آلوده خیار از گلخانه‌های خیار از استان یزد بدست آمد. هشت عدد از این جدایه‌های قارچی بر اساس آزمایشات بیماریزایی *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تشخیص داده شدند (Lesli et al., 2006; Nelson et al., 1993; Vakalounakis et al., 2005) که در محیط کشت سیب زمینی دکستروز اگار (PDA) در ٦ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مایه تلقیح قارچ طبق روش Vakalounakis و همکاران (۲۰۰۵) با رشد قارچ در محیط کشت مایع سیب زمینی دکستروز در فلاسک‌های ارلن مایر در شیکر چرخان برای ۷ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد بدون نور خورشید بدست آمد. بیماریزایی هر جدایه روی گیاهچه‌های مختلف خیار در مرحله سه برگی با روش غوطه‌ور سازی ریشه انجام گردید (Vakalounakis et al., 2005).

آماده‌سازی آزمایشات گلخانه‌ای: در این آزمایش از سه‌رقم خیار (خصیب (متحمل به فوزاریوم)، نگین (حساس به فوزاریوم) ودستجردی (متحمل به نماتد) استفاده گردید. بذرهای خیار با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۵ دقیقه استریل شدند و درون گلدان‌های ۸ اینچی حاوی خاک استریل (شامل ترکیبی از خاک گلخانه (۳۰ ٪زس، ۷۰٪ ماده آلی) و شن ۱:۱ حجمی/حجمی) کشت گردیدند (Shokoohi et al., 2003). گیاهان در مرحله سه برگی از خاک حذف شدند و ریشه‌ها با آب شسته و با سوسپانسیون قارچ شامل 10^6 میکروکنیدی با روش غوطه‌ورسازی ریشه تلقیح شدند (Vakalounakis et al., 2005). گیاهچه‌های خیار در مرحله سه‌برگی با مایه تلقیح دوعامل بیماریزا شامل مرحله لارو سن‌دو نماتد (J_2) یا سوسپانسیون میکروکنیدی قارچ تلقیح شدند. همچنین گیاهان شاهد با آب استریل تلقیح شدند (Oka et al., 1999). مایه تلقیح نماتد به تعداد ۱۵۰۰، ۳۰۰۰، ۴۵۰۰ و ۶۰۰۰ لارو سن‌دو نماتد با کمک میکروپیپت یک میلی‌لیتری درون دو چاهک نزدیک ریشه قرار گرفت (Hussey and Barker, 1973). ۴ تکرار برای هر یک از سطوح اینوکولوم در نظرگرفته شد. این بررسی بر اساس آزمایش فاکتوریال با طرح پایه بلوک کامل تصادفی شامل ۴۵ تیمار انجام گردید. در این طرح فاکتور رقم شامل سه سطح (ارقام خصیب، نگین و دستجردی) و فاکتور نماتد شامل پنج سطح (۰، ۱۵۰۰، ۳۰۰۰، ۴۵۰۰ و ۶۰۰۰ لارو نماتد) و فاکتور قارچ (شامل سه‌سطح (عدم تلقیح قارچ، تلقیح قارچ یک هفته بعد از نماتد و تلقیح همزمان قارچ و نماتد) بود. میزان ترکیبات فنلی و فعالیت پراکسیداز ۱۰، ۲۰و ۳۰ روز بعد از تلقیح قارچ ارزیابی گردیدند.

ارزیابی فعالیت پراکسیداز: جهت استخراج پروتئین از بافت گیاه خیار، ۰/۵ گرم از بافت ریشه گیاه در هاون چینی سرد با استفاده از ازت مایع به خوبی ساییده و نرم شد. سپس یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مولار (pH= ۶) به آن اضافه و کاملا هموژن گردید. در تمام مدت انجام کار هاون در تشت یخ قرار داشت. مخلوط حاصل به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شده، توسط میکروسانتریفیوژ ۱۳۰۰۰ دور بمدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. عصاره‌ی رویی برای انجام آزمایش‌ها جدا و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۴۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت (Reuveni, 1998). ارزیابی میزان فعالیت پراکسیداز براساس روش Mohammadi and Kazemi (۲۰۰۲) انجام شد. دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره شامل ۴۰ میلی‌گرم پروتئین، ۲۰ میکرولیتر گوئیکول و مقدار کافی بافر سیترات‌فسفات ۲۵ میلی‌مول (pH=۵/۴) دریک لوله آزمایش مخلوط گردیده، دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج λ_{max}=۴۷۵ nm صفر شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ ٪ به مخلوط اضافه کرده و سریعا مخلوط و تغییرات جذب نور با فواصل ۱۰ ثانیه و به مدت ۱ دقیقه اندازه گیری گردیده، فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

ارزیابی میزان فنل کل: میزان کل فنل ریشه توسط روش VanderMolen و همکاران (۱۹۷۷) انجام گرفت. برای بررسی تغییرات کمی ترکیبات فنلی، یک گرم ریشه تازه با ۱۰ سانتی‌متر مکعب متانل ۸۰٪ در هاون کوبیده و با پارچه ململ دولایه صاف و ریشه‌های روی پارچه دو دفعه با سه میلی‌لیتر متانول ۸۰ ٪ شسته شده و عصاره بدست‌آمده به مدت پنج دقیقه در۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول قسمت فوقانی برای اندازه گیری ترکیبات فنلی استفاده شد. مقدار کل مواد فنلی در عصاره ریشه‌ها بوسیله معرف فولین اندازه گیری شده، ۰/۵

میلی‌لیتر عصاره با هفت میلی‌لیتر آب مقطر در یک لوله آزمایش ریخته و محتوی لوله خوب مخلوط گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فوق به لوله اضافه شده و تکان داده شد. سه دقیقه بعد یک میلی‌لیتر کربنات‌سدیم اشباع به لوله اضافه شده، پس از یک ساعت مقدار جذب رنگ با طول موج ۷۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل کری ۳۰۰ خوانده شد. لوله بلانک با معرف تنها استفاده شده و برای هر نمونه عصاره، میانگین سه قرائت در محاسبات منظور گردید. بدین منظور اسید کافئیک به‌عنوان معیار مقایسه مورد استفاده قرارگرفته، برای تهیه محلول فنل ذخیره ۱۰۰ میلی‌گرم اسیدکافئیک در متانول ۸۰ ٪ حل وحجم این محلول به ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تهیه محلول استاندارد مقدار ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و۳۰ میلی‌لیتر محلول فنل ذخیره به داخل ۷ بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و حجم نهایی با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در نتیجه ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول‌های فوق به ترتیب ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و۳۰ میکروگرم اسیدکافئیک را در برخواهد داشت. منحنی استاندارد برای جذب رنگ و مقدار اسید کافئیک بر حسب میکروگرم تهیه گردید. در مراحل زمانی ۱۰،۲۰ و ۳۰ روز پس از مایه‌زنی عامل بیماریزا میزان کل فنل در ریشه محاسبه و اندازه گیری شد (Shokoohi et al., 2003).

داده‌های آزمایش تجزیه واریانس گردیدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با کاربرد نرم‌افزار آماری (International IBM SPSS 22 Bussines Machine corporation) انجام گردید. رشد و تلقیح و نمونه گیری گیاهان دوبار انجام شد و میانگین دو اندازه گیری برای آنالیز آماری به کاررفت. آزمون T مستقل برای مقایسه میانگین دوگروه مستقل (دو آزمایش) برای تعیین این که میانگین‌های جمعیت مورد مطالعه به طور معنی‌داری متفاوت هستند به کار رفت. آزمون T یک‌آزمون پارامتریک می‌باشد. آزمایشات یک مرتبه تکرار شدند. آزمون‌های T و لون برای برابری میانگین‌ها و برابری واریانس‌ها به کار رفتند.

نتایج

بررسی فعالیت ترکیبات‌فنلی و پراکسیداز در برهمکنش نماتد و قارچ در آزمایشات مربوط به آنزیم‌ها نتایج نشان داد که همه تیمارها در سطح ۵٪ در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری دارند. بالاترین مقدار ترکیبات فنلی و میزان پراکسیداز مربوط به تلقیح قارچ بعد از تلقیح گیاه با ۶۰۰۰ لارو نماتد بود (جدول ۱ و ۲). درمیان ارقام خیار، رقم نگین کمترین مقدار ترکیبات فنلی و پراکسیداز را دارا بود. بالاترین مقدار ترکیبات فنلی مربوط به سی امین روز بعد از تلقیح قارچ بود و میزان این ترکیبات از روز۱۰ ام تا ۳۰ ام افزایش نشان داد. میزان پراکسیداز در گیاهانی که فقط با قارچ تلقیح شده بودند افزایش یافت و به حداکثر خود در روزسی‌ام بعد از تلقیح رسید. فعالیت پراکسیداز تا ۲۰ روز بعد از تلقیح قارچ افزایش معنی‌داری در تیمارهای تلقیح شده با نماتد و قارچ نشان داد و سپس تا ۳۰ امین روز بعد از تلقیح قارچ در مقایسه با تیمارهایی که فقط تلقیح قارچ به تنهایی انجام شده بود، کاهش یافت. نتایج نشان داد که حضور قارچ قادر به محدود کردن القاء پراکسیداز نبود وقارچ تاثیر بیشتری نسبت به نماتد در افزایش پروکسیداز دارد (جدول ۱). افزایش سطوح جمعیتی نماتد و تعداد اینوکولوم (مایه تلقیح) منجر به افزایش میزان ترکیبات فنلی و پراکسیداز گردید (شکل ۳ و ٤). در این بررسی در حضور قارچ یعنی تیمار تلقیح قارچ بعد از نماتد و تیمار تلقیح همزمان قارچ و نماتد (بیماری کمپلکس) میزان پراکسیداز نسبت به تلقیح

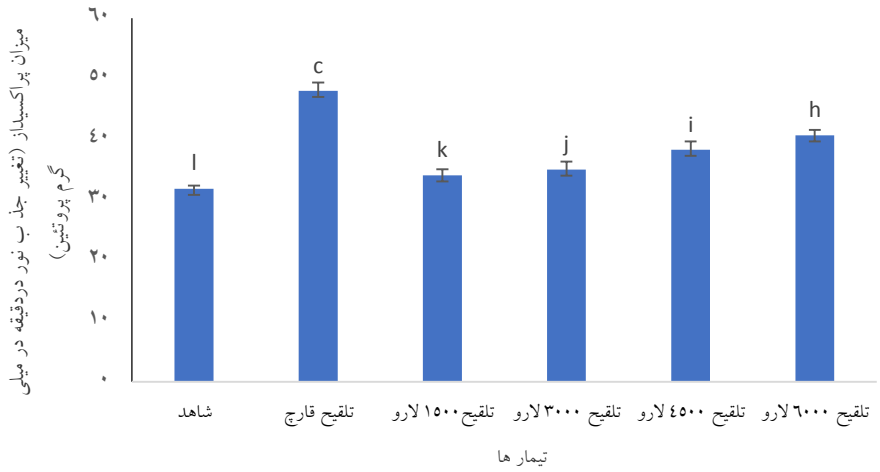
خیار با قارچ به تنهایی و با نماتد به تنهایی افزایش نشان داد (شکل ۱ و ۲). درتیمار تلقیح قارچ بعد از تلقیح نماتد میزان پروکسیداز و ترکیبات فنلی بیشتر از تلقیح همزمان بود. رقم خیار نگین (حساس به فوزاریوم) کمترین مقدار پراکسیداز و رقم دستجردی (متحمل به نماتد) بیشترین میزان پراکسیداز را نشان داد. مقایسه میانگین مقادیر ترکیبات فنلی و میزان پراکسیداز در برهمکنش بین نماتد و قارچ درجدول ۱ و ۲ قرارگرفته است.

جدول ۱: مقایسه میانگین میزان ترکیبات فنلی (میکروگرم دریک گرم وزن تر ریشه) تیمارها در برهمکنش بین قارچ پژمردگی *Fusarium oxysparum* f. sp. *radicis-cucumerinum* و نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در ارقام خیار.

تیمارها	میزان ترکیبات فنلی (میکروگرم) ۳۰ روز بعد از تلقیح قارچ			میزان ترکیبات فنلی(میکروگرم) ۲۰ روز بعد از تلقیح قارچ			میزان ترکیبات فنلی(میکروگرم) ۱۰ روز بعد از تلقیح قارچ		
	دستجردی	نگین	خصیب	دستجردی	نگین	خصیب	دستجردی	نگین	خصیب
شاهد	٦٤٦^{g}	٥٣٤^{h}	٦٥٢^{j}	٥٢٩^{i}	٥٢٠^{j}	٥٤٢^{j}	٣٢٣^{k}	٣٠٣^{i}	٣١٥^{k} [1]
قارچ	٩٦٧^{e}	٨٤٩^{e}	٩٧٤^{gh}	٨٧٢^{f}	٧٥٢^{g}	٨٥٧^{g}	٥٦١^{f}	٤٣٧^{d}	٥٧٥^{ef}
نماتد (۱۵۰۰ لارو)	٩٦٨^{e}	٨٥١^{e}	٩٧٥^{gh}	٨٤٠^{g}	٧٢٣^{h}	٨٣٩^{h}	٥٥٩^{f}	٤٢٨^{de}	٥٧١^{f}
نماتد (۱۵۰۰ لارو)←قارچ۲	١٠٠٩^{d}	٨٨٠^{de}	١١٢٢^{d}	٨٩٠^{e}	٧٥٧^{g}	٨٥٧^{g}	٦٦٩^{b}	٥١١^{b}	٦٦٥^{b}
نماتد (۱۵۰۰ لارو)+ قارچ	٨٧٢^{f}	٧٢٩^{g}	٨٨١^{i}	٧٤٢^{h}	٦٢٨^{i}	٧٧١^{i}	٤٣١^{j}	٣١٢^{gh}	٤٢٦^{j}
نماتد (۳۰۰۰ لارو)	٩٥٦^{e}	٨٦٩^{de}	٩٨٢^{g}	٨٦٩^{f}	٧٦٠^{g}	٨٦٠^{g}	567^{f}	٤٣٠^{d}	٥٨٣^{ef}
نماتد (۳۰۰۰ لارو)←قارچ	١٠٦٥^{d}	٩٣٥^{d}	١٠١٣^{e}	٩٠٨^{e}	٨١٥^{e}	٩٢٠^{e}	٦٢١^{c}	٤٧٠^{cd}	٦١١^{d}
نماتد (۳۰۰۰ لارو)+ قارچ	٩٨٣^{e}	٨١٦^{ef}	٩٥٨^{h}	٨٣٠^{g}	٧١٤^{h}	٨٥٠^{gh}	٤٦٥^{i}	٣٢٤^{g}	٤٥٦^{i}
نماتد (٤۵۰۰ لارو)	١٠١٤^{d}	٨٩٥^{d}	١٠٠٣^{ef}	٩٠٠^{e}	٧٨٣^{f}	٩٠٧^{f}	٥٩٤^{e}	٤٦٨^{cd}	٥٩٨^{e}
نماتد (٤۵۰۰ لارو)←قارچ	١٣١٢^{b}	١٢١٢^{b}	١٣٠٧^{b}	١٢٣٧^{b}	١٠٦٢^{b}	١٢٣٨^{b}	٦٢٣^{c}	٤٨٦^{c}	٦٣٤^{c}
نماتد (٤۵۰۰ لارو)+ قارچ	١٠٠٧^{d}	٨٨٥^{de}	١٠٢١^{e}	٨٩٦^{e}	٧٧٥^{fg}	٩٠٨^{f}	٥١٨^{gh}	٤٠٣^{f}	٥٢١^{h}
نماتد (٦۰۰۰ لارو)	١٢٢٥^{c}	١٠٧٠^{c}	١١٨٠^{c}	١١٦٠^{c}	٩٧٢^{c}	١١٠٥^{c}	٦١٢^{d}	٤٧٥^{cd}	٦٠٩^{e}
نماتد (٦۰۰۰ لارو)←قارچ	١٧١٠^{a}	١٥٩٥^{a}	١٨٩٢^{a}	١٦١٠^{a}	١٤٦٢^{a}	١٤٩٥^{a}	٩٠٩^{a}	٧١١^{a}	٨٩٤^{a}
نماتد (٦۰۰۰ لارو)+ قارچ	١١٣٧^{cd}	١٠٣٧^{c}	١١٤٥^{cd}	١٠٤٠^{d}	٩٢٧^{d}	١٠٧٥^{d}	٥٢٦^{g}	٤٢٨^{de}	٥٣٤^{g}

۱- اعداد با حروف مختلف در هر ستون در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری باهم دارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن)

۲- نماتد← قارچ = تلقیح قارچ یک هفته بعد از تلقیح نماتد، نماتد+ قارچ = تلقیح همزمان نماتد و قارچ



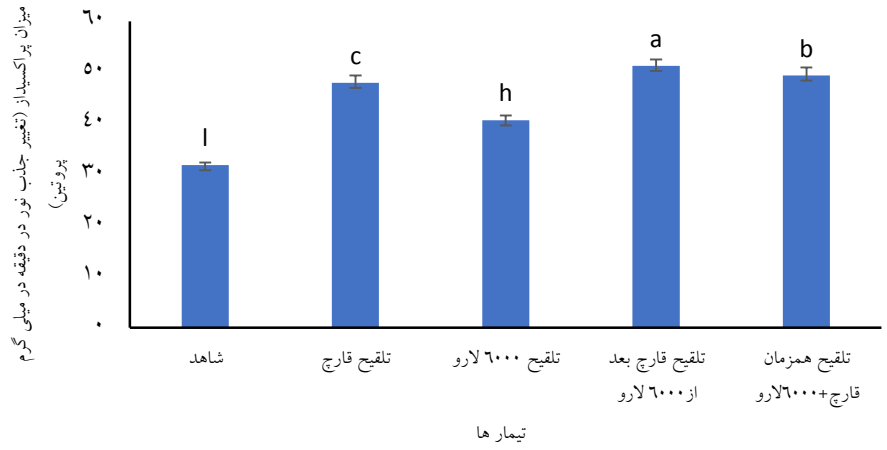
شکل ۱: میزان فعالیت پراکسیداز محلول (تغییر جذب نور دردقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در جمعیت‌های مختلف نماتد و تیمار تلقیح قارچ به تنهایی

جدول ۲: مقایسه میانگین میزان فعالیت پراکسیداز (تغییر جذب نور دردقیقه در میلی‌گرم پروتئین) تیمارها در برهمکنش بین قارچ پژمردگی *Fusarium oxysparum* f. sp. *radicis-cucumerinum* و نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در ارقام خیار.

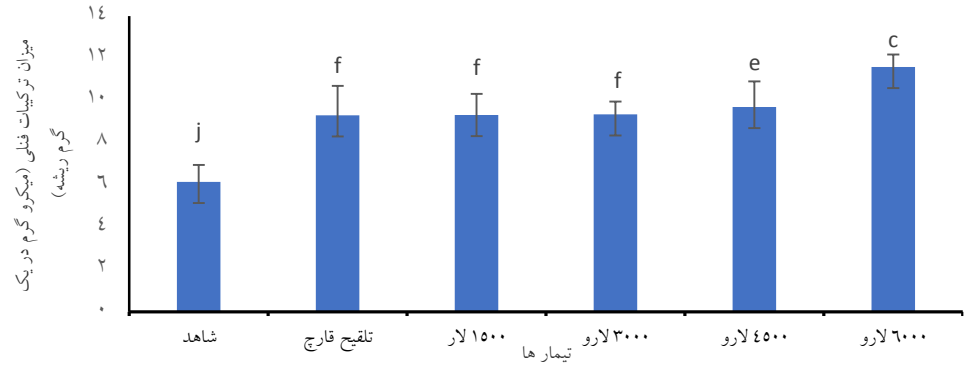
تیمارها	میزان پراکسیداز (تغییر جذب نور دردقیقه در میلی گرم پروتئین) ۳۰ روز بعد از تلقیح قارچ			میزان پراکسیداز (تغییر جذب نور دردقیقه در میلی گرم پروتئین) ز ۲۰ روز بعد از تلقیح قارچ			میزان پراکسیداز (تغییر جذب نور دردقیقه در میلی گرم پروتئین) ۱۰ روز بعد از تلقیح قارچ		
	دستجردی	نگین	خصیب	دستجردی	نگین	خصیب	دستجردی	نگین	خصیب
شاهد	۳۲/۱۵۰^{l}	۳۱/۲۰۰^{n}	۳۲/۲۲۵^{l}	۳۲/۳۵۰^{m}	۳۱/۵۷۵^{m}	۳۱/۱۲۵^{k}	۳۱/۱۵۰^{m}	۳۱/۲۲۵^{lm}	۳۰/۴۵۰^{m}
قارچ	۵۰/۴۵۰^{c}	۴۴/۶۲۵^{e}	۴۸/۸۷۵^{c}	۴۹/۳۵۰^{f}	۴۳/۵۲۵^{g}	۴۶/۶۵۰^{e}	۴۵/۸۲۵^{h}	۳۹/۳۲۵^{h}	۴۲/۶۲۵^{h}
نماتد (۱۵۰۰ لارو)	۳۵/۵۰۰^{k}	۳۳/۲۰۰^{m}	۳۳/۵۰۰^{k}	۳۷/۴۷۵^{l}	۳۳/۶۲۵^{l}	۳۴/۳۵۰^{ij}	۳۴/۴۴۰^{l}	۳۱/۵۱۵^{l}	۳۱/۳۲۵^{l}
نماتد (۱۵۰۰ لارو)←قارچ۲	۴۷/۹۵۰^{e}	۴۲/۰۱۲^{gh}	۴۵/۶۰۰^{fg}	۴۹/۵۵۰^{f}	۴۳/۵۲۵^{g}	۴۶/۴۷۵^{ef}	۴۷/۸۵۰^{f}	۴۱/۷۲۵^{f}	۴۵/۶۵۰^{f}
نماتد (۱۵۰۰ لارو)+ قارچ	۴۵/۸۲۵^{g}	۴۰/۵۲۵^{i}	۴۴/۲۷۵^{g}	۴۷/۱۵۰^{h}	۴۲/۶۵۰^{h}	۴۷/۸۵۰^{d}	۴۶/۵۰۰^{g}	۴۰/۶۷۵^{g}	۴۴/۶۲۵^{g}
نماتد (۳۰۰۰ لارو)	۳۶/۴۰۰^{j}	۳۴/۲۰۰^{l}	۳۴/۵۰۰^{j}	۳۸/۸۲۵^{k}	۳۴/۸۲۵^{k}	۳۴/۵۵۰^{i}	۳۶/۰۵۰^{k}	۳۲/۸۲۵^{k}	۳۳/۷۰۰^{k}
نماتد (۳۰۰۰ لارو)←قارچ	۵۰/۰۵۰^{cd}	۴۳/۳۵۰^{f}	۴۷/۵۷۵^{d}	۵۱/۴۰۰^{d}	۴۵/۵۷۵^{e}	۴۸/۸۲۵^{c}	۴۹/۹۰۰^{d}	۴۳/۸۵۰^{d}	۴۷/۷۵۰^{d}
نماتد (۳۰۰۰ لارو)+ قارچ	۴۷/۳۰۰^{ef}	۴۲/۷۲۵^{g}	۴۶/۶۰۰^{e}	۴۹/۲۰۰^{fg}	۴۴/۵۷۵^{f}	۴۷/۸۰۰^{d}	۴۷/۸۵۰^{f}	۴۲/۹۰۰^{e}	۴۶/۵۰۰^{e}
نماتد (۴۵۰۰ لارو)	۳۹/۵۰۰^{i}	۳۷/۷۷۵^{k}	۳۷/۵۲۵^{i}	۴۱/۷۰۰^{j}	۳۸/۶۲۵^{j}	۳۸/۳۷۵^{h}	۳۹/۸۰۰^{j}	۳۷/۳۲۵^{j}	۳۷/۱۲۵^{j}
نماتد (۴۵۰۰ لارو)←قارچ	۵۰/۱۰۰^{cd}	۴۶/۸۲۵^{b}	۴۹/۵۲۵^{bc}	۵۴/۰۵۰^{b}	۴۸/۸۵۰^{c}	۵۲/۵۰۰^{a}	۵۱/۱۲۵^{c}	۴۶/۸۲۵^{b}	۵۰/۲۰۰^{a}
نماتد (۴۵۰۰ لارو)+ قارچ	۴۹/۷۲۵^{d}	۴۵/۲۲۵^{d}	۴۵/۶۵۰^{f}	۵۱/۱۷۵^{de}	۴۸/۱۲۵^{cd}	۴۸/۸۸۷^{c}	۴۹/۶۲۵^{de}	۴۵/۶۲۵^{c}	۴۸/۸۵۰^{c}
نماتد (۶۰۰۰ لارو)	۴۲/۸۲۵^{h}	۳۹/۲۰۰^{j}	۳۹/۹۲۵^{h}	۴۴/۴۷۵^{i}	۴۱/۲۲۵^{i}	۴۱/۵۲۵^{g}	۴۱/۴۵۰^{i}	۳۸/۱۲۵^{i}	۳۹/۲۷۵^{i}
نماتد (۶۰۰۰ لارو)←قارچ	۵۳/۸۵۰^{a}	۴۸/۵۲۵^{a}	۵۱/۴۲۵^{a}	۵۵/۵۰۰^{a}	۴۹/۸۰۰^{a}	۵۲/۴۵۰^{a}	۵۳/۳۵۰^{a}	۴۷/۹۲۵^{a}	۵۰/۱۰۰^{a}
نماتد (۶۰۰۰ لارو)+ قارچ	۵۲/۴۰۰^{b}	۴۶/۱۰۰^{c}	۴۹/۶۲۵^{b}	۵۳/۸۰۰^{c}	۴۹/۴۰۰^{b}	۵۱/۴۷۵^{b}	۵۲/۱۲۵^{b}	۴۷/۸۰۰^{a}	۴۹/۶۲۵^{b}

۱- اعداد با حروف مختلف در هر ستون در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری باهم دارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن)

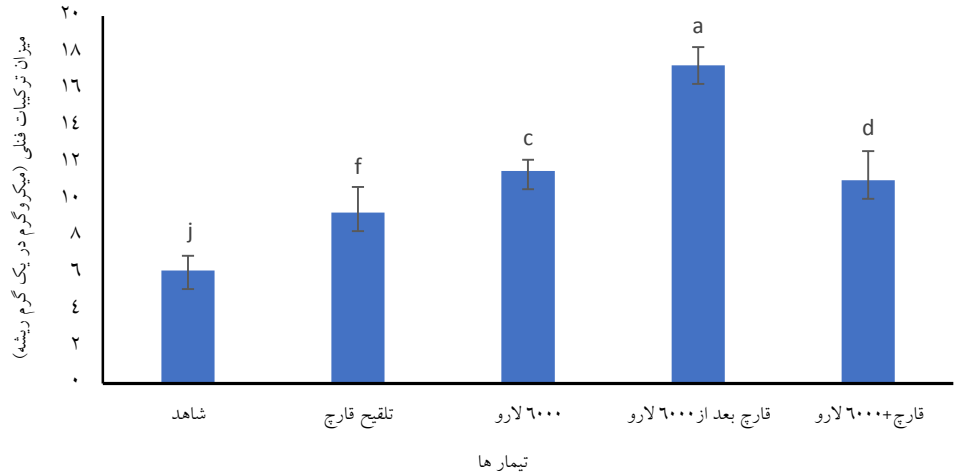
۲- نماتد← قارچ = تلقیح قارچ یک هفته بعد از تلقیح نماتد، نماتد+ قارچ = تلقیح همزمان نماتد و قارچ



شکل ۲: میزان فعالیت پراکسیداز محلول (تغییر جذب نور دردقیقه درمیلی‌گرم پروتئین) در تیمارهای قارچ تنها، نماتد تنها (۶۰۰۰ لارو)، تلقیح همزمان قارچ و نماتد (۶۰۰۰ لارو) و تلقیح قارچ بعد از تلیح نماتد (۶۰۰۰ لارو).



شکل ۳: میزان ترکیبات فنلی در جمعیت‌های مختلف نماتد و تیمار تلقیح قارچ به تنهایی



شکل ٤: میزان ترکیبات فنلی در تیمارهای قارچ تنها، نماتد تنها (۶۰۰۰ لارو)، تلقیح همزمان قارچ و نماتد (۶۰۰۰ لارو) و تلقیح قارچ بعد از تلقیح نماتد (۶۰۰۰ لارو)

بحث

یکی از جنبه‌های مهم دفاع گیاهی در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی دفاع‌های بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده آنها می‌باشد (Cao et al., 2005; Sato et al., 2019). در تلقیح قارچ بعد از نماتد، با توجه به تلقیح قارچ فوزاریوم یک هفته بعد از تلقیح نماتد میزان ترکیبات فنلی نسبت به تلقیح همزمان قارچ و نماتد افزایش نشان داد. در ابتدا با تلقیح گیاه با نماتد ترکیبات فنلی اندکی افزایش نشان دادند و یک هفته بعد که تلقیح قارچ انجام شد، مجددا ترکیبات فنلی افزایش مجدد یافتند. در نتیجه، گیاه خیار در دو مرحله افزایش ترکیبات فنلی را نشان داد. به طور کلی این افزایش ترکیبات فنلی از افزایش ناشی از تیمار تلقیح همزمان قارچ و نماتد بیشتر بود. نماتد مکان نفوذ را برای قارچ مهیاکرده بود در نتیجه، حمله گسترده‌تری در حضور قارچ در تیمارهای تلقیح قارچ بعد از نماتد اتفاق افتاده بود. خسارت و صدمه نماتد به ریشه خیار، تشکیل مکان‌های تغذیه‌ای (سلول غول‌آسا) روی پروکامبیوم ریشه و نفوذ ریسه‌های قارچ به پوست و منطقه آوندی ریشه، علت افزایش میزان ترکیبات فنلی بود. افزایش ترکیبات فنلی و پاسخ سریع در دو رقم خصیب و دستجردی به علت تحمل رقم خصیب به قارچ و تحمل رقم خیار دستجردی به نماتد ریشه‌گرهی خیار بود. افزایش جمعیت نماتد در تیمارهای مختلف منجر به افزایش زخم‌ها و صدمات

ناشی از نفوذ و توسعه نماتد در بافت‌های گیاهی شد درنتیجه افزایش جمعیت نماتد منجر به افزایش ترکیبات فنلی گردید. افزایش ترکیبات فنلی در روز۲۰ ام بعد از تلقیح قارچ نسبت به روز۱۰ ام و همچنین افزایش این ترکیبات در روز ۳۰ ام نسبت به روز۲۰ ام ناشی از افزایش فعالیت و توسعه قارچ و نماتد در بافت‌های گیاهی بود. افزایش ترکیبات فنلی در روز۲۰ ام بعد از تلقیح قارچ نسبت به روز ۱۰ ام و همچنین افزایش این ترکیبات در روز ۳۰ ام نسبت به روز۲۰ ام ناشی از افزایش فعالیت و توسعه قارچ و نماتد در بافت‌های گیاهی بود. همچنین افزایش ترکیبات فنلی درمحدوده زمانی ذکرشده می‌تواند ناشی از افزایش سن گیاه در محدوده‌های زمانی فوق باشد. میزان ترکیبات فنلی و پروکسیداز در بافت تلقیح شده خیار بیشتر از بافت‌های سالم و یا شاهد بود. این نشان می‌دهد که ترکیبات فنلی و پروکسیداز در دفاع گیاهی و مقاومت میزبانی دخالت دارند. VanderMolen و همکاران (۱۹۹۷) پیشنهاد کردند که بیماریزایی عمدتاً بستگی به زمان و مدت پاسخ گیاهی دارد. یکی از واکنش‌های مهم گیاهان در برابر عوامل بیماریزای گیاهی تولید و افزایش مواد فنلی درگیاهان است (Dhakshinamoorthy et al., 2014; Sari et al., 2007). خسارت سریع به سلول‌ها می تواند منجر به آزاد شدن سریع ترکیبات-فنلی و فعال‌سازی آنها شود و از نفوذ عوامل بیماریزای گیاهی جلوگیری کند (Sundararaju and Suba, 2006). از طرف دیگر اگر خسارت به سلول‌ها و رهایی ترکیبات فنلی و فعالیت آنها کند و تدریجی باشد، سرانجام منجر به توسعه عوامل بیماریزای گیاهی و ظهور علایم می‌شود (D'Addabbo et al., 2013). در این بررسی توسعه همزمان و افزایش نفوذ عامل بیماریزا به گیاه، ترکیبات فنلی تولید شده بواسطه حمله این عوامل را افزایش داد. از طرف دیگر، نقش ترکیبات فنلی در گیاه‌سوزی و حساسیت بالای گیاه به آنها یا مقدارشان و نقش ترکیبات در غیرفعال سازی آنزیم‌های لیتیک آشکار شد. افزایش این ترکیبات شرایطی را ایجاد کرد که توانست در توسعه بیماری تاثیر گذار باشد. نماتد ریشه‌گرهی باعث گسترش بیشتر عفونت قارچی شد در نتیجه، متابولیت‌های قارچ وارد جریان شیره آوندی شدند و تغییراتی در بافت آوندی بخش‌های مورد حمله قارچی ایجاد کردند در نتیجه، وسعت و سطح منطقه تحریک شده، ناحیه فعال و مدت زمان تولید آن و برهمکنش فعال در دفاع‌های گیاهی منجر به افزایش ترکیبات دفاعی در گیاهان شد. محققین در تعدادی برهمکنش‌های عامل بیماریزا-میزبان واکنش‌های آنزیمی را مورد بررسی قرارداده اند (Sari et al., 2007; Sari et al., 2008; Shokoohi et al., 2003). در سال‌های اخیر، در تعدای بررسی‌های انجام شده آنزیم‌هایی مثل پراکسیداز، بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، بتا ۱و٤ گلوکاناز و ترکیبات فنلی در گیاهان میزبان به عنوان مارکرهای دفاع بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Sari et al., 2008). پراکسیداز اغلب در پاسخ به صدمات درگیاهان میزبان تولید می‌شود. این آنزیم با دیواره‌های سلولی در ارتباط است و در شرایط درون شیشه، سینامیل الکل را پلیمریزه می‌کند. این آنزیم در تشکیل لیگنین و باندهای عرضی بین مونومرهای اکتنسین و پلی‌ساکاریدها دخالت دارد (Niebel et al., 1993). یکی از جنبه‌های مهم دفاع گیاه میزبان در برابر عوامل بیماریزای گیاهی دفاع بیوشیمیایی میزبان و واکنش‌های پیچیده‌ی مرتبط با آن می‌باشد. از زمانی که تعدادی بررسی‌ها روی فعالیت پراکسیداز طی برهمکنش عامل بیماریزا – میزبان انجام شده، محققین بر این باورند که این آنزیم نقش مهمی در واکنش‌های دفاعی گیاه بازی می‌کند (Maehly and chance,

1954; Sahebani et al., 2008). در این بررسی، ابتدا تلقیح نماتد منجر به افزایش پراکسیداز گردید و تلقیح قارچ یک‌هفته بعد از تلقیح نماتد، منجر به نفوذ و توسعه قارچ گردید در نتیجه، از روز ۱۰ ام تا روز ۲۰ ام بعد از تلقیح قارچ، پراکسیداز افزایش یافت. برهمکنش و رقابت بین قارچ و نماتد در پوست ریشه و منطقه استوانه مرکزی علت افزایش فعالیت پراکسیداز از روز ۱۰ ام تا روز ۲۰ ام بود. افزایش در پراکسیداز در روزهای اولیه می‌تواند با تشکیل سلول غول‌آسا در ریشه خیار و نفوذ نماتد و شروع و آغاز عفونت مرتبط باشد. در مکان‌های تغذیه‌ای نماتد، برهمکنش مستقیم بین دو بیمارگر شامل، نفوذ قارچ و تجمع داخل گال‌ها می تواند مشاهده شود. همچنین تکثیر بیش ازحد سلول میزبان توسط نماتد فرایندهای طبیعی تشکیل سلول و تقویت دیواره سلولی و ترکیب اجزا آن بویژه لیگنین و سلولز را به تاخیر می‌اندازد. در مقایسه با سلول‌های نرمال، آلودگی‌های قارچی می‌توانند به آسانی در چنین سلول‌هایی انجام شوند. در بررسی حاضر پراکسیداز در روز ۳۰ ام بعد از تلقیح قارچ نسبت به روز ۲۰ ام در همه تیمارها و سطوح جمعیتی نماتدها و در همه ارقام خیار، کاهش یافت. این کاهش می‌تواند به علت افزایش سن گیاه میزبان، اختلالات فیزیولوژیکی درگیاه و آماده‌شدن گیاه برای ورود به مرحله گلدهی باشد. چرا که گیاه خیار گلخانه‌ای در فواصل زمانی ۳۵ تا ٤٥ روز وارد فاز گلدهی و میوه‌دهی می شود. همچنین در۲۰ امین روز بعد از تلقیح قارچ بیشترین نفوذ و توسعه قارچ و نماتد اتفاق افتاد و اندکی بعد از ان ثابت شد. در روز۳۰ ام بعد از تلقیح نسبت به روز ۲۰ ام تلقیح با نماتد منجر به کاهش پروکسیداز گردید ولی تلقیح با قارچ افزایش پروکسیداز را باعث شد این نشان می‌دهد نماتد قادر به القاء سنتز ترکیبات محدودکننده پروکسیداز می‌باشد که این ترکیبات با ارتباط پیشرفته انگلی نماتد با میزبان ارتباط دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد پراکیسداز و ترکیبات فنلی از ترکیبات و آنزیم‌های دفاعی در خیار می‌باشند زیرا میزان آنها در تیمارهای تلقیح شده با قارچ و یا نماتد به تنهایی و یا ترکیبی از هر دوعامل بیماریزا به صورت کمپلکس نسبت به گیاه شاهد (بدون تلقیح پاتوژن) افزایش نشان داد. حضور قارچ فوزاریوم تاثیر بیشتری نسبت به نماتد ریشه‌گرهی در تولید پراکسیداز داشت. اما در افزایش ترکیبات فنلی حضور نماتد تاثیر بیشتری داشت. تعداد و جمعیت نماتد ریشه‌گرهی در تلقیح گیاه در تولید و میزان فعالیت پراکسیداز و ترکیبات فنلی اثر گذاشت در نتیجه هر چه مایه تلقیح بیشتر گشت ترکیبات دفاعی بیشتری تولید شد و تعداد آنها با میزان ترکیبات رابطه مستقیم داشت. مقدار بالای فعایت پراکسیداز و ترکیبات فنلی در بیماری کمپلکس، تیمار تلقیح قارچ بعد از نماتد (٦۰۰۰ لارو) رابطه سینرژیستی بین دوپاتوژن نماتد ریشه‌گرهی و قارچ فوزاریوم را اثبات نمود در نتیجه در بیماری‌های کمپلکس میزان ترکیبات دفاعی افزایش یافت. در تلقیح قارچ به تنهایی رقم نگین (حساس به فوزاریوم) کمترین میزان پراکسیداز و ترکیبات فنلی را نشان داد و رقم خصیب (متحمل به فوزاریوم) بیشترین ترکیبات فنلی را در تلقیح قارچ به تنهایی داشت. در تلقیح با نماتد تنها (٦۰۰۰ لارو) رقم دستجردی (متحمل به نماتد) بیشترین میزان ترکیبات فنلی و پراکسیداز را نشان داد. در نتیجه چون میزان پراکسیداز و ترکیبات فنلی در ارقام متحمل و حساس خیار به نماتد و قارچ با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند می‌توان ارتباط این ترکیبات دفاعی با مقاومت

و تحمل و یا حساسیت به دوپاتوژن را اثبات نمود لذا در آینده ترکیبات فنلی و پروکسیداز و ترکیبات دفاعی مشابه می‌توانند ابزار سودمندی برای رسیدن به مکانیسم‌های دقیق مولکولی مقاومت به پاتوژن‌ها و بویژه ایجاد ارقام کاملا مقاوم به نماتد و قارچ در بیماری کمپلکس باشند که در حال حاضر در بازار تجاری بذر وجود ندارند.

References

Anterola, A. and Lewis, N.G. (2002). Trends in lignification: a comprehensive analysis of the facts of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. Phytochemistry. 61: 221-294.

Arnao, M.B. and Hernández-Ruiz, J. (2019). Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator?. Trends in Plant Science, 24(1): 38-48.

Bolwell, G.P. and Daudi, A. (2009). Reactive oxygen species in plant–pathogen interactions. In *Reactive oxygen* species in plant signaling. (pp. 113-133). Springer, Berlin, Heidelberg

Cao, J., Jiang, W. and He, H. (2005). Induced resistance in yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) fruit against infection by Penicillium expansum by postharvest infiltration of acibenzolar-S-methyl. Journal of Phytopathology. 153: 640-646.

Chin, S., Behm, C.A. and Mathesius, U. (2018). Functions of flavonoids in plant–nematode interactions. Planta, 7(4): 85.

Cosio, C., Vuillemin, L., De Meyer, M., Kevers, C., Penel, C. and Dunand, C. (2009). An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation through its auxin oxidase activity. Planta, 229(4): 823-836

D'Addabbo, T., Carbonara, T., Argentieri, M., Radicci, V., Leonetti, P. and Villanova, L. (2013). Nematicidal potential of *Artemisia annua* and its main metabolites. European Journal of Plant Pathology. 137(2): 295–304.

Dhakshinamoorthy, S., Mariama, K., Elsen, A. and De Waele, D. (2014). Phenols and lignin are involved in the defence response of banana (*Musa*) plants to *Radopholus similis* infection. Nematology, 16: 565–576.

Eisenback, J.D. (1985). Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males, and females of the genus Meloidogyne (root-knot nematodes). An advanced treatise on Meloidogyne, 1: 47-77.

Gheysen, G. and Mitchum, M.G. (2011). How nematodes manipulate plant development pathways for infection. Current Opinion on Plant Biology. 14(4): 415–421.

Hiraga, S. (2001). A large family of class III plant peroxidases," Plant Cell and Physiology. 42: 462–468.

Hussey, R.S. and Barker, K.R. (1973). Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique, Plant Disease Reporters. 75: 1025-1028.

Jones J.T., Haegeman A., Danchin E.G., Gaur H.S., Helder J., Jones M.G. and Perry, R.N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathology. 14: 946–961.

Kadota, Y., Shirasu, K. and Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. Plant Cell Physiology. 56(8): 1472–1480.

Maehly, A.C. and Chance, B. (1954). The assay of catalases and peroxidases., Methods of biochemical analysis. 1: 357–424.

Malik, C.P. and Singh, M B. (1980). Plant Enzymology and Histo Enzymology. Kalyani Publishers. New Delhi. 286pp

Mazzafera, P., Gonçalves, W. and Fernandes, J. (1989). Phenols, peroxidase and polyphenol oxidase in the resistance of coffee to *Meloidogyne incognita*. Bragantia. 48: 131-142.

Mishra, C. and Mohanty, K. (2007). Role of phenolics and enzymes in imparting resistance to rice plants against root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, Indian journal of Nematology. 37: 131-134.

Mohamadian-Sarcheshmeh, M. and Ahmadi, A. (2014). The 1st international conference on new ideas in agriculture, The 1st international conference on new ideas in agriculture. p. 658.

Mohammadi, M. and Kazemi, H. (2002). Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance, Plant Sciencese. 162: 401-408.

Molinari, S. (1995). Role of oxidative and peroxidative processes in the plant-nematode interaction. Nematologia Mediterranea. 23: 69-73.

Moosavi, S.S., Karegar, A. and Deljoo, A. (2006). Responses of some common cucumber cultivars in Iran to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, under greenhouse conditions. Iranian Journal of Plant Pathology. 42: 37-50.

Morkunas, I. and Gmerek, J. (2007). The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*, Journal of Plant Physiology. 164: 185–194.

Niebel, A., Almeida, J. D., Tire, C., Engler, C., Van Montagu, G. and Gheysen, G. (1993). Induction Patterns of an extensin gene in tobacco upon nematode infection., Plant Cell. 5: 1697–1710.

Noel, G.R. and McClure, M.A. (1987). Peroxidase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in resistant and susceptible cotton infected by *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology. 10: 34–38.

Oka, Y., Cohen, Y. and Spiegel, Y. (1999). Local and systemic induced resistance to the root-knot nematode in tomato by DL- β -amino- n -butyric acid. Phytopathology. 89: 1138–1143.

Ones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G., Gaur, H.S., Helder, J. and Jones, M.G. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology. 14(9): 946–961.

Patel, B.A., Patel, D.J., Patel, N.B. and Patel, R.G. (2001). Determination of damaging threshold level of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* pathotype 1 on chickpea, Int. Chickpea Pigeonpea Newsletter. 8: 9–11.

Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P. and Djian-Caporalino, C. (2005). Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in Capsicum annuum. Phytopathology. 95: 158–165.

Portillo, M., Cabrera, J., Lindsey, K., Topping, J., Andrés, M. F., Emiliozzi, M. and Resnick, N. (2013). Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode-induced giant cell development in tomato compared with Arabidopsis: a functional role for gene repression. New Phytologist, 197(4): 1276-1290

Qin, X. and Xiaoyan, Z. (2008). The relationship between resistance to *Meloidogyne incognita* and phenyl propanes in roots of egg plant rootstock, Acta Phytophylacica Sinica. 35 : 43-46.

Reuveni, M. (1998). Relationships between leaf age, peroxidase and beta-1,3-glucanase activity, and resistance to downy mildew in grapevines. Journal of Phytopathology. 146: 525–530.

Saeedizadeh, A., Kheiri, A., Zad, J. and Etebarian, H.R. (2009). A Study of the changes in total Phenol content in olive cultivars during the interaction between *Verticillium* wilt, *Verticillium*, and nematode. Iranian Journal Plant Protection Science. 42: 125–135.

Sahebani, N., Zad, J., Sharifitehrani, A. and Kheiri, A. (2008). A study of changes in peroxidase activity in the interaction between root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and tomato Fusarium wilt agent (*Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersisci*), Tehran University. College of Agriculture. 39: 127–138.

Sari, E., Etebarian, H. R. and Aminian, H. (2008). Effects of Pseudomonas fluorescens CHA0 on the Resistance of wheat seedling roots to the take-all fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Plant Protection Science. 11: 298–306.

Sari., E., Etebarian, H. R. and Aminian, H. (2007). The effects of *Bacillus pumilus*, isolated from wheat rhizosphere, on resistance in wheat

seedling roots against the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Jornal of Phytopathology. 155: 720–727.

Sato, K., Kadota, Y. and Shirasu, K. (2019). Plant immune responses to plant parasitic nematodes. Frontiers in plant science, 10: 1165.

Shahriari D., Molavi, E., Aminian, H. and Etebarian, H.R. (2011). Histopathological response of resistant and susceptible cultivars of cucumber to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, the causal agent of fusarium stem and root rot. Seed Plant Improvement Journal. 27: 375–391.

Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. and Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. Journal of Experimental Botany, 53(372): 1305-1319

Shokoohi, E., Kheiri, A., Etebarian, H.R. and Roostaei, A. (2003). Interactions between root-knot nematode Meloidogyne javanica and Fusarium wilt disease, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* in different varieties of melon. Communication in Agriculture Applied Biology Sciencese. 69: 387–391.

Siddique, S., Matera, C., Radakovic, Z.S., Hasan, M.S., Gutbrod, P., Rozanska, E. and Grundler, F.M. (2014). Parasitic worms stimulate host NADPH oxidases to produce reactive oxygen species that limit plant cell death and promote infection. Science Signaling, 7(320): ra33-ra33.

Singh, R.K. (2003). Studies on and predacity and biocontrol potential of *Arthrobotrys oligospora*. Ph.D Thesis. Banaras Hindu University. Varanasi, India. 353pp.

Sundararaju, P. and Suba, K. (2006). Biochemical and molecular changes in banana plants induced by Pratylenchus coffeae and *Meloidogyne incognita*, Indian Journal of Nematology. 36: 256-259.

Tarek Hewezi, J.J. and Baum, T.J. (2011). Arabidopsis peroxidase AtPRX53 influences cell elongation and susceptibility to *Heterodera schachtii*. Plant Signaling and Behavior, 6: 1778-1786.

Taylor, D. and Netscher, C. (1974). An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica. 20: 268-269.

Teixeira, M.A., Wei, L. and Kaloshian, I. (2016). Root-knot nematodes induce pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana* roots. New Phytopathology. 211(1): 276–287.

Torres, M.A., Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. Plant Physiology. 141(2): 373–378.

Vakalounakis D.J., Doulis, A.G. and Klironomou, E. (2005). Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* attacking melon under natural conditions in Greece. Plant Pathology. 54: 339–346

VanderMolen, G.E., Beckman,C. H. and Rodehorst, E. (1977). Vascular gelation: a general response phenomenon following infection. Physiological Plant Pathology. 11(1): 95-100

Whitehead, A.G. and Hemming, J.R. (1965). A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from the soil, Annual Applied Biology. 55: 25–38.

Wong, E. (1973). Plant phenolics, Chemistry and Biochemestry of Herb. 1: 265–322.

Yang, S., Dai, Y., Chen, Y., Yang, J., Yang, D. and Liu, Q. (2019). A novel G16B09-like effector from *Heterodera avenae* suppresses plant defenses and promotes parasitism. Frontier Plant Science. 10: 66.

Zacheo, G., Blevezacheo, T., Pacoda, C., Orlando, D. and Durbin, R. D. (1995). The Association between Heat-Induced Susceptibility of Tomato to *Meloidogyne-Incognita* and Peroxidase-Activity. Physiology and Molecular Plant Pathology. 46: 491–507.

Zhou, J., Xu, X.C., Cao, J.J., Yin, L.L., Xia, X.J. and Shi, K. (2018). Heat shock factor HsfA1a is essential for *R* gene-mediated nematode resistance and triggers H_2O_2 production. Plant Physiology. 176(3): 2456–2471.

Journal of Plant Environmental Physiology, Serial 63, 16th year, Number 3, Autumn 2021
Doi: 10.30495/iper.2021.679543
Dor: 20.1001.1.76712423.1400.16.63.4.6

Biochemical defense response of the greenhouse cucumber (*Cucumis sativus* L.) to complex disease caused by a root-knot nematode and Fusarium wilt fungus

Mehdi Mohamadian Sarcheshmeh[1], Saeed Rezaee[1]*, Alireza Iranbakhsh[2]
[1]Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
[2]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

Received date: 2020/08/21 Accepted date: 2020/10/13

Abstract

Complex disease caused by the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, and the fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, has limited cucumber cultivation in Iran. Therefore, access to the nematode-resistant cultivars has a crucial role in disease control. The Assessment of plant defense compounds in the Complex disease helps understand the molecular mechanisms of resistance and the production of nematode-resistant cultivars. After inoculation of the plants in a greenhouse, the peroxidase enzyme and the phenolic compounds were measured using spectrophotometric method. The experiment was conducted based on a factorial completely randomized designed with 14 treatments, including control, fungi alone, nematode alone in four inoculations level viz. 1500, 3000, 4500, and 6000 J2s, fungus + nematode simultaneously, and fungus a week after nematode inoculation with 4 replications. Phenolic compounds increased by %54.74 and %92.34 and peroxidase enzyme activity increased by %50.64 and %63.31 in plants inoculated with fungus alone and nematode alone (6000 larvae) compared to the control, showing that these substances act as defensive compounds in cucumber. Results showed that increasing the nematode population in inoculated plants improved the defense compounds levels. Inoculation of nematode (6000 larvae) followed by fungus led to %80 and %54.48 increases in phenolic compounds and peroxidase activity, respectively as compared with the control which might be attributed to the synergistic effects of pathogens. The fungi had a more active role than nematodes in increasing the peroxidase compared to the phenolic compounds, which indicated the complex nature of nematode parasitism in the nematode-plant interaction. Decrease in the defense compounds in Negin cultivar (susceptible to Fusarium) and increase in the level of these compounds in Khasib (tolerant to Fusarium) and Dastjerdi (tolerant to nematode) cultivars showed that the production of the defensive compounds may be related to the cucumber resistance to pathogens.

Keywords: Cucumber, *Fusarium oxysparum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, Interaction, *Meloidogyne javanica*, Root-knot nematode, Peroxidase, Phenolic compounds.

*Corresponding author; srezaee@srbiau.ac.ir