

بسم الله الرحمن الرحيم



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

مطالعه پاسخ مولکولی گیاه خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش پاتوژن

عامل بیماری بوته میری (*Phytophthora sp.*)

نگارنده: فاطمه خسروی

اساتید راهنما

دکتر شاهرخ قرنجهیک

دکتر علی دهستانی کلاگر

دی ۱۳۹۶

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم،

برادران و خواهران دلسوزم

و، همسر مهربانم

آموزگارانی که برایم زندگی؛ بودن و انسانیت را معنا کردند حال این برگ سبزی است

تحفه درویش تقدیم آنان....

و حالاً پس از مدت با تلاش و زحمات شبانه روزی:

پاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش را بنمونان شد و به بهشتینی رحروان علم و دانش مفتخران نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

در ابتدا از اساتید با کمالات و کران قدیم جناب آقای دکتر شایخ قریبیک که در کمال سه صدر از بیج کلی دین نمودند و از جناب آقای دکتر علی دهستانی که همواره و در همه حال پاکشوی سوالات اینجانب بودند و با حسن خلق و فروتنی زحمت را سنایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند.

از پدر و مادر عزیزم، این دو معلم بزرگوار که همواره بر کوتاهی و درستی من قلم عفو کشیده و گریانه از کنار غفلت هایم گذشتند و همسر مهربانم که حیات های بی دینش را در اندک زمان حضورش از یاد نخواهم برد.

و در پایان از دوستان و همکاران خوبم در پژوهشگاه ژنتیک و زیست فناوری طبرستان و همکارانی های صبورم از صمیم قلب و خالصانه تشکر و قدردانی می نمایم باشد که این کمترین بخشی از زحمات آنان را پاس گوید.

تعمدنامه

اینجانب **فاطمه خسروی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه مطالعه پاسخ مولکولی گیاه خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش پاتوژن عامل بیماری بوته میری (*Phytophthora sp*) تحت راهنمایی دکتر **شاهرخ قرنچیک و دکتر علی دهستانی** کلاگر متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود . استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده:

بیماری‌های ناشی از قارچ‌ها، از اصلی‌ترین عوامل خسارت و کاهش عملکرد محصولات کشاورزی محسوب می‌گردند. تولید خیار گلخانه‌ای (*Cucumis sativus* L.) طی دهه گذشته در ایران توسعه زیادی یافته است. بیماری بوته میری ناشی از گونه‌های مختلف قارچ *Phytophthora* یکی از مهمترین بیماری‌هایی است که کشت خیار را تحت تاثیر قرار داده و روشهای کنترلی محدودی نیز برای کاهش خسارت آن در دسترس هستند. در این تحقیق، اثر کیتوزان و فسفیت پتاسیم به عنوان دو الفاکر مقاومت در کاهش خسارت ناشی از قارچ *Phytophthora capsici* در گیاه خیار مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و متابولیتی به همراه تغییر در بیان ژن‌های گلوتاتیون پراکسیداز (Gpx)، پروتئین شبه تاوماتینی (TLP)، اکسیداتیو انفجاری (RBOH)، واکنش القائی فوق حساسیت (HIR)، هیدروپراکسید لیاز (HPL) و اندوکتیناز PR-4 در زمان‌های مختلف پس از تلقیح گیاهان با عامل بیماری مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد در مقایسه با گیاه شاهد، میزان کلروفیل، پرولین، فعالیت‌های آنزیم‌های دفاعی مثل آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز، کاتالاز و میزان تجمع پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید در تیمارهای مختلف این آزمایش به صورت معنی‌داری تغییر کرده است. بیشترین میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز ($21/93 \text{ U mg}^{-1}\text{protein}$) در تیمار با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان در روز چهاردهم پس از آلودگی به ثبت رسید. همچنین بیشترین فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز (U) $41/99 \text{ mg}^{-1}\text{protein}$ و کاتالاز ($150/34 \text{ U mg}^{-1}\text{protein}$) در تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب در دومین روز پس از تلقیح مشاهده شد. بیشترین مقدار تجمع پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید در بیست و هشتمین روز پس از تلقیح در تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد. بررسی بیان ژن نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن‌های RBOH، HIR، HPL و PR-4 در تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و

کیتوزان در اولین روز پس از تلقیح عامل بیماری به ثبت رسیده است و افزایش بیان آن‌ها به ترتیب ۳۵/۵۴، ۳۰۶/۱۳، ۷۵/۰۶ و ۲۴۸/۵۱ برابر تیمار شاهد مشاهده شد. استفاده از فسفیت پتاسیم و کیتوزان با افزایش فعالیت آنزیم‌های حفاظتی آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز و القای بیان ژن‌های مقاومت ذکر شده توانست سبب ایجاد مقاومت در خیار تحت تنش قارچ عامل بیماری بوته‌میری شود. واژگان کلیدی: خیار، فسفیت پتاسیم، کیتوزان، *Phytophthora capsici*، آنزیم‌های دفاعی، ژن‌های مقاومت.

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

۱- بررسی تاثیر کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم های دفاعی در گیاه خیار تحت تنش قارچ (*Phytophthora capsici*)، پنجمین کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی ایران، دانشگاه زنجان، ۹-۸ شهریور ۱۳۹۶.

۲- بررسی تاثیر فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر میزان بیان ژن گلوکاتایون پراکسیداز در گیاه خیار تحت تنش قارچ (*Phytophthora capsici*)، دومین همایش بین المللی و دهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، انجمن بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، ۹-۷ شهریور ۱۳۹۶.

3- Molecular responses of *Phytophthora capsici*-challenged cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants as influenced by resistance inducer application, Journal of Plant Molecular Breeding, Genetics & Agricultural Biotechnology Institute of Tabatestan (GABIT), 10/14/2017.

فصل اول مقدمه و کلیات.....	۱
۱-۱ خانواده کدوئیان.....	۵
۱-۱-۱ خیار: منشأ و گیاه‌شناسی.....	۵
۲-۱ اهمیت خیار از نظر ارزش غذایی و دارویی.....	۵
۳-۱ ارزش اقتصادی خیار.....	۶
۴-۱ سطح زیر کشت و میزان تولید خیار.....	۶
۵-۱ قارچ‌ها و انواع بیماری‌زای گیاهی آن‌ها.....	۶
۶-۱ بیماری‌های قارچی خیار.....	۷
۱-۶-۱ آنتراکنوز.....	۷
۲-۶-۱ سفیدک دروغی یا درونی خیار.....	۸
۳-۶-۱ موزائیک خیار.....	۸
۴-۶-۱ بوته میری یا مرگ گیاه چه در خیار.....	۹
۷-۱ ساختار دیواره سلولی قارچ‌ها.....	۱۱
۸-۱ ساختار دیواره سلول‌های گیاهی.....	۱۲
۹-۱ تشخیص قارچ و گیاه توسط یکدیگر.....	۱۳
۱۰-۱ مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر انواع پاتوژن‌ها.....	۱۴
۱-۱۰-۱ پروتئین‌های PR گیاهی.....	۱۵
۲-۱۰-۱ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان.....	۱۶
۱۱-۱ مالون دآلدئید (MDA).....	۱۷
۱۲-۱ نقش القاگرها در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی.....	۱۸
۱-۱۲-۱ فسفیت پتاسیم.....	۱۸
۲-۱۲-۱ کیتوزان.....	۲۰
۱۳-۱ بررسی بیان ژن.....	۲۰
۱-۱۳-۱ PCR زمان واقعی (Real-Time PCR).....	۲۱
فصل دوم پیشینه و بررسی منابع.....	۲۵
۱-۲ بررسی مطالعات انجام‌شده در خصوص تأثیر کیتوزان بر گیاه.....	۲۷
۲-۲ بررسی مطالعات انجام‌شده در خصوص تأثیر فسفیت پتاسیم بر گیاهان.....	۳۰
۳-۲ مطالعات انجام‌شده در خصوص بیان ژن.....	۳۳
فصل سوم مواد و روش‌ها.....	۳۵

۳۶	۱-۳ محل و زمان انجام آزمایش
۳۶	۲-۳ ضدعفونی کردن محیط گلخانه
۳۶	۳-۳ مواد گیاهی و نحوه ی کشت آن‌ها
۳۷	۴-۳ تهیه تیمارها
۳۷	۱-۴-۳ تهیه فسفیت پتاسیم
۳۷	۲-۴-۳ تهیه استوک کیتوزان
۳۷	۳-۴-۳ تهیه سوسپانسیون زئوسپور قارچ
۳۸	۵-۳ اعمال تیمارهای آزمایش
۳۸	۱-۵-۳ سطوح تیماری مورد استفاده
۳۹	۶-۳ تلقیح گیاهان با سوسپانسیون قارچ
۳۹	۷-۳ نمونه برداری و اندازه گیری صفات و پارامترهای مورد مطالعه
۳۹	۸-۳ اندازه گیری شاخص های فیزیولوژیک
۳۹	۱-۸-۳ کلروفیل برگ‌ها
۴۰	۲-۸-۳ پرولین
۴۱	۹-۳ شاخص های بیوشیمیایی
۴۱	۱-۹-۳ استخراج محلول آنزیمی
۴۱	۲-۹-۳ تعیین میزان پروتئین عصاره بافت برگي به روش برادفورد
۴۲	۱۰-۳ ثبت فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان
۴۲	۱-۱۰-۳ سوپر اکسید دیسموتاز
۴۳	۲-۱۰-۳ کاتالاز
۴۴	۳-۱۰-۳ گایاکول پراکسیداز
۴۴	۴-۱۰-۳ آسکوربات پراکسیداز
۴۴	۱۱-۳ بررسی های متابولیتی
۴۴	۱-۱۱-۳ مالون دآلدئید
۴۵	۲-۱۱-۳ پر اکسید هیدروژن
۴۵	۳-۱۱-۳ آنتوسیانین
۴۶	۱۲-۳ آنالیز داده ها
۴۶	۱۳-۳ بررسی بیان ژن با دستگاه Real-Time PCR
۴۶	۱-۱۳-۳ استخراج RNA
۴۶	۲-۱۳-۳ تیمار RNA با آنزیم DNase
۴۷	۳-۱۳-۳ بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده
۴۷	۱-۳-۱۳-۳ تعیین کیفیت RNA استخراجی بر روی ژل آگارز
۴۷	۲-۳-۱۳-۳ تعیین کیفیت RNA استخراجی توسط اسپکتروفتومتری

۴۸.....	۳-۳-۱۳-۳ تعیین کمیت RNA استخراجی توسط اسپکتروفتومتری.....
۴۸.....	۴-۱۳-۳ سنتز رشته‌ی اول cDNA از RNA کل.....
۴۹.....	۵-۱۳-۳ طراحی آغازگرها جهت استفاده در Quantitative Real- Time PCR.....
۵۰.....	۶-۱۳-۳ بهینه‌سازی شرایط واکنش Real- Time PCR.....
۵۱.....	۱۴-۳ تحلیل داده‌های Real-Time PCR.....
۵۳.....	فصل چهارم نتایج و بحث.....
۵۴.....	۱-۴ بررسی فیزیولوژیکی.....
۵۴.....	۱-۱-۴ بررسی تغییرات فیزیولوژیکی گیاهان خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ <i>Phytophthora capsici</i> در زمان‌های مختلف.....
۵۵.....	۱-۱-۱-۴ میزان کلروفیل.....
۶۰.....	۲-۱-۱-۴ میزان پرولین.....
۶۳.....	۲-۴ بررسی‌های آنزیمی و بیوشیمیایی.....
۶۳.....	۱-۲-۴ اثر فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ <i>Phytophthora capsici</i>
۶۴.....	۱-۲-۴ میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز.....
۷۰.....	۲-۱-۲-۴ میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز.....
۷۴.....	۳-۱-۲-۴ میزان فعالیت آنزیم گاباکول پراکسیداز.....
۷۸.....	۴-۱-۲-۴ میزان فعالیت آنزیم کاتالاز.....
۸۲.....	۲-۲-۴ اثر فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ <i>Phytophthora capsici</i>
۸۳.....	۱-۲-۲-۴ میزان آنتوسیانین.....
۸۵.....	۲-۲-۲-۴ محتوای پراکسید هیدروژن.....
۸۸.....	۳-۲-۲-۴ میزان فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دی‌آلدئید.....
۹۱.....	۳-۴ بیان ژن.....
۹۱.....	۱-۳-۴ الگوی الکتروفورزی RNA استخراج شده از برگ خیار.....
۹۱.....	۱-۱-۳-۴ بررسی کیفیت RNA بعد از تیمار با DNase.....
۹۲.....	۲-۱-۳-۴ بهینه‌یابی شرایط PCR با cDNA.....
۹۲.....	۲-۳-۴ بررسی منحنی‌های ذوب واکنش Real-Time PCR.....
۹۴.....	۳-۳-۴ بررسی اثر فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر میزان بیان ژنهای دخیل در مقاومت به قارچ <i>P. capsici</i>
۹۶.....	۱-۳-۳-۴ الگوی تظاهر ژن گلوکاتایون پراکسیداز (Gpx).....
۹۹.....	۲-۳-۳-۴ الگوی تظاهر ژن پروتئین شبه تاوماتینی (TLP).....

- ١٠٢.....Respiratory burst oxidase homolog (RBOH) الگوی تظاهر ژن ٣-٣-٣-٤
- ١٠٤..... Hypersensitive-induced response protein (HIR) الگوی تظاهر ژن ٤-٣-٣-٤
- ١٠٥.....Allene oxide synthase, chloroplastic-like (HPL) الگوی تظاهر ژن ٥-٣-٣-٤
- ١٠٧.....PR-4 Like الگوی تظاهر ژن ٦-٣-٣-٤

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ علائم بیماری آنتراکنوز خیار ۷
- شکل ۲-۱ علائم بیماری سفیدک پودری خیار ۸
- شکل ۳-۱ علائم بیماری موزائیک خیار ۹
- شکل ۴-۱ علائم بیماری بوته میری خیار ۱۰
- شکل ۵-۱ طرح کلی از ساختار دیواره سلولی قارچ و جایگاه قرارگیری ترکیبات مختلف دیواره ۱۱
- شکل ۶-۱ ساختار و اجزاء دیواره سلول گیاهی ۱۲
- شکل ۷-۱ نمایی از برهمکنش پاتوژن و گیاه و فعال شدن مسیرهای متابولیکی و ژن‌های دفاعی ۱۳
- شکل ۱-۳ کشت گیاه خیار در گلدان‌های پلاستیکی در شرایط کنترل‌شده‌ی گلخانه ۳۶
- شکل ۲-۳ (الف) کشت قارچ *P. capsici* بر روی محیط کشت V8 (ب) عکس میکروسکوپی از اسپورانژیوم قارچ *P. capsici* ۳۸
- شکل ۳-۳ نمونه‌های RNA استخراجی چاهک: ۱، ۲، ۳ و ۴ استخراج از نمونه‌های مختلف بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ۴۷
- شکل ۱-۴ روند تغییرات کلروفیل کل در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۵۹
- شکل ۲-۴ روند تغییرات کلروفیل کل در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۶۰
- شکل ۳-۴ روند تغییرات مقدار پرولین در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۶۲
- شکل ۴-۴ روند تغییرات مقدار پرولین در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۶۳

شکل ۴-۵ روند تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۶۷

شکل ۴-۶ روند تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۶۹

شکل ۴-۷ روند تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۷۲

شکل ۴-۸ روند تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: عدم آلودگی با قارچ و تحت تنش قارچ *P. capsici* ۷۴

شکل ۴-۹ روند تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۷۶

شکل ۴-۱۰ روند تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۷۷

شکل ۴-۱۱ روند تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۸۰

شکل ۴-۱۲ روند تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۸۱

شکل ۴-۱۳ روند تغییرات میزان آنتوسیانین در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۸۴

شکل ۴-۱۴ روند تغییرات میزان آنتوسیانین در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۸۴

شکل ۴-۱۵ روند تغییرات فعالیت پراکسید هیدروژن در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۸۷

- شکل ۴-۱۶ روند تغییرات فعالیت پراکسید هیدروژن در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۸۸
- شکل ۴-۱۷ روند تغییرات فعالیت مالون دی آلدئید در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۹۰
- شکل ۴-۱۸ روند تغییرات فعالیت مالون دی آلدئید در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici* ۹۱
- شکل ۴-۱۹ نمونه‌های RNA استخراج شده از برخی تیمارها چاهک: ۳ و ۲، ۱ تکرار نمونه بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ۹۱
- شکل ۴-۲۰ الگوی الکتروفورزی نمونه‌های RNA استخراج شده بعد از تیمار با DNase چاهک: ۱ تا ۴ تکرار یک نمونه بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ۹۲
- شکل ۴-۲۱ الگوی الکتروفورزی محصولات PCR با cDNA حاصل از RNA از بافت برگ ۹۲
- شکل ۴-۲۲ منحنی‌های ذوب محصولات Real-Time PCR ۹۳
- شکل ۴-۲۳ منحنی‌های فلورسانس محصولات Real-Time PCR ۹۴
- شکل ۴-۲۴ تغییرات بیان ژن گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) در گیاهان خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف ۹۷
- شکل ۴-۲۵ تغییرات بیان ژن پروتئین شبه تاوماتینی (TLP) در گیاهان خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف ۱۰۰
- شکل ۴-۲۶ تغییرات بیان ژن پروتئین شبه تاوماتینی (TLP) در گیاهان خیار تحت تیمار کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف ۱۰۰
- شکل ۴-۲۷ تغییرات بیان ژن پروتئین شبه تاوماتینی (TLP) در گیاهان خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط عدم تلقیح با قارچ در طی روزهای مختلف ۱۰۲
- شکل ۴-۲۸ روند تغییرات بیان ژن (RBOH) در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف ۱۰۳

شکل ۴-۲۹ روند تغییرات بیان ژن (HIR) در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف..... ۱۰۴

شکل ۴-۳۰ روند تغییرات بیان ژن (HPL) در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف..... ۱۰۶

شکل ۴-۳۱ روند تغییرات بیان ژن (PR-4) در گیاهان خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف..... ۱۰۷

فهرست جداول

- جدول ۱-۱ طبقه‌بندی انواع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی بر اساس ساختار مولکولی خواص بیولوژیک و نحوه‌ی اثر آن‌ها..... ۱۶
- جدول ۱-۳ ترکیبات واکنش تیمار RNA با آنزیم DNase I..... ۴۶
- جدول ۲-۳ ترکیبات واکنش ساخت رشته اول cDNA..... ۴۹
- جدول ۳-۳ توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای آنالیز بیان با تکنیک Real-Time PCR..... ۵۰
- جدول ۴-۳ شرایط بهینه برای اجرای واکنش‌های Real-Time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر..... ۵۱
- جدول ۵-۳ برنامه دمایی Real-Time PCR..... ۵۱
- جدول ۱-۴ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات صفات کلروفیل a، b، کلروفیل کل و پرولین..... ۵۴
- جدول ۲-۴ (الف) مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان کلروفیل a ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) در طی روزهای مختلف..... ۵۶
- جدول ۲-۴ (ب) مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان کلروفیل b ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) در طی روزهای مختلف..... ۵۷
- جدول ۲-۴ (ج) مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان کلروفیل کل ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) در طی روزهای مختلف..... ۵۸
- جدول ۳-۴ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان پرولین ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{FW}$) در طی روزهای مختلف..... ۶۱
- جدول ۴-۴ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی..... ۶۴
- جدول ۵-۴ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ($\text{U mg}^{-1} \text{protein}$) در طی روزهای مختلف..... ۶۶

جدول ۴-۶ مقایسه میانگین آثار تیمار فسفیت پتاسیم تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$) در طی روزهای مختلف ۷۱

جدول ۴-۷ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$) ۷۳

جدول ۴-۸ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ($\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$) در طی روزهای مختلف ۷۵

جدول ۴-۹ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ($\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$) در طی روزهای مختلف ۷۹

جدول ۴-۱۰ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات صفات آنتوسیانین، پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید ۸۲

جدول ۴-۱۱ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان آنتوسیانین ($\mu\text{g}^{-1} \text{ ml}$) در طی روزهای مختلف ۸۳

جدول ۴-۱۲ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر فعالیت پراکسید هیدروژن ($\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$) در طی روزهای مختلف ۸۶

جدول ۴-۱۳ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت مالون دی آلدئید ($\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$) در طی روزهای مختلف ۸۹

جدول ۴-۱۴ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات میزان بیان ژنهای گلوکاتایون پراکسیداز GPX، پروتئین شبه تاوماتینی TLP، انفجار اکسیدتیوی RBOH، پروتئینهای واکنش القائی فوق حساسیت HIR، هیدرو پراکسید لیاز HPL و اندو کیتیناز PR-4 ۹۶

فصل اول

مقدمه و کلیات

مقدمه

بعد از حشرات، قارچ‌ها متنوع‌ترین موجودات روی زمین هستند. قارچ‌ها به علت ایجاد بیماری‌های گیاهی، تأثیر زیادی در جوامع بشری دارند. برخی از بیماری‌های قارچی گیاهان سبب قحطی‌های مهمی در طول تاریخ شده‌اند. برخی دیگر در از بین بردن و نابودی درختان، درختچه‌ها، جنگل‌ها، پارک‌ها و زمین‌های بازی نقش دارند (خداپرست، ۱۳۹۲). بیماری‌های ناشی از قارچ‌ها، از اصلی‌ترین عوامل خسارت و کاهش عملکرد محصولات کشاورزی می‌باشند (الهی نیا، ۱۳۸۲). قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی تنوع زیادی داشته که می‌توانند بر روی انواع گونه‌های گیاهی، اثر بیماری‌زایی خود را نشان بدهند (آگریوس، ۲۰۰۵).

بوته میری^۱ یکی از بیماری‌های شایع در گلخانه می‌باشد که اغلب توسط قارچ‌های خاکزی *Pythium*، *Phytophthora*، *Sclerotinia* و *Rhizoctonia* ایجاد می‌شود. گیاهان عالی دارای مکانیسم‌های دفاعی متعددی در برابر انواع تهدیدات مختلف از جمله تنش‌های فیزیکی، بیوشیمیایی و بیولوژیکی مانند زخم، شوری، خشکی، سرما، فلزات سنگین، آلاینده‌های هوا، اشعه‌ی ماوراءبنفش و حملات انواع پاتوژن‌ها مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها می‌باشند (آگریوس، ۲۰۰۵). تولید خیار گلخانه‌ای (*Cucumis sativus* L.) در میان بخش‌های مختلف کشاورزی در ایران به سرعت در حال رشد است و بیش از ۸۰ درصد گلخانه‌ها به‌طور انحصاری برای تولید خیار استفاده می‌شود (ارشاد، ۲۰۰۹). گزارش شده است که بیماری بوته میری در خیار از قارچ *Phytophthora* ناشی می‌شود که در اکثر گلخانه‌های ایران منجر به مرگومیر بیش از ۷۵ درصد گیاهچه‌های خیار و برخی گونه‌های دیگر در گلخانه‌ها می‌شود (ارشاد، ۲۰۰۹). در مطالعه خسروفر و بنی هاشمی مشخص شده است که قارچ *Phytophthora melonis* عامل اصلی بوته میری خیار در ایران می‌باشد (۲۰۰۴). با حمله قارچ، پاسخ دفاعی گیاه از طریق واکنش‌هایی انجام می‌شود که طی آن سلول‌های گیاهی و قارچی به کمک الیگوساکاریدهایی که از ترکیبات پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی قارچ و گیاه طی فعالیت‌های آنزیمی

¹ Damping-off

آزاد می‌شوند، یکدیگر را شناسایی می‌کنند. این ترکیبات از طرفی سبب آزاد شدن سیگنال‌ها و ایجاد چرخه‌های دخیل در واکنش‌های دفاعی گیاه شده و از طرف دیگر نیز مکانیسم‌های بیماری‌زایی قارچ را متناسب با وضعیت گیاه تغییر می‌دهند (هانی، ۱۹۹۹). یکی از اشکال معمول مکانیسم دفاع ساختاری در گیاهان، ایجاد ترکیبات پیچیده‌ای است که منجر به دفاع ساختاری و القایی در گیاه می‌شود. پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن‌ها گروه متنوعی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در پاسخ به حمله‌ی پاتوژن‌ها بیان می‌شوند (ردولفی ۱۹۸۳ و ون لون ۱۹۸۹). پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن‌ها^۱ معمولاً، به مقدار کم در گیاهان وجود دارند اما میزان آن‌ها در پاسخ به استرس یا حمله پاتوژن‌ها به میزان زیادی افزایش می‌یابد. انواع مختلفی از PR ها از گیاهان زراعی مختلف جدا شده است. جالب توجه است که اندام‌های مختلف گیاهی از جمله برگ‌ها، بذر و ریشه‌ها ممکن است انواع و میزان مختلفی از PR ها را تولید کنند (آگریوس، ۲۰۰۵). این پروتئین‌ها شامل کیتینازها، پراکسیدازها، پروتئینازها و ... هستند که باعث ایجاد مقاومت در گیاهان در برابر انواع پاتوژن‌ها می‌شود (دانجل و همکاران، ۱۹۹۶). جست‌وجو برای روش‌های جدید دوستدار طبیعت به‌ویژه در زمینه‌ی مقاومت گیاهان به استرس‌های زنده و غیرزنده از فاکتورهای کلیدی در کشاورزی پایدار است. القای سیستم دفاعی گیاهان به‌وسیله‌ی القاگرهای زنده و غیرزنده یک روش جایگزین مناسب برای محافظت از گیاهان در مقابل پاتوژن‌های گیاهی است. مقاومت سیستمیک القا^۲ی (ISR) مقاومتی است که توسط میکروارگانیزم‌های مفید، یا القاگرهای طبیعی ساخته‌شده و در گیاه القا می‌شود. نوع دیگر مقاومت، مقاومت سیستمیک اکتسابی^۳ (SAR) است که غالباً توسط عوامل پاتوژن در گیاه ایجاد می‌شود (کانراس و همکاران، ۲۰۰۶). فسفیت‌ها ترکیباتی با فرمول شیمیایی (H_2PO_3^-) هستند که از لحاظ تعداد اکسیژن و هیدروژن با فسفات (HPO_4^{2-}) کاملاً متمایز می‌باشند. فسفیت به علت دارا بودن یک اکسیژن کمتر از فسفات، سرعت حرکت آن بیشتر بوده و طی مدت‌زمان کوتاهی، در سراسر اندام

^۱ PR Proteins

^۲ Induced systemic resistance (ISR)

^۳ Systemic acquired resistance (SAR)

گیاهی انتشار می‌یابد، این ماده علاوه بر تحریک رشد رویشی و زایشی موجب کنترل طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای قارچی می‌گردد (تائو و همکاران، ۲۰۰۸). کیتوزان یک پلیمر پلی کاتیونی از α - و β -D-گلوکوز آمین است که امروزه به‌عنوان ماده افزایش‌دهنده قدرت دفاعی گیاهان علیه آلودگی‌های قارچی به کار می‌رود، این ماده از پوسته‌ی سخت‌پوستان، حشرات و بسیاری از قارچ‌ها، جلبک‌ها و مخمرها به‌دست می‌آید، این ماده خطر زیست‌محیطی ندارد چراکه اثر سمیت روی پستانداران و محیط‌زیست نداشته و از طرف دیگر فراوانی بالایی در طبیعت دارد. این ماده به‌عنوان القاگر مقاومت در گیاهان با القاگرهای مختلف باعث تحریک پاسخ‌های دفاعی شده و در نتیجه باعث کاهش علائم بیماری در پاتوسیستم‌های مختلف شده است (ولادی و همکاران، ۱۳۹۰). در این مطالعه، کیتوزان و فسفیت پتاسیم به عنوان دو القاگر مقاومت به بیماری مورد بررسی قرار گرفته و تاثیر آن‌ها بر میزان بیان ژن‌های دخیل در مقاومت و تغییر فعالیت آنزیم‌های دفاعی در جهت کاهش خسارت عامل بیماری بوته میری در گیاه خیار مورد بررسی قرار گرفت. هدف نهایی این تحقیق، افزایش مقاومت گیاه خیار (و سایر گیاهان خانواده کدوئیان) توسط مواد کم خطر و زیست تخریب پذیر می‌باشد که در نهایت به کاهش استفاده از سموم رایج قارچ کش سیستمیک منجر خواهد شد. این کار علاوه بر جنبه اقتصادی و کاهش هزینه‌های تولید از لحاظ زیست محیطی با اهمیت است چرا که با مصرف سموم کمتر و استفاده از القاگرهای زیست تخریب پذیر می‌توان محصولات سالم تری تولید کرد. برای بررسی بیان ژن‌های دخیل در مقاومت، در ابتدا استخراج RNA از نمونه برگ‌ی گیاه خیار صورت گرفت و پس از سنتز cDNA با استفاده از تکنیک Real-Time PCR به بررسی بیان ژن‌های مقاومت در نمونه‌های مختلف تیمار شده با دو القاگر کیتوزان و فسفیت پتاسیم پرداخته شد. سپس بررسی‌های بیوشیمیایی و متابولیتی مهم نظیر میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی مثل کاتالاز، پراکسیداز و ... انجام شد و در پایان نتایج حاصل از بخش‌های مختلف آزمایش جهت نتیجه‌گیری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۱-۱ خانواده کدوئیان

گیاهان خانواده کدوئیان از جمله مهم‌ترین گروه‌های گیاهان زراعی محسوب شده و سالانه میزان بالایی از این تولیدات به صورت تازه در بازارهای جهانی عرضه می‌شود. با توجه به مصرف عمده محصولات گیاهی خانواده کدوئیان به صورت تازه و لزوم مصرف کنترل شده و محدود سموم آفت‌کش، مبارزه با عوامل بیماری‌زا و آفات در این گیاهان با مشکلات و محدودیت‌هایی همراه است (یتیسیر و همکاران، ۲۰۰۳). طبق آمار وزارت جهاد کشاورزی سطح زیر کشت خیار در سال ۱۳۹۲ در فضای باز ۹۱ هزار هکتار با تولید یک میلیون و ۷۷۰ تن بوده است (www.maj.ir).

۱-۱-۱ منشأ و گیاه‌شناسی

خیار زراعی (*Cucumis sativus* L.) با ۱۴ عدد کروموزوم ($2n=2x=14$) گیاهی یک‌ساله، دوجنسی، یک‌پایه و دولپه متعلق به تیره کدوئیان است. خیار یک گیاه بسیار قدیمی است که کشت آن در رم و یونان قدیم از مدت‌ها پیش مرسوم بوده است. مبدأ پیدایش این گیاه به درستی مشخص نیست. عده ای آن را بومی نواحی گرم شمال شرقی هندوستان دانسته و بعضی‌ها عقیده دارند که نوع خودروی آن در ارتفاعات هیمالیا یافت شده است. آنچه مسلم است این است که این گیاه از طریق مصر به مناطق ساحلی دریای مدیترانه (یونان و ایتالیا) برده شد و از آنجا به اروپای شمالی راه یافت. پرورش خیار گلخانه‌ای ابتدا در قرن نوزده در انگلستان با ارقامی که از هندوستان آورده شده بود انجام گرفت (پیوست، ۱۳۸۴). بقایای خیار در شرق ایران به سه هزار سال قبل از میلاد تعلق دارند. کشت و کار خیار، به حداقل سه هزار سال پیش در هند و دو هزار سال پیش در چین برمی‌گردد (حسن‌دخت، ۱۳۸۷).

۲-۱ اهمیت خیار از نظر ارزش غذایی و دارویی

با توجه به اینکه خیار حدود ۹۶ تا ۹۷ درصد آب دارد، ولی به علت وفور ویتامین، املاح معدنی و اسیدهای آلی آن در تغذیه مدرن امروزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (پیوست، ۱۳۸۴). خیار

غنی از ویتامین‌های B و C و مواد معدنی از جمله کلسیم، فسفر، آهن و پتاسیم می‌باشد. خیار و سایر گیاهان جالیزی، دارای ترکیبات تری ترپنوئیدی تلخ به نام کوکوریبتاسین می‌باشند که با غلظت‌های متفاوت، در طی رشد در قسمت‌های مختلف گیاه یافت می‌شود. در خیار کوکوریبتاسین نوع C وجود دارد. علاوه بر مصارف خوراکی، خیار در تعدادی از محصولات آرایشی و بهداشتی مانند عطرها، محلول‌های شستشو، صابون‌ها و شامپوها استفاده می‌شود (حسن‌دخت، ۱۳۸۷).

۱-۳ ارزش اقتصادی خیار

تولید سبزی از نظر اقتصاد ملی و محلی بسیار بااهمیت بوده و جایگاه آن بیش از هر چیز بر اساس مصرف بالای این محصول استوار است. بسته به رسومات و نوع ذائقه و نیز به میزان توان اقتصادی دارای نوسانات زیادی است (آملی، ۱۳۸۴). از نظر اقتصادی، خیار در بین سبزی‌های مهم مقام چهارم را بعد از گوجه‌فرنگی، کلم پیچ و پیاز دارا است. ایران پس از چین، در سال ۲۰۱۰، بیش‌ترین تولید خیار را در جهان دارا بود (پیوست، ۱۳۸۴).

۱-۴ سطح زیر کشت و میزان تولید خیار

آسیا و اروپا به ترتیب ۸۵ و ۹۰ درصد خیار جهان را تولید می‌کنند. چین از نظر میزان تولید و اسپانیا از نظر میزان عملکرد در واحد سطح مقام اول را دارند (حسن‌دخت، ۱۳۸۷). طبق آمار فائو سطح زیر کشت خیار در سال ۲۰۱۴ در ایران ۸۹۶۳۲ هکتار و تولید کل این محصول برابر با ۱۸۰۴۱۸۴ تن در کشور بوده است (FAO).

۱-۵ قارچ‌ها و انواع بیماری‌زای گیاهی آن‌ها

قارچ‌ها از نظر تنوع دومین گروه موجودات روی زمین محسوب می‌شوند. قارچ‌ها به سبب ایجاد بیماری‌های گیاهی، در جوامع بشری بسیار موثر واقع شده و سبب قحطی‌های مهم و نابودی درختان، درختچه‌ها و گیاهان مختلف شده‌اند (خداپرست، ۱۳۹۲). از اصلی‌ترین عوامل خسارت و کاهش

عملکرد محصولات کشاورزی، بیماری‌های ناشی از قارچ‌ها می‌باشند (الهی نیا، ۱۳۸۲). به دلیل تنوع بسیار بالای قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، این موجودات می‌توانند بر روی انواع گونه‌های گیاهی، اثر بیماری‌زایی خود را نشان بدهند (آگریوس، ۲۰۰۵). قارچ‌ها موجودات یوکاریوت، فاقد پلاستید، دارای سیستم تغذیه‌ای از نوع جذب (اسموتروف) هستند (هرگز بلع کننده نیستند)، فاقد مرحله‌ی آمیبی با پاهای کاذب در چرخه‌ی زندگی می‌باشند (خداپرست، ۱۳۹۲).

۱-۶ بیماری‌های قارچی خیار

۱-۶-۱ آنتراکنوز

عامل بیماری قارچ *Colletotrichum nigrum* می‌باشد و به‌ویژه به خیار، هندوانه و طالبی حمله می‌کند. علائم بیماری، به‌صورت لکه‌هایی تیره، دایره‌ای و فرورفته روی میوه‌های رسیده و سبز نارس ظاهر می‌شود. سطح این لکه‌ها توسط نقاط سیاه‌رنگ پوشیده می‌شود که در حقیقت هاگ‌های این قارچ می‌باشند. میوه‌های آلوده ممکن است کاملاً پوسیده‌شده و ریزش کنند یا حتی ممکن است، بر روی گیاهان به شکل خشک‌شده، باقی بمانند. میوه‌های آلوده، به‌عنوان منبع آلوده‌کننده سایر گیاهان به شمار می‌آیند. آنتراکنوز بیماری بذری است که بر روی ساقه‌ها و برگ‌ها طی فصل زنده مانده و سبب آلودگی آن‌ها می‌گردد. علائم بیماری بر روی برگ‌ها و ساقه‌ها بسیار کند پیشرفت می‌کند. سم مناسب برای مبارزه با این بیماری، مانب می‌باشد (حسن‌دخت، ۱۳۸۷).



شکل ۱-۱ علائم بیماری آنتراکنوز خیار

۱-۶-۲ سفیدک دروغی یا درونی خیار

عامل بیماری قارچ *Pseudoperonospora cubensis* می‌باشد. در اولین علائم بیماری، مناطق سبز کم‌رنگ به وسیله مناطق سبز تیره جدا می‌شود. به زودی مناطق سبز کم‌رنگ به زردی گرائیده و به وسیله رگبرگ‌ها محدود می‌شود. در آب و هوای مرطوب، در سطح زیر برگ در مقابل لکه‌ها یک‌لایه از قارچ به رنگ ارغوانی ظاهر می‌شود. بعضی اوقات رنگ ارغوانی کم‌رنگ‌تر می‌گردد و رنگ آن‌ها از سفید تا سیاه تغییر می‌یابد. برگ‌ها سریعاً از بین می‌روند و معمولاً برگ‌های مرکز بوته ابتدا تحت تأثیر قرار می‌گیرند. از روش‌های مبارزه می‌توان کاشت گیاهان بافاصله مناسب، زهکشی خوب و کاشت گیاهان در مکان‌هایی با جریان هوا اشاره نمود. با توجه به اینکه نور خورشید، سطح برگ‌ها را سریعاً خشک می‌کند، کاشت گیاه در جاهایی که نور خورشید کافی باشد، ممکن است در جلوگیری از بیماری کمک کند. مهم‌ترین راه مبارزه با بیماری استفاده از قارچ‌کش‌های مانب و گوگرد، مانکوزب و کلروتالوتیل است (حسن‌دخت، ۱۳۸۷).



شکل ۱-۲ علائم بیماری سفیدک پودری خیار

۱-۶-۳ موزائیک خیار

گیاهان آلوده به ویروس موزائیک^۱ دارای برگ‌هایی لکه لکه، کوچک و تغییر یافته‌اند. علائم بیماری بر روی میوه‌ها به شکل لکه‌های حلقوی به رنگ روشن و یا لکه‌هایی خطدار ظاهر می‌شوند. این ویروس‌ها سبب آلوده شدن گیاهانی نظیر خانواده کدوئیان، توتون، گوجه‌فرنگی، یونجه و شبدر می‌گردند.

^۱ CMV

رعایت تناوب کشت مناسب، مبارزه به موقع با علف‌های هرز و حشرات در کنترل این بیماری بسیار مؤثر می‌باشد (حسن‌دخت، ۱۳۸۷).



شکل ۱-۳ علائم بیماری موزائیک خیار

۱-۶-۴ بوته میری یا مرگ گیاه چه در خیار

بوته میری یکی از بیماری‌های شایع در گلخانه می‌باشد که اغلب توسط قارچ‌های خاکزی *Pythium*، *Phytophthora*، *Sclerotinia* و *Rhizoctonia* ایجاد می‌شود. گونه‌های مربوط به این قارچ‌ها دارای دامن‌های میزبانی وسیعی می‌باشند و می‌توانند برای مدت‌زمان طولانی درون خاک، بقایای گیاهی و علف‌های هرز زنده بمانند. بوته میری اغلب در خاک‌هایی با رطوبت بالا که بافتی فشرده و زهکشی ضعیف دارند، اتفاق می‌افتد. هرچند که این بیماری می‌تواند گیاه را در تمام مراحل رشد مورد حمله قرار دهد، اما عمده خسارات آن عموماً در مراحل اولیه رشد گیاهچه‌ها و نشا از خزانه به خاک اصلی منتقل می‌گردد؛ زیرا در این مرحله دو تا سه مرحله آبیاری نشا صورت گرفته و رطوبت بالا شرایط رشد و تکثیر قارچ‌های خاکزی فوق‌الذکر را تشدید می‌کند. علائم حمله قارچ‌های بیماری‌زا به صورت پوسیدگی در منطقه طوقه و باریک‌تر شدن ساقه ظاهر می‌گردد که این امر سبب انسداد آوندها که عامل انتقال مواد غذایی به ریشه و قسمت‌های هوایی گیاه می‌باشند، می‌گردد. علائم بیماری به صورت لکه گرد، فرورفته و آبکی به رنگ سبز تیره به قطر نیم تا یک سانتی‌متر ظاهر شده و پس از مدت کوتاهی به صورت یک منطقه وسیع آبکی به رنگ قهوه‌ای یا قرمز متمایل می‌شود. از دیگر عوامل تشدیدکننده ابتلای گیاه به این بیماری می‌توان به تنش‌های رطوبتی، حمله آفات به قسمت ریشه و

سرد و مرطوب بودن خاک و زمین گلخانه اشاره کرد. با استفاده از ارقام مقاوم، ضدعفونی بذرها قبل از کاشت، استفاده از نشا سالم و گواهی شده، زهکشی مناسب خاک، مدیریت آبیاری به منظور جلوگیری از رطوبت بیش از حد خاک، از بین بردن بقایای آلوده گیاهی، ضدعفونی خاک به وسیله روش سولاریزاسیون^۱ یا استفاده از سموم تدخینی می باشد (حسن دخت، ۱۳۸۷).



شکل ۱-۴ علائم بیماری بوته میری خیار

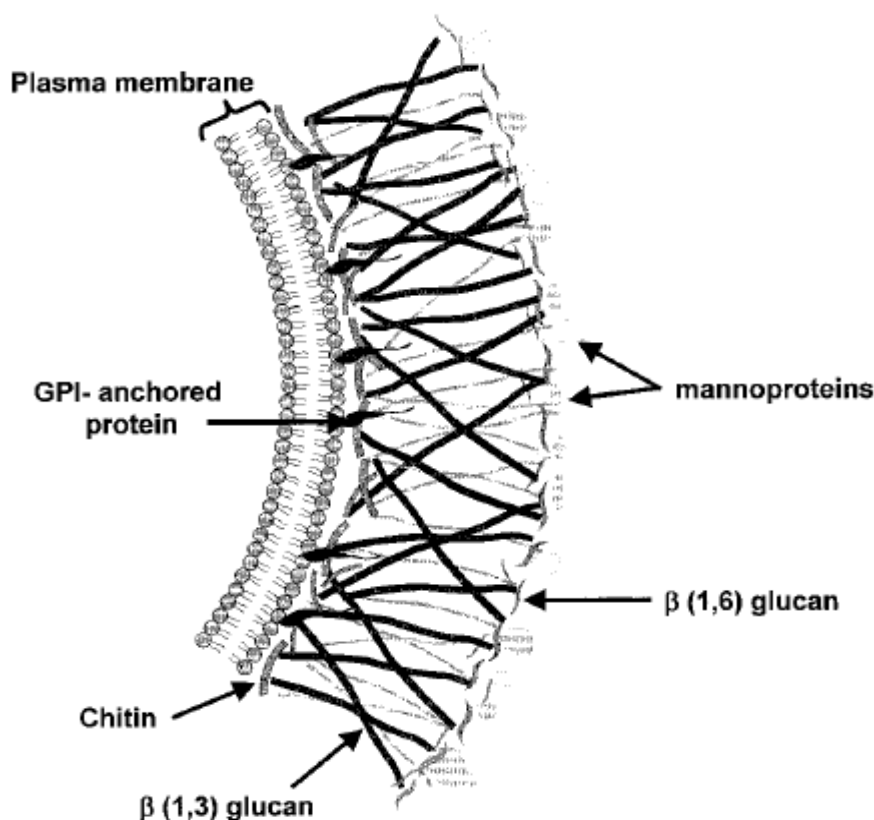
مدیریت قارچ *Phytophthora* بیماری بوته میری معمولاً شامل استفاده از قارچ کش می شود. اگرچه کنترل با قارچ کش یک گزینه است، اما با توجه به دشواری های عملی، از جمله اثرات غیر هدف، سمیت گیاهی، هزینه، تجمع باقی مانده، خطرات زیست محیطی و بهداشتی، حداقل استفاده از قارچ کش ها ترجیح داده می شود. افزایش محبوبیت تولید ارگانیک مستلزم توسعه و استفاده از روش های بدون قارچ کش برای کنترل این بیماری است. گزارش هایی از القاء مقاومت در خیار از طریق استفاده از القاگرها وجود دارد تیمار گیاهان خیار با β -آمینوبوتریک اسید در برابر طیف وسیعی از بیماری ها از جمله سفیدک پودری و آنتراکنوز از گیاه محافظت می کند (آندریاس و الیور، ۲۰۰۹).

محققان دریافته اند که گزارش های اندکی درباره ی قارچ *Phytophthora* عامل بوته میری در خیار در دسترس می باشد، این سیستم خواستار توسعه استراتژی های حفاظت از محصول جدید، خصوصاً روش های بدون قارچ کش برای کشت متداول و ارگانیک می باشد (آبخو و همکاران، ۲۰۱۶).

¹ Solarization

۷-۱ ساختار دیواره سلولی قارچ‌ها

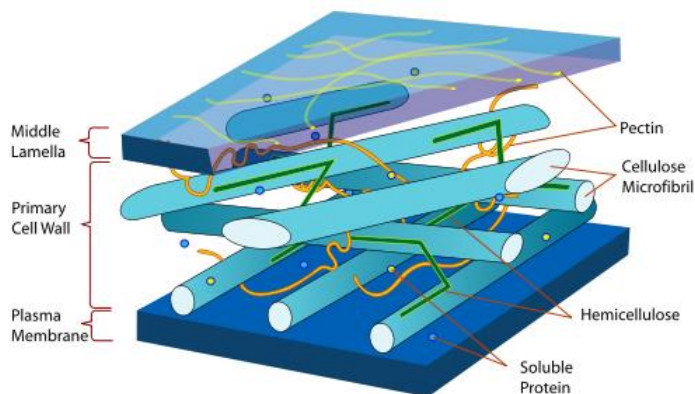
دیواره سلولی قارچ‌ها از پلی‌ساکاریدها (۸۰ درصد)، پروتئین‌ها (۳-۲۰ درصد)، لیپیدها، پیگمان‌ها و نمک‌های غیرمعدنی در مقادیر اندک تشکیل شده است. در قارچ‌های پیشرفته‌تر از نظر تکاملی، اجزای ماکرو مولکولی اصلی دیواره سلولی شامل β -گلوکان، کیتین و گلیکو پروتئین‌ها می‌باشند. این ترکیبات، مجموعاً داربستی را تشکیل می‌دهند که مسئول استحکام دیواره سلولی و حفظ شکل آن می‌باشد. دیواره قارچ‌ها نقش‌های گوناگونی از جمله محصور کردن پروتوپلاست و حفظ شکل کلی قارچ، کنترل ورود و خروج مولکول‌ها، حفاظت از قارچ در برابر تنش‌های اسمزی و در صورت داشتن رنگ‌دانه ملانین، حفاظت از آسیب اشعه ماوراءبنفش دارد (دیکان، ۱۹۹۷).



شکل ۷-۱ طرح کلی از ساختار دیواره سلولی قارچ و جایگاه قرارگیری ترکیبات مختلف دیواره (اویدیو و همکاران، ۲۰۰۴)

۸-۱ ساختار دیواره سلول‌های گیاهی

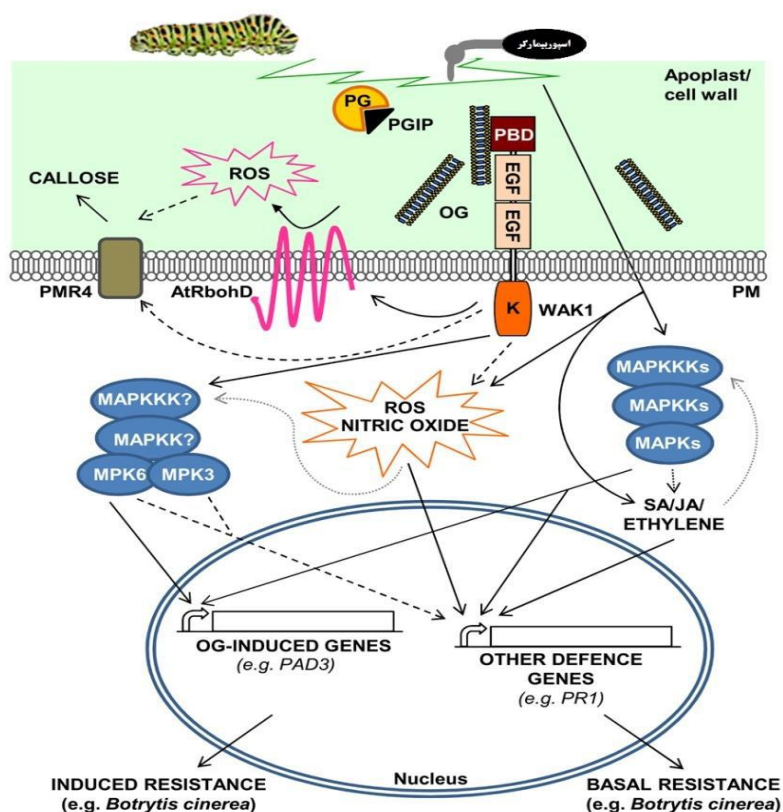
دیواره سلولی گیاهان منبع فراوان کربن در گیاهان محسوب می‌شود. دیواره سلولی گیاهی عمدتاً از سلولز، پلی ساکارید، همی سلولز و پکتین تشکیل شده است، دیواره‌های ثانویه اغلب با لیگنین اشباع شده و یک پلیمر آروماتیک ناهمگن تشکیل می‌دهند. آنزیم‌های میکروبی با تبدیل پلی ساکاریدهای دیواره سلولی به مونوساکاریدها و الیگوساکاریدها، کربن را جهت تثبیت در فرآیند فتوسنتز بازیابی می‌کنند. این فرآیند از نظر بیولوژیکی و صنعتی اهمیت زیادی دارد (هاری و گیلبرت، ۲۰۱۰). دیواره سلول‌های گیاهی نقش مرکزی و پویا در رشد گیاه و پایه اصلی تثبیت کربن در فرآیند فتوسنتز هستند. دیواره‌های سلولی از لحاظ اقتصادی اهمیت فراوانی دارند که جزء اصلی چوب، فیبر و مواد غذایی است و در گیاهان علوفه‌ای، منبع اصلی انرژی برای حیوانات هستند (فیلیپ و هاریس، ۲۰۱۴). اولین سد دفاعی گیاهان در مقابل پاتوژن‌ها سطوح آن‌هاست پاتوژن برای تولید بیماری باید از سد دفاعی گذشته به داخل رخنه کند. کوتیکول به عنوان خارجی ترین سطح، سلول های اپیدرم را به صورت یک لایه غیر سلولی می پوشاند. پاتوژن‌ها برای نفوذ از کوتیکول از آنزیم کوتیناز استفاده می کنند. پاتوژن پس از غلبه بر کوتیکول به دیواره سلولی می رسد. پاتوژن ها با تولید آنزیم هایی از جمله پلی گالاکتوروناز و سلولز و سلوبیوهیدرولاز و Xylanase باعث هیدرولیز سلولز و همی سلولز و پکتین دیواره سلولی می شوند (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۲).



شکل ۱-۶ ساختار و اجزاء دیواره سلول گیاهی

۹-۱ تشخیص قارچ و گیاه توسط یکدیگر

با حمله قارچ، پاسخ دفاعی گیاه از طریق واکنش‌هایی انجام می‌شود که طی آن سلول‌های گیاهی و قارچی به کمک الیگوساکاریدهایی که از ترکیبات پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی قارچ و گیاه طی فعالیت‌های آنزیمی آزاد می‌شوند، یکدیگر را شناسایی می‌کنند. این ترکیبات از طرفی سبب آزاد شدن سیگنال‌ها و ایجاد چرخه‌های دخیل در واکنش‌های دفاعی گیاه شده و از طرف دیگر مکانیسم‌های بیماری‌زایی قارچ نیز متناسب با وضعیت گیاه تغییر می‌کند (هانی، ۱۹۹۹). همچنین در طرف دیگر این واکنش تولید پروتئین‌های ضد قارچی مانند کیتینازها و گلوکانازها توسط گیاه، پاتوژن‌های قارچی نیز ترکیباتی ترشح می‌کنند که پروتئین‌های دفاعی گیاهی را بی‌اثر یا میزان فعالیت آن‌ها را کاهش می‌دهند (کام برینک، ۱۹۹۵).



شکل ۷-۱ نمایی از برهمکنش پاتوژن و گیاه و فعال شدن مسیرهای متابولیسمی و ژن‌های دفاعی (غلام نژاد، ۱۳۹۵).

۱-۱۰ مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر انواع پاتوژن‌ها

در تعاملات ناسازگار بین پاتوژن- میزبان، پاسخ‌های دفاعی گیاه به‌عنوان نتیجه‌ی آسیب‌های وارده توسط پاتوژن محسوب می‌شود. در سلول‌های اطراف محل آلودگی به‌سرعت بافت‌ها نکروزه می‌شوند که به‌عنوان مؤثرترین واکنش فوق حساسیت^۱ شناخته می‌شوند (گودمن و همکاران، ۱۹۹۴). مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در صورت نفوذ پاتوژن و شروع فرآیند بیماری‌زایی می‌توانند میزان خسارت را کاهش داده و از گسترش بیماری جلوگیری کنند. مقاومت سیستمی اکتسابی (SAR) با ایجاد واکنش‌های فوق حساسیت و تولید ترکیبات بیوشیمیایی بازدارنده از جمله مهم‌ترین این مکانیسم‌ها هستند. مقاومت سیستمی اکتسابی، نوعی واکنش دفاعی در کل گیاه است که پس از آلودگی با یک پاتوژن در گیاه ایجاد می‌شود که توسط آلودگی‌های پاتوژنی مختلف به‌خصوص آن‌هایی که موجب نکروزه شدن بافت می‌شوند، ایجاد شده و مقاومت حاصله در برابر دامنه وسیعی از پاتوژن‌ها کارایی خواهد داشت، از این‌رو آن را مقاومتی با دامنه وسیع محسوب می‌کنند. هم‌چنین گاهی با حمله پاتوژن و ایجاد مراحل اولیه آلودگی، سلول‌های سالمی که در اطراف ناحیه آلوده وجود دارند، سریعاً نکروزه شده و از بین می‌روند. این مرگ سریع سلول‌های بافت آلوده موجب جلوگیری از گسترش آلودگی و سرایت آن به سایر نقاط می‌شود. این نوع مکانیسم دفاعی مقاومت فوق حساسیت نامیده می‌شود که با تحریک تعدادی از ژن‌های دفاعی گیاه انجام می‌شود (استین تزی و همکاران، ۱۹۹۳).

پاسخ‌های دفاعی به وجود آمده در گیاه با یک سری از تغییرات متابولیکی هماهنگ است که سبب عدم نفوذ بیشتر پاتوژن به بافت گیاه شده و هم‌چنین موجبات ارتقاء پتانسیل دفاعی گیاه میزبان در کاهش آلودگی‌های بعدی توسط انواع مختلف پاتوژن‌ها را فراهم می‌آورد. از جمله این تغییرات متابولیک در سطح سلولی می‌توان به تغییر در جریان‌های یونی غشاء سلول‌های گیاهی، تولید گونه های اکسیژن فعال، تغییرات در وضعیت فسفوریلاسیون پروتئین‌های تنظیم‌کننده و فاکتورهای فعال کننده رونویسی و در سطح بافت گیاه می‌توان به مرگ سلول‌ها در محل آلودگی، تجمع موضعی

¹ Hypersensitive reaction

فیتوآلکسین‌ها و ترکیبات دیواره سلولی که منتج به تولید کالوز، لیگنین و رسوب سوبرین اشاره کرد (هاموند-کوساک و همکاران، ۱۹۹۶).

یکی از اشکال معمول مکانیسم دفاع ساختاری در گیاهان، ایجاد ترکیبات پیچیده‌ای است که منجر به دفاع ساختاری و القائی در گیاه می‌شود. پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن‌ها^۱ گروه متنوعی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در پاسخ به حمله‌ی پاتوژن‌ها بیان می‌شوند (ردولفی، ۱۹۸۳؛ ون لون، ۱۹۸۹). این پروتئین‌ها به‌طور طبیعی در گیاهان وجود دارند و با حمله عوامل پاتوژن و یا تنش‌های محیطی میزان تولید آن‌ها افزایش می‌یابد (جائن و همکاران ۲۰۰۲). بیان ژن‌های کد کننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی به‌عنوان یکی از شاخصه‌های مقاومت به کار می‌رود. از جمله این پروتئین‌ها، کیتینازها و β -۱ و ۳-گلوکاناز هستند که همراه سایر آنزیم‌های دفاعی مثل β -۱ و ۴-گلوکاناز، پراکسیداز و غیره در فعالیت‌های دفاعی گیاه مؤثرند (پاتاچاریا و همکاران ۲۰۱۰).

از آنجاکه دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زا به‌طور عمده از کیتین و β -گلوکان تشکیل شده است (آدامز، ۲۰۰۴). β -۱ و ۳-گلوکاناز فراوان‌ترین آنزیم با قدرت تنظیمی بالا در پاسخ به عوامل بیماری‌زا هستند (لئونر و متزگر، ۲۰۰۳-۲۰۰۵). البته اغلب مطالعات بر روی β -۱ و ۳-گلوکاناز گلوکانازها بر نقش آن‌ها در گیاه به عوامل بیماری‌زای میکروبی به‌ویژه قارچ‌ها متمرکز بوده است (هل و بوستوک، ۲۰۰۲).

۱-۱۰-۱ پروتئین‌های PR گیاهی

پروتئین‌های PR گیاهی برای اولین بار در گیاهان تنباکو آلوده به ویروس موزائیک تنباکو^۲ کشف شد (ون لوون و همکاران، ۱۹۷۰). این پروتئین‌ها مولکول‌هایی سبک با وزن مولکولی ۴۰-۱۰ کیلو دالتون می‌باشند که می‌توانند شرایط بسیار دشوار را به خاطر خصوصیات بیوشیمیایی‌شان تحمل نمایند. این پروتئین‌ها در pH پایین محلول و بسیار پایدار بوده درحالی‌که بسیاری از پروتئین‌های گیاهی دیگر

^۱ PR Proteins

^۲ TMV

واسرشته می‌گردند. آن‌ها همچنین در مقابل پروتئازها مقاومت زیادی از خود نشان می‌دهند (استین تزی و همکاران، ۱۹۹۳). β -۱ و ۳-گلوکاناز فراوان‌ترین آنزیم با قدرت تنظیمی بالا در پاسخ به عوامل بیماری‌زا هستند (لئونر و متزگر، ۲۰۰۳-۲۰۰۵). البته اغلب مطالعات بر روی β -۱ و ۳-گلوکاناز گلوکانازها بر نقش آن‌ها در گیاه به عوامل بیماری‌زای میکروبی به‌ویژه قارچ‌ها متمرکز بوده است (هل و بوستوک، ۲۰۰۲).

جدول ۱-۱ طبقه‌بندی انواع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی بر اساس ساختار مولکولی خواص بیولوژیک و نحوه‌ی اثر آن‌ها (ون لوون و همکاران، ۱۹۹۴).

شماره خانواده	نوع پروتئین دفاعی	محل اثر
PR-1	پروتئین‌های اولیه ضد قارچی	غشاء پلاسمایی
PR-2	۱ و ۳- β -گلوکاناز	گلوکان دیواره سلولی
PR-3	اندوکیٹیناز (کلاس‌های ۱، ۲، ۴، ۶ و ۷)	کیتین دیواره سلولی
PR-4	اندوکیٹیناز (پروهاوئین)	کیتین دیواره سلولی
PR-5	اسموتین و پروتئین‌های شبه تاوماتینی	غشاء پلاسمایی
PR-6	بازدارنده پروتئیناز	پروتئینازهای پاتوژن
PR-7	پروتئیناز	نامشخص
PR-8	اندوکیٹیناز (کلاس ۳)	کیتین نامشخص
PR-9	پراکسیداز	تحریک سیستم دفاعی
PR-10	RNase	پاتوژن RNA
PR-11	اندوکیٹیناز (کلاس ۵)	کیتین دیواره سلولی
PR-12	دیفنسین	غشاء پلاسمایی
PR-13	تیونین	غشاء پلاسمایی
PR-14	پروتئین‌های انتقال لیپید	لیپیدها
PR-15	اگزالات-اکسیداز	غشاء پلاسمایی
PR-16	پروتئین‌های شبه اگزالات-اکسیداز	غشاء پلاسمایی
PR-17	نامشخص	نامشخص

۱-۱۰-۲ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

تحت شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی از جمله شوری، خشکی، تنش دمایی و بیماری‌ها تعادل موجود بین تولید و تخریب انواع اکسیژن فعال از بین می‌رود که باعث افزایش انواع اکسیژن فعال شده و پراکسیداسیون لیپیدی را در پی دارد (سان و همکاران ۲۰۱۰).

با توجه به اینکه تولید اکسیژن فعال^۱ (ROS) نتیجه اجتناب ناپذیر متابولیسم هوازی می‌باشد. ROS شامل رادیکال‌های آزاد مانند آنیون سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسید (OH) و همچنین مولکول غیر رادیکال مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و تک اکسیژن ($1O_2$) و غیره است. غلظت بالای ROS در سلول برای موجودات زنده به شدت سمی است. هنگامی که سطح ROS بیش از مکانیسم‌های دفاعی باشد به اصطلاح گفته می‌شود که سلول در حالت تنش اکسیداتیو قرار دارد. تولید ROS در طول تنش‌های زیستی می‌تواند با ایجاد پراکسیدایسیون لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها، آسیب به اسیدهای نوکلئیک، مهار آنزیم، فعال سازی و برنامه ریزی مرگ سلولی^۲ و در نهایت سبب مرگ سلول‌ها شود. با وجود فعالیت‌های مخرب ROS، اما از طرفی دیگر حضور این مولکول به عنوان پیام‌رسان ثانویه در انواع فرآیندهای سلولی نظیر تحمل به تنش‌های محیطی ضروری است. در مواقع تنش سیستم آنتی اکسیدانی کارآمد شامل آنزیم‌های آنتی اکسیدانی سبب تجزیه اکسیژن‌های فعال می‌شوند. آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آنزیم‌های چرخه آسکوربات گلوکوتاتیون نظیر آسکوربات پراکسیداز (APX)، منوهیدرو آسکوربات ردوکتاز (MDHAR)، دی هیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) و گلوکوتاتیون ردوکتاز (GR) می‌باشند (شارما و همکاران، ۲۰۱۶).

۱-۱۱ مالون دآلدئید (MDA)

مالون دآلدئید (MDA)، به عنوان یک شاخص برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی و نشان دهنده‌ی آسیب به غشاء سلول می‌باشد (لین و همکاران، ۲۰۰۹). در اثر تخریب پراکسیدهای اسید چرب اشباع‌نشده، MDA به وجود می‌آید (رابطه زیر) که به عنوان یک نشانگر برای مشخص کردن مقدار صدمات اکسیداتیو به لیپیدها به کار می‌رود و مقدار آن بسته به میزان شدت تنش متفاوت می‌باشد (استوارت و بولی، ۱۹۸۰ و داوی و همکاران، ۲۰۰۵).

¹ Reactive oxygen species

² Programmed cell death



۱-۱۲ نقش القاگرها در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی

جست‌وجو برای روش‌های جدید دوستدار طبیعت به‌ویژه در زمینه‌ی مقاومت گیاهان به استرس‌های زنده و غیرزنده از فاکتورهای کلیدی در کشاورزی پایدار است. القای سیستم دفاعی گیاهان به‌وسیله‌ی القاگرهای زنده و غیرزنده یک روش جایگزین مناسب برای محافظت از گیاهان در مقابل پاتوژنهای گیاهی است. مقاومت سیستمیک القایی (ISR) مقاومتی است که توسط میکروارگانیسم‌های مفید، یا القاگرهای طبیعی ساخته‌شده و در گیاه القا می‌شود (کانراس و همکاران، ۲۰۰۶).

در میان القاگرها، یک دسته از ترکیبات طبیعی مانند کیتین، الیگوساکاریدهای کیتوزان، الیگوساکارید های β -گلوکوزید به‌دست‌آمده از دیواره‌های سلول گیاهی یا قارچی وجود دارد که می‌تواند سبب ایجاد یک سری از پاسخ‌های دفاعی بشوند (شی بویا و مینامی ۲۰۰۱). برای مثال، تیمار با β -۱ و ۳-گلوکان‌سولفات سبب بیان مجموعه‌ای از ژن‌های دفاعی، شامل PR-1، PR-2، PR-3، PR-5 می‌شود (منارد و همکاران ۲۰۰۴)؛ بنابراین، مقاومت القاشده به‌عنوان یک جایگزین برای کنترل بیماری‌های گیاهی در هر دو محیط آزمایشگاه و در چند مورد در مزرعه ثابت شده است (ون لون، ۱۹۹۷).

۱-۱۲-۱ فسفیت پتاسیم

ترکیب فسفیت پتاسیم در سال ۱۳۸۳، با نام عمومی فسفونیک اسید به‌عنوان ترکیب کود-سم و در گروه سموم آلی فسفوناتها در ایران به ثبت رسید. فسفیت علاوه بر تحریک رشد رویشی و زایشی گیاه، منجر به کنترل طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زای قارچی به‌ویژه خانواده اوومایست‌ها می‌گردد (جیحونی، ۱۳۹۱). فسفیت‌ها ترکیباتی با فرمول شیمیایی $(\text{H}_2\text{PO}_3^-)$ هستند که از لحاظ تعداد اکسیژن و هیدروژن از فسفات (HPO_4^{2-}) کاملاً متمایز می‌باشند. فسفیت به علت دارا بودن یک اکسیژن کمتر از فسفات، سرعت حرکت آن بسیار بیشتر بوده و طی مدت‌زمان کوتاهی، در سراسر

اندام گیاهی انتشار می‌یابد. این ماده علاوه بر تحریک رشد رویشی و زایشی موجب کنترل طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای قارچی می‌گردد (تائو و همکاران، ۲۰۰۸).

شیوه عمل فسفیت در کنترل بیماری‌های گیاهی، نخست مرتبط با تاثیر مستقیم بر روی عامل بیماری‌زا می‌باشد. نتیجه تحقیقات در زمینه کنترل قارچ *Phytophthora* بیانگر آن است که ترکیبات حاوی فسفیت موجب اختلال در متابولیسم‌های فسفر و تجمع پلی فسفات^۱ و پیروفسفات درون عامل بیماری‌زا می‌گردند که مهم‌ترین عامل موثر در برهم ریختن واکنش‌های آنابولیستی پیروفسفوریلاز^۲ و تجمع پیروفسفات می‌باشد (نییره و همکاران، ۱۹۹۴). فسفیت مشابه انگیزنده‌های بیمارگر، اجزای دیواره سلولی قارچی، از طریق شیکمیک اسید^۳ گیاه را تحریک به تولید مواد دفاعی فیتوالکسین^۴ بر علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌کند. این فیتوالکسین‌ها ترکیبات ضد میکروبی با وزن مولکولی پایین هستند که به مقدار قابل توجه و تنها پس از تحریکات ناشی از عوامل بیماری‌زا و زخم‌های ناشی از عوامل فیزیکی و شیمیایی توسط سلول‌های سالم مجاور سلول‌های مرده و آسیب دیده پدید می‌آیند (استهمان و گرنت، ۲۰۰۰). مقاومت زمانی علیه عامل بیماری‌زا پدید می‌آید که غلظت فیتوالکسین به اندازه‌ای برسد که از رشد و توسعه بیمارگر ممانعت کند. در راستای تولید فیتوالکسین‌ها، گیاه میزبان با تولید و انتشار اسید سالیسیک، موجب القاء بیان ژن و کد کردن پروتئین‌های مرتبط با بیماری در درون سلول‌های گیاهی می‌شود که در طی آن مقاومت اکتسابی فراگیر پدید می‌آید و بیماری در سرتاسر اندام گیاهی کنترل و محدود می‌گردد. در مجموع فیتوالکسین با ایجاد تغییرات در ساختمان دیواره سلولی میزبان، محدود نمودن دسترسی به کوآنزیم‌های ضروری و ایجاد تغییراتی در سرعت یا جهت متابولیسم میزبان به نحوی که گیاه در موقعیت بهتری از دفاع خود در برابر بیمارگر قرار گیرد، موجب افزایش مقاومت میزبان در برابر بیمارگر و در نهایت تقلیل میزان آلودگی می‌شوند (کرورا و همکاران، ۲۰۰۷).

¹ Polyphosphate (Poly-P)

³ Pyrophosphorylase

⁴ Shikmic acid

⁵ Phytoalexin

۱-۱۲-۲ کیتوزان

کیتوزان یک پلیمر پلی کاتیونی از β -۱ و ۴-D-گلوکوزآمین است که امروزه عنوان ماده افزایش دهنده قدرت دفاعی گیاهان علیه آلودگی‌های قارچی به کار می‌رود. این ماده از پوسته‌ی سخت‌پوستان، حشرات و بسیاری از قارچ‌ها، جلبک‌ها و مخمرها به دست می‌آید. این ماده خطر زیست‌محیطی ندارد چراکه اثر سمیت روی پستانداران و محیط‌زیست نداشته و از طرف دیگر فراوانی بالایی در طبیعت دارد. این ماده به‌عنوان القاگر مقاومت در گیاهان با القاگرهای مختلف باعث تحریک پاسخ‌های دفاعی شده و در نتیجه کاهش علائم بیماری در پاتوسیستم‌های مختلف شده است (ولادی و همکاران، ۱۳۹۰). دو مکانیسم مختلف برای تعامل بین مولکول‌های کیتوزان و میکروارگانیسم‌ها پیشنهاد شده است: اول، جذب کیتوزان موجب ایجاد پوششی بر دیواره سلولی شده و بافت غشاء پلاسمایی را مختل کرده و سبب نشت کیتوزان به سلول می‌شود. دوم، نفوذ کیتوزان به سلول‌های زنده منجر به مهار آنزیم‌های مختلف و تداخل در سنتز mRNA و پروتئین می‌شود (عبدل قادر و همکاران، ۲۰۱۲).

۱-۱۳ بررسی بیان ژن

ترانسکریپتومیکس یکی از زمینه‌های پیشرفته در زمینه‌ی علوم بعد از ژنومیک (Genomic-post) است. در واقع ترانسکریپتوم به مجموعه‌ی نسخه‌های RNA در نوع خاصی از یک سلول یا بافت در شرایط ویژه‌ای از نمو یا تحت شرایط فیزیولوژیکی خاص اطلاق می‌شود و شامل RNA های پیغامبر (RNA messenger)، انتقال دهنده های RNA (Transfer RNA)، RNA ریبوزومی (Ribosomal RNA) و دیگر RNA های غیر کد کننده (RNA coding-non) می‌شوند. ژنوم در تمامی سلول‌های یک موجود زنده، به استثنای موجودات جهش یافته، ثابت است، تحت شرایط مختلف الگوی بیان ژنها تغییر خواهد کرد، اما ترانسکریپتوم در سلول‌های مختلف متغیر است. به بیان دیگر، ترانسکریپتوم هر سلول الگوی بیانی ژنهایی است که به طور فعال در زمانی خاص بارز می‌شوند؛ تخریب mRNA نیز بر روی ترانسکریپتوم تأثیر دارد. علم ترانسکریپتومیکس بر روی میزان بیان ژن‌ها با بررسی سطوح RNA

تمرکز می‌کند (تافت و همکاران، ۲۰۱۰). فعالیت سلول‌ها در همه موجودات با فعال کردن و غیرفعال کردن بیان ژن‌ها تنظیم می‌شود. ژنوم موجودات یوکاریوتی دارای تعداد زیادی ژن است، ولی در هر سلول تنها بخشی از ژن‌ها بیان می‌شوند که به نوع عمل سلول بستگی دارد. بیان ژن به تعداد نسخه های mRNA یک ژن در یک بافت گفته می‌شود که سطوح بیان ژن با میزان پروتئین مربوطه همبستگی مثبت دارد (لیواک و چمیتچن، ۲۰۰۱).

روشهایی برای تعیین کمیت و کیفیت ترانسکریپتوم‌ها وجود دارد که به سه صورت کلی تقسیم می‌شوند: روش‌های متکی بر هیبریداسیون (Hybridization-based approaches) شامل روش‌های نوردن بلات (Northern blot)، نوردن بلات معکوس و روش ریزآرایه (Microarray) می‌باشد. روش‌های مبتنی بر (PCR) به دو روش PCR کمی و روش PCR زمان واقعی (Real-Time PCR) تقسیم می‌شود. روش‌های متکی بر توالی‌یابی (Sequencing-based approaches) از جدیدترین روش‌هاست که به چهار دسته توالی‌یابی سنگر، روش سریالی آنالیز بیان ژن (SAGE)، روش MPSS و روش توالی‌یابی RNA می‌توان تقسیم کرد.

۱-۱۳-۱ PCR زمان واقعی (Real-Time PCR)

همان‌طور که از معنی واژه برمی‌آید Real-time PCR مشاهده لحظه‌به‌لحظه یک فرایند می‌باشد Real Time PCR یا qRT-PCR روش تغییریافته‌ای است که برای ارزیابی کمیت نسبی یک رونوشت خاص در تعدادی نمونه و ارزیابی سطح تجمع آن رونوشت پس از تیمارهای مختلف یا در بافت‌ها یا زمان‌های مختلف استفاده می‌شود. qRT-PCR یک روش بر مبنای PCR است که برای تکثیر و سنجش مقدار مولکول هدف به کار می‌رود.

برای ردیابی تکثیر DNA از رنگ‌آمیزی فلورسنت بارنگ‌هایی مانند سایبر گرین (SYBR Green) استفاده می‌شود. این رنگ‌آمیزی برای تعیین میزان DNA به‌کاررفته و به تمام محصولات دو رشته‌ای PCR، اختصاصی و غیراختصاصی (دایمر پرایمرها) متصل می‌شود (اوربرگ و همکاران، ۱۹۹۹). انجام

qRT-PCR با استفاده از ترموسایکالر و میزان فلورسنت با استفاده از یک دستگاه ردیاب انجام می‌شود. سایر گرین تنها زمانی که به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود، از خود نور فلورسنت ساطع می‌نماید. برای تعیین دقت آزمایش، از یک ژن خانه‌دار (مرجع) برای کنترل مثبت و آب به‌عنوان کنترل منفی استفاده می‌شود. بدین ترتیب تغییر در کمیت و کیفیت RNA قابل تشخیص می‌شود (نولان و همکاران، ۲۰۰۶).

تکثیر در هر زمان قابل مشاهده می‌باشد. به عبارتی امکان نظارت لحظه‌به‌لحظه واکنش وجود داشته و در هر سیکل امکان بررسی فرایند تکثیر وجود دارد.

از مزایای روش Real-Time PCR می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. امکان بهینه‌سازی واکنش وجود دارد به‌طوری‌که مناسب‌ترین غلظت DNA و پرایمر و همچنین تعداد سیکل لازم برای تکثیر مشخص می‌شود.

۲. امکان قطع واکنش در زمان دلخواه وجود دارد. از آنجائی که روند PCR قابل مشاهده می‌باشد، در صورت عدم تکثیر و یا رفتن به فاز سکون می‌توان به واکنش خاتمه داد و از اتلاف وقت و انرژی پرهیز نمود.

۳. معمولاً واکنش‌ها سریع‌تر اتفاق می‌افتد و زمان کمتری لازم است.

۴. محدوده تشخیص آن بالاتر از PCR معمولی است. حتی اختلاف کمتر از ۲ برابر را هم نشان می‌دهد.

در حال حاضر Real-Time PCR دقیق‌ترین روش برای بررسی بیان ژن است. این روش مقدار زیادی داده‌های عددی خام تولید می‌کند که نحوه پردازش آن می‌تواند بر روی نتایج نهایی تاثیر بگذارد. پردازش داده‌ها را می‌توان به دو طریق روش منحنی استاندارد و روش $\Delta\Delta Ct$ انجام داد (لاریونو و همکاران، ۲۰۰۵).

منحنی استاندارد یک تابع خطی معمولی است که عموماً در آزمایشات با استفاده از تعداد کافی و طیف وسیعی از رقت‌های استاندارد رسم می‌شود. طراحی خاص منحنی‌های استاندارد ممکن است برای ژن‌های مختلف بسته به تغییرات بیان ژن آن‌ها متفاوت باشد، به همین منظور برای رسم منحنی استاندارد از ژن‌های نسبتاً پایدار β اکتین و GAPD استفاده می‌کنند.

در این روش غلظت نسبی DNA در فاز نمایی واکنش با رسم نمودار لگاریتمی میزان فلورسنت در مقابل تعداد چرخه نشان داده می‌شود (نمایش فاز نمایی با یک خط راست). یک آستانه برای میزان فلورسنت در نظر گرفته می‌شود. در چرخه واکنشی که فلورسنت به حد آستانه می‌رسد، چرخه آستانه یا Ct نامیده می‌شود (نولان و همکاران، ۲۰۰۶). مقادیر Ct حاصل از واکنش ابزار دقیقی برای انجام محاسبات Real-Time PCR می‌باشد، در این روش برای انجام آنالیز داده‌ها باید در انجام آزمایشات از یک ژن کنترل داخلی مانند β اکتین و GAPDH استفاده کرد. در ابتدا برای انجام محاسبات، مقادیر Ct را در نرم افزار Excel وارد کرده، سپس با استفاده از فرمول‌های زیر به محاسبه می‌پردازند (لیواک و چمیتچن، ۲۰۰۱).

$$\Delta CT_{\text{sample}} = CT_{\text{target}} - CT_{\text{actin}} \quad \text{رابطه (۱-۱)}$$

$$\Delta CT_{\text{calibrator}} = CT_{(\text{target, calibrator})} - CT_{(\text{actin, calibrator})} \quad \text{رابطه (۲-۱)}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{calibrator}} \quad \text{رابطه (۳-۱)}$$

فصل دوم

پیشینه و بررسی منابع

با توجه به تحقیقاتی که تاکنون در زمینه مطالعه تأثیر القاگرهای مختلف در ایجاد پاسخ دفاعی گیاه صورت گرفته است، به طور خلاصه به مرور نتایج این مطالعات می‌پردازیم:

استفاده از القاکننده‌های شیمیایی از یک سو سبب فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی گیاه قبل از رویارویی با پاتوژن می‌شوند و از سوی دیگر خطرات زیست‌محیطی ندارند که در سال‌های اخیر مورد توجه محققان قرار گرفته است (ژاکاب و همکاران، ۲۰۰۱). مقاومت در برابر بیماری می‌تواند از یک دسته از مولکول‌ها موسوم به القاگرها^۱ ناشی شود (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹؛ چن و همکاران، ۲۰۰۹).

در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ توسط سان و همکاران انجام شد خاصیت ضد قارچی β -۱ و ۳- گلوکاناز برگ گندم در آزمایشگاه بررسی گردید. این β گلوکانازها فعالیت ضد قارچی در برابر قارچ‌های *Rhizoctonia solani*, *Alternaria longipes*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahlia* نشان داد و همچنین از رشد لوله و جوانه اسپور جلوگیری کرد (سان و همکاران، ۲۰۰۴).

عوامل متعددی به مقاومت غده‌های سیب‌زمینی در برابر آلودگی قارچی کمک می‌کند. در میان این عوامل پروتئین بازدارنده گالاکترونز (PGIPs)، مهارکننده‌های پروتئاز (PIs) و کیتیناز مورد مطالعه قرار گرفتند. پروتئین‌های (PGIPs) مرتبط با دیواره سلولی گیاهان دولپه بوده و با عمل پلی گالاکترونزهای قارچی (PGs) مقابله می‌کند و از تخریب دیواره سلولی جلوگیری کرده و در نتیجه حمله پاتوژن‌ها را محدود می‌سازد (دی ماتئو و همکاران، ۲۰۰۶).

¹ Elicitore

۲-۱ بررسی مطالعات انجام شده در خصوص تأثیر کیتوزان بر گیاه

ال-قائوت و همکاران (۱۹۹۲) گزارش دادند که تأثیر کیتوزان و مشتقات آن بر سلول‌های قارچ سبب تغییرات ساختاری از جمله سست شدن دیواره سلول و تخریب پروتوپلاسم در آن‌ها می‌شود تا جایی که آنالیز هیستوشیمیایی در قارچ *Rhizopus stolonifer* نیز نشان‌دهنده سست شدن دیواره سلولی و از دست دادن تعادل بین بیوسنتز و بازده کیتین موجود در نوک هیف‌ها شده است و نیز دریافتند که نرخ مهار رشد پاتوژن‌ها با غلظت کیتوزان ارتباط مستقیم دارد.

میشل و همکاران (۱۹۹۴) با بررسی فعالیت آنزیمی گیاه گندم تیمار شده با کیتوزان با غلظت ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در لیتر تحت تنش قارچ *Botrytis cinerea* دریافتند که سطح فعالیت آنزیم‌های دخیل در مقاومت مانند فنیل آلانین آمونیالیز و پراکسیداز در گیاه چه گندم تیمار شده با کیتوزان به دنبال تلقیح با پاتوژن به ترتیب ۳/۴ و ۲/۷ برابر نسبت به شاهد افزایش یافته است.

ال-قائوت و همکاران (۱۹۹۷) در پژوهشی دریافتند که کیتوزان به‌طور قابل‌توجهی در کاهش تولید پلی‌گالاکترونازها که توسط *B. cinerea* در بافت‌های فلفل تولید شده و باعث نرم شدن دیواره یاخته ای بافت می‌شود مؤثر است. همچنین در میوه توت‌فرنگی و تمشک تازه با پوشش کیتوزان، افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط به مقاومت از جمله کیتیناز و β -۱ و ۳-گلوکاناز روی میوه در مقایسه با شاهد بدون پوشش مشاهده شده است (ژانگ و کوآن تیک، ۱۹۹۸).

شواهد قوی وجود دارد که نشان می‌دهد مخلوط شدن محیط کشت قارچ‌ها با کیتوزان از رشد میسلیومی قارچ جلوگیری کرده یا آن را به تاخیر می‌اندازد. برای مثال با افزایش غلظت کیتوزان از ۰/۷۵ به ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رشد شعاعی قارچ‌های *Colletotricum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternate* و *Rhizopus stolonifer* کاهش یافت (ال-قائوت و همکاران، ۱۹۹۲).

اثر کیتوزان در جلوگیری از رشد قارچ *Neurospora crassa* با تاثیر مستقیم بر روی غشاء پلاسمایی (پالما-گرورو و همکاران، ۲۰۰۹) و همچنین مهار رشد میسیلیومی *Pyricularia grisea* به میزان ۷۵ درصد رشد قطری و جلوگیری از تشکیل هاگ گزارش شده است (بداوی و همکاران، ۲۰۰۴).

سازوکاری که کیتوزان بر اساس آن روی رشد قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی اثر می‌گذارد هنوز به طور کامل روشن نیست، اما چندین فرضیه مطرح شده است. به دلیل طبیعت پلی کاتیونی کیتوزان، اعتقاد بر این است که کیتوزان با بار منفی مولکول‌های موجود بر سطح یاخته‌های قارچی تداخل یافته و این برهمکنش منجر به نشت الکترولیت‌های داخل یاخته‌ای و پروتئین‌ها می‌شود (قاضی محسنی و همکاران، ۱۳۹۳).

واسیوکووا و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند کیتوزان سبب القای تجمع فیتوآلکسین‌ها در بافت‌های گیاهان میزبان می‌شود، تغییر استرول‌های آزاد سبب ایجاد اثرات نامطلوب شده و آنزیم‌های کیتیناز و β -گلوکاناز و لیپوکسیژناز با فعالیت خود تولید گونه‌های اکسیژن فعال را تحریک می‌کنند. همچنین دریافتند که فعالیت آنزیم‌های دفاعی در بافت‌های غده سیب‌زمینی تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر محلول کیتوزان و تلقیح با *Phytophthora infestans* افزایش یافته است.

فالکوون و همکاران (۲۰۰۲) در پژوهشی به بررسی فعالیت آنزیم‌های دخیل در مقاومت در گیاه تنباکوی تیمار شده با کیتوزان به دنبال آلوده شدن با *Phytophthora parasitica* پرداختند و گزارش کردند که تیمار با کیتوزان در این پژوهش سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و β -۱ و ۳-گلوکاناز شده است.

بل و همکاران (۱۹۹۸)، پیتا و همکاران (۲۰۰۶)، ناوروکی و مازور (۲۰۰۷) تأثیر بازدهی کیتوزان در زمینه‌ی حفاظت از گیاه را تأیید کردند. نتایج حاصل از تحقیقات محققان نام‌برده نشان داد که راندمان حفاظت کیتوزان به‌کاررفته به‌عنوان یک وسیله پیشگیری به نسبت بهتر از زمانی است که

به عنوان درمان به کار می رود. اثر نفوذ کیتوزان بر پاتوژن های گیاهی به غلظت آن و قدرت بیماری زایی عوامل عفونی بستگی دارد (کرزاوینسکا و همکاران، ۲۰۰۹).

تروتل- عزیز و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که کاربرد کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم های دفاعی لیپوکسیژناز، فنیل آلانین آمونیالیز و کیتیناز در برگ های انگور آلوده به قارچ *B. cinerea* شده است.

موورت و همکاران (۲۰۰۹) در پژوهشی اثر کاربرد کیتوزان بر کنترل بیماری سفیدک پودری در خیار را بررسی کردند و دریافتند که کیتوزان با فعال کردن محصولات مرتبط با پاتوژن مانند کیتینازها، لیگنین ها، کیتوزانازها، β گلوکانازها و کالوز موجب ایجاد پاسخ دفاعی در گیاه شده است. در اثر استفاده کیتوزان در مورد کنترل بیماری سفیدک پودری در خیار این ماده در غلظت های مختلف بر اندازه زخم ایجاد شده در گیاه و مهار شدت بیماری مؤثر واقع شده است به طوری که میزان بازدارندگی این ماده بسته به نوع قارچ و غلظت ماده مصرفی متفاوت بوده است.

در مطالعه ولادی و همکاران (۱۳۹۲) تاثیر سالیسیلیک اسید و کیتوزان بر القای مقاومت در نخود علیه عامل بیماری های پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی بررسی شد. این محققان دریافتند سالیسیلیک اسید نتوانست تاثیر بسزایی در کنترل قارچ خاکزی داشته باشد در حالی که هر دو غلظت مصرفی کیتوزان در این تحقیق (۲۰۰ و ۴۰۰ ppm) سبب کاهش بروز و شدت بیماری شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بالاترین حد القاء آنزیم های دفاعی کیتیناز و β -۱ و ۳ گلوکاناز در برگ های تیمار شده با کیتوزان در غلظت ۴۰۰ ppm مشاهده شده که نشانگر تاثیر کیتوزان در تحریک پاسخ های دفاعی است. اثر ضد قارچی غلظت های به کار رفته کیتوزان روی قارچ *F. oxysporum* در شرایط آزمایشگاهی مشاهده شد که احتمالاً این امر نیز در کنترل قارچ مذکور در شرایط گلخانه بوده است.

نادری و همکاران (۱۳۹۴) تاثیر کیتوزان را بر شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در ریحان بررسی کردند. نتایج این محققان نشان داد که کیتوزان به عنوان القاگر زیستی کارآمد می تواند از

طریق القای سیستم دفاعی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بعد از یک روز از اعمال باعث افزایش تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی در گیاه ریحان شود.

مهدوی و صفری (۱۳۹۴) در بررسی اثر کیتوزان در شرایط تنش شوری بر رشد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک نخود دریافتند که پیش تیمار بذر گیاهان با کیتوزان با افزایش رشد ریشه، میزان پرولین، میزان کربوهیدرات و میزان پتاسیم ساقه و کاهش میزان سدیم ساقه سبب تحمل به شوری گیاه شده است و توانسته با بهبود رشد رویشی گیاه و افزایش اسمولیت‌ها در گیاه خسارات ناشی از تنش را جبران کند.

۲-۲ بررسی مطالعات انجام‌شده در خصوص تأثیر فسفیت پتاسیم بر گیاهان

آریایی و همکاران (۱۳۹۳) تأثیر ترکیبات مختلف کودی را در کاهش رشد فایتوفترا مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد فسفیت پتاسیم به‌طور معنی‌داری بر روی کاهش رشد قارچ مؤثر بود.

دولان و کوفی (۱۹۸۸) اظهار داشتند که گرچه تأثیر فسفونات بر جنس *Phytophthora* هنوز به‌طور قطعی شناسایی نشده است اما گزارش کردند که اسید فسفریک و A-فوستیل در محیط این ویتر و سبب مهار رشد *Phytophthora capsici* شده است.

فورستر و همکاران (۱۹۹۸) در پژوهشی تأثیر فسفیت بر میزان ابتلا گیاه فلفل سبز و گوجه‌فرنگی به قارچ *P. capsici* عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه را بررسی کردند. در این مطالعه پس از تلقیح گیاهان با قارچ *P. capsici* از فسفیت به‌عنوان عامل کنترل‌کننده بیماری استفاده شد. سپس با اندازه‌گیری‌های مختلف اعم از بیوشیمیایی و مورفولوژیکی محققان به این نتیجه رسیدند که گیاهان تیمار شده با فسفیت نسبت به گیاهان شاهد کمتر بیمار شده و اختلاف معنی‌داری در میزان و شدت بیماری بین دو گروه شاهد و تیمار شده با فسفیت مشاهده شده است. با توجه به این مشاهدات اثبات

شد که از فسفونات‌ها می‌توان به‌عنوان یک ترکیب ضد قارچی در برابر قارچ‌های اومیس‌ها استفاده کرد.

ویل کینسون و همکاران (۲۰۰۱) اثر فسفیت را بر کاهش میزان تولید زئوسپور قارچ *Phytophthora* مورد مطالعه قراردادند. در این مطالعه فسفیت با دو غلظت ۵ و ۱۰ گرم بر لیتر محلول‌پاشی شد. نتایج نشان داد فسفیت می‌تواند در کاهش زئوسپور قارچ مؤثر باشد؛ اما به‌طور کامل عامل بیماری را از بین نبرد.

لوباتو و همکاران در سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۱۱ در پژوهشی اثر محلول‌پاشی فسفیت پتاسیم در پری‌درم و ترکیبات کورتکس غده بذر سیب‌زمینی را بررسی کردند و نشان دادند که فسفیت پتاسیم اعمال‌شده در جوانه‌های غده، شاخ و برگ و غده‌های تولیدشده در گیاه سیب‌زمینی سبب ایجاد مقاومت به پاتوژن‌های *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Erwinia carotovora* می‌گردد. اثر محافظتی فسفیت پتاسیم در گیاه سیب‌زمینی در برابر پاتوژن‌های مختلف از قبل اثبات‌شده بود.

نتایج یافته شده از پژوهش لوباتو و همکاران در سال ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱ نشان می‌دهد که دیواره سلولی یا لایه میانی بافت گیاه به خاطر انباشت یک سری از ترکیبات ناشی از تیمار با فسفیت پتاسیم در پاسخ دفاعی تقویت‌شده است. میزان پکتین به‌طور قابل‌توجهی در عصاره قشر آسیب‌دیده تغییر کرده است و میزان پکتین در غده‌های تیمار شده با فسفیت پتاسیم به‌شدت افزایش یافت. این تأثیر حفاظتی بر روی غده می‌تواند یا از طریق کاهش سطح فعالیت هیدرولازهای قارچی پکتین، تیمار با فسفیت پتاسیم و یا از طریق اثر مستقیم فسفیت پتاسیم بر *F. solani* حاصل شود.

ترونک و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی تأثیر فسفونات پتاسیم را در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه فیتوفترایی فلفل سیاه در گلخانه و مزرعه مورد ارزیابی قراردادند. پوسیدگی طوقه فیتوفترایی فلفل سیاه که از قارچ *P. capsici* ناشی می‌شود یک بیماری مهم فلفل سیاه در سراسر مناطق تولیدی فلفل

ویتنام محسوب می‌شود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که فسفونات پتاسیم پتانسیل قابل توجهی برای استفاده در مدیریت قارچ *P. capsici* عامل پوسیدگی طوقه فلفل سیاه در ویتنام دارد.

اولیوری و همکاران (۲۰۱۲) دریافتند که نحوه عمل فسفیت پتاسیم احتمالاً تغییرات میزان پکتین را نیز شامل می‌شود. این تغییرات ممکن است به تقویت، یکپارچگی و حفظ ساختار پکتین کمک کند. قبل از این پژوهش هیچ گزارشی راجع به نحوه عمل فسفیت بر ساختار یا میزان پکتین در دیواره سلولی ارائه نشده بود.

راخا و همکاران در پژوهشی تأثیر فسفیت بر خیار که تحت حمله قارچ *Phytophthora sp.* عامل بیماری پوسیدگی ریشه قرار گرفته بود، را بررسی کردند. در این مطالعه با استفاده از بررسی‌های مورفولوژیک در طول زمان مشخص، اثبات شد که همه‌ی غلظت‌های فسفیت مصرفی توسط محققین بر کنترل بیماری‌های ناشی از این قارچ مؤثر بوده است.

در پژوهش مفیدنخعی و همکاران (۲۰۱۶) اثر فسفیت پتاسیم بر القای مقاومت در برابر قارچ *P. ultimum* بررسی شد. این محققان گزارش کردند که فسفیت پتاسیم می‌تواند اثرات نامطلوب قارچ پیتیوم را در گیاهچه‌های خیار کاهش دهد، علاوه بر این شواهد نشان داد که آنزیم‌های آنتی اکسیدان پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز که توسط فسفیت پتاسیم القاء شدند در کاهش تنش اکسیداتیو و حفظ رشد طبیعی گیاهچه‌ها دخالت داشته است.

حیدرزاده و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی تأثیر پیش تیمار غلظت‌های مختلف فسفیت پتاسیم بر خیار تحت تنش قارچ فوزاریوم دریافتند که فسفیت پتاسیم در غلظت ۴ گرم در لیتر بر میزان افزایش آنزیم‌های دفاعی نظیر کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز موثرتر واقع شده است به نحوی که فسفیت پتاسیم در غلظت مذکور سبب افزایش ۲/۸۱ برابری آنزیم کاتالاز، ۲/۲۱ برابری آنزیم گایاکول پراکسیداز و ۱/۴ برابری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت به شاهد شده است.

۲-۳ مطالعات انجام شده در خصوص بیان ژن

کیم و همکاران (۱۹۹۹) در تحقیقی مشاهده کردند که ژن کیتیناز کلاس III در کدو تنبل در پاسخ به الیسیتورهای قارچی و کیتین گلیکول القاء گردید. این ژن حداکثر ظرف مدت یک ساعت پس از تیمار با الیسیتورهای قارچی القاء شد و رونوشت‌های آن نیز در عرض ۶ ساعت ناپدید شد. درحالی‌که این ژن پس از تیمار با کیتین گلیکول در ظرف ۳ ساعت القاء گردید و بیان آن نیز به تدریج در طی ۲۴ ساعت کاهش یافت.

آدرین و باربارا (۲۰۰۶) در پژوهشی دریافتند که استفاده از کیتوزان احتمالاً سبب تحریک سیستم ایمنی گیاهان در طول آلودگی اولیه با *P. palmovira* می‌شود، اما فعالیت‌های مولکولی مانند بیان پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن PR که فعالیت‌های ضد قارچی را شامل می‌شود بعد از آلودگی در این مطالعه بررسی نشد.

ژیا و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی چگونگی تأثیر سطوح مختلف براسینوئید بر میزان مقاومت خیار به ویروس موزائیک خیار CMV پرداختند و دریافتند که تأثیر هورمون براسینواستروئید به‌عنوان یک القاگر بر میزان تجمع H_2O_2 سبب افزایش تحمل نسبت به تنش اکسیداتیو شده است. تیمار براسینواستروئید بر خیار سبب تنظیم بیان ژن‌های RBOH, MAPK1, MAPK3 و ژن‌های دخیل در مقاومت و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی شده است.

ضیغمی نژاد و شریفی سیرچی (۱۳۹۲) بیان ژن PR-1 در القای مقاومت به سفیدک پودری کدو توسط سالیسیلیک اسید را بررسی کرده و گزارش کردند بیان این ژن ۱۲ ساعت بعد از تلقیح با عامل بیماری افزایش یافته و تا پایان آزمایش (۷۲ ساعت بعد از تلقیح) تداوم داشته است. پروتئین PR-1 (ضدقارچی و اومیستی) یکی از فراوان ترین گروه از پروتئین‌های PR می‌باشد. این پروتئین به طور طبیعی در گیاهان حضور داشته و در اثر حمله انواع پاتوژن‌ها و تنش‌های محیطی میزان تولید آن افزایش می‌یابد.

اسماعیل‌زاده بهابادی و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی تأثیر کیتوزان بر روی بیان ژن‌های دخیل در سیستم دفاعی گیاه در کشت سلول گیاه کتان سفید پرداختند و دریافتند که بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین که با استفاده از روش Real time PCR بررسی گردید بعد از افزودن کیتوزان افزایش یافت. بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیالیز (*PAL*)، سینامیل الکل دهیدروژناز (*CAD*)، سینامویل کوآ ردوکتاز (*CCR*) و پینورزینول لاریسی رزونول ردوکتاز (*PLR*)، در اثر تیمار با کیتوزان به ترتیب ۲، ۲/۵، ۳ و ۲/۴ برابر نسبت به شاهد افزایش داشته است.

در مطالعه حیدرزاده (۱۳۹۵) اثر فسفیت پتاسیم بر بیان ژن‌های دخیل در مقاومت در گیاه خیار تحت تنش قارچ فوزاریوم بررسی شده و این محقق دریافت که پیش تیمار فسفیت پتاسیم سبب افزایش میزان بیان ژن *PGIP* و دیفنسین نسبت به شاهد شده است.

پروتئین‌های *PGIP* از مهم‌ترین انواع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی هستند که به صورت موثر و اختصاصی به پلی گالاکتورونازهای قارچی متصل شده و از فعالیت آن‌ها جلوگیری بعمل می‌آورد. نتیجه واکنش پروتئین‌های *PGIP* و پلی گالاکتورونازهای قارچی تولید ترکیبات الیگوساکاریدی است، الیگوساکاریدهای مشتق شده از پلی ساکاریدهای مشتق شده دیواره سلولی در غلظت‌های بسیار پایین نیز نقش تحریک کنندگی در القای واکنش‌های دفاعی در گیاه ایفا می‌کند (روبرتسن، ۱۹۸۶).

فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱ محل و زمان انجام آزمایش

این پژوهش در گلخانه با شرایط کنترل شده و مجموعه آزمایشگاه‌های پژوهشکده‌ی ژنتیک و زیست فن‌آوری طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری از آذرماه سال ۱۳۹۴ انجام شد. میانگین ارتفاع آن از سطح دریا ۱۴ متر است.

۳-۲ ضدعفونی کردن محیط گلخانه

قبل از اینکه در گلخانه کشتی صورت بگیرد، ابتدا محیط آن ضدعفونی شد تا اطمینان حاصل شود که عامل بیماری‌زایی در گلخانه وجود ندارد. عمل ضدعفونی کردن با استفاده از ترکیب آب و ساوین (محتوی ۲۰ درصد ساوین) انجام‌شده و کل فضای گلخانه با آن شستشو داده شد.

۳-۳ مواد گیاهی و نحوه‌ی کشت آن‌ها

بذور خیار رقم سلطان، در مخلوط خاکی (با نسبت پیت و پرلیت ۱:۱) استریل شده توسط دستگاه اتوکلاو کاشته شد و گلدان‌ها در شرایط فتوپریود و دمای مناسب (۱۶ ساعت روشنایی و دمای °C ۲۲-۲۸) در فضای گلخانه نگهداری شدند. آبیاری و تغذیه گیاهان با محلول غذایی هوگلند به صورت دو روز یکبار صورت گرفت.



شکل ۳-۱ کشت گیاه خیار در گلدان‌های پلاستیکی در شرایط کنترل‌شده‌ی گلخانه

۳-۴ تهیه تیمارها

۳-۴-۱ تهیه فسفیت پتاسیم

جهت تهیه فسفیت پتاسیم ابتدا ۴۰ سی‌سی محلول KOH ۱۰ مولار و ۲۰ سی‌سی محلول اسید فسفرو ۵ مولار تهیه و با نسبت‌های معین باهم ترکیب شد. بدین منظور ۲۲/۴ گرم KOH را در فالدکون ریخته و توسط آب مقطر به حجم ۴۰ سی‌سی رسانده شد. سپس ۸/۲ گرم اسید فسفرو به حجم ۲۰ سی‌سی رسانده و در نهایت pH اسید فسفرو اندازه گرفته شد. با افزودن تدریجی KOH، pH محلول در دمای °C ۲۵ به ۶/۳ رسید. در نهایت فسفیت پتاسیم (KH_2PO_3) با $\text{pH} = 6/3$ جهت اسپری برگی گیاه تهیه شد.

۳-۴-۲ تهیه استوک کیتوزان

برای تهیه محلول کیتوزان از پودر کیتوزان محصول شرکت سیگما آلدریج (Sigma) ایالات متحده آمریکا استفاده شد. سطوح مختلف غلظت کیتوزان با حل کردن در محلول ۱۰ درصد استیک اسید تهیه شد. سپس pH محلول با استفاده از استات سدیم به ۵/۸ رسانده شد. تیمار مورد استفاده برای گیاهان شاهد آب مقطر بود.

۳-۴-۳ تهیه سوسپانسیون زئوسپور قارچ

تهیه سوسپانسیون زئوسپور قارچ *Phytophthora capsici* طبق روش ماسرون و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. بدین منظور، ابتدا کشت قارچ *P. capsici* با استفاده از میسلیوم بر روی محیط کشت سبزیجات V₈ (V₈ juice agar- {HIMEDIA}) انجام شد، این قارچ توسط دکتر ضیاء بنی هاشمی در دانشکده کشاورزی شیراز، با شماره کشت PH-2-19-92 جداسازی شده است. سپس ۵ قطعه ۶ میلی‌متری از کلنی‌های در حال رشد از کشت ۵ روزه قارچ برداشت شده و در یک پتری قرار داده و تا جایی که بلوک‌های حاوی قارچ در عصاره خاک غوطه‌ور شوند به آن عصاره خاک اضافه شد. بعد از

گذشت ۵ روز، پس از ایجاد یک شوک سرمایی در دمای 4°C به مدت ۳۰ دقیقه (به منظور تحریک اسپورانژیوم و آزادسازی زئوسپورها)، مایع موجود در پتری‌ها را جمع‌آوری کرده و برای اطمینان از تشکیل زئوسپور با مشاهده میکروسکوپی با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش زئوسپورها انجام شد. غلظت زئوسپور موجود در سوسپانسیون $6/54 \times 10^6$ سلول زئوسپور در میلی‌لیتر تعیین شد.



شکل ۳-۲ (الف) کشت قارچ *P. capsici* بر روی محیط کشت V8 (ب) عکس میکروسکوپی از اسپورانژیوم قارچ *P. capsici*

۳-۵ اعمال تیمارهای آزمایش

۳-۵-۱ سطوح تیماری مورد استفاده

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، شامل ۱۲ تیمار و ۳ تکرار بوده و آزمایشات به صورت گلدانی به اجرا درآمد. این ۱۲ سطح تیماری عبارت‌اند از: دو سطح فسفیت‌پتاسیم (۰ و ۴ گرم در لیتر)، سه سطح کیتوزان (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و قارچ عامل بیماری بوته میری در دو سطح (حضور و عدم حضور).

محلول‌پاشی القاگرها در مرحله ۲-۳ برگ حقیقی گیاهان با غلظت‌های ذکرشده، صورت گرفت، به‌طوری‌که تمامی سطوح برگ حقیقی به محلول‌ها آغشته شد.

۳-۶ تلقیح گیاهان با سوسپانسیون قارچ

پس از گذشت ۵ روز از محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف فسفیت‌پتاسیم و کیتوزان گیاهان با سوسپانسیون زئوسپور قارچ طبق روش ماسرون و همکاران (۱۹۹۲) تلقیح شدند. در این روش با استفاده از ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تعیین غلظت شده با لام هموسیتومتر در قسمت طوقه گیاه استفاده شد و گلدان‌ها پس از تلقیح کاملاً "غرقاب شدند. شروع زمان نمونه‌برداری بر اساس زمان تلقیح قارچ زمان‌بندی شد و تهیه نمونه برگ‌گی از تمامی گیاهان مورد آزمایش در ده زمان (۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸ روز پس از تلقیح با قارچ) صورت گرفت.

۳-۷ نمونه‌برداری و اندازه‌گیری صفات و پارامترهای مورد مطالعه

پس از پایان تلقیح قارچ، از هر تیمار ۳ تکرار جهت اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی برداشت شد. پس از تلقیح گیاهان، نمونه‌ها درون ورقه‌های آلومینیومی پیچیده شده و بلافاصله درون نیتروژن مایع غوطه‌ور شده و تا زمان اندازه‌گیری در فریزر -80°C نگهداری شدند. اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در ۱۰ زمان ذکر شده و صفات متابولیتی به صورت هفتگی صورت گرفت و در بخش مولکولی نیز تیمارهای شاهد، کیتوزان به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، فسفیت پتاسیم به غلظت ۴ گرم در لیتر و تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط عدم تلقیح و تلقیح با قارچ عامل بیماری در زمان‌های صفر، یک روز، سه روز و پنج روز پس از تلقیح مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۸ اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیک

۳-۸-۱ کلروفیل برگ‌ها

به منظور اندازه‌گیری کلروفیل a, b و کل از روش آرنون (۱۹۶۷) استفاده شد. بدین منظور کلروفیل نمونه‌ها را با استفاده از استن ۸۰ درصد استخراج نموده و سپس جذب نوری آن‌ها در طول موج‌های

۶۴۵ و ۶۴۳ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر، اندازه‌گیری شد. بدین منظور ابتدا دستگاه با استن ۸۰ درصد (شاهد) کالیبره گردید و سپس جذب نوری هر نمونه استخراج شده انجام گرفت. با استفاده از اعداد به دست آمده هر نمونه و فرمول‌های ارائه شده مقدار کلروفیل بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تازه محاسبه گردید.

$$cl\ a = \frac{((19.3 \times A_{663}) - (0.86 \times A_{645}))V}{100W} \quad \text{رابطه (۱-۳)}$$

$$cl\ b = \frac{((19.3 \times A_{645}) - (3.6 \times A_{663}))V}{100W} \quad \text{رابطه (۲-۳)}$$

(در این فرمول‌ها V حجم محلول صاف شده و W وزن تر نمونه استفاده شده و A جذب نوری در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر می‌باشد.)

۳-۸-۲ پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین از روش بیتس و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. برای سنجش پرولین، ابتدا ۰/۲ گرم از برگ وزن شد و سپس ۳ میلی لیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۳ درصد به آن اضافه و به طور کامل در هاون چینی ساییده شد. عصاره‌های حاصل در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی لیتر از عصاره‌های صاف شده را به لوله‌های درب دار منتقل نموده و به تمام لوله‌ها ۲ میلی لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسیداستیک گلاسیال اضافه شد. محلول حاصل به مدت یک ساعت در بن ماری $100^{\circ}C$ قرار داده شدند. پس از سرد کردن لوله‌ها به هر کدام ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه و لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه با استفاده از دستگاه ورتکس تکان داده شدند. پس از آن فاز روئی که به رنگ قرمز و حاوی پرولین محلول در تولوئن بوده برداشته شده و هم‌زمان با نمونه‌های استاندارد با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. غلظت پرولین بر حسب میلی گرم بر گرم بافت تازه برگ با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.

۳-۹ شاخص‌های بیوشیمیایی

۳-۹-۱ استخراج محلول آنزیمی

جهت استخراج محلول‌های آنزیمی، ۰/۵ گرم نمونه برگ با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع ساییده شده و به آن ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH=۷/۵) محتوی ۰/۵ میلی‌لیتر EDTA اضافه شد. پس از انتقال به لوله‌های آزمایش، به مدت ۱۵ دقیقه ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای °C ۴، سانتریفوژ شدند. محلول‌های یکنواخت برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به سبب پیشگیری از انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها، به ۳ قسمت تقسیم و تا زمان اندازه‌گیری در دمای °C ۲۰- نگهداری شدند (سیرم و همکاران، ۲۰۰۲).

۳-۹-۲ تعیین میزان پروتئین عصاره بافت برگ به روش برادفورد

جهت تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در بافت، میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌ها تعیین شد. به‌منظور تعیین میزان کل پروتئین در عصاره به‌دست‌آمده در آزمایش‌ها، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر عصاره از هر نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر معرف برادفورد و ۱۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر، همگن‌شده و میزان جذب آن در طول موج نانومتر ۵۹۵ با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید. برای صفر کردن دستگاه از مخلوط آب مقطر و برادفورد فاقد عصاره استفاده شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

$$Pro.s\left(\frac{mg}{gr(plant)}\right) = \frac{a * V * df}{100 * m} \quad \text{رابطه (۳-۳)}$$

a = مقدار پروتئین برگ بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر (استخراج‌شده از منحنی کالیبراسیون)،

V = حجم محلول عصاره استخراجی پروتئین

df = فاکتور رقت عصاره (ناشی از اختلاط با آب مقطر)

m = جرم تر گیاه توزین شده

از سرم آلبومین گاوی برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. مقدار دو میلی گرم پودر BSA (شرکت سیگما، آلد ریچ آمریکا) را در ۱۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر استریل حل نموده و از آن به ترتیب مقادیر ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر به ۱۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر به طور جداگانه اضافه شده و به هر کدام ۵۰۰ میکرولیتر معرف برادفورد افزوده و پس از مخلوط کردن محلول‌ها، ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بلافاصله میزان جذب در طول ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. قبل از قرائت از لوله‌ی که استوک BSA نداشت جهت صفر کردن دستگاه استفاده شد. برای هر میزان غلظت BSA سه تکرار در نظر گرفته و میانگین آن‌ها تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. با استفاده از مقادیر معلوم BSA نمودار جذب بر اساس غلظت ترسیم شد و معادله منحنی محاسبه شد (برادفورد، ۱۹۷۶). اندازه‌گیری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر BioWave مدل WPA انجام شد.

۳-۱۰ ثبت فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان

۳-۱۰-۱ سوپر اکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از روش بیاچمپ و فردوویچ (۱۹۷۱) با اندازه‌گیری توانایی آنزیم در جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلو-تترازولیوم^۱ (NBT) تعیین شد. مخلوط واکنش جهت اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شامل، ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۵۰ میلی مولار، ۳۰۰ میکرولیتر متیونین ۱۲ میلی مولار، ۳۰۰ میکرولیتر نیتروبلوتترازولیوم کلراید ۷۵ میکرو مولار، ۳۰۰ میکرولیتر ریوفلاوین ۱ میکرومولار و ۳۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است.

پس از آماده‌سازی نمونه‌ها به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، نمونه بلانک به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و نمونه‌های کنترل (شاهد) و عصاره آنزیمی، به مدت ۱۵ دقیقه، در شیکر با

¹ Nitroblue Tetrazolium

دمای °C ۲۵ و دارای دو عدد لامپ فلورسنت ۴۰ وات با دور ۱۰۰ دور در دقیقه شیک شدند. سپس میزان جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به دست آمد.

$$\text{رابطه (۳-۴)} \quad \text{SOD} = 100 - [(OD \text{ Control} - OD \text{ Sample}) / OD \text{ Control}] * 100$$

۳-۱۰-۲ کاتالاز

فعالیت این آنزیم طبق روش ابی (۱۹۸۴) اندازه گیری شد. کمپکس واکنشی شامل ۱/۵ میلی لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷)، ۰/۷۵ میلی لیتر پر اکسید هیدروژن ۳ درصد و ۷۵ میکرولیتر محلول آنزیمی می باشد. با افزودن پر اکسید هیدروژن واکنش آغاز و کاهش جذب نمونه ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیمی از محاسبه میزان پر اکسید هیدروژن تجزیه شده توسط آنزیم محاسبه گردید.

$$\text{رابطه (۳-۵)} \quad \text{cat} \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{\Delta A * l * V_t * df}{\epsilon * b * t * V_s}$$

ΔA = تغییرات جذب کمپلکس واکنش در مدت زمان t دقیقه

l = ضریب پر اکسید هیدروژن در واکنش با آنزیم کاتالاز (برابر با ۱)

V_t = حجم کل کمپلکس واکنش (حاوی عصاره آنزیمی، بافر و پر اکسید هیدروژن) بر حسب میکرولیتر = ۷۵ (عصاره آنزیمی)، ۱۵۰۰ (بافر فسفات) و ۷۵۰ (پر اکسید هیدروژن)

ϵ = ضریب خاموشی پر اکسید هیدروژن ($0.28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

b = طول کوت دستگاه اسپکتروفتومتر بر سانتی متر (۱ سانتی متر)

t = مدت زمان اندازه گیری تغییرات جذب بر حسب دقیقه (۱ دقیقه)

V_s = حجم عصاره آنزیمی بر حسب میکرولیتر (۷۵ میکرولیتر)

m = جرم تر گیاه بر حسب میلی گرم (۲۰۰ میلی گرم یا ۰/۲ گرم)

U = واحد فعالیت آنزیم

V_b = حجم بافر جهت استخراج عصاره آنزیمی بر حسب میکرولیتر

۳-۱۰-۳ گایاکول پراکسیداز

مخلوط واکنش شامل ۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷) حاوی EDTA ۰/۱ میلی مولار، ۷۰۰ میکرولیتر گایاکول ۵ میلی مولار، ۷۰۰ میکرولیتر پر اکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده است. واکنش با اضافه کردن پر اکسید هیدروژن شروع شده و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی بر اساس میزان تترایاکول تشکیل شده و با استفاده از ضریب خاموشی $1/\text{cm} \cdot \mu\text{mol} \cdot 10^3$ به دست آمد (نانگ و نیوتن، ۲۰۰۵).

۳-۱۰-۴ آسکورات پراکسیداز

مخلوط واکنش شامل ۵۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۷۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۴ میلی مولار، ۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، ۷۰۰ میکرولیتر پر اکسید هیدروژن ۱۰ میلی مولار، ۷۰۰ میکرولیتر آسکورات ۱ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. جذب مخلوط واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی ۲/۸ میلی مول بر سانتی متر، میزان فعالیت آنزیم محاسبه شد (سیرم و همکاران، ۲۰۰۲).

۳-۱۱ بررسی های متابولیتی

۳-۱۱-۱ مالون دآلدئید

این شاخص بر اساس روش استوارت و بولی (۱۹۸۰) اندازه گیری شد. در حدود ۰/۵ گرم از نمونه برگی در ۱۰ میلی لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید یکنواخت شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. ۲ میلی لیتر از سوپرناتانت حاصل با ۴ میلی لیتر از محلول ۲۰ درصد تری کلرواستیک اسید محتوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت

۳۰ دقیقه در بن ماری با دمای °C ۹۵ نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل گردید. در مرحله‌ی بعد نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسید شدن لیپیدها از اختلاف بین طول‌موج‌های جذبی در ضریب خاموشی ۱۵۵ میکرو مول بر سانتی‌متر به دست آمد.

$$\text{MDA (nmol.g FW}^{-1}\text{)} = [(E_{532}-E_{600}) \times 155] \times 5 \quad \text{رابطه (۳-۶)}$$

۳-۱۱-۲ پراکسید هیدروژن

ابتدا به ۰/۵ گرم نمونه برگ‌ی ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید (وزنی-حجمی) اضافه کرده و در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس کمپلکس واکنش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رونشین، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و یک میلی‌لیتر KI یک مولار تهیه و میزان جذب آن‌ها در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر سنجش گردید. میزان پراکسید هیدروژن با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد (سرجیف و همکاران، ۱۹۹۷).

$$Y \text{ (nmol.g FW}^{-1}\text{)} = \{ (0.532x + 0.43) \times 5 \} \quad \text{رابطه (۳-۷)}$$

۳-۱۱-۳ آنتوسیانین

برای سنجش آنتوسیانین، ۰/۲ گرم از نمونه برگ‌ی گیاه را در ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل متانول و اسیدکلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱) خوب ساییده و سپس عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. محلول روئی پس از صاف شدن به مدت یک‌شب در تاریکی قرار داده شد و جذب آن در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول استفاده شد (موسیوکاسیو و همکاران، ۲۰۰۳).

۳-۱۲ آنالیز داده‌ها

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel صورت گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال موردنظر استفاده شد.

۳-۱۳ بررسی بیان ژن با دستگاه Real-Time PCR

۳-۱۳-۱ استخراج RNA

استخراج RNA از نمونه‌های نگهداری شده در فریزر -80°C با استفاده از محلول RNX-Plus محصول شرکت سیناکلون مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

۳-۱۳-۲ تیمار RNA با آنزیم DNase

به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی DNA از RNA، از کیت DNase I, RNase-free شرکت فرمنتاز استفاده شد.

مواد زیر به تیوب RNase-free اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 37°C در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد.

جدول ۳-۱ ترکیبات واکنش تیمار RNA با آنزیم DNase I

ماده	حجم موردنیاز برای یک واکنش (میکرولیت)
RNA	۱۰
بافر آنزیم DNase I	۲
آنزیم DNase I	۲
آب تیمار شده با DEPC	۶-۱
جمع	۲۰

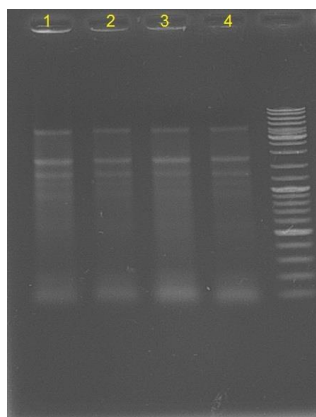
جهت غیرفعال سازی فعالیت آنزیم DNase I، مقدار ۱ µl محلول EDTA ۵۰ میلی مولار به تیوب افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۶۵ °C انکوبه شد.

۳-۱۳-۳ بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده

تعیین کیفیت RNA استخراجی از دو روش ژل آگارز و اسپکتروفتومتری انجام شد.

۳-۱۳-۳-۱ تعیین کیفیت RNA استخراجی بر روی ژل آگارز

تعیین کیفیت RNA استخراجی بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TAE 1X صورت گرفت. نمونه های RNA استخراج شده پس از مخلوط شدن با بافر بارگذاری در چاهک ها ریخته شد و سپس ژل مزبور مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. پس از پایان الکتروفورز ژل در محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و پس از شستشو با آب مقطر در زیر نور ماوراءبنفش در دستگاه ژل خوان مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۳-۳ نمونه های RNA استخراجی چاهک: ۱، ۲، ۳ و ۴ استخراج از نمونه های مختلف بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد

۳-۱۳-۳-۲ تعیین کیفیت RNA استخراجی توسط اسپکتروفتومتری

برای این منظور ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر با آب DEPC (استاندارد) صفر شد. سپس RNA استخراج شده با رقت مناسب به کوت کوارتری اضافه و همگن گردید. نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ اندازه گیری شد.

چنانچه RNA با محلول RNX-plus استخراج شده بالاترین مقدار نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ باید بین ۱/۶-۱/۹ باشد. مقادیر کمتر از ۱/۶ نمایانگر وجود پروتئین و یا دیگر جذب کننده های اشعه ماورای بنفش است. مقدار نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۳۰ میزان آلودگی به مواد فنلی و پلی ساکاریدی را نشان می دهد.

۳-۱۳-۳ تعیین کمیت RNA استخراجی توسط اسپکتروفتومتری

برای تعیین مقدار RNA ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر را با ۱۹۵ میکرولیتر آب مقطر استاندارد نموده و سپس ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده از برگ به کووت دستگاه تزریق و همگن شد. میزان جذب در طول موج نانومتر ۲۶۰ اندازه گیری شد.

$$X_{ng/\mu l} = OD_{260} \times 50 \quad \text{رابطه (۳-۸)}$$

۳-۱۳-۴ سنتز رشته ی اول cDNA از RNA کل

رشته اول cDNA با استفاده از کیت شرکت فرمانتاز (RevertAid™ First Str& cDNA Synthesis kit) با روش سنتز cDNA دو مرحله ای ساخته شد. واکنش مربوطه به شرح زیر انجام شد:

مقدار ۵ میکروگرم از RNA استخراج شده بر روی یخ با ۱ میکرولیتر آغازگر Oligo(dt)₁₈ مخلوط شده و حجم کل با آب فاقد RNase به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط به آرامی به هم زده شد و به مدت چند ثانیه سانتریفوژ کوتاه گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۶۵ °C انکوبه شد. پس از زمان انکوباسیون، تیوب ها به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شدند و پس از آن مواد لازم طبق جدول زیر به هر تیوب اضافه گردید (جدول ۳-۲).

جدول ۳-۲ ترکیبات واکنش ساخت رشته اول cDNA

غلظت ماده	برای هر واکنش (میکرولیتر)	ماده
۵X	۴	Buffer Reverse Transcriptase
۱۰ Mm	۲	DNTPmix
-	۱	Ribolock RNase Inhibitor
-	۱	M-MUL V Reverse Transcriptase
-	۱۲	ترکیب RNA و پرایمر
-	۲۰	جمع

محلول فوق چند ثانیه spin شد و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس قرار داده شد. برای غیرفعال کردن آنزیم مخلوط واکنش، به مدت ۵ دقیقه در ۷۲°C نگهداری شد. سپس نمونه‌ها روی یخ قرار داده شدند و تا زمان ادامه آزمایش در فریزر ۳۰°C- نگهداری شدند.

۳-۱۳-۵ طراحی آغازگرها جهت استفاده در Quantitative Real- Time PCR

در این آزمایش ابتدا توالی ژن رفرنس (اکتین) و ژن‌های مورد مطالعه موجود از پایگاه اینترنتی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) استخراج شده و سپس آغازگرها به وسیله نرم‌افزارهای BioEdit و 7.0.9.0 و OligoExplorer V1.7 طراحی شدند (جدول ۳-۳). آغازگرهای مورد استفاده به سفارش شرکت فزا پژوه و تکاپوزیست سنتز شدند.

جدول ۳-۳ توالی پرایمرهای استفاده شده برای آنالیز بیان با تکنیک Real-Time PCR

نام پرایمر	5'→3' توالی	Tm	طول قطعه تکثیر
Gpx (F)	GTTCTTCGCTTATCGCCTCGT	۶۰	۱۰۱
Gpx (R)	TCCTTTAGCATCCTTGACGGTG	۶۰	
TLP (F)	ATGAAGGCAAAGGCTCGTGTGA	۶۰	۱۲۰
TLP (R)	AGGGTGACATAGATGATCCCAG	۶۰	
RBOH (F)	CAGGCTACAAAACAGTGAGGAT	۵۸	۱۳۹
RBOH (R)	AAGGGAGAGATAGCAGAACAGT	۵۸	
HPL (F)	ACCAAATACAACCTCCACCGTCT	۵۹	۱۰۴
HPL (R)	ATGGGAAAACCTGAGGGCATCG	۶۰	
HIR (F)	GTTGTTGAGCCAGGATGCCA	۶۰	۱۷۱
HIR (R)	TGCTTTATCCGCCAGTGCTC	۶۰	
PR-4 (F)	AGGGTATTTCCGGTAGAGGAC	۵۵	۱۸۵
PR-4 (R)	CGAAGCCCTGGTTGATGAC	۵۸	
Actin (F)	GATTCTGGTGATGGTGTGAGTC	۶۰	۱۵۵
Actin (R)	TCGGCAGTGGTGGTGAACAT	۶۰	

۳-۱۳-۶ بهینه سازی شرایط واکنش Real-Time PCR

واکنش زنجیره ای پلی مرز کمی با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green I در دستگاه C1000™ Thermal Cycler (BioRad) انجام شد. کیت مورد استفاده برای بررسی بیان ژن Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master™ Mix (2X) "از شرکت فرمنتاس (Cat. No: K0221) خریداری گردید. ابتدا پرایمرهایی با غلظت ۱۰ پیکومول تهیه کرده، سپس Master Mix، پرایمرها و آب تیمار شده با DEPC به دمای محیط رسانیده و بعد از یک سانتریفوژ کوتاه (short spin) آماده استفاده شدند. استریپ های (تیوب های ۱۰۰ میکرولیتری متصل به هم) مخصوص دستگاه فوق بر روی یخ زیر هود بیولوژیک قرار داده و طبق جدول (۳-۴) مواد به هر استریپ اضافه شد. پس از آماده سازی مخلوط واکنش، استریپ ها را در دستگاه قرار داده و PCR طبق برنامه دمایی زیر انجام شد (جدول ۳-۵). برای جلوگیری از بروز خطاهای احتمالی در هنگام برداشت مقادیر کم مواد و نیز برای راحتی و

سرعت عمل بیشتر، اقدام به تهیه محلول‌های پایه گردید. در این آزمایش برای هر نمونه ۳ تکرار تکنیکی و برای کنترل منفی از آب عاری از نوکلئاز استفاده شد.

جدول ۳-۴ شرایط بهینه برای اجرای واکنش‌های Real-Time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر

ماده	حجم موردنیاز برای یک واکنش (میکرولیتر)
2X Real-Time PCR Master Mix	۶/۲۵
آغازگر رفت (۱۰ میکرومولار)	۰/۱۵
آغازگر برگشت (۱۰ میکرومولار)	۰/۱۵
نمونه cDNA	۲
آب عاری از نوکلئاز	۳/۹۵

جدول ۳-۵ برنامه دمایی Real-Time PCR

سیکل	مرحله واکنش	دما (°C)	زمان
اول	فعال‌سازی و واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۱۰ دقیقه
دوم (۴۰ تکرار)	واسرشته‌سازی	۹۵	۱۵ ثانیه
	اتصال و بسط	۶۰	۶۰ ثانیه

۳-۱۴ تحلیل داده‌های Real-Time PCR

نرخ بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen) اندازه‌گیری شد. در ابتدا میانگین سیکل آستانه تکرارهای هر ژن محاسبه شد. میانگین Ct ژن هدف از میانگین Ct ژن خانه‌دار اکتین (Actin) کم شده و شاخص ΔCt به دست آمد. سپس ΔCt زمان صفر برای نرمال‌سازی سایر زمان‌ها استفاده گردید.

$$\Delta Ct_{\text{sample}} = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{actin}} \quad \text{رابطه (۳-۹)}$$

$$\Delta Ct_{\text{calibrator}} = Ct_{(\text{target, calibrator})} - Ct_{(\text{actin, calibrator})} \quad \text{رابطه (۳-۱۰)}$$

سپس ΔCt نمونه به ΔCt کالیبراتور نرمال‌سازی شد.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}} \quad \text{رابطه (۳-۱۱)}$$

در انتها بیان ژن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال موردنظر استفاده شد.

فصل چہارم

نتیجہ و بحث

۱-۴ بررسی فیزیولوژیکی

۱-۱-۴ بررسی تغییرات فیزیولوژیکی گیاهان خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم

و کیتوزان تحت تنش قارچ *Phytophthora capsici* در زمان های مختلف

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها جدول (۱-۴) نشان داد که تمام آثار متقابل فاکتورهای زمان، قارچ *P. capsici*، فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر روی میزان کلروفیل و پرولین در برگ گیاه خیار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. اثر اصلی قارچ *P. capsici* بر روی میزان کلروفیل a و کلروفیل کل معنی‌دار نبود.

جدول ۱-۴ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات صفات کلروفیل a، b، کلروفیل کل و پرولین

میانگین مربعات				درجه آزادی (df)	منابع تغییرات
پرولین	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a		
۰/۰۰۶۵**	۶۰/۰۷۹**	۴/۰۷۲**	۳۳/۴۰۵**	۹	زمان (T)
۰/۰۱۰۹**	۰/۱۳۸ ^{ns}	۰/۰۱۰**	۰/۲۲۶ ^{ns}	۱	قارچ (F)
۰/۰۰۳۴**	۱۳۲/۹۶۰**	۷/۲۸۱**	۷۸/۰۱۰**	۱	فسفیت (P)
۰/۰۰۰۶**	۲۹/۰۰۹**	۱/۹۶۷**	۱۶/۰۰**	۲	کیتوزان (K)
۰/۰۰۲۰**	۱۲/۸۵۱**	۰/۶۵۱**	۷/۸۱۸**	۱۹	زمان × قارچ
۰/۰۰۱۰**	۶/۰۸۳**	۰/۳۱۶**	۳/۶۷۰**	۱۹	زمان × فسفیت
۰/۰۰۰۳**	۱۰/۷۳۸**	۰/۷۵۵**	۵/۹۶۵**	۲۹	زمان × کیتوزان
۰/۰۰۰۷**	۳/۱۱۸**	۰/۱۱۳*	۲/۰۴۳**	۳	قارچ × فسفیت
۰/۰۰۰۷**	۴/۵۷۸**	۰/۱۹۴**	۳/۰۰۲**	۵	قارچ × کیتوزان
۰/۰۰۰۳**	۱۷/۶۳۳**	۰/۸۷۱**	۱۰/۷۰۹**	۵	فسفیت × کیتوزان
۰/۰۰۰۲**	۹/۱۶۷**	۰/۵۵۲**	۵/۳۳۴**	۳۹	زمان × قارچ × فسفیت
۰/۰۰۰۳**	۹/۲۰۹**	۰/۳۸۵**	۶/۰۳۰**	۵۹	زمان × قارچ × کیتوزان
۰/۰۰۰۲**	۱۵/۸۰۸**	۰/۴۸۱**	۱۰/۷۷۵**	۱۱	قارچ × فسفیت × کیتوزان
۰/۰۰۰۳**	۳/۹۴۰**	۰/۲۹۸**	۲/۱۵۱**	۵۹	زمان × فسفیت × کیتوزان
۰/۰۰۰۳**	۴/۶۲۶**	۰/۲۴۱**	۲/۸۱۱**	۱۱۹	زمان × قارچ × فسفیت × کیتوزان
۰/۹۹۴۶	۰/۹۶۸	۰/۹۵۵۵	۰/۹۵۵۸	۲۴۰	خطا
۱/۹۴۱	۸/۱۸۰	۱۰/۲۰۲	۹/۷۴۱		ضریب تغییرات

** و ^{ns} معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

۴-۱-۱-۱ میزان کلروفیل

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها برای اثر متقابل فاکتورهای مورد بررسی نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل a ($8/42 \mu\text{g/ml}$) مربوط به تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در روز چهاردهم، بیشترین میزان کلروفیل b ($2/72 \mu\text{g/ml}$) و کلروفیل کل ($\mu\text{g/ml}$) ۱۱/۱۳ مربوط به تیمار شاهد در زمان صفر (بدون القاگر و تلقیح با قارچ) است و همچنین کمترین میزان کلروفیل a ($1/60 \mu\text{g/ml}$)، کلروفیل b ($0/49 \mu\text{g/ml}$) و کلروفیل کل ($2/10 \mu\text{g/ml}$) مربوط به تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در روز بیست و هشتم می‌باشد (جدول ۴-۲).

جدول ۴-۲ (الف) مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان کلروفیل a ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱	روز ۲۸
شاهد		۸/۴۱	۶/۰۶	۴/۳۷	۲/۵۳	۶/۳۴	۵/۳۴	۶/۹۱	۲/۶۶	۴/۵۲	۵/۹۶
کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۴/۵۷	۷/۰۷	۳/۷۵	۳/۹۵	۳/۸	۵/۳۸	۴/۶۸	۷/۴۷	۵/۹۴	۴/۶۷
کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۲/۳۳	۶/۶۱	۴/۵۵	۳/۰۷	۳/۸	۲/۹۳	۴/۳۳	۵/۶۲	۴/۷۴	۲/۴۶
فسفیت پتاسیم (۴ g/l)		۵/۶۷	۳/۷۰	۲/۷۶	۳/۲۲	۳/۲۹	۳/۶۸	۷/۷۵	۴/۲۲	۳/۴۷	۲/۵۳
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۲/۳۹	۴/۳۲	۲/۹۱	۱/۷۴	۲/۰۶	۲/۳۷	۶/۲۸	۸/۴۲	۳/۹۱	۱/۶۵
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۳/۹۱	۳/۵۶	۱/۷۲	۲/۳۹	۳/۵۶	۳/۶۵	۳/۷۸	۷/۱۸	۴/۶۷	۱/۶۰
قارچ <i>P. capsici</i>		۶/۷۱	۲/۶۸	۳/۸۵	۳/۸۶	۴/۵۸	۶/۵	۴/۴۶	۶/۸۱	۳/۲۱	۲/۹۸
کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۶/۴۰	۵/۰۲	۳/۷۶	۴/۵۳	۵/۴۷	۵/۳۹	۵/۲۰	۶/۱۲	۲/۸۱	۴/۵۳
کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۵/۱۷	۵/۴۱	۳/۱۵	۳/۲۶	۵/۶۷	۶/۲۶	۷/۴۹	۵/۰۹	۳/۳۷	۲/۰۸
فسفیت (۴ g/l) + قارچ		۵/۷۹	۶/۳۰	۳/۰۷	۳/۰۴	۶/۴۸	۶/۲۶	۶/۱۶	۶/۲۲	۳/۰۷	۲/۸۵
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۳/۴۱	۲/۳۷	۲/۳۵	۳/۵۶	۴/۶۸	۳/۲۸	۳/۴۴	۵/۱۴	۲/۱۵	۲/۵۶
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۲/۳۵	۴/۲۲	۳/۸۹	۲/۳۱	۳/۷۰	۴/۵۱	۴/۸۷	۵/۱۴	۳/۰۴	۲/۴۴

LSD_{5%}: ۰/۶۷ ، LSD_{1%}: ۰/۸۹

جدول ۴-۲ (ب) مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان کلروفیل b ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱	روز ۲۸
شاهد	۲/۷۲	۱/۸۳	۱/۲۳	۰/۷۹	۱/۸	۱/۶۲	۲/۲	۰/۸۷	۱/۲۹	۱/۷۳	
کیتوزان (۱۰۰ mg/l)	۱/۵۲	۲/۱۶	۱/۰۸	۱/۱۷	۱/۱	۱/۶۶	۱/۴۵	۲/۲۳	۱/۷۰	۱/۳۸	
کیتوزان (۲۰۰ mg/l)	۰/۸۴	۱/۹۰	۱/۳۳	۰/۹۶	۱/۱۴	۰/۹۶	۲/۳۵	۱/۷۲	۱/۲۸	۰/۷۰	
فسفیت پتاسیم (۴ g/l)	۲/۱۳	۱/۰۳	۰/۸۷	۱/۰۲	۰/۹۸	۱/۱۷	۲/۶۱	۱/۴۷	۰/۹۷	۰/۷۳	
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l)	۰/۸۱	۱/۲۱	۰/۸۷	۰/۶۱	۰/۶۷	۰/۷۵	۱/۷۶	۲/۵۹	۱/۲۱	۰/۴۹	
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l)	۱/۲۰	۱/۰۰	۰/۵۸	۰/۷۵	۱/۰۶	۱/۰۵	۱/۶۷	۲/۰۴	۱/۳۳	۰/۴۹	
قارچ <i>P. capsici</i>	۲/۴۲	۰/۷۹	۱/۱۹	۱/۲۵	۱/۴۶	۱/۸۹	۱/۵۱	۲/۱۷	۱/۰۱	۰/۹۷	
کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ	۱/۹۳	۱/۴۶	۱/۱۳	۱/۴۲	۱/۵۳	۱/۵۴	۱/۷۰	۱/۸۱	۰/۸۳	۱/۲۶	
کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ	۱/۴۵	۱/۵۵	۰/۹۱	۱/۰۷	۱/۶۱	۱/۹۵	۲/۳۳	۱/۵۹	۱/۰۴	۰/۵۹	
فسفیت (۴ g/l) + قارچ	۱/۷۳	۱/۸۸	۰/۹۳	۰/۹۵	۱/۸۱	۱/۷۶	۲/۵۸	۱/۷۴	۰/۹۹	۰/۷۸	
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ	۰/۹۱	۰/۷۲	۰/۷۸	۱/۱۳	۱/۴۵	۱/۰۴	۱/۰۳	۱/۳۲	۰/۶۲	۰/۷۴	
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ	۰/۶۵	۱/۲۱	۱/۲۸	۰/۷۳	۱/۱۶	۱/۴۱	۱/۵۵	۱/۴۴	۰/۸۲	۰/۷۰	

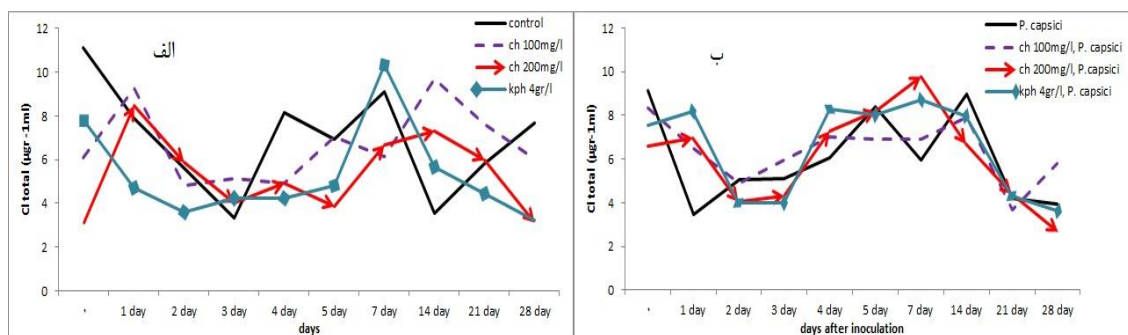
LSD_{5%}: ۰/۲۱ ، LSD_{1%}: ۰/۲۸

جدول ۴-۲ (ج) مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان کلروفیل کل ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱	روز ۲۸
شاهد		۱۱/۱۳	۷/۹۰	۵/۶۰	۳/۳۳	۸/۱۴	۶/۹۶	۹/۱۲	۳/۵۳	۵/۸۱	۷/۶۹
کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۶/۰۹	۹/۲۴	۴/۸۴	۵/۱۳	۴/۹۱	۷/۰۴	۶/۱۳	۹/۷۰	۷/۶۵	۶/۰۶
کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۳/۱۸	۸/۵۲	۵/۸۹	۴/۰۳	۴/۹۵	۳/۹۰	۶/۶۸	۷/۳۵	۶/۰۳	۳/۱۷
فسفیت پتاسیم (۴ g/l)		۷/۸۱	۴/۷۴	۳/۶۴	۴/۲۵	۴/۲۸	۴/۸۶	۱۰/۳۷	۵/۶۹	۴/۴۵	۳/۲۷
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۳/۲۰	۵/۵۳	۳/۷۸	۲/۳۵	۲/۷۴	۳/۱۳	۸/۰۵	۱۱/۰۲	۵/۱۳	۲/۱۴
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۵/۱۱	۴/۵۶	۲/۳۱	۳/۱۵	۴/۶۲	۴/۷۱	۵/۴۵	۹/۲۲	۶/۰۱	۲/۱۰
قارچ <i>P. capsici</i>		۹/۱۴	۳/۴۸	۵/۰۴	۵/۱۲	۶/۰۵	۸/۳۹	۵/۹۷	۸/۹۸	۴/۲۲	۳/۹۵
کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۸/۳۳	۶/۴۸	۴/۸۹	۵/۹۵	۷/۰۰	۶/۹۳	۶/۹۱	۷/۹۳	۳/۶۵	۵/۷۹
کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۶/۶۳	۶/۹۶	۴/۰۷	۳۳	۷/۲۸	۸/۲۱	۹/۸۲	۶/۶۹	۴/۴۱	۲/۶۸
فسفیت (۴ g/l) + قارچ		۷/۵۲	۸/۱۹	۴/۰۱	۴/۰۰	۸/۳۰	۸/۰۲	۸/۷۴	۷/۹۷	۴/۲۹	۳/۶۳
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۴/۳۲	۳/۱۰	۳/۱۳	۴/۶۹	۶/۱۴	۴/۳۲	۴/۴۸	۵/۹۹	۲/۷۷	۳/۲۷
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۳/۰۱	۵/۴۴	۵/۱۷	۳/۰۵	۴/۸۶	۵/۹۲	۶/۴۳	۶/۵۹	۳/۸۷	۳/۱۵

LSD_{5%}: ۰/۷۴ ، LSD_{1%}: ۰/۹۷

طبق نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین بیشترین مقدار کلروفیل کل، مربوط به تیمار شاهد در زمان صفر بوده است درحالی که تیمار گیاهان با فسفیت پتاسیم بر میزان کلروفیل کل برگ تاثیر گذاشته و در روز هفتم سبب افزایش آن شده است (شکل ۴-۱). محققان در پژوهشی اثر فسفیت را به عنوان پیش تیمار بر برگ های سیب زمینی قبل از تنش ماوراءبنفش بررسی کردند و دریافتند که فسفیت پتاسیم سبب افزایش پارامترهای فتوسنتزی مانند میزان کلروفیل برگ ها و بیان ژن psb A شده است (اویارورو و همکاران، ۲۰۱۵). نتایج این محققان با یافته های حاصل از مطالعه حاضر در زمینه افزایش میزان کلروفیل بر اثر پیش تیمار فسفیت پتاسیم هم سو می باشد.



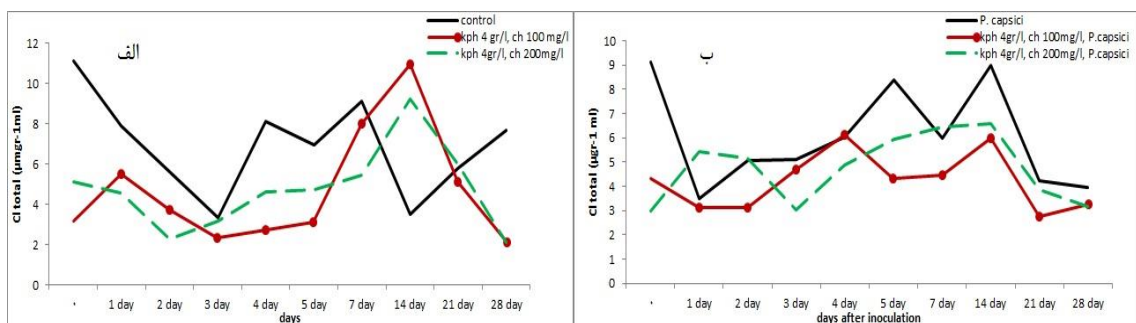
شکل ۴-۱ روند تغییرات کلروفیل کل در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ *P. capsici* (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

همان گونه که در شکل ۴-۱ مشاهده می گردد در شرایط عدم آلودگی با قارچ، افزایش میزان کلروفیل موجود در برگ تحت تاثیر محلول پاشی کیتوزان در روز اول رخ داده است و پس از یک دوره کاهش در روز چهاردهم نیز در بالاترین حد خود قرار دارد. محققان با بررسی تاثیر کیتوزان بر خصوصیات رشدی و محتوای کلروفیل گیاه لوبیا دریافتند که کیتوزان با تاثیر مثبت بر دو عامل میزان کلروفیل و شاخص سطح برگ سبب افزایش آن ها می شود. این دو عامل مستقیماً موجب افزایش فتوسنتز شده و در نهایت سبب بهبود بهره وری و افزایش وزن خشک گیاه می شوند (شیخی و الملکی، ۲۰۱۱).

با توجه به شکل ۴-۱ که نشان دهنده روند تغییرات محتوای کلروفیل کل می باشد، می توان دریافت که پیش تیمار کیتوزان در گیاهان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان کلروفیل تاثیر داشته و غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آن پس از گذشت ۷ روز از تلقیح عامل بیماری سبب افزایش مقدار

کلروفیل برگ شده است. در بیوپلیمر کیتوزان فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌ها و قارچ‌ها مشاهده شده است. فرض بر این است که کیتوزان نفوذپذیری غشاء پلاسمایی را تغییر داده و با تقویت تنش اکسیداتیو در برابر قارچ‌های بیماری‌زا سبب مقاومت گیاه می‌شود (گارسیا و همکاران، ۲۰۱۴).

از طرفی در شکل ۲-۴ مشاهده می‌شود که در شرایط عدم تلقیح، استفاده توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان به تدریج و با گذشت ۱۴ روز سبب افزایش قابل توجه میزان کلروفیل کل شده است. در حالی که همین تیمار در گیاه آلوده به عامل بیماری تغییر محسوسی در میزان کلروفیل ایجاد نکرده است. در مطالعه باوانی و همکاران (۱۹۹۸) محتوای کلروفیل کل در گیاهان آلوده به ویروس برگ‌های آفتابگردان نسبت به گیاهان سالم کاهش یافته بود. علت تغییر مشاهده شده در نسبت کلروفیل را می‌توان حضور ویروس و تعاملات مختلف میزبان- ویروس دانست.



شکل ۲-۴ روند تغییرات کلروفیل کل در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

۴-۱-۱-۲ میزان پرولین

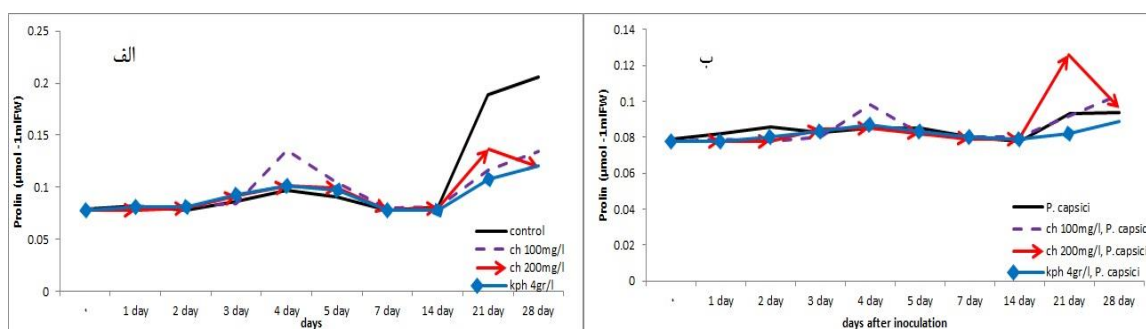
نتایج مقایسه میانگین داده‌ها برای تمامی آثار متقابل فاکتورهای مورد بررسی نشان داد که بیشترین مقدار پرولین ($0/206 \mu\text{mol/mg FW}$) مربوط به تیمار شاهد (بدون القاگر و عدم تلقیح با قارچ) در روز بیست و هشتم پس از آلودگی و کمترین مقدار پرولین ($0/78 \mu\text{mol/mg FW}$) مربوط به تیمار همزمان فسفیت و کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تحت تنش قارچ *P. capsici* در روز چهاردهم پس از آلودگی می‌باشد (جدول ۳-۴).

جدول ۳-۴ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان پرولین ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{FW}$) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱	روز ۲۸
شاهد		۰/۰۷۹	۰/۰۸۲	۰/۰۷۸	۰/۰۸۷	۰/۰۹۷	۰/۰۹۱	۰/۰۷۸	۰/۰۸۱	۰/۱۸۹	۰/۲۰۶
کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۰/۰۷۹	۰/۰۸۰	۰/۰۸۲	۰/۰۸۴	۰/۱۳۵	۰/۱۰۵	۰/۰۸۰	۰/۰۸۱	۰/۱۱۶	۰/۱۳۴
کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۰/۰۷۸	۰/۰۷۹	۰/۰۸۰	۰/۰۹۱	۰/۱۰۱	۰/۰۹۹	۰/۰۷۹	۰/۰۸۰	۰/۱۳۶	۰/۱۱۹
فسفیت پتاسیم (۴ g/l)		۰/۰۷۹	۰/۰۸۱	۰/۰۸۱	۰/۰۹۳	۰/۱۰۱	۰/۰۹۷	۰/۰۷۹	۰/۰۷۸	۰/۱۰۸	۰/۱۲۱
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۰/۰۷۸	۰/۰۷۹	۰/۰۷۸	۰/۰۹۱	۰/۰۹۹	۰/۰۹۳	۰/۰۷۹	۰/۰۸۲	۰/۱۲۷	۰/۱۳۳
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۰/۰۸۰	۰/۰۷۹	۰/۰۷۹	۰/۰۸۷	۰/۰۹۳	۰/۰۸۸	۰/۰۷۹	۰/۰۷۹	۰/۰۹۵	۰/۰۹۴
قارچ <i>P. capsici</i>		۰/۰۷۹	۰/۰۸۲	۰/۰۸۶	۰/۰۸۳	۰/۰۸۵	۰/۰۸۵	۰/۰۸۰	۰/۰۷۸	۰/۰۹۳	۰/۰۹۴
کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۰/۰۷۸	۰/۰۷۹	۰/۰۷۸	۰/۰۸۰	۰/۰۹۸	۰/۰۸۲	۰/۰۸۰	۰/۰۸۰	۰/۰۹۲	۰/۱۰۴
کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۰/۰۷۸	۰/۰۷۸	۰/۰۷۸	۰/۰۷۸	۰/۰۸۴	۰/۰۸۵	۰/۰۷۹	۰/۰۷۹	۰/۱۲۶	۰/۰۹۶
فسفیت (۴ g/l) + قارچ		۰/۰۷۸	۰/۰۷۸	۰/۰۸۰	۰/۰۸۳	۰/۰۸۷	۰/۰۸۳	۰/۰۸۰	۰/۰۷۹	۰/۰۸۲	۰/۰۸۹
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۰/۰۸۰	۰/۰۷۹	۰/۰۷۹	۰/۰۸۲	۰/۰۸۴	۰/۰۸۴	۰/۰۷۹	۰/۰۷۹	۰/۰۹۱	۰/۰۸۸
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۰/۰۷۸	۰/۰۸۲	۰/۰۷۸	۰/۰۸۲	۰/۰۸۲	۰/۰۸۳	۰/۰۷۹	۰/۰۷۸	۰/۰۸۳	۰/۰۸۴

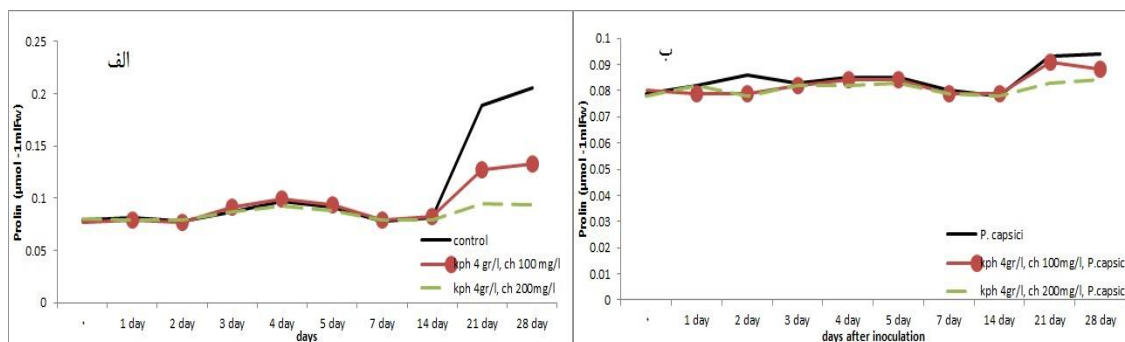
LSD_{5%}: ۰/۰۰۲۸ ، LSD_{1%}: ۰/۰۰۳۷

همان‌طور که در شکل ۳-۴ مشاهده می‌شود در حالی که محتوای پرولین در تیمارهای شاهد، فسفیت پتاسیم و غلظت‌های مختلف کیتوزان در هر دو شرایط عدم آلودگی و تحت تنش قارچ *P. capsici* در روزهای ابتدایی تفاوت چندانی باهم نداشته است اما به تدریج و با گذشت زمان مقدار پرولین در تمامی تیمارها افزایش یافت. قبلاً گزارش شده بود که پرولین یک اسید آمینه‌ی پروتئوژنیک بوده و در گیاهان در هر دو شرایط تنش و بدون تنش به‌عنوان یک املاح مفید محسوب شده و نقش مهمی را در رشد و تمایز گیاه در کل طول دوره رشدی را بر عهده دارد. حتی زمانی که گیاهان در شرایط نرمال فیزیولوژیکی قرار دارند تجمع مقدار زیادی پرولین در طول مرحله‌ی گل‌دهی در آن‌ها رخ می‌دهد که این تجمع پرولین در گیاه یک پدیده طبیعی است (کاوی کیشور و همکاران، ۲۰۱۵).



شکل ۳-۴ روند تغییرات مقدار پرولین در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ *P. capsici* (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

محلول‌پاشی کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پس از گذشت ۴ روز در گیاهان سالم و آلوده به عامل بیماری، سبب افزایش مقدار پرولین شده است. مهدوی و همکاران (۲۰۱۱) اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان را بر خصوصیات مختلف گیاه گلرنگ تحت تنش خشکی بررسی کردند و پس از اندازه‌گیری پرولین دریافتند که تیمار با کیتوزان سبب افزایش مقدار پرولین نسبت به شاهد شده است.



شکل ۴-۴ روند تغییرات مقدار پرولین در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

با توجه به اینکه گیاهان خیار در طول مدت این آزمایش در هفته سوم مرحله گل‌دهی را پشت سر گذاشتند احتمالاً علت تجمع بیشترین مقدار پرولین در نمونه شاهد و در روز پایانی آزمایش، عبور گیاهان از مرحله گل‌دهی است.

۴-۲ بررسی‌های آنزیمی و بیوشیمیایی

۴-۲-۱ اثر فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ *Phytophthora capsici*

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴-۴) نشان داد که تمامی اثر متقابل‌های فاکتورهای زمان، قارچ *P. capsici*، فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر روی میزان فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در برگ‌های گیاهان خیار در سطح احتمال ۱ درصد و اثر قارچ بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، اثر کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار نبود. اثر اصلی فاکتور زمان، اثر متقابل دوگانه (زمان، فسفیت) و (زمان، قارچ) و اثر متقابل سه‌گانه (زمان، قارچ، فسفیت) و (قارچ، فسفیت، کیتوزان) بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود و بقیه آثار تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت این آنزیم نداشتند.

جدول ۴-۴ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

میانگین مربعات				درجه آزادی (df)	منابع تغییرات
کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیداز		
۳۰۵۳/۲۰۹**	۳۴۲/۸۱۲**	۳۷۶۵/۵۹۱**	۱۱۳/۸۰۷**	۹	زمان (T)
۱۴۵/۶۴۵*	۴۷۰/۴۲۷**	۱۱۲/۷۸ ^{ns}	۹/۳۹۱**	۱	قارچ (F)
۱۳/۳۸۷ ^{ns}	۳۱۴۱/۲۷۰**	۳۳/۱۵۱۷ ^{ns}	۳۷/۹۵۷**	۱	فسفیت (P)
۳۱۷/۵۲۹**	۱۲/۰۴۲**	۱/۴۴۱ ^{ns}	۲/۹۵۸ ^{ns}	۲	کیتوزان (K)
۶۸۵/۳۱۲**	۱۵۶/۷۲۲**	۷۱۳/۴۷۷**	۵۲/۶۳۶**	۱۹	زمان × قارچ
۱۱۲۸/۹۵۱**	۳۴۵/۹۲۳**	۱۱۸۸/۰۶۴**	۳۷/۹۵۶**	۱۹	زمان × فسفیت
۹۹۹/۳۴۱**	۶۷/۹۵۹**	۰/۶۱۸ ^{ns}	۴۲/۹۱۶**	۲۹	زمان × کیتوزان
۲۷۲۴/۵۴۰**	۵۶۱/۹۳۹**	۱۱۳/۷۰۵ ^{ns}	۳۲/۴۷۸**	۳	قارچ × فسفیت
۲۰۸۸/۵۶۴**	۱۱۵/۴۷۷**	۰/۱۰۹ ^{ns}	۸۲/۰۴۱**	۵	قارچ × کیتوزان
۶۲۴/۷۸۵**	۱۸/۸۳۱**	۰/۴۰۵ ^{ns}	۱۳۹/۹۲۴**	۵	فسفیت × کیتوزان
۱۴۹۷/۲۲۵۵**	۱۴۶/۳۳۷**	۷۴۳/۲۷۵**	۲۰/۸۳۷**	۳۹	زمان × قارچ × فسفیت
۱۱۴۰/۵۴۲**	۱۱۷/۳۵۳**	۰/۳۶۹ ^{ns}	۲۹/۱۰۲**	۵۹	زمان × قارچ × کیتوزان
۲۶۱۹/۶۴۴**	۱۶۴/۵۵۷**	۰/۷۴۷**	۴۰/۶۴۲**	۱۱	قارچ × فسفیت × کیتوزان
۱۲۳۰/۶۳۳**	۷۵/۲۰۲**	۰/۵۳۶ ^{ns}	۲۷/۹۶۶**	۵۹	زمان × فسفیت × کیتوزان
۱۵۷۱/۴۹۱**	۱۱۰/۲۰۹**	۰/۴۰۱ ^{ns}	۴۱/۸۷۸**	۱۱۹	زمان × قارچ × فسفیت × کیتوزان
۰/۹۵۱	۰/۹۹۴	۰/۵۳۹	۰/۹۵۳	۲۴۰	خطا
۲۶/۷۴۵	۱۸/۳۴۴	۵۶/۰۸۲	۲۶/۹۲۲		ضرب تغییرات

*, ** و ^{ns} به ترتیب معنی‌داری در سطح ۱ درصد، در سطح ۵ درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

۴-۲-۱-۱ میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها برای آثار متقابل فاکتورهای مورد بررسی بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش قارچ *P. capsici* در طی روزهای مختلف نشان داد که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم ($21/93 \text{ Umg}^{-1} \text{ protein}$) مربوط به تیمار کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در روز چهاردهم در شرایط عدم آلودگی و کمترین میزان فعالیت آن ($0/26 \text{ Umg}^{-1} \text{ protein}$)

مربوط به تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در روز دوم پس از

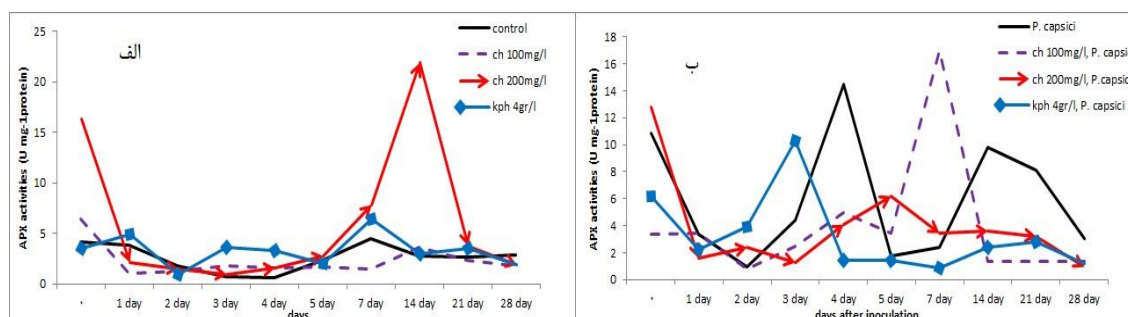
آلودگی می باشد (جدول ۴-۵).

جدول ۴-۵ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (U mg⁻¹ protein) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱	روز ۲۸
شاهد		۴/۱۳	۳/۸۳	۱/۸۰	۰/۷۳	۰/۶۵	۲/۳۲	۴/۴۸	۲/۷۷	۲/۶۷	۲/۹۱
کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۶/۴۳	۱/۰۸	۱/۳۲	۱/۷۶	۱/۵۹	۱/۶۸	۱/۵۲	۳/۶۴	۲/۲۹	۱/۸۱
کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۱۶/۲۵	۲/۱۷	۱/۴۹	۰/۹۵	۱/۵۴	۲/۷۸	۷/۷۶	۲۱/۹۳	۳/۷۳	۱/۹۶
فسفیت پتاسیم (۴ mg/l)		۳/۵۹	۴/۹۷	۰/۹۶	۳/۷۱	۳/۳۵	۲/۱۰	۶/۵۳	۳/۰۸	۳/۵۸	۱/۹۳
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۴/۱۹	۱/۸۱	۱/۷۰	۱/۴۲	۲/۲۴	۳/۲۵	۱۷/۰۳	۹/۵۶	۳/۳۶	۲/۰۴
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۲/۵۸	۳/۵۶	۰/۲۶	۳/۲۶	۰/۹۳	۴/۸۱	۴/۲۸	۵/۲۷	۱/۳۲	۱/۶۴
قارچ <i>P. capsici</i>		۱۰/۸۸	۳/۳۴	۰/۹۶	۴/۴۲	۱۴/۴۵	۱/۷۸	۲/۳۹	۹/۸۵	۸/۱۰	۳/۰۷
کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۳/۳۹	۳/۴۳	۰/۷۷	۲/۴۹	۴/۹۹	۳/۴۵	۱۶/۹۸	۱/۳۴	۱/۳۷	۱/۳۷
کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۱۲/۸۱	۱/۵۵	۲/۳۸	۱/۲۸	۴/۰۹	۵/۵۶	۳/۴۰	۳/۶۱	۳/۲۱	۱/۰۱
فسفیت (۴ mg/l) + قارچ		۶/۱۴	۲/۲۰	۳/۹۰	۱۰/۳۲	۱/۴۱	۱/۴۴	۰/۹۴	۲/۴۰	۲/۸۱	۱/۱۶
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۴/۸۷	۹/۹۰	۱/۰۹	۲/۵۵	۱۳/۲۵	۲/۰۶	۷/۹۱	۲/۷۱	۲/۳۰	۲/۲۴
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۲/۲۹	۱/۴۸	۱/۳۲	۰/۴۹	۴/۸۵	۲/۱۵	۱/۷۵	۰/۷۹	۱/۵۳	۲/۰۴

۲/۱۷ : LSD_{1%} ، ۱/۶۵ : LSD_{5%}

بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمارهای شاهد، کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و فسفیت پتاسیم با غلظت ۴ گرم در لیتر تغییر محسوسی نداشته است. در حالی که تیمار گیاهان توسط کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، ابتدا سبب کاهش فعالیت این آنزیم شده و سپس با گذشت ۱۴ روز از تلقیح عامل بیماری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به دیگر تیمارها افزایش یافته است. احتمالاً کیتوزان برای تاثیرگذاری بر روی میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به زمان نیاز دارد چنان که در شکل ۴-۵ مشاهده می شود میزان فعالیت این آنزیم در روز چهاردهم به طرز چشمگیری افزایش یافته است. نادری و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی تأثیر کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نظیر آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز موجود در گیاه ریحان دریافتند که کیتوزان در طول زمان سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شده است. در سلول همکاری آنزیم‌های حفاظتی مانند آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز سبب حذف ROS شده و میزان پراکسید هیدروژن را تنظیم می کند و آثار سوء تنش اکسیداتیو را در گیاه کاهش می دهد؛ بنابراین ویژگی های آنتی اکسیدانی کیتوزان می تواند مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو را در گیاه افزایش دهد (نادری و همکاران، ۱۳۹۳).



شکل ۴-۵ روند تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

آسکوربات، یک آنتی اکسیدان با وزن مولکولی کم و فراوانی بسیار زیاد است که در پاسخ به تنش اکسیداتیو و در افزایش سطح ROS نقش کلیدی ایفا می کند. آسکوربات همچنین به علت توانایی الکترون دهی در واکنش های آنزیمی و غیر آنزیمی یک آنتی اکسیدان قوی به شمار می رود. گزارش

شده است که سطح آنزیم آسکوربات پراکسیداز در پاسخ به تنش‌های مختلف متغیر است. سطح این آنزیم تحت تنش‌های محیطی به تعادل ظرفیت بیوسنتز آنزیم و بازده آن مرتبط با نیاز به آنتی اکسیدان در سلول بستگی دارد. افزایش بیان و تولید آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز آنزیم آسکوربات پراکسیداز سبب ایجاد تحمل و مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های غیرزیستی می‌شود (شارما و همکاران، ۲۰۱۶). افزایش فعالیت پراکسیدازها از طریق کاهش پراکسیدها در سلول سبب حفاظت غشاء و پروتئین‌های آن از اکسیداسیون می‌شود (رمضانی و همکاران، ۲۰۱۷).

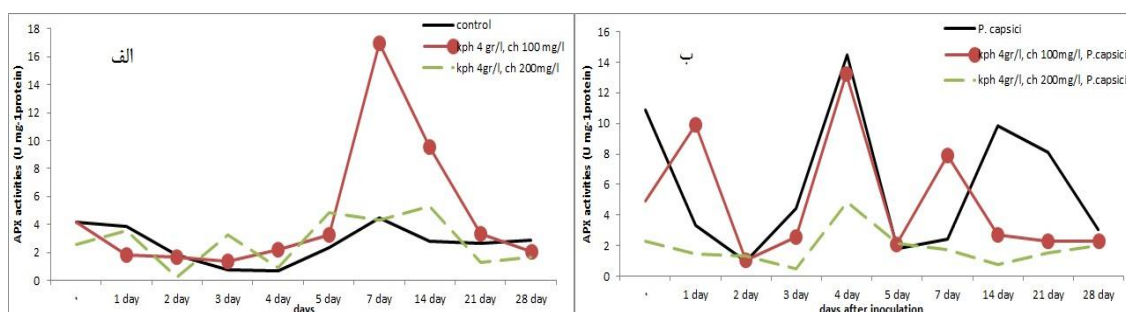
از طرفی در شکل ۴-۵ مشاهده می‌شود که میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تحت تنش قارچ *P. capsici* در مقایسه با نمونه شاهد (شکل الف) در ابتدای مواجهه با عامل بیماری کاهش یافته و سپس با گذشت ۳ روز از تلقیح، میزان این آنزیم افزایش می‌یابد. طی روزهای بعد روند تناوبی کاهش و افزایش میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در این تیمار ادامه دارد و به نظر می‌رسد گیاه در مواجهه با عامل بیماری با افزایش این آنزیم دفاعی درصدد ایجاد مقاومت برآمده است ولی با توجه به اینکه گیاه به تنهایی قادر به ایجاد مقاومت و پاسخ دفاعی در گیاه نیست میزان فعالیت این آنزیم دفاعی به صورت تناوبی کاهش و افزایش یافته است.

همچنین با توجه به شکل ۴-۵ افزایش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان محلول پاشی شده با کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پس از گذشت ۷ روز از تلقیح قارچ *P. capsici* مشاهده می‌شود. در حالی که تاثیر کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سبب افزایش و کاهش تناوبی میزان فعالیت این آنزیم شده است. اما فسفیت پتاسیم با غلظت ۴ گرم در لیتر در سومین روز پس از تلقیح سبب افزایش میزان فعالیت آن در گیاهان شده است.

رمضانی و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی تاثیر فسفیت پتاسیم قبل و بعد از آلودگی بر گیاه خیار آلوده به عامل بیماری سفیدک پودری مشاهده کردند که پیش تیمار فسفیت پتاسیم عمدتاً از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول

پراکسیداز آثار نامطلوب قارچ *Pseudoperonospora cubensis* را در گیاهان خیار کاهش داده است. علت القاء فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گیاهان با پیش تیمار فسفیت پتاسیم و تحت تنش عامل بیماری در مقایسه با شاهد این است که آنزیم آسکوربات پراکسیداز با وساطت سبب اتصال متقابل پروتئین‌های ساختاری و دیگر پلیمرهای بالقوه در سلول می‌شود. برخی از تحقیقات نشان داد که فسفیت پتاسیم به تنهایی و بدون آلودگی به پاتوژن قادر به تحریک مقاومت گیاه نیست. در مطالعه حاضر نیز پیش تیمار فسفیت پتاسیم در گیاهان بدون آلودگی با پاتوژن هیچ تغییری در میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ایجاد نکرده است درحالی که پیش تیمار فسفیت پتاسیم در گیاهان تحت تنش *P. capsici* سبب افزایش میزان فعالیت این آنزیم شده است (رضانی و همکاران، ۲۰۱۷).

بر اساس شکل ۴-۶ و نتایج مقایسه میانگین تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان (غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) در مقایسه با تیمار شاهد در شرایط عدم تلقیح قارچ عامل بیماری، پس از گذشت ۷ روز باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای ($17/03 \text{ U mg}^{-1}\text{protein}$) در میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گردید. در حالی که میزان فعالیت این آنزیم در تیمار فسفیت پتاسیم به همراه ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان تغییر محسوسی نسبت به تیمار شاهد نداشت (شکل الف).



شکل ۴-۶ روند تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

غلظت کیتوزان در تیمارهای همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. capsici* بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز موثر بود. روند فعالیت این آنزیم در تیمار کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر با تیمار شاهد مشابه بود در حالی که کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در هر دو حالت عدم آلودگی و در مواجهه با عامل بیماری تاثیر معنی داری بر فعالیت این آنزیم نداشت. به نظر می رسد کیتوزان در غلظت پایین توانسته همکاری بهتری با فسفیت پتاسیم نشان دهد و سبب افزایش میزان فعالیت این آنزیم شود در حالی که با افزایش غلظت کیتوزان به ۲۰۰ میلی گرم در لیتر مقدار فعالیت کاهش می یابد. با توجه به شناسایی خواص آنتی اکسیدانی کیتوزان و کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار کیتوزان که بر گونه ای از نعنا اعمال شده بود، به نظر می رسد که غلظت بالای تیمار کیتوزان سبب ایجاد دخالت و کاهش کارایی در فعالیت این آنزیم شده است (سلیمانی و طاهری، ۲۰۱۵).

۴-۲-۱-۲ میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

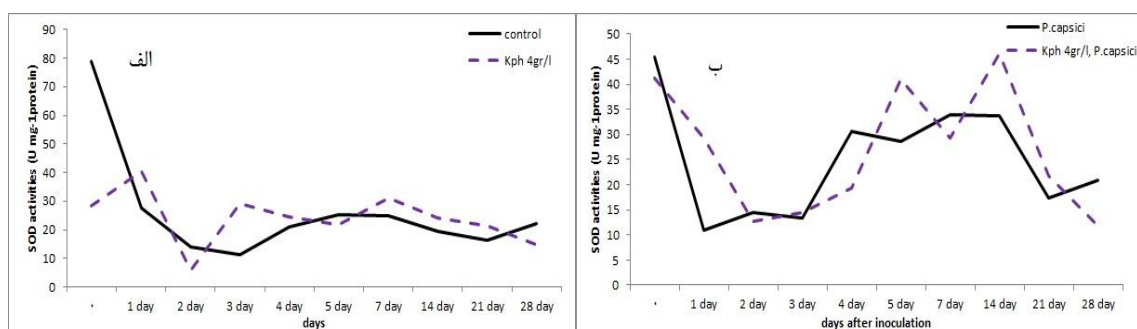
نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر متقابل سه گانه فاکتورهای (زمان، قارچ، فسفیت) و (قارچ، فسفیت، کیتوزان) بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۴-۴). نتایج مقایسه میانگین داده ها برای اثر متقابل فسفیت پتاسیم تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در طی روزهای مختلف نشان داد که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم ($78/69 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) مربوط به تیمار تیمار شاهد در روز صفر و کمترین میزان فعالیت آن ($6/04 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) مربوط به تیمار فسفیت پتاسیم با غلظت ۴ گرم در لیتر می باشد (جدول ۴-۴).

جدول ۴-۶ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱	روز ۲۸
شاهد		۷۸/۶۹	۲۷/۴۵	۱۴/۰۸	۱۱/۱۹	۲۰/۹۴	۲۵/۲۶	۲۴/۸۸	۱۹/۴۷	۱۶/۲۷	۲۲/۰۹
فسفیت پتاسیم (۴ g/l)		۲۸/۳۸	۴۰/۴۳	۶/۰۴	۲۹/۲۷	۲۴/۶۲	۲۱/۹۲	۳۱/۲۴	۲۴/۲۷	۲۱/۳۹	۱۴/۸۰
قارچ <i>P. capsici</i>		۴۵/۳۴	۲۰/۸۴	۱۴/۵۰	۱۳/۴۶	۳۰/۶۰	۲۸/۶۴	۳۳/۹۷	۳۳/۷۶	۱۷/۲۸	۲۰/۸۲
فسفیت (۴ g/l) + قارچ		۴۱/۲۶	۲۹/۲۷	۱۲/۶۹	۱۴/۵۴	۱۹/۴۱	۴۱/۰۳	۲۹/۲۵	۴۶/۱۸	۲۱/۷۵	۱۱/۸۹

LSD_{1%}: ۰/۶۹ ، LSD_{5%}: ۰/۹۲

بر اساس شکل (۴-۷) تیمار فسفیت پتاسیم در گیاهان خیار بدون تلقیح با قارچ در روز اول سبب افزایش فعالیت این آنزیم شده است، با توجه به این که محلول پاشی القاگرها پنج روز قبل از شروع آزمایش صورت گرفته است. پیش تیمار فسفیت پتاسیم در گیاهان آلوده بعد از کاهش و نوسانات در روزهای ابتدایی آزمایش، پس از گذشت ۱۴ روز از تلقیح عامل بیماری موجب افزایش چشمگیر میزان فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار شاهد شده است. در مطالعه مفید نخعی و همکاران (۲۰۱۶)، تاثیر فسفیت پتاسیم بر آنزیمهای آنتی اکسیدانی در گیاه خیار تحت تنش قارچ *Pythium ultimum* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این محققان نشان داد که تیمار با فسفیت پتاسیم می تواند با تاثیر بر فعالیت آنزیمهای دفاعی موجب کاهش آسیب بیماری به گیاه شود در حالی که گیاهان شاهد تیمار شده با قارچ به شدت توسط پاتوژن آسیب دیدند (مفید نخعی و همکاران، ۲۰۱۶).



شکل ۴-۷ روند تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم در شرایط: (الف) عدم

آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

از طرفی دیگر نتایج مقایسه میانگین داده ها برای اثر متقابل سه گانه فسفیت پتاسیم ، کیتوزان و قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم ($118/85 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) مربوط به تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و کمترین میزان فعالیت آن ($1/04 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) مربوط به تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در گیاهان خیار عاری از بیماری به ثبت رسیده است (جدول ۴-۷).

جدول ۴-۷ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان

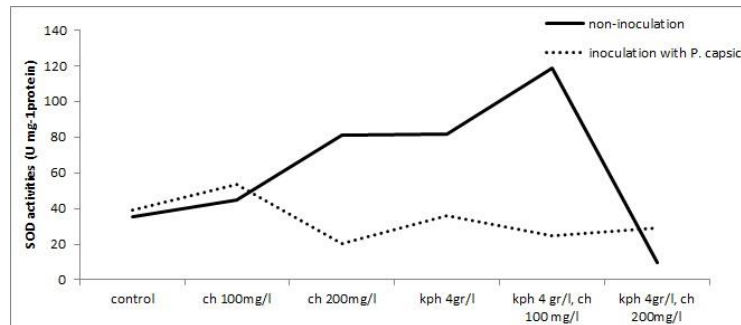
فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$)

تیمارها	عدم تلقیح	تلقیح با قارچ <i>P. capsici</i>
شاهد	۳۵/۱۹	۳۹/۲۹
کیتوزان (100 mg/l)	۴۴/۶۶	۵۳/۶۶
کیتوزان (200 mg/l)	۸۱/۱۵	۲۰/۴۴
فسفیت پتاسیم (4 g/l)	۸۱/۵۶	۳۶/۲۲
فسفیت (4 g/l) + کیتوزان (100 mg/l)	۱۱۸/۸۵	۲۴/۷۰
فسفیت (4 g/l) + کیتوزان (200 mg/l)	۹/۵۱	۲۹/۰۸

$\text{LSD}_{5\%}: 1/95$ ، $\text{LSD}_{1\%}: 2/65$

محققان در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که کیتوزان یک پلیمر طبیعی غیر سمی بوده و به عنوان محرک در بخش کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مطالعات اخیر در حوزه کشاورزی مشخص شده است که کیتوزان سبب تحریک مکانیسم‌های مختلفی در گیاهان در برابر انواع تنش‌های زنده (حشرات، باکتری‌ها و قارچ‌ها) و تنش غیر زنده (خشکی، شوری، سرما و فلزات سنگین) شده و به شکل‌گیری موانع در جهت بهبودی مقاومت گیاه در برابر پاتوژن کمک می‌کند (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۷).

همان گونه که در شکل ۴-۸ مشاهده می‌شود استفاده از القاگرها در گیاهان در شرایط عدم حضور قارچ عامل بیماری تاثیر بیشتری بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز داشته است و پیش تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در شرایط عدم آلودگی بیشترین میزان فعالیت آنزیم را به خود اختصاص داده است. از طرفی دیگر در شرایط مواجهه با عامل بیماری کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم به تنهایی توانست میزان فعالیت این آنزیم را به میزان اندکی افزایش دهد.



شکل ۴-۸ تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط:

عدم آلودگی با قارچ و تحت تنش قارچ *P. capsici*

در مطالعه‌ی ژانگ و همکاران (۲۰۱۷) که تاثیر القاگر کیتوزان بر روی نوعی کلم تحت تنش عنصر کادمیوم را بررسی کردند یافته‌ها نشان داد که محلول پاشی با کیتوزان سبب افزایش آنتی‌اکسیدان های غیر آنزیمی نظیر اسید آسکوربیک و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز شده است.

۴-۲-۱-۳ میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

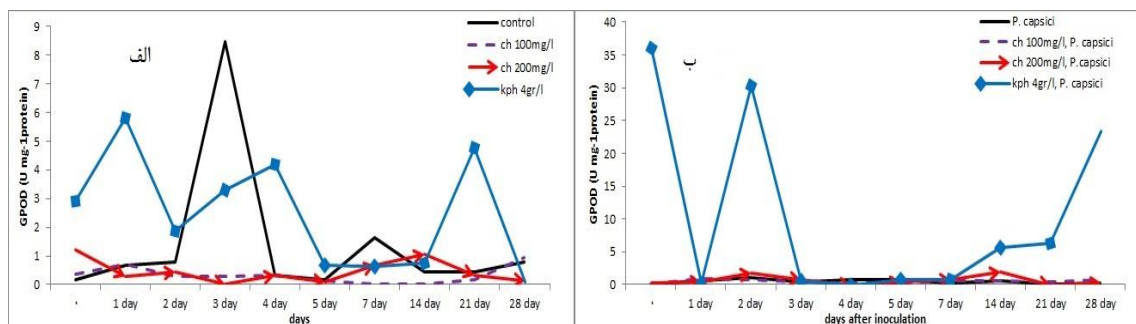
نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها برای کلیه آثار متقابل فاکتورهای زمان، فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تنش *P. capsici* نشان داد که بیشترین مقدار این آنزیم ($41/99 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) مربوط به تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر تحت تنش عامل بیماری در روز دوم پس از آلودگی می‌باشد (جدول ۴-۸).

جدول ۴-۸ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (U mg⁻¹ protein) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱	روز ۲۸
شاهد		۰/۱۹	۰/۶۹	۰/۷۹	۸/۴۸	۰/۳۱	۰/۱۷	۱/۶۵	۰/۴۵	۰/۴۴	۰/۷۸
کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۰/۳۶	۰/۷۳	۰/۳۰	۰/۲۷	۰/۳۱	۰/۱۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۷	۰/۹۴
کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۱/۲۲	۰/۲۸	۰/۴۱	۰/۰۵	۰/۳۰	۰/۰۷	۰/۶۵	۱/۰۴	۰/۳۲	۰/۱۱
فسفیت پتاسیم (۴ g/l)		۲/۹۱	۵/۸۴	۱/۹۰	۳/۳۱	۴/۲۰	۰/۷۰	۰/۶۳	۰/۷۷	۴/۷۸	۰/۱۰
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۱۴/۰۲	۹/۲۸	۵/۸۲	۱/۱۳	۰/۳۶	۶/۹۴	۰/۴۲	۰/۸۵	۰/۲۹	۰/۱۴
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۴/۰۲	۲۸/۸۳	۱۷/۱۹	۲/۵۱	۰/۲۲	۰/۴۹	۴/۵۲	۱/۰۰	۰/۳۰	۰/۴۷
قارچ <i>P. capsici</i>		۰/۰۷	۰/۵۹	۱/۰۸	۰/۴۵	۰/۶۸	۰/۷۲	۰/۲۳	۰/۵۶	۰/۰۰	۰/۱۶
کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۰/۰۰	۰/۹۱	۰/۷۷	۰/۳۸	۰/۲۰	۰/۲۹	۰/۵۷	۰/۵۵	۰/۳۹	۰/۸۰
کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۰/۱۴	۰/۳۶	۱/۶۲	۰/۷۲	۰/۰۰	۰/۲۶	۰/۵۹	۱/۹۳	۰/۰۶	۰/۱۹
فسفیت (۴ g/l) + قارچ		۳۶/۰۵	۰/۲۷	۳۰/۱۹	۰/۵۳	۰/۰۰	۰/۶۳	۰/۷۷	۵/۶۷	۶/۲۹	۲۳/۲۴
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۱۰/۲۱	۱۷/۳۹	۴۱/۹۹	۲/۴۷	۰/۱۷	۱/۷۸	۲۷/۵۶	۱/۷۱	۰/۸۱	۱/۱۷
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۲۴/۳۸	۹/۹۲	۸/۳۲	۲/۰۶	۲/۱۱	۱/۵۷	۶/۷۳	۰/۵۸	۰/۱۶	۲/۷۲

LSD_{5%}: ۱/۰۵ ، LSD_{1%}: ۱/۳۸

بر اساس مشاهدات در شکل ۴-۹ پیش تیمار فسفیت پتاسیم در روز دوم پس از آلودگی با عامل بیماری سبب افزایش قابل ملاحظه‌ی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ($30/19 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) شده است. تاثیر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت این آنزیم در گیاه خیار آلوده به بیماری سفیدک پودری توسط رمضانی و همکاران (۲۰۱۷) بررسی شد، این محققان دریافتند که میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در اثر پیش تیمار فسفیت پتاسیم در گیاهان تحت تنش در روز سوم پس از آلودگی افزایش یافته است. آویلا و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش کردند که در هنگام تنش، فسفیت پتاسیم سبب تحریک انواع پاسخ‌های بیوشیمیایی در گیاهان می‌شود.

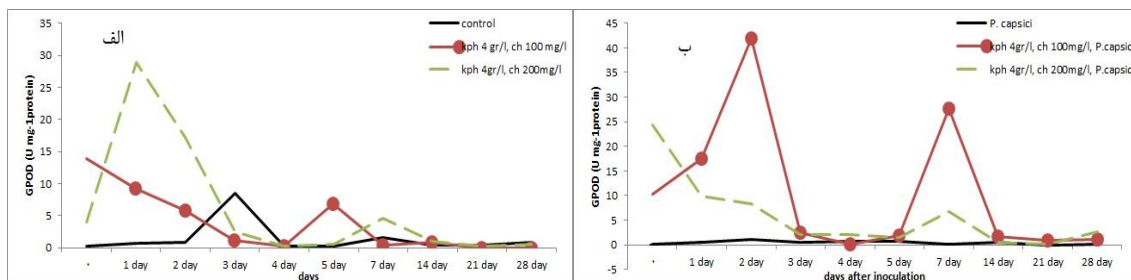


شکل ۴-۹ روند تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

پیش تیمار کیتوزان بر روی گیاهان در هر دو شرایط عاری از آلودگی و تلقیح شده با عامل بیماری بر اساس نتایج جدول مقایسه میانگین و شکل ۴-۹ تاثیری بر میزان فعالیت این آنزیم نداشته است. چون آنزیم پراکسیداز بخشی از مکانیسم بیوسنتز لیگنین در گیاه بوده و افزایش میزان فعالیت آن سبب ایجاد مقاومت در گیاهان تحت تنش عامل بیماری می‌شود، فعالیت این آنزیم با تحمل گیاهان نسبت به عامل بیماری رابطه مستقیم دارد (مفید نخعی و همکاران، ۲۰۱۶).

در شکل ۴-۱۰ فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در تیمار همزمان فسفیت پتاسیم به همراه کیتوزان در روز اول افزایش نشان داده است. غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان به همراه فسفیت پتاسیم در گیاهان خیار بدون تلقیح با قارچ عامل بیماری در روز اول سبب افزایش قابل ملاحظه‌ی این آنزیم ($28/83 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) شده است. از طرفی در گیاهان آلوده به قارچ *P. capsici*، تیمار فسفیت

پتاسیم به همراه کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سبب افزایش چشمگیر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز شده است به طوری که بیشترین مقدار فعالیت آنزیم ($41/99 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) در روز دوم پس از آلودگی در این تیمار می باشد و در ادامه همین روند پس از یک دوره کاهش میزان فعالیت در روزهای بعدی، در روز هفتم پس از تلقیح عامل بیماری نیز میزان بالایی از فعالیت آنزیم به ثبت رسیده است.



شکل ۴-۱۰ روند تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

بر اساس مطالعات پیشین صورت گرفته، گزارش شده است که کیتوزان به عنوان یک القاگر زیستی ممکن است دارای پتانسیلی برای از بین بردن رادیکال های آزاد باشد. کیتوزان علاوه بر از بین بردن رادیکال های آزاد $\text{OH}^\cdot$ و $\text{O}_2^\cdot$ قدرت حفاظت از DNA را نیز دارد. نادری و همکاران (۱۳۹۴) با مطالعه ای تاثیر کیتوزان بر برخی از ویژگی های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه ریحان دریافتند که بین میزان فعالیت آنزیم های گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در طی تیمار کیتوزان همبستگی معنی دار و مثبتی وجود دارد، این امر بیان می کند که آنزیم های حفاظتی نام برده شده توانسته در گیاه ریحان تحت تیمار کیتوزان ROS را حذف کند و باعث تعادل هموستاتیک بین تولید و حذف ROS گردد و مقدار رادیکال آزاد را کاهش دهد. در واقع این آنزیم های آنتی اکسیدانی با هم فعال شده و سبب کاهش آثار سوء تنش اکسیداتیو می شوند (نادری و همکاران، ۱۳۹۴). یافته های حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در هر دو شرایط آلودگی و عدم آلودگی با عامل بیماری در روزهای مختلف سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز می شود.

۴-۱-۲-۴ میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

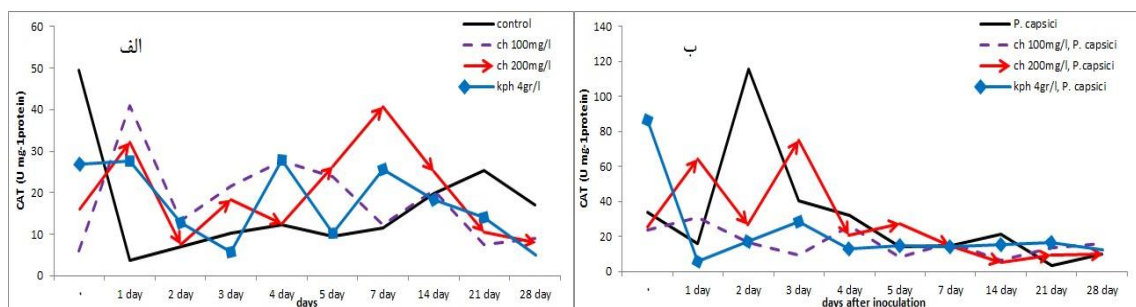
بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (۴-۴) تمامی آثار متقابل فاکتورهای زمان، قارچ، فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند. همچنین نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم (U mg^{-1} protein ۱۵۰/۳۴) مربوط به تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در حالت بدون آلودگی در زمان صفر (روز شروع آزمایش) و کمترین میزان فعالیت آن (U mg^{-1} protein ۱/۵۸) مربوط به همین ترکیب تیماری تحت تنش عامل بیماری در روز پنجم پس از آلودگی است (جدول ۴-۹).

جدول ۴-۹ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (U mg⁻¹ protein) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱	روز ۲۸
شاهد		۴۹/۵۲	۳/۷۲	۶/۹۰	۱۰/۳۲	۱۲/۲۴	۹/۴۷	۱۱/۶۴	۱۹/۵۷	۲۵/۴۲	۱۷/۰۱
کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۶/۰۲	۴۰/۹۸	۱۳/۱۸	۲۱/۶۲	۲۷/۵۹	۲۳/۹۲	۱۲/۲۲	۲۰/۴۶	۷/۴۰	۸/۹۶
کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۱۶/۰۰	۳۲/۲۱	۷/۷۳	۱۸/۳۷	۱۲/۴۹	۲۶/۳۸	۴۰/۸۱	۲۵/۰۶	۱۰/۵۲	۷/۹۲
فسفیت پتاسیم (۴ g/l)		۲۶/۸۵	۲۷/۴۲	۱۲/۶۴	۵/۷۵	۲۷/۹۱	۱۰/۲۲	۲۵/۴۴	۱۸/۱۰	۱۳/۸۷	۵/۰۵
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۳۲/۳۳	۲۵/۰۸	۷۰/۴۸	۲۹/۴۸	۵/۶۹	۳/۹۵	۶/۰۴	۱۵/۳۳	۱۰/۰۳	۷/۱۶
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۱۵۰/۳۴	۲۸/۲۱	۲۷/۸۶C	۴۳/۳۹	۳۳/۸۸	۱۴/۹۱	۵/۸۴	۱۳/۶۳	۲۰/۳۹	۵/۰۶
قارچ <i>P. capsici</i>		۳۳/۷۹	۱۶/۱۱	۱۱۵/۷۲	۴۰/۶۰	۳۲/۰۷	۱۴/۰۰	۱۴/۸۳	۲۱/۳۱	۳/۴۸	۱۰/۳۰
کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۲۳/۷۰	۳۰/۶۵	۱۶/۶۲	۹/۵۸	۲۶/۲۶	۸/۲۳	۱۶/۴۲	۶/۱۴	۱۳/۵۱	۱۵/۹۳
کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۲۵/۴۶	۶۴/۳۴	۲۶/۸۳	۷۵/۴۸	۲۰/۷۵	۲۷/۱۷	۱۴/۷۷	۵/۳۱	۹/۶۹	۹/۸۲
فسفیت (۴ g/l) + قارچ		۸۶/۸۹	۶/۱۸	۱۷/۲۹	۲۸/۷۹	۱۳/۰۳	۱۴/۹۶	۱۴/۲۵	۱۵/۲۹	۱۶/۷۹	۱۲/۴۷
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۶/۹۷	۱۱/۲۳	۳۶/۴۸	۲۶/۵۸	۶۹/۱۱	۴۹/۱۶	۲۱/۲۵	۱۱/۸۸	۱۲/۱۹	۷/۱۶
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۲۲/۵۳	۴/۲۷	۷/۵۰	۱۰/۶۷	۲۱/۸۲	۱/۵۸	۲۴/۳۲	۱۰/۹۱	۴/۵۹	۸/۷۲

LSD_{5%}: ۹/۳۶ ، LSD_{1%}: ۱۲/۳۴

بر اساس مشاهدات در شکل ۴-۱۱ در گیاهان خیار عاری از آلودگی با قارچ عامل بیماری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار شاهد به شدت در روز اول کاهش یافت، در حالی که تیمار کیتوزان در هر دو غلظت مصرفی پس از گذشت یک روز سبب افزایش میزان این آنزیم در این گیاهان شده است. ژانگ و همکاران (۲۰۱۷) پس از بررسی تاثیر کیتوزان بر روی فتوسنتز و فعالیت آنزیمی نوعی کلم تحت تنش کادمیوم، گزارش کردند که در اثر مصرف کیتوزان میزان فعالیت آنزیمهای کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربیک اسید افزایش یافته و در پی این تغییر، میزان تولید H_2O_2 نیز کاهش یافت. علاوه بر این، مقدار تاثیر کیتوزان بر روی پاسخ دفاعی به گونه گیاهی و ژنوتیپ آن بستگی دارد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۷). فسفیت پتاسیم نیز در همین شرایط با ایجاد یک روند تناوبی افزایشی و کاهشی بر میزان فعالیت آن تاثیر گذاشته است.

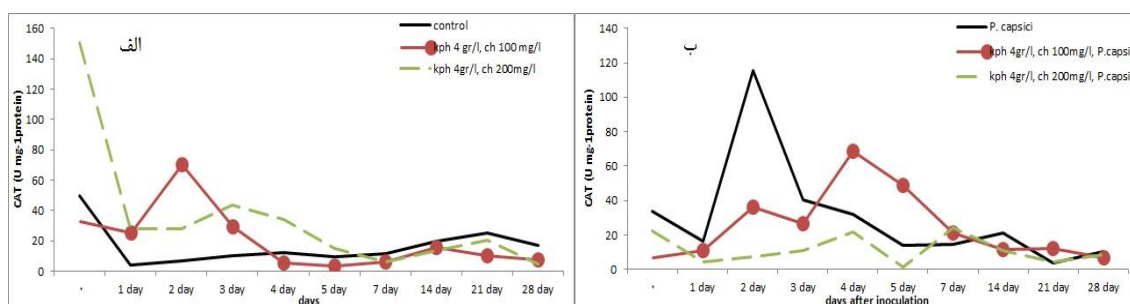


شکل ۴-۱۱ روند تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

با توجه به شکل ۴-۱۱ در گیاهان آلوده با عامل بیماری، بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ($U\ mg^{-1}$ protein¹ ۱۱۵/۷۳) در نمونه تلقیح شده با قارچ (بدون القاگر) پس از گذشت دو روز مشاهده شده است. در حالی که تیمار کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نیز سبب افزایش میزان فعالیت این آنزیم در سومین روز پس از تلقیح شده است. زمانی که گیاهان در معرض تنشهای مختلف زیستی یا غیر زیستی قرار می گیرند، این گونه تنشها موجب عدم تعادل و اختلال در زنجیره انتقال الکترون سلولها می شوند. با شکل گیری تکامل در گیاهان، استراتژیهای مختلف برای تخلیه سلولها از جمله سیستمهای آنتی اکسیدانی قوی تشکیل شده اند. در اثر تنش اکسیداتیو، تولید H_2O_2 در سلولها افزایش یافته و با فعالیت آنزیم کاتالاز این ترکیب سمی از سلول حذف می شود. از این رو افزایش بیان

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به دلیل تیمار با کیتوزان یا نانو ذرات کیتوزان ممکن است حافظت لازم از سلول را در برابر استرس اکسیداتیو حاصل از حمله عوامل بیماری‌زا فراهم می‌کند (چاندرا و همکاران، ۲۰۱۷). فسفیت پتاسیم در شرایط آلودگی تاثیر منفی بر میزان فعالیت این آنزیم داشته و موجب کاهش آن شده است.

همان طور که در شکل ۴-۱۲ مشاهده می‌گردد در شرایطی که گیاهان خیار بدون تلقیح با عامل بیماری با فسفیت پتاسیم و کیتوزان به صورت همزمان تیمار شدند، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان به همراه فسفیت پتاسیم پس از گذشت دو روز موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است. در گیاهان آلوده شده با قارچ میزان فعالیت این آنزیم پس از گذشت دو روز از آلودگی به شدت افزایش یافت. همچنین تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ذکر شده در گیاهان آلوده در پنجمین روز پس از تلقیح نیز سبب افزایش میزان این آنزیم شده است.



شکل ۴-۱۲ روند تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

ناندیش کومار و همکاران (۲۰۰۸) در آزمایشی تاثیر کیتوزان را بر میزان القاء مقاومت به بیماری سفیدک پودری در آفتابگردان بررسی کردند و دریافتند که بهبود مقاومت القایی در گیاهان با بیان مجموعه ای از پروتئین‌های PR همراه است از طرفی دیگر فعالیت‌های آنزیم‌های کاتالاز، فنیل آلانین آمونیالیاز، پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز، چالکون سنتاز، β ۱-۳-گلوکاناز، PR-1 و آنزیم‌های کیتیناز در ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن سفیدک پودری در آفتابگردان نقش فعال و مهمی ایفا می‌کنند.

۴-۲-۲ اثر فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاهان خیار

تلقیح شده با قارچ *Phytophthora capsici*

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تمامی آثار فاکتورهای زمان، قارچ *P. capsici*، فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر روی میزان محتوای آنتوسیانین، پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۹). اثر اصلی فسفیت بر میزان مالون دی‌آلدئید در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود و فقط اثر اصلی قارچ بر میزان این ماده معنی‌دار نبود.

جدول ۴-۱۰ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات صفات آنتوسیانین، پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات		
		آنتوسیانین	پراکسید هیدروژن	مالون دی‌آلدئید
زمان (T)	۴	۱۰۹۰۳**	۳۳۷/۴۴**	۸۳۰/۰۳**
قارچ (F)	۱	۱۴۱۰/۸**	۱۳۷/۶۴**	۰/۷۶۴۲ ^{ns}
فسفیت (P)	۱	۸۵۷**	۲۵۰/۴۷**	۰/۰۳۷۴*
کیتوزان (K)	۲	۶۱۲/۲۵**	۱۰۰/۰۶**	۳۰۹/۹**
زمان × قارچ	۹	۲۰۲۹/۴۳**	۲۳۱/۸۳**	۱۵۱/۹۳**
زمان × فسفیت	۹	۱۹۳/۴۳**	۲۵۶/۱۱**	۶۳/۷۵**
زمان × کیتوزان	۱۴	۳۶۲/۷۷**	۲۶۴/۳۵**	۲۰۸/۱۹**
قارچ × فسفیت	۳	۲۶۲/۲۸**	۴۱/۰۴**	۱۴/۱۲**
قارچ × کیتوزان	۵	۱۶/۶۱**	۱۳۴/۸۲**	۱۹۹/۶**
فسفیت × کیتوزان	۵	۵۴۴/۸۱**	۱۹۶/۹۷**	۵۵/۰۲**
زمان × قارچ × فسفیت	۱۹	۱۷۲۶/۰۵**	۴۲/۲۲**	۱۰۵/۷۹**
زمان × قارچ × کیتوزان	۲۹	۳۶۷/۳۲**	۳۶/۳۸**	۸۴/۶۱**
قارچ × فسفیت × کیتوزان	۱۱	۲۶۴/۷۷**	۲۱/۹۵**	۴۲/۴۸**
زمان × فسفیت × کیتوزان	۲۹	۲۹۸/۳۷**	۲۰۹/۰۸**	۵۰/۴**
زمان × قارچ × فسفیت × کیتوزان	۵۹	۱۲۸/۵**	۲۳/۱۸**	۲۷/۸۳**
خطا	۱۲۰	۰/۹۹۸	۰/۹۸۶	۰/۹۸۶
ضریب تغییرات		۱/۳۷۹	۳/۵۸۷	۷/۰۱

** و ^{ns} به ترتیب معنی‌داری در سطح ۱ درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

۴-۲-۱- میزان آنتوسیانین

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴-۱۰) نشان داد که کلیه آثار اصلی و متقابل فاکتورهای زمان، قارچ *P. capsici*، فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر روی میزان آنتوسیانین در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بودند. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان آنتوسیانین ($9/60 \mu\text{gr ml}^{-1}$) مربوط به تیمار توام فسفیت و کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در روز هفتم و کمترین میزان آن ($2/48 \mu\text{gr ml}^{-1}$) مربوط به تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در روز بیست و هشتم پس از آلودگی می‌باشد (جدول ۴-۱۱).

جدول ۴-۱۱ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان

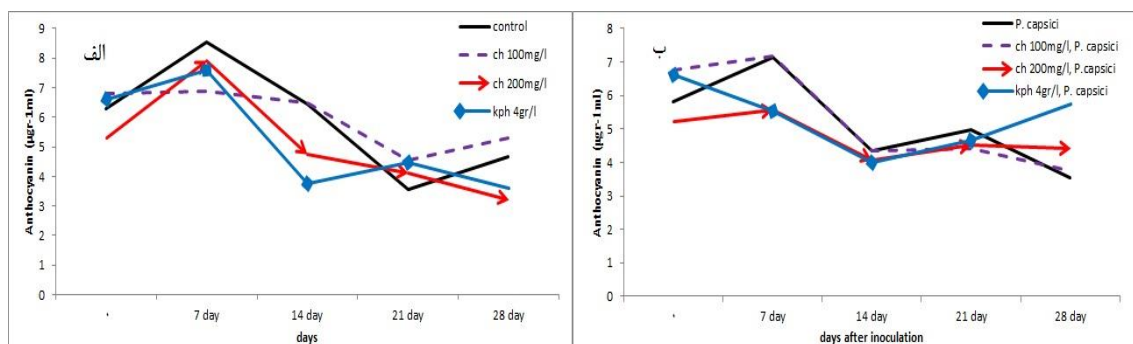
آنتوسیانین ($\mu\text{g}^{-1} \text{ ml}$) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	۷روز	۱۴روز	۲۱روز	۲۸روز
شاهد		۶/۲۸	۸/۵۴	۶/۴۳	۳/۵۶	۴/۶۷
کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۶/۷۹	۶/۸۶	۶/۴۹	۴/۵۵	۵/۲۸
کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۵/۲۸	۷/۹۲	۴/۷۳	۴/۱۲	۳/۲۳
فسفیت پتاسیم (۴ g/l)		۶/۶۳	۷/۶۲	۳/۷۶	۴/۴۹	۳/۶۳
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۶/۴۱	۷/۶۷	۴/۳۲	۳/۸۷	۲/۴۸
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۵/۴۲	۷/۶۰	۳/۸۰	۴/۴۹	۳/۲۲
قارچ <i>P. capsici</i>		۵/۸۰	۷/۱۵	۴/۳۶	۴/۹۸	۳/۵۴
کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۶/۷۴	۷/۱۹	۴/۳۳	۴/۴۳	۳/۷۵
کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۵/۲۱	۵/۵۸	۴/۱۰	۴/۵۳	۴/۴۰
فسفیت (۴ g/l) + قارچ		۶/۶۴	۵/۵۴	۴/۰۳	۴/۶۶	۵/۷۵
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۶/۵۰	۴/۵۶	۵/۵۸	۳/۴۸	۳/۸۰
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۵/۳۲	۴/۹۱	۴/۶۶	۳/۵۶	۴/۹۸

LSD_{5%}: ۰/۱۱، LSD_{1%}: ۰/۱۵

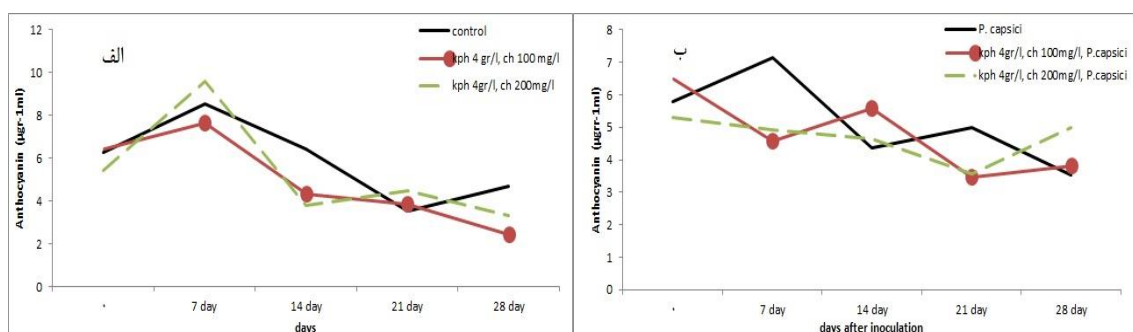
در شکل ۴-۱۳ مشاهده می‌شود که میزان آنتوسیانین در گیاهان با پیش تیمار القاگرهای مورد استفاده پس از گذشت ۷ روز افزایش و پس از آن به تدریج کاهش یافته است. مور و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که تیمار فسفیت پتاسیم با تولید بیشتر آنتوسیانین و اسید آسکوربیک سبب افزایش کیفیت میوه می‌شود. محققان در آزمایشی دیگر در سال ۲۰۰۹ دریافتند آنتوسیانین علاوه بر

نقش در عملکرد، رنگ و کیفیت میوه، در عملکرد سیستم دفاعی گیاه نیز نقش دارد. این محققان با استفاده از فسفیت پتاسیم در میوه توت فرنگی، افزایش تولید آنتوسیانین نسبت به نمونه شاهد گزارش کرده‌اند (استرادا- اورتیز و همکاران، ۲۰۰۹). از طرفی دیگر محققان در سال ۲۰۱۵ دریافتند که پوشش‌دهی میوه توت فرنگی با کیتوزان در طول مدت انبارداری سبب ثبات میزان پلی فنل کل، آنتوسیانین، محتویات فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها شده و این ترکیبات در میوه‌های تیمار شده با کیتوزان نسبت به نمونه شاهد کمتر دستخوش تغییر می‌شوند (پتريکونی و همکاران، ۲۰۱۵).



شکل ۴-۱۳ روند تغییرات میزان آنتوسیانین در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

همچنین در مطالعه حاضر پیش تیمار گیاهان با فسفیت پتاسیم و کیتوزان سبب افزایش تولید آنتوسیانین در برگ‌ها شده است، به گونه‌ای که بیشترین مقدار آنتوسیانین در تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان در روز هفتم به ثبت رسیده است که با نتایج مور و همکاران (۲۰۰۹)، اورتیز و همکاران (۲۰۰۹) و پتريکونی و همکاران (۲۰۱۵) هم‌خوانی دارد.



شکل ۴-۱۴ روند تغییرات میزان آنتوسیانین در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

از طرفی در هفتمین روز پس از تلقیح میزان آنتوسیانین گیاه در مواجهه با عامل بیماری افزایش یافته است، در حالی که تیمارهای توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان در هر دو غلظت مورد استفاده در طول زمان سبب کاهش میزان این متابولیت شده اند. فلاونوئیدها و آنتوسیانین دارای نقش‌های مهمی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا، حفاظت در برابر نور و مکانیسم‌های دفاعی هستند (تیواری و همکاران، ۲۰۰۹). آنتوسیانین دارای خاصیت ضد التهابی، ویروس کشی و ضدباکتریایی دارد (تودارو و همکاران، ۲۰۰۹).

۴-۲-۲-۲ محتوای پراکسید هیدروژن

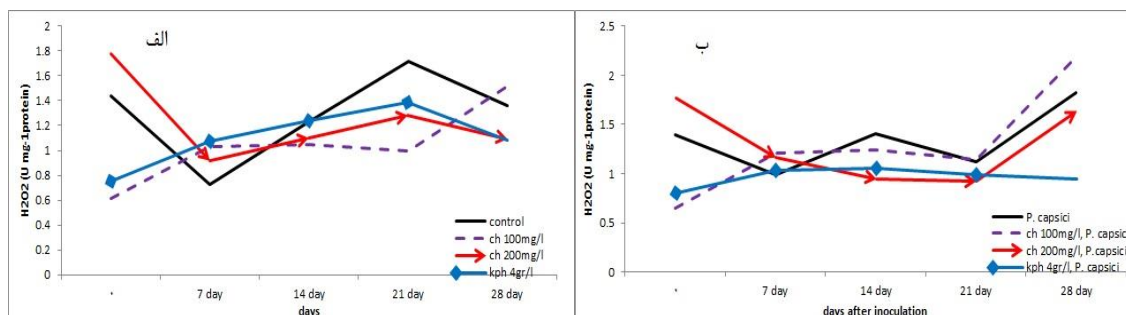
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴-۱۰) نشان داد که آثار اصلی و متقابل تمام فاکتورهای مورد بررسی در این مطالعه از جمله زمان، قارچ *P. capsici*، فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر روی میزان پراکسید هیدروژن در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان پراکسید هیدروژن ($2/19 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) مربوط به تیمار کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر و تلقیح با قارچ در روز بیست و هشتم پس از آلودگی و کمترین مقدار آن (U mg^{-1} protein ۰/۶۱) مربوط به تیمار با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان در زمان صفر به ثبت رسیده است (جدول ۴-۱۲).

جدول ۴-۱۲ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر فعالیت پراکسید هیدروژن (U mg⁻¹ protein) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	۷روز	۱۴روز	۲۱روز	۲۸روز
شاهد	۱/۴۴	۰/۷۳	۱/۲۳	۱/۷۲	۱/۳۶	
کیتوزان (۱۰۰ mg/l)	۰/۶۱	۱/۰۳	۱/۰۵	۱/۰۰	۱/۵۲	
کیتوزان (۲۰۰ mg/l)	۱/۷۸	۰/۹۲	۱/۱۰	۱/۲۸	۱/۰۹	
فسفیت پتاسیم (۴ g/l)	۰/۷۶	۱/۰۷	۱/۲۴	۱/۳۹	۱/۰۸	
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l)	۰/۹۸	۰/۹۶	۱/۲۳	۰/۹۶	۱/۱۳	
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l)	۱/۲۴	۱/۳۴	۱/۴۷	۰/۹۹	۱/۰۸	
قارچ <i>P. capsici</i>	۱/۳۹	۰/۹۹	۱/۴۱	۱/۱۲	۱/۸۲	
کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ	۰/۶۵	۱/۲۱	۱/۲۴	۱/۱۴	۲/۱۹	
کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ	۱/۷۷	۱/۱۶	۰/۹۴	۰/۹۳	۱/۶۳	
فسفیت (۴ g/l) + قارچ	۰/۸۱	۱/۰۳	۱/۰۶	۰/۹۹	۰/۹۴	
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ	۱/۲۰	۱/۱۱	۱/۰۸	۱/۱۸	۱/۵۹	
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ	۱/۲۱	۱/۳۳	۱/۷۰	۰/۷۴	۱/۵۰	

LSD_{5%}: ۰/۰۶۹ ، LSD_{1%}: ۰/۰۹۲

لوباتو و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند استفاده از فسفیت پتاسیم به عنوان القاگر، سبب تجمع پراکسید هیدروژن در برگ سیب زمینی تحت تنش اشعه ماوراء بنفش شده و پاسخ دفاعی را در گیاه تحریک کرده است. در مطالعه حاضر نیز با توجه به شکل ۴-۱۵ در شرایط عدم حضور قارچ عامل بیماری پیش تیمار فسفیت پتاسیم در گیاهان به تدریج سبب تجمع پراکسید هیدروژن در سلول شده است به طوری که در روز بیست و یکم به حداکثر میزان خود رسیده است و پس از آن روند کاهشی داشته است.

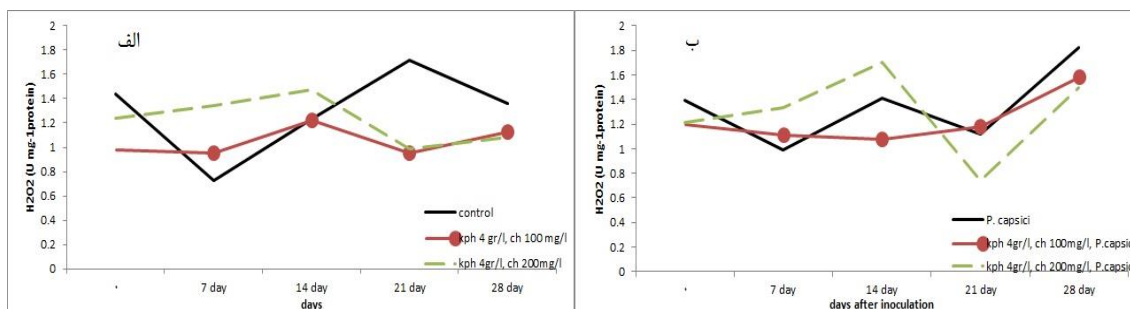


شکل ۴-۱۵ روند تغییرات فعالیت پراکسید هیدروژن در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم

آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

همچنین تیمار کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به تدریج در طی روزهای مختلف سبب روند افزایشی میزان پراکسید هیدروژن شده است، در حالی که غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر آن مشابه تیمار شاهد عمل کرده است. محققان در سال ۲۰۱۵ دریافتند که با وجود اینکه متابولیت‌های ثانویه به طور مستقیم در رشد درگیر نیستند، اما اغلب در پاسخ دفاعی گیاه نقش دارند در حالی که برخی از القاگرها قادر به تحریک تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌شوند که از کیتوزان به عنوان یک القاگر در جهت تحریک تولید این متابولیت‌ها و ایجاد پاسخ دفاعی در گیاه می‌توان ذکر کرد (زینگ و همکاران، ۲۰۱۵).

در تیمار همزمان گیاهان خیار با استفاده از فسفیت پتاسیم و کیتوزان مشاهده گردید که مقدار پراکسید هیدروژن در هر دو حالت آلودگی و عدم آلودگی به مرور زمان افزایش یافته و بیشترین مقدار آن در روز بیست و هشتم پس از آلودگی به ثبت رسیده است. همچنین تمام آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مورد مطالعه در این پژوهش در روز بیست و هشتم پس از آلودگی در کمترین حد خود گزارش شده‌اند. در روز چهاردهم پس از آلودگی در نمونه‌های تیمار شده با کیتوزان کمترین میزان پراکسید هیدروژن و بیشترین مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به ثبت رسیده است. با توجه به اینکه این آنزیم نقش مهمی در تجزیه‌ی پراکسید هیدروژن و سمیت زدایی از سلول را بر عهده دارد احتمال می‌رود که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر القاگر کیتوزان به مرور زمان افزایش یافته و با تجزیه‌ی پراکسید هیدروژن سبب کاهش صدمه به گیاه شده است.



شکل ۴-۱۶ روند تغییرات فعالیت پراکسید هیدروژن در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط:

(الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

اگرچه پراکسید هیدروژن در غلظت‌های بالا برای گیاه می‌تواند سمی باشد ولی در غلظت‌های پایین می‌تواند نقش پیام آور در گیاه داشته باشد. به طوری که در القای مرگ سلولی و فعال سازی ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (پروتئین‌های PR) می‌تواند نقش موثری را ایفا کند (ژین گوا و همکاران، ۲۰۰۸).

۴-۲-۳-۲ میزان فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دی‌آلدئید

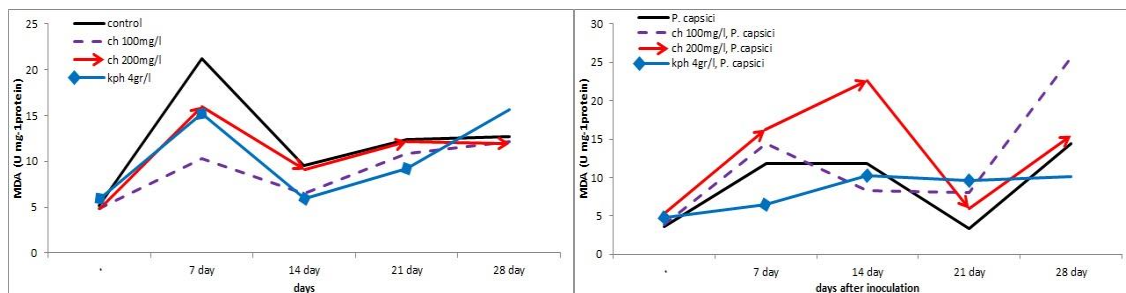
نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان فعالیت مالون دی‌آلدئید (U mg⁻¹ protein) ۲۵/۵۷ مربوط به تیمار کیتوزان با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در شرایط آلودگی با قارچ در روز بیست و هشتم پس از آلودگی و کمترین میزان آن (۳/۳۵ U mg⁻¹ protein) مربوط به گیاهان آلوده به عامل بیماری در روز بیست و یکم به ثبت رسیده است (جدول ۴-۱۳).

جدول ۴-۱۳ مقایسه میانگین آثار متقابل تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ *P. capsici* بر میزان فعالیت مالون دی آلدئید (U mg⁻¹ protein) در طی روزهای مختلف

تیمارها	زمان	صفر	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱	روز ۲۸
شاهد		۵/۱۶	۲۱/۱۸	۹/۵۵	۱۲/۴۰	۱۲/۶۵
کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۴/۹۰	۱۰/۳۳	۶/۴۵	۱۰/۸۵	۱۲/۱۴
کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۴/۹۰	۱۶/۰۱	۹/۰۴	۱۲/۱۴	۱۱/۸۸
فسفیت پتاسیم (۴ g/l)		۵/۹۴	۱۵/۲۴	۵/۹۴	۹/۳۰	۱۵/۷۵
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l)		۱۰/۰۷	۵/۹۴	۶/۲۰	۹/۵۵	۱۶/۰۱
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l)		۸/۰۰	۲۲/۴۷	۱۶/۵۳	۷/۴۹	۱۵/۵۰
قارچ <i>P. capsici</i>		۳/۶۱	۱۱/۸۸	۶/۲۰	۳/۳۵	۱۴/۴۶
کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۳/۸۷	۱۴/۴۶	۸/۲۶	۸/۰۰	۲۵/۵۷
کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۵/۴۲	۱۶/۲۷	۲۲/۷۳	۵/۹۴	۱۵/۵۰
فسفیت (۴ g/l) + قارچ		۴/۹۰	۶/۴۵	۱۰/۳۳	۹/۵۵	۱۰/۰۷
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۱۰۰ mg/l) + قارچ		۱۰/۵۹	۱۳/۹۵	۸/۰۰	۶/۴۵	۱۳/۱۷
فسفیت (۴ g/l) + کیتوزان (۲۰۰ mg/l) + قارچ		۷/۲۳	۱۷/۸۲	۲۵/۰۵	۵/۴۲	۱۳/۶۹

LSD_{5%}: ۱/۲۴ ، LSD_{1%}: ۱/۶۴

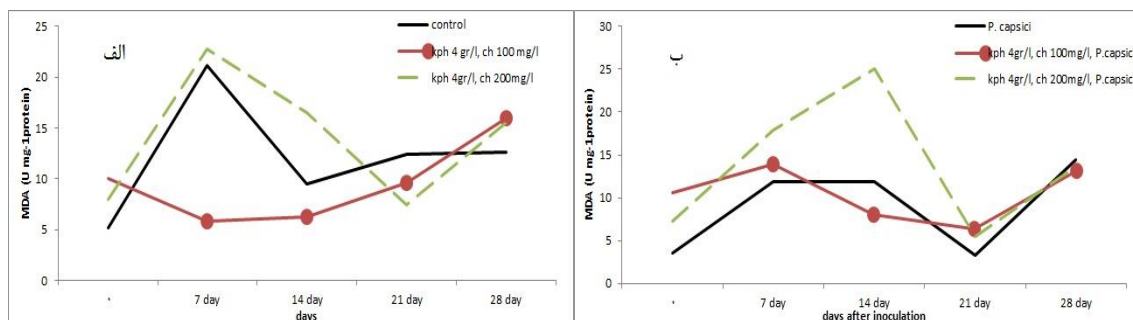
در شکل ۴-۱۷ مشاهده می‌شود که افزایش فعالیت میزان مالون دی آلدئید در تیمارهای شاهد، فسفیت پتاسیم و غلظت‌های مختلف کیتوزان در شرایط عدم تلقیح در روز هفتم ثبت رسیده و بیشترین میزان آن مربوط به تیمار شاهد است. از طرفی دیگر پیش تیمار کیتوزان در گیاهان آلوده به عامل بیماری سبب افزایش میزان مالون دی آلدئید شده است، به نحوی که غلظت ۱۰۰ میلی گرم کیتوزان پس از گذشت ۷ روز از تلقیح و غلظت ۲۰۰ میلی گرم کیتوزان بعد از سپری شدن ۱۴ روز از زمان آلودگی با عامل بیماری سبب افزایش میزان مالون دی آلدئید شدند، درحالی که تیمار گیاهان با فسفیت پتاسیم در این شرایط سبب ایجاد تغییر محسوس و معنی داری نشده است.



شکل ۴-۱۷ روند تغییرات فعالیت مالون دی‌آلدئید در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم

آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گروه‌های قارچی شامل کیتین و کیتوزان، باعث تحریک مکانیسم‌های دفاعی گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود (کانگ و همکاران، ۲۰۰۴). در شرایط عادی رشد، بسیاری از فرآیندهای متابولیکی در گیاهان باعث تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌شوند، اما گیاهان مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی کارآمدی برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن دارند. تحت شرایط تنش این تعادل به هم خورده و مقدار گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابند. حضور این گونه‌های فعال برای گیاه مضر بوده و موجب آسیب به ساختارهای سلولی مثل غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (نادری و همکاران، ۱۳۹۴). بررسی غلظت مالون دی‌آلدئید بافت گیاهی می‌تواند بیانگر میزان تخریب غشا سلولی باشد زیرا این ترکیب تحت تأثیر تخریب و پراکسیده شدن غشا سلولی آزاد می‌شود (پاتاچاریا و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین بر اساس شکل ۴-۱۸ میزان مالون دی‌آلدئید در شرایط استفاده توام از فسفیت پتاسیم و کیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در گیاهان خیار بدون تلقیح قارچ عامل بیماری، نسبت به تیمار شاهد کمتر بوده است. نظر به اینکه میزان مالون دی‌آلدئید نشانگر تخریب سلولی و خسارت به سلول می‌باشد بنابراین استفاده همزمان دو القاگر مورد استفاده توانست میزان خسارت را در طول زمان کاهش دهد. افزون بر این، ترکیب تیماری ذکر شده در گیاهان آلوده به عامل بیماری نیز تا حدودی عامل کاهش میزان مالون دی‌آلدئید و در نهایت خسارت وارده به گیاه شده است.

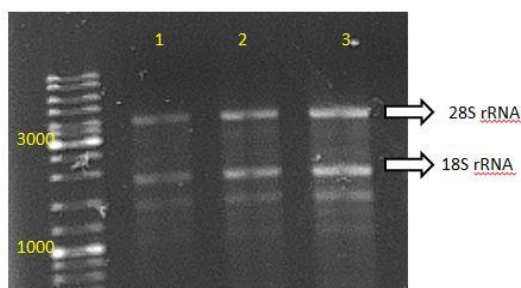


شکل ۴-۱۸ روند تغییرات فعالیت مالون دی آلدئید در گیاه خیار تحت تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط: (الف) عدم آلودگی با قارچ (ب) تحت تنش قارچ *P. capsici*

۳-۴ بیان ژن

۳-۴-۱ الگوی الکتروفورزی RNA استخراج شده از برگ خیار

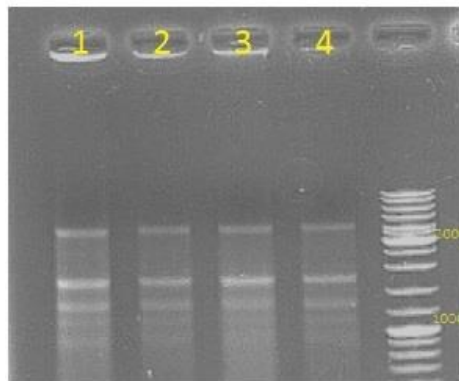
در نمونه‌های یوکاریوتی RNA کل استخراج شده سالم و دو باند ۲۸S rRNA و ۱۸S rRNA باید به صورت واضح و بدون کشیدگی بوده و شدت باند ۲۸S rRNA نیز دو برابر باند ۱۸S rRNA باشد. این ویژگی‌ها می‌تواند شاخص مناسبی برای کیفیت RNA استخراجی باشد (شکل ۴-۱۹).



شکل ۴-۱۹ نمونه‌های RNA استخراج شده از برخی تیمارها چاهک: ۳ و ۲، ۱ تکرار نمونه بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد

۳-۴-۱-۱ بررسی کیفیت RNA بعد از تیمار با DNase

پس از استخراج RNA، برای اطمینان از عدم آلودگی به DNA نمونه‌های استخراج شده با آنزیم DNase طبق پروتکل مربوطه تیمار شده و دوباره با استفاده از ژل آگارز کیفیت و کمیت RNA مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴-۲۰).



شکل ۴-۲۰ الگوی الکتروفورزی نمونه‌های RNA استخراج شده بعد از تیمار با DNase چاهک: ۱ تا ۴ تکرار یک نمونه بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد

۴-۳-۱-۲ بهینه‌یابی شرایط PCR با cDNA

بهینه‌یابی غلظت، مقادیر مواد مصرفی موجود در فرآیند PCR و برنامه دمایی این فرآیند با دستگاه ترموسایکر صورت گرفت. این واکنش با استفاده از غلظت‌های مختلف cDNA به عنوان رشته‌ی الگو و از آنزیم Taq DNA polymerase و $MgCl_2$ و پرایمر انجام شد. محصولات حاصل از واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴-۲۱).

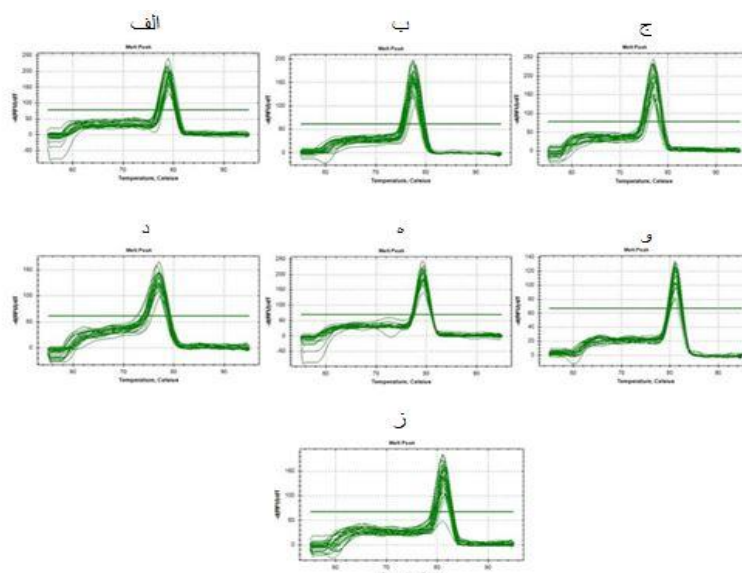


شکل ۴-۲۱ الگوی الکتروفورزی محصولات PCR با cDNA حاصل از RNA از بافت برگ گیاه چاهک‌ها از چپ، باندها مربوط به ژن‌های اکتین ۱۵۵ bp، شبه تاوماتینی (TLP) ۱۲۰ bp، گلوکاتینون پراکسیداز (Gpx) ۱۰۱ bp، (RBOH) ۱۳۹ bp، (PR-4) ۱۷۱ bp، (HIR) ۱۷۱ bp، (HPL) ۱۰۴ bp، ۱۸۵

۴-۳-۲ بررسی منحنی‌های ذوب واکنش Real-Time PCR

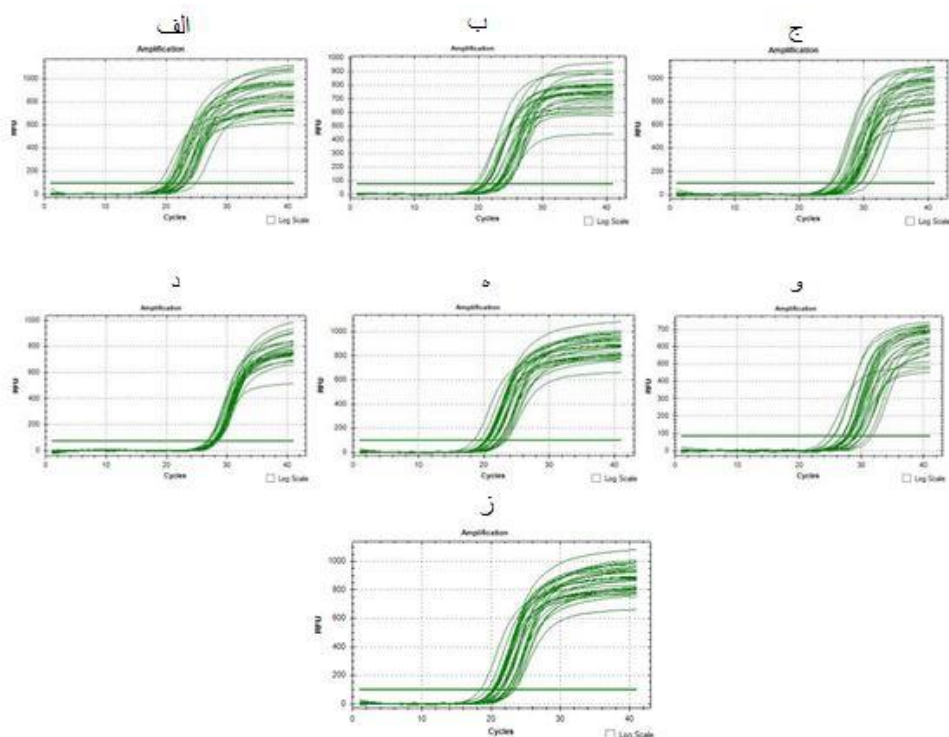
در نقطه ذوب (T_m) نیمی از پیوندهای هیدروژنی در DNA های دو رشته‌ای از هم جدا شده و میزان فلورسانس بطور ناگهانی تغییر می‌یابد. منحنی‌های ذوب مبتنی بر دما بوده و همزمان با منحنی

فلورسنت رسم می‌شود. در صورتی که منحنی ذوب حاصل دارای یک پیک باشد و با توجه به قرارگیری این پیک در بازه‌ی دمایی مناسب می‌توان از اتصال اختصاصی پرایمر به قطعه مورد نظر اطمینان حاصل کرد. بدیهی است که ترسیم چند پیک توسط دستگاه نشان دهنده‌ی تکثیر غیراختصاصی قطعات و یا تشکیل پرایمر-دایمر می‌باشد. به همین منظور در این مطالعه نیز دمای ذوب آغازگرها در محدوده دمایی اتصال تا دمای 95°C مورد بررسی قرار گرفت که بررسی نمودارهای ژن مرجع (Actin) و ژن‌های گلوکوتایون پراکسیداز (Gpx)، پروتئین شبه تاوماتینی (TLP)، انفجار اکسیداتیوی RBOH، پروتئین‌های واکنش القائی فوق حساسیت (HIR)، هیدروپراکسید لیاز (HPL) و اندوکیتیناز (PR-4) در فازهای مختلف واکنش حاکی از آن است که تشکیل پرایمر-دایمر وجود ندارد و نمودار دمای ذوب آغازگرها از کیفیت مناسبی برخوردار می‌باشند. همان‌طور که در شکل ۴-۲۲ مشاهده می‌گردد تک پیک ظاهر شده در منحنی‌های ذوب حاصل از تکنیک Real-Time PCR به صورت نوک تیز و در بازه‌ی دمایی مناسبی قرار گرفته است که نشان دهنده‌ی عملکرد اختصاصی پرایمرها و تولید قطعات مورد نظر می‌باشد.



شکل ۴-۲۲ منحنی‌های ذوب محصولات Real-Time PCR از ژن‌های (الف) اکتین ACT، (ب) گلوکوتایون پراکسیداز GPX، (ج) پروتئین شبه تاوماتینی TLP، (د) انفجار اکسیداتیوی RBOH، (ه) پروتئین‌های واکنش القائی فوق حساسیت HIR، (و) هیدرو پراکسید لیاز HPL، (ز) اندو کیتیناز PR-4

در این مطالعه بررسی تغییر میزان بیان ژن‌های نام برده در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، فسفیت پتاسیم ۴ گرم در لیتر، فسفیت پتاسیم ۴ گرم در لیتر × کیتوزان ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، قارچ، قارچ × کیتوزان ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، قارچ × فسفیت پتاسیم ۴ گرم در لیتر، قارچ × فسفیت پتاسیم ۴ گرم در لیتر × کیتوزان ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در بازه زمانی معین مورد بررسی قرار گرفت و آنالیز منحنی فلورسنس ترسیم شده توسط دستگاه نشان داد که قطعات مورد نظر با کارایی بالا تکثیر شدند (شکل ۴-۲۳).



شکل ۴-۲۳ منحنی‌های فلورسانس محصولات Real-Time PCR برای ژن‌های (الف) ACT، (ب) GPX، (ج) TLP، (د) RBOH، (ه) HIR، (و) HPL، (ز) PR-4

۴-۳-۳ بررسی اثر فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر میزان بیان ژن‌های دخیل در

مقاومت به قارچ *P. capsici*

با توجه به جدول ۴-۱۴ تمامی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای زمان، قارچ، فسفیت پتاسیم و کیتوزان در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان بیان ژن گلووتاتیون پراکسیداز (Gpx) معنی دار بود.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تمامی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای ذکر شده بر میزان بیان ژن پروتئین شبه تاوماتینی (TLP) در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند و فقط آثار متقابل چهارگانه تمامی فاکتورها و اثر دوگانه (قارچ×فسفیت) و (قارچ×کیتوزان) تاثیر معنی‌داری بر میزان بیان این ژن نداشتند.

بر اساس جدول تجزیه واریانس کلیه آثار اصلی و متقابل فاکتورهای مورد بررسی بر میزان بیان ژن انفجار اکسیداتیو RBOH در سطح احتمال ۱ درصد و تنها اثر متقابل دوگانه (قارچ×فسفیت) در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود.

با توجه به جدول ۴-۱۴ کلیه آثار اصلی و متقابل فاکتورهای نام برده بر میزان بیان ژن‌های پروتئین القائی فوق حساسیت (HIR)، ژن هیدروپراکسید لیاز (HPL) و ژن اندوکیتیناز (PR-4) در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند.

جدول ۴-۱۴ نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات میزان بیان ژن‌های گلوکوتاتیون پراکسیداز GPX، پروتئین شبه

تاوماتینی TLP، انفجار اکسیدتیوی RBOH، پروتئین‌های واکنش القایی فوق حساسیت HIR، هیدرو پراکسید لیا

HPL و اندو کینیناز PR-4

میانگین مربعات						درجه آزادی (df)	منابع تغییرات
PR-4	HPL	HIR	RBOH	TLP	Gpx		
۶۸۲۷/۲۶**	۹۷۴/۵۴**	۱۷۴۰۷/۸۹**	۱۵۳/۴۷**	۳۴/۷۲**	۲۳/۵۳**	۳	زمان (T)
۵۰۲۵/۹۰**	۱۲۰۳/۲۶**	۱۸۳۹۶/۰۲**	۱۴۲/۲۹**	۳۰/۷۶**	۵۷/۵**	۱	قارچ (F)
۹۴۳۹/۹۲**	۶۴۲/۳**	۱۲۷۰۳/۱۷**	۱۶۰/۹۵**	۸/۶۵**	۴۱/۶۲**	۱	فسفیت (P)
۶۲۰۲/۸۴**	۲۹۱/۷۹**	۶۱۸۲/۳۱**	۱۹۵/۸۷**	۴/۱۴**	۴۲/۰۴**	۱	کیتوزان (K)
۶۴۴۲/۰۹**	۹۲۰/۱۴**	۱۶۷۷۷/۷۹**	۱۰۳/۹۶**	۱۸/۳۷**	۱۹/۵۸**	۳	زمان × قارچ
۷۱۵۱/۷۳**	۹۱۵/۴۳**	۱۶۳۵۳/۰۴**	۱۱۵/۴۴**	۶/۴۶**	۶/۵**	۳	زمان × فسفیت
۳۷۶۲/۳۳**	۱۹۱/۱۳**	۳۰۸۲/۲۱**	۷۷/۵۵**	۶/۹۴**	۷/۹۹**	۳	زمان × کیتوزان
۳۲۱۳/۵۲**	۶۵۹/۹۹**	۱۳۱۰۴/۷۳**	۵۴/۷۲*	۰/۱۵ ^{ns}	۱۲/۷۶**	۱	قارچ × فسفیت
۵۹۴۳/۱۷**	۳۰۲/۲۵**	۴۶۹۳/۵۷**	۱۲۸/۷۶**	۱/۴ ^{ns}	۲۸/۳۳**	۱	قارچ × کیتوزان
۴۴۴۷/۸۲**	۲۲۶/۹۲**	۱۲۹۵/۱۸**	۱۰۱/۳۳**	۴/۹۶**	۷۳/۱۵**	۱	فسفیت × کیتوزان
۷۷۰۵/۴۴**	۸۶۴/۹۷**	۱۵۷۵۵/۱۸**	۱۳۴/۶۹**	۲۲/۳۰**	۱۳/۸۲**	۳	زمان × قارچ × فسفیت
۵۴۰۴/۵۷**	۱۷۳/۷۵**	۳۴۶۵/۵۵**	۷۷/۶۳**	۱۱/۲۳**	۸/۳۱**	۳	زمان × قارچ × کیتوزان
۳۶۳۴/۰۷**	۱۵۴/۲۵**	۲۹۸۸/۶۹**	۶۷/۲۶**	۸/۱۴**	۶۳/۷۸**	۱	قارچ × فسفیت × کیتوزان
۴۱۲۵/۴۸**	۳۲۹/۹۶**	۳۳۵۲/۸۳**	۹۴/۳۱**	۱۶/۲۰**	۶/۹۹**	۳	زمان × فسفیت × کیتوزان
۶۲۶۹/۳۲**	۳۰۳/۱۳**	۳۷۶۱/۲۹**	۱۵۳/۷۷**	۱/۳۱ ^{ns}	۲۲/۹۹**	۳۱	زمان × قارچ × فسفیت × کیتوزان
۰/۹۶	۰/۹۵	۰/۹۷	۰/۸۵	۰/۹۳	۰/۸۸	۶۴	خطا
۸۳/۲۷	۸۴/۳۲	۶۰/۷۳	۱۰۵/۰۴	۳۴/۶۵	۵۱/۷۹		ضریب تغییرات

ns و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح ۱ درصد، معنی‌داری در سطح ۵ درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

۴-۳-۱- الگوی تظاهر ژن گلوکوتاتیون پراکسیداز^۱ (Gpx)

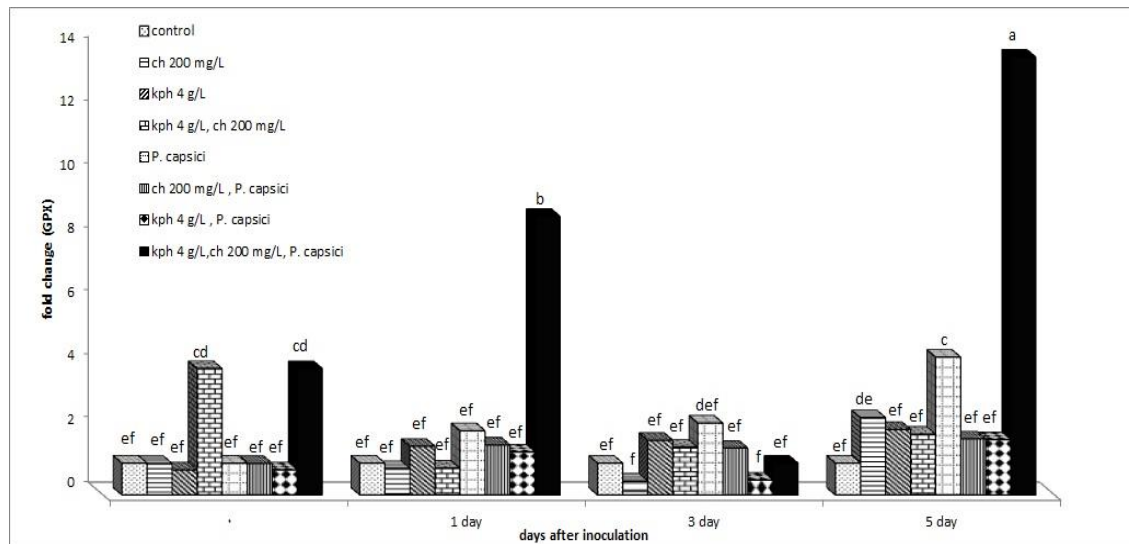
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل چهار گانه فاکتورهای زمان، قارچ *P. capsici*،

فسفیت پتاسیم و کیتوزان بر میزان بیان ژن گلوکوتاتیون پراکسیداز برگ گیاه خیار در سطح احتمال

۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۱۴). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان بیان

¹ Glutathion peroxidase

ژن گلوتاتیون پراکسیداز در این تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان در روز پنجم پس از تلقیح به ثبت رسیده است (شکل ۴-۲۴). در این شرایط بیان این ژن ۱۳/۷۵ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش پیدا کرده است.



شکل ۴-۲۴ تغییرات بیان ژن گلوتاتیون پراکسیداز (Gpx) در گیاهان خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف

فسفولیپید هیدروپروکسید گلوتاتیون پراکسیداز (PHGPX) یک عضو از خانواده گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) بوده و یک آنزیم آنتی اکسیدانی منحصر به فرد است که می‌تواند به‌طور مستقیم از میزان هیدروپراکسید موجود در فسفولیپید و لایه‌های لیپیدی غشای زیستی بکاهد، علاوه بر این دیگر اعضای خانواده GPX از H_2O_2 و دیگر هیدروپراکسیدهای آلی به عنوان پیش ماده استفاده می‌کنند، در نتیجه PHGPX برای حفاظت از غشاء سلول در تنش اکسیداتیو نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند (فالتین و همکاران، ۲۰۱۶).

در آزمایشی اثر الیگوکیتوزان به عنوان القاگر بر مسیر بیوسنتز سالیسیلیک اسید در چندین رقم گیاه آرابیدوپسیس تحت تنش ویروس موزائیک تنباکو (TMV) بررسی شد. در این مطالعه مشاهده گردید که الیگوکیتوزان سبب القای مقاومت به TMV در انواع وحشی و گیاهان آرابیدوپسیس موتانت در مسیر جاسمونیک اسید (jar1) شده ولی در گیاهان آرابیدوپسیس موتانت در مسیر سالیسیلیک اسید

(NahG) این گونه نبوده است. افزایش بیان ژن PR-1 در اثر الیگوکیتوزان نیز توسط محققان گزارش شد. این ژن به عنوان یک نشانگر در مسیر سیگنالینگ سالیسیک اسید شناخته شده است. طبق نتایج اعلام شده از مطالعه مذکور افزایش بیان ژن در نوع وحشی و jar1 گزارش شده و در نوع NahG مشاهده نشده است. تمامی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که الیگوکیتوزان با فعال سازی مسیر سیگنالینگ اسید سالیسیک سبب ایجاد مقاومت به TMV در گیاهان آرابیدوپسیس شده است (ژیا و همکاران، ۲۰۱۶).

در حالی که در مطالعه ژیا و همکاران (۲۰۱۶) اثبات شد که الیگوکیتوزان می‌تواند بیان ژن‌های مقاومت در چرخه بیوسنتز سالیسیک اسید را در جهت ایجاد مقاومت به ویروس TMV در گیاه آرابیدوپسیس افزایش دهد. اما در مطالعه حاضر استفاده از کیتوزان تنها توانسته در بازه زمانی ۲۴ ساعت پس از تلقیح بیان ژن Gpx را افزایش دهد، پس نمی‌توان از کیتوزان به عنوان یک القاگر برای افزایش بیان این ژن استفاده کرد.

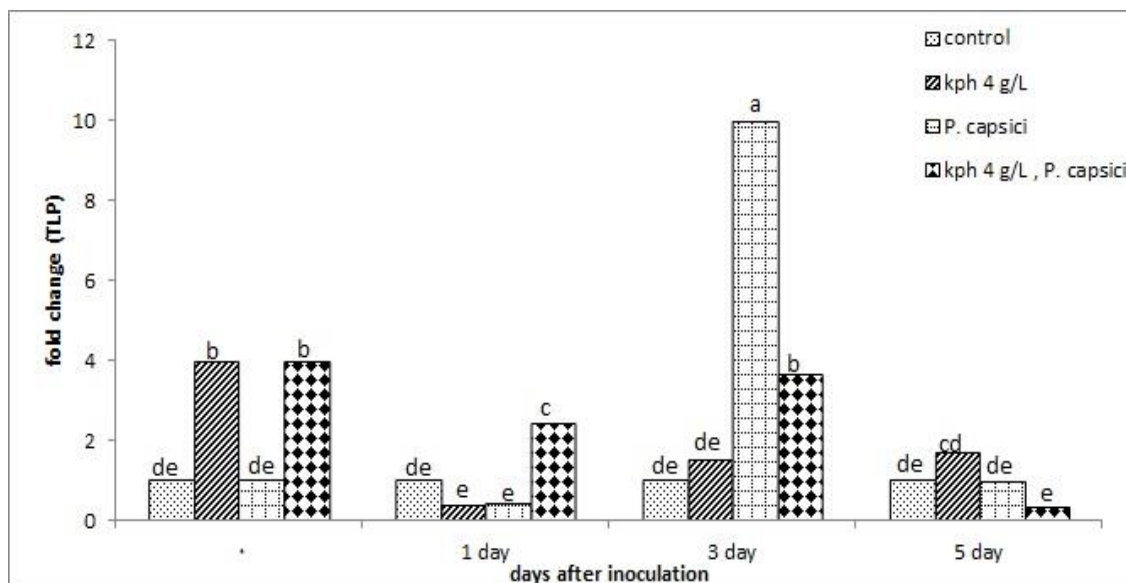
گونه‌های *Phytophthora spp.* پاتوژن‌های همی بیوتروفیک بوده و در شیوه‌ی زندگی خود دارای یک مرحله بیوتروفیک هستند که در ادامه روند زندگی با فاز نکروتوفی آن را تعویض می‌کنند. در فاز بیوتروفیک اولیه، ساختارهایی عفونتی ویژه به نام هستوریا برای شکستن اتصال دیواره سلولی و غشای پلاسمایی سلول میزبان اختصاص یافته‌اند. فاز بیوتروفیک اولیه برای ایجاد عفونت و بیماری بسیار مهم است و پس از شروع آن سریع رشد کرده و فضای بین سلولی را احاطه می‌کند و در نهایت منجر به مرگ سلول میزبان، اسپوراسیون و شروع یک چرخه عفونت جدید می‌شود (ژوپه و همکاران، ۲۰۱۳).

محققان با ایجاد تنش‌های مختلف محیطی اعم از شوری، دمای بالا و آلودگی فلزات سنگین در گیاه *Gossypium hirsutum* میزان بیان خانواده ژنی GPX را سنجیدند و دریافتند که میزان بیان این خانواده ژنی در پاسخ به تنش‌های مختلف محیطی افزایش یافته و به احتمال زیاد در حفاظت سلول نقش موثری بر عهده دارد (چن و همکاران، ۲۰۱۷).

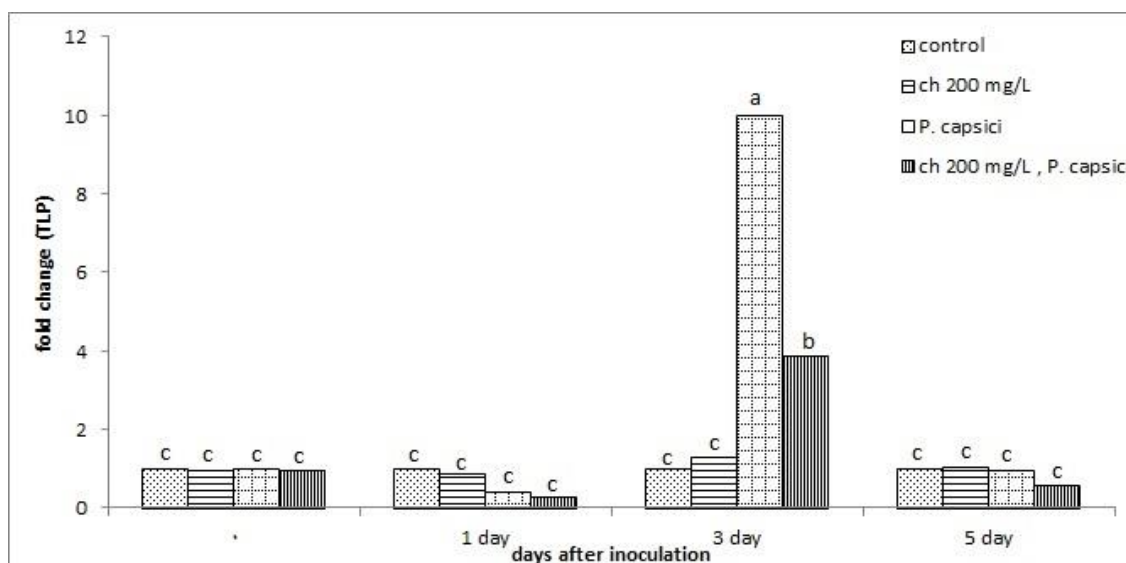
در نتایج حاصل از این پژوهش، افزایش میزان بیان ژن GPX در تمام زمان‌های مورد مطالعه در گیاهان تحت تنش قارچ *P. capsici* نسبت به گیاه شاهد مشاهده گردید. در نتایج این مطالعه علاوه بر تایید اثر افزایش القاگرهای مصرفی بر میزان بیان ژن گلوکاتایون پراکسیداز، بیان این ژن حتی بدون القاگرهای مصرفی نیز در مواجهه با تنش قارچی در تمام روزها نسبت به شاهد افزایش یافت و با توجه به نقش آن در مکانیسم دفاعی، سبب افزایش مقاومت گیاه نسبت به پاتوژن قارچی شده است که با نتایج چن و همکاران (۲۰۱۷) همخوانی دارد.

۲-۳-۳-۴ الگوی تظاهر ژن پروتئین شبه تاوماتینی (TLP)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تمامی آثار متقابل سه گانه (زمان × قارچ × فسفیت پتاسیم)، (زمان × قارچ × کیتوزان) و (زمان × فسفیت پتاسیم × کیتوزان) بر میزان بیان ژن پروتئین شبه تاوماتینی (TLP) در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۴-۱۳). نتایج حاصل از مقایسه میانگین در اثر متقابل سه گانه (زمان × قارچ × فسفیت پتاسیم) و (زمان × قارچ × کیتوزان) نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن TLP مربوط به تیمار قارچ *P. capsici* و در روز سوم پس از تلقیح می‌باشد این ترکیب تیماری توانست میزان بیان این ژن را نسبت به شاهد ۹/۹۹ برابر افزایش دهد (شکل ۴-۲۵ و ۴-۲۶).



شکل ۴-۲۵ تغییرات بیان ژن پروتئین شبه تاوماتینی (TLP) در گیاهان خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف

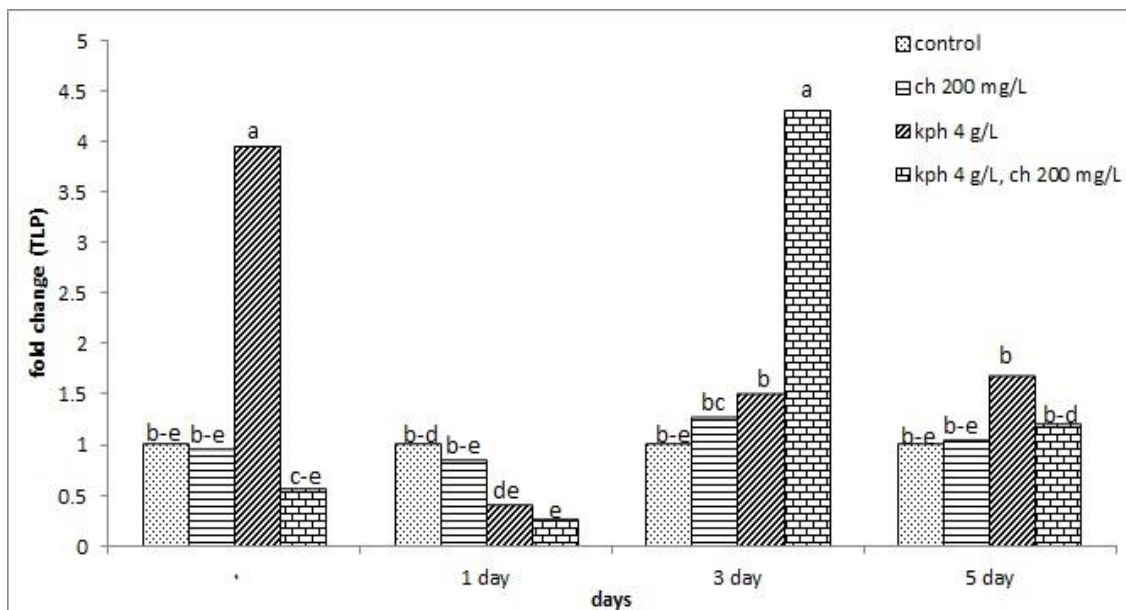


شکل ۴-۲۶ تغییرات بیان ژن پروتئین شبه تاوماتینی (TLP) در گیاهان خیار تحت تیمار کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف

تجمع پروتئین PR-5 (TLP) در گیاهان تحت تنش‌های مختلف مانند شوری، زخم‌ها و حمله پاتوژن دیده شده است، محصول این ژن در بذور گیاهی در حجم بالا انباشته شده و نقش مهمی در حفاظت دانه در مقابل حمله پاتوژن در طول جوانه‌زنی یا ذخیره‌سازی ایفا می‌کند (هرناندز و همکاران، ۲۰۰۵).

در نتایج حاصل از پژوهش حاضر افزایش بیان این ژن در نمونه تلقیح شده با قارچ عامل بیماری مشاهده شده و این روند تا سومین روز پس از تلقیح ادامه داشته و بیشترین میزان بیان ژن را به خود اختصاص می‌دهد. مکانیسم فعالیت PR-5 (TLP) به طور کامل مشخص نیست اما به احتمال زیاد با بر هم زدن خاصیت تراوایی انتخابی دیواره سلولی قارچی سبب لیز شدن بیمارگر می‌شوند. احتمالاً تعداد زیادی از PR ها در طبیعت فعالیت سینرژیستی داشته و همچنین وقتی در آزمایشگاه به طور ترکیبی به کار می‌روند، افزایش فعالیت بازدارندگی رشد قارچ را نشان دهند (هرناندز و همکاران، ۲۰۰۵). با توجه به اینکه پروتئین TLP ممکن است یکی از پروتئین‌های عامل مقاومت و یا به نوعی پیشگیری کننده از بروز بیماری باشد. مرادی (۱۳۹۵) در مطالعه مقایسه ارقام حساس و مقاوم خیار پس از آلودگی سفیدک پودری کدوئیان ناشی از *Sphaerotheca fuliginia* گزارش کرد، در زمان آلودگی گیاهان با قارچ عامل بیماری بیان ژن TLP در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس بیشتر بوده است.

از طرفی دیگر نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که در اثر متقابل سه گانه زمان، فسفیت پتاسیم و کیتوزان، بیشترین میزان بیان ژن پروتئین شبه تاوماتینی مربوط به تیمار فسفیت پتاسیم و در زمان صفر (قبل از تلقیح) و تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان در سومین روز پس از تلقیح می‌باشد، همان گونه که در شکل ۴-۲۷ مشاهده می‌گردد این ترکیب‌های تیماری توانست میزان بیان این ژن را نسبت به شاهد به ترتیب ۳/۹۵ و ۴/۳۲ برابر افزایش دهد. با توجه به اینکه محلول پاشی فسفیت پتاسیم بر روی گیاهان پنج روز قبل از شروع آزمایش صورت گرفته بود این القاگر در این چند روز تاثیر خود را بر میزان بیان ژن TLP گذاشته و در ساعات اولیه آزمایش، افزایش بیان این ژن مشاهده شد و همچنین ترکیب این دو القاگر پس از ۳ روز توانست بر میزان بیان این ژن اثر افزایشی بگذارد.

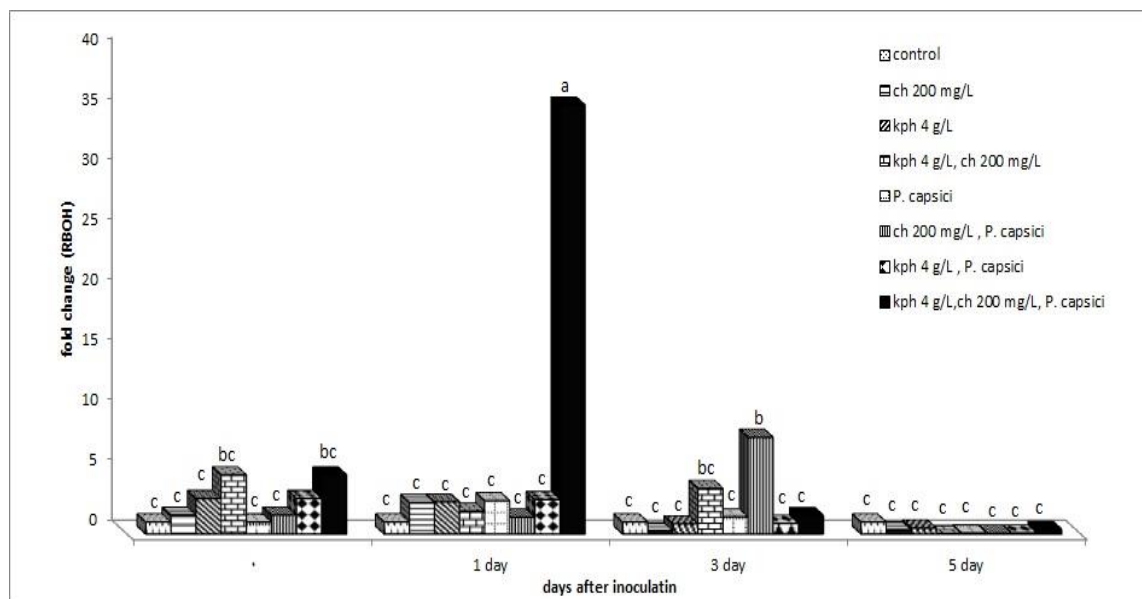


شکل ۴-۲۷ تغییرات بیان ژن پروتئین شبه تاوماتینی (TLP) در گیاهان خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان در شرایط عدم تلقیح با قارچ در طی روزهای مختلف

رضانی و همکاران (۲۰۱۷) از فسفیت پتاسیم قبل و بعد از تلقیح قارچ *Pseudoperonospora cubensis* عامل بیماری سفیدک پودری برای ایجاد مقاومت در گیاه خیار استفاده کردند. این محققان پس از بررسی بیان ژن‌های مقاومت با استفاده از دستگاه Real-Time PCR دریافتند پیش تیمار فسفیت پتاسیم قبل از آلودگی گیاهان با قارچ عامل بیماری سبب تحریک و افزایش بیان ژن‌های پروتئین شبه تاوماتینی (TLP)، پروتئین غنی سازی ریبوزوم (RIP) و دیفنسین شده است، این یافته نشان دهنده دخالت این ژن‌ها در پاسخ دفاعی برگ‌های خیار بعد از تیمار با فسفیت پتاسیم و تلقیح با عامل بیماری سفیدک پودری می‌باشد.

۳-۳-۳-۴ الگوی تظاهر ژن Respiratory burst oxidase homolog (RBOH)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل چهارگانه کلیه فاکتورها بر میزان بیان ژن اکسیداتیو انفجاری در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۴-۱۳). با توجه به شکل ۴-۲۸ میزان بیان این ژن تحت تاثیر تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در اولین روز پس از تلقیح ۳۵/۵۴ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت.



شکل ۴-۲۸ روند تغییرات بیان ژن (RBOH) در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف

تولید سریع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یک بخش مهم از پاسخ دفاعی گیاهان در برابر انواع پاتوژن‌ها محسوب می‌شود (ساگی و همکاران، ۲۰۰۴). اگرچه بسیاری از آنزیم‌ها مثل آدنین دی نوکلئوتید فسفات نیکوتین آمید (NADPH) اکسیداز، پراکسیدازهای دیواره سلولی، آمینوآکسیداز، اگزالات اکسیداز و فلاوین حاوی منابع بالقوه H_2O_2 هستند اما کمپلکس NADPH اکسیداز یکی از مهم‌ترین منابع در انفجار اکسیداتیوی (burst oxidative) محسوب می‌شود. RBOH گیاهی، یکی از پروتئین‌های غشای پلاسمایی است، این ژن اولین بار در سال ۱۹۹۶ در گیاه برنج از ناحیه همولوگ gp91 phox جدا شده و سپس در سایر گونه‌های گیاهی اعم از آرابیدوپسیس، گوجه فرنگی، تنباکو و سیب زمینی شناسایی شد (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

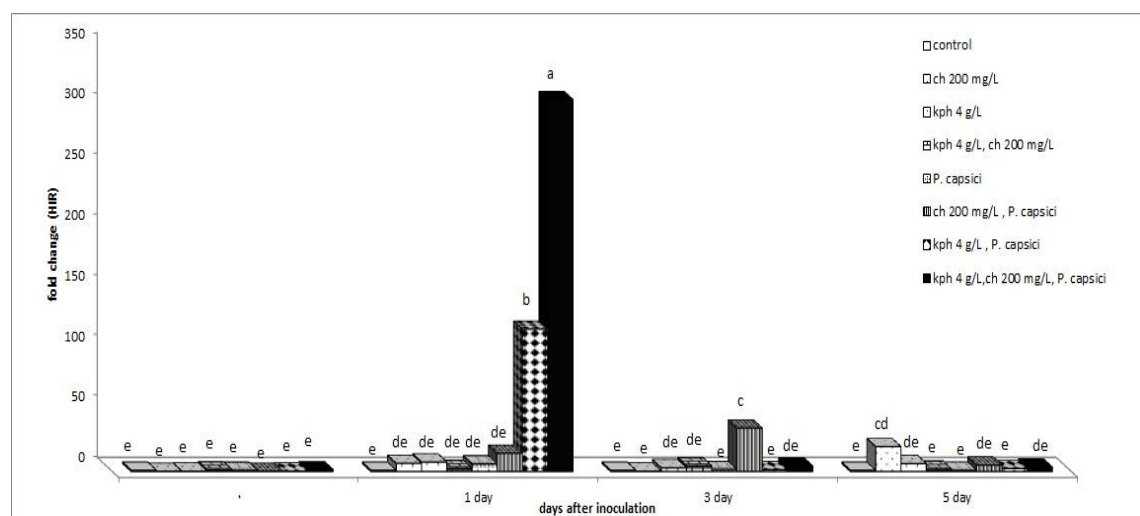
RBOH گیاهی سیتوزولی دارای دومین‌های متصل به FAD و NADPH در انتهای کربوکسیلی بوده و نقش دومین حفاظت شده مشابه NADPH اکسیداز پستانداران را در عرض غشا ایفا می‌کند. بر خلاف نمونه مشابه موجود در پستانداران، RBOH گیاهی دارای یک انتهای آمین سیتوزولی اضافه متشکل از دو موتیف و سایت‌های هدف فسفوریلاسیون است که نقش مهمی را در فعال شدن آن ایفا می‌کند. به محض فعال شدن، سوپراکسید (O_2^-) موجود در آپوپلاست از طریق عملکرد پروتئین‌های RBOH

تولید می‌شود و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به صورت خودبخودی یا کاتالیزی با پراکسید هیدروژن وارد واکنش می‌شود. غشاء نفوذپذیر در برابر H_2O_2 نقش کلیدی را در پیام رسانی مولکولی ایفا می‌کند که این پیام‌ها در تنظیم متابولیسم‌های سلولی دخیل در رشد، توسعه و پاسخ به محرک‌های طبیعی نقش دارند (باکستر و همکاران، ۲۰۱۴).

با توجه به نتایج این مطالعه بیان ژن RBOH توسط تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ عامل بیماری افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های تیمار شده نسبت به شاهد مشاهده شده است.

۴-۳-۳-۴ الگوی تظاهر ژن Hypersensitive-induced response protein (HIR)

بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۴-۱۳) اثر متقابل تمامی فاکتورها بر میزان بیان ژن HIR در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن HIR مربوط به پیش تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در گیاهان تلقیح شده با قارچ در اولین روز پس از آلودگی می‌باشد (شکل ۴-۲۹) افزایش میزان بیان این نسبت به نمونه شاهد ۳۰۶/۱۳ برابر بود.



شکل ۴-۲۹ روند تغییرات بیان ژن (HIR) در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف

پروتئین‌های واکنش القائی فوق حساسیت^۱ یک گروه از پروتئین‌های درگیر در واکنش فوق حساسیت را شامل می‌شوند که در تکثیر سلول، تنظیم کانال‌های یونی و مرگ سلولی دخالت دارند. تا به امروز ژن کد کننده‌ی HIRs در هر دو گروه گیاهان تک لپه و دولپه مانند ذرت، جو، برنج، گندم، تنباکو، آرابیدوپسیس، فلفل و حبوبات شناسایی شده است (زینگ و همکاران، ۲۰۱۵). پروتئین‌های HIR در گونه‌های گیاهی مختلف حاوی توالی‌های حفاظت شده اسیدآمین و همچنین دارای دومین SPFH است که اصطلاحاً به آن PHB دومین می‌گویند (چن و همکاران، ۲۰۱۷). در همین راستا یاسودا و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که بیان ژن پروتئین HIR در ریشه یک رقم از گیاه سویا همزیست شده با سویه‌ای از باکتری ریزوبیوم القاء شده است.

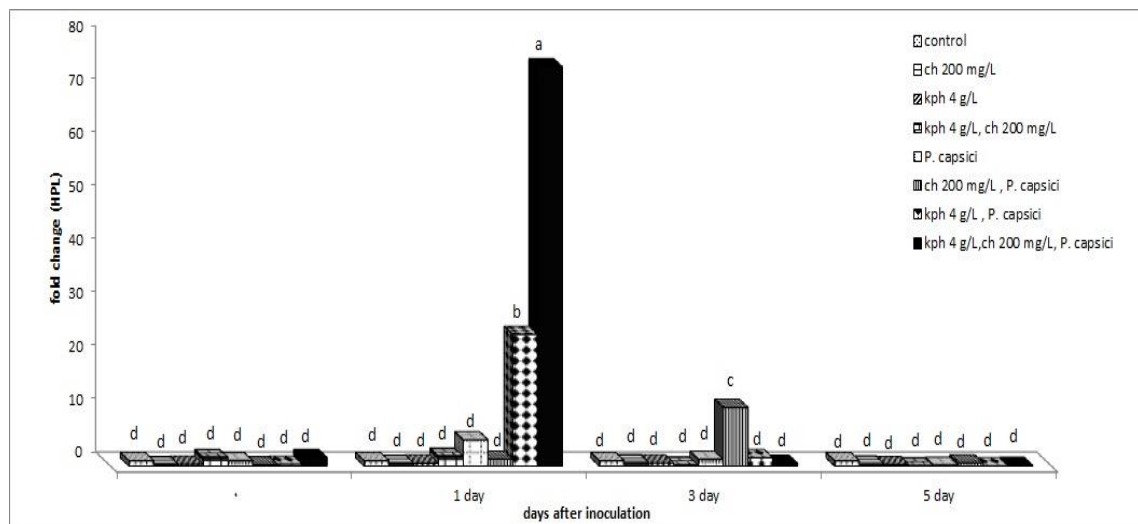
در این مطالعه نیز پیش تیمار همزمان فسفیت پتاسیم و کیتوزان در گیاهان تحت تنش قارچ *P. capsici* سبب افزایش میزان بیان ژن HIR شده است. بیان این ژن به سبب قرارگیری در شرایط تنش اکسیداتیو ناشی از حضور عامل بیماری تحت تاثیر قرار گرفته است پس می‌توان نتیجه گرفت ترکیب تیماری فسفیت پتاسیم و کیتوزان نیز در القاء بیان این ژن موثر باشد چون بیشترین میزان افزایش بیان ژن در این ترکیب تیماری مشاهده شده است.

۵-۳-۳-۴ الگوی تظاهر ژن (HPL) Allene oxide synthase, chloroplastic-like

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۴-۱۳) کلیه آثار متقابل چندگانه فاکتورها بر میزان بیان ژن HPL در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که میزان بیان ژن در گیاه تیمار شده با فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ عامل بیماری در اولین روز پس از تلقیح افزایش یافت و بیان ژن آن ۷۵/۰۶ برابر نمونه شاهد گزارش شد (شکل ۴-۳۰).

¹ Hypersensitive-induced response reaction

پیش تیمار فسفیت پتاسیم به تنهایی در گیاهان آلوده به قارچ عامل بیماری در اولین روز پس از تلقیح سبب افزایش میزان بیان ۲۴/۷۳ برابری بیان این ژن نسبت به شاهد شده است. در حالی که تیمار با کیتوزان در سومین روز آزمایش با افزایش ۱۱/۰۱ برابری نسبت به شاهد سبب تغییر میزان بیان این ژن شده است.



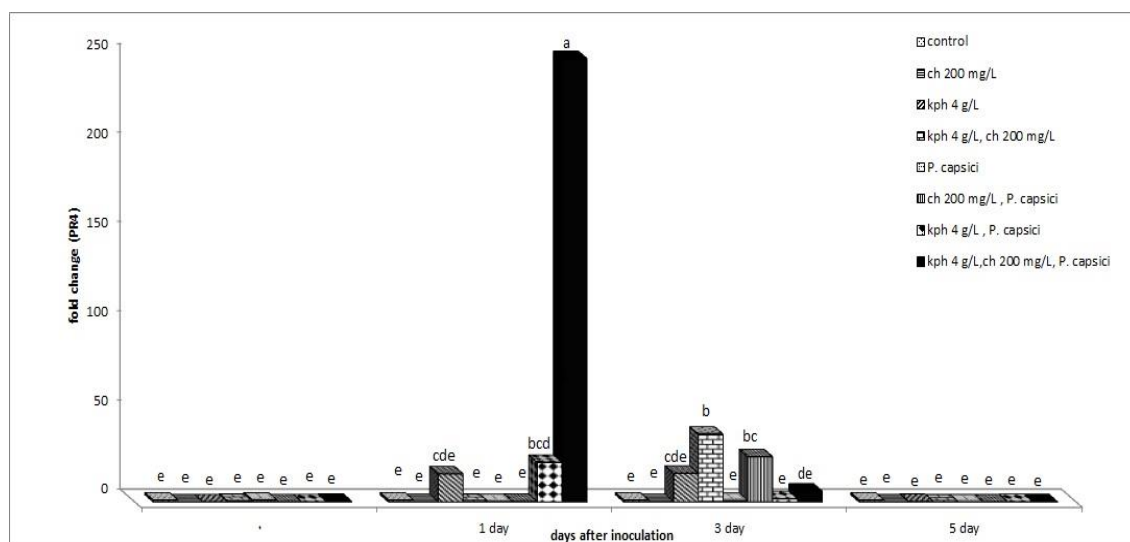
شکل ۴-۳ روند تغییرات بیان ژن (HPL) در گیاه خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف

هیدرو پراکسید لیاز (HPL) تقسیم هیدروپراکسیدهای اسیدهای چرب را به آلدئیدها و اگزواسیدها کاتالیز می‌کند. این آلدئیدهای فرار نقش عمده‌ای در تشکیل عطر بسیاری از میوه‌ها و گل‌های گیاهان را بازی می‌کند. علاوه بر این، فعالیت ضد میکروبی HPL در شرایط *in vitro* به اثبات رسیده است به همین سبب تصور می‌شود که در پاسخ دفاعی گیاه در برابر حمله پاتوژن‌ها و آفات نقش دارد (وانکانیت و همکاران، ۲۰۰۱) و به عنوان سوبسترا از اسید لینولئیک و لینولنیک در واکنش استفاده می‌کند. ژن HPL با ایجاد زخم و جراحت در گیاه القا شده و با توجه به اینکه اولین گام در مسیر بیوسنتز آنزیم HPL است، بنابراین این پدیده یک رویداد اولیه برای آبشار سیگنالینگ بوده که شروع آن با ایجاد زخم یا آسیب توسط گیاهخواران تحریک می‌شود (سیواسنکار و همکاران، ۲۰۰۰). در این مطالعه میزان بیان ژن HPL در نمونه‌های تحت تنش قارچ در روزهای اول و سوم از نمونه‌های شاهد بیشتر بوده است، که نتیجه‌ی حاصل از این بخش با نتایج مطالعات ذکر شده مطابقت دارد. از طرفی

دیگر میزان بیان این ژن کاملاً تحت تاثیر فسفیت پتاسیم و کیتوزان قرار گرفت و در ترکیب تیماری توام این دو القاگر بیشترین مقدار بیان ژن گزارش شده است پس احتمالاً علاوه بر اینکه گیاه تحت تنش قارچ نسبت به نمونه شاهد با افزایش بیان ژن HPL سبب ایجاد مقاومت نسبی در برابر حمله پاتوژن شده است، القاگرهای مورد مطالعه نیز با تحریک میزان بیان این ژن، به گیاه تحت تیمار القاگر و قارچ بر میزان مقاومت گیاه کمک کردند.

۶-۳-۳-۴ الگوی تظاهر ژن PR-4 Like

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تمامی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای ذکر شده بر میزان بیان ژن PR-4 برگ گیاه خیار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۴-۱۳). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها بیشترین میزان بیان ژن PR-4 مربوط به نمونه تیمار شده با فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ عامل بیماری در اولین روز پس از تلقیح می‌باشد (شکل ۴-۳۱). میزان بیان این ژن در تیمار نام برده نسبت به تیمار شاهد ۲۴۸/۵۱ برابر افزایش یافته است.



شکل ۴-۳۱ روند تغییرات بیان ژن (PR-4) در گیاهان خیار تحت تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان و تنش *P. capsici* در طی روزهای مختلف

خانواده PR-4 شامل پروتئین‌های متصل به کیتین با وزن مولکولی پایین که یک دومین مشترک در انتهای کربوکسیلی خود دارند و برخی از آن‌ها دارای خاصیت ضدقارچی می‌باشند. در حالی که نحوه عمل بسیاری از پروتئین‌های PR-4 ناشناخته باقی مانده است برخی از آن‌ها با فعالیت کیتینازی رشد قارچ‌ها را مهار کرده و برخی دیگر از این پروتئین‌ها خاصیت ریبونوکلئازی و DNase نشان دادند. (واقفی و همکاران، ۲۰۱۳).

نتیجه گیری:

در این مطالعه از پیش تیمار کیتوزان فسفیت پتاسیم با غلظت‌های مختلف، ۵ روز قبل از آلودگی با قارچ *P. capsici* عامل بیماری بوته‌میری استفاده شد. پیش تیمار فسفیت پتاسیم و کیتوزان هر کدام به تنهایی و در بازه‌های زمانی مختلف سبب افزایش میزان کلروفیل کل شده‌اند. کیتوزان با تاثیر مثبت بر میزان کلروفیل و شاخص سطح برگ سبب افزایش فتوسنتز و در نهایت بهبود بهره‌وری و افزایش وزن خشک گیاه می‌شود. پرولین در گیاهان شاهد به تدریج افزایش یافته و در نهایت بیشترین مقدار آن در آخرین روز آزمایش مشاهده شده است، با توجه به اینکه گیاهان خیار در هفته سوم مدت زمان آزمایش مرحله گل‌دهی را پشت سر گذاشتند به نظر می‌رسد علت تجمع بیشترین مقدار پرولین در این نمونه افزایش سن گیاه و عبور از مرحله گل‌دهی می‌باشد. همچنین در این پژوهش، دو آنزیم دفاعی آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز تحت تاثیر پیش تیمار کیتوزان قرار گرفتند و بیشترین میزان فعالیت آنها به ترتیب مربوط به روز چهاردهم و هفتم آزمایش می‌باشد. همکاری آنزیم‌های حفاظتی مانند آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در سلول سبب حذف گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) شده و میزان پراکسید هیدروژن را تنظیم می‌کند. استفاده از فسفیت پتاسیم به عنوان پیش تیمار در این آزمایش سبب افزایش آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به ترتیب در روزهای دوم و سوم پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری شده است. پراکسیدازها با کاهش پراکسید در سلول سبب حفاظت غشاء و پروتئین‌های آن از اکسیداسیون می‌شود. آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نام برده به دلیل ایفای نقش حفاظتی و انجام فرآیند تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن در هنگام تنش اکسیداتیو، برای ایجاد مقاومت گیاه در برابر بیماری بسیار دخیل هستند. در این مطالعه مقدار آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در نمونه آلوده شده با قارچ عامل بیماری به ترتیب ۳/۵۵، ۲/۰۸ و ۱۶/۷۷ برابر نمونه شاهد افزایش یافته و این افزایش میزان آنزیم‌ها به ترتیب در روزهای چهاردهم، چهارم و دوم پس از تلقیح مشاهده شده است. در گیاهان پیش تیمار شده با

کیتوزان، بیشترین مقدار آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کمترین میزان پراکسیدهیدروژن در روز چهاردهم پس از تلقیح مشاهده شده است. با توجه به نقش مهم این آنزیم در فرآیند تجزیه پراکسیدهیدروژن و سمت زدایی از سلول، به نظر می‌رسد فعالیت این آنزیم تحت تاثیر پیش تیمار کیتوزان به تدریج افزایش یافته و با تجزیه پراکسیدهیدروژن سبب کاهش خسارت به گیاه می‌شود. در نتایج بخش مولکولی این پژوهش مشاهده شد که در اولین روز پس از آلودگی بیشترین میزان بیان ژن‌های اکسیداتیو انفجاری (RBOH)، پروتئین واکنش فوق حساسیت (HIR)، هیدروپراکسیدلیاز (HPL) و اندوکیتیناز (PR-4) و در روز پنجم پس از تلقیح بیشترین مقدار بیان ژن گلوکاتیون پراکسیداز (Gpx) مربوط به تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش عامل بیماری می‌باشد. گلوکاتیون پراکسیداز یکی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی منحصر به فرد در تجزیه مواد سمی در سلول می‌باشد، بیان این ژن در تنش‌های مختلف محیطی افزایش می‌یابد. نقش موثر این آنزیم در حفاظت از سلول به اثبات رسیده است. ژن انفجار اکسیداتیوی با همکاری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، پراکسید هیدروژن اضافی موجود در سلول را تجزیه می‌کند. بیشترین میزان بیان ژن پروتئین‌های واکنش القائی فوق حساسیت و هیدرو پراکسید لیاز در اثر مصرف توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان در گیاهان آلوده‌شده با قارچ عامل بیماری مشاهده شده است. پروتئین‌های واکنش القائی فوق حساسیت با دخالت در تکثیر سلول، تنظیم کانال‌های یونی و مرگ سلولی در سلول نقش ایفا می‌کند. ژن هیدرو پراکسید لیاز در ابتدا مسیر بیوسنتز آنزیم هیدرو پراکسید لیاز است که با ایجاد زخم یا جراحت در گیاه القا می‌شود به همین علت در پاسخ دفاعی گیاه در برابر حمله پاتوژن‌ها و آفات نقش دارد. با توجه به اینکه میزان بیان ژن‌های HIR، RBOH، HPL و PR-4 در تیمار توام فسفیت پتاسیم و کیتوزان تحت تنش قارچ عامل بیماری در اولین روز پس از تلقیح بیشترین میزان افزایش بیان را از خود نشان دادند به احتمال زیاد فعالیت سینرژیستی بین این ژن‌ها وجود دارد و این ژن‌ها با تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی درصدد ایجاد مقاومت در گیاه برمی‌آیند. همچنین بیشترین میزان بیان ژن GPX نیز مربوط به همین تیمار و در روز پنجم آزمایش به ثبت رسیده است.

پیشنهادهات:

- ◀ اندازه‌گیری سایر آنزیم‌های دفاعی دخیل در ایجاد مقاومت
- ◀ بررسی متابولیت‌ها و صفات موثر در کاهش خسارت عامل بیماری
- ◀ استفاده از دیگر القاگرهای زیستی و بی خطر برای ایجاد مقاومت به انواع بیماری‌های قارچی
- ◀ بررسی دقیق‌تر و تفصیلی ژن‌های دخیل در چرخه‌های مختلف مرتبط با بیماری‌زایی
- ◀ جستجو برای یافتن ژن‌های جدید و مکانیسم عمل آنها در چرخه‌های مرتبط با واکنش دفاعی
- ◀ بررسی مکانیزم عمل کیتوزان و فسفیت پتاسیم بر فعالیت آنزیم‌ها و متابولیت‌های مختلف
- ◀ استفاده از ژن‌های جدید و شناسایی شده در چرخه‌های مقاومت برای فعالیت‌های مربوط به مهندسی ژنتیک و ایجاد گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری‌های قارچی

۱. اسفندیاری، ع. (۱۳۸۷). آثار مخرب انواع اکسیژن فعال، مکانیسم های محافظتی گیاه و ضرورت توجه به آن ها. مقالات دهمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، ۲۱-۲۲.
۲. الهی‌نیا، س. ع. (۱۳۸۲). بیماری شناسی گیاهی و شناخت قارچ ها و سایر عوامل بیماریزا در گیاهان. انتشارات دانشگاه گیلان، چاپ اول، ۶۴۷ صفحه.
۳. پیوست، غ. (۱۳۸۴). سبزیکاری. انتشارات دانش پذیر، چاپ چهارم، ۴۸۷ صفحه.
۴. حسندخت، م. ر. (۱۳۸۷). مدیریت گلخانه (تکنولوژی تولید سبزی ها). انتشارات سلسله، چاپ سوم، ۳۷۶ صفحه.
۵. حیدرزاده دلاور س. (۱۳۹۵). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه صنعتی شاهرود. ۱۰۹ صفحه.
۶. خداپرست، ا. (۱۳۹۲). سلسله قارچ ها. انتشارات دانشگاه گیلان، چاپ دوم، ۹۷۸ صفحه.
۷. ضیغمی نژاد ر. شریفی سیرچی غ. (۱۳۹۲). بررسی بیان ژن های مرتبط به بیمارگر و فعالیت آنزیم های موثر در القای مقاومت به سفیدک پودری کدو توسط اسید سالیسیک، مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۵، شماره ۱، صفحه ۹۷-۱۰۹.
۸. غلام نژاد ج. (۱۳۹۵). ترانسکریپتومیکس و روش های پرکاربرد بررسی بیان ژن های دفاعی گیاه، فصلنامه علمی- پژوهشی بیولوژی کاربردی، دوره ششم، شماره چهارم، زمستان ۹۵، صفحات ۲۱-۴۲.
۹. قاضی محسنی و. صباغ س. ک. اسمعیل زاده بهابادی ص. (۱۳۹۳). کاربرد کیتوزان در مدیریت بیماری های گیاهی، دو فصلنامه علمی- ترویجی دانش بیماری شناسی گیاهی، سال چهارم، جلد ۱، پاییز و زمستان ۱۳۹۳، صفحه ۵۴-۶۳.
۱۰. مرادی ن. (۱۳۹۵). پایان نامه دکتری. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. ۱۳۲ صفحه.
۱۱. مهدوی ب. صفری ح. (۱۳۹۴). اثر کیتوزان بر رشد و برخی ویژگی های فیزیولوژیک نخود در شرایط تنش شوری، فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۴، شماره ۱۲، صفحه ۱۱۷-۱۲۷.
۱۲. مهدوی ب. مدرس ثانوی س. ع. م. آقاعلیخانی م. شریفی م. علوی اصل س. ع. (۱۳۹۳). اثر محلول پاشی کیتوزان بر رشد و خصوصیات بیوشیمیایی گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)، نشریه پژوهشهای زراعی ایران، جلد ۱۲، شماره ۲، صفحه ۲۲۹-۲۳۶.
۱۳. نادری ص. اسمعیل زاده بهابادی ص. فاخری ب. (۱۳۹۴). تاثیر کیتوزان بر برخی شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*)، فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۴، شماره ۱۲، صفحه ۲۹-۴۱.
۱۴. نادری ص. فاخری ب. اسمعیل زاده بهابادی ص. (۱۳۹۳). افزایش بیان ژن چاویکول ۵-متیل ترانسفراز و فعالیت آنزیم های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز گیاه *Ocimum basilicum* تحت تأثیر کیتوزان، مجله علمی-پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی، سال سوم، شماره ۶، صفحه ۱-۹.
۱۵. ولادی س. سلیمانی پری م. ج. خداکرمیان غ. قیاسوند ط. (۱۳۹۲). تاثیر سالیسیک اسید و کیتوزان بر القای مقاومت در نخود علیه عامل بیماری های پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی، بیماری های گیاهی، جلد ۴۹، شماره ۲، صفحه ۱۸۱-۱۹۹.

16. Abdel-Kader, M., El-Mougy, N. S., Aly, M., & Lashin, S. (2012). Integration of biological & fungicidal alternatives for controlling foliar diseases of vegetables under greenhouse conditions. *International Journal of Agriculture & Forestry*, 2(2), 38-48 .

17. **Abkhoo, J., & Sabbagh, S. K. (2016).** Control of *Phytophthora melonis* damping-off, induction of defense responses, & gene expression of cucumber treated with commercial extract from *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1333-1342 .
18. **Abo-Ghalia, H. H., & Khalafallah, A. A. (2008).** Responses of wheat plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi to short-term water stress followed by recovery at three growth stages. *J Appl Sci Res*, 4, 570-580 .
19. **Adams, D. J. (2004).** Fungal cell wall chitinases & glucanases. *Microbiology*, 150(7), 2029-2035.
20. **Adrienne, C. S & a. B., J.H. . (2006).** Parallels in Fungal Pathogenesis on Plant & Animal Host: Eukaryote. *Cell*, 5, 1941-1949 .
21. **Aebi, H. (1984).** Catalase in vitro *Methods in Enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126): Academic Press.
22. **Agrios, G. N. (2005).** Preface *Plant Pathology (Fifth Edition)* (pp. xix-xx). San Diego: Academic Press.
23. **Aldaz CM.(2003).** Serial analysis of gene expression (SAGE) in cancer research. In: Ladanyi M, Gerald WL. Editors. Expression profiling of human tumors, diagnostic & research application. New Jersey: Human press. 2003; p.47-60.
24. **Almagro, L. G. R., L. V. Belchi-Navarro, S. Bru, R. Ros Barceló, A. Pedreño, M. A. (2009).** Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 377-390.
25. **Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. (1997).** “Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper & hybridization with DNA probes” 1997.
26. **&reas W, O. S. (2009).** β -Aminobutyric acid-induced resistance in cucumber against biotrophic & necrotrophic pathogens. *J Phytopathol*, 157, 356-361 .
27. **Arnon, A. N. (1967).** Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23, 112-121 .
28. **Badawy M.E., rabea E.I., Rogge T.M., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W. & Hofte M. (2004).** Synthesis & fungicidal activity of new N, O-acyl chitosan derivatives. *Biomarcromolecules* 5: 589-595.
29. **Bates LS, W. R & Teare ID (1973).** Rapid determination of proline for water stress studies. *Plant & Soil*, 39, 205-208.
30. **Baxter, A. M., Ron Suzuki, Nobuhiro. (2014).** ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1229-1240.
31. **Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971).** Superoxide dismutase: Improved assays & an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.
32. **Bhavani, U., Venkata Subbaiah, K., Sudhakara Rao, A. & Sai Gopal, D.V.R. (1998).** Studies on mpasid disease of sunflower: Biochemical changes & growth parameters. *Indian Phytopath.* 51(4) :357-385.

33. **BELL A.A., H. C. J., LIU L., DAVIS M.R. & SUBBARAO V.K. (1998).** Effects of chitin & chitosan on the incidence & severity of Fusarium yellows of celery. . *Plant Dis*, 82, 322-328 .
34. **Bhattacharjee S. (2005).** Reactive oxygen species & oxidative burst: Roles in stress, senescence & signal transduction in plants. *Current Science*. Vol. 89. N 7. P. 1113–1121.
35. **Bishob J.G., Dean A.M. & Mitchell-Olds T. (2000).** Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 97, 5322-5327.
36. **Blokhina, O., & Fagerstedt, K. V. (2010).** Oxidative metabolism, ROS & NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology & Biochemistry*, 48(5), 359-373.
37. **Bonasera, J. M. K., Jihyun F. Beer & Steven V. (2006).** PR genes of apple: identification & expression in response to elicitors & inoculation with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology*, 6, 23-23.
38. **Bower, L. A., & Coffey, M .D. (1985).** Development of laboratory tolerance to phosphorous acid, fosetyl-Al, & metalaxyl in *Phytophthora capsici*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7(1), 1-6.
39. **Bradford, M. M. (1976).** A rapid & sensitive method for the quantitative titration of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 .
40. **Caverzan &réia, P. G., Rosa, Silvia Barcellos Ribeiro, Carolina Werner, Lazzarotto, Fern &a, Margis-Pinheiro, Márcia. (2012).** Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics & Molecular Biology*, 35(4 Suppl), 1011-1019 .
41. **Ch&ra S, Chakraborty N, Dasgupta A, Sarkar J, P&a K & Acharya K. (2017).** Chitosan nanoparticles: A positive modulator of innate immune responses in plants. *Scientific Reports*.
42. **Ch&ra, A., Saxena, R., Dubey, A., & Saxena, P. (2007).** Change in phenylalanine ammonia lyase activity & isozyme patterns of polyphenol oxidase & peroxidase by salicylic acid leading to enhance resistance in cowpea against *Rhizoctonia solani*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(4), 361-367.
43. **Cervera, M., R. Cautin & G. Jeria. 2007.** Evaluation of calcium phosphite, magnesium phosphate & potassium phosphate in control of *phytophthora cinamomi* in Hass Avocado trees grown in container, proceeding .5.world Avocado congress.
44. **Chen, M., Li, K .,Li, H., Song, C.-P., & Miao, Y. (2017).** The Glutathione Peroxidase Gene Family in *Gossypium hirsutum*: Genome-Wide Identification, Classification, Gene Expression & Functional Analysis. *Scientific Reports*, 7, 44743.
45. **Chen, X. Y & .,Kim, J. Y. (2009).** Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal Behav*, 4.
46. **Conrath, U. B., Gerold J. M. Flors, Victor García-Agustín, Pilar, Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., . . . Mauch-Mani, B. (2006).** Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1062-1071.

47. **Dangl, J. L., Dietrich, R. A., & Richberg, M. H. (1996).** Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 8, 1793-1807 .
48. **Deacan, J. W. S., G. . (1997).** Orientated attachment & cyst germination in *Catnaria anguillulae*, a facultative endoparasite of nematodes. *Mycological Research*, 101, 513-522 .
49. **Di Matteo, A., Bonivento, D., Tsernoglou, D., Federici, L., & Cervone, F. (2006).** Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in plant defence: a structural view. *Phytochemistry*, 67(6), 528-533.
50. **Dixon D.P., C. L., Cole D.J. & Edwards R .(1998).** Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 258-266 .
51. **Dolan TE, C. M. (1988).** Correlative in vitro & in vivo behavior of mutant strains of *Phytophthora palmivora* expressing different resistances to phosphorous acid & fosetyl-Na. . *Phytopathology*, 78, 974-978 .
52. **Duan, S.H., Mathews, D.H. & Turner, D.H. (2006).** Interpreting oligonucleotide microarray data to determine RNA secondary structure: Application to the 3' end of *Bombyx mori* R2 RNA. *Bioche.* 2006; 45:9819-9832.
53. **E. Estrada-Ortiz, L. I. T.-T., F. C. Gómez-Merino, R. Núñez-Escobar & M. S&oval-Villa. (2009).** The effects of phosphite on strawberry yield & fruit quality. *Journal of Soil Science & Plant Nutrition*, 13(3), 612-620 .
54. **Ebadzad, G., & Cravador, A. (2014).** Quantitative RT-PCR analysis of differentially expressed genes in *Quercus suber* in response to *Phytophthora cinnamomi* infection. *SpringerPlus*, 3, 613.
55. **El-Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J. & Asselin, A. . (1992).** Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruit in storage. . *Phytopathology*, 82, 398-402 .
56. **El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., & Benhamou, N. (1997).** Biochemical & cytochemical aspects of the interactions of chitosan & *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biology & Technology*, 12(2), 183-194.
57. **Ershad, D. (2009).** Fungi of Iran. Agricultural Research, Education & Extension Organization .
58. **Esmailzadeh Bahabadi, S. A. U. S. M. A. U. M. J. A. U. S. H. (2014).** The Effect of Chitosan & Chitin Oligomers on Gene Expression & Lignans Production in *Linum album* Cell Cultures. *jmpir*, 1(49), 46 .⁵⁵-
59. **Faltin, Z., Holl&, D., Velcheva, M., Tsapovetsky, M., Roeckel-Drevet, P., H&a, A. K., . . . Perl, A. (2010).** Glutathione Peroxidase Regulation of Reactive Oxygen Species Level is Crucial for In Vitro Plant Differentiation. *Plant & Cell Physiology*, 51(7), 1151-1162.
60. **Förster, H., Adaskaveg, J. E., Kim, D. H., & Stanghellini, M. E. (1998).** Effect of Phosphite on Tomato & Pepper Plants & on Susceptibility of Pepper to *Phytophthora* Root & Crown Rot in Hydroponic Culture .*Plant Disease*, 82(10), 1165-1170.
61. **Foyer, Y. a. H. (1994).** Oxygen metabolism & the regulation of photosynthetic electron transport. . *Causes of photo oxidative stress & amelioration or defense system in plants*, 1-14 .

62. **Garcia. M. Silva Y. & Casariego A.(2014).** “Development of a mayonnaise with chitosan as natural antioxidant,” *Emirates Journal of Food & Agriculture*, vol.26: p835, 2014.
63. **Gill, S. S., N. Tuteja. (2010).** Reactive oxygen species & antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol*, 48(12) .
64. **Goodman, R. N., & Novacky, A. J. (1994).** The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. St Paul: American Phytopathological Society (APS.)
65. **Hammond-Kosack, K. E. J., J. D. (1996).** Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), 1773-1791 .
66. **Haran S., Schickler H. & chet I. (1996).** Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology.*, 142, 2321-2331.
67. **HEIL, M., & Bostock, R. M. (2002).** Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Annals of Botany*, 89(5), 503-512.
68. **Ho HH, L. J., Gong LY (1984).** Mating types of heterothallic species of *Phytophthora* in China. II. . *Acta Mycol Sin*, 3, 29-32 .
69. **Honée, G .(1999) .**Engineered Resistance Against Fungal Plant Pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 105(4), 319-326.
70. **Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005).** Real-time RT-PCR normalisation; strategies & considerations. *Genes & immunity*, 6(4), 279-284 .
71. **Jahn, M. M., & J.M. McCreight. (2002).** Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. In: Powdery Mildews: A compendium. *APS Press* .
72. **Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J.-P., & Mauch-Mani, B. (2001).** β -Aminobutyric Acid-induced Resistance in Plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 29-37.
73. **J&a T., K. E. L., Szalai G. & PAldi E. . (2005).** Investigation of antioxidant activity of maize during in low temperature stress. *Journal of Plant Physiology*, 49, 53-54 .
74. **Jia, X., Meng, Q., Zeng, H., Wang, W., & Yin, H. (2016).** Chitosan oligosaccharide induces resistance to Tobacco mosaic virus in *Arabidopsis* via the salicylic acid-mediated signalling pathway. *Scientific Reports*, 6, 26144.
75. **John M., Rohrig H., Schmidt J., Walden R. & Schell. (1997).** Cell signalling by oligosaccharides. *Trends Plant Sci.*, 2,111-115.
76. **Jupe, J., Stam, R., Howden, A., Morris, a., Zhang, R., Hedley, P. & Huitema, E. (2013).** *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome Biology*. 14:R63.
77. **Kang, S-M., Jung, H-Y., Kang, Y-M., Yun, D-J., Bahk, J-D., Yang, J-k., & Choi, M-S. (2004).** Effects of methyl jasmonate & salicylic acid on the production of tropane alkaloids & the expression of PMT & H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science*, 166(3), 745-751.

78. **Kavi Kishor, P. B. H. K., P. Sunita, M. S. L. Sreenivasulu, Nese. (2015).** Role of proline in cell wall synthesis & plant development & its implications in plant ontogeny. *Frontiers in Plant Science*, 6, 544.
79. **Khatun, S., B&yopadhyay, P. K., & Chatterjee, N. C. (2009).** Phenols with their oxidizing enzymes in defence against black spot of Rose (*Rosa centifolia*). *Asian Journal of Experimental Sciences*. 23(1) 249-252.
80. **Khosrowfar F, B. Z. (2004).** Role of weeds on the survival of *Phytophthora drechsleri* the causal agent of cucurbit damping-off in Fars province. . *Iran J Plant Pathol*, 40, 105-126 .
81. **Kim, C. H., & Palukaitis, P. (1997).** The plant defense response to cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by the viral polymerase gene & affects virus accumulation in single cells. *The EMBO Journal*, 16(13), 4060 .
82. **Kim, M. G., Lee, K. O., Cheong, N. E., Choi, Y. O., Jeong, J. H., Cho, M. J., . . . Lee, S .Y. (1999).** Molecular cloning & characterization of a class III chitinase in pumpkin leaves, which strongly binds to regenerated chitin affinity gel. *Plant Science*, 147(2), 157-163.
83. **Kombrink E, a. S .I. E. (1995).** Defence response of plants to pathogens. In *JH &rews, IC Tommerup, eds, Advances in Botanical Research (incorporating Advances in Plant Pathology)*. Academic Press, London., 21, 1-34 .
84. **Kuk Y.I., s. J. S., Burgos N.R., Hwang T.E., Han O., Cho B.H., Jung S. & Guh J.O. . (2003).** antioxidant enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop science Society of America*, 43, 2109-2117 .
85. **Kurzawińska, H., & Mazur, S. (2009).** The evaluation of *Pythium olig&rum* & chitosan in control of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary on potato plants *Folia Horticulturae* (Vol. 21, pp. 13).
86. **Leubner-Metzger. (2003).** Functions & regulation of β -1,3-glucanase during seed germination, dormancy release & after-ripening. *Seed Sci Res*, 13, 17-34.
87. **Leubner-Metzger, G. (2005).** β -1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *The Plant Journal*, 41(1), 133-145.
88. **Li, J., Mookerjee, B., Singh, P. & Wagner, J.L. (2008).** Generation of BKV-Specific T Cells for Adoptive Therapy Against BKV Nephropathy. *Virology: Research & Treatment*. 2008; 1: 97–107.
89. **Lin, T.-C., Ishizaka, M., & Ishii, H. (2009).** Acibenzolar-S-methyl-Induced Systemic Resistance against Anthracnose & Powdery Mildew Diseases on Cucumber Plants without Accumulation of Phytoalexins. *Journal of Phytopathology*, 157(1), 40-50.
90. **Livak ,K. J., Schmittgen, T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR & the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402-408 .
91. **Lobato, M. C., Machin&iarena, M. F., Tambascio, C., Dosio, G. A. A., Caldiz, D. O., Daleo, G. R .,Olivieri, F. P. (2011).** Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 130(2), 155-163.

92. **Lobato, M. C., Olivieri, F. P., Altamir&a, E. A. G., Wolski, E .A., Daleo, G. R., Caldiz, D. O., & &reu, A. B. (2008).** Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers & foliage. *European Journal of Plant Pathology*, 122(3), 349-358.
93. **Lobato, M. O., F. Daleo, G. &reu, A. (2010).** Antimicrobial activity of phosphites against different potato pathogens. *J Plant Dis Prot*, 3 .
94. **Loon, L. C. v. (1989).** Stress proteins in infected plants *In: Plant-microbe interactions; molecular & genetic perspectives. Vol. 3, T. Kosuge & E.W. Nester (eds.). McGraw-Hill Publ.-Co., New York, USA (1989) 198-237.*
95. **Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. (2008).** RNA-seq: an assessment of technical reproducibility & comparison with gene expression arrays. *Genome Res*, 18(9):1509-17.
96. **Martin, K. J., Rygiewicz, P.T. (2005).** Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology*, 5(1).
97. **Maskos, U. & Southern, E.M. (1992).** Oligonucleotide hybridizations on glass supports-a novel linker for oligonucleotide synthesis & hybridization properties of oligonucleotides synthesized in situ. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20:1679-1684
98. **Masukasu, H., Karin, O., Kyoto, H. (2003)** Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. *Plant Science* 164: 2: 259 - 265.
99. **Matheron, M. E & „Matejka, J. C. (1992).** Effects of temperature on sporulation & growth of *Phytophthora citrophthora* & *P. parasitica* & development of foot & root rot on citrus. *Plant Disease*, 76(1), 1103-1109 .
100. **Ménard, R., Alban, S., de Ruffray, P., Jamois, F., Franz, G., Fritig, B., . . . Kauffmann, S. (2004).** β -1,3 Glucan Sulfate, but Not β -1,3 Glucan, Induces the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco & Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(11), 3020-3032.
101. **Mitchell, H. J., Hall, J. L & „Barber, M. S. (1994).** Elicitor-Induced Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Activity in Lignifying Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves. *Plant Physiology*, 104(2), 551-556 .
102. **Mittler, R. (2002).** Oxidative stress, antioxidants & stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
103. **Mofidnakhaei Maryam, A. V., Dehestani Ali, Pirdashti Hemmatollah & Babaeizad Valiollah. (2016).** Potassium phosphite affects growth, antioxidant enzymes activity & alleviates disease damage in cucumber plants inoculated with *Pythium ultimum*. *Archives of Phytopathology & Plant Protection*, 49(9-10), 207-221.
104. **Moor, U. P., Priit Tõnutare, Tõnu Karp, Kadri Starast, Marge Vool, Ele. (2009).** Effect of phosphite fertilization on growth, yield & fruit composition of strawberries. *Scientia Horticulturae*, 119(3), 264-269.
105. **Moret, A. (2009).** Control of powdery mildew by chitosan. *Plant Pathology* .
106. **Nandeeshkumar P, Jogaiah S, Kini R & Shetty H. (2008).** Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara*.
107. **Nawrocki J., M. S. (2007).** Effectiveness of Biochikol 020 PC in the control of carrot & parsley pathogens. . *Progress on Chemistry & Application of Chitin & its Derivatives, Monograph*, 7, 211-215 .

108. **Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., . . . Mössinger, E. (1995).** Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation & characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato & of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*, 108(1), 17-27 .
109. **Niere J.O. DeAngelis G. & Grant B.R. (1994).** The effect of phosphonate on the acid soluble phosphorus component in the genus *phytophthora*. *Microbiology*, 140: 1661-1670.
110. **Nistico A , Young NS.(1994).** Gamma- interferon gene expression in the bone marrow of patient with aplastic anemia , 1994; Mar: 120: 463-469.
111. **Nobe R., Sakakibara Y., Ogawa K. & Suiko M. (2004).** Cloning & expression of a novel *Trichoderma viride* laminarinase Al gene (lamAl). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (10), 2111-2119.
112. **Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., & Foyer, C. H. (2000).** Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling & redox signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402), 1465-1475 .
113. **Nolan, T., H&s, R.E., Bustin, S.A. (2006).** Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. . *Nature protocols*, 1(3), 1559-1582 .
114. **Olivieri, F. P., Feldman, M. L., Machin&iarena, M. F., Lobato, M. C., Caldiz, D. O., Daleo, G. R & ,&reu, A. B. (2012).** Phosphite applications induce molecular modifications in potato tuber periderm & cortex that enhance resistance to pathogens. *Crop Prot*, 32.
115. **Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., Mathieu, C. (1999).** Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*, 11(4), 305-312 .
116. **Oyarburo, N. S., Machin&iarena, M. F., Feldman, M. L., Daleo, G. R., &reu, A. B., & Olivieri, F. P. (2015).** Potassium phosphite increases tolerance to UV-B in potato. *Plant Physiology & Biochemistry*, 88, 1-8.
117. **Palma-guerrero J., Huang I. c., Jansson H. B., Salinsa J., Lopez-Llorca L. V. & Read N.D. (2009).** Chitosan permeabilizes the plasma membrane & kills cells of *Neurospora crassa* in an energydependent manner. *Fungal Genetic Biology* 46: 585-594.
118. **Pan, & Junmin Wang, Q. S., William J. (2005).** Cilium-generated signaling & cilia-related disorders. *Lab Invest*, 85 (4), 452-463.
119. **Petriccione M, Mastrobuoni F, Pasquariello M, Zampella L, Nobis E, Capriolo G & Scortichini M. (2015).** Effect of Chitosan Coating on the Postharvest Quality & Antioxidant Enzyme System Response of Strawberry Fruit during Cold Storage. *Foods*. 4, 501-523.
120. **Pitson, S. M., Seviour, R. J., & McDougall, B. M. (1993).** Noncellulolytic Fungal β -Glucanases: Their Physiology & Regulation. *Enzyme Microbiology & Technology* 15, 178-192.
121. **Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2001-2007 .

122. **Pfaffl, M. W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002).** Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison & statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9).
123. **PIĘTA D., P. E., PASTUCHA A., . (2006).** Influence of Biochikol 020 PC used as seed dressing of bean on healthiness & yield of plants. *Progress on Chemistry & Application of Chitin & its Derivatives, Monograph*, 6, 159-170 .
124. **Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003).** Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, & high-salinity stresses & abscisic acid application using cDNA microarray & RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology*, 2003; 133: 1755-1767.
125. **Rakha M., e. a.** Evaluation of Fosphite rates against Phytophthora root rot Disease on Cucumber .
126. **Ramezani, M., Rahmani, F., & Dehestani, A. (2017).** Study of physio-biochemical responses elicited by potassium phosphite in downy mildew-infected cucumber plants. *Archives of Phytopathology & Plant Protection*, 1-15.
127. **Ramezani, M., Rahmani, F., & Dehestani, A. (2017).** The effect of potassium phosphite on PR genes expression & the phenylpropanoid pathway in cucumber (*Cucumis sativus*) palnts inoculated with *Pseudoperonospora cubensis*. *Scientia Horticultureae*, 225: 366-372.
128. **Robertsen B. (1986).** Elicitors of the production of lignin-Like compounds in cucumber hypocotyls. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 28, 137-148.
129. **Sagi, M. D., Olga Orazova, Saltanat Yesbergenova, Zhazira Ophir, Ron Stratmann, Johannes W. Fluhr, Robert. (2004).** Plant Respiratory Burst Oxidase Homologs Impinge on Wound Responsiveness & Development in *Lycopersicon esculentum*. *The Plant Cell*, 16(3), 616-628.
130. **Sairam ,R. K., Rao, K. V., & Srivastava, G. C. (2002).** Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity & osmolyte concentration. *Plant Science*, 163(5), 1037-1046.
131. **Seckin, B., Turkan, I., Sekmen, A. H., & Ozfidan, C. (2010).** The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barleygrass) & *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley). *Environental & Experimental Botany*, 69(1), 76-85.
132. **Sergive, I., V. Alexieva & E. Karanov.(1997).** Effect of spermine, atrazine & combination between them on some endogenous protective systems & stress markes in plants. *Comptes redus de lAcademie bulgare des Sciences*, 51, 121-124 .
133. **Sharma P, Bhushan Jha A, Shanker Dubey R, & Pessarakli M.(2016).** Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, & Antioxidative DefenseMechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. Vol 2012. 26 page.
134. **Sheykha SK, Al-malki FM. (2011).** Growth & chlorophyll responses of bean plants to the chitosan applications. *Eur J Sci Res* 50(1): 124–134.
135. **Shibuya, N., & Minami, E. (2001).** Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological & Molecular Plant Pathology*, 59(5), 223-233.

136. **Simmons C.R. (1994).** The physiology & molecular biology of plant 1,3-b-d-glucanases. 1994. *Crit Rev. Plant Sciences.*, 13,325-387.
137. **Sivasankar, S. S., Bay Rothstein, Steven J. (2000).** Expression of Allene Oxide Synthase Determines Defense Gene Activation in Tomato. *Plant Physiology*, 122(4), 1335-1342 .
138. **Soleymani, F., Taheri, Henghameh. (2015).** Effects of Gibberellic Acid, Methyl Jasmonate & Chitosan on Antioxidant Enzyme Activity in Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Int'l Journal of Advances in Chemical Engg, & Biological Sciences (IJACEBS)*, 2(2), 135-138 .
139. **Stehmann C. & Grant B.R. (2000).** Inhibition of the Glycolytic Pathway & Hexosmonophosphate bypass by phosphonate. *Pesticide Biochemestery.*, 67: 13-24.
140. **Stewart, R. R. C., & Bewley, J. D. (1980).** Lipid Peroxidation Associated with Accelerated Aging of Soybean Axes. *Plant Physiology*, 65(2), 245-248 .
141. **Stintzi, A. H., T. Prasad, V. Wiedemann-Merdinoglu, S. Kauffmann, S. Geoffroy, P. Legr&, M. Fritig, B. (1993).** Plant 'pathogenesis-related' proteins & their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75(8), 687-706.
142. **Sun . B., D. L., Xy.Ci, Rf. Guo & Wang, Y. (2004).** Induction ,purification & antifungal activity of beta-1,3-glucanase from wheat leaves. *Plant Pathol*, 30, 399-404 .
143. **Sun, C. h., J.M. Johnson., D. Cai., I. Sherameti., R. Oelmüller & B. Lou. (2010).** Piriformospora indica cofers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes & the plastid-localized CAS protein. *Journal of Plant Physiology*, 167, 1009-1017 .
144. **Taft., R., Pang, K.,C Mercer, T.R., Dinger, M., Matticks, J.S. (2010).** Non-coding RNAs: regulators of disease. *Journal of Pathology*, 220: 126-139.
145. **Tang, W., & Newton, R. J. (2005).** Peroxidase & catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. *Plant Physiology & Biochemistry*, 43(8), 760-769.
146. **Thao, H. T. B., Yamakawa, T., Myint, A. K., & Sarr, P. S. (2008).** Effects of phosphite, a reduced form of phosphate, on the growth & phosphorus nutrition of spinach (*Spinacia oleracea*L.). *Soil Sci Plant Nutr*, 54.
147. **Tiwari BK, O'Donnell CP, Patras A, Brunton N, Cullen PG. (2009).** Anthocyanins & color degradation in ozonated grape juice. *Food Chem Toxicol* 2009 Nov; 47(11):2824-9.
148. **Todaro A, Cimino F, Rapisarda P, Catalano AE. (2009).** Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry* 2009;114(2):434-39.
149. **Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., & Aziz, A. (2006).** Chitosan Stimulates Defense Reactions in Grapevine Leaves & Inhibits Development of Botrytis Cinerea. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), 405-413.
150. **Truong, N. V., Burgess, L. W., & Liew, E. C. Y. (2012).** Greenhouse & field evaluations of potassium phosphonate :the control of Phytophthora foot rot of black pepper in Vietnam. *Archives of Phytopathology & Plant Protection*, 45(6), 724-739.

151. **Vaghefi, N., Mustafa, B. M., Dulal, N., Selby-Pham, J., Taylor, P. W., & Ford, R. (2013).** A novel pathogenesis-related protein (LcPR4a) from lentil, & its involvement in defence against *Ascochyta lentis*. *Phytopathologia Mediterranea*, 192-201 .
152. **Van Loon, L. C. (1997).** Induced resistance in plants & the role of pathogenesis-related proteins. *Eur J Plant Pathol*, 103.
153. **Van Loon, L. C., & Van Kammen, A. (1970).** Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' & 'Samsun NN'. *Virology*, 40(2), 199-211.
154. **van Loon, P., Boller, Conejero, . (1994).** Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(3), 245-264.
155. **Vancanneyt, G. S., Carlos Farmaki, Theodora Paneque, Manuel Ortego, Félix Castañera, Pedro Sánchez-Serrano, Jose J. (2001).** Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 8139-8144.
156. **Vasyukova, N. I., Zinov'eva, S. V., Il'inskaya, L. I., Perekhod, E. A., Chalenko, G. I., Gerasimova, N. G., Ozeretskovskaya, O. L. (2001).** Modulation of Plant Resistance to Diseases by Water-Soluble Chitosan. *Applied Biochemistry & Microbiology*, 37(1), 103-109.
157. **Veladi S, S. P. M. J., Khodakaramian Gh & Ghyasy T.(2013).** Effect of salicylic acid and chitosan on induction of resistance in chickpea agan
158. **VELADI S , S. P. M. J., KHODAKARAMIAN GH , GHYASV& T. (2013).** Effect of salicylic acid & chitosan on induction of resistance in chickpea against fusarial wilt & root rot. *IRANIAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY*, 49, 181-199 .
159. **Visser J, Graffelman W, Blauw B. (2001).** LPS-incubated IL-10 production in whole blood cultures from chronic fatigue syndrome patients is increased but supersensitive to inhibition by dexamethasone. *J Neurimmunol*. 2001; 119(2): 43-349.
160. **Wang FD, F. G., Chen KS (2009).** Burdock fructooligosaccharide induces resistance to tomato mosaic virus in tomato seedlings. *Physiol Mol Plant Pathol*, 74, 34-40.
161. **Wang, Y., Kausch, Albert P. & lee, Joel M. Luo, Hong, Ruemmele, Bridget A. Browning, Marsha, ackson, Noel, Goldsmith, Marian R. (2003).** Co-transfer & expression of chitinase, glucanase, & bar genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance. *Plant Science*. 165(3): 497-506.
162. **Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. (2012).** Dual RNA-seq of pathogen & host. *Nat Rev Microbiol*. 10(9):618-30.
163. **Wilkinson, C. J., Holmes, J. M., Dell, B., Tynan, K. M., McComb, J. A., Shearer, B. L., Hardy, G. E. S. J. (2001).** Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 50(5), 587-593..
164. **Xing, K., Zhu, X., Peng, X., & Qin, S. (2015).** Chitosan antimicrobial & eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 569-588.
165. **Yasuda, M., Miwa, H., Masuda, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., & Okazaki, S. (2016).** Effector-Triggered Immunity Determines Host Genotype-Specific

- Incompatibility in Legume–Rhizobium Symbiosis. *Plant & Cell Physiology*, 57(8), 1791-1800.
166. **Yetişir, H., Sari, Nebahat, Yücel, Seral. (2003).** Rootstock resistance to Fusarium wilt & effect on watermelon fruit yield & quality. *Phytoparasitica*, 31(2), 163-169.
 167. **Zhang, D., & Quantick, P. C. (1998).** Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries & raspberries during storage. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 73 (6): 763-767.
 168. **Zhang, H. F., Qin Zhang, Zhengguang Wang, Yuanchao Zheng, Xiaobo. (2009).** The role of respiratory burst oxidase homologues in elicitor-induced stomatal closure & hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11).
 169. **Zong, H., Liu Song, Xing Rong, Chen Xiaolin, Li Pengcheng. (2017).** Protective effect of chitosan on photosynthesis & antioxidative defense system in edible rape (*Brassica rapa* L.) in the presence of cadmium. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 138, 271-278.

Abstract:

Fungal diseases are one of the main causes of damage & reduced yield of agricultural products. The production of greenhouse cucumber (*Cucumis sativus* L.) have been extensively grown in Iran during the past decades. Damping off caused by various *Phytophthora* species is one of the most important diseases affecting cucumber culture & there are few controlling measures to reduce its damages. In this study, chitosan & potassium phosphite were used as potential resistance inducers & their effect on reducing the damages caused by *Phytophthora capsici* in cucumber plants was investigated. Different physiological, biochemical & metabolic alterations along with changes in expression of glutathione peroxidase (Gpx), tomatine-like protein (TLP), Respiratory burst oxidase homolog (RBOH), Hypersensitive-induced response reaction (HIR), Allene oxide synthase, chloroplast-like (HPL) & Endo chitinase (PR-4) genes were studied at different time-courses after pathogen inoculation. Results showed that in comparison with the control plants, the content of chlorophyll, proline & activity of protective enzymes i.e. ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, guaiac peroxidase, catalase & in accumulation of hydrogen peroxide & malondialdehyde metabolites were significantly changed in different treatments. The highest amount of ascorbate peroxidase enzyme (21/93 U mg⁻¹protein) was recorded in treatment with 200 mg / L chitosan 14 days after infection. Also, the highest activity of guaiacol peroxidase (41/99 U mg⁻¹protein) & catalase (150/34 U mg⁻¹protein) enzymes was observed in treatments including concomitant application of potassium phosphate & chitosan with a concentration of 200 mg / L on the second day after inoculation & time of inoculation, respectively. The highest accumulation of hydrogen peroxide (2/19 U mg⁻¹protein) & malondialdehyde (25/57 U mg⁻¹protein) was recorded 28 days after inoculation in treatment including concomitant application of potassium phosphate & chitosan with a concentration of 200 mg / L. Gene expression analysis showed that the highest expression of RBOH, HIR, HLP and PR-4 genes was reported in potassium phosphate and chitosan simultaneously in the first day after inoculation of the disease, and their expression increased by 35.54, 306/136, 75/6 and 24/259 times the control treatment. The use of potassium phosphate & chitosan by increasing activity of ascorbate peroxidase & catalase protective enzymes, & also induction of expression of the resistance genes were able to induce resistance in cucumber plant that was under stress of the fungus causing damping-off disease.

Keywords: Cucumber, Potassium phosphite, Chitosan, *Phytophthora capsici*, Defensive enzymes & Resistance genes.



Shahrood University of
Technology

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

**Assessment of molecular responses of cucumber plants treated with
potassium phosphite and chitosan inoculated with damping-off causal
agent (*phytophthora sp.*)**

By: Fatemeh khosravi

Supervisor:
Dr. Shahrokh Gharanjik
Dr. Ali dehestani

January, 2018