

A pattern of defense enzymes in bread wheat genotypes in response to take-all disease isolate T-41

Mozhgan Gholizadeh Vazvani 

PhD Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran. Email address: mgholizadehvazvani@yahoo.com

Hossein Dashti 

*Corresponding Author: Professor, Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran. Email address: dashti@vru.ac.ir

Roohallah Saberi Riseh 

Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran. Email address: r.saberi@vru.ac.ir

Abstract

Objective

In plant diseases, enzymes play an important role in limiting the development of fungal disease. The activity of enzymes serves as a biochemical marker for the degree of resistance or sensitivity. Guaiacol peroxidase (GPX), polyphenol oxidase (PPO), and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) are enzymes related to plant defense against pathogens. Wheat (*Triticum aestivum*) is one of the most important food crops in the world. Root diseases have considerable economic impacts on wheat production. Take-all disease (*Gaeumannomyces tritici*) is one of the most destructive root wheat diseases. Therefore, it is necessary to identify the defense reaction of wheat in response to take-all disease through the evaluation of defense enzymes.

Materials and Methods

Nine genotypes of bread wheat germplasm (resistant and susceptible to take-all disease) were selected and planted in the greenhouse under infection and control conditions. Plants were sampled at 0, 7, 14, and 21 days after inoculation, and activities of defense enzymes GPX, PPO, PAL, and phenol content were measured.

Results

Susceptible genotypes have a high level of total phenol content; resistant genotypes have a high level of PAL and GPX enzymes. Increasing all three enzymes simultaneously in resistance genotypes leads to increased vegetative growth and resistance to take-all.

Conclusion

In this study, peroxidase plays an important role in defense against *Gaeumannomyces*. GPX is the only factor associated with the induction of systemic resistance and hypersensitivity reactions. The changes of the GPX enzyme in resistant genotypes in response to infection follow a zig-zag pattern.

Keywords: Resistance, Zig-zag pattern, Defense enzymes, *Gaeumannomyces tritici*.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Gholizadeh Vazvani M, Dashti H, Saberi Riseh R (2024) A pattern of defense enzymes in bread wheat genotypes in response to take-all disease isolate T-41. *Journal of Genetics and Plant Breeding* 1 (1), 1-26.

Journal of Genetics and Plant Breeding 1 (1), 1-26.

DOI: 10.22103/gpb.2024.23281.1010

Received: January 23, 2024.

Received in revised form: March 15, 2024.

Accepted: March 16, 2024.

Published online: April 6, 2024.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,
Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and
Iranian Genetics Society.



© the authors

الگوی آنزیم‌های دفاعی در ژنوتیپ‌های گندم نان در واکنش به بیماری پاخوره گندم

T-41 جدایه (Take-all disease)

مژگان قلی‌زاده وزوانی 

دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران.

رایانامه: mgholizadehvazvani@yahoo.com

حسین دشتی 

*نویسنده مسئول: استاد، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران. رایانامه:

dashti@vru.ac.ir

روح‌اله صابری ریشه 

استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران. رایانامه: r.saberi@vru.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۳ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۶

چکیده

هدف: در بیماری‌های گیاهی، آنزیم نقش مهمی برای محدود نمودن توسعه پاتوژن‌های قارچی ایفا می‌کند. فعالیت آنزیم‌ها می‌تواند به عنوان مارکرهای بیوشیمیایی برای درجه مقاومت یا حساسیت استفاده شود. گایاکول پراکسیداز (GPX)، پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و فنیل آلانین آمونیالیز (PAL) از جمله آنزیم‌های مرتبط با دفاع گیاه در برابر پاتوژن‌ها هستند. گندم (*Triticum aestivum*) یکی از مهمترین محصولات غذایی در جهان است. بیماری‌های ریشه اثرات اقتصادی قابل توجهی بر تولید گندم دارند. بیماری پاخوره گندم که توسط قارچ نکروتروف *Gaeumannomyces tritici* ایجاد می‌شود، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های ریشه گندم در سراسر جهان است. بنابراین شناسایی واکنش دفاعی گندم در عکس‌العمل به بیماری پاخوره از طریق ارزیابی آنزیم‌های دفاعی ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۹ ژنوتیپ ژرم‌پلاسما گندم نان (مقاوم و حساس به بیماری پاخوره) انتخاب و در شرایط آلودگی و شاهد در گلخانه کاشته شدند. برای بررسی فعالیت آنزیم‌های دفاعی مانند GPX، PPO، PAL و محتوای فنل کل، نمونه برداری از گیاهان در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از تلقیح به عامل بیماری انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد، ژنوتیپ‌های حساس، سطح بالایی از محتوای فنل کل و ژنوتیپ‌های مقاوم سطح بالایی از آنزیم‌های PAL و GPX را داشتند. در ژنوتیپ‌های مقاوم، سطح هر سه آنزیم دفاعی بسته به شرایط و زمان بالا رفته و افزایش سطح همزمان هر سه آنزیم در این ژنوتیپ‌ها منجر به افزایش رشد رویشی و غلبه بر آلودگی و مقاومت به بیماری پاخوره گردید.

نتیجه‌گیری: در این بررسی آنزیم GPX نقش بسیار مهمی در دفاع علیه بیمارگر داشت. این آنزیم تنها فاکتوری می‌باشد که تا به حال با القای مقاومت در ارتباط بوده و افزایش فعالیت پراکسیداز با مقاومت سیستمیک و یا واکنش فوق حساسیت همراه می‌باشد. تغییرات آنزیم GPX در روزهای نمونه‌برداری در ژنوتیپ‌های مقاوم در پاسخ به آلودگی از الگوی زیگ‌زاگ تبعیت داشت.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های دفاعی، الگوی زیگ‌زاگ، مقاومت، *Gaeumannomyces tritici*.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: قلی‌زاده وزوانی مژگان، دشتی حسین، صابری ریشه روح‌اله (۱۴۰۳) الگوی آنزیم‌های دفاعی در ژنوتیپ‌های گندم نان در واکنش به بیماری پاخوره گندم (Take-all disease) جدایه T-41. *مجله ژنتیک و به‌نژادی گیاهی*، ۱(۱)، ۱-۲۶.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,

Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and

Iranian Genetics Society

© the authors



مقدمه

مکانیسم‌های دفاعی گیاه از طریق فعال شدن پروتئین‌های دفاعی متعدد به کار گرفته می‌شود. آلودگی با عوامل بیماری‌زا یکی از تنش‌های محرک عمده است که گیاهان با آن روبرو می‌شوند (Anil et al. 2014; Jain & Khurana 2018). در پاسخ به آلودگی سطح بیان بعضی از آنزیم‌ها بالا می‌رود که در برابر بیمارگر القا می‌شود. سطح بیان آنزیم‌های مختلف از ویژگی‌های مهم مقاومت گیاه به عوامل بیماری‌زا می‌باشد (Das et al. 2023; Ribeiro et al. 2023). گایاکول پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیلایز از جمله آنزیم‌های مرتبط با دفاع گیاه در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشند. این آنزیم‌ها اکسیداتیو هستند و در ساخت و استفاده از اکسیژن‌های فعال، تشکیل لیگنین و دیگر فنل‌های اکسید شده به‌عنوان سدهای دفاعی برای استحکام ساختار سلولی دخیل هستند (Asran et al. 2023; Li et al. 2024).

در اکوسیستم‌های زراعی در سراسر جهان، برخی از مهم‌ترین و ویرانگرترین بیماری‌ها توسط پاتوژن‌های قارچی نکروتروف خاکزاد ایجاد می‌شوند که گیاهان زراعی عموماً در برابر آن‌ها مقاومت ژنتیکی ندارند (Kwak & Weller 2013). بیماری پاخوره گندم با عامل *Gaeumannomyces tritici* یک بیماری مخرب ریشه است. این پاتوژن به‌طور گسترده در مناطقی که گندم کشت می‌گردد، باعث ایجاد خسارات قابل توجهی می‌گردد. قارچ پاخوره به‌صورت ساپروفیت و به‌صورت میسلیم در بین بقایای

محصولات موجود در خاک زنده می‌ماند و همچنین می‌تواند در بقایای سایر غلات و علف‌های هرز از خانواده چمن یافت شود. آلودگی اولیه زمانی شروع می‌شود که ریشه‌های نهال‌های جوان با بقایای گیاهی حاوی میسلیوم در تماس باشند و هیف‌های رونده سیاه روی سطح ریشه رشد نمایند تا آلودگی‌های متعدد در طول ریشه‌ها ایجاد شوند. انشعابات هیالین از هیف‌های رونده سیاه منشعب می‌شوند و هیفوئیدیای ساده برای نفوذ به اپیدرم ریشه ایجاد می‌کنند، سپس به قشر ریشه حمله می‌کنند و در نهایت آوند آبکشی را کلونیزه می‌نمایند و از بین می‌برند و مانع جذب آب و مواد مغذی می‌شوند. آلودگی‌های ثانویه از طریق ارتباط ریشه‌ها با یکدیگر اتفاق می‌افتد و گیاهان به شدت آلوده اغلب به صورت لکه‌ای (سفیدرنگ) در مزرعه دیده می‌شوند. در آلودگی‌های شدید، بیماری پاخوره باعث مرگ گیاهچه و در گیاهان بالغ با حمله به طوقه منجر به مرگ گیاهان و در نهایت تاثیر قابل توجهی بر عملکرد گندم می‌شود (Palma-Guerrero et al. 2021; Zhao et al. 2023; Liu et al. 2000). این بیماری به طور گسترده در سراسر مناطق معتدل و همچنین مناطق خشک که کشت گندم انجام می‌شود، شایع است. همچنین در ارتفاعات بالا در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری نیز گزارش شده است (Palma-Guerrero et al. 2021). کاهش عملکرد سالانه بین ۵ تا ۲۰ درصد و در مواقع آلودگی شدید از ۵۰ تا ۶۰ درصد محصول نیز گزارش شده است (Palma-Guerrero et al. 2021; Keenan et al. 2015). در ایران این بیماری بیشتر در استان‌های فارس، آذربایجان غربی، اردبیل، تهران، قم، قزوین، فارس، کردستان، مناطق معتدل کرمانشاه، مازندران، کهگیلویه و بویراحمد، کرمان، گلستان، مرکزی، کرمانشاه و چهارمحال بختیاری دیده شده است (Sajjadi Naeeni & Kazemi 2018).

پژوهش‌های مختلف نشان داده است که وقتی گیاه گندم با حمله قارچ عامل بیماری مواجه می‌شود، با رشد و تولید ریشه اضافی بخشی از کاهش عملکرد را جبران می‌کند (Colbach et al. 1997; Gholizadeh Vazvani et al. 2016; 2017). اقدامات کنترلی بیماری پاخوره گندم عمدتاً شامل تناوب زراعی با محصولاتی غیر از غلات می‌باشد. روش‌های کنترل شیمیایی هم به قارچ‌کش‌های فلوکینکونازول، سلیتیوفام و ۴-کلروسینامالدئید تیوسمی کاربازید (PMDD) محدود می‌شود (Freeman et al. 2005; Wang et al. 2020). استفاده بیش از حد از قارچ‌کش‌ها باعث تکامل مقاومت در برابر قارچ‌کش‌ها شده که در نهایت منجر به کاهش راندمان کنترل شیمیایی می‌گردد (Yun et al. 2012). شناسایی و استفاده از منابع مقاومت ژنتیکی در برابر بیماری پاخوره یک استراتژی مدیریتی ایده‌آل می‌باشد که استفاده از آن برای کشاورزان آسان، مقرون به صرفه و پایدار خواهد بود. در یک غربال‌سازی گلخانه روی ۱۰۰۰ ژنوتیپ گندم که در شرایط گلخانه و آلودگی مصنوعی با جدایه T-41 این قارچ انجام گرفت، ژنوتیپ‌ها بر اساس واکنش به بیماری پاخوره به ۶ گروه از کاملاً مقاوم تا کاملاً حساس تقسیم‌بندی شدند (Gholizadeh Vazvani et al. 2016; 2017). در پژوهش دیگری که در رابطه با واکنش تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم در شرایط آلودگی با قارچ عامل بیماری در شرایط مزرعه انجام شد، مشخص گردید که ژنوتیپ‌های مقاوم در شرایط آلوده از نظر صفات مرتبط با عملکرد و عناصر کم‌مصرف بذر نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها برتری داشتند. همچنین مشخص شد که شدت بیماری اندازه‌گیری شده در گلخانه با ارتفاع گیاه، وزن دانه در خوشه، سطح برگ پرچم، وزن ۱۰۰ دانه و میزان آهن موجود در بذر که در شرایط آلوده به بیماری

اندازه‌گیری شد، همبستگی منفی و معنی‌دار دارد (Gholizadeh Vazvani et al. 2016). مطالعات نشان داده است که بیان دو ژن کد کننده پروتئین منجر به مقاومت سیستمیک در ریشه‌ها می‌شود، می‌تواند منجر به مقاومت به بیماری پاخوره گردد (Bai et al. 2021). مشخص شده است که قارچ *Gaeumannomyces tritici* می‌تواند واکنش فوق حساسیت، که یک مکانیسم دفاعی بر مبنای تولید گونه‌های فعال اکسیژن است از خود نشان دهد (Rejeb et al. 2014). با این حال این مکانیسم دفاعی برای غلبه بر آلودگی کافی نیست (Puga et al. 2015).

پاسخ رونویسی ریشه گندم در مقابل *Gaeumannomyces* نشان داده است که مولکول‌های مرتبط با بیوستز تریتوفان، بیوستز فنیل پروپانویید، مسیرهای انتقال سیگنال، سازماندهی مجدد دیواره سلولی، فاکتورهای رونویسی PR2، PR3، WRKY، PR5، PR10، MAPK1، کیتیناز و مسیرهای وابسته به اتیلن و جاسمونیک اسید در مقاومت گندم به بیماری پاخوره نقش بسزایی دارند. همچنین مطالعات نشان داده است ژنوتیپ مقاوم به بیماری پاخوره کارایی بیشتری برای تبدیل ترکیبات فنلی به لیگنین دارد (Zhang et al. 2020). قارچ عامل بیماری پاخوره گندم با ترشح فاکتورهای بیماری‌زایی سعی در نفوذ در میزبان دارد، قارچ از طرق مختلفی مانند ترشح پروتئین‌های بیماری‌زایی و نفوذ هیف‌های رونده بر سطح گیاه سیستم دفاعی میزبان را تحریک کرده و میزبان برای مقابله با این وضعیت که مانند یک زنگ خطر هست، فیتوالکسین‌ها، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و آنزیم‌های دفاعی را فعال می‌نماید. این مسیر دفاعی تحت تاثیر مولکول‌های جاسمونیک اسید، اتیلن و به خصوص سالیسیلیک اسید است. گزارش شده است که فاکتورهای رونویسی و عوامل رونویسی مختلفی تحت تاثیر این برهمکنش قرار می‌گیرند. به دنبال این واکنش‌ها در ارقام مقاوم مشاهده شده است که سنتز لیگنین و رسوب کالوز منجر به محدود نمودن نفوذ پاتوژن و ایجاد مقاومت می‌گردد (Zhang et al. 2020). در مطالعه آنزیمی مربوط به واکنش ژنوتیپ‌های مختلف به بیماری پاخوره در طی روزهای نمونه‌برداری نتایج نشان داد که آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیا لایاز و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌توانند به‌عنوان نشانگر مقاومت به بیماری پاخوره مورد بررسی بیشتری قرار گیرند. آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز اولین آنزیم در مسیر سنتز فنیل پروپانویید است و نقش اصلی در سنتز ترکیبات دفاعی مرتبط با ریشه مانند لیگنین می‌باشد (Saberi Riseh et al. 2021). گزارش‌ها نشان داده است که ارقام گندم، در توانایی برای سرکوب حمله پاتوژن متفاوت عمل می‌نمایند و یک تعامل پیچیده بین ژنوتیپ قارچ، ژنوتیپ میزبان و محیط وجود دارد (McMillan et al. 2018). بنابراین با توجه به این گزارش‌ها می‌توان بیان نمود که مقاومت به بیماری پاخوره احتمالا چندژنی باشد و لوکوس‌های کنترل کننده مقاومت بر روی کروموزوم‌های متعددی قرار دارند (McMillan et al. 2014; Saberi Riseh et al. 2022). در حال حاضر تحقیقات کمی در رابطه با فعالیت سیستم‌های آنزیمی در پاسخ به بیماری پاخوره در داخل و خارج کشور صورت گرفته است. هدف از این آزمایش بررسی نقش آنزیم‌های دفاعی گایاکول پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و فنیل-آلانین آمونیا لایاز در مقاومت به بیماری پاخوره گندم در بین تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم نان است که در مقابل این بیماری غربال شده‌اند.

مواد و روش‌ها

خالص‌سازی، نگهداری قارچ و تهیه زادمایه بیمارگر: در این آزمایش از قارچ *Gaeumannomyces tritici*.

جدایه T-41 استفاده شد. محیط کشت انتخابی برای کشت قارچ (Potato Dextrose Agar (PDA)، همراه با آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بود. جهت تهیه مایه تلقیح از ارزن استفاده شد. ۱۰۰ گرم بذر ارزن پخته شده که حداکثر جذب آب را داشته باشد به همراه ۱۰۰ گرم ماسه مرطوب درون ارلن ریخته و پس از مسدود کردن درب آن به فاصله دو روز دو بار در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سترون گردید. چند حلقه میسلیمی با قطر یک سانتی‌متر از حاشیه‌های در حال رشد پرگنه قارچ عامل بیماری به هر یک از ارلن‌ها مایه‌زنی و در انکوباتور دمای ۲۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. ارلن‌ها از انکوباتور خارج و به مدت ۱۵ روز در دمای محیط، زیر نور طبیعی و فلورسنت گذاشته شد. در دوره اخیر چندین بار ارلن‌ها جهت هوادهی و جلوگیری از گلوله شدن، تکان داده شدند (McMillan 2012).

استخراج DNA قارچ و انجام PCR به منظور شناسایی مولکولی قارچ: برای تکثیر میسلیم به منظور شناسایی

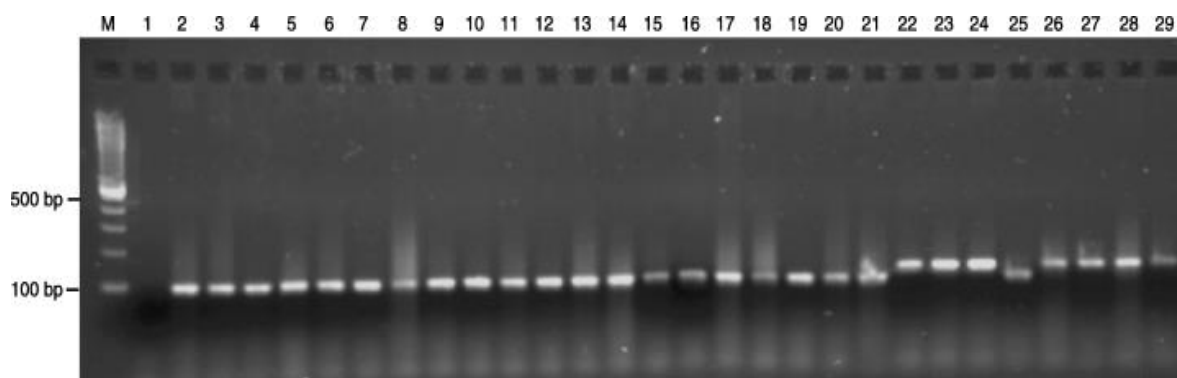
مولکولی قارچ، یک قرص از حاشیه فعال قارچ رشد یافته بر روی محیط PDA به محیط کشت مایع حاوی گلوکز، عصاره مخمر و آب مقطر استریل منتقل گردید. ارلن‌های مایه‌زنی شده به مدت ۷ تا ۹ روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. سپس با استفاده از پمپ خلاء، قیف بوخنر و کاغذ صافی استریل محیط مایع و حلقه‌های آگار محیط جامد از میسلیم جدا و میسلیم به دست آمده دو بار با آب مقطر استریل شسته شد و سپس با کاغذ صافی استریل کاملاً آبگیری و به درون میکروتیوب منتقل گردید. میکروتیوب‌ها در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد به منظور استخراج DNA نگهداری شدند. سپس میسلیم منجمد شده با نیتروژن مایع به پودر نرمی تبدیل و استخراج DNA با روش CTAB انجام گرفت. از سه آغازگر ویژه این قارچ به نام‌های Ggtfwd، GgtArev و GgtBrev2 استفاده گردید. دو آغازگر Ggtfwd و GgtArev از ناحیه ITS2 از DNA ریبوزومی و آغازگر GgtBrev2 از ناحیه بین ITS2 و زیرواحد بزرگ ژن rRNA توسط فریمن و همکاران طراحی شده‌اند. این آغازگرها قادر به تمایز بین جدایه‌های تیپ A و B می‌باشند. جدایه‌های نوع A و B را می‌توان از طریق تکثیر قطعات ۹۳ و ۱۳۲ جفت بازی از یکدیگر تشخیص داد (Freeman et al. 2005) (شکل ۱). توالی این آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است. آغازگرها توسط شرکت دنایست مشهد ساخته شدند. برای مشاهده محصول PCR و ردیابی قطعات DNA ریبوزومی تکثیر شده، الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت. جهت تعیین اندازه قطعات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز از نشانگر ۵۰ جفت‌بازی (تهیه شده از شرکت عالیان تجهیز آزما، شیراز) استفاده شد.

کشت در گلخانه و روش نمونه‌برداری: تعداد ۹ ژنوتیپ از غربال‌سازی ژرم‌پلاسما که قبلاً توسط نگارندگان در

گلخانه انجام گرفته بود، انتخاب شدند. مشخصات ژنوتیپ‌های مورد بررسی و شدت بیماری آن‌ها بر اساس مقیاس ۰ تا ۵

(Ownley et al. 2003) در جدول ۲ نشان داده شده است. آزمایش به صورت فاکتوریل با آلودگی در دو سطح و ژنوتیپ در ۹

سطح در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. تلقیح در مرحله دو برگی انجام و نمونه‌برداری در روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از تلقیح، صورت گرفت. در هر مرحله از برداشت، گیاهچه‌های جدا شده به سرعت به ازت مایع منتقل و پس از آن به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. میزان فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیز، هم-چنین میزان پروتئین کل و فنل کل، در طی روزهای نمونه‌برداری اندازه‌گیری شد.



شکل ۱. شناسایی اختصاصی نوع A و B قارچ *Gaeumannomyces tritici* با آغازگرهای اختصاصی

Ggtfwd، GgtArev و Ggtrev2 (۲-۲۱ و ۲۵: نوع A و ۲۲-۲۴ و ۲۶-۲۹: نوع B)

(Freeman et al. 2005)

Figure 1. Specific identification of type A and B of *Gaeumannomyces tritici* with specific primers Ggtfwd, GgtArev and Ggtrev2 (lanes 2–21 and 25, *Gt* A-type isolates, lanes 22–24 and 26–29, *Gt* B-type) isolates (Freeman et al. 2005)

جدول ۱. توالی آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی مولکولی *Gaeumannomyces tritici*

Table 1. Sequence specific primers for molecular identification of *Gaeumannomyces tritici*

توالی	آغازگر
Sequence	Primer
5'-AAGAACATCGGCGGTCTCGCC-3'	Ggtfwd
5'-TAGCGGCTGGAGCCCGCCG-3'	GgtArev
5'-CTACCTGATCCGAGGTCAACCTAAGG-3'	GgtBrev2

جدول ۲. مشخصات ژنوتیپ‌های کشت شده در گلخانه

Table 2. Genotypes grown in greenhouses

ژنوتیپ Genotype	محل Location	اسکور بیماری Disease Score	واکنش به بیماری پاخوره Reaction to take-all
1622	خراسان Khorasan	۰	کاملاً مقاوم Highly resistance
2112	سیستان و بلوچستان Sistan and Baluchestan	0.13	مقاوم Resistance
1429	ایلام Ilam	1.83	نیمه مقاوم Moderately resistant
850	ایلام Ilam	3.33	حساس Sensitive
871	ایلام Ilam	2.66	نیمه حساس Moderately sensitive
164	سیستان و بلوچستان Sistan and Baluchestan	5	کاملاً حساس Highly sensitive
1546	خراسان Khorasan	5	کاملاً حساس Highly sensitive
8031	خراسان Khorasan	0	کاملاً مقاوم Highly resistance
102	سیستان و بلوچستان Sistan and Baluchestan	0.13	مقاوم Resistance

استخراج پروتئین از بافت گیاه: ابتدا در محیط یخ، نیم گرم از بافت برگ گیاه در ۳-۵ میلی لیتر بافر نمونه پتاسیم

فسفات ۵۰ میلی مولار (pH = ۷/۵) حاوی PVP^۱ یک درصد و EDTA^۲ یک میلی مولار، در یک هاون چینی کاملاً له گردید.

مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه و توسط میکروسانتریفوژ در ۴۰۰۰ دور در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. سوسپانسیون رویی جهت مطالعات آنزیمی جدا و تا قبل از انجام آزمایش در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از پیش ماده

گایاکول اندازه‌گیری شد. در این روش سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی ۲/۷۷ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH = ۷)، ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۴۳ درصد و ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. افزایش

^۱Polyvinylpyrrolidone

^۲Ethylenediaminetetraacetic acid

^۳guaiacol

جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر بعد از ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. با ضریب خاموشی تترایاکول ($25/5 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$) و فرمول $A=\epsilon bc$ ، مقدار تترایاکول تشکیل شده محاسبه گردید (Plewa et al. 1991).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز: فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بر اساس روش Nicoli et al.

(1991) اندازه‌گیری شد. در این روش از پیروگالل به عنوان پیش ماده آنزیم استفاده شد. در این واکنش مخلوط واکنش شامل $2/5$ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات 50 میلی‌مولار ($\text{pH}=7$)، 200 میکرولیتر پیروگالل $0/2$ مولار و 100 میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. بعد از 3 دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج 420 نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی پیروگالل معادل ($6/2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و فرمول $A=\epsilon bc$ محاسبه گردید. فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در 100 میکرولیتر عصاره به دست آمده از روش (Bradford 1976) محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز: یک میلی‌لیتر از بافر استخراج، $0/5$ میلی‌لیتر فنیل آلانین

10 میلی‌مولار، $0/4$ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و $0/1$ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط شدند و به مدت 1 ساعت در دمای 37°C نگهداری گردیدند. واکنش با اضافه کردن $0/5$ میلی‌لیتر اسید کلریدریک 6 مولار متوقف و جذب نمونه‌ها در طول موج 260 نانومتر اندازه‌گیری گردید (D'cunha et al. 1996).

ارزیابی میزان کل پروتئین: به منظور ارزیابی پروتئین کل، به لوله‌های آزمایش مقدار $0/1$ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی و

5 میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و بی‌درنگ ورتکس شد. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 595 نانومتر قرائت و غلظت پروتئین‌ها با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد (Bradford 1976).

ارزیابی میزان فنل کل: $0/5$ گرم از بافت در 5 میلی‌لیتر اتانول 95 درصد ساییده و مخلوط حاصل به مدت 24 ساعت

در تاریکی نگهداری گردید. پس از سانتریفیوژ 4000 g به مدت 10 دقیقه، به $0/5$ میلی‌لیتر از محلول رویی $0/5$ میلی‌لیتر اتانول 95 درصد اضافه و حجم محلول با آب مقطر به $2/5$ میلی‌لیتر رسانده شد. به محلول حاصل $0/25$ میلی‌لیتر معرف فولین 50 درصد و $0/5$ میلی‌لیتر کربنات سدیم 5 درصد افزوده و جذب نمونه‌ها پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی با اسپکتروفتومتر در طول موج 725 نانومتر قرائت گردید (Roland & Laima 1999).

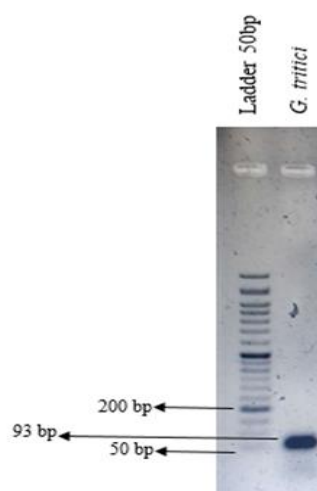
تجزیه‌های آماری: تجزیه واریانس داده‌ها، بر مبنای آزمایش فاکتوریل در طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. مقایسه

میانگین داده‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال $0/05$ و تجزیه کلاستر بر اساس میانگین صفات انجام شد. به منظور نرمال

شدن داده‌ها از تبدیل رادیکالی و از نرم‌افزارهای آماری Minitab19 و MSTAT-C استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده از تکثیر DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، تمایز بین دو تیپ *Gaeumannomyces tritici* (تیپ‌های A و B) را نشان داد. تکثیر اختصاصی یک قطعه ۹۳ جفت باز، قارچ مورد استفاده در این مطالعه را به عنوان نوع (A) شناسایی نمود که این نوع جدایه، بیماری‌زایی بالایی از خود نشان می‌دهد و مقاومت در برابر قارچ کش Silthiofam (یک ماده شیمیایی که برای کنترل بیماری پاخوره) دارد. شکل ۲ نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویژه *Gaeumannomyces* روی ژل آگارز ۱/۵٪ نشان می‌دهد.



شکل ۲. شناسایی اختصاصی قارچ *Gaeumannomyces tritici* (نوع A) و تکثیر قطعه ۹۳ جفت باز با

آغازگرهای اختصاصی Ggtfwd، GgtArev و Ggtrev2

Figure 2. Specific identification of *Gaeumannomyces tritici* (type A) and amplification of the 93 base pair fragment with specific primers Ggtfwd, GgtArev and Ggtrev2

تجزیه واریانس ۴ زمان نمونه‌برداری (صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی) آنزیم‌های مورد بررسی گایاکول پراکسیداز (GPX)، پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و فنیل آلانین آمونیالیز (PAL) و محتوای فنل کل در جدول ۳ نشان داده شده است. ژنوتیپ‌های مختلف در عکس‌العمل به بیماری واکنش‌های متفاوتی نشان داده‌اند. که بسته به واکنش ژنوتیپ به بیماری (مقاومت یا حساسیت)، سطح آنزیم نیز تغییر می‌کند. تیمارهای آلوده و شاهد در آنزیم گایاکول پراکسیداز تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ داشتند. اثر متقابل

آلودگی در زمان به جز در پلی‌فنل اکسیداز، در بقیه معنی‌دار و همچنین اثر متقابل سه جانبه آلودگی در زمان در ژنوتیپ در هر سه آنزیم و محتوای فنل کل معنی‌دار شد.

تغییرات آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: تغییرات آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس در طی روزهای

نمونه‌برداری و مقایسه میانگین تیمارهای آلوده و شاهد هر ژنوتیپ در روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از تلقیح عامل بیماری در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که سطح این آنزیم نسبت به زمان صفر روز، افزایش یافت. تغییرات آنزیمی در هر دو تیمار آلوده به بیماری و شاهد تقریباً در یک راستا و به یک میزان تغییر می‌کند. به‌طور کلی نتایج مقایسات میانگین نشان داد که، در زمان ۷ روز پس از مایه‌زنی، تیمار آلوده ژنوتیپ‌های کاملاً مقاوم ۱۶۲۲ و نیمه مقاوم ۱۴۲۹؛ در زمان ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، تکرار آلوده ژنوتیپ کاملاً حساس ۱۶۴ و در زمان ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، تکرار آلوده ژنوتیپ مقاوم ۱۰۲ با اختلاف مثبت و معنی‌دار از شاهد، بیشترین سطح آنزیم را دارا می‌باشند.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس آنزیم‌های دفاعی و محتوای فنل کل در عکس‌العمل به بیماری پاخوره

Table 3. Analysis of variance for defense enzymes and phenol content in response to take-all disease

منابع تغییرات SOV	df	MS			
		Phenol	PPO	GPX	PAL
ژنوتیپ	8	0.009**	0.001***	0.103***	0.054***
Genotype					
آلودگی	1	0.012	0.000001	0.451***	0.0002
Infection					
زمان	3	6.04***	0.013***	0.228***	0.525***
Time					
ژنوتیپ در آلودگی	8	0.035***	0.0001	0.070***	0.009***
Genotype × Infection					
ژنوتیپ در زمان	24	0.038***	0.0009***	0.092***	0.038***
Genotype × Time					
آلودگی در زمان	3	0.013*	0.0001	0.229***	0.004
Infection × time					
ژنوتیپ در آلودگی در زمان	24	0.026***	0.0001*	0.053***	0.005***
Genotype × Infection × Time					
خطا	110	0.003	0.00007	0.011	0.001
Error					
کل	181				
Total					
درصد ضریب تغییرات	4.57	6.99	7.63	12.08	4.57
CV%					
ضریب تبیین	89.70	97.07	83.92	73.34	89.70
R ²					

در ژنوتیپ‌های مقاوم، قارچ عامل بیماری منجر به تحریک سیستم دفاعی میزبان شده و به دنبال آن واکنش ناسازگار بین گیاه و پاتوژن رخ داده و در نهایت منجر به افزایش مقاومت این ژنوتیپ‌ها در مقابل بیماری می‌گردد. افزایش سطح آنزیم در روزهای اول آلودگی به گیاه این امکان را می‌دهد تا در برابر عامل بیماری‌زا و تنش اکسیداتیو از خود محافظت نماید. گزارش شده است که فعل و انفعالات میزبان-پاتوژن، اغلب منجر به افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز می‌شود (Kuvalekar et al. 2011). پلی‌فنل‌اکسیداز، در اکسیداسیون ترکیبات ضد میکروبی به کینون‌ها و لیگنینی شدن سلول‌های گیاهی در طول تهاجم عامل بیماری‌زا نقش دارند. این آنزیم‌ها همچنین در واکنش دفاعی القایی و القای مقاومت گیاهان به قارچ‌ها، ویروس‌ها و باکتری‌ها شرکت دارند (Hanifei et al. 2013).

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی در زمان در ژنوتیپ بر بیان آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (یونیت بر

میلی گرم پروتئین) بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) سطح ۰/۰۵

Table 4. Mean comparison of intraction effect of genotype × infection × time on the expression of polyphenoloxidase enzyme (unit.mg protein) based on least significant difference (LSD) test at 0.05 level

		ژنوتیپ Geotype								
Time	Infection	8031	2112	1622	1546	1429	871	850	164	102
0	Infected	0.136	0.125	0.116	0.084	0.122	0.115	0.086	0.100	0.060
	Control	0.135	0.125	0.128	0.085	0.122	0.113	0.089	0.110	0.065
	I-C	0.001 ^{ns}	0 ^{ns}	-0.012 ^{ns}	-0.001 ^{ns}	0 ^{ns}	0.002 ^{ns}	-0.003 ^{ns}	-0.010 ^{ns}	-0.005 ^{ns}
7	Infected	0.109	0.111	0.125	0.120	0.131	0.104	0.109	0.111	0.107
	Control	0.098	0.125	0.111	0.107	0.111	0.103	0.098	0.098	0.118
	I-C	0.011 ^{ns}	-0.014*	0.014*	0.013 ^{ns}	0.02*	0.001 ^{ns}	0.011 ^{ns}	0.013 ^{ns}	-0.010 ^{ns}
14	Infected	0.095	0.102	0.087	0.113	0.100	0.093	0.085	0.102	0.094
	Control	0.102	0.096	0.080	0.103	0.110	0.096	0.087	0.086	0.108
	I-C	-0.007 ^{ns}	0.006 ^{ns}	0.007 ^{ns}	0.011 ^{ns}	-0.010 ^{ns}	-0.003 ^{ns}	-0.002 ^{ns}	0.017*	-0.014*
21	Infected	0.125	0.132	0.163	0.141	0.134	0.134	0.124	0.122	0.157
	Control	0.155	0.134	0.156	0.132	0.132	0.145	0.124	0.117	0.138
	I-C	-0.030*	-0.002 ^{ns}	0.007 ^{ns}	0.009 ^{ns}	0.001 ^{ns}	-0.011 ^{ns}	0 ^{ns}	0.005 ^{ns}	0.019*

LSD = 0.01354

* و ^{ns}: به ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

* and ^{ns}: significant at 0.05 and no significant, respectively

تغییرات آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیا لایاز : تغییرات آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیا لایاز در تیمارهای آلوده و شاهد در طی روزهای

نمونه‌برداری نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم نسبت به زمان صفر افزایش یافته است. با توجه به جدول مقایسات میانگین (جدول ۵) که روند تغییرات آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیا لایاز را در تکرارهای آلوده و شاهد در طی روزهای نمونه‌برداری نشان می‌دهد، مشخص می‌شود که فعالیت آنزیم نسبت به زمان صفر افزایش می‌یابد. در زمان ۷ روز پس از مایه‌زنی، در ژنوتیپ‌های مقاوم ۱۰۲ و کاملاً مقاوم ۸۰۳۱؛ در زمان ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، در ژنوتیپ‌های مقاوم ۱۰۲ و ۲۱۱۲ و کاملاً مقاوم ۸۰۳۱ و در زمان ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، در

ژنوتیپ‌های حساس ۸۷۱ و کاملاً مقاوم ۸۰۳۱، فعالیت آنزیم در تیمار آلوده به طرز معنی‌داری افزایش یافته است (جدول ۵). همچنین مجدداً در زمان ۷ روز پس از مایه‌زنی، در ژنوتیپ‌های کاملاً حساس ۱۶۴ و ۱۵۴۶، نیمه مقاوم ۱۴۲۹ و مقاوم ۲۱۱۲؛ در زمان‌های ۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی در ژنوتیپ‌های کاملاً حساس ۱۶۴ و کاملاً مقاوم ۱۶۲۲ سطح آنزیم در تیمار شاهد به طرز معنی‌داری نسبت به تیمار آلوده افزایش نشان داده است.

تغییرات آنزیم گایاکول پراکسیداز: تغییرات آنزیم گایاکول پراکسیداز و مقایسه میانگین‌ها (جدول ۶) طی روزهای

نمونه‌برداری نشان داد که بیشترین تغییرات آنزیمی در زمان ۷ روز پس از مایه‌زنی و در تیمار آلوده به بیماری است. عامل بیماری‌زا به طور کلی منجر به افزایش سطح این آنزیم در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس گردیده است. در زمان ۷ روز پس از مایه‌زنی، در ژنوتیپ‌های کاملاً حساس ۱۶۴، نیمه حساس ۸۵۰، نیمه مقاوم ۱۴۲۹، کاملاً مقاوم ۱۶۲۲ و ۸۰۳۱ و مقاوم ۲۱۱۲؛ در زمان ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، در ژنوتیپ نیمه حساس ۸۵۰ و کاملاً حساس ۱۵۴۶ و در زمان ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، در ژنوتیپ‌های کاملاً حساس ۱۶۴ و نیمه مقاوم ۱۴۲۹، سطح آنزیم در تیمار آلوده به طرز معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. فقط در زمان ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، در ژنوتیپ مقاوم ۱۰۲ تیمار شاهد نسبت به آلوده سطح آنزیم بالاتری داشت. قارچ عامل بیماری، تقریباً در تمام ژنوتیپ‌ها (مقاوم و حساس) منجر به افزایش سطح آنزیم گایاکول پراکسیداز شده است. به نظر می‌رسد عامل بیماری در ژنوتیپ‌های مقاوم، باعث تحریک سیستم دفاعی و القای مقاومت به بیماری شده باشد؛ چون مشاهده شد تیمار آلوده همه ژنوتیپ‌ها تولید ریشه اضافی نمودند، می‌توان تولید ریشه اضافی را با افزایش آنزیم گایاکول پراکسیداز مرتبط دانست. زیرا بر اساس مطالعات پیشین، آنزیم گایاکول پراکسیداز در فرایند ساختن دیواره سلولی، سوپرینی کردن و لیگنینی شدن سلول گیاهی در حین دفاع، علیه عامل بیماری شرکت دارد (Gong et al. 2001).

تغییرات محتوای فنل کل: مقایسات میانگین تیمارهای آلوده و شاهد (جدول ۷)، نشان داد که بیشترین تغییر در محتوای

فنل کل در زمان ۷ روز بعد از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری است. در این زمان در ژنوتیپ‌های کاملاً حساس ۱۶۴ و ۱۵۴۶ و حساس ۸۷۱؛ در زمان ۱۴ روز پس از مایه‌زنی در ژنوتیپ‌های کاملاً حساس ۱۶۴ و ۱۵۴۶، مقاوم ۲۱۱۲ و کاملاً مقاوم ۸۰۳۱ و در زمان ۲۱ روز پس از مایه‌زنی در ژنوتیپ‌های کاملاً حساس ۱۶۴ و نیمه حساس ۸۵۰، سطح آنزیم در تیمار آلوده به قارچ به طرز معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد، افزایش یافت. علاوه بر این در زمان ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، در ژنوتیپ‌های مقاوم ۱۰۲ و حساس ۸۷۱ و در زمان ۲۱ روز پس از مایه‌زنی در ژنوتیپ‌های حساس ۸۷۱ و کاملاً مقاوم ۱۶۲۲، فنل کل در تیمار شاهد نسبت به آلوده افزایش معنی‌داری را نشان داد. نتایج نشان می‌دهد که محتوای فنل کل، بیشتر در ژنوتیپ‌های حساس افزایش یافته است، می‌توان گفت، چون گیاه حساس بیشتر در معرض حمله پاتوژن قرار دارد، با افزایش سطح فنل، محیط اطراف را برای پاتوژن سمی می‌نماید و سعی در غلبه بر پاتوژن دارد؛ ولی افزایش سطح فنل به تنهایی منجر به بروز مقاومت در گیاه نخواهد شد.

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی در زمان در ژنوتیپ بر بیان آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز (یونیت بر

میلی گرم پروتئین) بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) طح ۰/۰۵ *

Table 5. Mean comparison of intraction effect of genotype × infection × time on the expression of phenyl alanin ammonialyase enzyme (unit.mg protein) based on least significant difference (LSD) test at 0.05 level

Time (day)	infection	ژنوتیپ Geotype								
		8031	2112	1622	1546	1429	871	850	164	102
0	Infected	0.828	0.722	0.741	0.895	0.761	0.755	1.025	0.508	0.873
	Control	0.805	0.713	0.722	0.886	0.725	0.717	1.023	0.515	0.835
	I-C	0.023 ^{ns}	0.009 ^{ns}	0.019 ^{ns}	0.009 ^{ns}	0.036 ^{ns}	0.038 ^{ns}	0.002 ^{ns}	-	0.038 ^{ns}
7	Infected	1.162	0.845	0.996	0.912	0.885	1.013	1.061	1.016	1.023
	Control	1.105	0.921	0.971	1.073	0.980	1.039	1.109	1.101	0.924
	I-C	0.057*	-0.076*	0.025 ^{ns}	-0.161*	-0.095*	-0.026 ^{ns}	-0.048 ^{ns}	-0.085*	0.100*
14	Infected	1.093	0.964	1.081	0.958	0.999	1.042	1.088	0.987	1.006
	Control	0.935	0.853	1.225	0.963	0.953	1.074	1.096	1.083	0.885
	I-C	0.158*	0.111*	-0.144*	-0.006 ^{ns}	0.045 ^{ns}	-0.032 ^{ns}	-0.008 ^{ns}	-0.096*	0.121*
21	Infected	1.081	1.057	0.867	1.011	1.012	1.092	1.107	1.123	1.003
	Control	1.010	1.060	0.966	1.056	1.032	0.921	1.106	1.177	0.956
	I-C	0.071*	-0.002 ^{ns}	-0.099*	-0.045 ^{ns}	-0.021 ^{ns}	0.171*	0.001 ^{ns}	-0.054*	0.017 ^{ns}
LSD=		0.05117								

* و ^{ns}: به ترتیب معنی دار در سطح ۰/۰۵ و عدم وجود تفاوت معنی دار

* and ^{ns}: significant at 0.05 and no significant, respectively

با توجه به نتایج به دست آمده پس از افزایش ناگهانی در سطح آنزیم که با حمله پاتوژن شروع می شود، مجدداً سطح آنزیم در بعضی از ژنوتیپ ها کاهش یافته و دیگر افزایش نمی یابد. با حمله پاتوژن به گیاه حساس، سطح آنزیم های دفاعی، افزایش یافته ولی تغییر محسوسی در افزایش رشد آنها دیده نشد، مثل ژنوتیپ کاملاً حساس ۱۵۴۶ (شکل ۳). در مقابل، ژنوتیپ کاملاً مقاوم ۱۶۲۲ دارای سطح بالایی از آنزیم گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز می باشد و حمله عامل بیماری سبب تحریک سیستم دفاعی و به دنبال آن واکنش ناسازگار بین گیاه و پاتوژن و در نهایت بیان ژن ها و افزایش مقاومت در ژنوتیپ می گردد و رشد ریشه و حتی رشد اندام هوایی (افزایش پنجه) نیز افزایش یافت (شکل ۴).

تجزیه خوشه ای ژنوتیپ ها بر اساس میانگین صفات: تجزیه خوشه ای بر اساس میانگین سطح آنزیم های مورد

مطالعه و محتوای فنل کل انجام گرفت (شکل ۵). با توجه به دندروگرام حاصل، ژنوتیپ های مقاوم و حساس به دو گروه کاملاً مجزا تقسیم بندی شدند (استثنا مربوط به ژنوتیپ ۱۰۲ که مقاوم بود و در گروه حساس قرار گرفت و ژنوتیپ نیمه حساس ۸۷۱ که در گروه مقاوم قرار گرفت). گروه ۱ (حساس) شامل ژنوتیپ های ۱۰۲، ۱۶۴، ۱۵۴۶، ۸۵۰ و گروه ۲ (مقاوم) شامل ژنوتیپ های ۸۰۳۱، ۲۱۱۲، ۱۴۲۹، ۱۶۲۲ و ۸۷۱ می باشد. گروه ۱، دارای آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز بیشتری نسبت به گروه ۲ و گروه ۲، از نظر میزان محتوای

فنل کل، گایاکول پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز نسبت به گروه ۱، برتری دارد، که می‌توان مقاومت و افزایش رشد ریشه آنها را ناشی در افزایش این آنزیم‌ها و محتوای فنل کل دانست.

جدول ۶. مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی در زمان در ژنوتیپ بر بیان آنزیم گایاکول پراکسیداز (یونیت بر میلی گرم پروتئین) بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) سطح ۰/۰۵

Table 6. Mean comparison of intraction effect of genotype × infection × time on the expression of guaiacol peroxidase enzyme (unit.mg protein) based on least significant difference (LSD) test at 0.05 level

Time (day)	infection	ژنوتیپ Geotype								
		8031	2112	1622	1546	1429	871	850	164	102
0	Infected	1.058	1.061	1.076	0.927	1.023	1.069	0.621	1.060	0.896
	Control	1.030	0.959	1.033	0.965	1.003	1.007	0.627	1.006	0.909
	I-C	0.028 ^{ns}	0.102 ^{ns}	0.043 ^{ns}	-0.038 ^{ns}	0.020 ^{ns}	0.062 ^{ns}	-0.005 ^{ns}	0.05 ^{ns}	-0.013 ^{ns}
7	Infected	1.087	1.385	1.461	0.872	1.060	0.853	1.002	1.391	0.932
	Control	0.872	0.918	0.954	1.033	0.134	0.886	0.701	0.805	1.024
	I-C	0.214*	0.467*	0.508*	-0.162 ^{ns}	0.926*	-0.033 ^{ns}	0.301*	0.585*	-0.092 ^{ns}
14	Infected	0.733	0.980	0.601	1.110	0.913	0.818	0.946	0.837	0.685
	Control	0.796	0.956	0.697	0.832	0.828	0.810	0.704	0.795	0.900
	I-C	-0.063 ^{ns}	0.024 ^{ns}	-0.097 ^{ns}	0.278*	0.085 ^{ns}	0.008 ^{ns}	0.242*	0.042 ^{ns}	-0.215*
21	Infected	0.953	0.936	0.755	0.898	0.939	0.917	0.716	0.808	0.899
	Control	0.961	0.804	0.819	0.849	0.751	1.025	0.792	0.590	0.751
	I-C	-0.008 ^{ns}	0.132 ^{ns}	-0.064 ^{ns}	0.049 ^{ns}	0.188*	-0.108 ^{ns}	-0.076 ^{ns}	0.218*	0.148 ^{ns}
LSD=		0.1697								

* و ^{ns}: به ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

* and ^{ns}: significant at 0.05 and no significant, respectively

با توجه به نتایج این آزمایش، تیمار آلوده به قارچ ژنوتیپ‌های حساس (۸۵۰، ۸۷۱، ۱۵۴۶ و ۱۶۴) سطح بالایی از محتوای فنل کل، ژنوتیپ‌های نیمه مقاوم (۱۰۲ و ۲۱۱۲) سطح بالایی از آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لایاز و ژنوتیپ‌های کاملاً مقاوم (۱۶۲۲ و ۸۰۳۱) سطح بالایی از آنزیم گایاکول پراکسیداز را نسبت به تیمار شاهد (آلوده نشده) نشان دادند و بیشترین تغییرات آنزیمی در زمان ۷ روز پس از مایه‌زنی و در تیمار آلوده به قارچ مشاهده شد. نتایج نشان داد که در ژنوتیپ‌های ۱۶۲۲ و ۱۴۲۹ (گروه مقاوم)، افزایش همزمان آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در زمان ۷ روز پس از مایه‌زنی؛ در ژنوتیپ ۸۰۳۱ (مقاوم) افزایش همزمان آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیا لایاز در زمان‌های ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، گایاکول پراکسیداز در زمان ۷ روز پس از مایه‌زنی، و محتوای فنل کل در زمان ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، در ژنوتیپ ۲۱۱۲ (مقاوم) افزایش فنیل‌آلانین‌آمونیا لایاز در زمان ۱۴ روز پس از مایه‌زنی؛ گایاکول پراکسیداز در زمان ۷ روز پس از مایه‌زنی و محتوای فنل کل در زمان ۱۴، منجر به القای مقاومت در برابر بیماری می‌گردد. در ژنوتیپ مقاوم ۱۰۲، افزایش آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لایاز در دو زمان ۷ و ۱۴ روز پس از مایه‌زنی به همراه افزایش آنزیم

پلی فنل اکسیداز در زمان ۲۱ روز پس از مایه زنی منجر به غلبه بر پاتوژن و القای مقاومت می گردد. بنابراین به نظر می رسد که مجموعه ای از آنزیم های دفاعی و ژن های سنتز کننده آنها در مقاومت به بیماری پاخوره گندم نقش دارند و ژنوتیپ های مختلف بسته به نوع سیستم دفاعی که دارند (مقاومت یا مقاومت نسبی) مسیر دفاعی را در برهمکنش با قارچ عامل بیماری زا فعال نموده و باعث القای مقاومت در مقابل بیماری پاخورره می گردند.

جدول ۷. مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی در زمان در ژنوتیپ بر بیان محتوای فنل کل (میلی گرم بر

گرم وزن تازه) بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) سطح ۰/۰۵

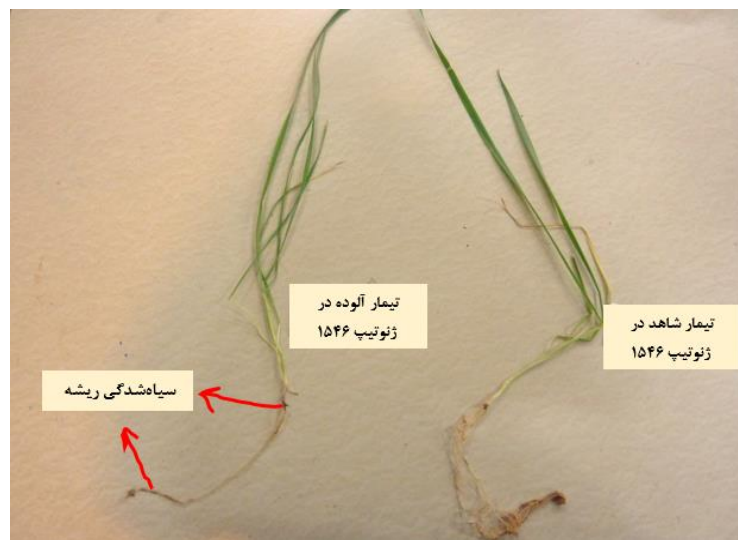
Table 7. Mean comparison of intraction effect of genotype × infection × time on the expression of otal phenol content (mg.g⁻¹ fresh weight) based on least significant difference (LSD) test at 0.05 level

Time (day)	infection	ژنوتیپ Geotype								
		8031	2112	1622	1546	1429	871	850	164	102
0	Infected	0.634	0.674	0.729	0.467	0.619	0.804	0.549	0.512	0.507
	Control	0.672	0.642	0.729	0.480	0.575	0.724	0.532	0.525	0.498
	I-C	-0.038 ^{ns}	0.032 ^{ns}	0 ^{ns}	-0.014 ^{ns}	0.044 ^{ns}	0.080 ^{ns}	0.016 ^{ns}	-0.013 ^{ns}	0.009 ^{ns}
7	Infected	1.397	1.369	1.418	1.494	1.359	1.515	1.364	1.492	1.423
	Control	1.367	1.318	1.400	1.358	1.363	1.396	1.386	1.362	1.362
	I-C	0.030 ^{ns}	0.051 ^{ns}	0.018 ^{ns}	0.137 [*]	-0.005 ^{ns}	0.119 [*]	-0.022 ^{ns}	0.131 [*]	0.062 ^{ns}
14	Infected	0.595	0.708	0.386	0.542	0.694	0.353	0.671	0.666	0.426
	Control	0.491	0.611	0.448	0.428	0.652	0.564	0.622	0.568	0.648
	I-C	0.104 [*]	0.098 [*]	-0.062 ^{ns}	0.114 [*]	0.042 ^{ns}	-0.212 [*]	0.048 ^{ns}	0.098 [*]	-0.222 [*]
21	Infected	0.851	0.759	0.885	0.868	0.802	0.655	0.884	1.009	0.875
	Control	0.857	0.709	0.981	0.831	0.823	0.968	0.702	0.425	0.959
	I-C	-0.006 ^{ns}	0.050 ^{ns}	-0.095 [*]	0.038 ^{ns}	-0.021 ^{ns}	-0.312 [*]	0.182 [*]	0.584 [*]	-0.085 ^{ns}
LSD=		0.08863								

* و ^{ns}: به ترتیب معنی دار در سطح ۰/۰۵ و عدم وجود تفاوت معنی دار

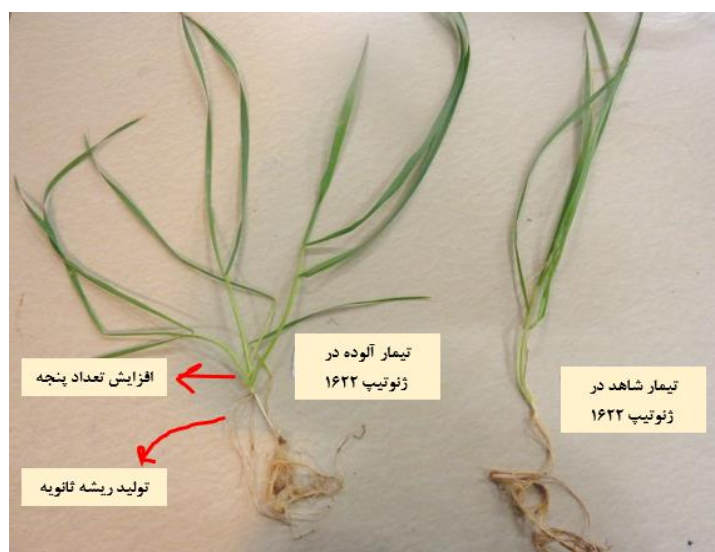
* and ^{ns}: significant at 0.05 and no significant, respectively

در ژنوتیپ های مقاوم به دلیل واکنش ناسازگار بین گیاه و پاتوژن (پاتوژن بیماری زا، میزبان مقاوم)، افزایش سطح آنزیم های دفاعی در گیاه مشاهده می شود که این افزایش با تحریک سیستم دفاعی و القای مقاومت همراه می باشد. مشخص شده است که افزایش سطح آنزیم گایاکول پراکسیداز در ژنوتیپ های خربزه نسبت به بیماری پرمردگی فوزاریومی نقش مهمی در القای مقاومت دارد (Madadkhah et al. 2012). در ژنوتیپ های حساس، با این که سطح فنل و آنزیم گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در گیاهان بیمار شده با قارچ بالاتر است، ولی چون هرکدام در یک زمان افزایش یافته اند نمی توان، نقش آنها را در بروز مقاومت دخیل دانست، به عبارتی افزایش سطح یک آنزیم به تنهایی در بروز مقاومت نقش ندارد.



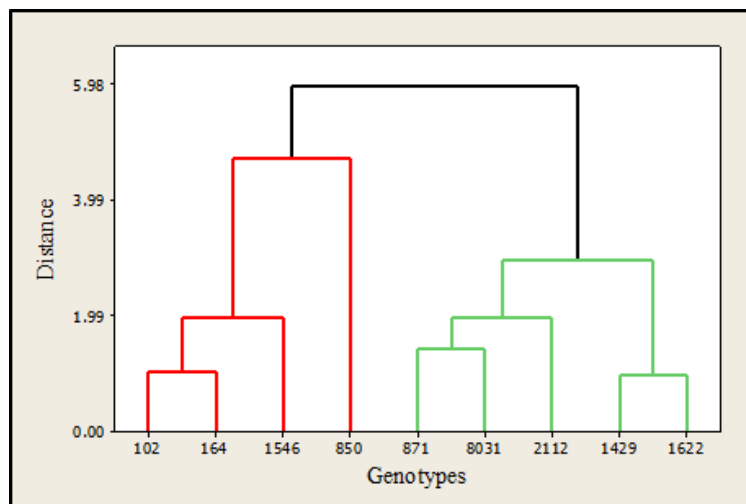
شکل ۳. سیستم رویشی و ریشه‌ای تیمار آلوده و شاهد در ژنوتیپ ۱۵۴۶

Figure 3. Shoot and root systems of infected and control treatment in genotype 1546



شکل ۴. سیستم رویشی و ریشه‌ای تیمار آلوده و شاهد ژنوتیپ کاملاً مقاوم ۱۶۲۲

Figure 4. Shoot and root systems of infected and control treatment in genotype 1622



شکل ۵. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مختلف گندم نان به روش WARD و بر اساس میانگین استاندارد شده محتوای فنل کل و آنزیم‌های مورد مطالعه و مربع فاصله اقلیدسی. گروه ۱ (۱۰۲)، (۱۶۴، ۱۵۴۶، ۸۵۰)؛ گروه ۲ (۸۷۱، ۸۰۳۱، ۲۱۱۲، ۱۴۲۹، ۱۶۲۲)

Figure 5. Dendrogram of clustering of bread wheat genotype based on average of phenol and enzymes in response to take-all disease by ward method with standardized data and Euclidean distance. Group 1 (102, 164, 1546, 850); group 2 (1622, 1429, 2112, 8031, 871)

در این پژوهش مشخص شد که فنل همراه با سایر آنزیم‌های دفاعی در ایجاد مقاومت به بیماری نقش دارد. بررسی‌های پیشین نیز نشان داده است که فنل به تنهایی در واکنش مقاومت ژنوتیپ‌های پنبه به پژمردگی فوزاریومی نقش ندارد و تنها به عنوان متابولیت ثانویه در مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی و تا حد زیادی به سمی کردن محیط اطراف گیاه برای از بین بردن عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند (Morkunas & Gemerek 2007) و چون ژنوتیپ‌های حساس بیشتر در معرض حمله پاتوژن می‌باشند، مقدار فنل نیز در آنها بالاست. فنل در صورتی منجر به بروز مقاومت می‌گردد که همزمان با آن سطح آنزیم‌های دفاعی فنیل آلانین-آمونیا لایز و گایاکول پراکسیداز نیز افزایش یابد. گزارش‌های مربوط به سیستم‌های مختلف میزبان-پاتوژن، همبستگی بین محتوای فنلی با مقاومت یا حساسیت به یک پاتوژن خاص را نشان نمی‌دهد. بلکه زمان تجمع ترکیبات فنلی به دنبال آلودگی با عامل بیماری‌زا و فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز یا دیگر آنزیم‌های اکسیدکننده فنل در تبدیل آنها به اشکال سمی‌تر است که از رشد پاتوژن جلوگیری می‌نماید (Kuvalekar et al. 2011).

ژنوتیپ‌های مقاوم مورد بررسی در این پژوهش، در حالت عدم آلودگی سطح بالایی از آنزیم پلی‌فنل اکسیداز را دارند و ژنوتیپ‌های حساس از نظر این آنزیم ضعیف عمل می‌کنند. در آزمایشی فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در گیاهچه‌های مقاوم و حساس ارزن مورد مطالعه قرار گرفت. سطح آنزیم در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس در حالت عدم آلودگی نسبت به حالت آلودگی کمتر بود و

همچنین در گیاهچه‌های مقاوم بیشتر از گیاهچه‌های حساس بود، که احتمالا نشان‌دهنده نقش احتمالی این آنزیم در آلودگی پاتوژن و مقاومت میزبان است (Niranjan et al. 2006). در زمان صفر سطح هر سه آنزیم دفاعی در تمام ژنوتیپ‌ها پایین می‌باشد، ولی بعد از تلقیح پاتوژن فعالیت آنزیم در گیاه افزایش یا کاهش می‌یابد. در ژنوتیپ‌های مقاوم به دلیل واکنش ناسازگار بین گیاه و پاتوژن، سطح آنزیم در تیمار آلوده افزایش می‌یابد و در نهایت منجر به مقاومت می‌گردد و در ژنوتیپ‌های حساس به دلیل واکنش سازگار بین گیاه و پاتوژن، کاهش سطح آنزیم و نهایتا حساسیت در گیاه رخ می‌دهد. در این پژوهش، در ژنوتیپ‌های حساس سطح آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه آلوده به قارچ افزایش یافت، می‌توان گفت که ژنوتیپ‌های حساس، موفق به نشان دادن واکنش‌های اولیه (افزایش سطح آنزیم) در برابر حمله پاتوژن می‌باشند و ممکن است یکی از دلایل ایجاد آلودگی و نفوذ عامل بیماری‌زا همین افزایش واکنش‌های اولیه باشد، که در ژنوتیپ‌های حساس بلافاصله بروز می‌کند و پس از چندی به دلیل شکست گیاه در مقابل پاتوژن، حساسیت در گیاه رخ می‌دهد. میزان فعالیت آنزیم معمولا در طی روزهای مختلف متغیر است و در آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز بسته به زمان تغییر می‌کند، در پژوهشی نیز ثابت شده است که فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در طی دوره پیری (افزایش سن گیاه) افزایش می‌یابد (Asran & Mahamed 2014). نتایج این آزمایش نشان داد که بین آنزیم‌های مورد بررسی، آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانیل‌آمونیا لایز نقش بسیار مهمی در ایجاد مقاومت به این بیماری دارند و سطح آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز تقریباً در بیشتر ژنوتیپ‌ها (حساس و مقاوم) افزایش یافته است. این آنزیم با مقاومت سیستمیک و یا واکنش فوق حساسیت همراه است (Simons & Ross 1971). با حمله پاتوژن، هورمون‌های رشدی گیاه افزایش می‌یابد (López et al., 2008; Vos et al., 2015)، تشکیل ریشه اضافی در هنگام حمله بیماری، تقریباً در تیمار آلوده همه ژنوتیپ‌ها دیده می‌شود. گیاه برای مقابله با شرایط بد محیطی رشدش را افزایش می‌دهد؛ ولی افزایش رشد در ژنوتیپ‌های حساس تاثیری بر نفوذ پاتوژن ندارد. به عبارتی این یک رابطه شدید میزبان-پاتوژن است. از یک طرف، گیاه رشد خود را افزایش می‌دهد و از طرف دیگر، پاتوژن با نفوذ به داخل بافت گیاه، آلودگی ایجاد می‌کند و منجر به از بین بردن ریشه‌ها می‌گردد. گیاه مجدداً رشد خود را افزایش می‌دهد، ولی باز هم در معرض آلودگی قرار می‌گیرد. این ترمیم شدن‌های متوالی در نهایت باعث تضعیف سیستم دفاعی گیاه گشته و حساسیت در گیاه ایجاد می‌گردد. این موضوع به خوبی در ژنوتیپ‌های حساس ۱۶۴، ۱۵۴۶ و ۸۵۰ دیده می‌شود و این‌طور به نظر می‌رسد که افزایش رشد رویشی و تولید ریشه اضافی در تکرار آلوده ژنوتیپ‌ها به فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه بستگی دارد که فعالیت این آنزیم در تیمار آلوده نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌دار افزایش یافته است. این آنزیم در فرایند سنتز برخی ترکیبات دفاعی و لیگنینی شدن دیواره سلولی گیاه دخالت دارد که نتیجه آن مقاومت‌سازی بافت‌های ریشه در برابر عوامل بیمارگر می‌باشد (Malekziarati et al. 2012).

در بعضی از ژنوتیپ‌ها سطح آنزیم گایاکول پراکسیداز نسبت به زمان صفر افزایش، از زمان ۷ به ۱۴، کاهش و از زمان ۱۴ به ۲۱ مجدداً افزایش می‌یابد. افزایش و کاهش سطح گایاکول پراکسیداز در مقابل بیماری، از مدل زیگ‌زاگ که مسیر تکاملی

تسلحاتی بین گیاه و پاتوژن است، تبعیت می‌کند. نتایج نشان داده که افزایش در تعدادی از ژن‌های خانواده پراکسیداز که در طول واکنش‌های حساسیت و مقاومت رخ می‌دهد، در ایجاد این الگو نقش دارد. پراکسیدازها مانع پیشرفت عوامل بیماری‌زا می‌شوند و بیان بیش از حد آنها مقاومت به پاتوژن‌های بیوتروپیک و نکروتروپیک را افزایش می‌دهند (Leach 2011). مشاهدات نشان داد که وجود یک یا دو لکه نکروزه در ژنوتیپ‌های مقاوم، به این دلیل است که با حمله پاتوژن، گیاه با القای مقاومت سیستمیک، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و سالیسیلیک‌اسید و با واکنش مرگ سلولی که یک واکنش فوق حساسیت است نفوذ پاتوژن را محدود می‌کند و منجر به مقاومت از نوع سیستمیک می‌گردد (Wen 2012). در ژنوتیپ کاملاً مقاوم ۸۰۳۱، سطح آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیلایز نسبت به زمان صفر، تکرار شاهد و ژنوتیپ‌های حساس بیشتر است. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیلایز در ارقام حساس و مقاوم کنگد نسبت به بیماری بوته‌میری فوزاریومی بررسی، و نتیجه این بود که در روز ۴ و ۱۲ (بعد از مایه‌زنی)، بیشترین تغییرات آنزیمی در رقم مقاوم مشاهده شد (Falah poor et al., 2013). در این آزمایش نیز، بیشترین تغییرات آنزیمی در روز ۷ بعد از مایه‌زنی عامل بیماری دیده شد. بیان اولیه آنزیم‌های اکسیدکننده فنل مانند پلی‌فنل‌اکسیداز و گایاکول پراکسیداز در بافت‌های آلوده ممکن است منجر به اکسیداسیون افزایش‌یافته پلی‌فنل‌ها شود که مانع بیوشیمیایی برای توسعه پاتوژن می‌گردد. با توجه به نتایج می‌توان بیان داشت که قارچ عامل بیماری منجر به تحریک سیستم دفاعی میزبان و باعث افزایش سطح آنزیم‌های دفاعی و القای مقاومت در ژنوتیپ‌ها گردیده است. آنزیم‌ها به تنهایی در القای مقاومت به بیماری نقش ندارند و افزایش همزمان آنها منجر به بروز مقاومت در گیاه می‌گردند که این موضوع به خوبی در ژنوتیپ‌های مقاوم مشهود و مشخص می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که این قارچ در تحریک سیستم دفاعی ژنوتیپ‌های مقاوم نقش کلیدی داشته باشد.

نتیجه‌گیری: تغییرات آنزیم‌های دفاعی بسته به ژنوتیپ گیاه و زمان نمونه‌برداری تغییر می‌کند. به‌نظر می‌رسد با حمله پاتوژن سطح هورمون‌های گیاهی در گیاه بالا رفته و این افزایش منجر به افزایش رشد در گیاهان آلوده می‌شود. در گیاهان مقاوم، سطح هر سه آنزیم دفاعی بسته به شرایط و زمان بالا می‌رود و افزایش سطح همزمان هر سه آنزیم در این ژنوتیپ‌ها (کاملاً مقاوم و مقاوم) منجر به افزایش رشد رویشی و همین‌طور غلبه بر آلودگی و در نهایت مقاومت می‌گردد و نتایج نشان داد که افزایش سطح یک آنزیم، به تنهایی در ایجاد مقاومت نقش ندارد. در این بررسی آنزیم گایاکول پراکسیداز نقش بسیار مهمی در دفاع علیه بیمارگر دارد. این آنزیم تنها فاکتوری است که تا به حال با القای مقاومت در ارتباط بوده و افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز با مقاومت سیستمیک و یا واکنش فوق حساسیت همراه است. تغییرات آنزیم گایاکول پراکسیداز در روزهای نمونه‌برداری در ژنوتیپ‌های مقاوم در پاسخ به آلودگی از الگوی زیگ‌زاگ تبعیت می‌کند. محتوای فنل کل، تنها در صورتی منجر به مقاومت می‌گردد که افزایش آن در یک زمان، همراه با افزایش آنزیم دفاعی در همان زمان باشد در غیر این صورت، به نظر می‌رسد که در ایجاد مقاومت بی‌تاثیر باشد.

References

- Anil, K., Das, S. N., & Podile, A. R. (2014). Induced defense in plants: a short overview. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 84, 669-679. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0279-2>
- Asran, A., & Mohamed, H. (2014). Use of phenols, peroxidase, and polyphenoloxidase of seed to quantify resistance of cotton genotypes to fusarium wilt disease. *Bangladesh Journal of Botany*, 43(3), 353-357. <https://doi.org/10.3329/bjb.v43i3.21613>
- Sran, T. S., Jindal, S. K., Sharma, A., & Chawla, N. (2023). Genetics of novel leaf curl virus disease resistant pepper genotypes and antioxidative profile analysis of their progenies. *Scientia Horticulturae*, 308, 111563. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111563>
- Bai, S. S., Zhang, H. B., Jing, H. A. N., Wu, J. H., Li, J. C., Geng, X. X., Lü, B. Y., Xie, S. F., Han, D. J., Zhao, J. X., & Yang, Q. H. (2021). Identification of genetic locus with resistance to take-all in the wheat-*Psathyrostachys huashanica* Keng introgression line H148. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(12), 3101-3113. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63340-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63340-8)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Colbach, N., Lucas, P., & Meynard, J. M. (1997). Influence of crop management on take-all development and disease cycles on winter wheat. *Journal of Phytopathology*, 87, 26-32. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.1.26>
- Das, S., Kundu, S., Meena, K., Jha, R. K., Varma, A., Bahuguna, R. N., & Tripathi, S. (2023). Seed biopriming with potential bioagents influences physiological processes and plant defense enzymes to ameliorate sheath blight induced yield loss in rice (*Oryza sativa* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(5), 136. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03576-6>
- D'cunha, G. B., Satyanarayan, V., & Nair, P. M. (1996). Purification of phenylalanine ammonialyase from *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Phytochemistry*, 42, 17-20. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00914-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00914-0)
- Fallahpori, A., Aminian, H., Sahebani, N., & Hosseini, S. E. (2013). Evaluation of resistance of 20 sesame germplasms to damping off caused by *fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* in Yazd region and investigation of phenylalanine ammonia-lyase (pal) activity in resistant and susceptible germplasms. *Iraian Journal of Plant Pathology*, 49(4), 413-424 [In Persian]

- Freeman, J., Ward, E., Gutteridge, R. J., & Bateman, G. L. (2005). Methods for studying population structure, including sensitivity to the fungicide silthiofam, of the cereal take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Plant Pathology*, 54(5), 686-698. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01252.x>
- Gholizadeh Vazvani, M., Dashti, H., Saberi Riseh, R. A., & Bihamta, M. R. (2016). Study of relationship between of vegetative traits and resistance to take-all disease in greenhouse condition. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 47(1) <https://doi.org/10.22059/ijpps.2016.59205> [In Persian]
- Gholizadah Vazvani, M., Dashti, H., Saberi Riseh, R., & Bihamta, M. R. (2017). Screening bread wheat germplasm for resistance to take-all disease (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) in greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19(5), 1173-1184. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807073.2017.19.5.16.9>
- Gong, Y., Toivonen, P. M., Lau, O. L., & Wiersma, P. A. (2001). Antioxidant system level in Braeburn apple is related to its browning disorder. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42, 259-264.
- Hanifei, M., H. Dehghani, & Choukan, R. (2013). The role of antioxidant enzymes and phenolic compounds in disease resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(8), 1985-1996.
- Jain, D., & Khurana, J. P. (2018). Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Molecular Aspects of Plant-pathogen Interaction*, 265-281. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12
- Keenan, S., Cromey, M. G., Harrow, S. A., Bithell, S. L., Butler, R. C., Beard, S. S., & Pitman, A. R. (2015). Quantitative PCR to detect *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in symptomatic and non-symptomatic wheat roots. *Australasian Plant Pathology*, 44, 591-597. <https://doi.org/10.1007/s13313-015-0379-y>
- Kuvalekar, A., Redkar, A., Gandhe, K., & Harsulkar, A. (2011). Peroxidase and polyphenol oxidase activities in compatible host-pathogen interaction in *Jasminum officinale* and *Uromyces hobsoni*: Insights into susceptibility of host. *New Zealand Journal of Botany*, 49(3), 351-359. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2011.569727>
- Kwak, Y. S., & Weller, D. M. (2013). Take-all of wheat and natural disease suppression: a review. *The Plant Pathology Journal*, 29(2), 125. <https://doi.org/10.5423/PPJ.SI.07.2012.0112>
- Leach, J. E. (2011). Disease Responses Signalic for disease Resistance in Rice, Thesis Ph.D.
- Li, C., Wang, M., Guo, Y., Zhang, S., Xu, H., & Ge, Y. (2024). Activation of the calcium signaling, mitogen-activated protein kinase cascade and phenylpropane metabolism contributes to the induction of disease resistance in pear fruit upon phenylalanine treatment.

- Postharvest Biology and Technology*, 210, 112782.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2024.112782>
- Liu, C., Shang, H., & Tan, R. (2000). Infection process of take-all causing fungus (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) on wheat (*Triticum aestivum*) and oat (*Avena sativa*) roots. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 70(1), 23-27.
<https://epubs.icar.org.in/index.php/IJAgS/article/view/27875>
- López, M. A., Bannenberg, G., & Castresana, C. (2008). Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 420-427. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.002>
- Madadkhah, E., Lotfi, M., Nabipour, A., Rahmanpour, S., Banihashemi, Z., & Shoorooei, M. (2011). Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race. *Scientia Horticulturae*, 135, 171-176.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.020>
- Malekziarati, H., Sahebani, N., & Etebarian, H. R. (2012). Biological Control and Systemic Induction of Peroxidase and Polyphenoloxidase by *Trichoderma harzianum* in Tomato Plants Infected with Nematode *Meloidogyne javanica*. *Biological Control of Pests and Plant Disease*, 61, 72. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.002> [In Persians]
- McMillan, V. E. (2012). Identification and characterization of resistance to the take-all fungus in wheat. Ph.D. Thesis. Biological Sciences England. University of Exeter.
- McMillan, V. E., Canning, G., Moughan, J., White, R. P., Gutteridge, R. J., & Hammond-Kosack, K. E. (2018). Exploring the resilience of wheat crops grown in short rotations through minimising the build-up of an important soil-borne fungal pathogen. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25511-8>
- McMillan, V. E., Gutteridge, R. J., & Hammond-Kosack, K. E. (2014). Identifying variation in resistance to the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, between different ancestral and modern wheat species. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1-12.
<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0212-8>
- Morkunas, I., & Gemerek, J. (2007). The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupin embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 497-506.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.005>
- Nicoli, M. C., Elizabel, B. E., Piotti, A., & Lerici, C. R. (1991). Effect of sugar and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *Food Biochemistry*, 15, 169-184. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1991.tb00153.x>

- Niranjan, S., Sarosh, A. B. R., & Shetty, A. H. S. (2006). Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. *Functional Plant Biology*, 33(6), 563-571. <https://doi.org/10.1071/FP06003>
- Ownley, B. H., Duffy, B. K., & Weller, D. M. (2003). Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3333-3343. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3333-3343.2003>
- Palma-Guerrero, J., Chancellor, T., Spong, J., Canning, G., Hammond, J., McMillan, V. E., & Hammond-Kosack, K. E. (2021). Take-all disease: new insights into an important wheat root pathogen. *Trends in Plant Science*, 26(8), 836-848. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.02.009>
- Plewa, M. J., Smith, S. R., & Wagner, E. D. (1991). Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 247(1), 57-64. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90033-K](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90033-K)
- Puga-Freitas, R., & Blouin, M. (2015). A review of the effects of soil organisms on plant hormone signalling pathways. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 104-116. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.07.006>
- Rejeb, I., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants*, 3(4), 458-475. <https://doi.org/10.3390/plants3040458>
- Ribeiro, C. F., de Borba, M. C., Geller, A. C., Pontes, E. S., Kulcheski, F. R., de Freitas, M. B., & Stadnik, M. J. (2023). Enhanced oxidative enzymes activity and lipid peroxidation are associated with hypersensitive response and atypical lesions in resistant bean plants infected with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 127, 102099. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102099>
- Roland, S. F., & Laima, S. K. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture*, 1, 1-5.
- Saberi Riseh, R., Dashti, H., & Gholizadeh Vazvani, M. (2022). Association between agronomic traits and molecular markers with take-all disease severity in bread wheat *Triticum aestivum*. *Journal of Crop Protection*, 11(1), 39-59. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.22519041.2022.11.1.4.5>
- Saberi Riseh, R., Dashti, H., Gholizadeh Vazvani, M., & Dini, A. (2021). Changes in the activity of enzymes phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, and peroxidase in some

- wheat genotypes against take-all disease. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 23(4), 929-942. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807073.2021.23.4.1.0>
- Sajjadi Naeeni, M., & Kazemi, H. Management of plant disease. Plant Protection organization, 2018, pp. 51. www.PRO.ir
- Simons, T., & Ross, A. F. (1971). Metabolic changes associated with systemic induced resistance to tobacco Mosaic virus in Samsun NN Tobacco. *National Science Foundation Grant*, 13856. <https://doi.org/10.1094/Phyto-61-293>
- Vos, I. A., Moritz, L., Pieterse, C. M., & Van Wees, S. C. (2015). Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. *Frontiers in Plant Science*, 6, 639. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00639>
- Wang, Z., Peng, Q., Gao, X., Zhong, S., Fang, Y., Yang, X., ... & Liu, X. (2020). Novel fungicide 4-chlorocinnamaldehyde thiosemicarbazide (PMDD) inhibits laccase and controls the causal agent of take-all disease in wheat, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(19), 5318-5326. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01260>
- Wen, L. (2012). Cell in death in plant immune response to necrotrophs. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*, 1, 3. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000e103>
- Yun, Y., Yu, F., Wang, N., Chen, H., Yin, Y., & Ma, Z. (2012). Sensitivity to silthiofam, tebuconazole and difenoconazole of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* isolates from China. *Pest Management Science*, 68(8), 1156-1163. <https://doi.org/10.1002/ps.3277>
- Zhang, J., Yan, H., Xia, M., Han, X., Xie, L., Goodwin, P. H., Quan, X., Sun, R., Wu, C., & Yang, L. (2020). Wheat root transcriptional responses against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Phytopathology Research*, 2(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s42483-020-00066-7>
- Zhao, G., Sun, T., Zhang, Z., Zhang, J., Bian, Y., Hou, C., Zhang, D., Han, S., & Wang, D. (2023). Management of take-all disease caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat through *Bacillus subtilis* strains. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1118176. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1118176>