

بررسی تغییرات آنزیمی و بیوشیمیایی در گیاه خیار تیمارشده با فسفیت پتاسیم در شرایط تنش قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

سحر حیدرزاده^۱، شاهرخ قرنجیک^{۲*}، علی دهستانی^۳ و داریوش شهریاری^۴

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

۳. استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴. مربی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۶)

چکیده

در این تحقیق تأثیر پنج سطح تیمار فسفیت پتاسیم (KH_2PO_3) روی القای مقاومت القایی فراگیر (سیستمیک) و فعالیت آنزیم‌های دفاعی و متابولیت‌های مرتبط در پنج زمان مختلف در گیاه خیار تلقیح شده با *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* در قالب آزمایش اسپلیت پلات در زمان بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. پس از القای تنش قارچی، فعالیت آنزیم‌های دفاعی شامل گاباکول پراکسیداز (GPX)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و همچنین میزان متابولیت‌هایی چون مالون دآلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در یک بازه زمانی یازده روزه بررسی شد. نتایج نشان داد، در مقایسه با گیاهان شاهد، فعالیت همه آنزیم‌های دفاعی و متابولیت‌های مورد بررسی در نتیجه تیمارهای مختلف فسفیت پتاسیم و قارچ افزایش معنی‌داری یافته است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم CAT ($18.7 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم (KPhi4) در روز پنجم پس از تلقیح با قارچ مشاهده شد که افزایش ۲/۸۱ برابری در مقایسه با شاهد (گیاه بدون تیمار قارچ) داشت. همچنین بیشترین فعالیت آنزیم‌های GPX ($233 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) و SOD ($10.8 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) به ترتیب با ۲/۲۱ و ۱/۴۵ برابر افزایش نسبت به شاهد، در روز سوم پس از تلقیح با قارچ و در تیمار KPhi4 مشاهده شد. از سوی دیگر میزان فعالیت H_2O_2 در بافت‌ها و نیز زمان آن با آنزیم‌های دفاعی CAT، GPX و SOD همخوانی داشته و افزایش آن‌ها با هم متوازن بوده که می‌تواند بیانگر تولید H_2O_2 به‌عنوان پیش‌زمینه سنتز آنزیم‌های دفاعی باشد. همچنین نتایج نشان داد، میزان فعالیت MDA در تیمار KPhi4 کمتر از دیگر تیمارها بوده است که نشان‌دهنده کاهش آسیب بافتی و کنترل تقریبی بیماری است.

واژه‌های کلیدی: خیار، فسفیت پتاسیم، آنزیم‌های دفاعی، پوسیدگی فوزاریومی.

Study on enzymatic and biochemical changes in cucumber plant treated with potassium phosphite under *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* stress

Sahar Heidarzade¹, Shahrokh Gharanjik^{2*}, Ali Dehestani³ and Darioush Shahriari⁴

1, 2. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Iran

3. Assistant Professor, Genetics & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Iran

4. Instructor, Agriculture and Natural Resources Research Center of Tehran Province, Iran

(Received: Dec. 26, 2015 - Accepted: Dec. 26, 2016)

ABSTRACT

In this study, we evaluated the effects of five levels of potassium phosphite (KH_2PO_3) on Induced Systemic Resistance (ISR), and also defense related enzymes and metabolites activities during different days in cucumber plants inoculated with *Fusarium oxysporum*. The experiment was designed as a split-plot in time based on a completely randomized design with three replications. The activity of defense-related enzymes including, catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD) and also the accumulation of secondary metabolites such as lipid peroxidation (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2), were evaluated in a period of 11 days after pathogen inoculation. Results revealed that defense enzymes activities and metabolites accumulations were significantly increased in plants treated with potassium phosphite in comparison to control. The highest concentration of CAT enzyme ($18.7 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) was measured in plants treated with 4 gr l^{-1} potassium phosphite (KPhi4) and 5 days after inoculation, that showed 2.81 fold increase in comparison with control (no inoculate with the pathogen). Also the highest concentration of enzymes GPX ($233 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) and SOD ($10.8 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$) were recorded at 3 days after inoculation in plants treated with KPhi4 in comparison with control plants. Results showed that accumulation of H_2O_2 in plant tissues and its time was in accordance with increasing of defense enzymes CAT, GPX and SOD and it would indicate that the H_2O_2 production is the prerequisite for production of defense-related enzymes. It was also revealed that MDA accumulation in KPhi4 treatment was less than other treatments, indicating reduced tissue damage and alleviated disease symptoms.

Keywords: Cucumber, defense enzymes, *Fusarium oxysporum*, potassium phosphite.

* Corresponding author E-mail: gharanjik@shahroodut.ac.ir

مقدمه

مقاومت القایی فراگیر یا سیستمیک (ISR)^۱ در گیاهان سازوکاری است در برابر محرک‌های زنده یا غیر زنده، که می‌تواند منجر به مقاومت در برابر تنش‌های محیطی شود. مقاومت القایی فراگیر به‌طور گسترده در گیاهان خانواده کدوییان مورد مطالعه قرار گرفته است (Cherif et al., 1992). بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه در خیار توسط قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* ایجاد می‌شود (Vakalounakis, 1996). برای مقابله با این بیماری اغلب از قارچ‌کش‌ها استفاده می‌شود که استفاده از این سموم شیمیایی افزون بر مهار بیماری منجر به آسیب به محیط زیست و سلامتی انسان نیز می‌شود. سازوکار جدید، شامل استفاده از ترکیب‌های شیمیایی سازگار با محیط زیست که موجب افزایش مقاومت گیاهان در برابر بیماری از راه القاء مقاومت فراگیر می‌شود، است (Daayf et al., 2000). در این میان، فسفیت‌ها (نمک‌های معدنی اسید فسفرو) به‌طور ویژه‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند.

فسفیت‌ها ترکیباتی با فرمول شیمیایی ($H_2PO_3^-$) هستند که از لحاظ شمار اکسیژن و هیدروژن با فسفات (HPO_4^{2-}) کاملاً متمایز هستند. فسفیت به علت دارا بودن یک اکسیژن کمتر از فسفات، سرعت حرکت آن بسیار بیشتر بوده و طی مدت زمان کوتاهی، در سرتاسر اندام‌های گیاهی انتشار می‌یابد و افزون بر تحریک رشد رویشی و زایشی گیاه منجر به کنترل طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زای قارچی می‌شود (Adams & Conral, 1953). فسفیت پتاسیم، به‌عنوان سمی فراگیر علیه عوامل بیماری‌زای قارچی و باکتریایی خاکزاد و هوازاد است که به صورت سیمپلاستیک در گیاه حرکت کرده و خاصیت پیشگیری، ایمن سازی و درمان دارد (Thao, 2008). فسفیت‌ها می‌توانند تأثیر مستقیم روی بیمارگر (پاتوژن) و یا تأثیر غیر مستقیم با تحریک پاسخ‌های دفاعی میزبان داشته باشند (Deliopoulos et al., 2010). تأثیر مستقیم شامل مهار رشد قارچ و کاهش یا تغییر سوخت‌وساز بیمارگر و تأثیر غیر مستقیم

شامل تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه مانند افزایش تولید فیتوالکسین‌ها و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)^۲، القای PR^۳ها، و تقویت دیواره یاخته‌ای است (Lobato et al., 2008). تحقیقات نشان داده است، محلول‌پاشی با فسفیت پتاسیم در سبب زمینی توانسته با القای پاسخ‌های دفاعی فراگیر، منجر به کاهش حساسیت به قارچ‌های *Phytophthora* *Erwinia* و عفونت *Fusarium solani infestans* *carotovora* شود (Lobato et al., 2011). Lu (1990) در بررسی‌های خود به این نتیجه دست یافتند، همه گیاهان خیاری که در تحقیقاتشان با فسفیت تیمار شده بودند، نشانه‌های بیماری پوسیدگی ریشه کمتری از خود نشان دادند.

تنش‌های مختلف محیطی شامل تنش‌های زنده و غیر زنده سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند. رادیکال‌های هیدروکسیلی که عامل رخداد تنش اکسیدکنندگی هستند، به‌وسیله فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده (آنتی‌اکسیدان) کنترل می‌شوند (Selote, 2004). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نقش مهمی در پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن از راه یکسری واکنش‌های پیچیده ایفا می‌کنند. این واکنش‌ها شامل تبدیل اکسیژن رادیکال به پراکسید هیدروژن توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و سمیت‌زدایی پراکسید هیدروژن به وسیله آنزیم‌های متعددی از جمله پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گلووتاتیون ردوکتاز است (Neto et al., 2005).

کاتالاز از شناخته‌شده‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که نقش مهمی در پاکسازی پراکسید هیدروژن و کاهش اثرات تخریبی آن در پراکسی‌زوم و گلی‌اکسیزم (Seckin et al., 2010) و میتوکندری (Foyer & Nector, 2000) ایفا می‌کند، همچنین پراکسید هیدروژن تولیدشده در نتیجه فعالیت SOD را تجزیه می‌کند. با فعالیت این آنزیم H_2O_2 به آب و اکسیژن تبدیل می‌شود (Blokina & Fagerstedt, 2010). آنزیم پراکسیداز از گروه آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز است که قادر به تجزیه ماده سمی آب اکسیژنه در فرآیندهای مختلف یاخته‌ای

2. Reactive oxygen species
3. Pathogenesis-related protein

1. Induced Systemic Resistance

سپس با نسبت‌های معین با هم ترکیب شده و در نهایت فسفیت پتاسیم با $\text{pH}=6/3$ برای محلول‌پاشی برگ گیاه تهیه شد. گیاهان که در مرحله یک تا دو برگ حقیقی با غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم تیمار شده بودند پس از پنج روز به خاک آلوده به قارچ منتقل شدند.

تهیه آینوکولوم قارچ، آلوده سازی خاک و انتقال گیاه به خاک آلوده

به این منظور ماسه و آرد ذرت به نسبت ۹ به ۱ (۹۰ گرم ماسه و ۱۰ گرم آرد ذرت) مخلوط شده و چند میلی‌لیتر آب مقطر نیز برای تأمین رطوبت به آن اضافه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر در اتوکلاو استرون شدند. پس از خنک شدن مخلوط‌ها، به هر ظرف چهار قطعه به قطر ۵ میلی‌متر از محیط کشت چهار روزه قارچ اضافه شد و مخلوط‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت سه تا چهار هفته نگهداری شدند تا قارچ در مخلوط ماسه-آرد ذرت به‌طور کامل رشد کند. سپس این مخلوط با خاک استرون‌شده (کوکوپیت، پرلیت و پیت به نسبت ۱، ۲، ۱) به نسبت ۲ درصد وزنی مخلوط شد. در گلدان‌های شاهد از مخلوط ماسه و آرد ذرت استرون استفاده شد (Molavi *et al.*, 2009). برای اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی از آخرین برگ توسعه‌یافته بوته‌های خیار استفاده شد. نمونه برگ‌ها از همه گیاهان مورد آزمایش در پنج زمان (روز اول، سوم، پنجم، هشتم و یازدهم) پس از تلقیح با قارچ (تهیه و در ورقه‌های آلومینیومی قرار گرفتند و بی‌درنگ در نیتروژن مایع غوطه‌ور و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج محلول آنزیمی

برای استخراج محلول‌های آنزیمی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز $0/5$ گرم از نمونه برگ‌ها با استفاده از هاون چینی کامل سرد شده و نیتروژن مایع، همگن (هموزن) و سپس ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد ($\text{pH}=7/5$) حاوی EDTA $0/5$ میلی‌مولار به آن اضافه شد. همگن‌شده‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰۰ در دقیقه و

است، این آنزیم در سیتوزول فعالیت داشته و از گلوکاتیون به‌عنوان کوفاکتور خود استفاده می‌کند (Dixon *et al.*, 1998). مالون دآلدئید در نتیجه تخریب پراکسیدهای اسیدهای چرب اشباع‌نشده به‌وجود می‌آید که به‌عنوان یک نشانگر برای مشخص کردن میزان آسیب‌های اکسایشی (اکسیداتیو) به لیپیدها به‌کار می‌رود و میزان آن بسته به میزان شدت تنش زیستی و یا غیر زیستی متفاوت است (Davey *et al.*, 2005).

این تحقیق با هدف بررسی تغییرات در میزان فعالیت برخی آنزیم‌های دفاعی و متابولیت‌های مرتبط به آن شامل گایاکول پراکسیداز (GPX)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، مالون دآلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن تحت تأثیر تیمار فسفیت پتاسیم و بررسی القای مقاومت در گیاه خیار در شرایط تنش *F. oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum* اجرا شد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه

این آزمایش در پاییز ۱۳۹۳ در شرایط کنترل‌شده گلخانه تحقیقاتی در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. در این آزمایش گیاه خیار (*Cucumis sativus L.*) رقم سلطان (شرکت Seminis، کشور آمریکا) در گلخانه با دمای روزانه ۲۴-۲۸ و دمای شبانه ۱۷-۱۵ درجه سلسیوس و با دوره نوری (فتوپریود) ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در گلدان‌های پلاستیکی (۲۳ × ۲۰ سانتی‌متر) که در انتها و دیواره آن‌ها سوراخ‌هایی ایجاد شده بود، حاوی کوکوپیت، پرلیت و پیت به نسبت ۱، ۲، ۱ کشت شدند. گلدان‌ها در سینی‌های پلاستیکی قرار گرفته و از محلول غذایی هوگلند برای تغذیه گیاهان از قسمت زیرین استفاده شد.

تهیه فسفیت پتاسیم و تیمار گیاه

فسفیت پتاسیم (KH_2PO_3) با $\text{pH}=6/3$ برای محلول‌پاشی برگ گیاه تهیه شد. برای تهیه این ترکیب ابتدا ۴۰ میلی‌لیتر محلول ۱۰ مولار KOH و ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۵ مولار اسید فسفرو تهیه شد.

آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار ۵۰ درصد احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم می‌شود.

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز
کمپلکس واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر پراکسید ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده است. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی آغاز و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی بر پایه میزان تراگایاکول تشکیل و با استفاده از ضریب خاموشی $1.33 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ به دست آمد (Chance & Maehly, 1955).

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دآلدئید

این شاخص بر پایه روش Stewart & Bewley (1980) اندازه‌گیری شد. در حدود ۰/۵ گرم از برگ‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید هموژن و به مدت ده دقیقه و با دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. ۲ میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصل با ۴ میلی‌لیتر از محلول ۲۰ درصد تری کلرواستیک اسید محتوای ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت سی دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل شد. نمونه‌ها دوباره به مدت ده دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۳ و ۶۰۰ نانومتر ثبت شد. میزان پراکسید شدن چربی‌ها از اختلاف بین طول‌موج‌های جذبی در ضریب خاموشی $1.55 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ به دست آمد.

اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن
ابتدا ۰/۵ گرم نمونه برگی همگن شد و به آن ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید (وزنی-حجمی) اضافه کرده و با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس کمپلکس واکنش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات

دمای ۴ درجه سلسیوس، سانتریفیوژ شدند. برای پیشگیری از تأثیر زیانبار انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها، محلول آنزیمی به دست آمده به سه قسمت تقسیم و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Sairam et al., 2003).

ثبت فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز
کمپلکس واکنش شامل ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی است. حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. با افزودن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز می‌شود و کاهش در جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت شد. تغییر جذب به دست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $36/6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی از محاسبه میزان پراکسید هیدروژن تجزیه شده توسط آنزیم محاسبه شد (Aebi, 1984).

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز
برای اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، از ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار، ۳۰۰ میکرولیتر متیونین ۱۲ میلی‌مولار، ۳۰۰ میکرولیتر نیتروبلوتترازولیوم کلراید ۷۵ میکرومولار، ۳۰۰ میکرولیتر ریبوفلاوین ۱ میکرومولار و ۳۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. پس از آنکه مخلوط به هم زده شد، لوله‌های آزمایش شیشه‌ای، به مدت ده دقیقه، در زیر یک لامپ فلورسنت ۱۵ وات به فاصله ۳۵ سانتی‌متر قرار داده شد. با خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر) خوانده شد (Giannopolitis, 1977). همچنین از یک لوله آزمایش حاوی مخلوط واکنش به جز عصاره آنزیمی به عنوان شاهد (بلانک) استفاده شد. یک واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به عنوان میزان

قارچ و کمترین میزان فعالیت آن ($U\ mg^{-1}\ protein$) (۳/۸) در گیاهان شاهد (تلقیح نشده با قارچ) و در روز سوم بوده است. نتایج همچنین نشان داد، صرف نظر از زمان، با افزایش غلظت فسفیت پتاسیم تا غلظت ۴ گرم بر لیتر، فعالیت آنزیم کاتالاز نیز افزایش یافته و پس از این غلظت کاهش می یابد. با محلول پاشی فسفیت پتاسیم، در غلظت های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فعالیت این آنزیم به ترتیب ۱/۳۶، ۱/۶۳، ۲/۱۶، ۲/۸۱ و ۱/۶۱ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داده و پس از آن سیر کاهشی پیدا کرده است.

تأثیر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

همان طور که در شکل ۲ دیده می شود میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاهچه های خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم در همه تیمارها در روز سوم پس از تلقیح با قارچ بیشینه بوده است. بیشترین میزان این آنزیم ($U\ mg^{-1}\ protein$) (۲۳۳) در تیمار ۴ گرم بر لیتر در سومین روز پس از تلقیح با قارچ و کمترین میزان فعالیت آن ($U\ mg^{-1}\ protein$) (۴۴/۸) در تیمار شاهد و در روز هشتم بوده است. فعالیت این آنزیم همانند فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم بیشتر بوده و با محلول پاشی فسفیت پتاسیم، در غلظت های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فعالیت این آنزیم به ترتیب ۰/۸۳، ۰/۹۸، ۱/۶۱، ۲/۲۱ و ۰/۹۶ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داده است.

تأثیر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز همانند دو آنزیم آنتی اکسیدانی دیگر در تیمار فسفیت پتاسیم با غلظت ۴ گرم بر لیتر بیشترین میزان ($U\ mg^{-1}\ protein$) (۱۰/۸) را در روز سوم پس از تلقیح با قارچ و در تیمار شاهد کمترین میزان ($U\ mg^{-1}\ protein$) (۳/۵) را در روز یازدهم نشان داده است (شکل ۳). همچنین در همه تیمارهای فسفیت پتاسیم با غلظت های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فعالیت این آنزیم به ترتیب ۰/۵۲، ۰/۶۱، ۰/۶۵، ۱/۴ و ۰/۶۱ برابر افزایش یافته بود.

۱۰ میلی مولار ($pH=7$) و ۱ میلی لیتر $1\ KI$ مولار تهیه و میزان جذب آن ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر سنجش شد. میزان پراکسید هیدروژن با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد (Sergiev *et al.*, 1997).

طرح آماری مورد استفاده و تجزیه و تحلیل داده ها

این تحقیق به صورت آزمایش کرت های خرد شده (اسپلیت پلات) در زمان بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. پنج سطح تیمار فسفیت پتاسیم (غلظت های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر) به عنوان عامل اصلی و پنج زمان اندازه گیری (روز اول، سوم، پنجم، هشتم و یازدهم پس از تلقیح با قارچ) به عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شد. تجزیه آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون LSD در سطح احتمال مورد نظر استفاده شد.

نتایج

تأثیر فسفیت پتاسیم بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در گیاهان خیار تلقیح شده با قارچ

F. oxysporum f. sp. radicle-cucumerinum

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد، تأثیر سطوح مختلف فسفیت پتاسیم و تأثیر زمان و همچنین اثر متقابل این دو عامل روی فعالیت آنزیم های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در برگ های خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum f. sp. radicle-cucumerinum* در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۱). همچنین میزان فعالیت آنزیم کل در زمان های مختلف و تیمار با غلظت های مختلف فسفیت پتاسیم نیز تفاوت معنی داری نشان داده و فسفیت پتاسیم توانسته منجر به افزایش فعالیت آنزیم های دفاعی شود.

اثر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج مقایسه میانگین داده ها برای اثر متقابل آنزیم کاتالاز (شکل ۱) نشان داد، بیشترین میزان فعالیت این آنزیم ($U\ mg^{-1}\ protein$) (۱۸/۷) در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم و پس از پنج روز پس از تلقیح با

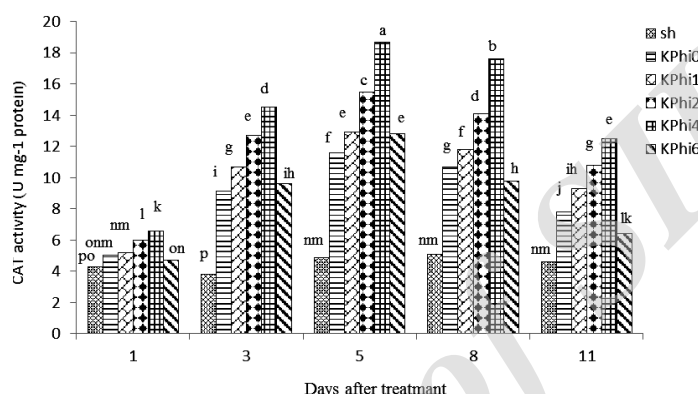
جدول ۱. تجزیه واریانس و میانگین مربعات فعالیت آنزیمی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید و مالون دآلدئید

Table 1. Analysis of variance and mean squares of enzymatic activity of the catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), superoxide dismutase(SOD), hydrogen peroxide(H₂O₂) and malondialdehyde (MDA)

Sources of Variance	df	Mean squares (MS)				
		CAT	GPX	SOD	H ₂ O ₂	MDA
Potassium phosphite (KPhi)	5	156.401**	30592.489**	21.379**	0.153**	7198.656**
Error(Ea)	12	0.137	11.007	0.001	0.00	0.95
Time	4	150.693**	7065.213**	18.896**	0.359**	5783.032**
KPhi × Time	20	7.462**	1285.691**	1.216**	0.015**	294.533**
Error(Eb)	48	0.126	4.386	0.000	0.00	1.437
CV (%)		3.719	1.825	0.175	1.219	1.30

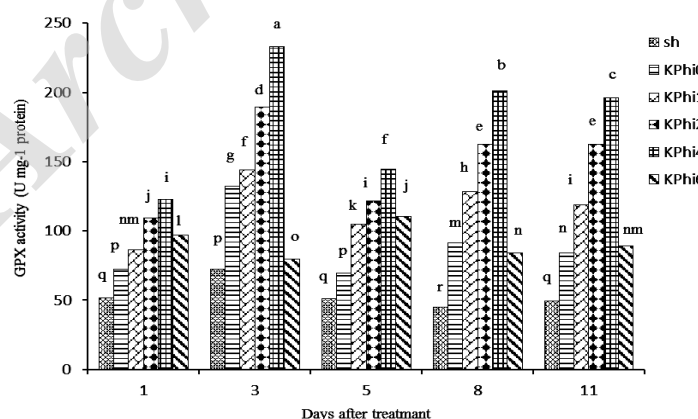
** Significant at the 1% probability level.

** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.



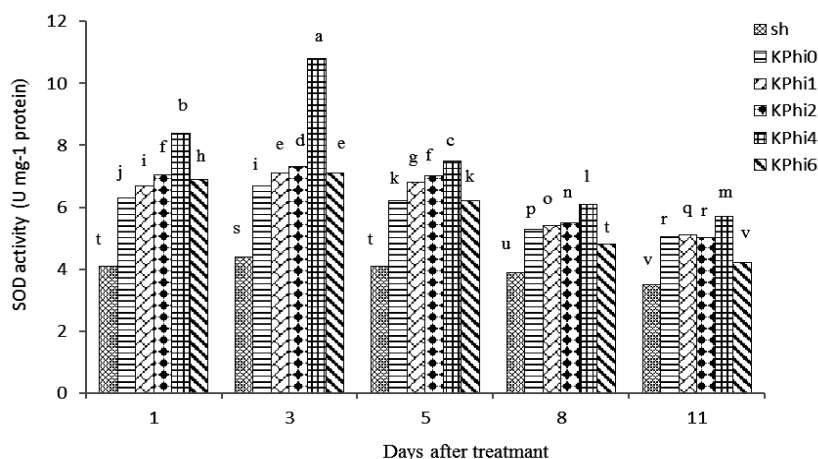
شکل ۱. تغییر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در بافت‌های گیاهان خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم در روزهای ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum*. (sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6 به ترتیب شاهد، غلظت های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

Figure 1. Changes in activity level of catalase (CAT) in tissues of cucumber plants treated with different amounts of potassium phosphate during days 1, 3, 5, 8 and 11 after infection with fungus *F. oxysporum f. sp radicis-cucumerinum*. (Sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6 are control, concentrations of 0, 1, 2, 4 and 6 g/l potassium phosphite, respectively).



شکل ۲. تغییر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) در بافت‌های گیاهان خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم در روزهای ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum*. (sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6 به ترتیب شاهد، غلظت های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

Figure 2. Changes in activity level of guaiacol peroxidase (GPX) in tissues of cucumber plants treated with different amounts of potassium phosphate during days 1, 3, 5, 8 and 11 after infection with fungus *F. oxysporum f. sp radicis-cucumerinum*. (Sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6 are control, concentrations of 0, 1, 2, 4 and 6 g/l potassium phosphite, respectively).



شکل ۳. تغییر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بافت‌های گیاهان خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم در روزهای ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum f. sp. radidis-cucumerinum*. KPhi1, KPhi0, sh). KPhi2, KPhi4, KPhi6 به ترتیب شاهد، غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

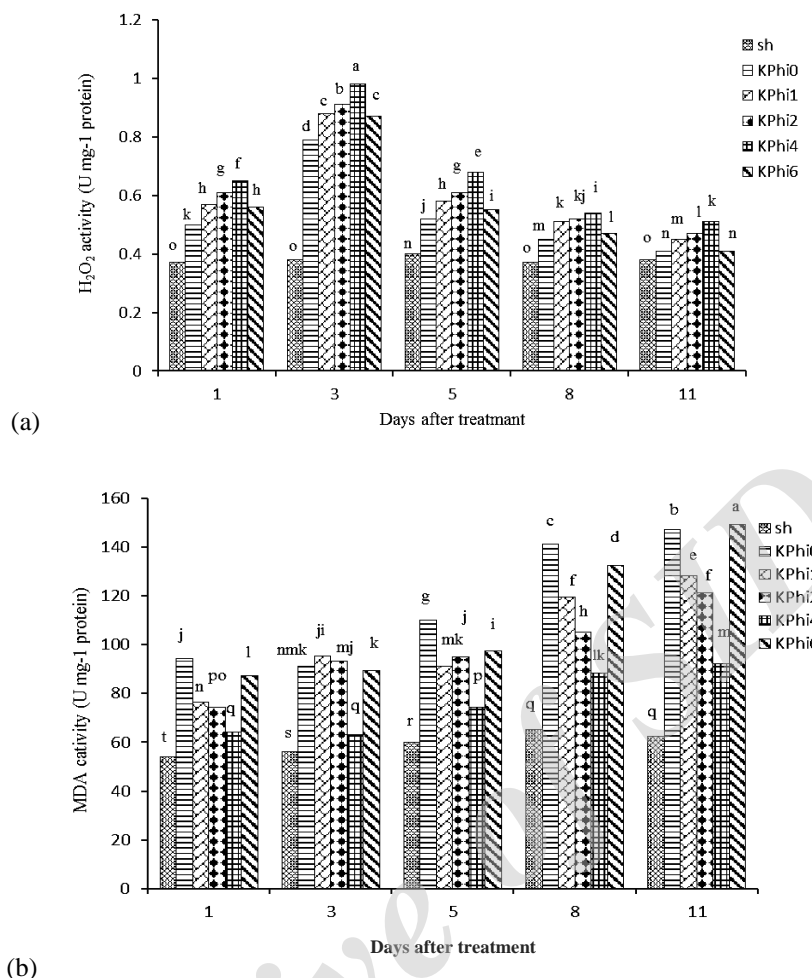
Figure 3. Changes in activity level of superoxide dismutase (SOD) in tissues of cucumber plants treated with different amounts of potassium phosphite during days 1, 3, 5, 8 and 11 after infection with fungus *F. oxysporum f. sp. radidis-cucumerinum*. (Sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6 are control, concentrations of 0, 1, 2, 4 and 6 g/l potassium phosphite, respectively).

افزایش غلظت فسفیت پتاسیم تا غلظت ۴ گرم بر لیتر، فعالیت پراکسید هیدروژن افزایش یافته درحالی‌که میزان مالون دآلدئید کاهش یافته است. با محلول‌پاشی فسفیت پتاسیم، در غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فعالیت پراکسید هیدروژن ۱/۰۷، ۱/۳۱، ۱/۳۹، ۱/۵۷ و ۱/۲۸ و فعالیت مالون دآلدئید به ترتیب ۱/۳۶، ۱/۰۵، ۰/۹۴، ۰/۴۷ و ۱/۳۹ نسبت به شاهد افزایش نشان داده است.

بحث

با توجه به نتایج این آزمایش، میزان آلودگی در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم (KPhi4) نسبت به تیمار قارچ کمترین میزان (۵۰ درصد) را داشت. همچنین درصد پوسیدگی در تیمارهای KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4 و KPhi6 به ترتیب ۱۰۰، ۸۲/۵، ۷۵، ۵۰ و ۹۰ درصد بود. فعالیت آنزیم‌های دفاعی GPX, CAT, SOD و میزان متابولیت H_2O_2 در گیاهان آلوده شده به قارچ *F. oxysporum f. sp. radidis-cucumerinum* تیمار با فسفیت پتاسیم به ترتیب ۲/۸، ۲/۲، ۱/۴ و ۱/۵ برابر نسبت به شاهد (تلقیح نشده با قارچ) و ۶۱/۲، ۷۵/۸، ۶۱/۱ و ۲۴ درصد نسبت به تیمار KPhi0 (عدم مصرف فسفیت پتاسیم) افزایش یافته است.

تأثیر فسفیت پتاسیم بر میزان فعالیت پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید در برگ‌های خیار تیمار شده با قارچ *F. oxysporum f. sp. radidis-cucumerinum* نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد، تأثیر سطوح مختلف فسفیت پتاسیم و تأثیر زمان و همچنین اثر متقابل این دو عامل بر فعالیت پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدی (مالون دآلدئید) در برگ‌های خیار تلقیح شده با قارچ *F. oxysporum f. sp. radidis-cucumerinum* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها برای اثر متقابل (شکل ۴-a) نشان داد، بیشترین میزان فعالیت پراکسید هیدروژن ($0.98 U mg^{-1} protein$) در تیمار ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم و ۳ روز پس از تلقیح با قارچ و کمترین میزان فعالیت آن ($0.37 U mg^{-1} protein$) مربوط به گیاهان شاهد (تلقیح نشده با قارچ) و در روز آخر اندازه‌گیری بوده است. این درحالی است که بیشترین میزان مالون دآلدئید مربوط به تیمار ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم ($1.49/4 U mg^{-1} protein$) در روز ۱۱ پس از تلقیح با قارچ و کمترین میزان آن ($0.53/9 U mg^{-1} protein$) مربوط به تیمار شاهد و در روز اول است (شکل ۴-b). نتایج همچنین نشان داده است، صرف‌نظر از زمان، با



شکل ۴. میزان تغییر پراکسید هیدروژن (الف) و مالون دآلدئید (ب) در بافت گیاهان خیار تیمار شده با مقادیر مختلف فسفیت پتاسیم در روزهای ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum* (sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6 به ترتیب شاهد، غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم).

Figure 4. Changes in hydrogen peroxide (A) and malondialdehyde (B) in tissues of cucumber plants treated with different amounts of potassium phosphite during days 1, 3, 5, 8 and 11 after infection with fungus *F. oxysporum f. sp radicis-cucumerinum*. (Sh, KPhi0, KPhi1, KPhi2, KPhi4, KPhi6 are control, concentrations of 0, 1, 2, 4 and 6 g/l potassium phosphite, respectively).

بر لیتر فسفیت پتاسیم) نسبت به تیمار KPhi0 (بدون کاربرد فسفیت پتاسیم) می‌تواند نشان‌دهنده کاهش آسیب بافتی و مهار تقریبی بیماری باشد. تنش قارچی باعث تنش اکسایشی شده که نتیجه آن تجمع گونه‌های اکسیژن فعال مانند H_2O_2 و O_2^{-2} است (Turkan & Demiral, 2009) که با تغییراتی در فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز (Morkunas & Gemerek, 2007)، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز برای دفاع در برابر ROSها همراه است. در این تحقیق نیز آنزیم‌های پاکسازی‌کننده پراکسید هیدروژن (کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) که در سم‌زدایی این

این در حالی است که میزان پراکسیداسیون لیپیدی (MDA)، ۴۷/۷ درصد نسبت به شاهد افزایش و ۳۷/۵ درصد نسبت به تیمار KPhi0 کاهش یافته است. MDA در نتیجه تخریب پراکسیدهای اسیدهای چرب اشباع نشده، به وجود می‌آید که به‌عنوان شاخصی برای مشخص کردن میزان آسیب‌های اکسایشی به چربی‌ها به کار می‌رود و میزان آن بسته به میزان شدت تنش زیستی یا غیر زیستی متفاوت است (Davey et al., 2005). میزان MDA به‌عنوان یک نشانگر برای ارزیابی وضعیت درون یاخته در شرایط تنش استفاده می‌شود. کاهش معنی‌دار MDA در تیمار KPhi4 (غلظت ۴ گرم

پایم‌رسان ثانویه را در مسیر انتقال پیام بازی کند. بررسی‌های دیگر نشان داد، تیمار گیاهان سیب‌زمینی تلقیح‌شده با قارچ *Phytophthora infestans*، با فسفیت پتاسیم منجر به افزایش ترکیب‌های ضد میکروبی مانند فیتوالکسین‌ها شد (Andreu et al., 2006). در آزمایش دیگری نیز فسفیت و فسفات پتاسیم را به محیط کشتی که قارچ پیتوم قرار داشت، اضافه کردند که نشان داده شد فسفیت پتاسیم از رشد قارچ جلوگیری می‌کند (Landschoot, 2005). همچنین Aryaie et al. (2015) تأثیر ترکیب‌های مختلف کودی را در کاهش رشد قارچ *Phytophthora nicotianae* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه درختان زردآلو بررسی کردند، نتایج آنان نشان داد کود حاوی فسفیت پتاسیم به‌طور معنی‌داری بر کاهش رشد این قارچ مؤثر بود. صرف‌نظر از تیمارهای مختلف فسفیت پتاسیم، میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری متفاوت بود فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گاپاکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید به ترتیب در روزهای ۵، ۳، ۳، ۳ و ۱۱ پس از تلقیح با قارچ بیشینه بوده است. در مطالعه حاضر، فسفیت پتاسیم در غلظت‌های مختلف منجر به تغییر فعالیت آنزیم‌های دفاعی در گیاهچه‌های خیار شده است. در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم، با افزایش غلظت فسفیت پتاسیم، میزان ساخت آنزیم‌ها نسبت به شاهد بیشتر شده اما در غلظت ۶ گرم بر لیتر کاهش ساخت در میزان آنزیم‌ها مشاهده شد. این موضوع بیانگر این است که فسفیت پتاسیم تا غلظت خاصی می‌تواند در افزایش ساخت آنزیم‌های دفاعی نقش داشته باشد و بیشتر از آن غلظت تأثیر بازدارندگی خواهد داشت. نتایج مشابهی مبنی بر اثر غلظت‌های مختلف فسفیت پتاسیم با تأثیر قارچ‌کشی آن‌ها وجود دارد. در تحقیقی چگونگی و عمل فعالیت قارچ‌کش فسفیت‌دار بر کنترل قارچ *Phytophthora* و *Pythium* آزمایش شد. نتایج این بررسی نشان داد، هنگامی که غلظت‌های پایین فسفیت در بین ریشه‌ها وجود داشت، گسترش زخم ناشی از قارچ نیز کاهش معنی‌داری داشته است (Jackson et al., 2000). همچنین گروهی از محققان تأثیر فسفیت را روی قارچ‌های پیتوم و فایتوفتورا بررسی کردند، نتایج

متابولیت سمی نقش دارند در همه تیمارهای فسفیت پتاسیم به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافتند. از سویی با توجه به افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تیمار تنش قارچ بدون اعمال فسفیت پتاسیم (KPhi0) به‌نظر می‌رسد افزایش فعالیت این آنزیم‌ها یکی از سازوکارهای تحمل به تنش قارچی است. از سوی دیگر، تیمار فسفیت پتاسیم نیز به‌طور مؤثر به افزایش قابل ملاحظه‌ی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه خیار انجامید، که احتمال دارد سازوکار عمل فسفیت پتاسیم برای حفاظت از تنش ناشی از بیمارگر قارچی *F.oxysporum f. sp. radices-cucumerinum* از همین راه باشد. نتایج این بخش از تحقیق با نتایج Boerjan et al. (2003) همخوانی دارد. نتایج این محققان نشان داد، در گیاهان علف تال (*Arabidopsis thaliana*) تلقیح‌شده با *Phytophthora. Palmivora* و *Phytophthora. Cinnamomi* که با فسفیت پتاسیم تیمار شده بودند، مقاومت در برابر عفونت با سرعت بیشتر و به‌طور کارآمدتری انجام گرفت. همچنین آنان اظهار داشتند که فسفیت پتاسیم نه تنها باعث افزایش تولید ROSها می‌شود، بلکه با افزایش ترکیب‌های چربی (لیگنینی) در تقویت دیواره یاخته‌ای نقش دارد. در هر حال، افزایش مشاهده‌شده در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نتیجه کاربرد فسفیت پتاسیم، نقش این ترکیب را به عنوان یک سامانه تنظیم‌کننده فعالیت آنزیم‌های یادشده نشان می‌دهد. تحقیقات پیشین نشان داده است، تیمار فسفیت پتاسیم منجر به افزایش تجمع H_2O_2 و O_2^{2-} در گیاهان سیب‌زمینی تلقیح‌شده با قارچ *Phytophthora* شده و در نتیجه افزایش مقاومت به این عامل بیماری مشاهده شد (Machinan et al., 2012). در این بررسی نیز میزان تجمع H_2O_2 در بافت‌ها و نیز زمان تجمع آن با آنزیم‌های دفاعی CAT، GPX و SOD همخوانی داشته و افزایش آن‌ها با هم متوازن بوده است. احتمالاً تولید H_2O_2 به نوعی پیش‌ساز ساخت (سنتز) آنزیم‌های دفاعی است و افزایش تولید H_2O_2 در فرآیند تنش می‌تواند به‌عنوان یک سیگنال القایی برای فعال‌سازی سازوکارهای دفاعی عمل کند (Desikin et al., 2001). بنابراین اکسیژن فعال می‌تواند به‌عنوان یک شاخص یاخته‌ای برای تنش در نظر گرفته شود و نقش یک

مقاومت در برابر قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه خیار شود. نتایج نشان داد، بهترین غلظت فسفیت پتاسیم برای افزایش آنزیم‌های دفاعی، غلظت ۴ گرم بر لیتر آن بوده است که گیاه در این غلظت بیشترین فعالیت آنزیم‌های دفاعی را در روزهای سوم و پنجم پس از تلقیح با قارچ را داشته است.

سیاسگزاری

این تحقیق در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری) و با حمایت مالی آن پژوهشکده انجام شده است. بدین‌وسیله از مدیریت و کارکنان آن پژوهشکده، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تحقیقات آنان نشان داد، فسفیت در غلظت‌های پایین می‌تواند رشد این قارچ‌ها را محدود سازد (Smilie *et al.*, 1990). نتایج این تحقیق نشان داد، القاء و افزایش ساخت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی در حضور فسفیت پتاسیم می‌تواند به‌عنوان یک پاسخ دفاعی در برابر قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* در گیاه خیار باشد. در عین حال بررسی‌های گسترده‌تری برای بررسی ارتباط بین این آنزیم‌ها و سازوکار عمل فسفیت پتاسیم مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد، پیش‌تیمار گیاهان با غلظت‌های مناسب فسفیت پتاسیم، از راه افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی می‌تواند منجر به

REFERENCES

1. Adams, F. & Conral, J. P. (1953). Transition of phosphate to phosphite. *Soil Science*, 75, 361-371.
2. Aebi, H. E. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
3. Andreu, A., Guevara, M., Wolski, E., Daleo, G. & Caldiz, D. (2006). Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Management Science*, 62, 162-70.
4. Ariaei, A., Eskandari, M., Fazli, H. & Pirnia, M. (2014). The effect of different compounds in reducing the growth of phytophthora. *Agricultural Research*, 7, 20-22. (in Farsi)
5. Blokhina, O. & Fagerstedt K. V. (2010). Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 359-373.
6. Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519-46.
7. Chance, B. & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 11, 764-755.
8. Cherif, M., Benhamou, N. & Menzies, J. G. (1992). Silicon induced resistance in cucumber plant against *Pythium ultimum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 41, 411-425.
9. Daayf, F., Ongena, M., Boulanger, R. N., Hadrami, E. I. & Belanger, R. R. (2000). Induction of phenolic compounds in two cultivars of cucumber by treatment of healthy and powdery mildew infected plants with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Jornal of Chemical Ecology*, 26, 1579-1593.
10. Davey, M. W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J. & Swennen, R. I. (2005). High throughput of malondialdehyde in plant. *Analytical Biochemistry*, 347(2), 201-207.
11. Deliopoulos, T., Kettlewell, P. S. & Hare, M. C. (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. *Crop Protection*, 29, 1059-1075.
12. Desikin, R., Mackerness, S., Hancock, J. & Neill, S. J. (2001). Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Journal of Plant Physiology*, 127, 159-172.
13. Dixon, D. P., Cummins, L., Cole, D. J. & Edwards, R. (1998). Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 258-266.
14. Foyer, C. H. & Noctor, G. (2000). Oxygen processing in photosynthesis regulation and signaling. *New Phytologist*, 146 (3), 395-388.
15. Giannopolitis, S. (1977). Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59, 309-314.
16. Jackson, T., Burgess, T., Colquhoun, I. & Hardy, G. (2000). Action of the fungicide phosphate on eucalyptus marginata inoculated with *phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 15, 235-238.
17. Janda, T., Szalai, G., Tari, I. & Paldi, E. (1999). Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, 208, 175-180.
18. Landschoot, P. & Cook, J. (2005). Sorting out the phosphonate products. *Plant physiology*, 12, 73-74.

19. Lobato, M. C., Olivieri, F. P., Wolski, E. A., Daleo, G. R., Caldiz, D. O. & Andreu, A. B. (2008). Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 349-358.
20. Lobato, M. C., Machinandiarena, M. F., Tambascio, C., Dosio, G. A. A., Caldiz, D. O., Daleo, G. R., Andreu, A. B. & Olivieri, F. P. (2011). Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. *Eur. J. Plant Pathol*, 130, 155-163.
21. Machinan, D., Lobato, M. C., Feldman, M. L., Rauldaleo, G. & Andrex, A. B. (2012). Potassium phosphate primes defense responses in potato against phytophthora infestans. *Plant physiology*, 70, 120-123.
22. Molavi, E., Aminian, H., Etebarian, H. R. & Shahriari, D. (2009). Investigation the resistance of greenhouse-cucumber cultivars to *Fusarium* stem and root rot disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-ucumerinum*). *Journal of Agriculture*, 11, 177-189.
23. Moor, U., Polldma, P., Tonutare, T., Karp, K., Starast, M. & Vool, E. (2009). Effect of phosphate fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Journal of Scientia Horticulturae*, 119, 264-269.
24. Morkunas, I. & Gemerek, J. (2007). The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupin embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiology*, 164, 497-506.
25. Neto, A. D., Prisco, J. T., Eneas-Filho, J., Abreu, C. E. B. & Gomes-Filho, E. (2005). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt sensitive maize genotypes. *Environ Experimental Botany*, 56, 87-94.
26. Rakha, M. & Lu, S. (1990). Evaluation of phosphate rates against phytophthora root rot disease on cucumber. *Plant Physiology*, 20, 57-59.
27. Rickard, D. A. (2000). Review of phosphorus acid and its salts as fertilizer materials. *Journal of Plant Nutrition*, 23, 161-180.
28. Sairam, R. K., Rao, K. V. & Srivastava, G. C. (2003). Differential response wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163, 1037-1046.
29. 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 barley grass) and *Hordeum vulgare* L. (Cultivated barley). *Jornal of Environmental and Experimental Botany*, 69, 76-85.
30. Selote, D. S. & Khanna-Chopra, R. (2004). Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defense in rice panicles. *Plant Physiology*, 121, 462-471.
31. Sergiev, V., Alexieva, E. & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus de l'Academie Blugare Sciences*, 51, 121-124.
32. Smilie, R., Dunstan, R., Grant, B., Giffith, J., Iser, J. & Niere, J. (1990). The mode of action of the antifungal agent phosphate. *Plant physiology*, 20, 185-192.
33. Stewart, R. R. C. & Bewley, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, 65, 245-248.
34. Thao, H. T. B. & Yamakawa, T. (2008). Phosphite: fungicide fertilizer or biostimulator. *Journal of soil science and Plant Nutririon*, 55, 228-234.
35. Turkan, I. & Demiral, T. (2009). Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Exprimantal Botany*, 67, 2-9.
36. Vakalounakis, D. J. (1996). Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-cucumerinum* f. sp. Nov. *Plant Disease*, 80, 313-316.