

ارزیابی بیان ژن‌های کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز در پاسخ به آلودگی قارچ فوزاریوم در لاین‌های مقاوم، نیمه مقاوم و حساس ذرت

Evaluation of the gene expression of Catalase and Superoxide dismutase in response to Fusarium fungus infection in resistant, moderate resistant and sensitive corn lines

سید افشین مساوات^۱، حجت اله مظاهری لقب^{۲*}، حسن سلطانلو^۳

- ۱- دانش‌آموخته دکتری، دانشگاه بوعلی سینا همدان و مربی پژوهش بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان
- ۲- دانشیار، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
- ۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Mosavat SA¹, Mazahery-Laghab H^{*2}, Soltanloo H³

- 1- Graduated PhD, Department of Agronomy and Horticulture Research, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan
- 3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Plant Production College, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hojat.mazahery@yahoo.co.uk

(تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

گیاهان با توسعه یک سازوکار دفاعی ضد میکروبی، می‌توانند خود را در مقابل آسیب‌های تنش اکسیداتیو محافظت کنند. آنزیم‌های خاص آنتی‌اکسیدان‌های مختلف مانند پراکسیداز^۱ (POX)، کاتالاز^۱ (CAT)، سوپراکسید دسموتاز^۱ (SOD) و پلی فنول اکسیداز^۱ (PPO) در متابولیسم گونه‌های فعال اکسیژنی، در طی حمله بیمارگر شرکت می‌کنند. به منظور شناسایی نقش این آنزیم‌ها در مقاومت ذرت به قارچ *F. verticillioides*، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. آلوده سازی ابریشم و دانه ذرت با سوسپانسیون فوزاریوم صورت گرفت و از آن‌ها در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از آلودگی، نمونه برداری شد و بلال‌های آلوده نشده به‌عنوان شاهد منظور شدند. بعد از ارزیابی بیان ژن CAT و SOD با استفاده از روش Real-Time PCR، مشخص شد این دو ژن هماهنگ با هم عمل می‌کنند. بیان این دو ژن بعد از آلودگی در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس تغییر پیدا می‌کند اما میزان بیان آن‌ها قبل از آلودگی در لاین مقاوم بیشتر مشاهده شد. بیان ژن‌های CAT و SOD در لاین مقاوم بیش‌تر از لاین حساس بود. هم‌چنین مشاهده شد که آلودگی از طریق ابریشم خسارت بیش‌تری نسبت به آلودگی از طریق دانه به بلال ذرت وارد می‌کند. نقاط زمانی که تغییرات چشمگیر در بیان ژن‌های CAT و SOD رخ داد در ساعات اولیه تماس با پاتوژن و اواخر آلودگی بود.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
ذرت
سوپراکسید دسموتاز
فوزاریوم
کاتالاز

مقدمه

ذرت (*Zea mays*) با عدد کروموزومی $2n=2x=20$ به‌عنوان یک محصول غذایی راهبردی، قسمت عمده‌ای از زمین‌های قابل کشت جهان را به خود اختصاص داده و برای غذا، خوراک دام، سوخت و فیبر، نه تنها در مناطق معتدل بلکه در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مورد استفاده قرار می‌گیرد. چنانچه عوامل بازدارنده رشد این محصول از جمله بیماری‌های ذرت به خوبی شناخته و با آن‌ها مقابله اصولی انجام گیرد، افزایش سطح کشت و تولید بیش‌تر آن کاملاً قابل پیش‌بینی است. بنابراین با توجه به افزایش روند روز افزون جمعیت، ضرورت افزایش تولیدات زراعی و نقشی که ذرت می‌تواند در این ارتباط نقش داشته باشد ایجاب می‌کند که ضمن به‌کارگیری دستاوردهای تحقیقاتی به عوامل دیگری از جمله بیماری‌ها و خسارات ناشی از آن‌ها پرداخته شود.

از میان بیماری‌های گوناگون مبتلا کننده ذرت که در مجموع تعداد آن‌ها به ۶۰ مورد می‌رسد، یکی از مهم‌ترین و زیان‌بارترین آن‌ها پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت (*Fusarium ear rot*) می‌باشد که علاوه بر خسارت‌های کمی و کیفی به محصول، با تولید مایکوتوکسین‌های مختلف، سلامت انسان و دام را نیز به خطر می‌اندازد (Bacon et al. 2004). تاکنون گونه‌های مختلفی از فوزاریوم به‌عنوان عامل این بیماری معرفی شده‌اند ولی گونه *Fusarium verticillioides* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای بلال، ساقه، ریشه و گیاهچه ذرت شناخته شده‌است (Drepper and Renfro 1990). نشانه آلودگی در بلال، ابتدا به صورت لکه‌ها و مناطق تغییر رنگ یافته صورتی عنبی تا قرمز قهوه‌ای روی نوک دانه‌ها ظاهر می‌شود. این لکه‌ها ممکن است به صورت پراکنده یا پیوسته روی دانه‌ها در قسمت نوک بلال به وجود بیایند. در صورت پیشرفت بیماری کپک پودر مانند یا پنبه‌ای صورتی رنگ روی دانه‌های آلوده رشد می‌نمایند. عامل این بیماری می‌تواند یک متابولیت ثانویه از خانواده مایکوتوکسین به‌نام moniliform بسازد که یک ماده سرطان‌زاست و با نقص لوله عصبی در انسان و بیماری شدید در دام ارتباط داده می‌شود (Gelderblom et al. 1988).

گیاهان دارای سازوکارهایی هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهد با تنش‌های مختلف، مانند محدودیت مواد غذایی، حضور اکسیدان‌ها در محیط و آسیب ناشی از مواد شیمیایی یا عوامل فیزیکی، مقابله نمایند. سلول‌های شبه‌هسته‌دار و هسته‌دار در برابر این تنش‌ها، سریعاً پاسخ داده و متابولیسم خود را با شرایط محیطی وفق می‌دهند (Alla and Hassan 2006). تغییرات در متابولیسم میزبان در مقابله با نفوذ بیمارگر به دو دسته اصلی تقسیم می‌شود: دسته اول تغییرات رخ داده در خارج از منطقه آسیب دیده است که می‌تواند چند روز پس از مایه‌کوبی مشاهده شود و دسته دوم تغییراتی است که با سازوکار دفاعی مرتبط می‌شود و در مدت زمان کوتاهی پس از آلودگی در اطراف سلول‌های آسیب دیده مشاهده می‌شود.

بررسی واکنش تنش، نشان دهنده وجود شبکه‌ای گسترده از سیستم‌های نظارتی هماهنگ می‌باشد. این سازوکارها عمدتاً با مشارکت تعداد بسیار زیادی از متابولیت‌های ثانویه متنوع به همراه آنزیم‌ها، آنتی بیوتیک‌ها و سموم انجام می‌شود. اشکال واکنش پذیر اکسیژن از قبیل H_2O_2 ، O_2^- و OH توسط عوامل محیطی و متابولیسم‌های هوازی طبیعی در سیستم انتقال الکترون تولید می‌شوند که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌توانند به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی حمله کنند و منجر به جهش، مهار رشد و مرگ سلولی شوند (Fridovich 1978). با این حال، سلول‌های گیاهی دارای اجزای آنزیمی و غیر آنزیمی هستند که می‌توانند سلول‌ها را از خسارت اکسید کننده محافظت کنند.

گیاهان با توسعه یک سیستم دفاعی ضد میکروبی خود را در مقابل آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان‌های مختلف مانند پراکسیداز (POX)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دسموتاز (SOD) و پلی فنول اکسیداز (PPO) در متابولیسم ROS در طی حمله بیمارگر شرکت می‌کنند (Torres et al. 2006). سوپراکسید دسموتاز (SOD) متالوآنزیمی است که رادیکال سوپراکسید (O_2^-) را به هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و اکسیژن مولکولی (O_2) کاتالیز می‌کند (Santos et al. 1999). این آنزیم تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می‌شود و نقش مهمی در دفاع در برابر تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند.

دریا قرار گرفته است. خاک مزرعه از نوع لومی رسی، عمق خاک زراعی ۳۰ تا ۴۵ سانتی‌متر و اسیدیته آن بین ۷/۵ الی ۸ می‌باشد. از لحاظ آب و هوایی، این ایستگاه جزء مناطق گرم و معتدل به شمار می‌رود و میزان بارندگی سالیانه آن ۴۰۰ الی ۴۵۰ میلی‌متر است. این آزمایش در سه تکرار و هر لاین در دو خط پنج متری به فاصله بوته ۲۰ سانتی‌متر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی کشت شدند.

برای تهیه اسپور قارچ، *F. verticillioides* بر روی صفحه‌های پتری دیش به قطر ۹cm در محیط کشت آگار سیب زمینی دگستروز (PDA) در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. کندیوم‌ها پس از شستشوی صفحات با آب مقطر، خراش دادن سطح آگار با اسکارپل و عبور دادن سوسپانسیون اسپور از پارچه استریل جمع‌آوری شدند. در نهایت، سوسپانسیون اسپور با اضافه کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر آب استریل تهیه شد.

برای ارزیابی ژنوتیپ‌ها، بلال‌ها ۱۵ روز پس از گرده افشانی با استفاده از روش مایه‌کوبی سرنگ، مایه‌زنی شدند. مایه‌کوبی از یک سوم بالایی بلال برای آلوده سازی نمونه دانه و از نوک بلال برای آلوده سازی ابریشم با سوسپانسیون *F. verticillioides* انجام شد و برای بالا بردن رطوبت و ایجاد شرایط بیماری با کیسه پلاستیکی پوشیده شدند. بلال‌های دوم هر بوته نیز با دو روش آلوده سازی از طریق دانه و ابریشم به صورت جداگانه آلوده‌سازی و برای ارزیابی فنوتیپی تا زمان رسیدگی فیزیولوژیکی نگهداری شدند. در زمان رسیدگی فیزیولوژیکی، تعداد ۱۰ بلال در هر ردیف برداشت شد و نسبت به یادداشت برداری شاخص شدت بیماری (DS) هر تیمار اقدام شد. نمره دهی شدت بیماری بر اساس مقیاس ۱ تا ۷ بر مبنای درصد آلودگی و پیشرفت بیماری در بلال از صفر تا ۱۰۰ درصد انجام شد (Reid and Zhu 2005).

بلال مایه‌کوبی نشده (T0) به‌عنوان شاهد انتخاب و از بلال‌های آلوده در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی و برای هر زمان از سه بلال استفاده و نمونه دانه و نمونه ابریشم این سه بلال با هم جمع شدند. برای جلوگیری از خطای ناشی از آسیب مکانیکی، نمونه گیری از بذرها مجاور قسمت مایه‌کوبی

H_2O_2 تولید شده از طریق فعالیت SOD در سلول به سرعت در سراسر غشاء پخش شده و به‌عنوان یک اکسیدکننده و کاهش دهنده، برای سلول سمیت ایجاد می‌کند (Halliwell 1999). به‌طور کلی، H_2O_2 به‌عنوان عمومی‌ترین ROS شناخته شده با مشارکت در فرایند دفاعی گیاه، علاوه بر اثرات ضد میکروبی مستقیم، مانند مهار جوانه زنی اسپورهای بسیاری از بیمارگرهای قارچی (Peng and Kuc 1992)، در اتصال متقابل اکسیداتیو گلیکو پروتئین دیواره سلولی نیز نقش دارد (Bradley et al. 1992). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که برخی بیمارگرها ممکن است تولید ROS را به نفع خود تحریک کنند و منجر به مرگ سلول‌های حساس و در نهایت استقرار موثر قارچ شوند (Schouten et al. 2002). کاتالاز (CAT) یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهمی است که سم زدایی H_2O_2 را انجام داده و لیپیدهای هیدروپراکسید را به الکل غیرسمی تبدیل می‌کند (Ayar- 2002). این سازوکارها در پاسخ به تنش اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین تولید و سم‌زدایی رادیکال‌های اکسیژنی به وجود می‌آیند. تعادل بین فعالیت SOD و CAT، نقش مهمی در انجام مکانیسم‌های دفاعی در برابر آسیب اکسیداتیو در سلول ایفا می‌کند (Badawi et al. 2004). هدف از انجام این پژوهش، بررسی تغییرات آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز در پاسخ به آلودگی قارچ فوزاریوم در لاین مقاوم، نیمه مقاوم و حساس ذرت و بررسی نقاط مهم در ساعات بعد از آلودگی در لاین مقاوم و حساس است که باعث تفاوت واکنش این ارقام به آلودگی فوزاریوم شده‌است.

مواد و روش‌ها

سه ژنوتیپ ذرت با فنوتیپ‌های متفاوت از نظر تحمل به پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت به‌نام‌های C7 (لاین مقاوم)، B73 (لاین نیمه مقاوم) و MO17 (لاین حساس) مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات مزرعه‌ای در ایستگاه تحقیقات کشاورزی عراقی محله گرگان انجام شد. این ایستگاه به مساحت ۳۷ هکتار در فاصله پنج کیلومتری شمال شهر گرگان واقع شده‌است. این ایستگاه در مدار ۵۴ درجه و ۲۵ دقیقه طول جغرافیایی و ۳۶ درجه و ۵۴ دقیقه عرض جغرافیایی با ارتفاع ۵/۵ متر از سطح

آلودگی از طریق نمونه دانه ایجاد می‌کند. بلال‌هایی که از طریق ابریشم آلوده شده بودند تعداد نمونه دانه کمتر و بلال‌های ضعیف‌تری را تولید کرده بودند. هم‌چنین مشاهده شد لاین C7 با بروز کم‌ترین شدت آلودگی (شدت آلودگی ۱۰ و ۲۵ به ترتیب در دانه و ابریشم) به‌عنوان مقاوم‌ترین لاین و لاین MO17 با بیش‌ترین شدت آلودگی (شدت آلودگی ۲۵ و ۷۵ به ترتیب در دانه و ابریشم) به‌عنوان حساس‌ترین لاین شناخته شد. تفاوت دیگری که در این دو لاین به صورت فنوتیپی مشاهده شد این بود که آلودگی در لاین مقاوم محدود به همان قسمت تزریق قارچ و کمتر به دانه‌های مجاور آلودگی پخش شده بود ولی در لاین حساس تعداد نمونه دانه کمتر و هم‌چنین آلودگی شدیدتری مشاهده شد. شکل ۱ تفاوت شدت آلودگی را در بین لاین‌های مورد بررسی و هم‌چنین تفاوت شدت آلودگی با تزریق از طریق دانه و ابریشم را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود C7 در هر دو روش مایه کوبی شدت آلودگی کمتری را نشان داده است. لاین B73 (با شدت آلودگی ۱۸,۳۳ و ۶۷,۸۵ به ترتیب در دانه و ابریشم) به‌عنوان لاین نیمه مقاوم شناخته شد. بیان ژن *CAT1* و *CAT2* در سه لاین C7, B73 و MO17 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد اوج بیان ژن *CAT1* در نمونه ابریشم لاین مقاوم در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی است و بیان این ژن در ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش و دوباره در ۹۶ ساعت بیان ژن افزایش می‌یابد. در نمونه دانه لاین مقاوم، برعکس نمونه ابریشم، کاهش شدید بیان ژن در ۲۴ ساعت مشاهده شد و بعد از یک روز بیان ژن افزایش یافت (شکل ۲). نقطه مشترک در بین دو نمونه ابریشم و دانه، افزایش بیان ژن در ۹۶ ساعت بود. هم‌چنین بیان این ژن در نمونه دانه لاین مقاوم بیش‌تر از نمونه ابریشم مشاهده شد. شاید این خود دلیلی بر مقاومت بیش‌تر دانه نسبت به ابریشم و کاهش شدت آلودگی آن باشد.

در نمونه ابریشم لاین نیمه مقاوم، بیان ژن *CAT1* تا ۹۶ ساعت به صورت صعودی افزایش یافت و کاهش بیان ژن در نمونه ابریشم مشاهده نشد. در حالی که در نمونه دانه، کاهش بیان ژن در ۹۶ رخ داد. در نمونه ابریشم لاین حساس نمودار باینومیال مشاهده شد.

شده انجام شد. نمونه دانه با استفاده از اسکارپل استریل و نمونه ابریشم با قیچی استریل جدا و در نیتروژن مایع منجمد و در فریزر ۸۰- نگهداری شد.

نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نیتروژن مایع و هاون کوبیده شد. جهت استخراج RNA از بافر پی‌بایوزول (p-Biozol Buffer) بر اساس دستورالعمل شرکت (BioFlux, Japan) استفاده شد. جهت تعیین کمیت RNA استخراج شده از دستگاه Nanophotometer مدل p300 محصول شرکت IPMLN و جهت تعیین کیفیت، RNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

به‌منظور از بین بردن DNA ژنومی موجود در نمونه، از روش پیشنهادی شرکت فرمتاز استفاده شد. در مرحله بعدی cDNA تک‌رشته‌ای (RevertAid) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Thermo Scientific USA) ساخته شد. آغازگرهای مورد نیاز بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر سه و با در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش qRT-PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی) طراحی شد. در این تحقیق از ژن خانه‌دار *B-actin* استفاده شد. در جدول ۱ اطلاعات و توالی مربوط به ژن‌های *B-actin*, *CAT1* و *CAT2* و *SOD* نشان داده شده‌است.

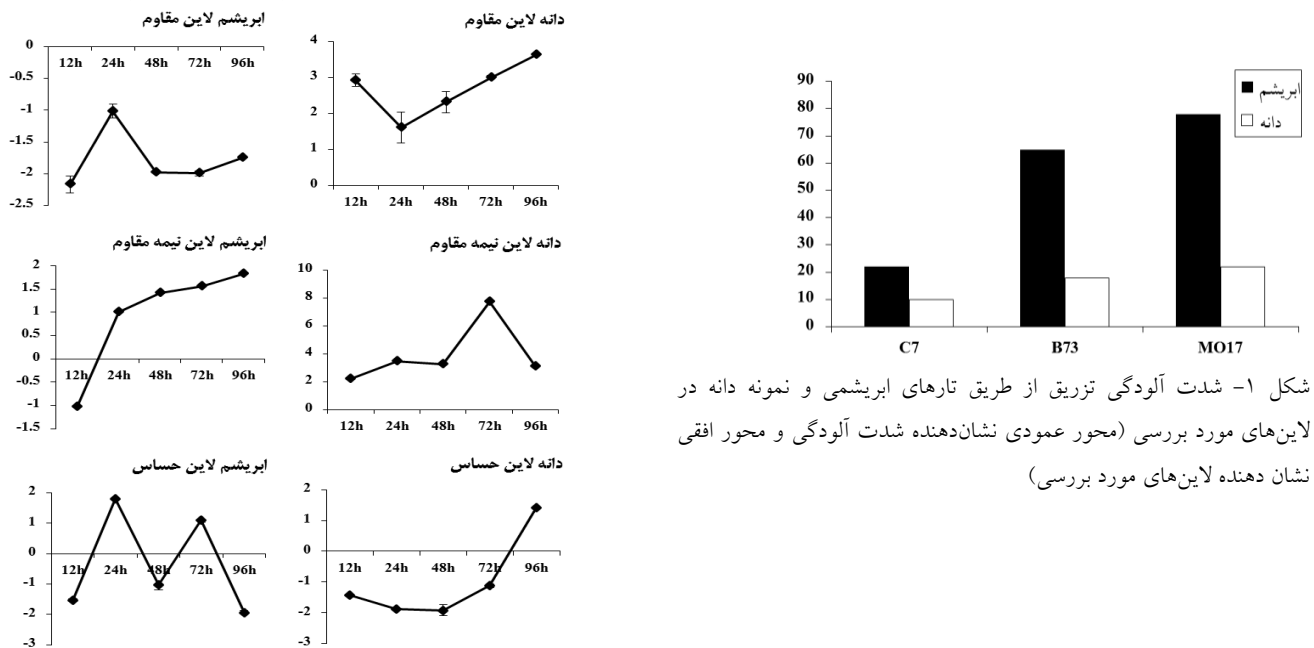
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green I و کیت سایبر بیوپارس (شرکت زیست فرایند تولید پایدار، ایران) در دستگاه iQ5 (شرکت بیورد، آمریکا) انجام شد. شرایط بهینه برای اجرای واکنش Real-Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و از هر نمونه سه تکرار فراهم شد. برای ارزیابی و محاسبه میزان بیان ژن از روش C_t مقایسه‌ای (Comparative C_T) ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) استفاده شد. داده‌های بدست آمده از دستگاه توسط نرم‌افزار Rest مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و نمودارهای مربوطه توسط نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

بر اساس روش پیشنهادی (Tenuta 2006) شدت آلودگی از طریق دانه و ابریشم به‌صورت جداگانه‌ای اندازه‌گیری و مشخص شد آلودگی از طریق ابریشم شدت آلودگی بیش‌تری را نسبت به

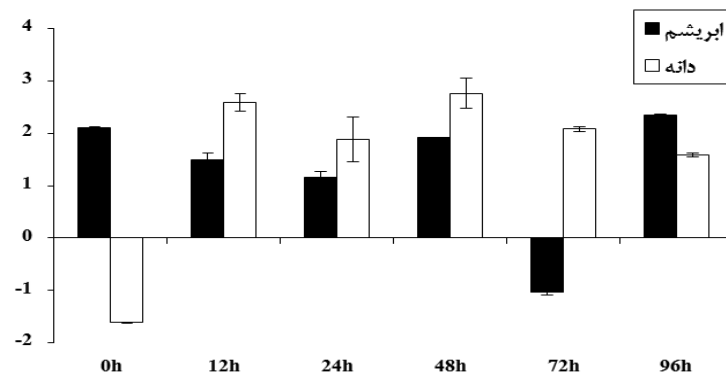
جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در qRT-PCR

نام ژن	آغازگر	توالی	درصد GC	دمای اتصال (C)	اندازه محصول	accession number
B-actine	F	GCG TTA CCG GCT CAT TGT	۵۵/۵۶	۵۹/۶۸	۱۷۳	AB022041
	R	GAG GCA ACA CGT TAC ACC AG	۵۵	۵۹/۲۱		
CAT1	F	CAA GGA TGC AAC GCA ACA	۵۰	۵۵/۷	۲۰۲	U20777.1
	R	TGT ACC ACA GGC CAC AAT GA	۵۰	۵۸/۲		
CAT2	F	CAC ACC CAC GAG ATC AGG AC	۶۰	۵۸/۶	۱۶۵	EU139298
	R	CAT GAG CGA CGA GAC AGA GA	۵۵	۵۸/۳		
SOD	F	AAT GCT GGC GGA CGT GTT	۵۵/۶	۵۹/۳	۱۶۶	DQ866813
	R	GGA TCA GGC GCT TAT TTG GA	۵۰	۵۷/۱		



شکل ۱- شدت آلودگی تزریق از طریق تارهای ایریشمی و نمونه دانه در لاین‌های مورد بررسی (محور عمودی نشان‌دهنده شدت آلودگی و محور افقی نشان‌دهنده لاین‌های مورد بررسی)

شکل ۲- الگوی بیان ژن *CAT1* در نمونه ایریشم و نمونه دانه لاین‌های مقاوم C7، نیمه مقاوم B73 و حساس MO17 ذرت (محور عمودی: تغییر نسبی بیان ژن و محور عمودی: زمان پس از آلودگی)



شکل ۳- مقایسه الگوی بیان ژن *CAT1* در لاین مقاوم نسبت به حساس در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با قارچ فوزاریوم در ذرت

بعد از اینکه بیان ژن در ۲۴ ساعت به حدود دو برابر نسبت به شاهد رسید سپس بیان ژن در ۴۸ ساعت افت شدیدی نمود و دوباره در ۷۲ ساعت بیان ژن افزایش یافت ولی این افزایش بیان ژن پایدار نمانده و در ۹۶ ساعت دوباره کاهش یافت (شکل ۲). نکته مشترک الگوی بیان ژن در مورد نمونه دانه سه لاین مورد بررسی وجود ثبات بیان ژن در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت و بعد از آن افزایش تصاعدی بیان ژن بود. اما از این نظر نمونه ابریشم وضعیت متفاوتی را نشان داده به طوری که در هر سه لاین در ۲۴ ساعت بیشینه افزایش و بعد از آن کاهش بیان ژن مشاهده شد.

بعد از مایه‌کوبی قارچ فوزاریوم بیان ژن *CAT2* در نمونه دانه و نمونه ابریشم لاین مقاوم افزایش یافت. این افزایش تا ۴۸ ساعت ادامه یافت اما در ۷۲ ساعت دچار افت شد و مجدداً در ۹۶ ساعت به اوج بیان ژن خود در حدود $9/4$ برابر نسبت به حالت قبل از آلودگی (شاهد) رسید (شکل ۴). ولی در نمونه ابریشم لاین مقاوم وضعیت متفاوتی رخ داد و بیشینه بیان ژن در ۱۲ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد. این افزایش حتی شدیدتر از بافت نمونه دانه و به حدود $4/7$ برابر نسبت به شاهد رخ داد. ولی بعد از آن بیان ژن به تدریج کم شده و در ۹۶ ساعت به کم‌ترین مقدار خود رسیده و حتی کمتر از شاهد شد ($-1/36$). در لاین نیمه مقاوم (*B73*) بیان ژن در ساعات اولیه آلودگی ($12h$) در هر دو بافت نمونه ابریشم و نمونه دانه افزایش می‌یابد. بعد از آن در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی بیان ژن در نمونه ابریشم به بیش‌ترین مقدار خود نسبت به شاهد ($5/7$) رسید و بعد از آن بیان ژن در نمونه ابریشم کاهش یافت به طوری که در ۷۲ و ۹۶ ساعت بیان ژن نسبت به شاهد منفی شد (به ترتیب $-9/5$ و $-9/1$). اما در نمونه دانه وضعیت متفاوت از نمونه ابریشم و در ۲۴ ساعت بیان ژن به شدت نسبت به شاهد کاهش یافت ولی در ساعات پایانی آلودگی بیان ژن افزایش می‌یابد. به این مفهوم که در ساعاتی که بیان ژن در نمونه دانه افزایش می‌یابد در نمونه ابریشم کاهش یافت و بالعکس (شکل ۴).

در نمونه ابریشم لاین حساس (*MO17*) ژن *CAT2* بیان ژن ناپایداری را نشان داد. بیان این ژن در یک روز بعد از آلودگی افزایش یافت ولی بعد از آن در دو روز بعد از آلودگی بیان ژن افت پیدا کرده و دوباره در ۷۲ ساعت بیان ژن افزایش یافت و بعد

از آن نمودار تقریباً وضعیت خطی نشان داد. در نمونه دانه بیان ژن تا دو روز بعد از آلودگی افزایش یافت. بعد از آن در ۷۲ ساعت کاهش شدیدی در بیان ژن رخ داد. ولی در ساعات پایانی دوباره بیان ژن افزایش یافت و تقریباً برابر سطح قبلی خود در ۴۸ ساعت رسید. نقطه مشترکی که در مورد این ژن در نمونه دانه و نمونه ابریشم لاین حساس مشاهده شد افزایش این ژن در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی بود و بعد از آن بیان ژن که در هر دو بافت مشاهده شد، بیان ژن دوباره در ساعات پایانی افزایش یافت. این افت بیان ژن در نمونه ابریشم زودتر از نمونه دانه رخ داده است. همچنین شدت افزایش بیان ژن در نمونه ابریشم شدیدتر از نمونه دانه بود (شکل ۴).

بیان ژن *CAT2* در نمونه ابریشم و نمونه دانه لاین حساس قبل از آلودگی بیش‌تر از لاین مقاوم مشاهده شد (شکل ۵). ولی بعد از آلودگی، بیان ژن در ۱۲ ساعت در نمونه ابریشم لاین مقاوم به شدت افزایش یافت و بیش‌تر از لاین حساس شد ($55/12$). در ساعات پایانی آلودگی بیان ژن در نمونه ابریشم لاین مقاوم بیش‌تر بود. به نظر می‌رسد به دلیل افزایش شدید بیان ژن در نمونه ابریشم لاین مقاوم در ساعات پایانی دیگر نیازی به افزایش بیان ژن این ژن وجود نداشت اما در مورد لاین حساس چون بیان ژن بعد از آلودگی به اندازه لاین مقاوم نبود، می‌بایست این افزایش هم‌چنان تا ساعات ۷۲ و ۹۶ ادامه می‌یافت. اما چون شدت بیان ژن در نمونه دانه لاین مقاوم در ساعات اولیه آلودگی بالا نبود نسبت به لاین حساس افزایش بیان ژن هم‌چنان تا ساعات پایانی آلودگی بیشتر از لاین حساس ادامه یافت (شکل ۵).

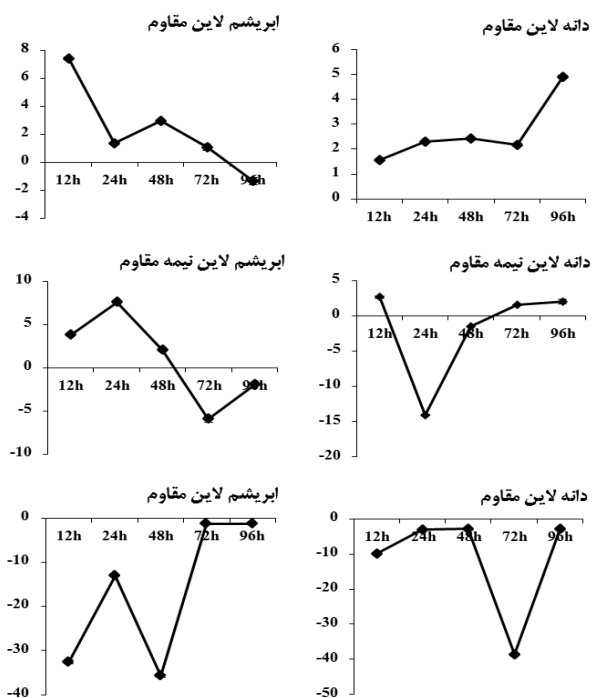
بیان ژن *SOD* در نمونه ابریشم لاین مقاوم *C7* کاهش تدریجی را نشان داد. بیان ژن در ۲۴ ساعت افت بیشتری را نشان داد به طوری که در ۲۴ ساعت به بیان ژن کمتر از شاهد می‌رسد ($1/54$). این کاهش بیان ژن تا ۹۶ ساعت ادامه پیدا می‌کند و به کم‌ترین مقدار خود می‌رسد ($-2/21$). ولی در نمونه دانه لاین مقاوم بیان این ژن به تدریج افزایش می‌یابد و در ۹۶ ساعت به بیشترین مقدار خود ($2/18$) می‌رسد. در لاین مقاوم و نیمه مقاوم بیان این ژن در نمونه دانه بیش‌تر از نمونه ابریشم بود. در نمونه دانه لاین مقاوم و نیمه مقاوم بیان ژن کاتالاز نمودار مشابهی داشت. در هر دو لاین بعد از آلودگی، بیان این ژن افزایش یافته و بعد از مدتی

در لاین حساس MO17 بعد از مایه کوبی، بیان ژن در نمونه ابریشم افزایش می‌یابد و در ۲۴ ساعت به بیش‌ترین مقدار خود می‌رسد (۱/۲۵). بعد از آن بیان ژن به شدت افت پیدا می‌کند و این افت بیان ژن تا ۹۶ ساعت ادامه می‌یابد. در نمونه دانه لاین حساس بعد از مایه کوبی تا ۲۴ ساعت افزایش یا کاهش بیان ژن قابل توجهی رخ نداد و تقریباً بیان ژن به صورت خطی است بعد از آن بیان ژن در ۴۸ ساعت افزایش یافت. سپس در ۷۲ ساعت بیان ژن دوباره کاهش و در ۹۶ ساعت بیان ژن افزایش می‌یابد. این نوع نمودار در مورد ژن *CAT* نیز مشاهده شد. این نشان می‌دهد لاین حساس کمتر می‌تواند بیان ژن خود را کنترل کند و بیان ژن ناپایداری دارد (شکل ۶).

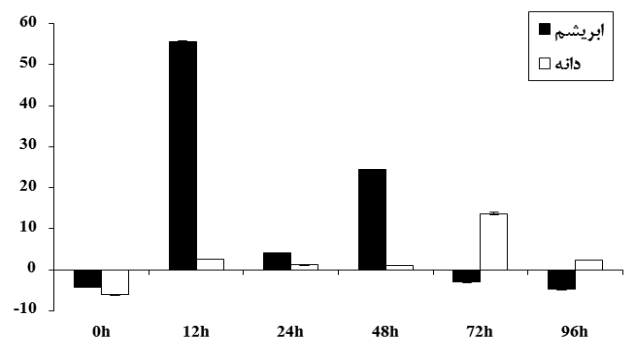
بحث

استرس‌های زیست محیطی و فیزیولوژیکی اثرات مختلفی بر تمام موجودات زنده دارد. برای مقابله با اثرات زیان آور تنش، سلول‌ها برای تعمیر آسیب و محافظت از سلول‌ها برای بیش‌تر در معرض قرار نگرفتن به همان استرس و یا دیگر اشکال استرس، با پاسخ‌های سریع مولکولی توسعه پیدا کرده‌اند (Houssin et al. 1991). ممکن است نتیجه این استرس‌ها، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژنی توسط زنجیره تنفسی شود. ROSها بسیار واکنش پذیر هستند و می‌توانند باعث آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شوند. H_2O_2 نقش مهمی در مکانیسم مقاومت، تقویت دیواره سلول‌های گیاهی، تولید فیتوالکسین و تحریک چندین ژن گیاهی در حفاظت و دفاع سلولی دارد (Chen et al. 1993). H_2O_2 هم‌چنین برای شروع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده که منجر به SAR می‌شود مورد نیاز است (Dangl et al. 1996). گونه‌های فعال اکسیژنی به‌عنوان یکی از اولین رویدادهای مرتبط با مقاومت گیاه در برابر بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود. در شرایط عادی میزان تولید ROS توسط سیستم‌های مختلف بیوشیمیایی در تمام سلول‌های زنده نسبتاً کم است و باعث آسیب کمی می‌شود چون از طریق سیستم‌های *CAT*، *SOD* و *GSH-PN* به‌طور مناسب حذف می‌شود.

بیان ژن ثابت و بعد از آن کاهش می‌یابد. ولی این ثابت بیان ژن در لاین مقاوم زودتر رخ می‌دهد. تفاوت این دو لاین در نمونه دانه این است که لاین مقاوم نسبت به شاهد دو برابر، ولی لاین نیمه‌مقاوم حدود ۵ برابر بیان ژن *SOD* قبل از آلودگی بیشتر است. در لاین مقاوم در ساعات پایانی آلودگی (96h) بیان ژن *SOD* دوباره افزایش می‌یابد ولی در رقم نیمه مقاوم بیان ژن بالا نمی‌رود. بیان ژن *SOD* قبل از آلودگی در لاین مقاوم از لاین حساس و نیمه مقاوم بیش‌تر بوده است (شکل ۶).



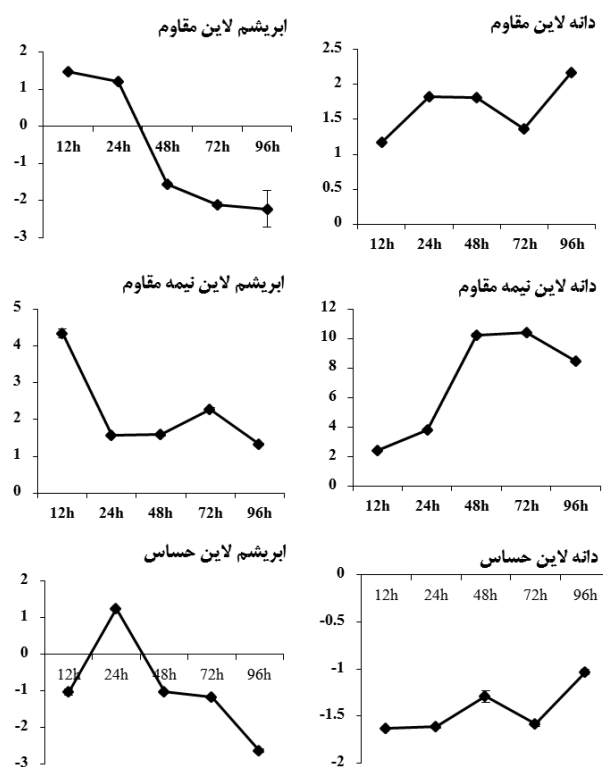
شکل ۴- الگوی بیان ژن *CAT2* در نمونه ابریشم و نمونه دانه لاین‌های مقاوم C7، نیمه مقاوم B73 و حساس MO17 ذرت (محور عمودی: تغییر نسبی بیان ژن و محور عمودی: زمان پس از آلودگی)



شکل ۵- تفاوت بیان ژن *CAT2* در لاین مقاوم نسبت به لاین حساس

گسترش بیمارگر افزایش دهد (Mandal et al. 2008). در این مطالعه، بیان ژن *CAT* و *SOD* در روند تقریباً مشابهی با هم کاهش و افزایش پیدا کرده‌اند. یعنی در ساعاتی که بیان *CAT* بالا رفته بیان ژن *SOD* در همان ساعت بالا رفته است. اوج بیان ژن *CAT* در ۲۴ ساعت و حداکثر بیان ژن *SOD* نیز در ۲۴ ساعت مشاهده شد و بعد از یک روز، کاهش شدید دو برابری در هر دو ژن دیده شد.

فعالیت *SOD* اندکی بعد از مایه‌کوبی با فوزاریوم تا ۳۶ ساعت افزایش یافت. پس از آن افزایش شدید در ۴۸ ساعت مشاهده شد. پس از این افزایش، فعالیت *SOD* نزدیک به ۷۲ ساعت حالت پایداری به خود گرفت (Mandal et al. 2008). حداکثر فعالیت ژن *CAT* در هر سه لاین در ۲۴ ساعت بعد از مایه‌کوبی فوزاریوم بود و سپس به صورت تدریجی در نمونه ابریشم لاین مقاوم کاهش بیان ژن نشان داد. در مطالعه (Mandal et al. 2008) سطح H_2O_2 بعد از آلودگی تغییر نمود که حداکثر آن در ۲۴ ساعت پس از مایه‌کوبی مشاهده شد بنابراین نتیجه‌گیری شد که H_2O_2 می‌تواند یکی از استراتژی‌های دفاع در مقابل بیمارگر باشد (Mandal et al. 2008). افزایش میزان H_2O_2 به حداکثر مقدار خود در ۲۴ ساعت منطبق بر زمان حداکثر فعالیت آنزیم *SOD* و نیز اوج بیان ژن *CAT* بود. زیرا گیاه هنگامی که با میزان زیاد H_2O_2 در سلول مواجه می‌شود بیان ژن *CAT* بالا رفته تا سم زدایی صورت گیرد. به نظر می‌رسد افزایش پراکسید هیدروژن در ژنوتیپ‌های مقاوم به علت القا سریع *SOD* و کاهش فعالیت *CAT* باشد (Sorahinobar et al. 2015). تجزیه و تحلیل‌های ترانسکریپتوم و پروتئوم نشان داده است که ژن‌ها و پروتئین‌های دخیل در تولید ROS و کاهش استرس اکسیداتیو همزمان بعد از آلودگی در سلول القا شده‌اند. افزایش محتوای H_2O_2 به عنوان یک جز مهم از گونه‌های فعال اکسیژنی در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس گندم مایه‌کوبی شده مشاهده شد (Sorahinobar et al. 2015). Ayar (2005) Kayali and Tarhan گزارش نمودند سطح تولید H_2O_2 در گیاه گوجه فرنگی مایه‌کوبی شده با فوزاریوم در ۲۴ ساعت بعد از مایه‌کوبی در مقایسه با گیاهان غیر آلوده افزایش چشمگیری داشت. پس از این افزایش قابل ملاحظه، میزان تدریجی H_2O_2 تا ۴۸ ساعت کاهش یافت و بعد از آن افزایش رو



شکل ۶- الگوی بیان ژن *SOD* در نمونه ابریشم و نمونه دانه لاین‌های مقاوم C7، نیمه مقاوم B73 و حساس MO17 ذرت (محور عمودی: تغییر نسبی بیان ژن و محور عمودی: زمان پس از آلودگی)

با این حال به دلایل مختلفی ممکن است میزان ROS بالا رود. بنابراین تغییرات بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ضروری خواهد بود. سرازیر شدن ROS و عدم توانایی گیاه در کنترل تولید آن تحت تنش، ممکن است ساختارهای مختلف گیاهی را مختل کند. برای کاهش اثرات منفی ROS، گیاهان آنتی‌اکسیدان‌های مختلفی را تولید می‌کنند. سوپراکسید دسموتاز به عنوان اولین خط دفاع در برابر ROS، باعث تخریب رادیکال‌های سوپراکسید به O_2 و H_2O_2 می‌شود و سپس H_2O_2 توسط *CAT* و *POX* به H_2O و O_2 تبدیل و سم زدایی می‌شود (Diaz-Vivancos et al. 2006).

تعادل بین فعالیت *SOD* و آنزیم‌های تخلیه H_2O_2 مانند *CAT* و *POX* نقش مهمی در ایجاد سازوکارهای دفاع در برابر آسیب اکسیداتیو در سلول ایفا می‌کند (Badawi et al. 2004). غلظت موثر رادیکال‌های آزاد در بافت گیاهی ناشی از تعادل دینامیکی بین میزان تولید و تخلیه آن است. این تغییرات سریع ممکن است اثربخشی دیواره سلولی را به عنوان یک مانع برای کاهش سرعت

مایه‌کوبی توسط *F. graminearum* افزایش می‌یابد. این نتایج با نتایج Xingfu et al. (1995) موافق است که نشان می‌دهد فعالیت *SOD* در ژنوتیپ‌های مقاوم بالاتر از ژنوتیپ حساس است. تفاوت تولید *ROS* و پاسخ آنتی‌اکسیدانی آنزیمی تحت مایه‌کوبی فوزاریوم در ارقام مقاوم و حساس مشاهده شد. القا سریع و مقدار بالای محتوای H_2O_2 به‌عنوان یک مولکول سیگنال و القا فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در رقم مقاوم، می‌تواند نقش مهمی در مقاومت گندم در برابر فوزاریوم داشته باشد (Sorahinobar et al. 2015).

طبق مطالعه Mandal et al. (2008) فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در پاسخ به مایه‌کوبی بیمارگر فوزاریوم افزایش یافت ولی فعالیت کاتالاز در ۲۴ ساعت کاهش می‌یابد. ولی این افزایش یا کاهش بیان ژن در پاسخ به آلودگی در ساعات مختلف بستگی به سطح بیان آن ژن قبل از آلودگی دارد. اگر بیان ژن قبل از آلودگی بالا باشد بعد از مایه‌زنی سلول توانایی مقابله با این سطح از مواد سمی را دارد و دیگر نیازی به بالا بردن سطح بیان ژن خود ندارد. ولی در غیر این صورت، با مایه‌کوبی بیان ژن به یکباره بالا می‌رود تا گیاه بتواند سم زدایی کند.

بر طبق مطالعه Lanubile et al. (2015) گونه‌های فعال اکسیژنی، تنها پس از مایه‌کوبی بیمارگر در لاین حساس ایجاد شد هر چند فعالیت آنزیمی آن‌ها در لاین مقاوم بیش‌تر بود. در دانه‌های بدون مایه‌کوبی، نتایج *CAT* به‌طور معنی‌داری متفاوت از دانه‌های مایه‌کوبی شده در هر دو ژنوتیپ بود و نمونه ابریشم لاین مقاوم فعالیت *CAT* بیش‌تری را نشان داد. پس از مایه‌کوبی با بیمارگر، فعالیت *CATI* در نمونه دانه هر دو لاین حساس و مقاوم نسبت به شاهد افزایش پیدا می‌کند. در لاین مقاوم، نتایج فعالیت کاتالاز در شرایط مطلق بالاتر بود اگرچه افزایش بیشتر در لاین حساس رخ داد. رونویسی از این ژن‌ها در لاین‌های حساس تنها بعد از مایه‌کوبی قارچ بالا می‌رود در حالی که در لاین مقاوم، ژن‌های دفاعی بالاتر، اجازه آمادگی گیاه برای مقابله علیه حملات بیمارگر را می‌دهد (Lanubile et al. 2015). هم‌چنین فعالیت *SOD* در کنترل دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری داشت. هرچند محتوای H_2O_2 در لاین حساس پس از مایه‌کوبی افزایش می‌یابد اما روند معکوس در فعالیت *SOD* رخ داده است. فعال شدن *SOD* در

به رشدی تا ۷۲ ساعت مشاهده شد و تغییرات فعالیت *CAT* با فعالیت *SOD* همراه بوده است.

با توجه به نمودارهای بیان ژن *SOD* و *CATI* در لاین نیمه مقاوم به‌نظر می‌رسد بیان ژن *CATI* بعد از آلودگی تا ۲۴ ساعت افزایش دو برابری داشته است ولی در مورد ژن *SOD* بیان ژن به اندازه دو برابر تا ۲۴ ساعت کاهش یافته است. شاید این دلیلی بر وابسته و مرتبط بودن بیان ژن این دو ژن بعد از آلودگی باشد که می‌خواهند بعد از آلودگی سطح بیان ژن *SOD* را به یک نسبت برسانند. بعد از این هماهنگ شدن، بیان هر دو ژن تقریباً ثابت می‌شود که شاید این نشان دهنده اندازه مناسب و نسبت بیان ژن مناسب این دو ژن در لاین نیمه مقاوم باشد و دیگر احتیاجی به افزایش یا کاهش بیان ژن نباشد و سلول توانسته به سطح مناسب و متعادلی از این دو ژن برسد.

در مطالعه Ayar Kayali et al. (2002) فعالیت *SOD* در پاسخ به آلودگی با *F. acuminatum* به صورت معنی‌داری افزایش یافت. فعالیت *CAT* تغییرات معنی‌داری را در ۱۲-۲۴ ساعت بعد از آلودگی نداشت (Ayar Kayali et al. 2002). در این مطالعه، بیان ژن *SOD* و *CAT2* هم‌زمان با هم در ۲۴ ساعت افزایش یافته و بعد ثابت شد و در ۷۲ ساعت بیان هر دو ژن کاهش یافته و دوباره در ۹۶ ساعت بیان هر دو ژن افزایش یافت. این شاید دلیل دیگر باشد که نشان دهد بیان این دو ژن بعد از آلودگی به هم مرتبط است و این دو ژن با همکاری هم می‌توانند علیه بیماری قارچ فوزاریوم عمل کنند.

مورد مشابهی که در نمودار سه ژن *SOD*، *CATI* و *CAT2* در نمونه دانه لاین حساس مشاهده شد این بود که سه ژن دارای یک بخش خطی در نمودار بیان ژن خود هستند. یعنی بعد از آلودگی به یک ثبات بیان ژن می‌رسند. بعد از این ثبات بیان ژن در ۷۲ ساعت، *SOD* و *CAT2* افت شدیدی یافته و دوباره در ۹۶ ساعت بیان ژن در هر سه ژن بالا می‌رود. در این رابطه Ayar Kayali et al. (2002) نیز عنوان کردند یک ارتباط نزدیک بین *SOD* و فعالیت *CAT* وجود دارد که تاییدی بر نتایج به‌دست آمده است. بر طبق گزارش Sorahinobar et al. (2015) فعالیت *CAT* در سه و پنج روز بعد از آلودگی به‌طور معنی‌داری افزایش و سپس در ۷ روز کاهش یافت. فعالیت *SOD* در ژنوتیپ مقاوم پس از

ممکن است منعکس‌کننده تفاوت در سرعت، شدت، الگوی فضایی و محدوده بیان ژن‌های مختلف (ژن‌های دفاعی) باشد (Zhu et al. 1996).

در این مطالعه بیان دو ژن *CAT* و *SOD* بعد از آلودگی با قارچ فوزاریوم در ذرت افزایش یافت. ولی این افزایش بیان ژن در ژن *SOD* زودتر از ژن *CAT* رخ می‌دهد. این دو ژن هماهنگ با یکدیگر می‌توانند در برابر حمله قارچ فوزاریوم عمل کنند و نقش موثری در سم‌زدایی و کاهش اثرات منفی بیماری بر گیاه داشته باشند. نکته مهم در مورد مقاومت گیاه به این بیماری در سطح بیان این دو ژن قبل از آلودگی است. هر چه بیان این دو ژن قبل از آلودگی بیشتر باشد سلول آمادگی بیشتری برای مقابله و سم‌زدایی داشته و به‌طور موثرتری به بیماری پاسخ می‌دهد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی ساعات بعد از آلودگی افزایش یابد تا روند تغییر بیان ژن‌های *CAT* و *SOD* در زمانی که بیماری شدت بیشتری پیدا می‌کند نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

منابع

Alla MN, Hassan N (2006) Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. *Plant Physiology and Biochemistry* 44:202-210.

Ayar Kayali H, Tarhan L (2005) A comparative study of the metal ion uptake and antioxidant enzyme activities of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* as a function of external magnesium concentration. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 35:217-230.

Ayar Kayali H, Ozer N, Tarhan L (2002) Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 400:265-272.

Bacon CW, Hinton DM, Porter JK, Glenn AE, Kuldau G (2004) Fusaric acid, a *Fusarium verticillioides* metabolite, antagonistic to the endophytic biocontrol bacterium *Bacillus mojavensis*. *Canadian Journal of Botany* 82:878-885.

Badawi GH, Yamauchi Y, Shimada E, Sasaki R, Kawano N, Tanaka K, Tanaka K (2004) Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Science* 166:919-928.

Bradley DJ, Kjellbom P, Lamp CJ (1992) Elicitor-and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70:21-30.

Chen Z, Silva H, Klessiq DF (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by

مراحل اولیه عفونت بیمارگر، قبل از ۱۲ ساعت رخ می‌دهد (Lanubile et al. 2015) که ممکن است به‌علت افزایش گونه‌های فعال اکسیژنی در سلول باشد. مایه‌کوبی فوزاریوم در محتوای H_2O_2 لاین مقاوم تاثیری نداشت. انفجار اکسیداتیو می‌تواند به‌طور موثر در لاین مقاوم توسط فعالیت *CAT* محدود شود. در حالی که در لاین حساس، H_2O_2 بیشتری باقی می‌ماند. از سوی دیگر، تجمع بالای H_2O_2 توسط بیمارگرها در لاین حساس همراه با کاهش قابل توجه فعالیت *SOD* ممکن است نشان دهد که یک سم‌زدایی پایین H_2O_2 به جای تولید بالاتر رخ می‌دهد. تمام ژنوتیپ‌ها قادر به پاسخ به عفونت هستند اما ژنوتیپ‌های حساس بیشتر به عفونت بیمارگر پاسخ می‌دهند (Lanubile et al. 2015). همانطور که در نمودارها مشخص است، در لاین حساس بعد از آلودگی افت یا پیک بیان ژن شدیدتری نسبت به لاین مقاوم مشاهده شد. در حالی که بیان ژن در لاین مقاوم همواره بیشتر می‌باشد. فعالیت بین دو پاسخ فنوتیپ‌های حساس و مقاوم،

salicylic acid. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information* 262:1883-1885.

Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell* 8:1793.

Diaz-Vivancos P, Rubio M, Mesonero V, Periaje PM, Ros Barcelo A, Martinez-Gomez P, Hernandez JA (2006) The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany* 57:3813-3824.

Drepper, WJ, Renfro BL (1990) Comparison of methods for inoculation of ears and stalks of maize with *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease* 74:952-956.

Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201:875-880.

Gelderblom W, Jaskiewicz K, Marasas WF, Thiel PG, Horak RM, Vlegaar R, Kriek NP (1988) Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54:1806-1811.

Halliwell B (1999) The chemistry of free radicals and related reactive species; Peroxynitrite. *Free Radicals in Biology and Medicine* 95-100.

Houssin C, Eynard N, Shechter E, Ghazi A (1991) Effect of osmotic pressure on membrane energy-linked functions in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1056:76-84.

Lanubile A, Maschietto V, De Leonardi S, Battilani P, Paciolla C, Marocco A (2015) Defense responses to mycotoxin-producing fungi *Fusarium proliferatum*, *F.*

subglutinans, and *Aspergillus flavus* in kernels of susceptible and resistant maize genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:546-557.

Mandal S, Mitra A, Mallick N (2008) Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72:56-61.

Peng M, Kuc J (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82:696-699.

Reid LM, Zhu X (2005) Screening corn for resistance to common diseases in Canada. *Agriculture and Agri-Food Canada*.

Santos R, Bocquet S, Puppo A, Touati D (1999) Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 181:4509-4516.

Schouten A, Tenberge KB, Vermeer J, Stewart J, Wagemakers L, Williamson B, van Kan JA (2002)

Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 3:227-238.

Sorahinobar M, Niknam V, Ebrahimzadeh H, Soltanloo H (2015) Differential antioxidative responses of susceptible and resistant wheat cultivars against *Fusarium* head blight. *International Journal of Farming and Allied Sciences* 4:239-243.

Torres MA, Jones JD, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141:373-378.

Xingfu Y, Shimao C, Xiuwen H (1995) The Relationships Between the Activity of Several Enzymes in Cucumber Tissues and Their Resistance to Downy Mildew of Cucumber. *Acta Agriculturae Boreal Sinica* 10:92-98

Zhu Q, Dröge-Laser W, Dixon RA, Lamb C (1996) Transcriptional activation of plant defense genes. *Current Opinion in Genetics and Development* 6:624-6