Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 54, No 1, Spring 2023 (229-247)
DOI**:** 10.22059/IJFCS.2022.343522.654915

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۴، شمارهٔ ۱، بهار ۱۴۰۲ (۲۴۷-۲۲۹)

Biochemical reaction of resistant and susceptible genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.) to Fusarium wilt disease

Neda Ebrahimi[1], Ali Akbar Mohammadi Mirik[2], Ebrahim Sedaghati[3], Narges Hatami[4]
1,2. Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rfsanjan, Rafsanjan, Iran, 3. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rfsanjan, Rafsanjan, Iran, 4. Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.
(Received: June 9, 2022 - Accepted: October 23, 2022)

ABSTRACT
Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* L. is one of the most important destructive flax diseases that markedly decrease the production and yield of this crop. The cultivation of flax cultivars resistant to *F. oxysporum* is the most effective method for managing this disease. In this study, the changes in content of phenylalanine ammonia lyase, peroxidase and polyphenol oxidase enzymes, total protein, proline and soluble sugars were measured in 12 different genotypes of flax infected to wilt Fusarium and non-infected conditions under greenhouse conditions. The experiment was conducted in a randomized complete block design with three replications. 21 days after inoculation of the plant with the pathogen, biochemical components changes were measured by spectrophotometry. Based on the results of ANOVA, the soluble sugars content in infected genotypes was higher compared to control and healthy genotypes. Also, this parameter increased in resistant and highly resistant genotypes of flax, meanwhile this trait decreased in susceptible genotypes in contaminated conditions. The activity of phenylalanine ammonia lyase, peroxidase and polyphenol oxidase enzymes as well as proline content in leaves of resistant and highly resistant genotypes were significantly increased in wilt Fusarium infected treatment. Total protein content in non-infected genotypes of flax was higher than infected genotypes. Therefore, increasing the activity of antioxidant enzymes, proline content and soluble sugars can play a possible role in inducing resistance to Fusarium wilt disease in flax genotypes.
Keywords: Antioxidant mechanism, biochemical defense, enzyme activity, phenolic compounds, resistant genotype.

واکنش بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس کتان روغنی (*Linum usitatissimum* L.) به بیماری پژمردگی فوزاریومی

ندا ابراهیمی[۱]، علی اکبر محمدی میریک[۲]، ابراهیم صداقتی[۳]، نرگس حاتمی[۴]
۱و۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر رفسنجان، رفسنجان،ایران،۳- دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر رفسنجان،رفسنجان، ایران ، ٤- استادیار گروه علوم کشاورزی دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۱)

چکیده
پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* L. یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های کتان روغنی است که تولید و عملکرد این محصول را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. کشت ارقام کتان مقاوم به *F. oxysporum* موثرترین روش برای مدیریت این بیماری می‌باشد. در این پژوهش، میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز، پروتئین کل، پرولین و قندهای محلول در ۱۲ ژنوتیپ کتان روغنی در حالت آلوده به بیماری پژمردگی فوزاریومی و عدم آلودگی (شاهد) در شرایط گلخانه بررسی شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد. بدین‌منظور، ۲۱ روز پس از مایه‌زنی گیاه با بیمارگر، سنجش تغییرات مولفه‌های بیوشیمیایی به‌شیوه اسپکتروفتومتری انجام شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، میزان قندهای محلول در ژنوتیپ‌های بیمار در مقایسه با ژنوتیپ‌های سالم و شاهد بیشتر بود. همچنین، این صفات در اثر آلودگی در ژنوتیپ‌های مقاوم و بسیار مقاوم کتان افزایش و در ژنوتیپ‌های حساس کاهش یافت. فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز و همچنین محتوای پرولین برگ‌های ژنوتیپ‌های مقاوم و بسیار مقاوم کتان آلوده به بیماری پژمردگی فوزاریومی، به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند. محتوای پروتئین کل در ژنوتیپ‌های غیر آلوده کتان روغنی بیشتر از ژنوتیپ‌های آلوده بود. بنابراین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، محتوای پرولین و قندهای محلول می‌توانند نقش احتمالی در القای مقاومت ژنوتیپ‌های کتان نسبت به بیماری پژمردگی فوزاریومی داشته باشد.
واژه‌های کلیدی: **ترکیبات فنلی، دفاع بیوشیمیایی، ژنوتیپ مقاوم، سازوکارهای آنتی‌اکسیدان، فعالیت آنزیمی.**

*Corresponding author Email: aa.mohammadi@vru.ac.ir

مقدمه

دانه‌های روغنی یکی از مهمترین منابع پروتئین و انرژی شناخته می‌شوند و علاوه‌بر مصرف خوراکی، تولیدات آن‌ها به مصارف مختلف صنعتی، آرایشی و بهداشتی نیز می‌رسند (Hassanzade Ghorttapeh & Motalebizadeh, 2013; Mohammadi *et al*., 2018). یکی از گیاهان روغنی و دارویی که در سطح جهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، کتان روغنی یا بزرک می‌باشد. کتان روغنی با نام علمی *Linum usitatissimum* L.، گیاهی علفی و یک‌ساله است که به تیره کتان (Linaceae) تعلق دارد (Parhizkar-Khajan *et al*. 2012). این محصول برای تولید فیبر، الیاف، روغن و مواد مغذی استفاده می‌شود (Vaisey-Genser & Morris, 2003). کشت و تولید کتان تحت تاثیر تنش‌های زیستی و غیر زیستی متعددی قرار می‌گیرد. در میان تنش‌های زیستی، قارچ *Fusarium oxysporum* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی، یکی از بیمارگرهای مهم کتان است که بر تولید و عملکرد این محصول در سراسر جهان تاثیر می‌گذارد (Planchon *et al*., 2021). این بیمارگر از طریق ریشه‌های جوان و مویین وارد گیاه شده و با تولید میکروکنیدی در کل سیستم آوندی پخش می‌شود. سپس، با انسداد جریان آب و مواد مغذی منجر به زردی و پژمردگی برگ‌ها، قهوه‌ای‌شدن بافت آوندی و در نهایت خشک‌شدن و مرگ گیاه می‌شود (Ma *et al*., 2013). این بیماری در صورت وقوع اپیدمی و انجام آبیاری مداوم می‌تواند عملکرد سالانه کتان را به میزان ۸۰ تا ۱۰۰ درصد کاهش دهد (Kanapin *et al*., 2020).

قارچ *F. oxysporum* از طریق تولید کلامیدوسپور می‌تواند به‌مدت ۱۰-۵ سال در خاک آلوده زنده بماند و در صورت عدم کنترل آن، آلودگی‌های مکرر را امکان‌پذیر می‌کند (Galindo-Gonzalez & Deyholos, 2016). کنترل پژمردگی فوزاریومی مانند سایر بیماری‌های خاک‌زاد، اغلب از طریق ضدعفونی‌کردن خاک با ترکیبات شیمیایی تدخینی و یا کشت ارقام مقاوم صورت می‌گیرد (Rozhmina & Loshakova, 2016; Rozhmina, 2017). کاربرد سموم به‌دلیل اثرات کشنده آن‌ها برای انسان و دام، خطرات زیست‌محیطی، اثرات جانبی برای موجودات غیر هدف و هزینه‌های بالا قابل توجیه نمی‌باشد و در اکثر مواقع، کارایی لازم برای کنترل و مهار این بیمارگرها را ندارد (Sanchez-Martin & Keller, 2019). به‌علت وجود این مشکلات و اهمیت استفاده از روش‌های سازگار با محیط زیست، کاربرد ژنوتیپ‌های مقاوم و متحمل به‌عنوان جایگزین یا مکمل سموم ، کم‌خطرترین، کم‌هزینه‌ترین و در عین حال مطمئن‌ترین روش برای مدیریت بیماری‌های ناشی از بیمارگرهای خاک‌زاد می‌باشد (de Borba *et al*., 2017; Dmitriev *et al*., 2017). میزان حساسیت یا مقاومت واریته‌های کتان به بیماری پژمردگی فوزاریومی بسته به جدایه/نژاد بیمارگر متفاوت است. اکثر واریته‌های جدید کتان مقاومت متوسط تا بالایی نسبت به بیماری پژمردگی فوزاریومی نشان داده‌اند (Rozhmina, 2017). با این حال، به‌دلیل وجود تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت قارچی، خطر ابتلا به این بیماری همواره وجود دارد (Kanapin *et al*., 2020).

گیاهان همواره در تعامل با عوامل بیماری‌زای موجود در محیط اطرافشان هستند. بدین‌منظور، سدهای دفاعی فیزیکی و شیمیایی از پیش ساخته‌شده‌ای در بافت‌ها و سلول‌های خود برای مقابله با عوامل بیماری‌زا دارند. پس از تحریک گیاه توسط بیمارگر، ظرفیت دفاعی گیاه بالا می‌رود که این حالت به القای مقاومت تعبیر می‌شود

(Ponce de Leon & Montesano, 2013). واکنش‌های دفاعی القا شده‌ی گیاه ممکن است به‌صورت موضعی در محلی که تحریک صورت گرفته است رخ دهد (مقاومت موضعی). در این صورت میزان ترکیبات فنلی، گونه‌های فعال اکسیژن، فیتوآلکسین‌ها و ترکیباتی مانند سوبرین و لیگنین در محل آلودگی افزایش یافته و باعث چوبی‌شدن می‌شوند که از گسترش بیمارگر جلوگیری می‌کنند (Zhang *et al*., 2013). در حالت دیگر، این واکنش‌ها در تمام اندام‌های گیاه تحریک‌شده، القا می‌شوند (مقاومت سیستمیک) و علاوه‌بر ترکیبات مذکور، میزان برخی آنزیم‌ها و ترکیبات دفاعی در گیاه افزایش می‌یابد (Gholamnezhad, 2019).

پس از حمله بیمارگر و تشخیص آن توسط گیاه، انفجار اکسیداتیو (یکی از اولین واکنش‌های دفاعی گیاه) رخ می‌دهد که با تولید گذرا و سریع انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[1]) از جمله مولکول‌های آنیون سوپراکسید (O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) همراه می‌باشد (Sharma *et al*., 2012; Zhou, 2018). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن برای سلول‌های گیاهی بسیار سمی است؛ بدین صورت که با مولکول‌های زیستی مانند کربوهیدارت‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و نوکلئیک‌اسیدها (DNA و RNA) واکنش داده و موجب پراکسیداسیون لیپید غشایی، تخریب پروتئین‌ها و رنگدانه‌ها، جهش DNA، مرگ سلولی و بروز واکنش فوق حساسیت (HR[2]) می‌شوند (Pareek *et al*., 2017). علاوه‌براین، این مولکول‌ها مانند یک پیام عمل کرده و سازوکارهای دفاعی سلول‌های گیاهی را فعال می‌کنند (Wojtasik *et al*., 2011). گیاهان برای از بین‌بردن رادیکال‌های آزاد اضافی تولیدشده و کاهش اثرات مخرب شکل‌های فعال اکسیژن دارای سیستم‌های آنزیمی (مانند پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز) و غیر آنزیمی (مانند ترکیبات فنلی، گلوتاتیون و کارتنوئیدها) آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Caverzan *et al*., 2016; de Quadros *et al*., 2019).

مکانیسم‌های دفاعی گیاه به‌طور گسترده در برهمکنش‌های مختلف گیاه-بیمارگر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز نخستین و مهم‌ترین آنزیم مسیر فنیل‌پروپانوئید است که موجب سنتز بنزوئیک‌اسید، سالیسیلیک‌اسید و سایر ترکیبات فنلی وابسته به دفاع گیاه را می‌شود. افزایش فعالیت این آنزیم موجب تجمع قابل توجه ترکیبات فنلی و به دنبال آن، تقویت دفاع میزبان برای محدودسازی گسترش بیمارگر و محافظت از گیاه در برابر بیماری می‌شود (Caretto *et al*., 2015). پراکسیدازها یکی دیگر از آنزیم‌های دفاعی است که بر اثر تنش‌های زیستی فعال می‌شوند (Parida & Das, 2005). این آنزیم‌ها از سلول گیاهی در برابر مقادیر سمی پراکسید هیدروژن (H_2O_2) محافظت می‌کنند و در فرآیندهای مختلفی مانند لیگنینی و چوب‌پنبه‌ای‌شدن، اکسیداسیون فنل‌ها، ایجاد شرایط ناسازگار برای بیمارگر و جلوگیری از حمله آن دخالت دارند (Siddique *et al*., 2014). یکی از نقش‌های فیزیولوژیکی مهم پراکسیدازها، سنتز پلیمرهای دیواره سلولی (لیگنین و سوبرین) است که موانع دفاعی جهت استحکام ساختار سلول در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایجاد می‌کنند (Quiroga *et al*., 2000). پلی‌فنل‌اکسیدازها گروهی از پروتئین‌های مس‌دار هستند که موجب اکسیداسیون فنل‌ها به کوئینون‌ها (ترکیبات ضد میکروبی) و لیگنینی‌شدن دیواره سلول‌های گیاهی

[1] Reactive Oxygen Species

[2] Hypersensitivity Response

شده و در واکنش‌های دفاعی و فوق حساسیت گیاه برای مقاومت به بیمارگرهای قارچی نقش موثری دارند (Zehra *et al*., 2017). پرولین نوعی آمینواسید است که به‌عنوان یک مولکول آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی در پاسخ به بسیاری از تنش‌های غیر زیستی از جمله خشکی، شوری و یخبندان و همچنین تنش‌های زیستی مانند آلودگی گیاه به بیمارگرها نقش دارد و از گیاه در برابر اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کند (Gill & Tuteja, 2010). قندها محصولات مستقیم فتوسنتز و شکل اولیه ذخیره انرژی هستند که به‌عنوان پیام‌های مولکولی در واکنش‌های دفاعی گیاه تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی دخیل می‌باشند (Dallagnol *et al*., 2013). بیمارگرهای گیاهی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها موجب القای سنتز پروتئین‌های میزبان می‌شوند که به محدودکردن تکثیر و گسترش بیمارگرها در بافت‌های سالم کمک کرده و مقاومت یا تحمل گیاه در برابر حمله بیمارگر را بهبود می‌بخشند (Agnieszka & Iwona, 2003). در سال‌های اخیر به‌دلیل توجه ویژه به سلامتی انسان و محیط زیست و همچنین پیدایش نژادهای مقاوم عوامل بیماری‌زای گیاهی به آفت‌کش‌های مختلف، تحقیقات بسیاری به‌منظور یافتن روش‌های جایگزین انجام شده است. در کشاورزی پایدار، ایجاد مقاومت ژنتیکی در گیاهان می‌تواند یک استراتژی بلندمدت و اقتصادی جهت مدیریت بیماری‌های خاک‌زاد از جمله پژمردگی فوزاریومی ارائه دهد. بدین‌منظور، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (پراکسیداز، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و پلی‌فنل‌اکسیداز)، میزان پرولین و قند محلول در برخی ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس کتان روغنی پس از مایه‌زنی با قارچ بیمارگر *F. oxysporum* انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه زادمایه جدایه بیمارگر *F. oxysporum*

در این بررسی از جدایه بیمارگر *F. oxysporum* که از ریشه و طوقه بوته‌های کتان دارای علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی واقع در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان جداسازی و سپس شناسایی شده بود، استفاده شد. به‌منظور تهیه زادمایه قارچ بیمارگر، ابتدا ۵۰۰ گرم گندم به مدت یک شبانه‌روز در آب خیسانده شد تا حداکثر جذب آب را داشته باشد. سپس، درون هر ارلن میزان ۹۰ گرم گندم ریخته و سه مرتبه به فاصله یک روز، توسط دستگاه اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. تحت شرایط استریل در زیر هود، دو تا سه حلقه میسیلیومی ۱×۱ سانتی‌متری از حاشیه پرگنه در حال رشد جدایه قارچ بیمارگر به هر یک از ارلن‌ها مایه‌زنی و به مدت پنج تا شش روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. لازم به ذکر است برای هوادهی، جلوگیری از گلوله‌شدن گندم و رشد یکنواخت قارچ، ارلن‌ها هر روز یک مرتبه تکان داده شدند (Kavak & Boydak, 2006).

تهیه ژنوتیپ‌های کتان

در این پژوهش ۱۲ ژنوتیپ برگزیده از بین ۱۳۴ ژنوتیپ کتان روغنی که قبلا بر اساس شاخص نمره بیماری و میزان مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی از مناطق مختلف دنیا از طریق بانک ژن جمع آوری شده بودند در گلخانه پژوهشی دانشگاه ولی عصر رفسنجان مورد ارزیابی قرار گرفته و انتخاب شدند. مشخصات ژنوتیپ‌های مورد بررسی و میانگین نمره بیماری براساس مقیاس صفر تا پنج، در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های کتان روغنی منتخب
Table 1. Selected oil flax genotypes

Genotype number	Average disease score	Reaction to the disease
Argentina 825	4	Sensitive
Sweden 715	4	Sensitive
Afghanistan 1133	5	Highly sensitive
Uruguay 165	5	Highly sensitive
Poland 1027	0	Highly resistant
Austria 1019	0	Highly resistant
Austria 1200	1	Resistant
Palestine 1393	1	Resistant
Argentina 864	2	Moderately resistant
Chile 1051	2	Moderately resistant
Germany 702	3	Moderately sensitive
China 1201	3	Moderately sensitive

در پژوهش حاضر، تعداد ۲۰ بذر از هر ژنوتیپ کتان در گلدان‌های یک کیلویی حاوی خاک (با شوری ۱/۲ دسی‌زیمنس بر متر و اسیدیته ۷/۵)، کوکوپیت و پرلیت استریل به نسبت ۱:۱:۱ کشت شد. سه هفته پس از کشت، زمانی‌که ارتفاع گیاهچه‌ها به ۱۵ سانتی‌متر رسید، نمونه‌برداری برای شروع آزمایش انجام شد (روز صفر). سپس به‌منظور مایه‌زنی گیاهچه‌ها با *F. oxysporum*، میزان پنج گرم زادمایه بیمارگر در کنار طوقه گیاهچه‌ها، قرار گرفت. سه هفته پس از مایه‌زنی بیمارگر، نمونه‌برداری از گیاهچه‌های تیمار آلودگی و عدم آلودگی انجام شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار (در هر تکرار ۴ گیاهچه) به اجرا درآمد. لازم به ذکر است در هر دو مرحله از برداشت، قسمت‌های هوایی گیاهچه‌های جداشده به‌سرعت داخل ازت مایع قرار گرفته و پس از آن، به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند. در ادامه، میزان پرولین، قندهای محلول، میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز اندازه‌گیری شد.

محتوای پرولین برگ

برای تهیه عصاره استخراج، ۰/۵ گرم برگ تازه با پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد در هاون چینی کوبیده و محلول حاصل به لوله فالکون منتقل شد. عمل استخراج دو بار و هر بار با پنج میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد تکرار شد. مخلوط به‌دست‌آمده به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. برای تعیین غلظت پرولین، یک میلی‌لیتر از عصاره الکلی فوق با پنج میلی‌لیتر آب مقطر رقیق‌شده و پنج میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و سپس، پنج میلی‌لیتر اسیداستیک گلایسال به آن اضافه شد و محلول به‌مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از خنک‌شدن نمونه‌ها، پنج میلی‌لیتر بنزن به آن‌ها اضافه و به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. در نهایت، فاز بالایی محلول‌ها جدا شده و میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدلDB20) در طول موج ۵۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. استانداردهای پرولین با استفاده از ال‌پرولین در غلظت‌های صفر، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ (میلی‌گرم در لیتر) تهیه و میزان جذب آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. براساس جذب‌های خوانده‌شده، منحنی استاندارد رسم شد. با جای‌گذاری داده‌های جذب در معادله منحنی استاندارد، غلظت نمونه بر حسب میلی‌گرم در لیتر (ppm) محاسبه شد. برای تبدیل غلظت

از واحد ppm به مقدار میکرومول بر گرم ماده تازه، از رابطه یک استفاده شد (Bates *et al*., 1973):

رابطه (۱)

µM proline/g Fw= [(mg proline/Lit × ml benzene)/ 115.5 µg/µmole] / [g sample)/5]

محتوای قندهای محلول

به‌منظور اندازه‌گیری قندهای محلول، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده برای اندازه‌گیری پرولین با سه میلی‌لیتر آنترون تازه تهیه‌شده (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۷۲ درصد) مخلوط شد. سپس، مخلوط حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد تا واکنش انجام و رنگ محلول (سبز رنگ) تشکیل شود. پس از خنک‌شدن، میزان جذب محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت و غلظت قندهای محلول محاسبه شد. برای تهیه استاندارد قندها از گلوکز خالص در غلظت‌های صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۲۵۰ و ۲۵۰۰ (میلی‌گرم در لیتر) استفاده و میزان جذب آن‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین، تعیین میزان قند بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه بود (Irigoyen *et al*., 1992).

میزان پروتئین کل

برای تعیین مقدار پروتئین کل از روش Bradford (1976) استفاده شد. مبنای این روش براساس اتصال رنگ کوماسی برلیانت بلو G250 موجود در معرف اسیدی، به مولکول پروتئین می‌باشد. برای تهیه معرف بیوره، ۰/۰۱ گرم کوماسی برلیانت بلو G250 در پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد با کمک همزن مغناطیسی (مگنت) در شرایط تاریکی به‌خوبی حل شد. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر اسیدفسفریک ۸۵ درصد، قطره‌قطره به مخلوط فوق افزوده و پس از هم‌زدن، حجم نهایی محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین، ۳۰ میکرولیتر عصاره استخراج‌شده در ۸۰ میکرولیتر بافر استخراج، رقیق‌شده و پنج میلی‌لیتر معرف بیوره تازه به آن اضافه شد. محلول حاصل به‌مدت دو دقیقه به خوبی هم زده شد و پس از پنج دقیقه، میزان جذب تابش آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. از بافر استخراج همراه معرف بیوره بدون عصاره استخراجی به‌عنوان شاهد استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

برای استخراج و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ابتدا نیم گرم برگ تازه گیاه با سه تا پنج میلی‌لیتر بافر (پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷/۲، PVP (Poly vinyl pyrrolidone) یک درصد و EDTA داخل یک هاون چینی که روی حمام یخ قرار دارد، به‌طور کامل له شد. مخلوط حاصل، به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای چهار درجه سلسیوس، سانتریفوژ شد. سپس، فاز رویی جهت بررسی تغییرات آنزیمی جدا و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، یک میلی‌لیتر بافر استخراج، ۵۰۰ میکرولیتر فنیل‌آلانین ۱۰ میلی‌مولار، ۴۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط‌شده و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. واکنش با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر اسیدکلریدریک شش مولار متوقف شد و تغییرات جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Dcunha *et al*., 1996). یک واحد فعالیت آنزیمی به‌عنوان یک میکرومول سینامیک‌اسید تولیدشده در مدت یک دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در نظر گرفته

شد. اندازه‌گیری و محاسبه میزان سینامیک‌اسید تولید-شده با استفاده از منحنی استاندارد انجام شد.

برای اندازه‌گیری میزان آنزیم پراکسیداز از روش Chance & Maehly (1995) استفاده شد که مبتنی بر میزان اکسیدشدن گایاکول توسط این آنزیم می‌باشد. در این روش، ۳۳ میکرومول عصاره آنزیمی با یک میلی‌لیتر محلول پراکسیداز (۱۳ میلی‌مولار گایاکول ($C_7H_8O_2$)، پنج میلی‌مولار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و ۵۰ میلی‌مولار بافر پتاسیم فسفات با اسیدیته ۷) مخلوط شد. سپس، بلافاصله میزان جذب نور در طول موج ۴۳۶ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در فاصله‌های یک دقیقه و به‌مدت سه دقیقه اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با استفاده از روش Nicoli *et al.* (1991) اندازه‌گیری شد. در این روش، پیروگایول به‌عنوان پیش‌ماده آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. بدین‌ترتیب، مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم‌فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، ۲۰۰ میکرولیتر پیروگایالل ۰/۰۲ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر بعد از سه دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی پیروگالل معادل ($۶/۲mM^{-1}cm^{-1}$) و فرمول شماره دو محاسبه شد.

رابطه شماره ۲: $A=€bc$

A= جذب خوانده‌شده

€= ضریب خاموشی

b= عرض کووت برابر با یک سانتی‌متر

c= غلظت آنزیم.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست‌آمده از این آزمون با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 واکاوی شدند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. برای ترسیم نمودارها و جداول نیز از نرم‌افزارهای Excel و Word استفاده شد.

نتایج و بحث

باتوجه‌به جدول ۲ میزان فعالیت ترکیبات بیوشیمیایی بین ژنوتیپ‌ها و همچنین بین تیمارهای آلوده و شاهد در سطح آماری یک درصد تفاوت معنی‌دار نشان داد. معنی‌داربودن اثر متقابل ژنوتیپ در تیمار بیانگر این موضوع است که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه عکس‌العمل متفاوتی به آلودگی قارچی از نظر تغییر این صفات نشان دادند.

گیاهان در طول بیماری با فعالیت سامانه‌های بیوشیمیایی و تولید ترکیباتی از قبیل پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، فیتوالکسین‌ها، مواد فنلی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و گونه‌های فعال اکسیژن که در مجموع به آن‌ها سازوکارهای دفاعی می‌گویند، در برابر عامل بیماری‌زا واکنش نشان می‌دهند (Javanshir Javid *et al.*, 2021; Ogalloand Mcclure,1996). ارتباط بین این تغییرات و مقاومت به بیماری بین گونه‌ها و ارقام مختلف گیاهی، متفاوت می‌باشد؛ به‌طوری‌که برخی از تغییرات بیوشیمیایی با مقاومت گیاهان به بیماری همبستگی مثبت و برخی دیگر، همبستگی منفی دارند (Zhang *et al.*, 2020). برای جبران خسارت ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن، گیاهان مقاوم در مقایسه با گیاهان حساس رنگدانه‌های فتوسنتزی (مانند کلروفیل) و محتویات بیوشیمیایی (تمام پروتئین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان) بیشتری تولید می‌کنند (Ramalingam, 2019). از طرفی، سرعت واکنش دفاعی ارقام حساس نسبت به ارقام مقاوم کمتر است یا با کمی

تاخیر اتفاق می‌افتد؛ در نتیجه تولید اجزای دفاعی برای جلوگیری از رشد بیمارگر کافی نیست و یا اینکه سنتز آن‌ها در طی فرآیند آلودگی با سرعت کمی فعال می‌شود (Bernard *et al*., 2004). بررسی‌های متعددی نشان دادند فعالیت آنزیم‌های دفاعی در ارقام گیاهی مقاوم به بیماری از نظر آماری بیشتر از ارقام حساس می‌باشد (Li *et al*., 2016; Guo *et al*., 2018; Zheng *et al*., 2019). در ادامه، فعالیت هر یک از آنزیم‌ها، میزان قندهای محلول، محتوای پروتئین کل و پرولین به تفکیک مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی در ژنوتیپ‌های کتان روغنی در شرایط آلودگی قارچی و شاهد.

Table 2. Results of analysis of variance of biochemical traits in oil flax genotypes under fungal and control contamination conditions.

		Mean of squares					
Sources of variation	DF	Phenylalanine ammonialyase	Peroxidase	Polyphenol oxidase	Total protein	Proline	Soluble sugars
Genotype	11	2.73**	229025**	30.13**	0.080**	0.0004**	90065**
Treatment	1	1.05**	2052875**	91.13**	0.231**	0.0389**	168900**
Genotype×Treatment	11	3.87**	109911**	9.38**	0.015**	0.0003**	94640**
Error	36	7.37	5573	1.31	0.0018	0.00007	19873
Coefficient of variation (CV%)	-	5.97	19.83	15.15	5.75	17.57	17.29
R^2%	-	92.19	95.75	88.34	92.55	94.03	70.44

**: Significance at 1% probability level. **: معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد.

محتوای پرولین

نتایج مقایسات میانگین محتوای پرولین در ژنوتیپ‌ها (در شرایط آلوده و شاهد) نشان داد که میزان پرولین ژنوتیپ‌ها در تیمار شاهد از ۰/۰۴۳ تا ۰/۰۶۳ متغیر بود و تمایز قابل توجهی از نظر این ویژگی بین ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس وجود نداشت؛ در حالی‌که در تیمار آلوده به قارچ میزان این صفت از ۰/۰۶۶ تا ۰/۰۹۷ در بین ژنوتیپ‌ها متفاوت بود و این اختلاف بین ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم معنی دار بود (جدول ۳). از سوی دیگر، بیشترین تغییرات محتوای پرولین در ژنوتیپ‌های فلسطین ۱۳۹۳ (به میزان ۰/۰۳۶)، لهستان ۱۰۲۷ (به میزان ۰/۰۳۵) و اتریش ۱۰۱۹ (به میزان ۰/۰۳۵) مشاهده شد که در گروه ژنوتیپ‌های مقاوم و بسیار مقاوم قرار گرفتند و کمترین تغییرات محتوای پرولین مربوط به ژنوتیپ‌های افغانستان ۱۱۳۳ (به میزان ۰/۰۱۴) و شیلی ۱۰۵۱(به میزان ۰/۰۱۷) بود که در گروه ژنوتیپ‌های حساس و بسیارحساس قرار گرفتند . بنابراین، محتوای پرولین در تمام ژنوتیپ‌های کتان روغنی ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که این تغییرات در ژنوتیپ‌های مقاوم و بسیار مقاوم بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین محتوای پرولین در ژنوتیپ‌های مختلف کتان روغنی بیمار و سالم، ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر با آزمون LSD.

Table 3. Comparison of proline content in different genotypes of diseased and healthy oil flax, 21 days after inoculation with pathogen.

	Genotype											
Treatment	**Palestine 1393**	**Sweden 715**	**China 1201**	**Austria 1200**	**Afghanistan 1133**	**Austria 1019**	**Uruguay 165**	**Germany 702**	**Chile 1051**	**Argentina 864**	**Argentina 825**	**Poland 1027**
Control treatment (a)	0.057	0.047	0.043	0.046	0.049	0.048	0.043	0.038	0.064	0.050	0.047	0.062
Infected treatment (b)	0.093	0.074	0.073	0.066	0.063	0.083	0.068	0.067	0.081	0.083	0.069	0.097
Difference(a-b)	-0.036*	-0.027*	-0.030*	-0.020*	-0.014*	-0.035*	-0.025*	-0.029*	-0.017*	-0.033*	-0.022*	-0.035*
LSD= 0.011												

مطالعات نشان داده که تجمع پرولین آزاد در پاسخ به بسیاری از تنش‌های زیستی همچون آلودگی قارچی رخ می‌دهد تجمع پرولین در محل آلودگی منجر به محدود-کردن توسعه بیمارگر می‌شود، زیرا چنین ترکیباتی برای بیمارگرها سمی می‌باشند (Rajeswari, 2015). سازوکار دقیق پرولین در دفاع گیاه میزبان در برابر بیمارگرها هنوز به‌طور دقیق مشخص نشده است (Wong *et al*., 2021). بااین‌حال، چندین سازوکار حفاظتی شامل تثبیت پروتئین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین، حذف مستقیم گونه‌های فعال اکسیژن را به پرولین نسبت داده‌اند (Ben Rejeb *et al*., 2014) که تجمع پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن‌ها (PR) می‌تواند باعث تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها و القای مقاومت در گیاهان می‌شود (Slusarenko *et al*.,2000). بنابراین، مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا ممکن است با افزایش غلظت پرولین همراه باشد (Cecchini *et al*., 2011).

قندهای محلول

باتوجه‌به داده‌های مقایسه میانگین مربوط به میزان قند محلول که در جدول ۴ بیان شده است، ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر، میزان قند محلول در تمام ژنوتیپ‌های کتان روغنی آلوده بیش از ژنوتیپ‌های سالم بود. همچنین، بیشترین و کمترین تغییرات قند محلول به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های آرژانتین ۸۶۴ (با اختلاف ۷۶۰/۹۵) در گروه ژنوتیپ‌های با مقاومت نسبی و افغانستان ۱۱۳۳ (با اختلاف ۷۶/۶۷) در گروه ژنوتیپ‌های بسیار حساس قرار گرفتند.

جدول ۴. مقایسه میانگین میزان قندهای محلول در ژنوتیپ‌های مختلف کتان روغنی در ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر با آزمون LSD.

Table 4. Mean comparison of soluble sugars in different genotypes of oil flax at 21 days after inoculation with the pathogen.

	Genotype											
Treatment	**Palestine 1393**	**Sweden 715**	**China 1201**	**Austria 1200**	**Afghanistan 1133**	**Austria 1019**	**Uruguay 165**	**Germany 702**	**Chile 1051**	**Argentina 864**	**Argentina 825**	**Poland 1027**
Control treatment (a)	825.24	614.29	1060.95	911.19	897.14	667.14	1006.19	707.62	643.10	1037.62	545.00	796.90
Infected treatment (b)	951.43	740.48	800.24	1054.05	973.81	848.57	1100.71	880.71	814.05	1798.57	677.62	1187.76
Difference (a-b)	-126.19	-126.19	206.71*	-142.86	-76.67	-181.43*	-94.59	-173.09	-170.95	-760.95*	-132.62	-387.86
LSD= 175.83												

قندها به‌دلیل عملکرد تنظیمی، تمام مراحل زندگی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند و از طریق برهمکنش با هورمون‌های گیاهی، فرآیندهای رشد و نمو گیاهان را کنترل می‌کنند (Stokes *et al*., 2013). در این مطالعه، افزایش میزان قندهای محلول در ژنوتیپ‌های مقاوم کتان روغنی مشاهده شد و روند افزایش قندهای محلول همسو با محتوای پرولین بود. قندهای محلول (مانند ساکارز، گلوکز و فروکتوز) علاوه‌بر اینکه منبع انرژی و کربن در گیاه هستند، پیام‌های متابولیکی مورد نیاز برای بیان بسیاری از ژن‌ها مانند ژن‌های دفاعی را القا می‌کنند (Morkunas & Ratajczak, 2014). از سوی دیگر، توانایی فعال‌کردن سازوکارهای دفاعی گیاه در برابر قارچ‌های بیماری‌زا، به‌ویژه قارچ‌های سیستمیک مانند *F. oxysporum* به‌دست می‌آورند (Morkunas *et al*., 2011). همچنین، می‌توانند موجب افزایش لیگنینی‌شدن دیواره سلولی و تحریک سنتز فلاونوئیدها شوند (Morkunas & Ratajczak, 2014). بنابراین، بین غلظت قندهای محلول و تحمل تنش‌های

زیستی ناشی از بیمارگرها همبستگی قوی وجود دارد و در اکثر موارد، تنش‌های زیستی با تجمع قندهای محلول مرتبط می‌باشد (Zaragoza *et al*., 2009). به‌طور کلی، این ترکیبات یک پاسخ انطباقی به شرایط تنش تلقی می‌شود.

محتوای پروتئین کل

نتایج مقایسه میانگین ارائه‌شده در جدول ۵ نشان داد که ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی با قارچ بیمارگر، کاهش محتوای پروتئین کل در تمام ژنوتیپ‌های کتان مشاهده شد. به‌عبارت دیگر، میزان پروتئین کل در گیاهان تیمارشده و آلوده کمتر از تیمار شاهد بود. بااین‌حال، پروتئین کل ژنوتیپ‌های مقاوم نسبت به ژنوتیپ‌های حساس بیشتر بود. براین‌اساس، بیشترین میزان تغییرات کاهشی پروتئین در ژنوتیپ‌های آرژانتین ۸۶۴ (به میزان ۰/۳۸۵)، فلسطین ۱۳۹۳ (به میزان ۰/۲۷۱) و لهستان ۱۰۲۷ (به میزان ۰/۲۰۵) مشاهده شد که جزء ژنوتیپ‌های مقاوم گروه‌بندی شدند و کمترین میزان تغییرات کاهشی پروتئین در ژنوتیپ‌های آلمان ۷۰۲ (به میزان ۰/۰۳۳) و اتریش ۱۰۱۹ (به میزان ۰/۰۳۷) در گروه بسیار حساس قرار گرفتند.

جدول ۵- مقایسه میانگین میزان پروتئین کل در ژنوتیپ‌های مختلف کتان روغنی بیمار و سالم، ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر با آزمون LSD.

Table 5. Mean comparison of total protein in different genotypes of diseased and healthy oil flax, 21 days after inoculation with pathogen.

	Genotype											
Treatment	**Palestine 1393**	**Sweden 715**	**China 1201**	**Austria 1200**	**Afghanistan 1133**	**Austria 1019**	**Uruguay 165**	**Germany 702**	**Chile 1051**	**Argentina 864**	**Argentina 825**	**Poland 1027**
Control treatment (a)	0.993	0.654	0.774	0.946	0.754	0.826	0.747	0.819	0.733	0.822	0.910	0.923
Infected treatment (b)	0.722	0.568	0.645	0.780	0.554	0.789	0.593	0.786	0.653	0.437	0.848	0.718
Difference (a-b)	0.271*	0.086*	0.129*	0.166*	0.200*	0.037*	0.154*	0.033	0.080*	0.385*	0.062*	0.205*
LSD= 0.054												

نقش پروتئین‌ها در مقاومت گیاه به بیمارگرهای قارچی به خوبی تایید شده است (Aly *et al*., 2017). افزایش محتوای پرولین پس از بروز بیماری در ژنوتیپ‌های مقاوم می‌تواند ناشی از افزایش تجزیه پروتئین‌ها در جهت بالا-بردن سطح گلوتامات برای آغاز مسیر سنتز پرولین و یا افزایش مستقیم محتوای پرولین باشد (Knox *et al*., 2010). از طرفی، این احتمال وجود دارد که افزایش میزان کربوهیدرات در گیاه آلوده به بیمارگر به‌دلیل کاهش مصرف اسکلت کربنی برای سنتز آمینواسیدها است؛ درنتیجه، سنتز پروتئین کاهش پیدا خواهد کرد (Rasmussen *et al*., 2008). همچنین، در شرایط تنش ممکن است افزایش سرعت تجزیه پروتئین‌ها رخ دهد (Heidarvand & Maali Amiri, 2010). باتوجه‌به اینکه پروتئین‌های کتان آلوده ۲۱ روز پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شدند، به نظر می‌رسد پروتئین‌های ارزیابی-شده شامل پروتئین‌های ساختمانی[3] و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PRs[4]) هستند که در پاسخ به حمله بیمارگر القا شده‌اند. پروتئین‌های ساختمانی از طریق

[3] Constitutive

[4] Pathogenesis-related proteins

سازوکارهای مختلفی مانند تاثیر بر اجزای سازنده دیواره بیمارگر، تداخل در سنتز دیواره بیمارگر و بی‌ثبات‌کردن غشای قارچی در دفاع گیاهان نقش دارند (Aly *et al*., 2012). از سوی دیگر، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی هم به‌صورت موضعی و هم سیستمیک در طی حمله بیمارگر در غلظت‌های بالاتری تولید می‌شوند و دارای فعالیت ضد قارچی می‌باشند. به‌عنوان مثال، برخی از آن‌ها جوانه‌زنی اسپور را مهار می‌کنند و برخی دیگر، با تقویت دیواره سلولی میزبان مرتبط هستند (Agrios, 2005).

تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

باتوجه‌به نتایج مقایسه میانگین بیان‌شده در جدول ۶، بیشترین میزان اختلاف فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در دو تیمار آلوده و سالم (شاهد) مربوط به ژنوتیپ‌های لهستان ۱۰۲۷ (۰/۰۰۰۳)، اتریش ۱۰۱۹ (۰/۰۰۰۳)، اتریش ۱۲۰۰ (۰/۰۰۰۲)، فلسطین ۱۳۹۳ (۰/۰۰۰۲) و آرژانتین ۸۶۴ (۰/۰۰۰۲) بود. ژنوتیپ‌های ذکرشده جزء ژنوتیپ‌های بسیار مقاوم و مقاوم هستند. کمترین میزان اختلاف مربوط به ژنوتیپ چین (۰/۰۰۰) بود که جزء ژنوتیپ‌های بسیار حساس می باشد. در ژنوتیپ‌های بسیار حساس تا مقاوم نسبی، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز بین تیمار آلوده و سالم تفاوت معنی‌داری نداشت. بنابراین، فعالیت این آنزیم در تیمار بیمار و ژنوتیپ‌های بسیار مقاوم و مقاوم بیشتر از تیمار سالم و ژنوتیپ‌های حساس و بسیار حساس بود. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ‌های مختلف کتان روغنی بیمار و سالم در جدول ۷ نشان داده شده است. براساس این جدول استنباط می‌شود که در تمام ژنوتیپ‌های مورد بررسی، میزان این آنزیم به میزان قابل توجهی افزایش یافت. به‌طوری‌که بیشترین تفاوت فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به ژنوتیپ‌های لهستان ۱۰۲۷ (۳۱۵/۴۳) و آرژانتین ۸۶۴ (۲۹۴/۳۳) بود که هر دو جزء ژنوتیپ‌های مقاوم بودند. در مقابل، کمترین تغییرات آنزیمی در ژنوتیپ‌های چین ۱۲۰۱ (۶۲/۳۷) و افغانستان ۱۱۳۳ (۶۸/۳۷) مشاهده شد. پس، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ‌های مقاوم و بسیار مقاوم بیشتر از ژنوتیپ‌های حساس و بسیار حساس بود.

جدول ۶. نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در ژنوتیپ‌های کتان روغنی در ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر با آزمون LSD.

Table 6. Mean comparison of phenylalanine ammonialyase enzyme activity in oil flax genotypes at 21 days after inoculation with the pathogen.

	Genotype											
Treatment	**Palestine 1393**	**Sweden 715**	**China 1201**	**Austria 1200**	**Afghanistan 1133**	**Austria 1019**	**Uruguay 165**	**Germany 702**	**Chile 1051**	**Argentina 864**	**Argentina 825**	**Poland 1027**
Control treatment (a)	0.0018	0.0013	0.0014	0.0017	0.0014	0.0016	0.0014	0.0016	0.0014	0.0013	0.0016	0.0016
Infected treatment (b)	0.0020	0.0012	0.0014	0.0019	0.0015	0.0019	0.0015	0.0017	0.0015	0.0015	0.0017	0.0019
Difference (a-b)	0.0002*	0.0001	0.0000	0.0002*	-0.0001	-0.0003*	-0.0001	-0.0001	0.0001	-0.0002*	-0.0001	0.0003*
LSD= 0.0001												

براساس نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین داده‌های مربوط به بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز مشخص شد بیشترین تغییرات آنزیمی در تکرار آلوده ژنوتیپ لهستان ۱۰۲۷ (۸۶/۵) مشاهده شد که یک ژنوتیپ بسیار مقاوم بود. کمترین میزان تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز مربوط به چین ۱۲۰۱ (۱/۴۷) بود

که در گروه ژنوتیپ‌های حساس نسبی قرار داشت. به‌طور کلی، سطح این آنزیم در اکثر ژنوتیپ‌های آلوده کتان بیش از تیمار سالم (عدم آلودگی) بود (به استثنای ژنوتیپ‌های شیلی ۱۰۵۱ (۱/۰۶) و آلمان ۷۰۲ (۳/۸۶). باتوجه‌به نتایج، بیشترین تغییرات آنزیمی در ژنوتیپ‌های مقاوم و بسیار مقاوم و کمترین آن در ژنوتیپ‌های حساس مشاهده شد (جدول ۸).

جدول ۷. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ‌های مختلف کتان روغنی در ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر با آزمون LSD.

Table 7. Mean comparison of peroxidase activity in different genotypes of oil flax at 21 days after inoculation with the pathogen.

	Genotype											
Treatment	**Palestine 1393**	**Sweden 715**	**China 1201**	**Austria 1200**	**Afghanistan 1133**	**Austria 1019**	**Uruguay 165**	**Germany 702**	**Chile 1051**	**Argentina 864**	**Argentina 825**	**Poland 1027**
Control treatment (a)	297.93	422.51	373.06	186.74	168.80	380.81	432.94	303.78	143.47	463.66	338.55	421.87
Infected treatment (b)	502.30	509.49	435.43	320.14	237.17	662.20	543.31	449.79	331.39	757.99	604.48	737.30
(a- Difference b)	-204.37*	-86.98*	-62.37	-133.40*	-68.37	-281.39*	-110.37*	-146.01*	-187.92*	-294.33*	-265.93*	-315.43
LSD= 93.115												

گیاهان در طول بیماری با فعالیت سامانه‌های بیوشیمیایی و تولید ترکیباتی از قبیل پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، فیتوالکسین‌ها، مواد فنلی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و گونه‌های فعال اکسیژن که در مجموع به آن‌ها سازوکارهای دفاعی می‌گویند، در برابر عامل بیماری‌زا واکنش نشان می‌دهند (Javanshir Javid *et al*., 2021; Ogalloand Mcclure,1996). ارتباط بین این تغییرات و مقاومت به بیماری بین گونه‌ها و ارقام مختلف گیاهی، متفاوت می‌باشد؛ به‌طوری‌که برخی از تغییرات بیوشیمیایی با مقاومت گیاهان به بیماری همبستگی مثبت و برخی دیگر، همبستگی منفی دارند (Zhang *et al*., 2020). برای جبران خسارت ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن، گیاهان مقاوم در مقایسه با گیاهان حساس رنگدانه‌های فتوسنتزی (مانند کلروفیل) و محتویات بیوشیمیایی (تمام پروتئین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان) بیشتری تولید می‌کنند (Ramalingam, 2019). از طرفی، سرعت واکنش دفاعی ارقام حساس نسبت به ارقام مقاوم کمتر است یا با کمی تاخیر اتفاق می‌افتد؛ در نتیجه تولید اجزای دفاعی برای جلوگیری از رشد بیمارگر کافی نیست و یا اینکه سنتز آن‌ها در طی فرآیند آلودگی با سرعت کمی فعال می‌شود (Bernard *et al*., 2004). بررسی‌های متعددی نشان دادند فعالیت آنزیم‌های دفاعی در ارقام گیاهی مقاوم به بیماری بیشتر از ارقام حساس می‌باشد (Li *et al*., 2016; Guo *et al*., 2018; Zheng *et al*., 2019). در ادامه، فعالیت هر یک از آنزیم‌ها، میزان قندهای محلول، محتوای پروتئین کل و پرولین به‌تفکیک مورد بررسی قرار خواهند گرفت. مایه‌زنی ژنوتیپ‌های مختلف کتان روغنی با قارچ *F. oxysporum* به‌عنوان یک عامل تنش‌زای زنده‌ی خارجی، سبب تحریک گیاه به فعال‌شدن یا افزایش سازوکارهای دفاعی می‌شود. بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یکی از شاخص‌های مهم برای ارزیابی واکنش‌های دفاعی گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و روند ساخت سایر ترکیبات دفاعی می‌باشد. در پژوهش حاضر، میزان فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز ۲۱ روز پس از حمله بیمارگر، در ژنوتیپ‌های بسیار مقاوم و مقاوم کتان نسبت به ژنوتیپ‌های حساس به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز بخشی از پاسخ دفاعی گیاه در برابر بیمارگرها است. این آنزیم نقطه ورود مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید است و L-فنیل‌آلانین را با آمین‌زدایی به یون آمونیوم و ترانس‌سینامیک‌اسید تبدیل می‌کند (Huang *et al*., 2010) که این ترکیب به‌عنوان مهمترین و اولین حد واسط در مسیر سنتز طیف وسیعی از ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، هورمون‌های گیاهی، فیتوآلکسین‌ها و لیگنین‌ها می‌باشد (Zehra *et al*., 2017).

جدول ۸- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در ژنوتیپ‌های مختلف کتان روغنی بیمار و سالم، ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر با آزمون LSD.

Table 8. Mean comparison of polyphenol oxidase enzyme avtivity in different genotypes of sick and healthy oil flax, 21 days after inoculation with the pathogen.

Treatment	Genotype											
	Palestine 1393	Sweden 715	China 1201	Austria 1200	Afghanistan 1133	Austria 1019	Uruguay 165	Germany 702	Chile 1051	Argentina 864	Argentina 825	Poland 1027
Control treatment (a)	5.82	9.71	7.16	6.26	5.65	12.25	10.86	10.14	8.83	9.85	4.44	5.33
Infected treatment (b)	8.96	11.24	8.63	8.44	8.68	15.25	12.24	6.27	7.77	11.29	5.54	11.19
Difference (a-b)	-3.14*	-1.53*	-1.47*	-2.18*	-3.03*	-3.00*	-1.38	3.86*	1.06	-1.44*	-1.10	-5.86*
LSD= 1.432												

ترکیبات لیگنین دیواره سلولی نقش مهمی در ایجاد مقاومت در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌های بیماری‌زا دارند که پژوهش‌های قبلی نیز اثبات کرده است که به دنبال افزایش فعالیت آنزیم *pal* در گیاه طیف وسیعی از عملکردهای دفاعی مانند تقویت دیواره سلولی (افزایش لیگنین)، تشکیل رنگدانه‌ها، و سنتز سالیسیلیک‌اسید رخ می‌دهد که تمام این موارد منجر به مقاومت در برابر قارچ-های بیمارگر می شوند (Nouri *et al*., 2017). در اکثر مواقع، سطح بیان و فعالیت این آنزیم با میزان حساسیت و مقاومت ارقام مختلف یک گونه گیاهی به بیماری ارتباط وجود دارد (Xu *et al*., 2010). بنابراین، تفاوت مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس کتان روغنی ممکن است به اختلاف میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در گیاه مربوط باشد. علاوه بر آنزیم PAL، آنزیم پراکسیداز نیز نقش مهمی در دفاع از گیاه و جلوگیری از نفوذ و گسترش عامل بیماری‌زا می‌شود (Aly *et al*., 2017).

این آنزیم با مصرف پراکسید هیدروژن منجر به اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کینون‌ها می‌شوند که اغلب برای بیمارگرها سمی می‌باشند (Agrios, 2005). این آنزیم با خاصیت کیتینازی دیواره سلولی قارچ‌ها را تخریب کرده و با فعالیت پراکسیدازی در القای مقاومت گیاه مقابل بیمارگرها از طریق استحکام دیواره آوند چوبی، افزایش سنتز فیتوآلکسین‌ها، رسوب ترکیبات فنلی در دیواره سلولی، لیگنین‌سازی، سخت‌شدن دیواره سلولی با ایجاد سد مکانیکی در برابر نفوذ بیمارگر در سرکوب حمله بیمارگر، نقش دارد (Nguyen *et al*., 2016; de Quadros *et al*., 2019). بنابراین، افزایش فعالیت پراکسیداز با القای مقاومت مرتبط می‌باشد.

دیگر آنزیم دفاعی که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز بود. این آنزیم در فرآیند بیوسنتز بسیاری از ترکیبات موثر دفاعی در گیاه مانند برخی از فیتوآلکسین‌ها و مواد فنلی نقش مهمی دارد (Mohammadi & Kazemi, 2002). این آنزیم در هنگام بروز بیماری رادیکال‌های اکسیژن آزاد تولیدشده در سلول

را جمع‌آوری کرده و کاتالیز هیدروکسیلاسیون مونوفنل‌ها به دی‌فنل‌ها و اکسیداسیون آن‌ها به دی‌کینون‌ها را برعهده دارند (Araji *et al*., 2014). کینون‌های تولیدشده با استفاده از روش‌های مختلفی منجر به حفاظت از گیاهان می‌شوند (Melo *et al*., 2006). پلی‌فنل‌اکسیداز ممکن است به‌طور مستقیم در توقف توسعه بیمارگر، تسریع مرگ سلولی سلول‌های نزدیک به محل آلودگی، جلوگیری از پیشرفت بیماری و ایجاد محیط سمی برای مهار رشد بیمارگر داخل سلول‌های گیاهی، دخیل باشد (Ashry & Mohamed, 2012). برخی بر این باورند که تجمع فیتوالکسین‌ها و افزایش پلیمرهای موجود در دیواره سلولی در اثر ازدیاد مشتقات لیگنین از پیامدهای افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز می‌باشند (Raj *et al*., 2006; Araji *et al*., 2014).

براساس نتایج به‌دست‌آمده از بررسی Pociecha *et al.* (2009)، غلظت پرولین در ژنوتیپ‌های مقاوم ۲۵ برابر بیشتر از گیاهان شاهد و پنج برابر بیشتر از ژنوتیپ‌های حساس بود. Ashry & Mohamed (2011) میزان پروتئین کل و پرولین برگ‌ها و ساقه‌های ۱۸ لاین مقاوم و حساس به بیماری سفیدک پودری (*Odium lini*) را در کتان روغنی ارزیابی کردند. یافته‌های آن‌ها حاکی از افزایش محتوای پرولین برگ‌های آلوده به این بیماری بود. از طرفی، میزان پروتئین کل پس از حمله بیمارگر در برگ‌های لاین‌های مقاوم کتان به‌طور قابل توجهی افزایش یافت که برخلاف نتایج پژوهش حاضر است. در بررسی دیگر، افزایش فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاهچه‌های کتان یک‌هفته‌ای مایه‌زنی‌شده با *F. oxysporum* حاصل شد (Kostyn *et al*., 2012). Madadkhah *et al.* (2012) فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در ارقام مقاوم (پنج رقم) و حساس (پنج رقم) خربزه مایه‌زنی‌شده با *F. oxysporum* f.sp *melonis* race 1 مورد مطالعه و ارزیابی قرار دادند. مطابق با نتایج آن‌ها، فعالیت آنزیم‌ها در هر دو گروه افزایش یافت، اما این افزایش در ارقام مقاوم بیشتر بود. در آزمایشی دیگر، Madadkhah *et al.* (2015) تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در ارقام مقاوم (پنج رقم) و حساس (پنج رقم) طالبی و خربزه مبتلا به بیماری پژمردگی فوزاریومی (*F. oxysporum* f.sp *melonis* race 1) را ارزیابی کردند. نتایج نشان داد فعالیت این آنزیم در ارقام مقاوم به میزان قابل توجهی افزایش یافت، اما در گروه حساس تغییرات معنی‌داری وجود نداشت.

در یک مطالعه، تغییرات بیوشیمیایی ۱۲ لاین بسیار مقاوم و شش لاین بسیار حساس کتان در برابر بیماری سفیدک پودری ارزیابی شد و براساس نتایج، میزان پروتئین، پرولین، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز در برگ‌های آلوده لاین‌های بسیار مقاوم نسبت به لاین‌های بسیار حساس، به‌طور قابل توجهی افزایش یافتند (Aly *et al*., 2017). در آزمایش انجام‌شده توسط Darvishzadeh *et al.* (2018)، محتوای پرولین و پروتئین کل لاین‌های حساس (C100) و مقاوم (C90) آفتابگردان در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با دو جدایه *Sclerotinia sclerotiorum* اندازه‌گیری شد. براساس نتایج، محتوای پرولین در لاین مقاوم آلوده به قارچ بیمارگر در تمام زمان‌های مورد بررسی نسبت به شاهد (گیاه سالم) بیشتر بود. اما گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان بیمار، میزان پروتئین کل بیشتری داشتند. همچنین، بیشترین میزان پروتئین کل مربوط به لاین حساس بود. در مطالعه دیگر، صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی درگیر در مقاومت ۲۰ ژنوتیپ نخود به بیماری برق‌زدگی ناشی از *Ascochyta rabiei* مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج تجزیه واریانس، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، محتوای پروتئین، پرولین و قندهای محلول تحت تاثیر بیماری قرار گرفتند. به‌طوری‌که فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز، مقدار پرولین و میزان قند محلول تحت شرایط تنش بیماری افزایش یافتند، اما کاهش میزان پروتئین در شرایط بیماری مشاهده شد (Hasanian *et al*., 2020). He *et al.* (2022) فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در رقم‌های مقاوم (Jinya 7= R-7) و حساس

(Shanxi Huang 29= S-29) کتان آلوده به *F. oxysporum* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که هشت ساعت پس از مایه‌زنی ارقام کتان با بیمارگر، فعالیت این آنزیم در رقم مقاوم به‌طور قابل توجهی افزایش یافت که موجب افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه مانند لیگنین و بهبود مقاومت به بیمارگر شد. در مقابل، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در رقم حساس کاهش یافت که نشان‌دهنده سنتز کمتر لیگنین و مقاومت نسبتا ضعیف آن در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی بود.

نتیجه‌گیری کلی

گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زای مختلف فعالیت‌های بیوشیمیایی متعددی از خود بروز داده که به دنبال آن واکنش‌های پیچیده مرتبط با آن منجر به ایجاد مقاومت یا حساسیت می‌شود. در بررسی حاضر، ژنوتیپ‌های مختلف کتان روغنی پاسخ متفاوتی به بیماری پژمردگی فوزاریومی نشان دادند. براساس نتایج به‌دست‌آمده، میزان پرولین، قندهای محلول و آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در ژنوتیپ‌های مقاوم و بسیار مقاوم کتان روغنی، به‌ویژه لهستان ۱۰۲۷، پس از مایه‌زنی با *F. oxysporum* به میزان قابل توجهی افزایش یافتند. در واقع، القای بیشتر این فاکتورها در ژنوتیپ‌های مقاوم و بسیار مقاوم بیمار می‌تواند به‌عنوان یک پاسخ دفاعی در برابر *F. oxysporum* باشند که در کاهش میزان بیماری‌زای قارچ بیمارگر و شدت بیماری موثر خواهند بود. در مقابل، میزان پروتئین کل پس از آلودگی تمام ژنوتیپ‌های کتان روغنی در مقایسه با ژنوتیپ‌های غیر آلوده کاهش یافت. بنابراین، حساسیت، مقاومت و تحمل ارقام مختلف کتان روغنی به بیماری پژمردگی فوزاریومی به میزان این ترکیبات دفاعی ارتباط دارد.

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌ها با واکنش مقاومتی متفاوت به بیماری پژمردگی فوزاریومی واکنش‌های مختلفی در مواجه با قارچ عامل بیماری دارند. بررسی‌های فیزیولوژی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان داد که وقتی ژنوتیپ مورد حمله قارچ عامل بیماری قرار می‌گیرد، مسیر سنتز یک سری صفات فیزیولوژی مرتبط با مقاومت فعال شده و به دنبال فعال‌شدن این مسیر، مقاومت یا حساسیت در گیاه رخ خواهد داد. افزایش فعالیت این پارامترها را می‌توان به عنوان یک پاسخ دفاعی در ژنوتیپ‌ها در مواجه با حمله قارچ دانست و با شناسایی ژن‌های سنتزشده در مسیر افزایش بیان این پارامترها، ژن یا ژن‌های دخیل در القای مقاومت ژنوتیپ‌های کتان به بیماری فوزاریوم را شناسایی کرد.

باتوجه‌به اینکه در این پژوهش افزایش قابل ملاحظه میزان پرولین و آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز پس از مایه‌زنی با عامل بیماری در ژنوتیپ‌های مقاوم کتان روغنی مشاهده شد، لذا در ارزیابی منابع ژنتیکی این گیاه از نظر مقاومت به بیماری به نظر می‌رسد که بتوان از این ویژگی‌ها برای انتخاب غیر مستقیم در شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی بهره برد.

References:

1. Agnieszka, P., & Iwona, Z. (2003). Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. *Plant Science*, 164, 1019-1028.
2. Agrios, G.N. (2005). *Plant Patheology*. Elsevier Academic Press, San Diego USA.
3. Aly, A.A., Mansour, M., Mohamed, H.I., & Abd-Elsalam, K.A. (2012). Examination of correlations between several biochemical components and powdery mildew resistance of flax cultivars. *The Plant Pathology Journal*, 28(2), 149-155.
4. Aly, A.A., Mansour, M.T.M., & Mohamed, H.I. (2017). Association of increase in some biochemical components with flax resistance to powdery mildew. *Gesunde Pflanzen*, 69(1), 47-52.
5. Araji, S., Grammer, T.A., Gertzen, R., Anderson, S.D., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Phu, M.L., Solar, A., Leslie, C.A., Dandekar, A.M., & Escobar, M.A. (2014). Novel roles for the polyphenol oxidase

enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut. *Plant Physiology*, 164, 1191-1203.
6. Ashry, N.A., & Mohamed, H.I. (2011). Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to powdery mildew. *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(1), 78-85.
7. Ashry, N.A., & Mohamed, H.I. (2012). Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and/or susceptibility to powdery mildew. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 1073-1077.
8. Bates, L., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
9. Ben Rejeb, K., Abdelly, C., & Savoure, A. (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 278-284.
10. Bernard, M.A., Summerhurst, D.K., & Razem, F.A. (2004). Oxidase, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection. *Phytochemistry Reviews*, 3(1), 113-126.
11. 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 of Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
12. Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., & Lattanzio, V. (2015). Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 26378–26394.
13. Caverzan, A., Casassola, A., & Brammer, S.P. (2016). Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and Molecular Biology*, 39(1), 1-6.
14. Cecchini, N.M., Monteoliva, M.I., & Alvarez, M.E. (2011). Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 155, 1947-1959.
15. Chance, B., & Maehly, A.C. (1995). Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775.
16. Dallagnol, L.J., Rodrigues, F.A., Chaves, A.D.M., Vale, F.X.R., & DaMatta, F.M., (2013). Photosynthesis and sugar concentration are impaired by the defective active silicon uptake in rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. *Plant Pathology*, 62(1), 120-129.
17. Darvishzadeh, R., Arjomand, N., Najafzadeh, R., & Heydari, R. (2018). Proline content, total protein and protein electrophoresis pattern in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) disease. *Modares Journal of Biotechnology*, 9(2), 285-291. (In Persian)
18. Dcunha, G.B., Satyanarayan, V., & Nair, P.M. (1996). Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Phytochemistry*, 42, 17-20.
19. de Borba, M.C., Garces-Fiallos, F.R., & Stadnik, M.J. (2017). Reactions of black bean seedlings and adult plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Crop Protection*, 96, 221-227.
20. de Quadros, F.M., Garces-Fiallos, F.R., de Borba, M.C., de Freitas, M.B., & Stadnik, M.J. (2019). *Fusarium oxysporum* affects differently the hydrogen peroxide levels and oxidative metabolism in susceptible and resistant bean roots. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106, 1-6.
21. Dmitriev, A.A., Krasnov, G.S., Rozhmina, T.A., Novakovskiy, R.O., Snezhkina, A.V., Fedorova, M.S., Yurkevich, O.Y., Muravenko, O.V., Bolsheva, N.L., Kudryavtseva, A.V., & Melnikova, N.V. (2017). Differential gene expression in response to *Fusarium oxysporum* infection in resistant and susceptible genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biology*, 17(2), 253-265.
22. Pociecha, E., Płażek, A., Janowiak, F., & Zwierzykowski, Z. (2008). ABA level, proline and phenolic concentration, and PAL activity induced during cold acclimation in androgenic festulolium forms with contrasting resistance to frost and pink snow mould (*Microdochium nivale*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 73(6), 126-132.
23. Galindo-Gonzalez, L., & Deyholos, M.K. (2016). RNA-seq transcriptome response of flax (*Linum usitatissimum* L.) to the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1766.
24. Gholamnezhad, J. (2019). Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(0), 1-10.
25. Gill, S.S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
26. Guo, Z., Ge, B., Han, M.L., Tao, W.L., Hu, Y., & Chen, G.K. (2018). Analysis of defense enzyme activities and transcriptome of clubroot-resistant and -susceptible in canola to clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae* during early infection. *Journal of Plant Protection*, 45(2), 290-298.

27. Hasanian, S., Sofalian, O., Zare, N., Tarinejad, A., Davari, M., & Pirzad, A. (2020). Evaluating resistance to Ascochyta blight in some chickpea genotypes and its impact on antioxidant enzymes activities, containing of proline and carbohydrate. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 43(2), 19-33. (In Persian)
28. Hassanzade Ghorttapeh, A., & Motalebizadeh, B. (2013). Effect of bio fertilizers application on the yield and yield components of flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars. *Research in Field Crop Journal*, 1(1), 31-43. (In Persian)
29. He, R., Chang, Y., & Wang, J. (2022). Identification of genes responsible for stress resistance in *Fusarium oxysporum*-inoculated flax seedlings using weighted gene co-expression network analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 1-16.
30. Heidarvand, L., & Maali Amiri, R. (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(3), 419-431.
31. Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu, J.Q., & Chen, Z. (2010). Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153(4), 1526-1538.
32. Irigoyen, J., Einerich, D., & Sanchez-Dias, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa plants. *Physiologia Plantarum*, 84(1), 55-60
33. Javanshir Javid, K., Alizadeh, H.R., & Gholamnezhad, J. (2021). Evaluation of biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* using different isolates of *Trichoderma harzianum* antagonist and activation of defense mechanisms of cucumber plant. *Applied Plant Protection*, 9(2), 75-89. (In Persian)
34. Kanapin, A., Samsonova, A., Rozhmina, T., Bankin, M., Logachev, A., & Samsonova, M. (2020). The genome sequence of five highly pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(9), 1112-1115.
35. Kavak, K., & Boydak. E. (2006). Screening of the resistance levels of 26 sesame breeding lines to Fusarium wilt disease. *Plant Pathology Journal*, 24, 141-146.
36. Knox, J., Jaggi, D., & Paul, M. (2010). Evaluation of allelophatic potential of selected plant species on *Parrhenium hysterophorus*. *Egyptian Journal of Biology*, 12, 57-62.
37. Kostyn, K., Czemplik, M., Kulma, A., Bortniczuk, M., Skała, J., & Szopa, J. (2012). Genes of phenylpropanoid pathway are activated in early response to fusarium attack in flax plants. *Plant Science*, 190, 103-115.
38. Li, J., Feng, L., Yang, C., Wang, Y., He, J., Zhang, B., & Chen, X. (2016). Effects of key enzymes and products in phenylpropanoid pathway of *Lycium* infected by *Fusarium oxysporum*. *Acta Prataculturae Sinica*, 25(5), 87-94.
39. Ma, L.J., Geiser, D.M., Proctor, R.H., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D.M., Manners, J.M., & Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67, 399-416.
40. Madadkhah, E., Lotfi, M., Nabipour, A., Rahmanpour, S., Banihashemi, Z., & Shoorooei, M. (2012). Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1. *Scientia Horticulturae*, 135, 171-176. (In Persian)
41. Madadkhah, E., Nasertorabi, M., Shoorooei, M., Moghbelim E., Lotfi, M., & Banihashemi, Z. (2015). Enzymatic activities and secondary metabolite contents in roots of melon genotypes Infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1. *Journal of Plant Protection*, 28(4), 459-466. (In Persian)
42. Mohammadi, M., & Kazemi, H. (2002). Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science, 162*, 491-498.
43. Morkunas, I., & Ratajczak, L. (2014). The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(7), 1607-1619.
44. Mohammadi, S., Mohtadi, A., & Movahhedi Dehnavi, M. (2018). The effect of different iron concentrations on growth and elements uptake of flax (*Linum usitatissimum* L.) under salinity stress. *Journal of Plant Process and Function*, 8(32), 463-477. (In Persian)
45. Morkunas, I., Narozna, D., Nowak, W., Samardakiewicz, S., & Remlein-Starosta, D. (2011). Cross-talk interactions of sucrose and *Fusarium oxysporum* in the phenylpropanoid pathway and the accumulation and localization of flavonoids in embryo axes of yellow lupine. *Journal of Plant Physiology*, 168(5), 424-433.

46. Nguyen, T.N., Son, S., Jordan, M.C., Levin, D.B., & Ayele, B.T. (2016). Lignin biosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): Its response to waterlogging and association with hormonal levels. *BMC Plant Biology*, 16(1), 1-16.
47. Nicoli, M.C., Elizable, B.E., Poitti, A., & Lerici, C.R. (1991). Effect of sugar and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *Journal of Food Biochemistry*, 15(3), 169-184.
48. Nouri, A., Darvishzadeh, R., & Abdollahi-Mandoulakani, B. (2017). Study of gene expression profiling of phenylalanine ammonia-lyase and thaumatin-like protein in sunflower infected by *Sclerotinia* stem rot disease. *Genetic Engineering and Bio-Safety Journal*, 6(1), 11-23. (In Persian)
49. Ogallo, J.L., & McClure, M.A. (1996). Systemic acquired resistanceand susceptibility to root-knot nematodes in tomato. *Phytopathology*, 86: 498-501.
50. Pareek, A., Gaur, A., Kumar, A., & Lodha, P. (2017). Impacts of root knot nematode infestation on metabolites and antioxidant enzymes in *Abelmoschus esculentus* L. Moench. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 1093-1096.
51. Parida, A.K., & Das, A.B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324-349.
52. Parhizkar-Khajan, F., Irannezhad, H., Amiri, R., Orak, H., & Majidian M. (2012). Effects of different levels of nitrogen, phosphorus and potassium on quantitative and qualitative characteristics of oil flax. *Crop Production*, 5 (1): 37-51. (In Persian)
53. Planchon, A., Durambur, G., Besnier, J.B., Plasson, C., Gugi, B., Bernard, S., Merieau, A., Trouve, J.P., Dubois, C., Laval, K., & Driouich, A. (2021). Effect of a *Bacillus subtilis* strain on flax protection against *Fusarium oxysporum* and its impact on the root and stem cell walls. *Plant, Cell & Environment*, 44(1), 304-322.
54. Ponce de Leon, I., & Montesano, M. (2013). Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3178-3200.
55. Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barcelo, A., Amaya, I., Medina, M.I., Alonso, F.J., de Forchetti, S.M., Tigier, H., & Valpuesta, V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, 122(4), 1119-1128.
56. Raj, S.N., Sarosh, B.R., & Shetty, 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.
57. Rajeswari, P. (2015). Control of *Fusarium oxysporum* causing Fusarium wilt by *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas fluorescens* on *Arachis hypogaea* L. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)*, 6(1), 57-65.
58. Ramalingam, K. (2019). Exploring the disease severity by the interaction of fusarium wilt and root knot nematode in tomato. *International Journal of Fauna and Biological Studies*, 6(3), 1-5.
59. Rasmussen, S., Parsons, A.J, Fraser, K., Xue, H., & Newman, J.A. (2008). Metabolic profiles of *Lilnum perenne* are differentially affected by nitrogen supply, carbohydrate content, and fungal endophyte Infection. *Plant Physiology*, 146: 1440-1453.
60. Rozhmina, T.A., & Loshakova, N.I. (2016). Samples of fiber and oil flax (*Linum usitatissimum* L.)-Sources of effective genes for resistance to *Fusarium* wilt and its dependence on temperature. *Agricultural and Biological*, 51, 310-317.
61. Rozhmina, T.A. (2017). Identification of effective genes for resistance to *Fusarium* wilt in fiber flax varieties. *Agricultural and Biological*, 4, 10-12.
62. Sanchez-Martin, J., & Keller, B. (2019). Contribution of recent technological advances to future resistance breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(3), 713-732.
63. Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1-12.
64. Siddique, S., Matera, C., Radakovic, Z.S., Hasan, M.S., Gutbrod, P., Rozanska, E., & Grundler, F.M. (2014). Parasitic worms stimulate host NADPH oxidases to produce reactive oxygen species that limit plant cell death and promote infection. *Science Signaling*, 7(320), ra33-ra33.
65. Slusarenko, A.J., Fraser, R.S., & Van Loon, L.C. (2000). Mechanisms of resistance to plant diseases. Berlin: *Springer Netherlands*, p.160.

66. Stokes, M.E., Chattopadhyay, A., Wilkins, O., Nambara, E., & Campbell, M.M. (2013). Interplay between sucrose and folate modulates auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 162(3), 1552-1565.
67. Vaisey-Genser, M., & Morris, D.H. (2003). Introduction: History of the cultivation and uses of flaxseed. In: A.D. Muir & N.D. Westcott (Eds), *Flax* (pp. 13-33). CRC Press.
68. Wojtasik, W., Kulma, A., Kostyn, K., & Szopa, J. (2011). The changes in pectin metabolism in flax infected with *Fusarium*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(8), 862-872.
69. Wong, C.K.F., Zulperi, D., Saidi, N.B., & Vadamalai, G. (2021). A consortium of *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma harzianum* for improving growth and induced biochemical changes in Fusarium wilt infected bananas. *Tropical Life Sciences Research*, 32(1), 23-45.
70. Xu, H., Park, N.I., Li, X., Kim, Y.K., Lee, S.Y., & Park, S.U. (2010). Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4- hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis*. *Bioresource Technology*, 101(24), 9715-9722.
71. Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., & Casadevall, A. (2009). The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*, 68, 133-216.
72. Zehra, A., Meena, M., Dubey, M.K., Aamir, M., & Upadhyay, R.S. (2017). Activation of defense response in tomato against Fusarium wilt disease triggered by *Trichoderma harzianum* supplemented with exogenous chemical inducers (SA and MeJA). *Brazilian Journal of Botany*, 40(3), 651-664.
73. Zhang, Y.P., Yang, X.M., Xu, F., Wang, L.H., Su, Y., & Tang, Y. (2020). Changes in the activity of defense enzyme in *Fusarium oxysporum* resistant mutant of lily. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 32(1), 33-37.
74. Zhang, Y., Lubberstedt, T., & Xu, M. (2013). The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(1), 23-35.
75. Zheng, J.L., Yi, K.X., & Xi, J.G. (2019). Several cases of Sisal (H.11648) infection with *Phytophthora nicotianae* changes in important defense enzyme activities. *Plant Fiber Sciences in China*, 41(5), 210-216.
76. Zhou, J., Xu, X.C., Cao, J.J., Yin, L.L., Xia, X.J., & Shi, K. (2018). Heat shock factor HsfA1a is essential for *R* gene-mediated nematode resistance and triggers H_2O_2 production. *Plant Physiology*, 176(3), 2456-2471.