مقاله تحقیقی

بررسی تاثیر برخی عصاره‌های گیاهی در کنترل بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی خیار گلخانه‌ای

سپیده سادات آقازاده نایینی[۱]، مژده ملکی[۲]، جلال غلام نژاد[۳]، مصطفی شیرمردی[۴]

۱، ۲- دانشجوی دکترای تخصصی بیماری شناسی، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی ،دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین– پیشوا، تهران، ایران.

۳، ۴– استادیار، استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، یزد، ایران.

مسئولین مکاتبات: جلال غلام‌نژاد، مژده ملکی، ایمیل: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir; mojdehmaleki@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۶ ۹(۲) ۸۷–۱۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶

چکیده

کاربرد قارچ‌کش‌های شیمیایی علاوه بر آلودگی زیست‌محیطی موجب افزایش و گسترش سویه‌های مقاوم به قارچ‌کش در قارچ‌های بیمارگر گیاهی می‌شود. به حداقل رساندن تاثیرات مخرب قارچ‌های بیمارگر در گیاهان زراعی نیاز به یک روش امید بخش در کنترل آن‌ها دارد. از این رو، فراورده‌های طبیعی از جمله اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی گزینه مناسبی برای کنترل و کاهش بیماری‌های قارچی می‌باشد. در این تحقیق اثر کنترل کنندگی عصاره گیاهان آویشن دنایی، اسطوخدوس، رازیانه، دارچین، میخک و تلخه و سطوح مختلف سولفات روی به‌عنوان یکی از ترکیبات غذایی بر میزان رشد قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* و تغییرات میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز و کاتالاز و همچنین تغییرات میزان بیان ژن این دو آنزیم در شرایط آزمایشگاه و گلخانه در گیاه خیار در همکنش با بیماگر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تمامی عصاره‌های گیاهی و سولفات روی قادر به مهار رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی و همچنین قادر به کاهش شدت بیماری در شرایط گلخانه بودند. نتایج آزمون استفاده از دیسک کاغذی داد که بیشترین میزان بازدارندگی رشد در بین تیمارهای عصاره گیاهی (عصاره الکلی) به ترتیب مربوط به عصاره اسطوخودوس با ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و قطر ۳۲/۹۰ میلی‌متر و کمترین میزان بازدارندگی رشد قارچ مربوط به عصارهٔ تلخه با غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و قطر ۱۰/۱۷میلی‌متر (در مقایسه با شاهد با قطر ۳/۴۵ میلی‌متر) بود. در آزمون اختلاط عصاره‌های گیاهی با محیط کشت، عصارهٔ اتانولی گیاه اسطوخودوس با غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام و با ۸۲/۲۱ و ۸۰/۷۵ درصد و عصارهٔ آویشن دنایی با غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام و ۷۲/۱۸ درصد ممانعت از قارچ بیمارگر نسبت به شاهد به ترتیب موثرترین عصاره‌ها در جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر بودند. تیمار توأم قارچ بیمارگر، سولفات روی و عصارهٔ اسطوخودوس بهترین تیمار در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش بیان آن‌ها بود. با توجه به نتایج تحقیق حاضر این چنین نتیجه‌گیری می‌شود که عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق به خصوص گیاه اسطوخودوس و همچنین سولفات روی تاثیر قابل توجهی در کنترل و کاهش شدت بیماری ناشی از *R. solani* در خیار داشتند و بهترین غلظت بدست آمده در این تحقیق می‌تواند به صورت تجاری فرموله شده و برای اهداف مدیریت تلفیقی بکار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: خیار، *Rhizoctonia solani*، سولفات روی، عصاره‌های گیاهی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

مقدمه

قارچ *Rhizoctonia solani* یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای قارچی درگیاهان می‌باشد که که موجب پوسیدگی ریشه و ساقه در گیاهان می‌شود که اصلی‌ترین عامل محدود کنندهٔ تولید در گیاهان زراعی، باغی و زینتی می‌باشد (Khaledi *et al.*, 2015). این بیمارگر به بیشتر سبزی‌ها، گل‌ها، بعضی از

گیاهان زراعی، انواع چمن‌ها، گیاهان زینتی چند ساله، درختچه‌ها و درختان خسارت وارد می‌کند و از نظر اقتصادی یکی از مهم‌ترین بیماری ریشه‌ای خیار محسوب می‌گردد (Agrios, 2005). مطالعات، نشان داده است که این بیماری منجر به کاهش تولید در محصولات مختلف می‌گردد؛ از جملهٔ آن می‌توان به، کاهش ۵۰٪ محصول در خیار (Kiewnick *et al*., 2001)، کاهش ۷۰٪ در کاهو (Davis *et al*., 1997) و کاهش حدود ۲۰٪ در تولید سیب‌زمینی (Grosch *et al*., 2005)، در دنیا، اشاره نمود. طیف میزبانی وسیع و توانایی تحمل شرایط محیطی مختلف و همچنین کمبود ارقام مقاوم نسبت به این بیمارگر (Babadoost & Islam, 2003)، کنترل این بیماری را تا حدی محدود کرده است از این رو یافتن راهکارهای کنترلی موثر بسیار حائز اهمیت است.

رایج‌ترین شیوه برای کنترل بیماری‌های قارچی کاربرد ترکیبات شیمیایی قارچ‌کش می‌باشد، ولی کارآیی و اثربخشی قارچ‌کش‌های شیمیایی با مشکل بروز مقاومت در قارچ‌های بیمارگر به دلیل کاربرد نامناسب یا بیش از حد آنها همراه است.کاربرد گسترده قارچ‌کش‌های شیمیایی منجر به افزایش فراوانی مقاومت قارچ‌های بیمارگر گیاهی شده و تلاش برای کنترل مقاومت قارچ‌ها از طریق افزایش غلظت قارچ‌کش‌ها و افزایش دفعات سمپاشی موجب افزایش هزینه‌های حفظ نباتات وگسترش جمعیت مقاوم بیمارگر به سموم قارچ‌کش می‌شود. علاوه بر مشکلات ذکر شده، کاربرد بی‌رویه قارچ‌کش‌های شیمیایی موجب آلودگی محیط زیست واکوسیستم‌های آبی و خشکی و تاثیرات مخرب مختلف روی جوامع میکروبی، حشرات، مهره‌داران و همچنین آلودگی مواد غذایی می‌شود (Shcherbakova *et al*., 2020). از این رو یافتن روش‌های کنترلی جایگزین برای این بیماری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. روغن‌ها و عصاره‌های گیاهی ترکیبات مایع و فرار هستند که از بخش‌های مختلف گیاه از قبیل پوست، گل، میوه، برگ‌ها و ریشه استخراج می‌شوند و حاوی مخلوطی از ترپن‌ها، ترپنوئیدها و مشتقات آنها هستند. این ترکیبات خاصیت ضدقارچی و ضدمیکروبی قوی علیه سویه‌های مقاوم و حساس می‌باشند. عصاره‌ها و روغن‌های اساسی از طریق تحت تاثیر قرار دادن متابولیسم سلولی، تخریب سلول و نشت ترکیبات سلولی و همچنین ایجاد مرگ و میر سلولی موجب اختلال در یکپارچگی ساختاری غشای سلولی بیمارگرها می‌شوند (Rufa *et al*., 2018). به نظر می‌رسد که مکانیسم تاثیرات ضد قارچی عصاره‌های گیاهی شامل نفوذ آنها از طریق دیواره سلولی و ایجاد آسیب مستقیم به غشای سیتوپلاسمی و میتوکندریایی از طریق تغییر در نفوذپذیری غشا و نشت ترکیبات سلولی و نهایتاً مرگ و میر سلولی می‌باشد (Omar & Kordali, 2019). مطالعه روی ساز وکارهای کنترل بیماری توسط عصاره‌ها یا فرآورده‌های گیاهی نشان داده است که اجزای فعال بیولوژیکی موجود در آن‌ها ممکن است تأثیر مستقیم ضدمیکروبی (Ansari, 1995) یا به عنوان محرک با تحریک واکنش‌های دفاعی گیاهان باعث جلوگیری از توسعه بیماری شوند (Schneider & Ullrich, 1994). به نظر می‌رسد که ساز و کار اثر عصاره‌های گیاهی، علاوه برتاثیر قارچ‌کشی مستقیم، القای سازوکارهای دفاعی گیاه نیز می‌باشد، بدین معنی که وقوع بیماری را از طریق مقاومت موضعی کاهش می‌دهند (Daayf *et al*., 2000). مهم‌ترین بخش دفاع موثر گیاه در برابر بیمارگرها، القای سریع ژن‌های دفاعی گیاه است. یک گروه عمده از ژن‌های دفاعی ژن‌های رمزکنندهٔ پروتئین‌های مرتبط به بیماری‌زایی (PR– proteins) هستند. القای بیان ژن‌های دفاعی در سطح اول در سطح رونویسی (mRMA) و در سطح دوم به‌صورت تنظیم الگوهای بیانی ژن‌ها، با استفاده از عناصر تنظیمی، رخ می‌دهد. ژن‌های دفاعی مهم‌ترین قسمت از دفاع گیاهی به شمار می‌روند (Massah, 2015). هدف از این تحقیق، بررسی اثر عصاره‌های گیاهی و تیمارهای به کار گرفته شده در این تحقیق، بر کاهش رشد قارچ در محیط آزمایشگاه و همچنین شرایط گلخانه‌ای می‌باشد. در بخش دیگری از این تحقیق تأثیر عصاره‌های گیاهی و تیمارهای دیگر بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین بیان ژن‌های درگیر در فعالیت دفاعی، گیاه خیار آلوده به بیمارگر *R. solani* بررسی شد. هدف غایی از این تحقیق رسیدن به عصارهٔ گیاهی و

همچنین غلظت مناسب برای کنترل این بیماری است. در این تحقیق اثر کنترل کنندگی عصارهٔ گیاهان آویشن دنایی، اسطوخدوس، رازیانه، دارچین، میخک و تلخه و سطوح مختلف سولفات روی به عنوان یکی از ترکیبات غذایی بر میزان رشد قارچ بیمارگر *R. solani* و تغییرات میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز و کاتالاز و همچنین تغییرات میزان بیان ژن این دو آنزیم در شرایط آزمایشگاه و گلخانه در گیاه خیار در همکنش با بیمارگر بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از گلخانه‌های خیار آلوده در شهرستان ورامین استان تهران انجام شد. ریشه‌های آلودهٔ گیاه (تیره رنگ و پوسیده) و قطعاتی از حاشیهٔ بین بافت آلوده و سالم ناحیهٔ طوقه توسط اسکالپل سترون جدا شدند. جدایه‌های قارچی با استفاده از کلید پارمتر (Parmeter) شناسایی شدند (Parmeter, 1970). آزمون اثبات بیماری‌زایی طبق اصول کخ انجام گرفت. به منظور ازدیاد قارچ برای آزمون‌های گلخانه‌ای از بذر گندم استفاده شد. ابتدا بذرهای گندم سترون شدند و در ظروف پتری سترون توزیع و در هر ظرف پتری پنج دیسک میسلیومی از کشت یک هفته‌ای جدایهٔ قارچی قرار گرفت. سپس پتری‌ها به انکوباتور با دمای ۲۴ درجهٔ سلسیوس منتقل شدند و به مدت ۲۰ روز در نگهداری شدند تا میسلیوم قارچ تمام بذرهای پتری را در برگیرد. بذور ضدعفونی شدهٔ خیار رقم ناگین در گلدان‌های سترون یک کیلویی با قطر دهانهٔ ۱۵ سانتی‌متر حاوی خاک سترون (شامل خاک، ماسه، کود برگ (۱:۱:۲) و مقداری پیت ماس و پرلیت) کشت شدند.

تهیهٔ عصاره‌های گیاهی

در این تحقیق از گیاهان آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak)، اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* Mill)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، دارچین (*Cinnamomum verum*)، میخک (*Syzygium aromaticum*) و تلخه (*Acroptilon repens*) استفاده شد. آویشن دنایی، اسطوخودوس و رازیانه از مراتع استان یزد جمع‌آوری شدند. دارچین و میخک از منابع معتبر (زیر نظر گیاهشناس) تهیه شدند. در مورد آویشن دنایی، اسطوخودوس و از کل اندام‌های هوایی گیاه، رازیانه (بذر) و در مورد دارچین از پوست درخت و در مورد میخک از گل گیاه استفاده شد. عصاره‌گیری با استفاده از حلال اتانولی انجام گرفت. پنج گرم از مادهٔ خشک گیاهی در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد خیسانده شد و بعد از ۲۴ ساعت مادهٔ گیاهی همراه اتانول در هاون چینی ساییده شد. و پس از عبور از صافی در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، ۷۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به یک استوانهٔ مدرج منتقل شد و ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به آن اضافه شد تا حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسد، سپس هم حجم آن با آن هگزان اضافه شد. مخلوط حاصل دو ساعت روی شیکر قرار داده شد و بخش‌های مختلف به کمک دکانتور جدا و بخش متانولی جهت تبخیر متانول و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد (Bahraminejad *et al.*, 2008). عصاره‌ها در چهار غلظت ۵۰۰ پی پی ام، ۱۰۰۰ پی پی ام، ۱۵۰۰ پی پی ام و ۲۵۰۰ پی پی ام در آب مقطر تهیه شدند و محیط کشت پس از اتوکلاو شدن در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای ۴۵–۴۰ درجهٔ سلسیوس، محلول یکنواخت عصاره به آن اضافه شد. قطر میسلیوم‌های قارچ تا زمان اشغال سطح محیط کشت در تشتک‌های پتری شاهد در ساعات معین مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Yanar *et al.*, 2011). درصد بازدارندگی تاثیر عصاره بر رشد میسلیوم‌های قارچ با استفاده از رابطه ی زیر محاسبه شد (Anil Sehajpal *et al.*, 2009; Dissanayake & Kumari 2012).

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{قطر رشد میسلیوم در تشتک پتری شاهد} - \text{قطر رشد میسلیوم در تشتک پتری میسلیوم}}{\text{قطر رشد میسلیوم در تشتک پتری شاهد}} \times ۱۰۰$$

تاثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی

درصد بازدارندگی عصاره روی رشد میسلیوم های قارچ با استفاده از روش دیسک کاغذی

مقدار صفر (شاهد)، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم از هر عصاره پودر شده (مادهٔ جامد که در زیر هود به‌دست‌آمده بود) در یک‌میلی‌لیتر حلال خنثی دی متیل سولفوکسید حل شد و مورد استفاده قرار گرفت (**Meliss *et al.*, 2005**). سپس ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه (طی پنج مرحله، هربار ۱۰ میکرولیتر) با استفاده از سمپلر روی دیسک‌های کاغذ صافی به قطر شش میلی‌متر بارگذاری شدند و در فضای آزمایشگاه قرار داده شدند تا حلال تبخیر شود. برای بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌های گیاهی از حاشیهٔ کلنی هفت روزهٔ قارچ بیمارگر (ایزولهٔ R_1) روی محیط PDA، قرص‌هایی به قطر شش میلی‌متر توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن تهیه و در وسط تشتک پتری حاوی محیط PDA قرار داده شد. در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس در انکوباتور، قطر کلنی قارچ بیمارگر بعد از ۲۴ ساعت به حدود ۱۵ میلی‌متر رسید. پس از این مرحله دیسک‌های حاوی عصاره‌ها در فاصلهٔ ۲۰میلی‌متری حاشیهٔ روییده قارچ قرار داده شدند، سپس در فواصل زمانی مختلف، شعاع هالهٔ بازدارندگی با استفاده از خط‌کش از روبرو یادداشت برداری شد و میانگین آن در محاسبات لحاظ شد. در این آزمایش، از حلال موردنظر به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. این آزمایش با ۱۹ تیمار (شش نوع عصارهٔ گیاهی در سه غلظت ۱۵۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و تیمار شاهد (گیاهان خیار تلقیح شده با آب مقطر سترون)، در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد، در این آزمایش و همهٔ آزمایشات تشتک پتری دیگر فقط از یک ایزولهٔ بیمارگر R_1 استفاده شد (Hadian *et al.*, 2011)

تاثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت

در هر ظرف پتری که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA بود، عصارهٔ گیاهان مذکور در غلظت‌های ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام (در حلال متانولی) به محیط کشت اضافه شد. پلاکی از حاشیه کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در مرکز ظروف پتری قرار داده شد و تا روز پنجم قطر میسلیومی آن اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل در شرایط سترون و در سه تکرارصورت گرفت و همه آزمایش‌ها دو بار انجام شد (Gholamnezhad *et al.*, 2017). درصد بازدارندگی رشد میسلیومی هر تیمار از فرمول زیر (۱) محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی رشد قارچ} = \frac{A-B}{A}$$

A: قطر کلنی در شاهد

B: قطر کلنی در تیمار

تاثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر در شرایط گلخانه‌ای

در هر گلدان مخلوط خاک مزرعه و ماسه به نسبت ۲ به ۱ بکار رفت. پنج عدد بذر آلوده گندم به ***R. solani*** در سطح خاک گلدان قرار گرفته و روی آن با لایهٔ نازکی از خاک پوشانده شد. سپس بذرهای خیار رقم ناگین (رقم مقاوم) به تعداد چهار عدد در هر گلدان قرار گرفته و با لایه‌ای از خاک پوشانده شدند. عصارهٔ گیاهان در غلظت‌های مختلف به هر گلدان اضافه گشت. در گلدان‌های شاهد سالم از مایهٔ تلقیح قارچ استفاده نشد. شاهد آلوده دارای تیمار قارچ و فاقد تیمارعصاره بود. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمون فاکتوریل و چهار تکرار برای هر تیمار انجام شد. پس از گذشت سه هفته از کشت گیاهان، علایم بیماری و فاکتورهای رشدی مورد ارزیابی قرارگرفتند. فاکتورهای طول ریشه، طول اندام هوایی، وزن تر ریشه، وزن تر اندام هوایی و و قطر لکه‌ها اندازه‌گیری شدند.

آزمون عصاره‌های گیاهی و تیمار خیار بر میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی در بوتهٔ خیار

در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل پراکسیداز، کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی دیگری مانند فنیل‌آلانین آمونیالیاز و β (۱و۳) گلوکاناز مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور

بررسی تغییرات آنزیم‌های مذکور از بوته‌های خیار کشت شده انجام شد. تمام مراحل دیگر این آزمایش مانند مایه‌زنی با عصاره‌های گیاهی و مایه‌زنی قارچ، همانند آزمایشات مربوط به گلخانه انجام شد. در این بخش از تحقیق از عصارهٔ گیاه اسطوخودوس استفاده شد. این عصاره در آزمایشات مربوط به آزمایشگاه و گلخانه از خود نتیجهٔ خوبی نشان داده بود. این آزمون به‌صورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور **A** با شش سطح شامل غلظت‌های مختلف عصارهٔ گیاهی مانند شاهد سالم، شاهد آلوده، و همان غلظت‌هایی که در گلخانه استفاده شد، انجام گرفت. و فاکتور **B** با شش سطح شامل ساعات نمونه‌برداری ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بعد از آلودگی با بیمارگر و اثرات متقابل این دو فاکتور بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. میزان تغییرات آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در روزهای ۳، ۶، ۸، ۱۲و۱۶ به‌صورت مجزا بررسی شد. نمونه‌برداری توسط اسکالپل قطعاتی به وزن یک گرم از محل لکه‌ها و چاهک از روی میوه برداشته شد (Ippolito *et al*., 2000).

ارزیابی میزان پروتئین کل قابل حل در عصاره (روش برادفورد)

برای محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد آزمون و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در بافت؛ میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌ها به روش برادفورد تعیین شد (Bradford, 1976). این روش بر مبنای اتصال رنگ کوماسی بریلیانت‌بلو موجود در معرف برادفورد به مولکول پروتئین استوار است.

استخراج پروتئین از بافت گیاه (روش ریونی و همکاران)

به ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاه خیار که از محل مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر جدا شده بود، در یک ویال دو میلی‌لیتری، یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با ۶ **pH=** اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و توسط میکروسانتریفوژ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شد. مایع رویی برای انجام آزمایش‌های بعدی جدا و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شد (Reuveni, 1995). از این عصارهٔ استخراج شده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل‌اکسیداز استفاده شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش ارائه شده توسط گنگ و همکاران (Gong *et al*., 2001) اقتباس شده از دو و برام‌لاگ (Du & Bramlage, 1995) ارزیابی شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش ارائه شده توسط ریونی و همکاران (۱۹۹۵) با استفاده از گوئیکول (Guaiacol) انجام گرفت. مقدار فعالیت آنزیم برحسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (ΔOD /Min./mg. protein) Reuveni, 1995).

ارزیابی میزان فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز

فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز بر اساس روش ارائه شده به وسیلهٔ چونها و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام شد. فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات جذب نور در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Shi *et al*., 2001) (ΔOD /Min./mg. protein)

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز PAL

فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز بر اساس روش ارائه شده به وسیلهٔ وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد. یک واحد از فعالیت آنزیم PAL معادل یک میکرومول از اسیدسینامیک تولید شده در یک دقیقه است (Wang *et al*., 2009).

انتخاب و تکثیر ژن‌ها

طراحی آغازگر برای تکثیر ژن‌های منتخب توسط نرم افزار Oligo5 صورت گرفت. در این تحقیق بیان ژن آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز وکاتالاز مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی این ژن‌ها از بانک اطلاعاتی (NCBI) به دست آمد و آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر این ژن‌ها طراحی شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA

نمونه‌های گیاهی فریزر شده در دمای۷۰- درجهٔ سلسیوس، در داخل هاون حاوی نیتروژن مایع کوبیده شدند. استخراج RNA کل توسط کیت RNXplus مطابق دستورالعمل موجود انجام گرفت. ساخت رشتهٔ cDNA از روی mRNA تام سلول با استفاده از کیت RevertAid Reverse Transcriptase انجام شد. بررسی الگوی بیان ژن‌های منتخب با روش Real time RT–PCR بررسی شدند. پس از یکسان‌سازی غلظت RNAهای مختلف، واکنش ساخت cDNA بر طبق دستورالعمل کیت YTA SYBR Green qPCR Master Mix (2x) انجام شد. الگوی بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Corbett RG–6000) و به روش Real time PCR بررسی شد. برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها در طی نقاط زمانی از روش Livak استفاده گرفت (Livak & and Schmittgen, 2001). میزان بیان ژن‌های دفاعی منتخب بر اساس ژن خانه دار با بیان ثابت نرمال شد، سپس میزان تغییرات بیان ژن در همهٔ تیمارها نسبت به شاهد سنجیده شد. نتایج به دست آمده از Real time RT –PCR با استفاده از آزمون چند دامنهٔ دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

کلیهٔ آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تجزیهٔ واریانس در سطح یک درصد و مقایسه میانگین به روش دانکن برای همهٔ آزمون‌ها استفاده شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن ها

Table 1. Sequence of primers used for gene amplification

	Genes name		Primers seq.	Size
1	Peroxidase	F	AATCAGACCGTCTCCTGCG	170
		R	GGTGGTGTCGTTGTTGAAC	
2	Chitinase	F	5 AGATACTATGGCAGAGGACC 3	113
		R	5 GTCGCAACTAAATCAGGG 3	
3	PAL	F	ACGGGTTGCCATCTAATCTG	197
		R	AGCTCTTTTCCTGGCTGAAA	
4	Glucanase	F	5 GAACATCAAGTACATCGCCG 3	180
		R	5 GCTACACGTACTAGAACTGG 3	
5	Lipoxigenase	F	CCTGAAATCTATGGCCCTCA	227
		R	ATGGGCTTAAGTGTGCCAAC	
6	Catalase	F	35GCGACCAAGGATCTTTACGA	200
		R	5 CAACACCAATCGACCAACTG 3	
7	House (E f1α) keeping gene	F	5 GACAGGCGTTCAGGTAAGG 3	128
		R	5 CCCAATGGAGGGTATTCAG 3	

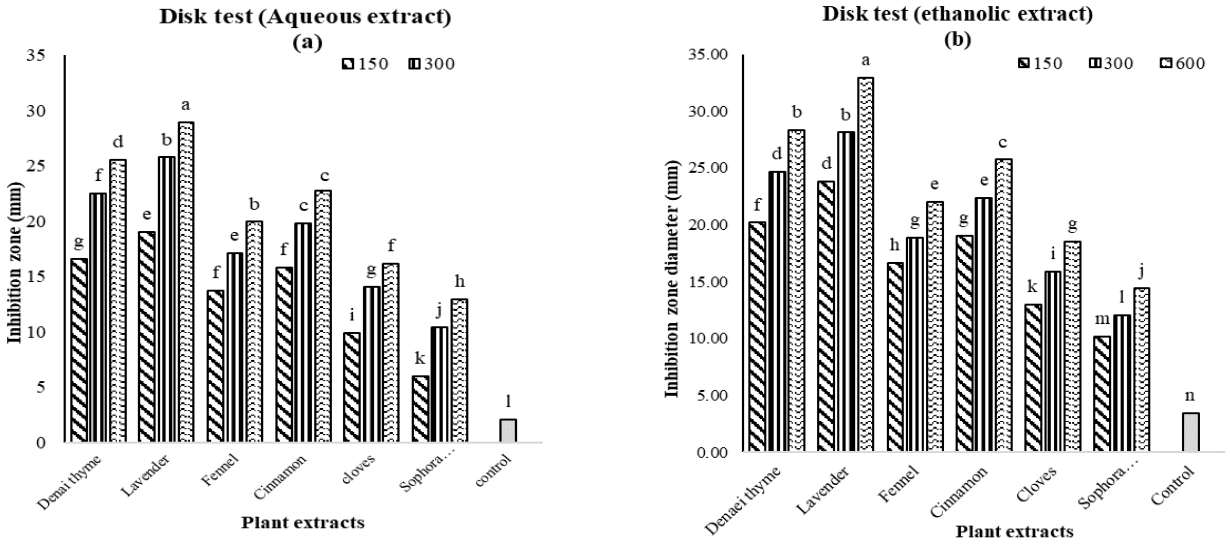
نتایج

درصد بازدارندگی تاثیر عصاره بر رشد میسلیوم‌های قارچ با استفاده از روش دیسک کاغذی

نتایج جدول تجزیهٔ واریانس نشان داد که بین عصاره‌های مورد بررسی در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی، و غلظت‌های مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر *R. solani* (R1) به روش آزمون دیسک کاغذی اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

نتایج نشان داد که بیشترین میزان بازدارندگی رشد در بین تیمارهای عصارهٔ گیاهی (عصارهٔ الکلی) مربوط به

عصارهٔ اسطوخودوس با ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۳۲/۹۰ میلی‌متر) و کمترین میزان بازدارندگی رشد قارچ مربوط به عصارهٔ تلخه با ۱۵۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر (۱۰/۱۷میلی‌متر) بود. کمترین میزان بازدارندگی رشد قارچ در بین کل تیمارها مربوط به تیمار شاهد بود (۳/۴۵ میلی‌متر) (شکل ۱– b). همچنین بیشترین میزان بازدارندگی رشد قارچ در بین عصاره‌های آبی مربوط به عصارهٔ اسطوخودوس با ۵۰۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر (۲۸/۹۳ میلی‌متر) و کمترین میزان بازدارندگی رشد قارچ مربوط به عصارهٔ تلخه با ۱۵۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر (۱۲/۹۳ میلی‌متر) بود. کمترین میزان بازدارندگی رشد قارچ در بین کل تیمارها مربوط به تیمار شاهد بود (۲/۱۳ میلی‌متر) (شکل ۱– a).



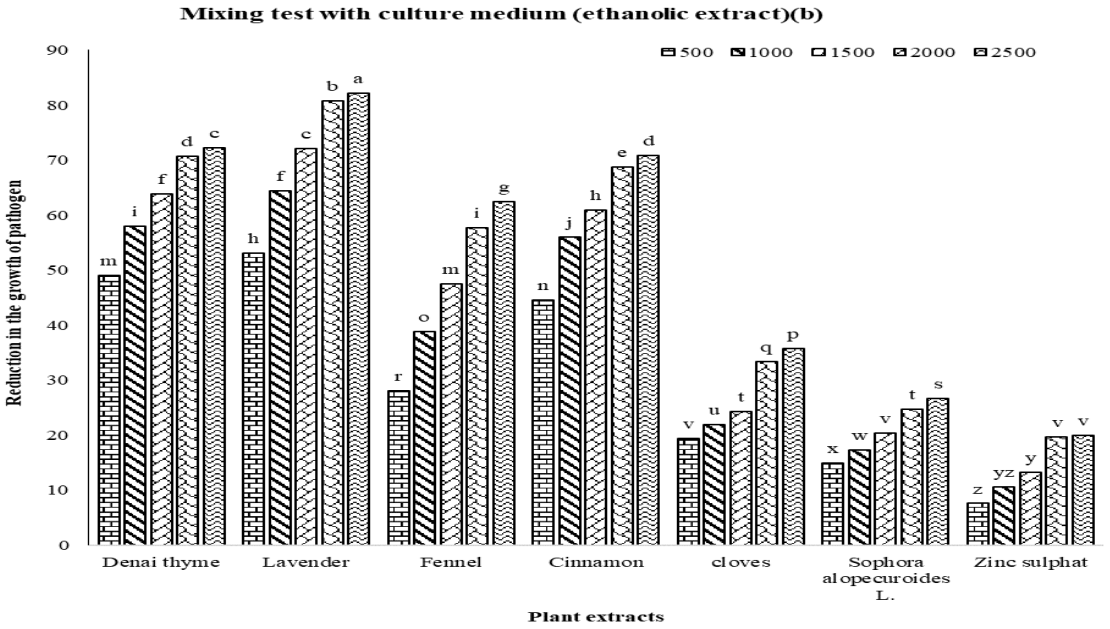
شکل ۱– تأثیر عصارهٔ آبی (a) و اتانولی (b) آویشن دنایی، اسطوخودوس، رازیانه، دارچین، میخک و تلخه بر میزان ممانعت از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر *R. solani* (R1) به‌صورت قطر ناحیهٔ بازدارندگی (میلی‌متر) به روش استفاده از دیسک کاغذی؛ اعداد میانگین چهار تکرار است. تیمارها با حروف مشابه به احتمال ۹۹ درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig. 1. Inhibitory effect of aqueous (a) and ethanolic (b) extract of thyme, lavender, fennel, cinnamon, clove and acroptilon on mycelium growth of *R. solani* (R1) using agar well diffusion method. Data are mean value of 4 replications. Treatments with similar letters have no significant difference at 99% probablity level.

تأثیر عصاره‌های گیاهی و تیمار سولفات روی بر رشد قارچ *R. solani* (R1) با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت

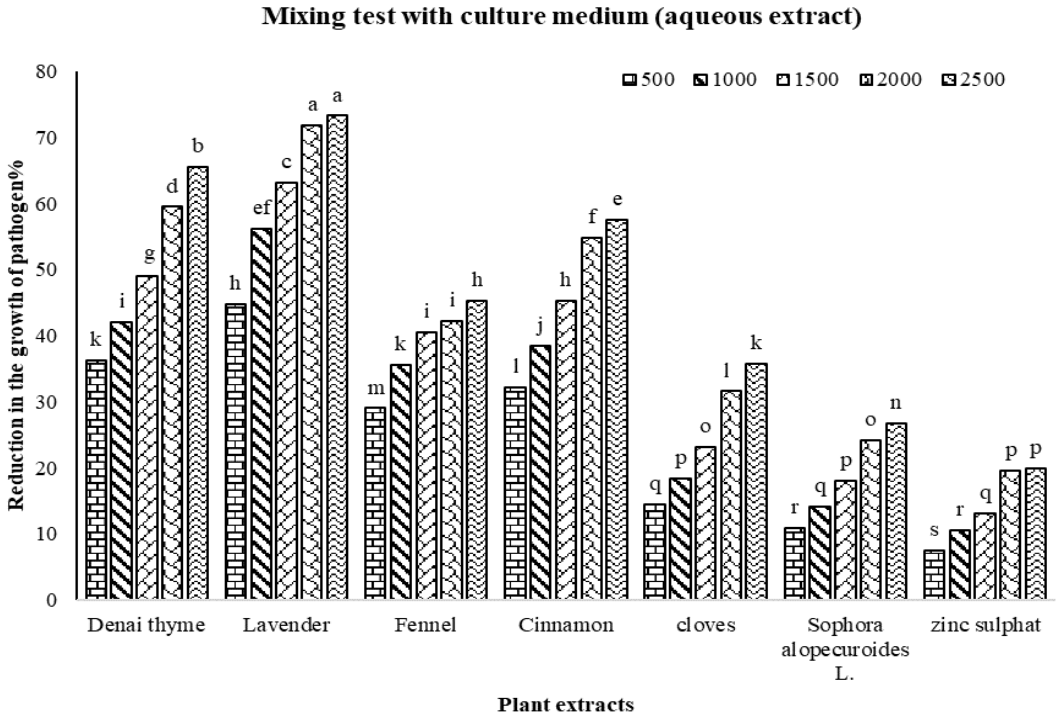
نتایج نشان داد که بین تیمارهای مورد بررسی، در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و اتانولی و غلظت‌های مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر کاهش میزان رشد هالهٔ قارچ، به روش آزمون اختلاط با محیط کشت در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در این آزمون، عصارهٔ آبی گیاه اسطوخودوس با غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام با ۷۳/۳۱ و ۷۱/۹۳ درصد ممانعت از قارچ *R. soani* (R1) نسبت به شاهد به ترتیب بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر نسبت به شاهد، در بین عصاره‌های گیاهی مربوط به غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام گیاه تلخه با ۱۰/۹۵ درصد ممانعت از رشد نسبت به شاهد بود. در مورد عصاره‌های اتانولی، روند دقیقاً مانند عصاره‌های آبی بود. عصارهٔ اتانولی گیاه اسطوخودوس با غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام و با ۸۲/۲۱ و ۸۰/۷۵ درصد و عصارهٔ آویشن دنایی با غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام و ۷۲/۱۸ درصد ممانعت از قارچ بیمارگر نسبت به شاهد به‌ترتیب موثرترین عصاره‌ها در جلوگیری از رشد قارچ *R. soani* (R1) بودند. کمترین درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر نسبت به شاهد، مربوط به غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام رازیانه بود که با ۱۰/۹۵ درصد ممانعت از رشد

نسبت به شاهد بود. سولفات روی نسبت به شاهد توانست در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰و ۲۵۰۰ پی پی ام به ترتیب به میزان ۷/۵۷، ۱۰/۶۴، ۱۳/۱۹، ۱۹/۶۳ و ۱۹/۹۴ درصد از رشد قارچ جلوگیری کند (شکل ۲ و ۳).



شکل ۲–تاثیر عصارهٔ اتانلی آویشن دنایی، اسطوخودوس، رازیانه، دارچین، میخک، تلخه و سولفات روی بر میزان ممانعت از رشد میسلیومی قارچ *R. solani* (R1) به روش اختلاط عصاره با محیط کشت؛ اعداد میانگین چهار تکرار است. تیمارها با حروف مشابه به احتمال ۹۹ درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig. 2. Inhibitory effect of ethanolic extract of thyme, lavender, fennel, cinnamon, clove, acroptilon and zinc–sulfate on mycelium growth of *R. solani* using mixing method. Data are mean value of 4 replications. Treatments with similar letters have no significant difference at 99%probablity level.

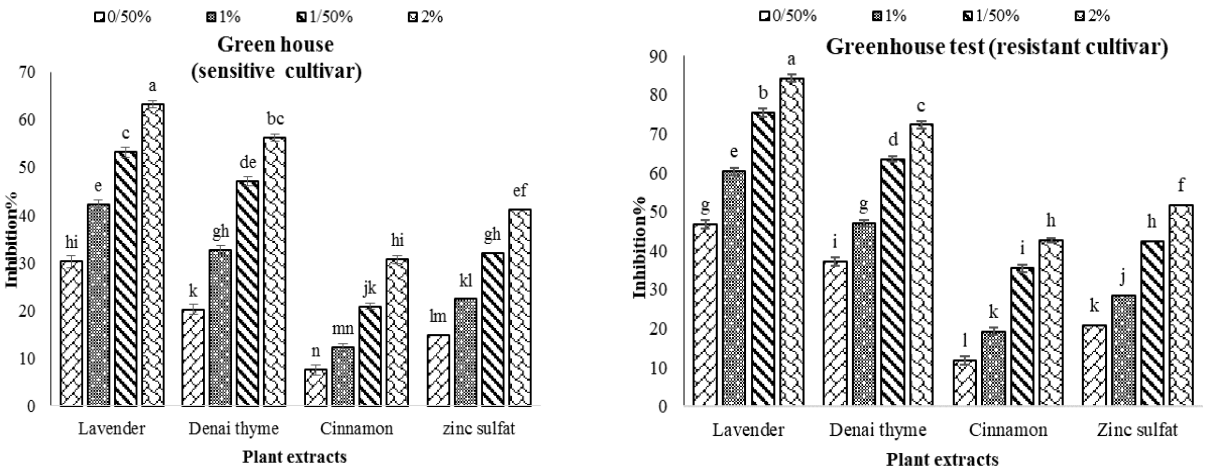


شکل ۳– تاثیر عصارهٔ آبی آویشن دنایی، اسطوخودوس، رازیانه، دارچین، میخک، تلخه و سولفات روی بر میزان ممانعت از رشد میسلیومی قارچ *R. solan*i (R1) به روش اختلاط عصاره با محیط کشت؛ اعداد میانگین چهار تکرار است. تیمارها با حروف مشابه به احتمال ۹۹ درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig. 3. Inhibitory effect of aqueous extract of thyme, lavender, fennel, cinnamon, clove, acroptilon and zinc–sulfate on mycelium growth of *R. solani* (R1) using mixing method. Data are mean value of 4 replications. Treatments with similar letters have no significant difference at 99%probablity level.

تأثیر عصاره‌های اسطوخودوس، آویشن دنایی و دارچین در کاهش شدت بیماری زایی قارچ *R.solani* (R1) در شرایط گلخانه‌ای بر روی بوتهٔ خیار

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد بین عصاره‌های مورد بررسی و غلظت‌های مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر میزان کاهش شدت بیماری‌زایی نسبت به شاهد، که به‌صورت مایه‌زنی بوته‌های خیار (ارقام حساس (ناگین) و مقاوم (گالاردو) در گلخانه استفاده شد، اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در مورد رقم حساس، عصارهٔ آبی اسطوخودوس با غلظت دو درصد به میزان ۶۳/۱۴ درصد در مقایسه با شاهد بیشترین کنترل کنندگی بر بیماری (کاهش بیماری‌زایی) را در گلخانه از خود نشان داد. همچنین عصارهٔ آبی دارچین در غلظت یک و نیم درصد به میزان ۷/۵۶ درصد کمترین تاثیر کنترل کنندگی شدت بیماری را نسبت به شاهد در گلخانه داشت (شکل ۴– راست). در مورد رقم مقاوم میانگین بازدارندگی از بیماری (شدت بیماری‌زایی) در مورد این رقم، در مقایسه با رقم حساس بیشتر بود. میزان کاهش شدت بیماری‌زایی در مورد رقم مقاوم ۴۹/۱۲ و در مورد رقم حساس ۳۰/۱۹ درصد بود و درصد کنترل‌کنندگی عصاره‌ها در درصدهای مشابه با عصاره‌های آبی دارای میانگین بالاتری بودند، به‌طوری‌که بیشترین میزان کنترل‌کنندگی شدت بیماری‌زایی در مورد رقم مقاوم گالاردو تیمار شده با عصارهٔ اسطوخودوس با غلظت‌های دو و یک و نیم درصد به ترتیب ۸۴/۲۳ و ۷۵/۴۴ درصد مشاهده شد. کمترین درصد کنترل کنندگی هم در بین تیمارها مربوط به تیمار نیم درصد عصارهٔ دارچین با درصد کنترل‌کنندگی ۱۱/۸۴ بود (شکل ۴– چپ).

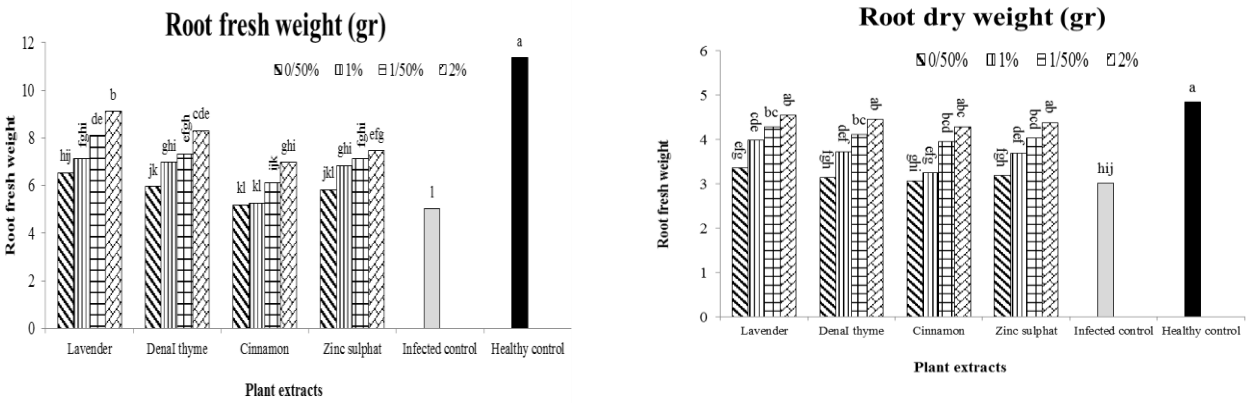


شکل۴– تأثیر عصاره‌های آبی بر رقم حساس (راست) و مقاوم (چپ) اسطوخودوس، آویشن دنایی، دارچین و سولفات روی بر کاهش شدت بیماری‌زایی قارچ بیمارگر *R. solani* (R1) (سانتی‌متر مربع) ؛ اعداد میانگین چهار تکرار است. عصاره‌های مختلف در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد در آب مقطر استفاده شدند.

Fig. 4. Effect of aqueous extract of lavender, thyme, cinnamon, and zinc–sulfate on disease index (DI) Caused by *R. solani*. Data are mean value of 4 replications. various extracts were applied in concentrations of 0.5%, %1, 1.5% and 2% dissolved in distilled water.

وزن تر و وزن خشک ریشه

نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان داد وزن تر ریشهٔ شاهد آلوده به قارچ بیمارگر در مقایسه با شاهد سالم (تلقیح نشده با بیمارگر) به طور معنی‌داری کاهش یافت و کمترین وزن تر ریشه، به میزان ۵/۰۲ گرم، مربوط به تیمار شاهد آلوده بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت. بیشترین میزان وزن تر ریشه مربوط به تیمار شاهد سالم (۱۱/۳۶گرم) بود. در بین تیمارها عصارهٔ گیاهی، بیشترین وزن تر ریشه نسبت به تیمار شاهد مربوط به عصارهٔ اسطوخودوس با غلظت ۲ درصد (۹/۱۰ گرم) بود و کمترین میزان وزن تر ریشه مربوط به عصارهٔ دارچین با غلظت نیم درصد بود که با تیمار شاهد آلوده اختلاف معنی‌داری نداشت. در گیاهان تیمار شده با سولفات روی تمام تیمارها، به جز تیمار ۰/۵ درصد، نسبت به شاهد آلوده افزایش معنی‌دار وزن تر ریشه نشان دادند (شکل ۵–چپ). در مورد وزن خشک ریشه، نتایج نشان داد بالاترین مقدار وزن خشک ریشه مربوط به تیمار شاهد سالم به میزان ۴/۸۵ بود. کمترین وزن خشک ریشه مربوط به شاهد آلوده به میزان ۳/۰۲ گرم بود که با تیمارهای غلظت سولفات روی، غلظت ۰/۵ درصد عصاره‌های دارچین و آویشن‌دنایی به ترتیب با مقادیر ۳/۶۰ و ۳/۱۴ گرم دارای اختلاف معنی‌دار نبود. در مورد تیمار عصارهٔ دارچین با افزایش غلظت عصاره، وزن خشک ریشه افزایش یافت. بین غلظت‌های ۱/۵ و ۲ درصد اختلاف معنی‌دار وجود نداشت و از طرفی بین غلظت‌های ۰/۵ و یک درصد نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. در بین تیمارهای عصاره‌های گیاهی، بیشترین میزان وزن خشک ریشه با ۴/۵۵ گرم مربوط به عصارهٔ اسطوخودوس با غلظت دو درصد و کمترین میزان وزن خشک ریشه مربوط به عصارهٔ دارچین با ۳/۰۶ گرم در غلظت نیم درصد بود. در تیمار سولفات روی با افزایش غلظت از ۰/۵ تا دو درصد افزایش وزن خشک ریشه از ۳/۱۹ الی ۴/۳۸ گرم مشاهده شد (شکل ۵– راست).

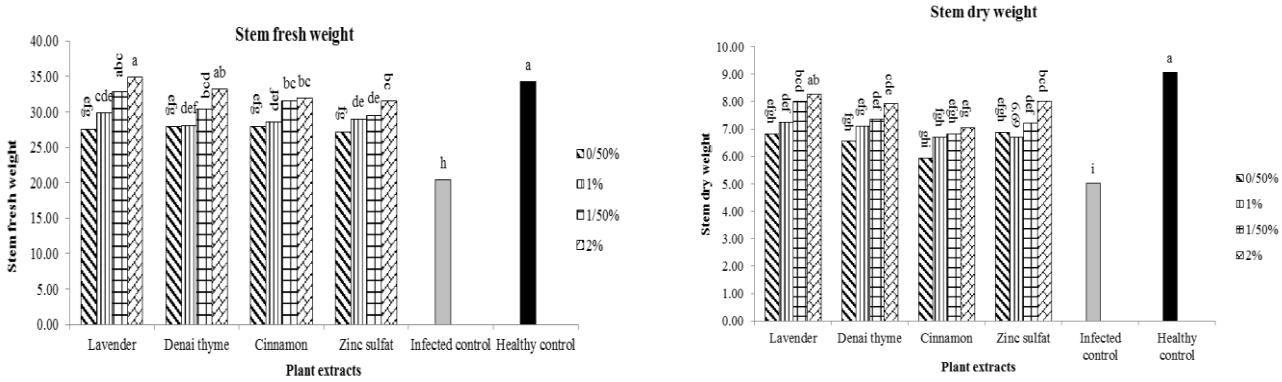


شکل۵– مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی اسطوخودوس، آویشن‌دنایی، دارچین و ترکیب سولفات روی بر وزن تر (چپ) و وزن خشک ریشه خیار (راست) در شرایط گلخانه. هر عدد میانگین سه تکرار است. میانگین‌هایی که با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف، مشخص شده اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($p \leq ۰/۰۱$) ارائه شده اند.

Fig. 5. Mean comparisons of various concentrations of aqueous extract of lavender, thyme, cinnamon, and zinc–sulfate on cucumber root fresh weight (left) and dry weight (right) under greenhouse conditions. Data are mean value of 3 replications. Means with significant difference marked with different letters, comparisons were done with dunkan test at $p \leq 0.01$

وزن تر ساقه و وزن خشک اندام هوایی

نتایج مقایسه میانگین تیمارهای شاهد سالم و شاهد آلوده مربوط به وزن تر ساقه خیار نشان داد بین این دو تیمار اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طوری که بیشترین میزان وزن تر ساقه مربوط به تیمار شاهد سالم و کمترین میزان آن مربوط به تیمار شاهد آلوده بود. در بین تیمارهای عصاره‌های گیاهی بیشترین وزن تر ساقه مربوط به عصارهٔ اسطوخودوس با ۳۴/۸۸ گرم در غلظت دو درصد بود و کمترین میزان وزن تر ساقه مربوط به عصارهٔ دارچین با ۲۷/۹۲ گرم در غلظت نیم درصد بود. همچنین کمترین میزان وزن تر اندام هوایی مربوط به تیمار سولفات روی به میزان ۲۷/۲۱ گرم با غلظت نیم درصد بود که این تیمار نیز با تیمار شاهدآلوده دارای اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۶– چپ). در مورد وزن خشک اندام هوایی نتایج نشان داد بالاترین مقدار وزن خشک ساقه مربوط به شاهد سالم به میزان ۹/۰۶ بود که این مقدار با سایر مقادیر وزن خشک ساقه، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بود. کمترین میزان وزن خشک ساقه مربوط به تیمار شاهد آلوده با ۵/۰۲ گرم بود. بعد از تیمار شاهد سالم، بیشترین میزان وزن خشک اندام هوایی از تیمارهای غلظت ۲ و ۱/۵ درصد اسطوخودوس و تیمار استفاده از غلظت دو درصد سولفات روی به ترتیب با مقادیر ۸/۲۶، ۸/۰۲ و ۸ گرم بدست آمد. در مورد عصاره‌های آبی آویشن‌دنایی و دارچین با افزایش غلظت عصاره، میزان وزن خشک افزایش می‌یافت، به طوری که بیشترین میزان وزن خشک در مورد هر دو عصاره در غلظت دو درصد، به ترتیب با مقادیر ۷/۹۲ و ۷/۰۵ گرم، مورد مشاهده قرار گرفت (شکل۶– راست).



شکل۶– مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی اسطوخودوس، آویشن‌دنایی، دارچین و ترکیب سولفات روی بر وزن تر ساقه (چپ) و وزن خشک اندام هوایی خیار(راست) در شرایط گلخانه. هر عدد میانگین سه تکرار است. میانگین‌هایی که با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف، مشخص شده اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($p \leq$ ۰/۰۱) ارائه شده اند.

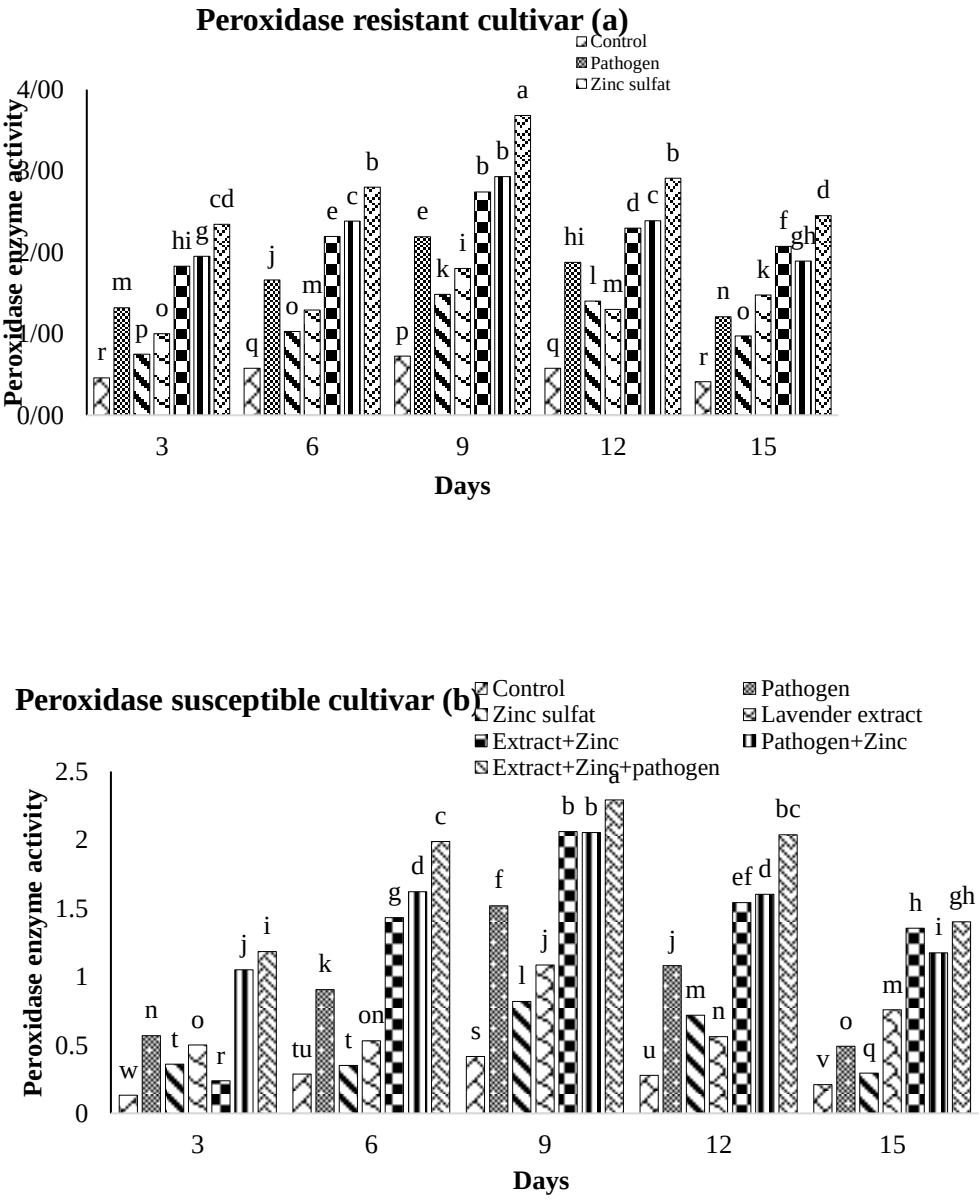
Fig. 6. Mean comparisons of various concentrations of aqueous extract of lavender, thyme, cinnamon, and zinc–sulfate on cucumber shoot fresh weight (left) and shoot dry weight (right) under greenhouse conditions. Data are mean value of 3 replications. Means with significant difference marked with different letters, comparisons were done with Duncan test at $p \leq 0.01$

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در خیار رقم مقاوم و حساس

نتایج نشان داد بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به تیمار گیاه خیار تیمار شده با عصارهٔ اسطوخودوس، عامل بیمارگر و سولفات روی در هر دو رقم مقاوم و حساس بوده که در نهمین روز بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر این میزان فعالیت به ترتیب با مقادیرعددی ΔOD/Min/mg protein ۳/۶۸ و ۲/۲۹ (برای رقم مقاوم و حساس) مشاهده شد. روند فعالیت این آنزیم، در مورد هر دو رقم مقاوم و حساس، تا روز نهم افزایشی و سپس کاهشی بود. همهٔ تیمارهای به کار گرفته شده در این مطالعه قادر به افزایش فعالیت این آنزیم هستند، اما مهم‌تر از آن این آنزیم تحت تأثیر روزهای نمونه‌برداری نیز می‌باشد (شکل ۷ a & b–).

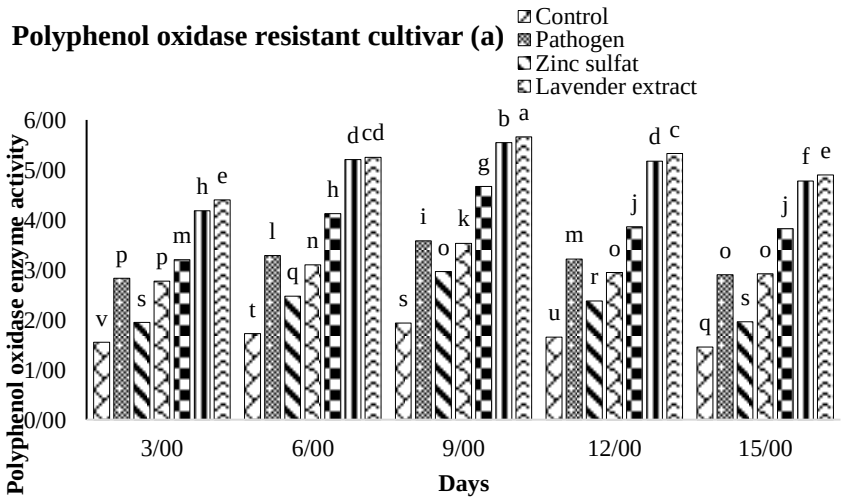
بررسی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در خیار رقم مقاوم و حساس

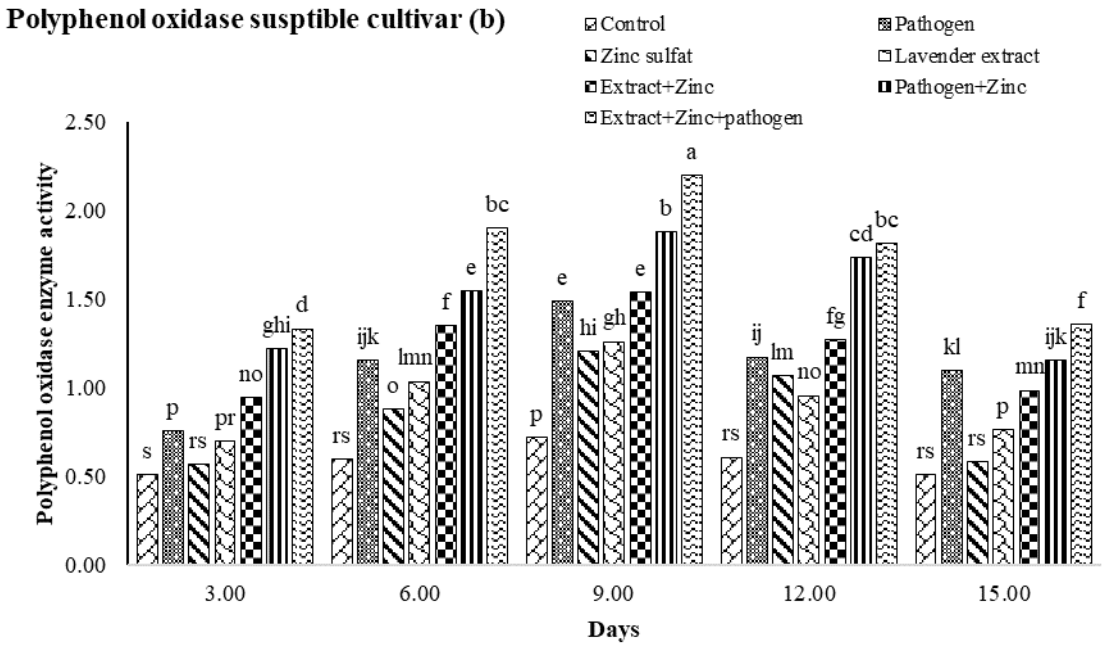
نتایج نشان داد بیشترین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز مربوط به تیمار گیاه خیار تیمار شده با عصارهٔ اسطوخودوس، عامل بیمارگر و سولفات روی در هر دو رقم مقاوم و حساس بوده که در نهمین روز بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر این میزان فعالیت به ترتیب با مقادیرعددی ΔOD/Min/mg protein ۵/۳۳ و ۲/۱۱ (برای رقم مقاوم و حساس) مشاهده شد. روند فعالیت این آنزیم، در مورد هر دو رقم مقاوم و حساس، از روز نهم کاهشی شد به این صورت که در روز پانزدهم بعد از آلوده سازی گیاه خیار با قارچ بیمارگر، میزان فعالیت این آنزیم در تیمار کاربرد توأم عصاره، بیمارگر و سولفات روی به کمترین میزان خود در بین روزهای نمونه‌برداری (به جز روز سوم بعد از نمونه‌برداری) با مقادیر ΔOD/Min/mg protein ۴/۷۷ و ۱/۳۶، به ترتیب برای ارقام مقاوم و حساس رسید. تیمار کاربرد توأم عصاره، بیمارگر و سولفات روی، همواره در تمام روزهای نمونه‌برداری (به جز روز ششم برای رقم مقاوم و روز دوازدهم برای رقم حساس) نسبت به همهٔ تیمارهای دیگر دارای اختلاف معنی‌دار از نظر سطح فعالیت آنزیم بود. روند کلی میزان فعالیت این آنزیم افزایش تا روز نهم و سپس کاهش، در مورد هر دو رقم حساس و مقاوم، می‌باشد. به عبارت دیگر همهٔ تیمارها قادر به افزایش فعالیت این آنزیم هستند، اما مهم‌تر از آن، این آنزیم تحت تأثیر روزهای نمونه‌برداری نیز می‌باشد (شکل ۸– a & b).



شکل ۷– مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز رقم مقاوم (a) و رقم حساس (b) در تیمارهای مختلف (بیمارگر، عصارهٔ اسطوخودوس، سولفات روی و کاربرد توآم این سه عامل) و روزهای مختلف نمونه‌برداری، در گیاه خیار، اعداد (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)، اعداد میانگین چهار تکرار هستند، حروف مختلف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنهٔ دانکن در سطح ۹۹ درصد هستند.

Fig. 7. Mean comparisons of Peroxidase activity in resistant (a) and sensitive (b) cultivars of cucumber after treating with pathogen, lavender extract, zinc–sulfate, and combined using of pathogen, lavender extract, zinc–sulfate on cucumber. Data are mean value of 4 replications. Means with significant difference marked with different letters, comparisons were done with Duncan test at $p \leq 0.01$





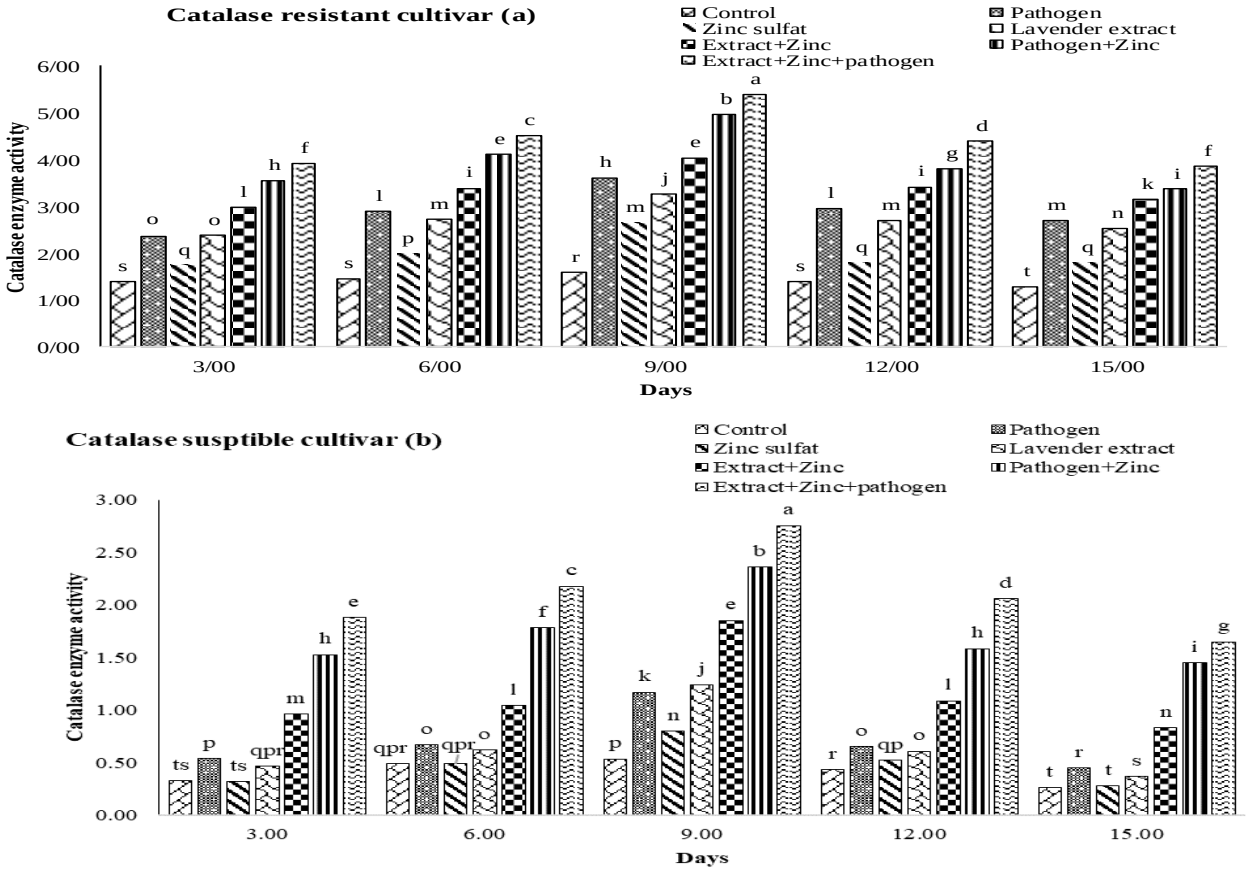
شکل۸– مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در رقم مقاوم (a) و حساس (b) در تیمارهای مختلف (بیمارگر، عصارهٔ اسطوخودوس، سولفات روی و کاربرد توآم این سه عامل) و روزهای مختلف نمونه‌برداری، در گیاه خیار، اعداد (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)، اعداد میانگین چهار تکرار هستند، حروف مختلف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنهٔ دانکن در سطح ۹۹ درصد هستند.

Fig. 8. Mean comparisons of PPO activity in resistant (a) and sensitive (b) cultivars of cucumber after treating with pathogen, lavender extract, zinc–sulfate, and combined using of pathogen, lavender extract, zinc–sulfate on cucumber. Data are mean value of 4 replications. Means with significant difference marked with different letters, comparisons were done with Duncan test at $p \leq 0.01$

بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز درخیار رقم مقاوم و حساس

نتایج نشان داد که هر یک از تیمارهای عصارهٔ اسطوخودوس، بیمارگر و سولفات روی به تنهایی قادر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دورقم حساس و مقاوم هستند. در بین تیمارهای مختلف مورد مطالعه، تیمار استفادهٔ توأمان بیمارگر، سولفات روی و عصارهٔ اسطوخودوس بیشترین تاثیر را در افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تمام روزهای نمونه‌برداری، در هر دو رقم داشتند.

بین میزان فعالیت آنزیم در روزهای نمونه‌برداری از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود داشت و بیشترین فعالیت آنزیم در نهمین روز پس از مایه زنی، در مورد همهٔ تیمارها در هر دو رقم مورد مشاهده قرار گرفت. تیمار استفادهٔ توأمان بیمارگر، سولفات روی و عصارهٔ اسطوخودوس، بیشترین میزان فعالیت آنزیم را در مورد هر دو رقم مقاوم و حساس در نهمین روز نمونه‌برداری به ترتیب برای رقم حساس و مقام با مقادیر ΔOD/Min/mg protein ۵/۳۸ و ۲/۷۶ از خود نشان داد(شکل ۹– a & b).



شکل ۹– مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم مقاوم (a)) و حساس (b) در تیمارهای مختلف (بیمارگر، عصارهٔ اسطوخودوس، سولفات روی و کاربرد توآم این سه عامل) و روزهای مختلف نمونه‌برداری، در گیاه خیار، اعداد (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)، اعداد میانگین چهار تکرار هستند، حروف مختلف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنهٔ دانکن در سطح ۹۹ درصد هستند.

Fig 9. Mean comparisons of CAT activity in resistant (a) and sensitive (b) cultivars of cucumber after treating with pathogen, lavender extract, zinc–sulfate, and combined using of pathogen, lavender extract, zinc–sulfate on cucumber. Data are mean value of 4 replications. Means with significant difference marked with different letters, comparisons were done with Duncan test at $p \leq 0.01$

بررسی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در خیار رقم مقاوم و حساس

نتایج نشان داد بیمارگر، سولفات روی و عصارهٔ اسطوخودوس هر کدام به تنهایی قادر به افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز هستند، اما بین این تیمارها، و همچنین اثرات متقابل آن‌ها، نیز از نظر افزایش فعالیت آنزیم، تفاوت معنی‌دار وجود دارد. در بررسی اثر زمان بر فعالیت آنزیم مشخص شد که بین روزهای نمونه‌برداری از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود داشت و بیشترین فعالیت آنزیم در نهمین روز پس از مایه‌زنی ثبت شد. بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز مربوط به گیاهان خیار تیمار شده با سه عامل بیمارگر، سولفات روی و عصارهٔ اسطوخودوس مورد مشاهده قرار گرفت که در نهمین روز بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر این میزان فعالیت با مقادیر عددی ۱۲/۶۰ ΔOD/ min/ mg protein و ۵/۴۷ به ترتیب برای ارقام مقاوم و حساس مشاهده شد. تیمار استفادهٔ توأمان عصارهٔ اسطوخودوس، سولفات روی و بیمارگر همواره بیشترین مقدار فعالیت آنزیم را در کلیهٔ روزهای نمونه‌برداری از خود نشان داد و نسبت به همهٔ تیمارهای دیگر دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد، در مورد هر دو رقم حساس و مقاوم، بود. در کلیهٔ روزهای نمونه‌برداری، فعالیت آنزیم در تیمار بیمارگر تنها به صورت معنی‌داری بیشتر از شاهد و همچنین تیمار استفاده از اسطوخودوس (به غیر از روز ششم در مورد رقم مقاوم) و سولفات روی، بود(شکل ۱۰– a & b).

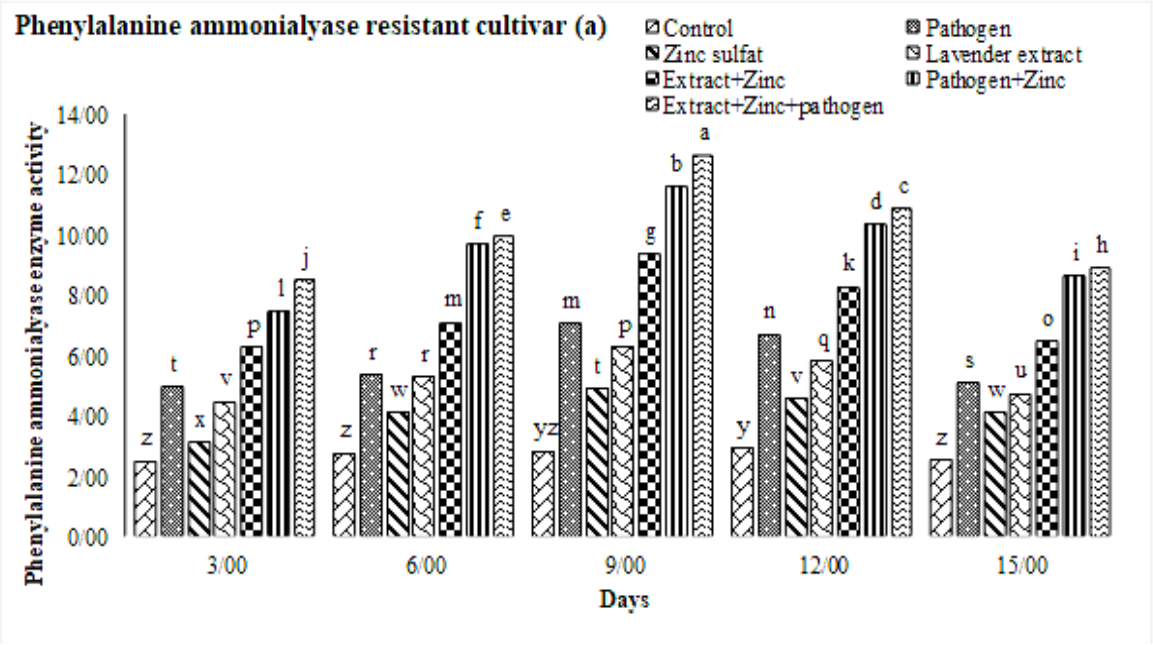
بررسی بیان ژن‌ها

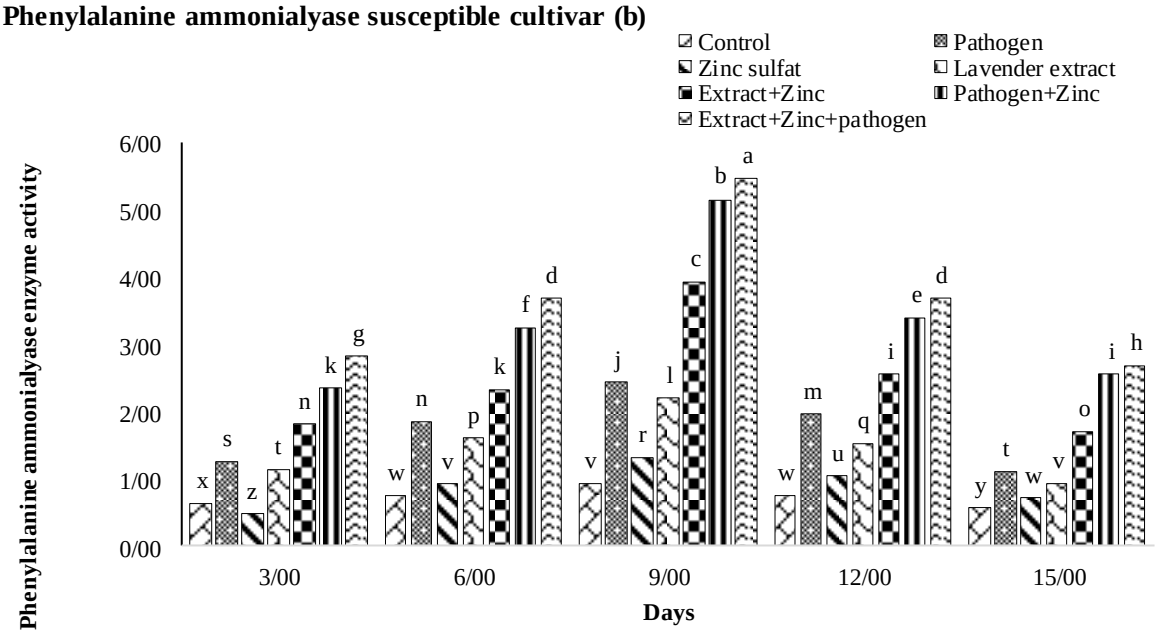
بررسی میزان بیان کمی ژن بتا (۱ و ۳) گلوکاناز

نتایج نشان داد میزان بیان ژن رمزکنندهٔ بتا (۱ و ۳) – گلوکاناز در تمام تیمارها و در تمام روزها نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود. میزان بیان این ژن تا روز نهم پس از مایه‌زنی با بیمارگر افزایش یافت و بعد از آن دوباره سیر نزولی پیدا کرد. میزان بیان ژن در تیمار توأم قارچ بیمارگر، سولفات روی و عصارهٔ اسطوخودوس در تمام روزهای نمونه‌برداری بیشتر از سایر تیمارها بود و این اختلاف معنی‌دار بود، به طوری که بیشترین میزان بیان ژن در این تیمار در روز نهم نمونه‌برداری، به میزان ۱۷۷/۲۹ برابر میزان بیان همین ژن در گیاه شاهد سالم، مورد مشاهده قرار گرفت. این موضوع نشان دهندهٔ اثر سینرژیست (هم‌افزایی) به‌کار بردن عصارهٔ گیاهی و بیمارگر و همچنین سولفات روی در القای سیستم‌های دفاعی میزبان علیه بیمارگر می‌باشد. همچنین نتایج اختلاف معنی‌دار میزان بیان ژن در تیمار بیمارگر تنها با تیمار عصارهٔ‌گیاهی و همچنین سولفات روی در تمام روزهای نمونه‌برداری، به جز روز اول، را نشان داد به‌صورتی که بیمارگر بیش از هر دو عامل (عصارهٔ اسطوخودوس و سولفات روی) باعث القای میزان بیان ژن گلوکاناز شده است و این اختلاف به‌صورت معنی‌دار مورد مشاهده قرار گرفت (شکل ۱۱– چپ).

بررسی میزان بیان کمی ژن کیتیناز

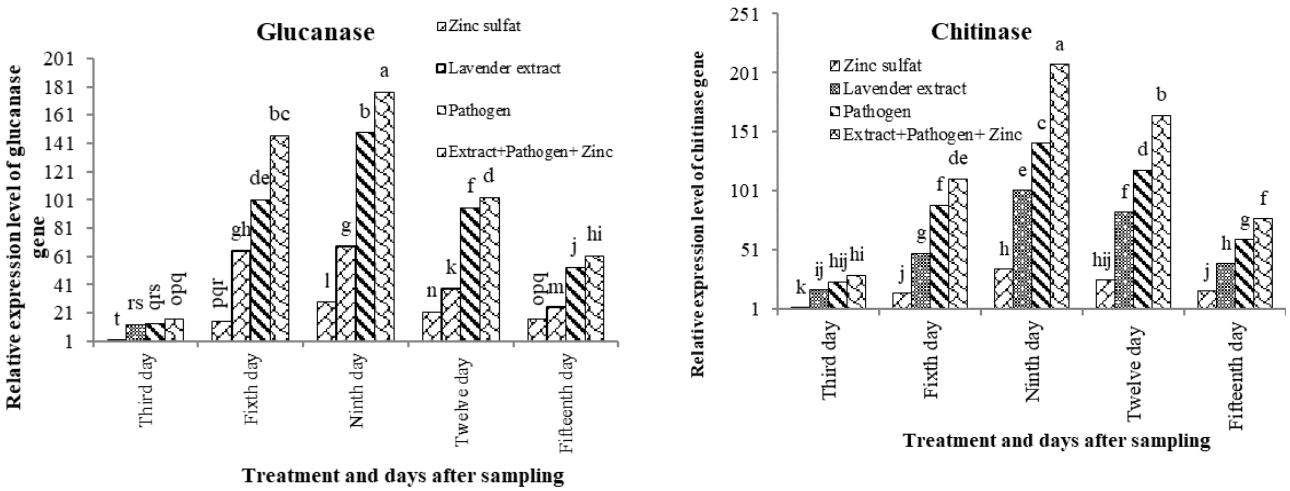
نتایج نشان داد میزان بیان ژن رمز کنندهٔ کیتیناز تا روز نهم نمونه‌برداری در هر چهار تیمار بیمارگر تنها، سولفات روی و عصارهٔ اسطوخودوس هر یک به تنهایی، و تیمار بیمارگر، سولفات‌روی و عصارهٔ اسطوخودوس در رقم مقاوم متین نسبت به تیمار شاهد سالم روند افزایشی داشت. و بعد از این روز تا روز پانزدهم دارای سیر نزولی بود و تقریباً در مورد میزان بیان این ژن، روند مشابهی با میان بیان ژن آنزیم β (۱،۳) گلوکاناز مورد مشاهده قرار گرفت. بیشترین میزان بیان ژن همواره در کلیهٔ روزهای نمونه‌برداری مر بوط به تیمار استفادهٔ توأم قارچ بیمارگر، سولفات‌روی و عصارهٔ گیاه اسطوخودوس بر روی گیاه خیار بود و با بقیهٔ تیمارها در تمام روزها (به جز روز اول نمونه‌برداری) دارای اختلاف معنی‌دار بود و بیشترین مقدار آن در روز نهم با میزان عددی ۲۰۷/۹۳ برابر میزان بیان ژن در شاهد سالم، مورد مشاهده قرار گرفت (شکل ۱۱– راست).





شکل ۱۰– مقایسه میانگین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در رقم مقاوم (a) و حساس (b) در تیمارهای مختلف (بیمارگر، عصارهٔ اسطوخودوس، سولفات روی و کاربرد توآم این سه عامل) و روزهای مختلف نمونه‌برداری، در گیاه خیار، اعداد (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)، اعداد میانگین چهار تکرار هستند، حروف مختلف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنهٔ دانکن در سطح ۹۹ درصد هستند.

Fig. 10. Mean comparisons of PAL activity in resistant (a) and sensitive (b) cultivars of cucumber after treating with pathogen, lavender extract, zinc–sulfate, and combined using of pathogen, lavender extract, zinc–sulfate on cucumber. Data are mean value of 4 replications. Means with significant difference marked with different letters, comparisons were done with Duncan test at $p \leq 0.01$



شکل ۱۱– الگوی بیان ژن رمزکنندۀ آنزیم بتا (۱و۳) گلوکاناز (چپ) و کیتیناز (راست) در رقم مقاوم تحت تیمارهای مختلف در نقاط زمانی متفاوت.

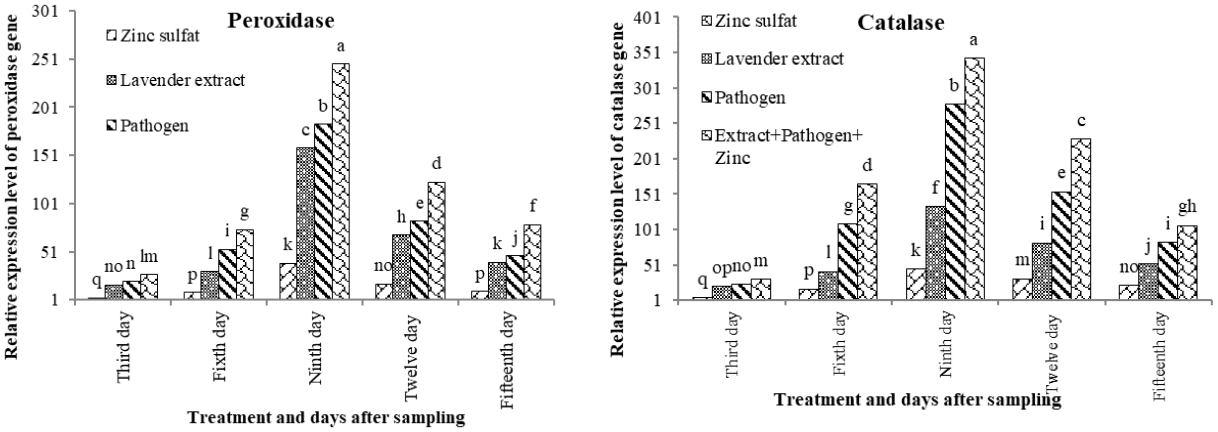
Fig. 11. Expression pattern of gene encoding 1–3β glucanase (left) and chitinase (right) in resistant cultivar under various treatments at different times.

بررسی میزان بیان کمی ژن آنزیم کاتالاز

نتایج نشان داد میزان بیان ژن رمزکنندۀ آنزیم کاتالاز در طول پانزده روز نمونه‌برداری، تا روز نهم افزایش در همۀ تیمارها نشان داد. روند افزایش و کاهشی میزان بیان ژن این آنزیم هم مانند دو آنزیم کیتیناز و بتا۱–۳گلوکاناز بود. بیشترین میزان بیان ژن آنزیم در تمام روزهای نمونه‌برداری مربوط به تیمار ترکیب عصارۀ اسطوخودوس، سولفات روی با بیمارگر بود و میزان این افزایش همواره در تمام روزهای نمونه‌برداری دارای اختلاف معنی‌دار با بقیۀ تیمارها بود. بیشترین میزان بیان ژن کاتالاز در تیمار استفاده توأم سه عامل در روز نهم به میزان ۳۴۲/۵۰ برابر میزان بیان این ژن در گیاه شاهد سالم بود(شکل ۱۲–راست).

بررسی میزان بیان کمی ژن پراکسیداز

نتایج نشان داد میزان بیان ژن رمزکنندۀ آنزیم پراکسیداز مانند میزان بیان ژن‌های کاتالاز، کیتیناز و بتا ۱–۳ گلوکاناز بود. بیشترین میزان بیان ژن پراکسیداز را تیمار کاربرد توأم بیمارگر، سولفات‌روی و عصارۀ اسطوخودوس نشان داد و این تیمار همواره با بقیۀ تیمارها، در تمامی روزهای نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری داشت. بیشترین مقدار در این تیمار، مانند بقیۀ تیمارها در روز نهم نمونه‌برداری، به میزان ۲۴۵/۵۷ برابر میزان بیان این ژن در گیاه شاهد سالم، مورد مشاهده قرار گرفت. بیشترین میزان بیان ژن پراکسیداز مربوط به تیمار کاربرد توأم بیمارگر در روز نهم به میزان نسبی ۱۸۳/۵۴ برابر میزان بیان این ژن در گیاه شاهد سالم در همین روز بود، در حالیکه میزان بیان ژن پراکسیداز در تیمارهای عصاره و سولفات‌روی به ترتیب به مقادیر ۱۵۸/۶۷ و ۳۸/۹۶ برابر بیان این ژن در گیاه سالم در همین روز بود. به صورت کلی نیز کمترین میزان بیان ژن هم مربوط به تیمار کاربرد سولفات‌روی در روز سوم به میزان نسبی ۳/۳۵ برابر میزان بیان این ژن در گیاه سالم در همین روز بود (شکل۱۲–چپ).



شکل۱۲– الگوی بیان ژن رمزکنندۀ آنزیم کاتالاز(راست)و پراکسیداز(چپ) در رقم مقاوم تحت تیمارهای مختلف در نقاط زمانی متفاوت.

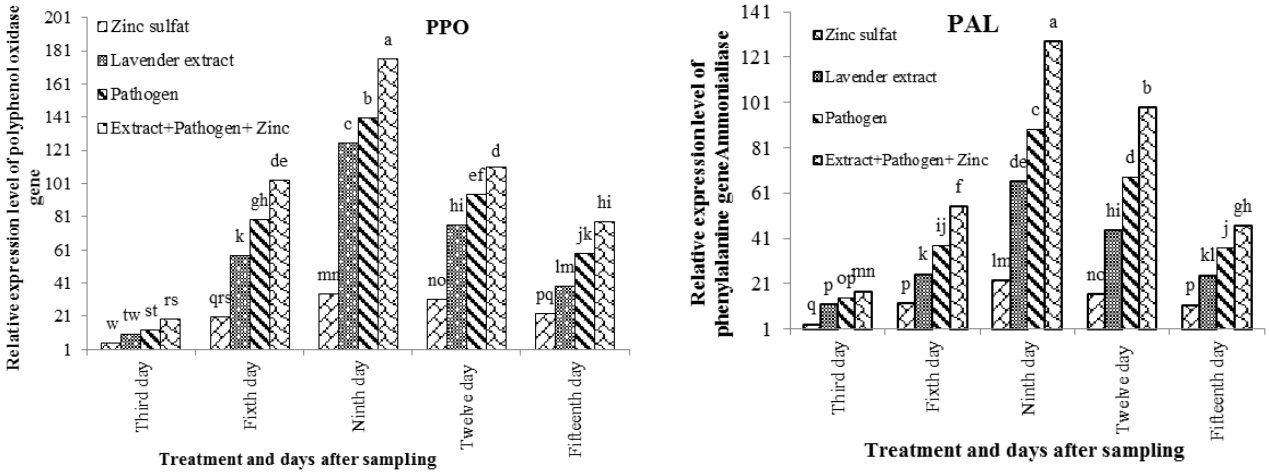
Fig12. Expression pattern of gene encoding Peroxidase (left) and Catalase (right) in resistant cultivar under various treatments at different times.

بررسی میزان بیان کمی ژن فنیل آلانین آمونیالیاز

نتایج نشان داد میزان بیان ژن فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز تا روز نهم در همۀ تیمارها افزایش یافت و سپس تا روز پانزدهم دارای روند کاهشی بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار استفادۀ توأم بیمارگر، عصاره و سولفات روی مورد مشاهده قرار گرفت و در تمام روزهای نمونه‌برداری این تیمار با بقیۀ تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود. بعد از تیمار استفادۀ توأم بیمارگر، سولفات روی و عصاره تیمار کاربرد بیمارگر به تنهایی بیشترین القا را در بیان این ژن به وجود آورد و در رتبۀ بعدی، به ترتیب دو تیمار کابرد عصاره و سولفات روی هر یک به تنهایی قرار داشتند. در مورد این آنزیم نیز عصاره و سولفات روی به میزان کمتری توانست که ژن این آنزیم را القا کند. کاربرد توأمان قارچ بیمارگر، سولفات روی و عصارۀ گیاهی بیشترین تأثیر را بر روی میزان بیان این ژن داشت، و در روز نهم با میزان عددی ۱۲۸ برابر میزان بیان این ژن در گیاه سالم (شاهد) در همان روز، به بیشترین مقدار خود، در این روز، و همچنین در بین کلیۀ روزهای نمونه‌برداری رسید(شکل۱۳– راست).

بررسی میزان بیان کمی ژن پلی فنل اکسیداز

نتایج نشان داد بیشترین میزان بیان ژن پراکسیداز را تیمار کاربرد توأم بیمارگر، سولفات‌روی و عصارۀ اسطوخودوس بود و این تیمار همواره با بقیۀ تیمارها، در تمامی روزهای نمونه‌برداری (به جز روز اول) اختلاف معنی‌داری داشت. بیشترین مقدار در این تیمار، در روز نهم نمونه‌برداری، به میزان ۱۷۶/۰۶ برابر میزان بیان این ژن در گیاه شاهد سالم، مشاهده شد. بعد از این تیمار، تیمار کاربرد بیمارگر تنها قرار داشت، در رتبۀ سوم تیمار کاربرد عصارۀ اسطوخودوس تنها و بعد از آن هم تیمار سولفات‌روی قرار داشت. بیمارگر در روز نهم بیشترین میزان القا این ژن را موجب شد و میزان بیان در این روز ۱۴۶/۵۵ برابر میزان بیان این ژن در گیاه سالم، مشاهده شد. در مورد این آنزیم هم القا به‌وسیلۀ عصاره و سولفات روی به تنهایی صورت گرفت، و مانند بقیۀ تیمارها مقدار آن در روزنهم به بیشترین مقدار خود، با میزان عددی ۳۴/۶۱ و ۱۲۵/۵۳ برابر بیان این ژن در گیاه سالم، رسید. به صورت کلی کمترین میزان بیان ژن مربوط به تیمار کاربرد سولفات‌روی در روز سوم به میزان نسبی ۴/۵۹ برابر میزان بیان این ژن در گیاه سالم در همین روز بود (شکل۱۳–چپ).



شکل۱۳– الگوی بیان ژن رمزکنندۀ آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز(راست) و آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز(چپ)در رقم مقاوم تحت تیمارهای مختلف در نقاط زمانی متفاوت.

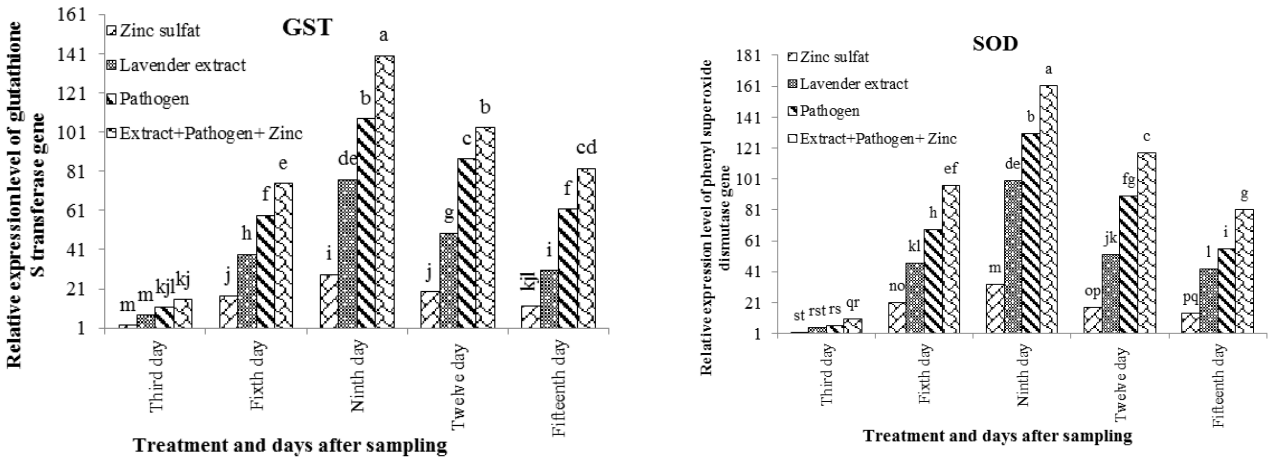
Fig13. Expression pattern of gene encoding PPO (left) and PAL (right) in resistant cultivar under various treatments at different times.

بررسی میزان بیان کمی ژن سوپر اکسید دیسموتاز

نتایج نشان داد میزان بیان ژن رمزکنندۀ سوپراکسیددیسموتاز تا روز نهم نمونه‌برداری در هر چهار تیمار بیمارگر تنها، سولفات روی و عصارۀ اسطوخودوس هر یک به تنهایی، و تیمار استفادۀ توأم بیمارگر، سولفات–روی و عصارۀ اسطوخودوس در رقم مقاوم نسبت به تیمار شاهد سالم روند افزایشی داشت و بعد از این روز تا روز پانزدهم دارای روند کاهشی بود. بیشترین میزان بیان ژن همواره در کلیۀ روزهای نمونه‌برداری از آن تیمار استفادۀ توأم قارچ بیمارگر، سولفات‌روی و عصارۀ گیاه اسطوخودوس بر روی گیاه خیار بود و با بقیۀ تیمارها در تمام روزها (به جز روز اول نمونه‌برداری) دارای اختلاف معنی‌دار بود و بیشترین مقدار آن در روز نهم با میزان عددی ۱۶۱/۴۵ برابر میزان بیان ژن در شاهد سالم، مشاهده شد(شکل ۱۴–راست).

بررسی میزان بیان کمی ژن گلوتاتیون S ترانسفراز

نتایج نشان داد میزان بیان ژن رمزکنندۀ آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز در طول پانزده روز نمونه‌برداری، تا روز نهم افزایش در همۀ تیمارها نشان داد. روند افزایش و کاهشی میزان بیان ژن این آنزیم مانند هفت آنزیم ذکر شده در بالا بود. بیشترین میزان بیان ژن آنزیم در تمام روزهای نمونه–برداری مربوط به تیمار ترکیب عصارۀ اسطوخودوس، سولفات روی به‌همراه بیمارگر بود و میزان این افزایش همواره در تمام روزهای نمونه‌برداری، به جز روز اول، دارای اختلاف معنی‌دار با بقیۀ تیمارها بود. بیشترین میزان بیان ژن گلوتاتیون S ترانسفراز در تیمار استفاده توأم سه عامل در روز نهم به میزان ۱۴۰/۰۶ برابر میزان بیان این ژن در گیاه شاهد سالم بود. میزان بیان ژن گلوتاتیون S ترانسفراز در تیمار بیمارگر تنها نیز همواره بیشتر از دو تیمار عصارۀ اسطوخودوس و سولفات روی هر یک به تنهایی بود و این اختلاف نیز در تمام روزهای نمونه‌برداری معنی‌دار بود (شکل۱۴–چپ)



شکل۱۴– الگوی بیان ژن رمزکنندۀ آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز(چپ) و آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(راست) در رقم مقاوم تحت تیمارهای مختلف در نقاط زمانی متفاوت

Fig 14. Expression pattern of gene encoding Glutathione S–Transferase(left) and Super oxide dismutase (right) in resistant cultivar under various treatments at different times.

بحث

نتایج به دست آمده از آزمون‌های دیسک کاغذی و اختلاط عصاره‌ها با محیط کشت نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها، میزان فعالیت ضدقارچی افزایش پیدا می‌کند. بیشترین میزان فعالیت ضدقارچی در آزمون‌های دیسک کاغذی و اختلاط با محیط کشت به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام عصارۀ اتاولی است. هر چه بر میزان غلظت عصاره‌ها افزوده شود، میزان فعالیت قارچ‌کشی آن نیز افزوده می‌شود. در مورد عصاره‌های آبی نیز بیشترین میزان فعالیت ضدقارچی مربوط به همین غلظت‌ها بود، که این نتایج را می‌توان با تغییر در نوع حلال مرتبط دانست. زمانی که از عصارۀ اتانولی استفاده می‌شود احتمالاً مواد ضدقارچی بیشتری از مواد گیاهی قابل استحصال خواهد بود، البته به علت خاصیت آبگیری که الکل دارد، خود الکل به تنهایی نیز خاصیت ضدمیکروبی و قارچکشی دارد. کمترین میزان فعالیت ضدقارچی در مورد آزمون استفاده از دیسک کاغذی و اختلاط با محیط کشت به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۵۰۰ پی‌پی‌ام در مورد هر دو نوع عصارۀ آبی و اتانولی بود. برای استخراج متابولیت‌های ضدقارچی از اندام گیاهی اتانول در مقایسه با آب از راندمان بیشتری برخوردار بود و به عبارت دیگر در بین عصاره‌های مستخرج از گیاهان مختلف عصارۀ اتانولی در کاهش رشد قارچ با تأثر بیشتر ظاهر شد. اثر بازدارندگی عصاره علاوه بر نوع حلال مورد استفاده برای استخراج، به غلظت عصاره نیز بستگی دارد. اغلب ترکیبات و متابولیت‌های گیاهی که خاصت ضدقارچی دارند حاوی ترکیبات آلی اشباع شده یا ترکیبات آروماتیک هستند، و غالباً حلال‌های متاولی بری استخراج آن‌ها مناسبتر از آب هستند (Duraipandiyan *et al*., 2009). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد افزودن عصاره‌های گیاهی به عنوان ترکیبات ضدقارچی به محیط کشت باعث کنترل قارچ بیمارگر می‌شود نتایج ما با نتایج دین و همکاران (۲۰۱۳) هم‌خوانی داشت. در مطالعات آن‌ها عصاره‌های اسطوخودوس و دارچین باعث کاهش رشد بیمارگر *P. expansum* شد (Deein *et al*., 2013). در آزمون‌های استفاده از دیسک‌های کاغذی و اختلاط با محیط‌کشت عصاره‌های گیاهی توانستند این بیمارگر را کنترل کنند که این نتایج نشان می‌دهد که مواد بازدارنده ای که در عصاره‌های گیاهی وجود دارند قادرند که در محیط کشت

دارای آگار نفوذ یابند و عامل بیمارگر را تحت کنترل درآورند.

در مورد آزمون گلخانه‌ای عصاره‌های گیاهی که با هر دو نوع حلال استحصال شدند، تأثیر معنی‌داری در کاهش این بیماری (*R. solani*) در مقایسه با شاهد داشتند. عصارهٔ اتانولی در این آزمون نیز قادر به کنترل بیشتر بیماری نسبت به عصارهٔ آبی بود، که این مورد را می‌توان هم به حلالیت بیشتر ترکیبات قارچ‌کش در الکل مرتبط دانست و هم به خاصیت قارچ‌کشی خود الکل به تنهایی، الکل (اتانول) به علت خاصیت آبگیری شدیدی که دارد آب را از بافت سلولی جذب می‌کند و به این طریق سلول میزبان را از بین می‌برد. غلام نژاد (۱۳۹۶) تاثیرعصاره‌های آبی و اتانولی اسطوخودوس، رازیانه، پونهٔ آبی، آویشن شیرازی و اکالیپتوس جهت کنترل بیماری کپک خاکستری سیب با عامل *B. cinerea*، در آزمایشگاه و در انبار در دمای چهار درجهٔ سلسیوس مورد بررسی قرار دادند و نتایج انها نشان داد که عصارهٔ اسطوخودوس با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۲۲ میلی‌متر قطر ممانعت از قارچ بیمارگر، دارای بیشترین اثر کنترل کنندگی، و عصارهٔ پونهٔآبی با غلظت ۵۰ میکروگرم در میکرولیتر و ۳/۲۲ میلی‌متر قطر ممانعت از قارچ بیمارگر، دارای کمترین اثر کنترل‌کنندگی روی رشد قارچ داشت. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های غلام نژاد(۱۳۹۶) مطابقت دارد (Gholamnezhad, 2017). کمانگر و همکاران (۱۳۹۳) اثر ضدقارچی عصارهٔ(ان‌هگزان، دی‌اتیل‌اتر، کلروفرم و اتانولی) پنج گونهٔ گیاهی اسپند، آویشن‌کوهی، بومادران، پونه و سیر علیه بیمارگرهای *Fusarium solani* و *R. solani* روی لوبیا در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد عصارهٔ هگزانی آویشن دنایی وپونه نه تنها موجب کاهش معنا دار پوسیدگی ریشه شد، بلکه بر شاخص‌های رشدی گیاه لوبیا مانند وزن تر و خشک اندام هوایی تأثیر مثبت گذاشت (Kamangar *et al.*, 2012). در تحقیق حاضر نیز عصارهٔ اتانلی گیاهان مورد مطالعه موجب کاهش معنی‌دار بیماری ریزوکتونیایی در خیار شد و همچنین تاثیر مثبت روی صفات وزن تر و وزن خشک ریشه، وزن تر ساقه و وزن خشک اندام هوایی خیار داشت.نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های کمانگر و همکاران (۱۳۹۳) همخوانی داشت (Kamangar *et al.*, 2012). در مطالعه یحیی آبادی و همکاران(۱۳۹۰) اثرات ضدقارچی عصاره‌های آبی شوید، آویشن شیرازی، گشنیز و گل محمدی بر روی سویه‌های استاندارد و جداسازی شدهٔ *Aspergillus flavus* و *A. fumigatus* مورد بررسی قرار گرفت (Yahyaabadi *et al.*, 2011). نتایج این تحقیق نشان داد که در مورد *A. flavus* استاندارد، نیستاتین، عصاره‌های آبی شوید، آویشن و گشنیز به میزان برابر و در نهایت گل محمدی دارای بیشترین اثرات ضدقارچی بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که در تمامی موارد عصاره‌ها موجب کاهش رشد کلنی قارچ‌ها گردید که در این میان با افزایش غلظت عصاره‌های آبی شوید، آویشن، گشنیز و گل‌محمدی این اثر افزایش می‌یابد (Yahyaabadi *et al.*, 2011). نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های یحیی آبادی و همکاران (۱۳۹۰) مطابقت داشت (Yahyaabadi *et al.*, 2011). تاثیر مهار کنندگی عصاره‌های گیاهی مختلف روی رشد قارچ ریزوکتونیا سولانی به وسیلهٔ (Khaledi *et al.*, 2015) ، Saruj *et al.* (2015) و Rahman *et al.* (2011) گزارش شده است. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های این محققین همخوانی داشت.

نتایج مطالعات مختلف نشان داده اند که اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی توانایی مهار رشد میکروارگانیسم‌ها را دارند و خاصیت ضد میکروبی آنها روی باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌های بیمارگر گیاهی و حیوانی اثبات شده است (Rufa *et al.*, 2017) خاصیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی به ترکیبات شیمیایی موجود در آنها مربوط می‌شود که نوع ترکیب شیمیایی، گروه‌های کارکردی موجود در این ترکیبات و تعاملات سینرژیستی این گروه‌ها فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. همچنین خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی به نوع عصاره و سویه میکروارگانیسم بستگی دارد. علی‌رغم اینکه مکانیسم دقیق ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی هنوز به طور کامل شناخته نشده است، ولی چندین مکانیسم پیشنهاد شده است. تجمع عصاره‌ها و

اسانس‌های گیاهی در سلول، تاثیر آنها روی نفوذ پذیری غشای سلول میکروبی، مختل کردن غشاهای ارگانل‌های اصلی سلول و تغییر در مورفولوژی کلی سلول که موجب نشت محتویات درون سلول به بیرون سلول و مرگ و میر سلول میکروبی می‌شود، مهمترین مکانیسم‌های ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌باشند (Omar & Kordali, 2019). در مطالعه حاضر عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه موجب کاهش رشد قارچ ریزوکتونیا سولانی گردید. مکانیسم احتمالی تاثیر ضد قارچی عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق را می‌توان به تاثیرات آنها روی غشای سلول قارچی و تغییر در نفوذپذیری غشای سلول و نشت ترکیبات درون سلولی و نهایتا مرگ و میر سلول قارچ نسبت داد.

فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کاتالازو فنیل‌آلانین آمونیاز لیاز در گیاهان خیار مایه‌زنی شده با تیمارهای مختلف مورد مطالعه در این تحقیق، سه روز بعد از مایه‌زنی با بیمارگر (اولین روز نمونه‌برداری) افزایش معنی‌داری پیدا کرد. استفاده توأم از عصارهٔ اسطوخودوس، سولفات روی و عامل بیمارگر بر روی فعالیت این آنزیم‌ها موجب افزایش فعالیت آنها در کلیهٔ تیمارها تا روز نهم افزایش گردید و از روز نهم تا پانزدهم روند کاهشی داشت. همچنین میزان بیان کمی آنزیم‌های ۱و۳ گلوکاناز، کیتیناز، پراکسیداز، کاتالاز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، سوپر اکسید دیسموتاز، پلی فنل اکسیداز و گلوتاتیون S– ترانسفراز در تمام تیمارها و در تمام روزها نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود. میزان بیان این ژن‌ها تا روز نهم پس از مایه‌زنی با بیمارگر افزایش یافت و بعد از آن دوباره سیر نزولی پیدا کرد. میزان بیان ژن این آنزیم‌ها در تیمار توأم قارچ بیمارگر، سولفات روی و عصارهٔ اسطوخودوس در تمام روزهای نمونه‌برداری بیشتر از سایر تیمارها بود و این اختلاف معنی‌دار بود، به طوری که بیشترین میزان بیان ژن در تمام آنزیم‌های ذکر شده در این تیمار در روز نهم نمونه‌برداری مشاهده شد. (Sareana *et al.*, 2006) افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برنج را در پاسخ به آلودگی با *R. solani* گزارش کردند که موجب کاهش علایم و مهار بیماری شیت بلایت گردید که اهمیت مسیر فنیل پروپانوئیدی و پراکسیداز را در پاسخ‌های دفاعی به آلودگی با ریزوکتونیا سولانی نشان می‌دهد. افزایش بیان آنزیم‌های دفاعی ژن‌های کیتیناز و β(۱و۳) گلوکاناز در گیاه نخود پس از آلودگی با بیمارگر *Ascochyta rabiei* به وسیلهٔ افضل و همکاران (Afzal *et al.*, 2014)، افزایش بیان کیتیناز A، کیتیناز B، گلوکاناز و PR–10a در رقم مقاوم سیب زمینی *S. phureja* پس از آلوده‌سازی با باکتری *Ralstonia solanacearum* به وسیلهٔ مسلم خانی و همکاران. (Moslemkhany *et al.*, 2007)، افزایش بیان ژن پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و کاتالاز در سیب زمینی آلوده به بیمارگر *Ralstonia solanacearum* به وسیلهٔ (Aragawi & adds, 2019) گزارش شده است. افزایش میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیونSترانسفراز در سیب‌زمینی آلوده به بیمارگر *Phytophthora infestans*، گندم آلوده به بیمارگر *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* و گیاه آرابیدوپسیس آلوده با بیمارگر *Peronospora parasitica* به وسیلهٔ (Rehmany *et al.*, 2003) گزارش شده است. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های محققین فوق الذکر همخوانی دارد.

گیاهان طیف متنوعی از پاسخ‌ها را در طول آلودگی به بیمارگرها، آفات و تنش‌های غیر زیستی از خود نشان می‌دهند که بسیاری از این پاسخ‌ها در فعال سازی ژن‌های دفاعی میزبان دخیل می‌باشند. فعال شدن این ژن‌ها منجر به تغییرات فیزیکی و بیوشیمیایی در سلول‌های گیاهی می‌شود که این تغیرات برای پیشرفت و تداوم آسیب به گیاه نامطلوب و نامناسب می‌باشند. یکی از مهمترین تغییرات بیوشیمیایی بیان پروتئین‌های دفاعی مرتبط با بیمارگرها یا پروتئین‌های PR می‌باشد. خانوادهٔ PR–3 و PR–4 شامل کیتینازها می‌باشند که موجب تجزیه پیوندهای بتا۱–۴ در کیتین می‌شود که پلی‌ساکارید ساختاری دیوارهٔ سلولی بسیاری از قارچ‌ها از جمله ریزوکتونیا سولانی می‌باشد. فراورده‌های حاصل از تجزیه کیتین به خصوص الیگومرها به عنوان الیسیتورهای مقاومت عمل می‌کنند. کیتینازها موجب فعال‌سازی ژن‌های دفاعی در برابر بیمارگرها می‌شوند که در مقاومت پایه‌ای گیاهان به بیمارگرها دخیل می‌باشند. خانوادهٔ

PR–9 یا پراکسیدازها با رسوب ترکیبات فنلی در دیوارهٔ سلول‌های گیاهی در طول پاسخ‌های دفاعی مرتبط می‌باشند. نقش احتمالی پراکسیدازها در ایجاد مقاومت به بیمارگر شامل القای تشکیل موانع ساختاری از قبیل افزایش سنتز دیوارهٔ سلولی و رسوب ترکیبات مختلف در دیوارهٔ سلولی می‌باشد که هر دو مورد می‌تواند در الیگومریزاسیون لیگنین و سوبرین، ارتباطات سراسری گلیکوپروتئین‌ها یا پلی‌ساکاریدها و دیمریزاسیون فنل‌های آنتی میکروبی باشد. با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق به نظر می‌رسد پراکسیداز ممکن است در رسوب لیگنین در دیواره سلولی خیار در پاسخ به آلودگی با قارچ ریزوکتونیا سولانی نقش داشته باشد (Taheri & Tarighi, 2012). پراکسیداسیون لیپیدها درگیاهان پس از آلودگی با بیمارگر قارچی در نتیجه القای تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) رخ می‌دهد. تشکیل پراکسید هیدروژن در نتیجهٔ تهاجم بیمارگر از یک طرف تاثیر سمی مستقیم روی قارچ داشته و از طرف دیگر به عنوان سیگنالی برای القای واکنش فوق حساسیت در گیاه عمل می‌کند. تولید مالون دی آلدئید به عنوان شاخصی است که مشخص می‌کند گیاه تحت تنش اکسیداتیو قرار گرفته است و در نتیجهٔ آن گیاه تولید پراکسید هیدروژن نموده و در نتیجهٔ آن سطوح آنزیم‌های اکسیداتیو کاتالاز، پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز افزایش یافته و پراکسید هیدروژن را به ترکیبات غیر سمی برای گیاه تبدیل می‌نمایند (Pittner *et al*., 2019).

در این تحقیق کاربرد تیمار سولفات روی موجب کاهش رشد قارچ ریزوکتونیا سولانی گردید که بیشترین میزان کاهش در غلظت ۵۰۰ پی پی ام مشاهده شد. (Gallego *et al*., 2017) گزارش کردند که کاربرد روی موجب کاهش ۵۰ درصدی رشد قارچ آلترناریا براسیکولا در گیاه *Noccaea caerulescens* گردید. همچنین کاهش میزان رشد باکتری سدوموناس سیرینگا در اثر کاربرد روی در گیاه *Noccaea caerulescens* به وسیلهٔ (Fones & Preston, 2013) گزارش شده است. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های محققین فوق همخوانی دارد. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده اند که مکانیسم تاثیرات ضد قارچی و ضد باکتریایی یون روی از طریق تاثیر مستقیم سمی روی بیمارگرهای گیاهی وهمچنین القای آغاز سیستم دفاعی گیاه می‌باشد (Cabot *et al*., 2019).

در این تحقیق کاربرد تیمار سولفات روی موجب افزایش فعالیت تمام آنزیم‌های مورد مطالعه گردید. افزایش فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز، فنیلآلانین آمونیالیاز در گیاه لوبیا تلقیح شده با ریزوکتونیا به وسیلهٔ (Wadhwa *et al*., 2014) گزارش شده است. نتیجه تحقیق حاضر با یافته‌های این محققین همخوانی دارد. آنزیم‌های آنتی اکسیدان نقش مهمی در گیاه در برابر تهاجم پاتوزن بازی می‌کنند. یون روی به عنوان کوفاکتور برای آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله فنیل‌آلانین آمونیالیاز عمل کرده و از این طریق موجب افزایش مقاومت گیاه به بیماری قارچی می‌شود (Wadhwa *et al*., 2014).

نتیجه‌گیری کلی

بیماری‌های قارچی یکی از مهمترین عوامل تهدید کننده تولید غذا در جهان می‌باشد. با افزایش مقاومت قارچ‌ها به قارچ‌کش‌های شیمیایی، استفاده از روشهای جایگزین برای کنترل و مدیریت بیماری‌های قارچی اجتناب ناپذیر می‌باشد. در این مطالعه تاثیر ضد قارچی عصارهٔ پنج گیاه بر علیه عامل پوسیدگی طوقه و ریشه خیار و همچنین تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و بیان نسبی این آنزیم‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور کلی عصارهٔ دو درصد و غلظت ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گیاه اسطوخودوس بهترین تاثیر را به ترتیب در مهار رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی و کاهش شدت بیماری‌زایی قارچ روی گیاه خیار در شرایط گلخانه داشت. تیمار توأم قارچ بیمارگر، سولفات روی و عصارهٔ اسطوخودوس بهترین تیمار در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و افزایش بیان آنها بود.با توجه به نتایج تحقیق حاضر این چنین نتیجه گیری می‌شود که عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق به خصوص گیاه اسطوخودوس و همچنین سولفات روی تاثیر قابل توجهی در کنترل و کاهش شدت بیماری ناشی از ریزوکتونیا سولانی در خیار داشتند و بهترین غلظت بدست

آمده (یک الی دو درصد) در این تحقیق می‌تواند به صورت تجاری فرموله شده و برای اهداف مدیریت تلفیقی بکار گرفته شود.

References

Afzal, R., Marashi, S.H., Moshtaghi, N. & Kavousi, H.R. 2014. Gene expression profiling of chitinase and β–1, 3 glucanase in chickpea infected by *Ascochyta* blight. Iranian Journal of Pulses Research, 5(1): 151–158.

Bahraminejad, S., Asenstorfer, R.E., Riley, I.T. & Schultz, C.J. 2008. Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoot's oats (*Avena sativa* L.). Journal of Phytopathology, 156: 1–7.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1–2): 248–254.

Cabot, C., Martos, S., Llugany, M., Gallego, B., Tolrà, R. & Poschenrieder, C. 2019. A role for zinc in plant defense against pathogens and herbivores. Frontiers in Plant Science, 10: 1171.

Daayf, F., El Hadrami, A., Adam, L.R. & Ballance, G.M. 2006. Polyphenols communications 2006. XXIII International Conference on Polyphenols, August 22–25, Winnipeg, Canada.

Dissanayake, A.J., Camporesi, E., Hyde, K.D., Yan, J.Y. & Li, X.H. 2017. Saprobic botryosphaeriaceae, including *Dothiorella italica* sp. nov., associated with urban and forest trees in Italy. Mycosphere, 8: 1157–1176.

Duraipandiyan, V. & Ignacimuthu, S. 2009. Antibacterial and antifungal activity of Flindersine isolated from the traditional medicinal plant, *Toddalia asiatica* (L.) Lam. Journal of Ethnopharmacology, 123(3):494–498. DOI: 10.1016/j.jep.2009.02.020

Du, Z. & Bramlage, W.J. 1995. Peroxidative activity of apple peel in relation to development of poststorage disorders. HortScience, 30: 205–209.

Fones, H.N. & Preston, G.M. 2013. The impact of transition metals on bacterial plant disease. FEMS Microbiology Review, 37: 495–519.

Gholamnezhad, J. 2017. Effect of plant extracts against apple gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Applied Microbiology in Food Industries, 3(1): 53–66.

Gong, 2001, Involvment of calcium and calmodulin in the acquisition of HS inuced thermotolerance in maize seeding, Journal of Plant Physiology, 150: 615–621.

Hadian, S., Rahnama, K., Jamali, S. & Eskandari, A. 2011. Comparing Neem extract with chemical control on *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. Advances in Environmental Biology, 5(8): 2052–2057.

Ippolito, A., El–Ghaouth, A., Wilson, C. & Wisniewski, M. 2000. Control of post harvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. Postharvest Biology and Technology, 19: 267–272.

Kamangar, S., Ebrahimi, E. & Keyhanian, A. 2012. Preliminary study on biology and seasonal population dynamics of Turnip Sawfly, *Athalia rosae* (Hym.: Tenthredinidae), on Canola in Kurdistan province. Applied Enthomology and Pathology, 79(2): 181–197.

Khaledi, N., Taheri, P. & Tarighi, S. 2015. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. Journal of Applied Microbiology, 118: 704–717.

Livak, K.L. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real–time quantitative PCR and the 2(–Delta Delta C(T)). Methods, 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262. 25.

Meliss, T.G.S., Sponia, M.S., Terezinha, G.F.M.B., Cardarelli, P. & Therezinha, C.B.T. 2005. Studies on antimicrobial activity in vitro of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. Mem inst Oswaldo Cruz Rio de Janerio, 100(7): 779–782.

Moslemkhany, K., Mozafari, J., Alizadeh, A. & Mobasser S. 2007. Increasing The detection sensitivity of *Ralstonia solanacearum* using the post–Enrichment and nitrocellulose membrane–elisa techniques. Agricultural Sciences and Technology, 21(1): 57–65.

Omar, M.S & Kordali S. 2019. Review of essential oils as antifungal agents for plant fungal diseases. Ziraat Fakültesi Dergisi, 14(2): 294–301.

Parameter, J.R., Sherwood, R.T. & Platt. W.D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorous cucumeris*. Phytopathology, 59: 1270–1278.

Peng, L., Peng, S., Yang, Y.J., Cheng, F., Chen, S. & Pan, G. 2012. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. Food Science Biotechnology, 21(6): 1533–1539.

Pittner, E., Marek, J., Bortuli, D., Santos, L.A., Knob, A., Marcia, C. & Faria, D.R. 2019. Defense responses of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) against brown spot as a result of possible elicitor's application. Plant Pathology, 86: doi: 10.1590/1808‑1657000312017, 1808–1657.

Rahman, A., Al–Reza, S.M. & Kang, S.C. 2011. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper chaba* Hunter against phytopathogenic fungi. Journal of the American Oil Chemists Society, 88: 573–579.

Rehmany, A.P., Grenville, L.J., Gunn, N.D., Allen, R.L., Paniwnyk, Z., Byrne, J., Whisson, S.C., Birch, P.R. & Beynon, J.L. 2003. A genetic interval and physical contig spanning the *Peronospora parasitica* (At) avirulence gene locus ATR1Nd. Fungal Genetics and Biology, 38: 33–42.

Reuveni, R. 1995. Biochemical marker of disease resistance. In: Singh, R.P. and Singh, U.S. (Ed.) Molecular Methods in Plant Pathology, 99–114.

Rufa, I., Yangora, M.S., Usman, Y.M. & Shamsuddeen, U. 2017. Essential oils and their antimicrobial activity: A Review. Umyu Journal of Microbiology Research, 2(2): 2616 – 0668.

Saroj, A., Pragadheesh, V.S., Palanivelu, Yadav, A., Singh, S.C., Samad, A., Negi, A.S. & Chanotiya, C.S. 2015. Anti–phytopathogenic activity of *Syzygium cumini* essential oil, hydrocarbon fractions and its novel constituents. Industrial Crops and Products, 74: 327–335.

Sareena, S., Poovannan, K. & Kumar, K.K. 2006. Biochemical responses in transgenic rice plants expressing a defence gene deployed against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. Current Science, 91(11): 1529–1532.

Schneider, S. & Ullrich, W.R. 1994. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. Physiological and Molecular Plant Pathology, 45: 291–304.

Shcherbakova, L., Kartashov, M., Statsyuk, N., Pasechnik, T. & Dzhavakhiya, V. 2020. Assessment of the sensitivity of some plant pathogenic fungi to 6–Demethylmevinolin, a putative natural sensitizer able to help overcoming the fungicide resistance of plant pathogens. Antibiotics, 9(12): 842, DOI: 10.3390/antibiotics9120842.

Shi, C. 2001. The Purification and Spectral Properties of Polyphenol Oxidase I from *Nicotiana tabacum*. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 381–385.

Taheri, P. & Tarighi, S. 2012. The role of pathogenesis–related proteins in the tomato–*Rhizoctonia solani* interaction, Journal of Botany, 2012(2): 1–6, doi.org/10.1155/2012/137037.

Wadhwa, N., Narayan Joshi, U. & Mehta, N. 2014. Zinc induced enzymatic defense mechanisms in *Rhizoctonia* root rot Iinfected clusterbean seedlings. Journal of Botany, 2014: 1–7, doi.org/10.1155/2014/735760.

wang, X. 2009. cDNA–AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with Puccinia striifonnis f. sp. tritici. BMC genomics, 10: 289–304.

Yahyaabadi, S. Zibanejad, E. & Doudi, M. 2011. Effect of Some OF Plant Extracts On The Growth Of Two *Aspergillus* Species. Journal Of Herbal Drugs, 2(1): 69–81.

Evaluation of the effect of some plant extracts in controlling Rhizoctonia rot in the greenhouse cucumber

Sepideh Sadat Aghazadeh Naeini[1], Mojdeh Maleki[2], Jalal Gholamnezhad[3], Mostafa Shirmardi[4]

1., 2. Ph.D. student in Plant Pathology, Assistant Professor, Department of Plant Portection, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University of Varamin–Pishva, Tehran, Iran.
3., 4. Assistant Professor, Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Ardakan, Ardakan, Yazd, Iran.

Corresponding authors: Jalal Gholamnezhad, Mojdeh Maleki; email: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir; mojdehmaleki@yahoo.com

Received: Sep., 17, 2021 9(2) 87–113 Accepted: Feb., 05, 2023

Abstract

The use of chemical fungicides, in addition to environmental pollution, causes the increase and spread of fungicide-resistant strains in plant fungal pathogen. Minimizing the harmful effects of fungal pathogen in agricultural plants requires a promising method in their control. Therefore, natural remedies, including essential oils and plant extracts, are a suitable option for controlling and reducing fungal diseases. In this research, the controlling effect of the plant extracts of thyme, lavender, fennel, cinnamon, cloves and bitter gourd and different levels of zinc sulfate as one of the food compounds on the growth rate of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* and the changes in the activity of the defense enzymes peroxidase and catalase as well as the changes in the amount The gene expression of these two enzymes was investigated in laboratory (*in vitro*) and greenhouse conditions (*in vivo*) in cucumber plants in interaction with pathogen. The results showed that all plant extracts and zinc sulfate were able to inhibit the growth of the pathogen in laboratory conditions and were also able to reduce the severity of the disease in greenhouse conditions. The results of the paper disc test showed that the highest growth inhibition rate among the plant extract treatments (ethanolic extract) was related to lavender extract with 600 micrograms per milliliter and 32.90 mm in diameter, and the lowest growth inhibition rate was related to bitter extract with a concentration of 150 µg/ml and a diameter of 10.17 mm (compared to the control with a diameter of 3.45 mm). In the test of mixing plant extracts with culture medium, the ethanolic extract of lavender plant with concentrations of 2000 and 2500 ppm and with 82.21 and 80.75 percent and the extract of Danai thyme with a concentration of 2500 ppm and 18. 72% inhibition of the pathogenic fungus compared to the control, respectively, were the most effective extracts in preventing the growth of the fungal pathogen. The combined treatment of fungal pathogen, zinc sulfate and lavender extract was the best treatment in increasing the activity of antioxidant enzymes and increasing their expression. According to the results of this research, it can be concluded that the plant extracts studied in this research, especially the lavender plant, as well as zinc sulfate had a significant effect in controlling and reducing the severity of the disease caused by *R. solani* in cucumber, and the best concentration obtained in this research can be formulated commercially and used for integrated management purposes.

Keywords: Cucumber, *Rhizoctonia solani*, Zinc– sulfate, Plant extract, Antioxidant Enzymes