تأثیر اسانس آویشن دنایی، فوزتیل آلومینیوم و مانکوزب- متالاکسیل بر روی القای سیستم دفاعی گیاه خیار در برهمکنش با بیماری پوسیدگی طوقهٔ خیار با عامل *Phytophthora* sp.

The effect of Denai thyme essential oil, fustil aluminum and mancozeb-metalaxyl on the induction of cucumber plant defense system in interaction with cucumber ring rot disease caused by *Phytophthora* sp.

جواد محبوبی فولادی[۱]، جلال غلام نژاد[۲*] و ناصر محمدی[۳]

دریافت: ۱۴۰۰/۸/۱۹ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۸

چکیده

کشت خیار به‌صورت گلخانه‌ای در ایران در سال‌های اخیر بسیار گسترش پیدا کرده است. در این بررسی، تأثیر اسانس آویشن دنایی و دو قارچ‌کش فوزتیل‌آلومینیوم (الیت) و متالاکسیل- مانکوزب (ریدومیل ام زد) برای بیماری بوته‌میری گیاه خیار گلخانه‌ای ناشی از شبه قارچ فیتوفتورا مطالعه شد. هر گلدان دارای یک گیاه به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. در آزمون گلخانه‌ای اثر تیمارهای مذکور بر روی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و همچنین آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاه خیاری که به‌وسیلهٔ شبه قارچ *Phytophthora* sp. آلوده شده بود، اندازه‌گیری شد. داده‌ها تحت طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. نتایج تأثیر تیمارهای مختلف بر مکانیسم‌های دفاعی گیاه خیار نشان داد که بیشترین فعالیت سه آنزیم پراکسیداز، کاتالاز و همچنین آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، مربوط به تیمار گیاه خیار آلودهٔ تیمار شده با غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم بود. در ششمین روز بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به ۱/۹۵ ΔOD/Min/mg protein رسید. روند فعالیت هر سه آنزیم تا روز ششم افزایشی و سپس کاهشی بود؛ به این صورت که در روز دهم بعد از آلوده‌سازی خیارها با عامل بیمارگر، میزان فعالیت این آنزیم در تیمار فوزتیل آلومینیوم کاهش یافت و به ۱/۲۹ ΔOD/Min/mg protein رسید. تیمار استفاده از قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم در تمام روزهای نمونه‌برداری نسبت به همهٔ تیمارهای دیگر دارای اختلاف معنی‌دار از نظر سطح فعالیت آنزیم بود. در کلیهٔ روزهای نمونه‌برداری، فعالیت آنزیم‌ها در تیمار متالاکسیل-مانکوزب به‌صورت معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. در روز دهم بعد از نمونه‌برداری میزان فعالیت هر سه آنزیم، در تمام تیمارها نسبت به روز هشتم کاهش یافت، اما باز روند فعالیت آنزیم در هر سه تیمار مشابه سایر روزها بود. به عبارت دیگر، همهٔ تیمارها قادر به افزایش فعالیت این آنزیم‌ها (کاتالاز و پراکسیداز)، نسبت به شاهد بودند. اما مهم‌تر از آن این آنزیم‌ها کاتالاز و پراکسیداز، تحت تأثیر روزهای نمونه‌برداری نیز بود. نتایج نشان داد که آویشن دنایی همراه با متالاکسیل- مانکوزب، در تمام روزهای نمونه‌برداری قادر به القای آنزیم‌های دفاعی در برابر بیمارگر بود. به بیان دیگر اسانس این گیاه توانست در کنار القاگرهای شیمیایی بر مکانیسم‌های دفاعی گیاه اثر گذاشته و از این راه، باعث کاهش خسارت بیمارگرها به گیاه شود.

واژگان کلیدی: پوسیدگی طوقه، خیار، اسانس آویشن، فوزتیل آلومینیوم، متالاکسیل – مانکوزب

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: jalal.gholamnejad@gmail.com

مقدمه

خیار میوه‌ای سرشار از ترکیبات مفید با ارزش غذایی بالا و همچنین آنتی‌اکسیدان‌هاست که ممکن است به بهبود و حتی پیشگیری از برخی بیماری‌ها کمک کنند. در عین حال، این محصول همیشه در معرض عوامل بیمارگر در محیط زندگی خود می‌باشد که در این بین، قارچ‌ها و سایر بیمارگرهای گیاهی سبب خسارات بسیاری در مزارع سبزی و صیفی در ایران و نیز سراسر دنیا می‌شوند (Bajpai *et al*., 2008). میزان خسارت محصولات کشاورزی ناشی از بیمارگرها حدود ۱۲ درصد از تولید جهانی است که این مقدار در کشورهای توسعه نیافته بیشتر است (Gholamnejad *et al*., 2009؛ Serra *et al*., 2006). یکی از بیماری‌های مخرب که هر سال خسارت چشمگیری به محصولات سبزی و صیفی در مزارع و گلخانه‌ها وارد می‌کند، بیماری مرگ گیاهچه و بوته‌میری ناشی از شبه قارچ فیتوفتوراست (اعتباریان، ۱۳۹۱). در حال حاضر سریع‌ترین و در دسترس‌ترین راه، برای مبارزه با این بیماری استفاده از سموم شیمیایی است. کنترل شیمیایی عوامل بیماری‌زای قارچی و مصرف بیش از حد قارچ‌کش‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهان، به‌خصوص بیماری‌های خاکزاد سبب عوارضی همچون اختلال در گرده‌افشانی، سرطان‌های ناشی از باقیماندهٔ سموم روی مواد غذایی، آلودگی‌های زیست‌محیطی و پدیده مقاومت در مقابل قارچ‌کش‌ها شده است (Bi *et al*., 2012). استفاده از عصاره و اسانس‌های گیاهی و متابولیت‌های ثانویهٔ آن‌ها به‌عنوان یکی از روش‌های نوین کنترل بیماری‌های گیاهی، مطرح و بیشتر در سطوح آزمایشگاهی انجام شده است (Sokovic and Griensven, 2006). با افزایش آگاهی دربارهٔ اهمیت کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در کشاورزی و صنایع دارویی، جداسازی و استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی رو به افزایش است (Amvam zollo *et al*., 1998). استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی بدان جهت دارای ارزش فوق‌العاده است که به دلیل وجود ترکیبات مؤثره متعدد و متنوع در این مواد، تاکنون هیچ‌گونه مقاومتی در برابر این نوع ترکیبات در آفات و بیماری‌ها مشاهده نشده است (Amini *et al*., 2012) و با توجه به مشکلات موجود در مورد کاربرد قارچکش‌ها، مطالعه و تحقیق در خصوص روش‌های جدید و مطمئن و کم هزینه برای کنترل و مدیریت بیماری‌های گیاهی یک ضرورت است (Martinez *et al*., 2007).

آویشن دنایی (*Zataria multiflora*) از خانوادهٔ نعناعیان، گیاهی است که مطالعات فراوانی در مورد اثرات ضدقارچی آن انجام شده است. سرشاخه‌های گلدار این گیاه علفی و چند ساله کاربرد وسیعی در تهیه دارو و درمان انسان در طب سنتی دارد. تیمول و کارواکرول از مهمترین ترکیبات مؤثره این گیاه هستند. مواد موثرهٔ آویشن از سرشاخه‌های گلدار و برگ‌های خشک‌شده گیاه به‌دست می‌آیند. از مهم‌ترین ترکیبات فنلی گزارش شده در آویشن تیمول در حد ۷۰٪ می‌باشد (Sitara *et al*., 2008). مطالعات گوناگون اثرات ضدمیکروبی *Candida albicans*، *Saprolegnia parasitica*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به اثبات رسیده است (Ghasemi *et al*., 2013؛ Tajalipour *et al*., 2014).

یکی از جنبه‌هایی که باید در مورد اسانس و عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه قرار گیرد، تأثیر این ترکیبات بر روی مکانیسم‌های دفاعی گیاه، مانند تأثیر بر روی آنزیم‌های دفاعی و همچنین تأثیر بر روی میزان بیان ژن‌های دفاعی گیاهان مختلف است. تأثیرات ضدقارچی اسانس‌های گیاهی سال‌هاست که اثبات شده است اما کمتر بر روی تأثیر این تیمارها بر مکانیسم‌های دفاعی گیاهی مطالعه شده است. لذا هدف از انجام این مطالعه، مقایسه تأثیرات ضدقارچی اسانس آویشن دنایی با دو قارچ‌کش فوزتیل‌آلومینیوم و متالاکسیل- مانکوزب با توجه به میزان تغییرات فعالیت سه آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز به‌عنوان شاخص مکانیسم‌های دفاعی است.

مواد و روش‌ها

ایزولهٔ بیمارگر

در فصول پاییز و زمستان ۱۳۹۸ نمونه‌برداری از گلخانه‌های خیار مشکوک به آلودگی در شهر گرمسار، استان سمنان انجام شد؛ بافت طوقه و ریشهٔ گیاهان آلوده پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد تجاری شستشو و پس از شستشوی مجدد با آب مقطر سترون روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت شدند. جدایه‌های این عامل بیماری به روش تک هیف خالص‌سازی و در دمای یخچال روی محیط کشت PDA نگه‌داری شدند. شناسایی جدایه‌های عامل بیمارگر با استفاده از مشخصات مورفولوژیکی اندام‌های قارچ در حد جنس انجام شد (ارشاد، ۱۳۷۲).

تهیه اسانس و قارچ‌کش‌های مورد استفاده

در این پژوهش پس از تهیه گیاهان ابتدا اقدام به خشک کردن گیاه آویشن دنایی در سایه شد. استخراج اسانس به روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد. برای این کار ۱۰۰ گرم از نمونه آسیاب شده در یک بالون ته‌گرد یک و نیم لیتری ریخته و حدود دو سوم حجم بالون به آن آب مقطر اضافه شد، سپس اسانس موجود در آن، سه ساعت بعد از انجام عمل تقطیر، جمع‌آوری شد و در ظرف تیره رنگ دور از نور و در یخچال در دمای چهار درجه سلسیوس نگه‌داری گردید (British Pharmacopeia, 1988). فوزتیل‌آلومینیوم (الیت) و متالاکسیل- مانکوزب (ریدومیل ام زد) هر دو از شرکت آریا شیمی تهیه شدند.

بررسی تأثیر عصارهٔ آویشن دنایی و بیماری‌کش های مورد مطالعه بر روی مکانیسم‌های دفاعی گیاه خیار در مقابل بیماری بوته‌میری در شرایط گلخانه

بذور گیاه خیار بعد از ضدعفونی و کشت در گلدان، در مرحلهٔ سه الی چهار برگی، مطابق روش اثبات بیماری‌زایی، با مایهٔ بیمارگر *Phytophthora* sp. تلقیح شدند. بعد از ۲۴ ساعت ۵۰ میلی‌لیتر از عصارهٔ گیاه آویشن دنایی و قارچ‌کش‌های مورد استفاده در این تحقیق به ترتیب با غلظت ۱۵۰۰ و ۱۵۰ پی‌پی‌ام به خاک اطراف ریشهٔ گیاهان آلوده به عامل بیمارگر اضافه شدند. اضافه کردن عصارهٔ گیاه و قارچ‌کش‌ها به حدی بود که از زیر گلدان‌ها آبی خارج نشود. در تیمار شاهد به جای عصارهٔ گیاه آویشن دنایی و قارچ‌کش‌ها از آب مقطر سترون به اضافهٔ توئین ۸۰ استفاده شد. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه تحت درجه حرارت ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری و قبل از اینکه سطح خاک خشک شود، آبیاری می‌شدند. اندازه‌گیری شدت بیماری بر اساس نمرهٔ صفر الی پنج به شرح زیر انجام شد (Rao *et al.*, 2010).

صفر= گیاه سالم و بدون علایم بیماری

۱= ظهور لکه‌های قهوه‌ای کوچک در محل طوقه و ساقهٔ گیاه

۲= ظهور لکه‌های قهوه‌ای به‌صورت حلقه در اطراف طوقه و ساقه و گسترش آن روی کوتیلدون

۳= افتادگی برگ‌های گیاه و زردی و پژمردگی قسمت‌های هوایی گیاه به‌جز برگهای جوان

۴- آلودگی، افتادگی و پژمردگی کل قسمت‌های هوایی گیاه

۵= مرگ و خشکیدگی کامل گیاه.

ارزیابی میزان پروتئین کل قابل حل در عصاره

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

استخراج پروتئین از بافت گیاه (روش ریونی و همکاران)

به ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاه خیار نمونه‌برداری شده طبق بند قبلی در یک ویال ۲ میلی‌لیتری، یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH =۶ اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و توسط میکروسانتریفوژ در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه در چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. مایع رویی برای انجام آزمایش‌ها جداسازی و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Reuveni, 1995). از این عصارهٔ استخراج شده جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل‌اکسیداز استفاده شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (روش گنگ و همکاران)

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش ارائه شده توسط گنگ و همکاران (Gong *et al.*, 1997) به شرح زیر ارزیابی شد:

مقداری از عصاره دارای ۴۰ میکروگرم پروتئین (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، با بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷ به حجم دو میلی‌لیتر رسانده و سپس در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده و دستگاه کالیبره شد. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از H_2O_2 ٪۳ به مخلوط واکنش اضافه و میزان جذب نور به مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس مقدار تجزیه شدن H_2O_2 اندازه‌گیری می‌شود. جذب محلول‌ها در ۲۴۰ نانومتر نسبت به آب با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت شد.

فعالیت کاتالاز بر اساس میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین (ΔOD /Min./mg. protein) در چهار تکرار اندازه گیری شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (روش ریونی و همکاران)

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره دارای ۵۰ میلی‌گرم پروتئین (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، با ۵ میلی‌مولار گوئیکول و مقدار کافی بافر فسفات ۲۵ میلی‌مول pH= ۷ به حجم نهایی دو میلی‌لیتر رسانده شد. این ترکیب در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت و دستگاه با استفاده از این مخلوط در طول موج ۴۷۰ نانومتر صفر گردید. سپس ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ٪۳۰ به این مخلوط اضافه شد و سریعاً تغییرات جذب نور به فواصل ۱۰ ثانیه، به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم برحسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (ΔOD /Min./mg. protein) (Reuveni, 1995).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (روش شی و همکاران)

۱۰۰ گرم از بافت گیاهان تیمار شده، در ۶/۵ میلی‌لیتر از بافر تریس اسیدی با pH ۶/۵ ۵۰ میلی‌مولار حاوی ۱۵ میلی‌مولار بتامرکاپتواتانول، ساییده شد و عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس از محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL استفاده شد. دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر محلول بافر تریس اسیدی (Tris-HCl) ۵۰ میلی‌مولار با pH=۶/۵ و L- فنیل‌آلانین ۱۰ میلی‌مولار که به آن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی اضافه شده بود، تهیه گردید. این مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجهٔ سلسیوس تیمار شد. سپس واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر از اسیدکلریدریک شش نرمال به هر لوله، متوقف شد. در نهایت، به محلول حاصل ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه شد. سپس فاز روغنی تشکیل شده جداسازی و باقیمانده آن در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا تبخیر شود. بعد از تبخیر اتیل استات، باقیماندهٔ ته لوله که همان ترانس سینامیک اسید بود، در سه میلی‌لیتر NaOH ۰/۰۵ مولار حل شد و غلظت اسید سینامیک

با اندازه‌گیری میزان جذب برای هر لوله توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در λ= max ۲۹۰nm اندازه‌گیری شد. یک واحد از فعالیت آنزیم PAL معادل ۱میکرومول از اسید سینامیک تولید شده در یک دقیقه است (Wang *et al*., 2006).

آنالیز آماری

برای هر آزمایش سه تکرار در نظر گرفته شد. در این آزمون هر گلدان که در آن یک گیاه قرار داشت به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. داده‌ها بعد از یادداشت‌برداری به‌وسیلهٔ نرم‌افزار آماری SAS مورد آنالیز قرار گرفتند. آزمون مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش چند دامنهٔ دانکن در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سطح احتمال یک درصد انجام گرفت.

نتایج

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مربوط به اثر تیمارهای مختلف (آویشن دنایی، متالاکسیل- مانکوزب، فوزتیل آلومینیوم) بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نقاط زمانی مختلف نمونه‌برداری نشان داد که بین پنج نقطه زمانی نمونه‌برداری (فاکتور A)، سطوح مختلف تیمارها (فاکتور B) و اثرات متقابل زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و تیمارهای مختلف شامل آویشن دنایی، متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم (فاکتور A × فاکتور B) تفاوت معنی‌دار وجود داشت. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که از نظر آماری بین روزهای مختلف نمونه‌برداری از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز اختلاف معنی‌دار وجود داشت. به بیان دیگر، بدون در نظر گرفتن تیمارهای متفاوت (شکل ۱)، فعالیت این آنزیم از روز اول نمونه‌برداری (دو روز بعد از تلقیح با بیمارگر) افزایش پیدا کرد و این افزایش تا روز ششم، تا ΔOD/Min/mg protein ۱/۳۲ ادامه یافت و سپس از روز ششم روند نزولی داشت. در روز دهم نمونه‌برداری تا ΔOD/Min/mg protein ۰/۸۹ کاهش یافت.

بر اساس شکل ۲ بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به تیمار گیاه خیار آلودهٔ تیمار شده با غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم بوده که در ششمین روز بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر این میزان فعالیت به میزان ΔOD/Min/mg protein ۱/۹۵ مشاهده شد. روند فعالیت این آنزیم تا روز ششم افزایشی و سپس کاهشی بود. به این صورت که در روز دهم بعد از آلوده‌سازی خیارها با عامل بیمارگر، میزان فعالیت این آنزیم در تیمار فوزتیل آلومینیوم کاهش یافت و به ΔOD/Min/mg protein ۱/۲۹ رسید. تیمار استفاده از قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم در تمام روزهای نمونه‌برداری نسبت به همهٔ تیمارهای دیگر دارای اختلاف معنی‌دار از نظر سطح فعالیت آنزیم بود. در کلیهٔ روزهای نمونه‌برداری، فعالیت آنزیم در تیمار متالاکسیل-مانکوزب به‌صورت معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. به غیر از روز هشتم در بقیهٔ روزها میزان فعالیت آنزیم در تیمار آویشن دنایی بیشتر از تیمار متالاکسیل-مانکوزب بود و این اختلاف به‌صورت معنی‌دار بروز پیدا کرد. این مطلب نشان‌دهندهٔ این موضوع است که تیمار آویشن دنایی قادر به افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسهٔ با تیمار متالاکسیل-مانکوزب نیست. در روز دهم بعد از نمونه‌برداری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمام تیمارها نسبت به روز هشتم کاهش یافت، اما باز روند فعالیت آنزیم در مورد تیمارهای مختلف مشابه با سایر روزها بود (شکل ۲). با توجه به شکل ۳، روند کلی میزان فعالیت پراکسیداز تا روز ششم افزایش و سپس کاهشی بود. به عبارت دیگر، همهٔ تیمارها قادر به افزایش فعالیت این آنزیم، نسبت به شاهد بودند. نکته مهم‌تر آنکه، این آنزیم تحت تأثیر روزهای نمونه‌برداری نیز قرار داشت.

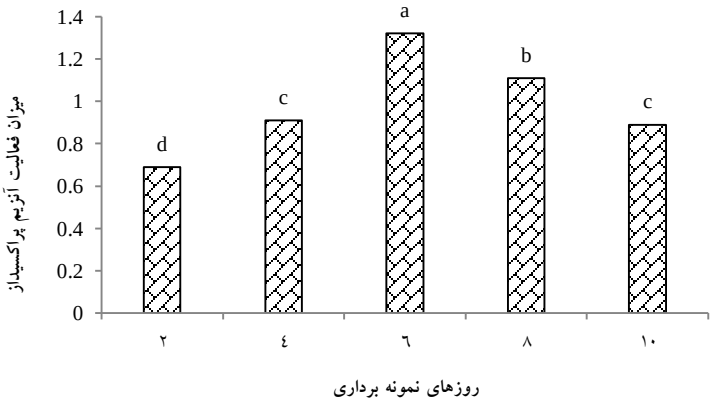
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر کاربرد تیمارهای مختلف و بیمارگر *Phytophthora* sp. بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در خیار مایه‌زنی شده با تیمارهای مختلف شامل عصارهٔ گیاه آویشن دنایی، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم

Table 1. Variance analysis of the effect of different treatments and pathogens of Phytophthora sp. On the amount of peroxidase enzyme activity (absorption changes per minute per milligram of protein) in the inoculated cucumber plant with different treatments, including the extract of the thyme plant, and metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum fungicides.

منبع تغییرات (S.O.V)		درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
روزهای نمونه‌برداری (فاکتور A)	Sampling days (A)	4	2.7	0.68	416.96**
تیمارهای مختلف (فاکتور B)	Different treatments (B)	3	8.34	2.78	1683.25**
تیمارهای مختلف × روزهای نمونه‌برداری (فاکتورA×B)	A×B	12	0.67	0.05	33.88**
خطای آزمایش	Error	40	0.06	0.0016	
کل	Total	59			

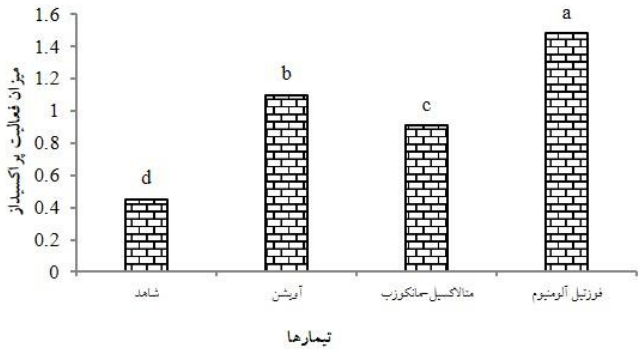
** به احتمال ۹۹ درصد ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌دار است. C.V= ٪۴/۱۰، داده‌ها نرمال بودند.

** There is a significant difference with a probability of 99% ($P\leq0.01$). C.V= 4.10%, the data were normal.



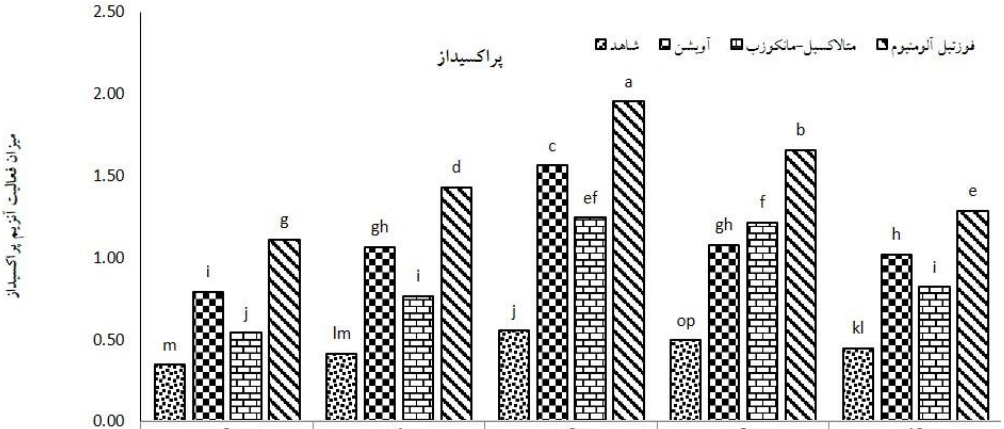
شکل ۱- اثر تیمارهای مختلف شامل عصارهٔ آویشن دنایی (غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام)، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم (غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، طی روزهای مختلف نمونه‌برداری، حروف مختلف نشان‌دهندهٔ سطوح مختلف معنی‌داری در سطح ۹۹درصد هستند.

Fig. 1. The effect of different treatments including Thyme Denai extract (concentration 1500 ppm), and fungicides metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum (concentration 150 ppm) on peroxidase enzyme activity, during different days of sampling, different letters indicate They give different levels of significance at the 99% level.



شکل ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز بین تیمارهای مختلف (شامل عصارهٔ آویشن دنایی (غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام)، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم (غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام) در گیاه خیار، حروف مختلف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنهٔدانکن در سطح ۹۹درصد هستند.

Fig. 2. Comparison of the average activity of peroxidase enzyme between different treatments (including Denai thyme extract (concentration 1500 ppm), and metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum fungicides (concentration 150 ppm) in cucumber plant, different letters indicate the difference They are significant based on Duncan's multiple range test at the 99% level.



	2	4	6	8	10
شاهد	0.35	0.41	0.55	0.50	0.44
آویشن	0.79	1.06	1.56	1.08	1.02
متالاکسیل-مانکوزب	0.54	0.77	1.24	1.21	0.82
فوزتیل آلومنیوم	1.11	1.43	1.95	1.66	1.29

شکل ۳- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (الف) در تیمارهای مختلف (شامل اسانس آویشن دنایی (غلظت ۱۵۰۰ پی پی ام)، و قارچکش های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم (غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام) 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 ۹۹درصد هستند.

Fig. 3. Comparison of the average activity of peroxidase enzymes (a) in different treatments (including Denai thyme essential oil (concentration 1500 ppm), and metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum fungicides (concentration 150 ppm) and different sample days Vector, in cucumber plant, numbers (absorption changes per minute in mg of protein), numbers are average of four replicates, different letters indicate significant difference based on Duncan's multiple range test at 99% level.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

جدول ۲ نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز در روزهای مختلف نمونه‌برداری نشان می‌دهد که بین روزهای مختلف نمونه‌برداری (فاکتور A)، سطوح مختلف تیمارهای مختلف (فاکتور B)، و همچنین اثرات متقابل روزهای نمونه‌برداری با تیمارهای مختلف (فاکتور A × فاکتور B) تفاوت معنی‌داری (P≥۰/۰۱) در فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه خیار وجود داشت.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر کاربرد تیمارهای مختلف و بیمارگر *Phytophthora* sp. بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در خیار مایه‌زنی شده با تیمارهای مختلف شامل اسانس گیاه آویشن دنایی، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل-مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم

Table 2. Variance analysis of the effect of different treatments and pathogens of Phytophthora sp. On the amount of catalase enzyme activity (absorption changes per minute per milligram of protein) in inoculated cucumber subjected to different treatments, including the essential oil of the Denai thyme plant, and the fungicides metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum.

منبع تغییرات (S.O.V)		درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
روزهای نمونه‌برداری (فاکتور A)	Sampling days (A)	2	5.06	1.26	255.30**
تیمارهای مختلف (فاکتور B)	Different treatments (B)	3	25.61	8.53	1720.32**
تیمارهای مختلف × روزهای نمونه‌برداری (فاکتورA×B)	A×B	12	1.52	0.12	25.61**
خطای آزمایش	Error	40	0.198	0.004	
کل	Total	59			

/** به احتمال ۹۹ درصد (P≤0.01) اختلاف معنی‌دار است. CV= ٪۲/۸۸

**There is a significant difference with a probability of 99% (P≤0.01). C.V= 2.88%, the data were normal.

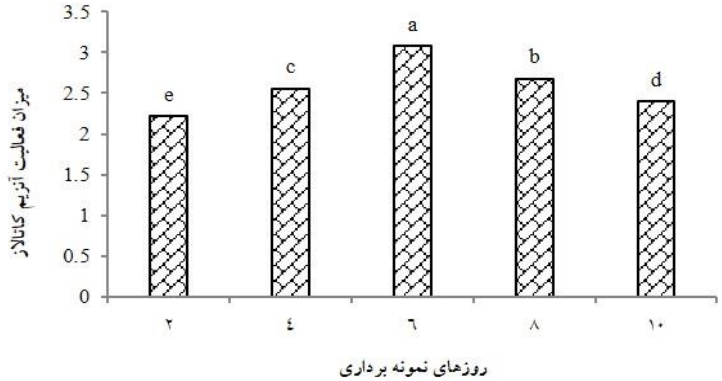
با توجه به شکل‌های ۴، ۵ و ۶ بین روزهای مختلف نمونه‌برداری، تیمارهای مختلف و اثرات متقابل این دو با هم از نظر فعالیت آنزیمی اختلاف معنی‌دار وجود داشت. به بیان دیگر، زمان و تیمارهای مختلف فاکتورهایی هستند که توانستند فعالیت آنزیم کاتالاز را تحت تأثیر خود قرار دهند. بنابر شکل‌های ۴، ۵ و ۶، با افزایش روزهای نمونه‌برداری (تا روز ششم) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش پیدا کرد و بین سطوح مختلف تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت. بین تیمارهای مختلف مورد مطالعه تیمار استفاده از قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم با میزان ΔOD/Min/mg protein ۳/۲۹، بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را در بین تیمارهای مورد مطالعه از خود نشان داد.

بین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در روزهای نمونه‌برداری از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود داشت و بیشترین فعالیت آنزیم در ششمین روز پس از مایه‌زنی، با میزان ΔOD/Min/mg protein ۳/۰۷ مورد مشاهده قرار گرفت.

فعالیت این آنزیم در اثر مایه‌زنی توأماً تیمارهای مختلف شامل آویشن دنایی و قارچ‌کش‌های متالاکسیل-مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم هر یک با شبه قارچ بیمارگر از اولین نقطهٔ زمانی پس مایه‌زنی در گیاه خیار دارای اختلاف معنی‌دار با هم بودند (شکل ۶).

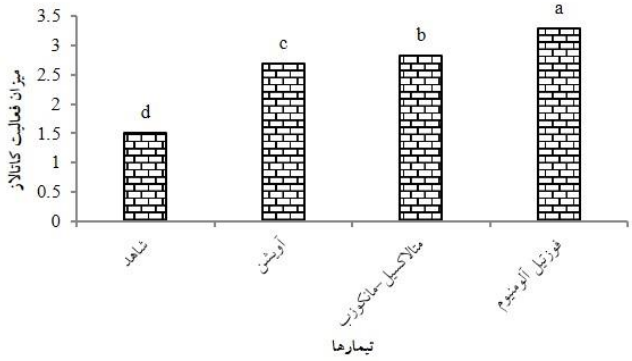
در مورد این آنزیم مشابه با پراکسیداز، بین اثرات متقابل دو فاکتور روزهای نمونه‌برداری با تیمارهای مورد مطالعه، از نظر میزان فعالیت آنزیم اختلاف معنی‌دار وجود داشت. به عبارت دیگر، اثر تیمارهای مختلف با این‌که روند مشابهی را در روزهای مختلف نمونه‌برداری از خود نشان می‌دادند، اما در روزهای مختلف نمونه‌برداری، تیمارهای مختلف به یک میزان نتوانستند میزان فعالیت این آنزیم را تغییر بدهند. بنا بر شکل ۶، بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به تیمار گیاه خیار آلودهٔ

تیمار شده با قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم بوده که در ششمین روز بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر، فعالیت آنزیم به ۳/۰۷ ΔOD/Min/mg protein رسید، روند فعالیت این آنزیم ابتدا افزایشی و سپس کاهشی بود؛ به این صورت که تا روز ششم میزان فعالیت آنزیم افزایش یافت و در روزهای هشتم و دهم بعد از آلوده‌سازی خیارها با عامل بیمارگر، میزان فعالیت آنزیم‌ها در کلیهٔ تیمارها کاهش پیدا کرد. تیمار استفاده از فوزتیل آلومینیوم همراه با شبه قارچ بیمارگر در تمام روزهای نمونه‌برداری نسبت به همهٔ تیمارهای دیگر دارای اختلاف معنی‌دار از نظر سطح فعالیت آنزیم بود. در کلیهٔ روزهای نمونه‌برداری، فعالیت آنزیم در تیمار قارچ‌کش متالاکسیل- مانکوزب به‌صورت معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (شکل ۶).



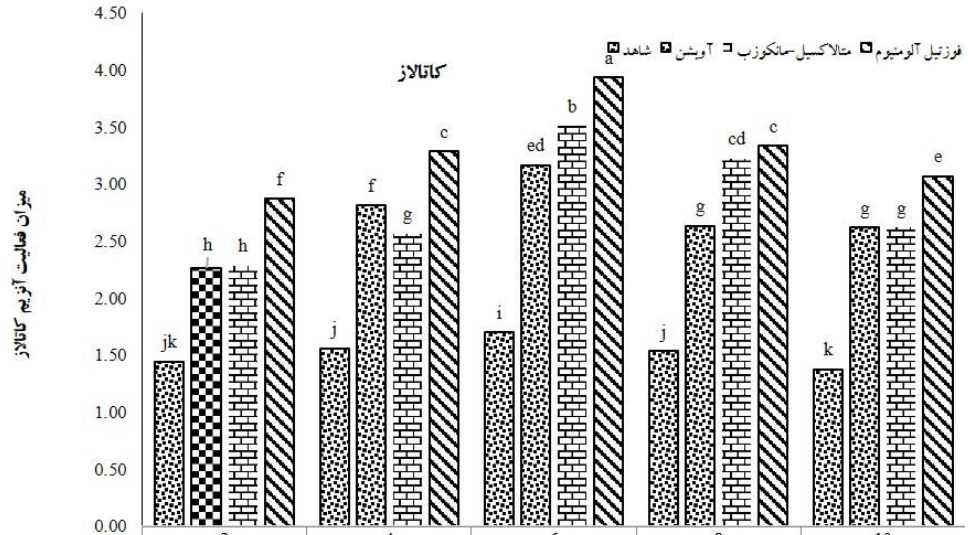
شکل ۴- اثر تیمارهای مختلف شامل عصارهٔ آویشن دنایی (غلظت ۱۵۰۰ پی پی ام)، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم (غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام) بر فعالیت آنزیم کاتالاز، طی روزهای مختلف نمونه‌برداری، حروف مختلف نشان‌دهندهٔ سطوح مختلف معنی‌داری در سطح ۹۹درصد هستند.

Fig. 4. The effect of different treatments including Thyme Denai extract (concentration 1500 ppm), and fungicides metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum (concentration 150 ppm) on catalase enzyme activity, during different days of sampling, different letters indicate They give different levels of significance at the 99% level.



شکل ۵- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز بین تیمارهای مختلف (شامل اسانس آویشن دنایی (غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام)، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم (غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام) در گیاه خیار، حروف مختلف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنهٔ‌دانکن در سطح ۹۹درصد هستند.

Fig. 5. Comparison of the average catalase enzyme activity between different treatments (including Denai thyme essential oil (concentration 1500 ppm), and metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum fungicides (concentration 150 ppm) in cucumber plants, different letters indicate the difference They are significant based on Duncan's multiple range test at the 99% level.



	2	4	6	8	10
شاهد	1.45	1.56	1.70	1.54	1.38
آویشن	2.27	2.82	3.17	2.64	2.62
متالاکسیل-مانکوزب	2.29	2.57	3.51	3.23	2.62
فوزتیل آلومینیوم	2.87	3.29	3.94	3.34	3.07

روزهای نمونه برداری

شکل ۶- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (الف) در تیمارهای مختلف (شامل اسانس آویشن دنایی (غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام)، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم (غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام) 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 ۹۹درصد هستند.

Fig. 6. Comparison of the average activity of catalase enzymes (A) in different treatments (including Denai thyme essential oil (concentration 1500 ppm), and metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum fungicides (concentration 150 ppm) and different sample days. Vector, in cucumber plant, numbers (absorption changes per minute in mg of protein), numbers are average of four replicates, different letters indicate significant difference based on Duncan's multiple range test at 99% level.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

جدول ۳ نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر روی فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در حضور بیمارگر در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان می‌دهد که بین روزهای مختلف نمونه‌برداری (فاکتور A)، تیمارهای مختلف (فاکتور B)، و همچنین اثرات متقابل تیمارهای مختلف با روزهای مختلف نمونه‌برداری (فاکتور A × فاکتور B) تفاوت معنی‌داری ($P\geq$۰/۰۱) در فعالیت آنزیم PAL در گیاه خیار وجود داشت.

بر اساس شکل‌های ۷، ۸ و ۹ بین روزهای مختلف نمونه‌برداری، تیمارهای مختلف و اثرات متقابل این دو با هم از نظر فعالیت آنزیمی اختلاف معنی‌دار وجود داشت. به بیان دیگر، زمان و تیمارهای مختلف فاکتورهایی هستند که توانستند فعالیت آنزیم را تحت تأثیر خود قرار دهند. همان‌طوری‌که شکل ۷ نشان می‌دهد با افزایش روزهای نمونه‌برداری تا روز ششم فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز افزایش پیدا کرد و بین اثر تیمارهای مختلف نیز اختلاف معنی‌دار وجود داشت. 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 ششمین روز پس از مایه‌زنی ثبت شد (شکل ۷).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر کاربرد تیمارهای مختلف و بیمارگر *Phytophthora* sp. بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در خیار مایه‌زنی شده با تیمارهای مختلف شامل اسانس گیاه آویشن دنایی، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم

Table 3. Variance analysis of the effect of different treatments and pathogens of Phytophthora sp. On the amount of phenyl-alanine-ammonialyase enzyme activity (absorption changes per minute per milligram of protein) in inoculated cucumber subjected to different treatments, including the essential oil of the thyme plant, and the fungicides metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum.

منبع تغییرات (S.O.V)		درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
روزهای نمونه‌برداری (فاکتور A)	Sampling days (A)	4	20.75	5.21	781.15**
تیمارهای مختلف (فاکتور B)	Different treatments (B)	3	92.70	30.90	4328.36**
تیمارهای مختلف × روزهای نمونه‌برداری (فاکتورA×B)	A×B	12	7.07	0.58	88.29**
خطای آزمایش	Error	40	0.26	0.0066	
کل	Total	59			

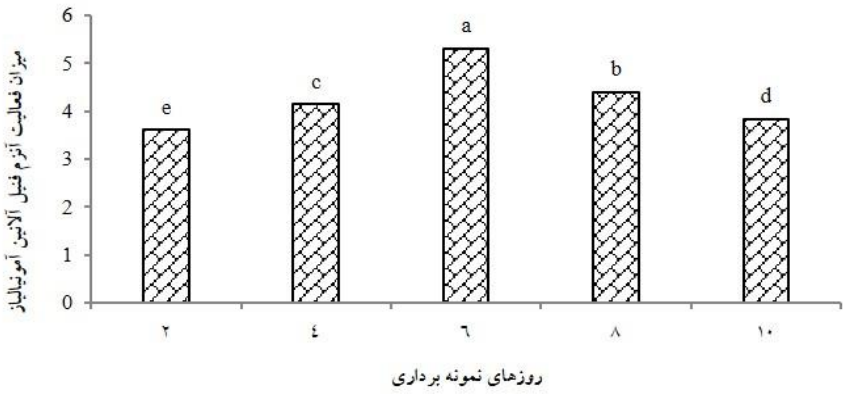
** به احتمال ۹۹ درصد ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌دار است. CV= ٪۱/۹۷

** There is a significant difference with a probability of 99% ($P\leq0.01$). CV = 1.97%

همان‌طور که ۹ نشان می‌دهد بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز مربوط به تیمار خیار آلودهٔ تیمار شده با قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم بوده که در روز ششم بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر، فعالیت آنزیم به میزان ۵/۳۰ ΔOD/Min/mg protein مشاهده شد، روند فعالیت این آنزیم افزایشی و کاهشی بود به این‌صورت که تا روز ششم میزان فعالیت آنزیم افزایش یافت و در روزهای هشتم و دهم بعد از آلوده‌سازی گیاهان خیار با عامل بیمارگر، میزان فعالیت آنزیم‌ها در کلیهٔ تیمارها کاهش پیدا کرد. در مورد این آنزیم نیز همانند آنزیم‌های قبلی اثر متقابل روزهای نمونه‌برداری و تیمارهای مختلف از نظر تأثیر بر روی میزان فعالیت آنزیم PAL در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. استفاده از قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم در تمام روزهای نمونه‌برداری نسبت به همهٔ تیمارهای دیگر بیشتر و دارای اختلاف معنی‌دار از نظر سطح فعالیت آنزیم بود. در کلیهٔ روزهای نمونه‌برداری، فعالیت آنزیم در تیمار متالاکسیل- مانکوزب به‌صورت معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. در تمام روزهای نمونه‌برداری به غیر از روز دوم اختلاف معنی‌داری بین تیمار استفاده از اسانس گیاه آویشن دنایی و قارچ‌کش متالاکسیل – مانکوزب وجود داشت و همواره فعالیت این آنزیم در تیمار استفاده از اسانس گیاه آویشن دنایی بیشتر از قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم بود (شکل ۹).

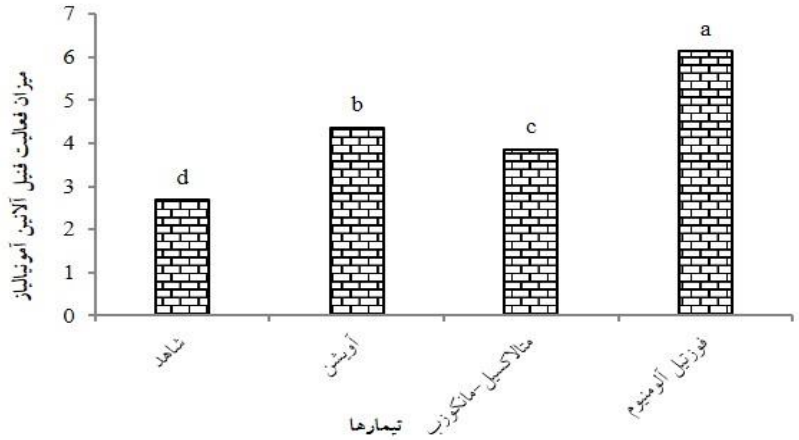
بحث

استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی توسط انسان لطمه‌های جبران‌ناپذیری را به محیط زیست وارد نموده است. علاوه بر این به‌علت استفاده مداوم از این ترکیبات، آفات و بیماری‌های گیاهی به این سموم مقاوم شده و نیاز به افزایش دز را اجتناب‌ناپذیر ساخته است (Gholamnezhad *et al.*, 2016). مشکلات زیست‌محیطی که دنیای امروز با آن روبروست ناشی از برخورد غیر منطقی انسان با محیط زیست و استفاده از منابع پایه است. به‌طوری‌که به جای آینده‌نگری و در نظرگیری منافع دراز مدت، با هجوم بی‌وقفه و استفاده بی‌رویه از منابع، منافع کوتاه مدت را ترجیح داده و با تداوم این خط مشی، مسیر قهقرایی و زوال آن را برای خویش رقم زده است. از سوی دیگر رشد فزاینده جمعیت مستلزم غذای بیشتر و در نهایت استفاده از نهاده‌های شیمیایی اجتناب‌ناپذیر است (Gholamnezhad *et al.*, 2019).



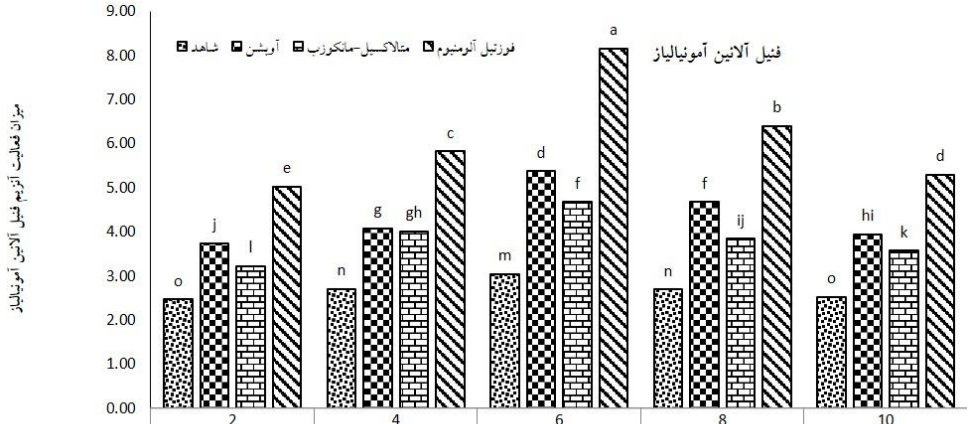
شکل ۷- اثر تیمارهای مختلف شامل اسانس آویشن دنایی (غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام)، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم (غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام) بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، طی روزهای مختلف نمونه‌برداری، حروف مختلف نشان‌دهندهٔ سطوح مختلف معنی‌داری در سطح ۹۹درصد هستند.

Fig. 7. The effect of different treatments, including Denai thyme essential oil (concentration 1500 ppm), and metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum fungicides (concentration 150 ppm) on the activity of phenylalanine ammonia-lyase enzyme, during different days of sampling, different letters indicate They give different levels of significance at the 99% level.



شکل ۸- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز بین تیمارهای مختلف (شامل اسانس آویشن دنایی (غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام)، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم (غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام) در گیاه خیار، حروف مختلف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنهٔدانکن در سطح ۹۹ درصد هستند.

Fig. 8. Comparison of the average activity of the phenylalanine ammonia-lyase enzyme between different treatments (including thyme essential oil (concentration 1500 ppm), and fungicides metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum (concentration 150 ppm) in cucumber plants, different letters indicating Significant differences are based on Duncan's multiple range test at the 99% level.



	2	4	6	8	10
شاهد	2.47	2.71	3.05	2.69	2.51
آویشن	3.74	4.08	5.37	4.67	3.94
متالاکسیل-مانکوزب	3.22	4.01	4.67	3.84	3.57
فوزتیل آلومنیوم	5.03	5.82	8.15	6.39	5.30

شکل ۹- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (الف) در تیمارهای مختلف (شامل اسانس آویشن دنایی (غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام)، و قارچ‌کش‌های متالاکسیل- مانکوزب و فوزتیل آلومینیوم (غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام) 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. Comparison of the average activity of phenylalanine ammonia-lyase enzymes (a) in different treatments (including Danai thyme essential oil (concentration 1500 ppm), and metalaxyl-mancozeb and fusitel aluminum fungicides (concentration 150 ppm)) and different days Sampling, in cucumber plant, numbers (absorption changes per minute in mg of protein), numbers are the average of four replicates, different letters indicate significant difference based on Duncan's multiple range test at the 99% level.

با توجه به موارد ذکر شده، در سال‌های اخیر گرایش زیادی به استفاده از پتانسیل بالقوه مواد بیولوژیکی و همچنین مواد با منشأ طبیعی در کنترل حشرات، بیماری‌ها وعلف‌های هرز ایجاد شده است. استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهی یکی از موارد جایگزینی است که استفاده از آن همواره مدنظر محققین این رشته بوده است (Gholamnejad *et al.*, 2016).

خاصیت تجزیه‌پذیری عصاره و اسانس‌های گیاهی در طبیعت و سمیت پایین آن‌ها برای انسان و سایر پستانداران و همچنین نداشتن اثرات مخرب کمتر آن‌ها بر محیط‌زیست، این ترکیبات را به‌عنوان مواد جایگزین سموم شیمیایی مطرح کرده است. عصاره‌های گیاهی با داشتن مواد و عناصر غذایی در افزایش رشد گیاه مفید بوده و برای انسان و محیط زیست بی‌خطر هستند (Bakkali *et al.*, 2008). در تحقیقات متعددی اثرات ضدقارچی عصاره گیاهانی مانند اسطوخودوس و آویشن دنایی به اثبات رسیده است (Beiko *et al.*, 2008). در تحقیقی اثرات بازدارندگی عصاره‌های هگزانی،کلروفرمی، دی‌اتیل‌اتری و اتانولی هفت گونهٔ گیاهی علیه دو قارچ بیماری‌زای گیاهی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد فاز هگزانی عصاره‌های گیاه آویشن کوهی و پونه مؤثرترین عصاره‌ها بر علیه هر دو بیمارگر عمل کردند (Beiko *et al.*, 2008).

گزارش های متعددی وجود دارد که نشان دهنده خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی است. ترکیباتی مانند بتا پینن، آلفا پینن، لینالول و کامفور از جمله آن‌هاست. از دیگر ترکیباتی که خاصیت ضدقارچی دارند، می‌توان به سینئول، سیمن، کامفن و آلفا ترپ ینئول، کارواکرول، لیمونن، کارون و برنئول

اشاره نمود (Soltani *et al.*, 2007). تیمول یکی از مهم‌ترین ترکیبات عصاره و اسانس‌های گیاهانی مانند آویشن دنایی، اسطوخودوس، رازیانه می‌باشد (Stepanova *et al.*, 2008).

مقاومت القایی که از آن به‌عنوان مقاومت سیستمیک القایی نیز یاد می‌شود، ترکیبی از فرآیندهای بیوشیمیایی با مکانیسم‌های متفاوت است. مقاومت القایی ممکن است با ترکیبات شیمیایی (مولکول‌های محرک) مانند اسید سالیسیلیک یا توسط تعدادی از میکروارگانیسم‌ها و همچنین ترکیباتی شیمیایی مانند فوزتیل آلومینیوم ایجاد شود (Bahraminejad *et al.*, 2008). یکی از روش‌های مدیریتی مهم در کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده از القاگرهای مقاومت به بیماری (Plant Resistance Inducers) می‌باشد که از طریق القای واکنش‌های دفاعی در گیاه، منجر به کاهش بیماری می‌گردند (Gholamnezhad *et al.*, 2016). این القاگرها می‌توانند ترکیبات شیمیایی سنتزی یا ترکیباتی با منشأ طبیعی مانند عصاره‌ها یا اسانس‌های گیاهی باشند.

دامنه وسیعی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در انواع ترکیبات سلولی مربوط به گیاهان مختلف شناسایی شده است (Chandru *et al.*, 2003). فعالیت هم‌زمان سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) آسکوربات پراکسیداز (APX)، مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR)، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) و گلوتاتیون S-ترانسفراز (GR) به‌عنوان قسمتی از سامانه آنتی‌اکسیدانی می‌تواند سلول را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) حفاظت کند. سلول‌های گیاهی برای مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species) تولید شده تحت شرایط تنش با دو استراتژی اصلی یعنی کاهش ROS در کل ساختار گیاه و همچنین سازگاری فیزیولوژیکی با ROS مقابله می‌کنند (De Gara *et al.*, 2003). واکنش اولیهٔ گیاه به آلودگی توسط عوامل بیماری‌زا به‌وسیله تغییرات متابولیکی مقاومت همچون تولید گونه‌های اکسیژن (ROS) و مقاومت اکتسابی سیستمیک (Systemic Acquired Resistance; SAR) و مقاومت القایی سیستمیک (Induced Systemic Resistance; ISR) ابراز می‌گردد. فعالیت و حضور پروتئین‌های مرتبط با SAR ارتباط مستقیمی با سطح مقاومت و حساسیت گیاه دارد. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی همچون بتا ۱و ۳ گلوکاناز، کیتیناز و پراکسیداز که نقش ضدباکتریایی و ضدقارچی دارند، در ارتباط با مقاومت القایی می‌باشند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی مانند گلوکاناز و کیتیناز نقش ضدباکتریایی و ضدقارچی دارند و در ارتباط با مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاه هستند (El-Gamal *et al.*, 2007).

از نتایج آزمایش مربوط به فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه خیار مایه‌زنی شده با سه تیمار متالاکسیل- مانکوزب، فوزتیل آلومینیوم و اسانس آویشن دنایی این‌طور برداشت می‌شود که از نظر فعالیت این آنزیم دو روز بعد از مایه‌زنی با بیمارگر بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار در گیاه خیار وجود داشت. در مورد تأثیر تیمارهای مورد مطالعه در این تحقیق (متالاکسیل- مانکوزب، فوزتیل آلومینیوم و اسانس آویشن دنایی) و عامل بیمارگر بر روی فعالیت این آنزیم روند به این‌صورت بود که فعالیت آنزیم پرکسیداز در کلیهٔ تیمارها تا روز ششم افزایش پیدا کرد و از روز ششم تا دوازدهم روند کاهشی بود. البته ذکر این نکته در اینجا لازم است که کم یا زیاد شدن فعالیت این آنزیم و همچنین بقیهٔ آنزیم‌های مورد مطالعه صرفاً در روزهایی که نمونه‌برداری انجام شد، به این صورت بوده است، و ممکن است بیشترین فعالیت آنزیم در روز پنجم بوده که البته نمونه‌برداری در آن روز به دلیل زیاد شدن تیمارهای آزمایشی انجام نشده است. از زمانی‌که گیاه مورد حمله قرار می‌گیرد، فعالیت اکسیژن‌های آزاد و به موازات آن آنتی‌اکسیدان هم در جهت کاهش فعالیت تخریبی اکسیژن‌های آزاد و رایکال‌های اکسیژن افزایش می‌یابد. فعالیت پراکسیداز هم از اولین روز نمونه‌بردای افزایش می‌یابد و بعد از رسیدن به نقطهٔ عطف (روز نهم)، به دلیل کاهش میزان اکسیژن‌های آزاد و مشتقات آن در سلول، فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدانی هم کاهش می‌یابد.

همان‌طورکه نتایج بسیاری از مطالعات نشان داده و در این تحقیق هم قبلاً اشاره شد، گیاهان در برابر عوامل بیمارگر از خود عکس‌العمل نشان می‌دهند، که این عکس‌العمل ممکن است در گیاه حساس به بیماری گیاه بیانجامد و یا در گیاهان

مقاوم و متحمل، گیاه بیمار نشود (Wu *et al*., 2011). از طرفی نتایج مطالعات زیادی نشان داده‌اند که گیاه حساس و مقاوم هر دو قادر هستند که فعالیت‌های دفاعی خود و همچنین میزان سنتز ترکیبات دفاعی خود بعد از حملهٔ بیمارگر را افزایش دهند، اما آنچه مقاوم یا حساس بودن گیاه نسبت به بیمارگر را تعیین می‌کند، سرعت این واکنش‌ها است. در گیاهان مقاوم سرعت این واکنش‌ها بسیار بالاتر از گیاهان حساس است؛ به بیان ساده‌تر در گیاه مقاوم، بلافاصله بعد از شناسایی بیمارگر به‌وسیلهٔ گیاه میزان ترکیبات دفاعی گیاه افزایش یافته ولی در گیاه حساس و یا نیمه‌حساس سرعت این افزایش بسیار کندتر است. استفاده از قارچ‌کش‌هایی با خاصیت القای مکانیسم‌های دفاعی مانند فوزتیل آلومینیوم و همچنین اسانس‌های گیاهی مانند آویشن دنایی از آن جهت دارای اهمیت هستند، که بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های این تحقیق، علاوه بر این‌که دارای خاصیت ضدقارچی هستند، دارای اثر القا بر روی میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی نیز هستند (شکل‌های ۳، ۶ و ۹). القا سیسم دفاعی گیاه به‌وسیلهٔ ترکیبات شیمیایی، اسانس و عصاره‌های گیاهی مربوط به موادی است که در این ترکیبات وجود دارد. آنالیز فیتوشیمیایی گونه‌های آویشن، وجود ترکیبات فنلی مانند تیمول، کارواکرول، تیمونین، اسید کافئیک و اسید رزمارونیک، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین را تأیید می‌نماید (Hadji *et al*., 2012).

در پژوهشی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های گونه‌های مختلف جنس آویشن (Thyme) شامل آویشن کوهی مازندران، آویشن شیراز، آویشن دنایی و نیز گیاهان کاکوتی شیراز، کاکوتی مازندران و مرزه بختیاری، بر روی باکتری‌های *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Streptococcus pyogenes*، *Staphylococcus aureus* و همچنین دو گونه از قارچ *Candida albicans* مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در سه بار تکرار بر آزمایش نشان داد که حداقل غلظت بازدازنده (MIC) اسانس مرزه بختیاری بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های مورد آزمایش در مقایسه با اسانس دیگر گیاهان به‌طور معنی‌داری کمتر (MIC با غلظت کمتر از یک درصد) بود. اسانس آویشن دنایی، آویشن شیراز و آویشن مازندران بیشترین اثرات را بر روی مهار رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها داشتند که بسته به نوع اسانس و نوع باکتری یا قارچ، شدت اثر متفاوت است. اسانس گیاهان کاکوتی مازندران و کاکوتی شیراز در مقایسه با سایر اسانس‌ها کمترین اثر را بر روی گونه‌های مختلف باکتری‌ها و قارچ‌های مورد آزمایش نشان داد.

مقاومت القایی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر آفات در پاسخ به محرک‌های فیزیکی یا شیمیایی بیرونی است. در پژوهشی اثر سیلیکات پتاسیم و فوزتیل آلومینیوم بر روی آنزیم‌های دفاعی در جهت ایجاد مقاومت القایی در گیاه گلرنگ مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، ترکیبات القایی (سیلیکات پتاسیم و فوزتیل آلومینیوم) بر آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در سطح احتمال ۱٪ اثر معنی‌داری داشتند. در این بین سیلیکات پتاسیم بیشترین تأثیر را بر روی آنزیم‌های دفاعی داشته است. این پژوهش نشان داد که استفاده از ترکیبات القایی موجب فعال شدن سیستم دفاعی در گیاه می‌شود (Mota *et al*., 2012).

قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم (الیت) با فرمولاسیون WDG 80% قارچ‌کش و باکتری‌کش آلی فسفاته از مشتقات اسید فسفونیک و خانواده الکیل فسفانات است که به‌علت ویژگی‌های خاص و سیستمیک بودن، به سرعت از طریق برگ و ریشه جذب گیاه شده و با حرکت رو به بالا[1] و رو به پایین[2] درگیاه منتشر می‌شود و با فعال کردن مکانیسم دفاعی و تأثیر بر بیمارگر، سبب کاهش رشد بیمارگر و کنترل بیماری می‌گردد. فوزتیل آلومینیوم روی اامیست‌ها به‌طور مستقیم مؤثر نیست؛ بلکه با ایجاد مقاومت در گیاه از طریق تولید فیتوالکسین‌ها[3] نسبت به اامیست‌ها از شدت بیماری می‌کاهد. این ترکیب در هر دو سمت به‌طور یکسان در گیاه حرکت می‌کند. فوزتیل آلومینیوم دارای فعالیت اختصاصی علیه قارچ‌های اامیست، مانند سفیدک

[1] Acropetal

[2] Basipetal

[3] Phytoalexins

دروغی انگور، پوسیدگی طوقه و ریشه درختان، گموز پسته، آتشک سیب و گلابی و شانکر باکتریایی درختان هسته‌دار و نیز انواع سفیدک‌های دروغی و آلترناریا و بوته‌میری در گیاهان زراعی و باغی می‌باشد. این قارچ‌کش در مهار بیماری‌های مذکور از سایر قارچ‌کش‌های موجود موفق‌تر می‌باشد. فوزتیل مثالی کمیاب از محصولاتی است که در آوندهای آبکشی حرکت دارند، که علت آن احتمالاً تجزیه شدن فوزتیل وتولید اسید فسفونیک[4]است. بنابر این جز معدود قارچ‌کش‌هایی است که خاصیت دبل سیستمیک دارد. این قارچ‌کش باعث تحریک مقاومت طبیعی گیاه در برابر بیماری‌ها می‌شود. فوزتیل آلومینیوم از طریق تأثیر در میزان بیوسنتز فیتوآلکیسن‌ها و افزایش غلظت آن باعث ایجاد مقاومت در گیاه می‌شوند. فیتوآلکسین‌ها مولکول‌های فنولیک و ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی هستند که گیاه در پاسخ به آلودگی‌های باکتریایی و قارچی برای دفاع از خود در مقابله با بیماری‌ها تولید می‌کند (Mota *et al.*, 2012).

تحقیقات غلام‌نژاد و همکاران (۱۳۹۲) نشان داد که تیمار سیب‌های آلوده به بیمارگر *P. expansum* با مخمر آنتاگونیست *Rhodotorula mucilaginosa* (A1) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در میوهٔ سیب شد و این افزایش در روز ششم بعد از تلقیح بیمارگر به بیشترین سطح خود رسید. مخمرها متابولیت‌های ثانویه دارند.

پراکسیدازها در فرآیند ساختن دیوارهٔ سلولی مثل اکسیداسیون فنل، سوبرینی کردن و لیگنینی شدن سلول گیاهی در حین دفاع علیه عامل بیماری‌زا شرکت دارند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مثل پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز، ترکیباتی مثل H_2O_2 را به آب تبدیل می‌کنند (Gong *et al.*, 1997) افزایش فعالیت پراکسیداز با القاء مقاومت ارتباط دارد (Lurie *et al.*, 1997). در واقع تجمع پراکسیداز اغلب با شروع القا مقاومت ارتباط دارد. این آنزیم در دفاع علیه بیمارگرها بسیار فعال عمل می‌کند. در گیاهانی که دفاع خیلی دیر اتفاق می‌افتد، بیمارگر به‌راحتی بافت گیاه را کلونیزه می‌کند (Kuc, 2001). مگی و همکاران با مطالعه بر روی تأثیر القاگر اسید بنزوئیک بر روی بیماری لکه شکلاتی باقلا نشان دادند که زمانی‌که از این مادهٔ القاگر به‌صورت پاشش بر روی گیاه استفاده می‌شود، شدت بیماری در مقایسه با شاهد به شدت کاهش و میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز تا ۲ برابر در مقایسه با شاهد افزایش پیدا می‌کند (Maggie *et al.*, 2006).

فعالیت آنزیم کاتالاز نیز تا روز ششم بعد از تلقیح میوه‌های گیاهان خیار با بیمارگر در همهٔ تیمارها افزایشی و از آن روز به بعد به‌صورت کاهشی دیده شد. این روند با روند افزایش و کاهش در مورد آنزیم پراکسیداز همانند بود. به‌عبارتی همهٔ تیمارها به همراه بیمارگر بر روی میزان فعالیت این آنزیم تأثیر گذاشته بودند و میزان آن را افزایش داده بودند. در مورد فعالیت این آنزیم نیز ترکیب شیمیایی فوزتیل آلومینیوم باعث افزایش بیشتری در میزان فعالیت آنزیم نسبت به بقیهٔ تیمارها شد. اگر چه قارچ‌کش متالاکسیل- مانکوزب و اسانس آویشن دنایی نیز مقادیر قابل توجه از القا در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را در گیاه نمایان ساختند. مطالعه‌ای با عنوان تأثیر عصارهٔ گیاه جینکو بیلوبا در بافت‌های مختلف موش صحرایی بر روی دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز انجام شد؛ نتایج نشان داد که این عصاره باعث القای فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت‌های مختلف این موجود ازرجمله قلب می‌شود (Lin and Chang, 1997). در تحقیقی تأثیر چهار عصارهٔ گیاهی شامل *Azardirachta indica*، *Ages mermelos*، *Cassia auriculata* و *Vitex negundo* علیه بیماری سوختگی برگ برنج با عامل *Xanthomonas oryzae* در ارقام برنج حساس مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق تأثیر عصاره‌ها بر روی القای آنزیم‌های دفاعی نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی مانند پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز در این ارقام برنج افزایش پیدا کرد. بر اساس یافته‌های این تحقیق تأثیر عصاره‌های گیاهی در کاهش این بیماری، بیشتر القای سیستم آنزیمی گیاهی می‌باشد، برخلاف آنچه که در بیشتر منابع تأثیر مستقیم عصارهٔ گیاهی علیه خود قارچ ذکرمی‌شود (Nisha *et al.*, 2012).

[4]Phosphonic acid

روند فعالیت آنزیم کاتالاز همانند پراکسیداز بود. این آنزیم هم از نظر عملکرد همانند پراکسیداز عمل می‌کند. آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند و پراکسیداز با اکسیداسیون ترکیبات فنلی پراکسید هیدروژن را تجزیه می‌کند، و همان طور که مشاهده می‌کنیم دقیقاً از نظر کارکرد و سیر فعالیت آنزیم مانند پراکسیداز عمل‌می‌کند. این آنزیم‌ها به همراه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سیستم‌های اصلی آنزیمی سلول در برابر صدمات اکسیداتیو هستند (Wang *et al.*, 2006). پراکسیداز و کاتالاز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت هستند که غلظت پراکسید هیدروژن را تنظیم می‌کنند (Barcelo, 1997). دی‌گارا و همکاران (De Gara *et al.*, 2003) نشان دادند که پراکسید هیدروژن می‌تواند از ورود بیمارگر به داخل بافت از طریق تسهیل و کاتالیز کردن واکنش‌های پراکسیداز در ترکیبات ساختاری دیوارهٔ سلولی و پلی‌مریزاسیون لیگنین که باعث محکم شدن دیواره سلولی می‌شود، جلوگیری کند. در نتیجه سدهای مکانیکی افزایش یافته و سرعت نفوذ عامل بیماری‌زا کاهش می‌یابد و به سلول‌های گیاه اجازه می‌دهد که واکنش‌های دفاعی خود را که برای فعال شدن به زمان بیشتری نیاز دارد، تنظیم کند (Durner *et al.*, 1997).

نتایج مربوط به آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در گیاهان خیار آلوده با بیمارگر و القا شده با تیمارهای مختلف نشان داد که این القاگرها فعالیت این آنزیم‌ها را در گیاه خیار آلوده به بیمارگر افزایش می‌دهد. حضور قارچ بیمارگر در کنار تیمارها باعث افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌ها در مقایسه با کاربرد بیمارگر به تنهایی است. از نظر افزایش میزان فعالیت، این آنزیم هم روندی مانند دو آنزیم قبل را طی کرد. در مورد این آنزیم نیز قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم بیشترین نقش را در افزایش فعالیت آنزیم نشان داد.

از دیگر آنزیم‌های کلیدی که در تولید مولکول‌های اولیه ضروری برای ساخت بیشتر مواد فنلی از جمله فیتوآلکسین‌ها و لیگنین نقش دارد، فنیل‌آلانین‌آمونیولیاز (Phenylalanin ammonia lyase: PAL) است که نقش مهمی در القای مقاومت در گیاه ایفا می‌کند (Gorran *et al.*, 2015). آنزیم PAL نقش مهمی در مقاومت گیاهان در مقابل بیمارگرها از طریق دخالت در مسیرهای ساخت ایزوفلاونوییدها و فنیل پروپانوییدها که فعالیت فیتوآلکسینی دارند، ایفا می‌کند. PAL اولین آنزیم کلیدی و تعیین‌کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل‌پروپانوئیدها است و عمل اصلی آن آمین‌زدایی از اسید آمینه L- فنیل‌آلانین و تبدیل آن به ترانس سینامیک اسید می‌باشد که این ترکیب به‌عنوان اولین و مهم‌ترین حد واسط در مسیر تولید ترکیبات فنلی شناخته می‌شود (Dortant *et al.*, 2001). متابولیت‌هایی که در اثر فعالیت PAL به وجود می‌آیند، به‌عنوان مشتقات فنلی طبقه‌بندی می‌شوند و نقش‌های متعددی مانند شرکت در ترکیب ساختاری میزبان و محافظت مکانیکی آن، تشکیل رنگدانه و مسیرهای پیام دهی، محافظ در برابر اشعه‌های UV و نقش ضدمیکروبی و مقاومت در مقابل آفات و قارچ‌ها را در گیاه بازی می‌کنند. PAL همچنین در ترکیبات لیگنین، سوبرین و دیگر مواد فنلی دیواره سلولی گیاه میزبان مشارکت می‌نماید. این ترکیبات به‌منظور جلوگیری از گسترش هیف‌های قارچ در محل حمله بیمارگر در ساختارهایی همچون پاپیلا تجمع می‌یابند. با افزایش بیان PAL و در اثر آن افزایش میزان ترکیبات فنلی، مقاومت گیاه در برابر تنش‌ها افزایش می‌یابد (Hadian and Rahnama, 2011).

با توجه به پیشرفت‌های گذشته متأسفانه هنوز سازوکارهای مولکولی و بیوشیمیایی درگیر در مقاومت گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده اغلب مورد شناسایی قرار نگرفته است. بنابراین نیاز به دستیابی اطلاعات کافی در زمینهٔ اساس مولکولی و ژنتیکی مقاومت به تنش‌ها احساس می‌شود. این اطلاعات استراتژی‌های مناسبی را جهت دستکاری گیاهان و اصلاح آن‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی و اصلاح نباتات سنتی ایجاد خواهد کرد (Moghaddam and Farhadi, 2015).

در این تحقیق ابتدا نشان داده شد که تیمارهای به‌کار رفته به‌طور مستقیم می‌تواند قارچ بیمارگر را در محیط کشت کنترل کند. در آزمون گلخانه که شبه‌قارچ بیمارگر در تعامل با گیاه خیار بود، باز تیمارهای به‌کار رفته توانستند عامل بیمارگر را بر روی گیاه خیار کنترل کنند. در مراحل بعدی برای این‌که اثبات شود که کنترل بیماری بر روی گیاه خیار بر اساس فقط

کنترل مستقیم شبه قارچ بیمارگر به‌وسیلهٔ عصاره‌های گیاهی بوده است یا خیر، آزمون‌هایی مانند بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های گیاه و میزان بیان ژن‌های متناظر آن‌ها بر روی گیاهان خیاری که تحت تأثیر تیمارهای مورد مطالعه قرار گرفته بودند، انجام گرفت. هر دو آزمون نشان دادند که این تیمارها توانستند ژن‌های دفاعی را در گیاه خیار القا کنند.

علاوه بر اثر مستقیمی که تیمارهای گیاهی بر کاهش رشد شبه‌قارچ بیمارگر دارند، این تیمارها می‌توانند مکانیسم‌های دفاعی را در گیاه تحت تیمار فعال نمایند و از این راه باعث افزایش مقاومت میوه در برابر قارچ بیمارگر شوند. نتایج مطالعات دیگر که در مورد بررسی بیان ژن‌های رمزکنندهٔ آنزیم‌ها و همچنین بررسی فعالیت خود آنزیم‌ها بوده است، نشان داده است که با بالا رفتن میزان بیان ژن‌های رمز کنندهٔ این آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز، میزان فعالیت این آنزیم‌ها نیز افزایش می‌یابد و عصاره‌های گیاهی می‌توانند به‌عنوان عامل محرک افزایش فعالیت‌های آنزیمی و در نتیجه افزایش مقاومت گیاهی عمل نمایند (Gholamnejad *et al.*, 2009).

منابع References

ارشاد ج. ۱۳۷۲. گونه Phytophthora در ایـران (جداسـازی، خالص‌سازی، شنـاسایی). سازمان تحقـیقات کشاورزی، ۲۱۵ صفحه.

اعتباریان، ح. ر. ۱۳۹۲. بیماری‌های سبزی و کدو و کنترل آنها. انتشارات دانشگاه تهران، ۶۰۰ صفحه.

غلام‌نژاد، ج.، اعتباریان، ح. و ناصری‌نسب، ف. ۱۳۹۲. القای پاسخ‌های دفاعی و کنترل بیولوژیک کپک آبی سیب *Penicillium expansum* به وسیلهٔ مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* (A1). مجله تحقیقات بیماری‌های گیاهی ۱(۴): ۴۵-۵۷.

Amini, M., Safaie, N., Salmani, M. J. and Shams-Bakhsh, M. 2012. Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. Anniversary Edition Trakia Journal of Science 10 (1): 1-8.

Amvam Zollo, P. H., Biyti, L., Tchoumbougnang, F., Menut, C., Lamaty, G. and Bouchet, P. 1998. Aromatic plants of tropical central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. Flavour Fragrance Journal 13: 107-114.

Arras, G. and Vsai, M. 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *thymus capitates* oil and its effectin subatomospheric pressure condition. Journal of Food Protection 64: 1025-1029.

Bahraminejad, S., Asenstorfer, R. E., Riley, I. T. and Schultz, C. J. 2008. Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots oats (*Avena sativa* L.). Journal of Phytopathology 156: 1-7.

Bajpai, V. K., Lee, T. J. and Kang, S. C. 2008. Chemical composition and in vitro control of agricultural plant pathogens by the essential oil and various extracte of *Nandina domestica* Thunb. Journal of Science of Food and Agriculture 89: 109-116.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. Food and Chemical Toxicology 46: 446-475.

Barcelo, A. R., 1997. Lignification in plant cell walls. International Review of Cytology 176: 87–132.

Beiko, R. G., Doolittle, W. F. and Charlebois, R. L. 2008. The impact of reticulate evolution on genome phylogeny.Systematic and Biology 57: 844–856.

Bi, Y., Jiang, H., Hausbeck, M. K. and Hao, J. J. 2012. Inhibitory effect of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. Plant Disease 96: 797-803.

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

British pharmacopoeia. 1988. vol 20, Hmso. London, pp.137-138.

Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G. and Kopelowitz, J. 2005. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. Plant Disease 89(12): 1339-1347.

Chandru, H. K., Kim, E., Kuk, Y., Cho, K. and Han, O. 2003. Kinetics of wound- induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth stages. Plant Science 164: 935-941.

De Gara, L., de Pinto, M. C. and Tommasi, F. 2003. The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. Plant Physiology and Biochemistry 41: 863–870.

Dortant, P., Peters-volleberg, G., Van loveren, H., Marquardt, R. and Speijers, G. 2001. Age-related differences in the toxicity of ochratoxin A in female rats. Food and Chemical Toxicology 39: 55-65.

Durner, J., Shah, J. and Klessig, D. F. 1997. Salicylic acid and disease in plants. Trends in Plant Science 2: 266–274.

El-Gamal, N. G., Abd-El-Kareem, F., Fotouh, Y. O. and El Mougy, N. S. 2007. Induction of systemic resistance in potato plants against late and early blight diseases using chemical inducers under greenhouse and field conditions, Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 3(2): 73–81.

Fillion, M., ST-Arnadus, M. and Jabaji-Hare, H. 2003. Quantification of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolation on selective media. Phytopathology 93: 229-235.

Ghasemi, S., Khoshgoftarmanesh, A. H., Afyuni, M. and Hadadzadeh, H. 2013. The effectiveness of foliar applications of synthesized zinc-amino acid chelates in comparison with zinc sulfate to increase yield and grain nutritional quality of wheat. European Journal of Agronomy 45: 68-74.

Gholamnejad, J., Etebarian, H. R., Roustaee, A. and Sahebani, N. 2009. Biological control of apple blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection Research 49: 270-275.

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

Gholamnejad, 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: 1-10.

Gholamnejad, J., Sanjarian, F., Goltapeh, E. M., Safaei, N. and Razavi, K. 2016. Effect of salicylic acid on enzyme activity in wheat on immediate early time after infection with *Mycosphaerella graminicola.* Scientia Agriculturae Bohemica 47(1): 1–8.

Gong, M., Li, Y., Dai, X., Tian, M. and Li, Z. 1997. Involvment of calcium and calmodulin in the acquisition of HS inuced thermotolerance in maize seeding. Journal of Plant Physiology 150: 615-621.

Gorran, A., Salehnia B., Farzaneh, H. R., Farzanehorcid, M. and Shivazad, M. 2015. Effect of essential oils and extracts of *Satureja macrosiphon* and *Satureja khozistanica* on mycelial growth and aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus*. Journal of Veterinary Research 70(2): 139-145.

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

Hadji Sfaxi, I., Ezzine, A., Coquet, L., Cosette, P. and Jouenne, T. 2012. Combined proteomic and molecular approaches for cloning and characterization of copper–zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD2) from Garlic, *Allium sativum.* Molecular Biotechnology 52: 49– 58.

Han, J. H., Kim, J. Y., Hwang, H. S. and Kim, B. S. 2000. Breeding lines with multiple-resistance to both bacterial wilt and Phytophthora blight in pepper (*Capsicum annuum* L.). Agriculture Research Bulletin of Kyungpook National University 18: 9–17.

Kuc, J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. Plant protection research, 65(2): 32-45.

Lin, S. Y. and Chang, H. P. 1997. Induction of superoxide dismutase and catalase activity in different rat tissues and protection from UVB irradiation after topical application of Ginkgo biloba extracts. Methods and Findings in Experimental and Clinica Pharmacology 19(6):367-371.

Lurie, S., Fallik, E., Handors, A. and Shapira, R. 1997. The possible involvement of Proxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated tomato fruit. Physiological and Molecular Plant Pathology 50: 141-149.

Maggie, E. M. H., El-Rahman A. B. D., El-Abdasi S. and Mikhail, M. S. 2006. Inducing resistance against faba bean chocolate spot disease. Egyptian Journal of Phytopathology 34: 69-79.

Martinez, M. C., Crozo, N. and Vilamiel, M. 2007. Biological properties of onion and garlic. Trend in Food Science and Technolog 18: 609-625.

Moghaddam, M. and Farhadi, N. 2015. Influence of environmental and genetic factors on resin yield, essential oil content and chemical composition of *Ferula assa-foetida* L. populations. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants 2: 69-76.

Mohammad pour, G., Majid, A., Najhadsatari, T., Mehrabian, S., and Hossinzadehkalagar, A. 2011. Antibacterial and antifungal effects of three genus of Thyme plants and two ecotype of ziziphora and *Satureja bachtiarica* essential oils. Journal of sciences 78(1): 111-120.

Mota, K. S. L., Pereira, F. O., Oliveira, W. A., Lima, I. O. and Lima, E. O. 2012. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. Molecules 17: 14418-14433.

Nisha, S., Revathi, K. and Chandrasekaran, R. 2012. Effect of plant compounds on induced activities of defense-related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. Physiological and Molecular Plant Pathology 80: 1-9.

Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. and Rao, R. 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54: 5062-5069.

Reuveni, R. 1995. Biochemical marker of disease resistance. Pp. 99-114. In: Singh, R. P. and Singh, U.S. (eds.). Molecular Methods in Plant Pathology, CRC Press, USA.

Serra, R., Lourenco, A., Alipio, P. and Venancio, A. 2006. Influence of the region of origin on th mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. Mycological Researches 110: 550-553.

Sitara, U., Niaz, I., Naseem, J. and Sultana, N. 2008. Antifungal effect of essential oil on in vitro growth of pathogenic fungi. Pakistan Journal of Botani 40: 409-414.

Sokovic, M. and Griensven, L. J. L. D. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of cultivated button mushroom *Agaricus bisporus*. European Journal of Plant Pathology 116: 211-224.

Soltani Tolarod, A. A., Saleh Rastin, N., Khavazi, K. and Asadi Rahmani, H. 2007. Isolation and evaluation of PGP characteristics of some fluorescent *Pseudomonads* of Iranian soils. Iranian Journal of soil and water science 21(2): 277-289.

Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D. Y., Dolezal, K., Jurgens, S. G. and Alonso, J. M. 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. Cell 133: 177-191.

Tajalipour, S., Hassanzadeh, N., Khabbaz Jolfaee, H., Heydari, A. and Ghasemi, A. 2014. Biological control of mushroom brown blotch disease using antagonistic bacteria. Biocontrol Science and Technology 24: 473–484.

Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. and Tan, R. Y. 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in Taxus yunnanensis cell suspension cultures. Nitric Oxide 15: 351-358.

Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., Wang, X., Chen, G. and Yuan, Z. 2011. Metabolic pathways of ochratoxin A. Current Drug Metabolism 12(1): 1-10.

Yang, Y., Han, C., Liu, Q., Lin, B. and Wang, J. 2008. Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. Acta Physiologiae Plantarium 30: 433–440.

The effect of Denai thyme essential oil, fustil aluminum and mancozeb-metalaxyl on the induction of cucumber plant defense system in interaction with cucumber ring rot disease caused by P*hytophthora* sp.

J. Mahboobi Fuladi[1], J. Gholamnejad[2*] and N. Mohammadi[3]

Received: 10 Nov., 2021 Accepted: 28 Jan., 2022

ABSTRACT

Growing of cucumbers in the form of a greenhouse in Iran has expanded a lot in recent years. In this study, the effect of Denai thyme essential oil and two fungicides, fustil aluminum and metalaxyl-mancozeb, were studied for greenhouse cucumber plant dieback disease caused by *Phytophthora pseudofungus*. In the greenhouse test, the effects of the mentioned treatments on the activity of peroxidase, catalase and phenylalanine ammonia-lyase enzymes in cucumber plants infected by *Phytophthora* sp. was contaminated, it was measured. The results of the effect of different treatments on the defense mechanisms of the cucumber plant showed that the highest activity of the three enzymes peroxidase, catalase and also the enzyme phenylalanine ammonialyase was related to the treatment of the infected cucumber plant treated with a concentration of 150 ppm fustil aluminum fungicide, which was on the sixth day after Contamination with the pathogen, the activity of the peroxidase enzyme reached ΔOD/Min/mg protein of 1.95. The trend of the activity of all three enzymes was increasing until the sixth day and then decreasing, so that on the tenth day after infecting cucumbers with the pathogen, the activity of this enzyme decreased in fustil aluminum treatment and reached 29/ΔOD/Min/mg protein. 1 receipt. The treatment using Fustil aluminum fungicide on all the days of sampling compared to all other treatments had a significant difference in terms of enzyme activity level. On all sampling days, enzyme activity in metalaxyl-mancozeb treatment was significantly higher than control. On the 10th day after sampling, the activity level of all three enzymes decreases in all treatments compared to the 8th day, but the process of enzyme activity in different treatments is the same as the rest of the days. In other words, all the treatments are able to increase the activity of this enzyme compared to the control, but more importantly, this enzyme is also affected by the days of sampling. The results showed that Danai thyme was able to induce defense enzymes against the pathogen on all sampling days. In other words, the essential oil of this plant can affect the defense mechanisms of the plant along with the chemical inducers, and in this way, reduce the damage caused by pathogens to the plant.

Key words: Collar rot, Cucumber, Thyme essential oil, Fustil aluminum, Metalaxyl-mancozeb

1. Former Ms. student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
2. Associated professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran.
3. Assistant professor, Dryland Agricultural Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Maragheh, Iran.

Corresponding author: jalal.gholamnejad@gmail.com