مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.355339.3029
جلد ۳۷، شماره ۶، صفحه ۹۳۳-۹۲۰ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.6.3.4

تأثیر عصاره آبی برخی گیاهان دارویی بر کاهش بیماری پوسیدگی فوزاریومی خیار و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، بتا-۱، ۳-گلوکاناز و پراکسیداز در گیاه خیار بیمار

سمانه ملک‌پور[۱]، سیمین نصرتی[۲*]، بیتا بهبودیان[۳]، جلال غلام‌نژاد[۴] و محمد آرمین[۵]

۱- دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه کشاورزی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران، پست الکترونیک: siminnosrati@yahoo.com

۳- استادیار، گروه کشاورزی، واحد کاشمر، دانشگاه آزاد اسلامی، کاشمر، ایران

۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اردکان، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

۵- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۰ | تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۴۰۰ | تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۰

چکیده

در مطالعه حاضر، ابتدا تأثیر عصاره آبی گیاهان آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.)، رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.)، رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) و نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.)، بر کاهش رشد عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی خیار (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (forc)) در شرایط درون شیشه‌ای، به‌وسیله آزمون دیسک کاغذی بررسی شد. براساس نتایج، به‌ترتیب عصاره آبی آویشن باغی، رازیانه، رزماری و نعناع فلفلی در غلظت ۲۵۰ppm با ۲۴/۶۶، ۱۷/۳۳، ۱۱/۶۶ و ۱۰/۳۳ میلی‌متر قطر ناحیه بازدارندگی حداکثر فعالیت ضدقارچی را نسبت به شاهد (۳/۶۶ میلی‌متر قطر ناحیه بازدارندگی) نشان دادند. سپس تأثیر عصاره‌های آبی آویشن باغی و رازیانه روی گیاه خیار رقم ناگین تیمار شده با عامل بیماری *F. oxysporum* در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. عصاره آبی آویشن باغی در غلظت ۲۰۰ppm با ۳۱٪ شاخص بیماری بیشترین کاهش علایم بیماری را نسبت به شاهد بیمار با ۸۲/۶۶٪ و تیمار رازیانه با ۴۲٪ شاخص بیماری نشان داد. بررسی فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، بتا- ۱، ۳-گلوکاناز و پراکسیداز در شرایط گلخانه نشان داد که فعالیت هر سه آنزیم روند افزایشی داشته است، به‌طوری که میزان فعالیت آنزیم‌ها در تیمار توأم عصاره آبی آویشن باغی (۲۰۰ppm) و بیمارگر به‌ترتیب از ΔOD/min/mg protein ۱/۱۲، ۱/۱۱ و ۰/۲۷ در روز اول پس از مایه‌زنی به ΔOD /min/mg protein ۵/۲۵، ۴/۸۱ و ۲/۸۸ در روز دوازدهم افزایش یافت و دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد بود. با توجه به نتایج این تحقیق مشخص شد که عصاره آبی آویشن باغی علاوه بر اثر مستقیم قارچ‌کشی قادر به افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی در گیاه خیار است، در نتیجه القای مقاومت گیاه میزبان در برابر بیمارگر اتفاق می‌افتد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌فنل اکسیداز، بتا-۳،۱-گلوکاناز، پراکسیداز، عصاره آبی، *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*.

مقدمه

خیار (*Cucumis sativus*) یکی از گیاهان متداول و حائز اهمیت در کشت‌های گلخانه‌ای و همچنین یکی از سبزیجاتی است که به‌طور گسترده رشد کرده و از نظر اقتصادی در سراسر جهان مهم است (Huang *et al*., 2009). ازجمله مهمترین بیماری‌های قارچی که گیاه خیار را آلوده می‌کنند، می‌توان به پوسیدگی ساقه و ریشه با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*، پوسیدگی ریشه و طوقه با عامل *F. solani* f. sp. *cucurbitae*، پوسیدگی ریشه ناشی از *Rhizoctonia solani*، گیاهچه‌میری ناشی از گونه‌های *Pythium* شامل (*P. ultimum*، *P. debaryanum* و *P. aphanidermatum*) و بوته‌میری جالیز با عامل *Phytophthora drechsleri* اشاره کرد (Al-Tuwaigri, 2008). در این میان، بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار گلخانه‌ای برای اولین بار از یونان گزارش و قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (Forc) به‌عنوان عامل بیماری معرفی شده است (Vakalounakis, 1995). گیاه خیار زمانی که مورد حمله فوزاریوم پژمردگی آوندی قرار می‌گیرد، قارچ بیماری‌زا وارد سیستم آوندی شده و سبب ایجاد بیماری پژمردگی و کاهش محصول می‌شود (Fravel *et al*., 2003). مدیریت و کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی کار بسیار دشواری است. استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی عمدتاً برای مدیریت بیماری پژمردگی استفاده می‌شود (El-sheekh *et al*., 2020). استفاده از روش‌های غیرشیمیایی و کاهش مصرف سموم یکی از انگیزه‌های مهم استفاده از ترکیب‌های گیاهیست (Lokman, 2010). عصاره‌های گیاهی ترکیب‌هایی طبیعی هستند که آثار مخربی بر سلامت انسان و محیط‌زیست ندارند، سریع تجزیه می‌شوند و تاکنون گزارشی مبنی بر مقاومت بیمارگرها نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی گزارش نشده است (Bakkali *et al*., 2008). عصاره گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن طیف وسیعی از ترکیب‌های زیستی فعال به‌عنوان یک منبع بالقوه از داروهای گیاهی جدید، مورد توجه ویژه هستند، زیرا داروهای گیاهی به علت داشتن منشأ طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی دارای سازگاری بیشتری با ارگانیسم‌های زنده بوده و عوارض جانبی کمتری ایجاد می‌کنند (Ghaderi *et al*., 2012؛ Toyang & Verpoorte, 2013). عصاره‌های گیاهی قابلیت بالایی برای فعال کردن فعالیت آنزیمی در گیاهان دارند و فناوری بررسی فعالیت‌های آنزیمی به‌عنوان روش‌هایی مؤثر برای بررسی این فرایند بکار می‌رود. آویشن باغی (*T. vulgaris*)، یکی از بزرگترین و متمایزترین خانواده‌های گیاهی گیاهان گلدار است (Gonçalves *et al*., 2013). ترکیب‌های مؤثر ضد میکروبی در عصاره آویشن باغی حاوی فلاونوئیدهایی مانند اپی‌ژنین، نارینژین، لوتنولین، روغن‌های فرار محتوای تیمول و کارواکرول می‌باشد (Leung & Faster, 1996). گیاه نعناع فلفلی (*M. piperita*)، گیاهی علفی، پایا و چندساله است. اثر عصاره این گیاه روی بازداری از رشد قارچ‌های اندوفیت برگی مورد بررسی قرار گرفته و تأثیر بازدارندگی آن به اثبات رسیده است (Mucciarelli *et al*., 2003). گیاه رزماری (*R. officinalis*)، گیاهی بوته‌ای و همیشه سبز است. رزماری به‌دلیل داشتن ترکیب‌های ترپنی مانند آلفا و لینالول در ساختار خودش دارای خواص ضدقارچی و ضداکسیدانی مناسبی می‌باشد. رازیانه (*F. vulgare*)، گیاه معطری است که مهمترین ترکیب‌های فعال آن آنیتول و فنچون است (Renjie *et al*., 2010). محققان زیادی در سال‌های اخیر به مطالعه اثرهای ضدقارچی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی پرداخته‌اند. حتی ۲۰٪ از گیاهان شناخته شده در جهان در آزمون‌های زیست‌سنجی بررسی شده‌اند (Tamuli *et al*., 2014). در پژوهشی اثر ضد میکروبی چندین عصاره گیاهی بر گونه‌های مختلف فوزاریومی بررسی و گزارش شد که عصاره برگ دارچین، آویشن و میخک اثرهای بازدارندگی بیشتری بر گونه‌های قارچ فوزاریوم داشتند (Jasenka *et al*., 2010). در مطالعه‌ای اثر ضد قارچی عصاره‌های گیاهی مریم‌گلی بنفش، بومادران و کاکوتی در مهار قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* در شرایط *In vitro* و گلخانه‌ای مورد بررسی

قرار گرفته که بالاترین فعالیت ضد قارچی را گیاه کاکوتی در برابر بیمارگر داشته است (Maddahi & Nematollahi, 2019). بررسی اثر عصاره‌های گیاهی علاوه‌بر اینکه خاصیت ضدمیکروبی دارند، قادرند بعضی از سازوکارهای دفاعی گیاه را در برابر عوامل میکروبی ازجمله قارچ‌ها فعال کنند. یکی از این سازوکارهای دفاعی افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی ازجمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند پراکسیداز، کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ترکیب‌های فنلی است (Daayf *et al*., 2001).

با توجه به اینکه یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای محدودکننده رشد گیاه خیار، قارچ *F. oxysporum* است و از سویی استفاده از سموم قارچ‌کش باعث تهدید سلامت انسان و محیط‌زیست می‌شود. نتایج این تحقیقات اطلاعات مرتبط به سازوکار تحمل و مقاومت به بیمارگر و همچنین سایر شرایط زیست محیطی را افزایش داده و تولید ارقام متحمل از طریق بیوتکنولوژی را هموارتر می‌نماید. در این پژوهش ابتدا بررسی اثرهای عصاره آبی آویشن باغی، رازیانه، رزماری و نعناع فلفلی بر کاهش رشد قارچ عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی خیار در محیط درون شیشه‌ای ارزیابی شد. سپس تأثیر عصاره آبی آویشن باغی و رازیانه روی گیاه خیار رقم ناگین تیمار شده با عامل بیماری *F. oxysporum* در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. همچنین عصاره آبی آویشن باغی که بهترین نتیجه را در آزمایش گلخانه‌ای نشان داد انتخاب گردید و تأثیر آن بر میزان فعالیت سه آنزیم پلی‌فنل اکسیداز، β (۱و۳) گلوکاناز و پراکسیداز در گیاه خیار، تحت بیمارگر فوزاریوم نیز ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

گیاهچه‌های خیار

بذرهای ضدعفونی شده خیار (شرکت انزا زادن کشور هلند) رقم ناگین (*Cucumis sativus* L.)، در گلدان‌های سترون، حاوی خاک سترون شامل خاک، ماسه، کود برگ (۱:۱:۲) و مقداری پیت و پرلیت کشت شد و در شرایط مساعد گلخانه (شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۶–۲۸ درجه سلسیوس) پرورش داده شد. گیاهچه‌ها در مرحله ۲–۴ برگی برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه زادمایه

جدایه بیماری‌زای قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* با کد IRAN2282C، از وزارت جهاد کشاورزی (سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور) دریافت شد (Nosrati *et al*., 2017). مقداری ذرت داخل چند ارلن (نیم لیتری) ریخته و با درپوش آلومینیوم درب آنها بسته شد و داخل دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه تحت فشار یک اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس ضدعفونی گردید، سپس ارلن‌ها در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از سرد شدن ارلن‌ها در کنار شعله زیر هود چند قرص شش میلی‌متری قارچ عامل بیماری بر روی ذرت‌ها اضافه گردید و ارلن‌ها به مدت ۴ هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

مواد گیاهی

در این تحقیق، از تمام اندام‌های گیاهی (آویشن باغی، رازیانه، رزماری و نعناع فلفلی) که در فصل تابستان از رویشگاه طبیعی آن در استان یزد جمع‌آوری شدند، به روش استفاده از آب عصاره‌گیری شد (Ataei Azimi *et al*., 2006).

القاء عصاره‌های گیاهی بر قارچ بیمارگر (آزمون دیسک کاغذی)

این آزمایش با ۱۶ تیمار (چهار عصاره آبی در چهار غلظت با مقادیر ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ppm و سه تکرار) و

تیمار شاهد (عامل بیماری بر روی محیط کشت بدون عصاره) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد (Hadian *et al.*, 2011). در این آزمون ابتدا عصاره‌های آبی آویشن باغی، رازیانه، رزماری و نعناع فلفلی تهیه و به‌علت اینکه غلظت پایه عصاره‌ها باهم متفاوت بود، برای هر عصاره مقادیر مختلف (میکرولیتر) محاسبه و با استفاده از سمپلر روی دیسک‌های کاغذ صافی به قطر ۱۵ میلی‌متر که با استفاده از اتوکلاو سترون شده بودند (کاغذ واتمن نمره ۱) بارگذاری شدند، در نهایت به غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ppm رسیدند، سپس در پتری‌های ۸ سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت potato dextrose agar اضافه شدند. در هر پتری حاوی محیط کشت دو دیسک حاوی غلظت مورد نظر با فاصله از هم و همچنین عامل بیماری به قطر ۶ میلی‌متر قرار داده و داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بعد از گذشت ۷ روز رشد شعاعی هاله بازدارنده قارچ ثبت گردید. در این آزمون میزان بازدارندگی، با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده قارچ با استفاده از خط‌کش (میلی‌متر) یادداشت‌برداری و میانگین آن در محاسبات لحاظ شد.

آزمون گلخانه‌ای

در این بررسی گیاهچه‌های خیار در مرحله ۲-۴ برگی توسط غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ppm عصاره آبی گیاهان آویشن باغی و رازیانه آبیاری شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت هر گیاهچه توسط بیماگر *F. oxysporum* مایه‌زنی گردید. گیاهچه‌های شاهد با آب‌مقطر سترون و بیمارگر تیمار شدند و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۴۰ روز (با توجه به گیاهان شاهد)، نتایج تأثیر عصاره‌های گیاهی بر میزان علائم بیماری (لکه‌های پوسیده بر روی ساقه و طوقه گیاه) در گلخانه، طبق روش Liu و همکاران (۱۹۹۵) نمره‌دهی شد (جدول ۱).

جدول ۱- شاخص بیماری‌زایی *Fusarium oxysporum* بر روی گیاهچه‌های خیار رقم ناگین

علائم	نمره‌دهی
گیاهان بدون علائم	۰
گیاهان با علائم ۲۵٪	۱
گیاهان با علائم ۲۵٪ تا ۵۰٪	۲
گیاهان با علائم ۵۰٪ تا ۷۵٪	۳
گیاهان با علائم ۷۵٪ تا ۱۰۰٪	۴
گیاهان با مرگ کامل	۵

بعد از نمره‌دهی گیاهان، با استفاده از فرمول زیر شاخص بیماری‌زایی برای هر تیمار ارزیابی شد.

$$\text{درصد شاخص بیماری} = \frac{\sum(\text{تعداد گیاه بیمار در هر رتبه} \times \text{رتبه})}{\text{تعداد کل گیاهان بیمار در هر رتبه} \times \text{بالاترین رتبه}} \times ۱۰۰$$

بررسی تغییرات آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، β (۱و۳) گلوکاناز و پراکسیداز مرتبط با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی

برای بررسی فعالیت‌های آنزیمی پلی‌فنل اکسیداز، β (۱و۳) گلوکاناز و پراکسیداز، بذرهای خیار رقم ناگین کشت شده در سینی‌های کشت در مرحله دو تا چهار برگی برداشت و به گلدان‌ها منتقل و گیاهچه‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره آبی آویشن باغی و قارچ عامل بیماری مایه‌زنی شدند.

این آزمون به‌صورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور A با شش سطح شامل غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ppm عصاره گیاهی، شاهد سالم، شاهد آلوده و فاکتور B با شش

سطح شامل روزهای ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ بعد از نمونه‌برداری و اثرهای متقابل این دو فاکتور بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای نمونه‌برداری، قطعاتی به وزن یک گرم از بافت کل گیاه برداشته شد.

ارزیابی میزان پروتئین کل قابل حل در عصاره

تهیه محلول پایه پروتئین استاندارد

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.

برای تهیه منحنی استاندارد، ابتدا محلول پایه پروتئین آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) فراکسیون پنج تهیه شد. برای این کار، ۵ میلی‌گرم از پروتئین استاندارد (ساخت کارخانه Fluka) را در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ حل کرده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. پروتئین استاندارد مورد استفاده آلبومین سرم گاوی BSA فراکسیون پنج بود.

تهیه منحنی پروتئین استاندارد

مقادیر ۵، ۱۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم از محلول BSA در آب مقطر سترون به‌طور جداگانه به سه میلی‌لیتر معرف برادفورد در کوت (۵ میلی‌لیتری) اضافه شد. سپس رابطه رگرسیون براساس جذب نور هر یک از غلظت‌ها محاسبه و منحنی استاندارد ترسیم شد (Bradford, 1976).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

مقداری از عصاره که دارای ۴۰ میلی‌گرم پروتئین بود (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، ۲۰ میلی‌مولار محلول پرولین و مقدار کافی بافر سیترات فسفات ۲۵ میلی‌مولار pH= ۶/۴ به حجم نهایی دو میلی‌لیتر رسانده شد و بعد در یک کوت ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Jenus، ساخت انگلیس) با استفاده از این مخلوط در طول موج ۵۱۵ نانومتر صفر شد، سپس ۴۰ میکرولیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی‌مولار به این مخلوط اضافه و به‌سرعت تغییرات جذب نور در طول موج ۵۱۵ نانومتر 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 β (۱و۳) گلوکاناز

فعالیت آنزیم β (۱و۳) گلوکاناز با روش Laminarin dinitro salicylate، با مقدار کمی اصلاح تعیین شد (Abeles *et al.*, 1971). مخلوط واکنش شامل ۳۵ میلی‌لیتر لامینارین ۴٪ (مرک، آلمان) بود که در ۰/۰۵ میلی‌مول بافر استات سدیم با pH=۵ و ۳۰ میکرولیتر عصاره گیاه حل و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. بعد از ۳۰ دقیقه، مخلوط واکنش با ۱۸۷ میکرولیتر معرف اسید دنیتروسالیسیلیک (DNS تهیه شده با ۳۰۰ میلی‌لیتر NaOH، ۴/۵٪ به ۸۸۰ میلی‌لیتر حاوی ۸/۸ گرم اسید دینیتروسالیسیلیک (مرک، آلمان) و ۲۲ گرم پتاسیم سدیم تارترات) به مدت ۵ دقیقه گرم شده و بعد مخلوط واکنش را با ۲ میلی‌لیتر آب‌مقطر رقیق کرده و ورتکس می‌کنند. جذب رنگ حاصل در ۵۰۰ نانومتر ثبت شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی که به‌صورت برابر میلی‌گرم گلوکز در هر میلی‌گرم کل پروتئین در دقیقه منتشر شد، از منحنی استاندارد مربوط به میزان جذب در ۵۰۰ نانومتر به غلظت گلوکز استفاده شد (Anguelova-Merhar *et al.*, 2008).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

مقداری از عصاره که دارای ۵۰ میلی‌گرم پروتئین بود

(این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، ۵ میلی‌مولار گوئیکول (Guaiacol) و مقدار کافی بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار pH=۷ به حجم نهایی دو میلی‌لیتر رسانده شد و بعد در یک کوت ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Jenus، ساخت انگلیس) با استفاده از این مخلوط در طول موج ۴۷۰ نانومتر صفر شد؛ سپس ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۳۰٪ به این مخلوط اضافه شد و به‌سرعت تغییرات جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر 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).

نتایج

القاء عصاره‌های گیاهی بر قارچ بیمارگر (آزمون دیسک کاغذی)

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی آزمون دیسک کاغذی نشان می‌دهد که به احتمال ۹۹٪ بین عصاره‌ها و غلظت‌های مختلف مورد استفاده بر کاهش میزان رشد قارچ بیمارگر اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۲). در این آزمون عصاره آبی آویشن باغی با غلظت ۲۵۰ppm و مقدار ۲۴/۶۶ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد بیمارگر نسبت به بقیه تیمارها و شاهد مؤثرترین عصاره بود. به این ترتیب تیمار آبی آویشن باغی در غلظت ۱۵۰ppm و رازیانه آبی در غلظت ۲۵۰ppm با مقادیر ۲۱ و ۱۷/۳۳ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد بیمارگر نسبت به بقیه تیمارها و شاهد در مرتبه‌های بعدی قرار داشتند. کمترین ممانعت‌کنندگی مربوط به شاهد با مقدار ۳/۶۶ میلی‌متر و در بین تیمار عصاره‌ها مربوط به غلظت ۵۰ppm عصاره آبی نعناع فلفلی با مقدار ۳/۸۳ میلی‌متر قطر ممانعت از رشد قارچ بیمارگر بود (شکل ۱).

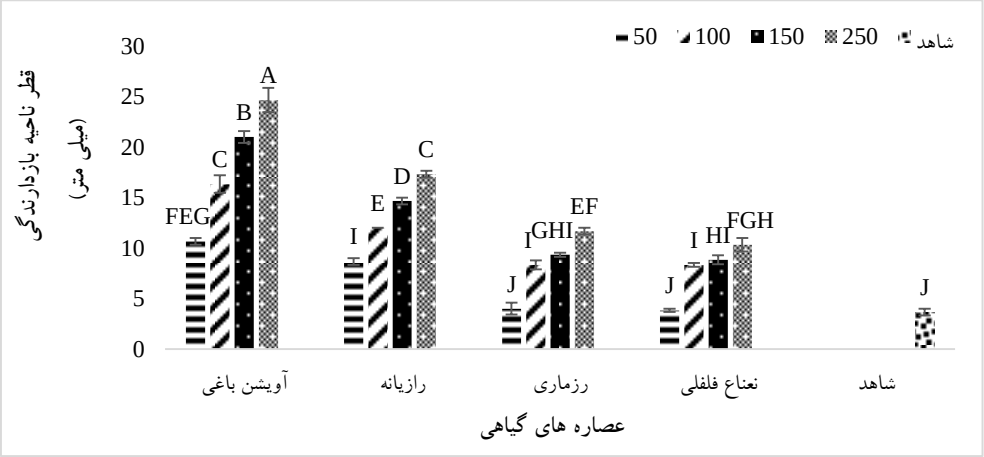
بررسی اثر عصاره‌های گیاهی بر میزان علائم بیماری‌زایی در شرایط گلخانه

اثر عصاره‌های آبی آویشن باغی و رازیانه بر شاخص بیماری‌زایی *F. oxysporum* در شرایط گلخانه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با احتمال ۹۹٪ بود (جدول ۳). در این آزمون هر دو نوع عصاره آبی تأثیر معنی‌داری در کاهش این بیماری در مقایسه با شاهد داشتند. به‌نحوی که عصاره آبی آویشن باغی در غلظت ۲۰۰ppm و ۳۱٪ شاخص بیماری نسبت به شاهد بیمار با ۸۲/۶۶٪ و تیمار رازیانه با ۴۲٪ شاخص بیماری، مؤثرترین عصاره در کاهش بیماری بود. به‌طور کلی برای گیاهان تیمار شده با عصاره آبی آویشن باغی در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ppm؛ ۶۹، ۶۱/۳۳، ۴۲ و ۳۱ درصد شاخص بیماری، نسبت به شاهد بیمار با ۸۲/۶۶٪ و گیاهان تیمار شده با عصاره آبی رازیانه با ۷۵، ۶۶، ۵۱ و ۴۲ درصد شاخص بیماری ایجاد شد (شکل ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس مربوط به اثر عصاره‌های آبی گیاهی بر میزان رشد قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* به روش استفاده از آزمون دیسک کاغذی

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
تیمارهای مختلف	۱۶	۱۶۴۸/۳۲	۱۰۳/۰۲	۱۲۹/۷۶**
خطای آزمایش	۳۴	۲۶/۹۹	۰/۷۹	
کل	۵۰	۱۶۷۵/۳۱		

**: به احتمال ۹۹٪ ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌دار است. C.V=٪۷/۸۲



شکل ۱- اثر عصاره‌های آبی گیاهان آویشن باغی، رازیانه، رزماری و نعناع فلفلی بر میزان ممانعت از رشد قارچ *Fusarium oxysporum* به‌صورت قطر ناحیه بازدارندگی (میلی‌متر) در مقایسه با شاهد، به روش استفاده از آزمون دیسک کاغذی

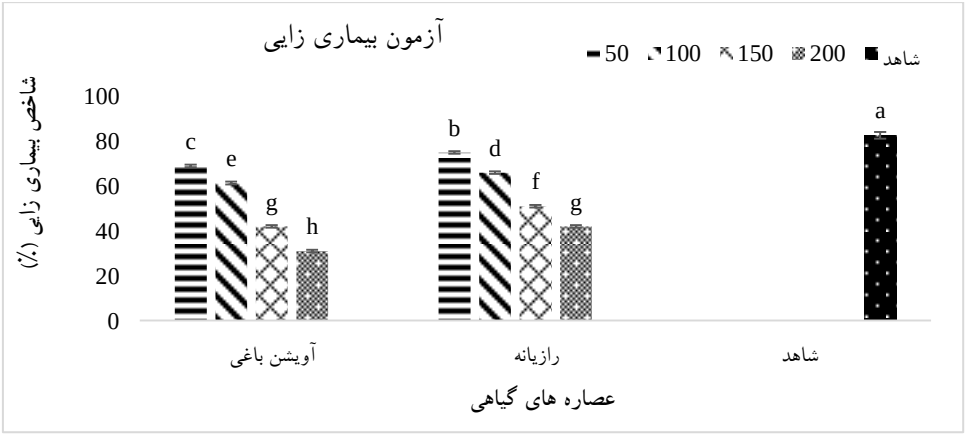
اعداد میانگین سه تکرار است. عصاره‌های مختلف در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ppm استفاده شدند.

تیمارهایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند با حروف مختلف مشخص شده‌اند.

جدول ۳- تجزیه واریانس مربوط به مقایسه بیماری‌زایی قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* بر روی گیاه خیار رقم ناگین تیمارشده با عصاره‌های آبی آویشن باغی و رازیانه

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
تیمارهای مختلف	۸	۷۱۴۹/۳۳	۸۹۳/۶۶	۵۴۸/۳۹**
خطای آزمایش	۱۸	۲۹/۳۳	۱/۶۲	
کل	۲۶	۷۱۷۸/۶۶		

**: به احتمال ۹۹٪ ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌دار است. C.V=٪۲/۲۰



شکل ۲- مقایسه شاخص بیماری‌زایی (درصد) به‌وسیله قارچ *Fusarium oxysporum* بعد از ۴۵ روز بر روی گیاه خیار رقم ناگین تیمار شده با عصاره‌های آبی آویشن باغی و رازیانه به روش نمره‌دهی (اعداد میانگین سه تکرار است)

عصاره‌ها در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ppm استفاده شدند. حروف مختلف نشان‌دهنده سطوح مختلف معنی‌داری است.

بررسی تغییرات آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، β (۱و۳) گلوکاناز و پراکسیداز مرتبط با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با *F. oxysporum* و عصاره آبی آویشن باغی

با توجه به نتایج تجزیه واریانس مربوط به اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه آویشن باغی بر روی فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، β (۱و۳) گلوکاناز و پراکسیداز در نقاط زمانی مختلف، نمونه‌برداری نشان داد که بین شش نقطه زمانی نمونه‌برداری (فاکتور A)، سطوح مختلف غلظت‌های عصاره آبی گیاه آویشن باغی (فاکتور B) و اثرهای متقابل زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه آویشن باغی (فاکتور A× فاکتور B) تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۴). مقایسه میانگین تیمارها به‌شرح زیر است.

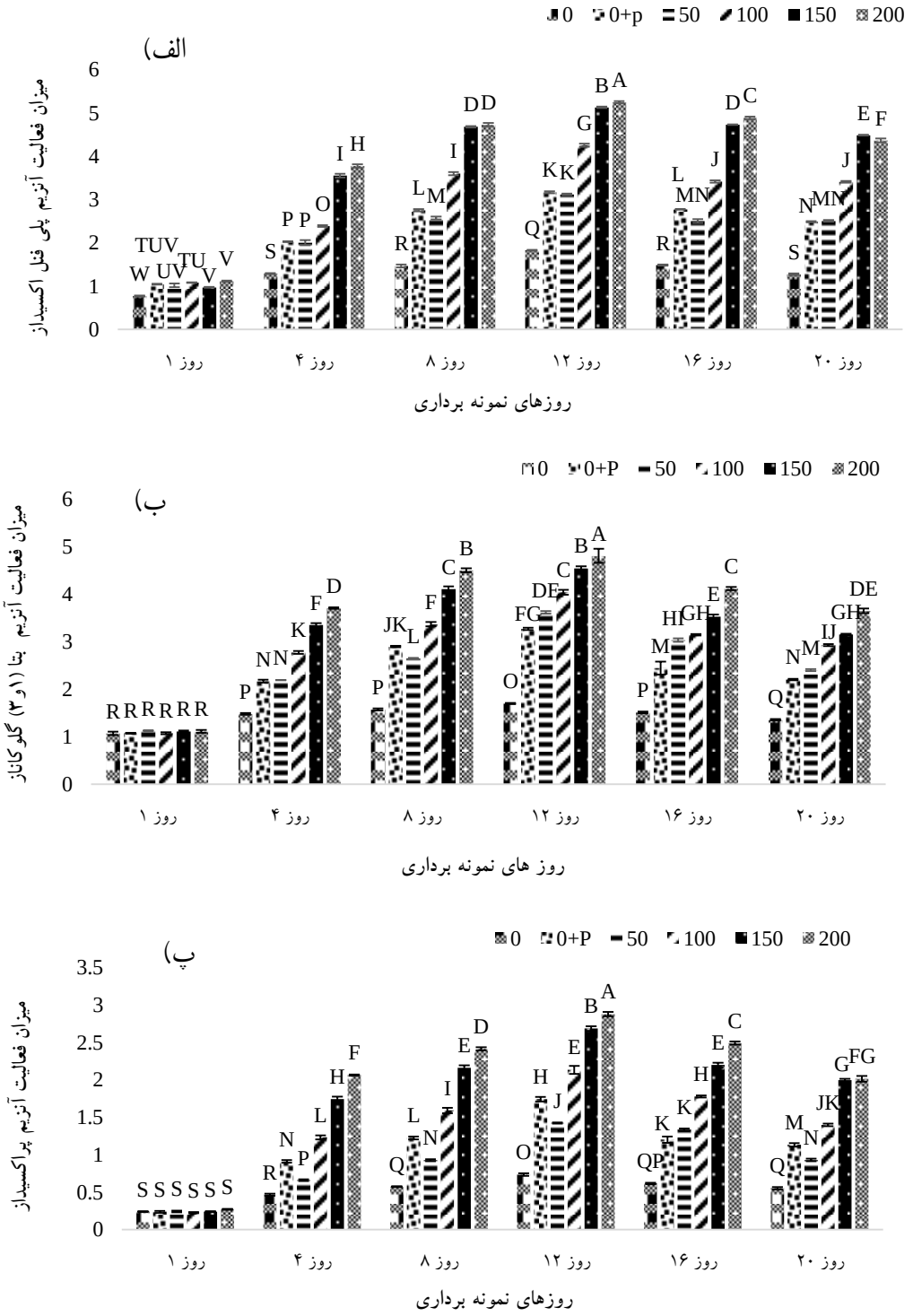
همان‌طور که شکل ۳ (الف، ب و پ) نشان می‌دهد، بیشترین فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، β (۱و۳) گلوکاناز و پراکسیداز مربوط به تیمار گیاه خیار رقم ناگین آلوده تیمار شده با غلظت ۲۰۰ppm عصاره آبی گیاه آویشن باغی بود که در دوازدهمین روز بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر این میزان فعالیت به‌ترتیب با میزان عددی ۵/۲۵، ۴/۸۱ و ۲/۸۸ (ΔOD /min/mg protein) مشاهده شد. روند فعالیت این سه آنزیم تا روز دوازدهم افزایشی و بعد کاهشی بود، به این صورت که در روز بیستم بعد از آلوده‌سازی گیاهان با قارچ بیمارگر، میزان فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار غلظت ۲۰۰ppm عصاره در بین روزهای نمونه‌برداری به‌ترتیب با میزان ۴/۳۶، ۳/۶۵ و ۲/۰۱ رسید. همچنین در کلیه روزهای نمونه‌برداری، فعالیت آنزیم‌ها در تیمار بیمارگر تنها به‌صورت معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. به‌طور کلی همه غلظت‌ها قادر به افزایش فعالیت این سه آنزیم بودند، اما مهمتر از آن، این آنزیم تحت تأثیر روزهای نمونه‌برداری نیز است.

جدول ۴- تجزیه واریانس مربوط به میزان فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، β (۱و۳) گلوکاناز و پراکسیداز (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در گیاهچه‌های خیار رقم ناگین مایه‌زنی شده با غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه آویشن باغی و قارچ *Fusarium oxysporum*

منابع تغییرات	درجه آزادی	پراکسیداز	β (۱و۳) گلوکاناز	پلی‌فنل اکسیداز
		F		
روزهای نمونه‌برداری (فاکتور A)	۵	۳۶۵۳/۲۵**	۲۴۳۵/۹۴**	۷۹۵۳/۷۵**
غلظت‌های مختلف (فاکتور B)	۵	۵۳۳۴/۸۳**	۱۹۳۰/۷۰**	۸۶۸۸/۰۳**
غلظت‌های مختلف× روزهای نمونه‌برداری (فاکتور A×B)	۲۵	۱۶۰/۹۸**	۹۴/۰۰**	۳۳۹/۱۰**
خطای آزمایش	۷۲			
کل	۱۰۷			

**: به احتمال ۹۹/۹۹٪ (P≤0.01) اختلاف معنی‌دار است.

۳/۱۱٪= (پراکسیداز) C.V، ۲/۷۹٪= (β (۱و۳) گلوکاناز) C.V، ۱/۶۵٪= (پلی‌فنل اکسیداز) C.V



شکل ۳- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز (الف)، β (۱و۳) گلوکاناز (ب) و پراکسیداز (پ) در تیمارهای مختلف (غلظت‌های مختلف عصاره آبی آویشن باغی ۵۰ ، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ppm) در گیاه خیار رقم ناگین

اعداد (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) میانگین سه تکرار و حروف مختلف نشان‌دهنده سطوح مختلف معنی‌داری هستند.

شاهد آلوده با آب‌مقطر=p +۰، شاهد سالم + آب‌مقطر=۰

بحث

با توجه به اثرهای مخرب زیست محیطی ناشی از استفاده بی‌رویه از سموم و ترکیب‌های شیمیایی و ضرورت تولید هرچه بیشتر محصولات ارگانیک که می‌تواند کمک مؤثری به سالم‌سازی و حفظ محیط‌زیست و بهداشت عمومی جامعه کند، استفاده از روش‌های غیر شیمیایی و کاهش مصرف سموم یکی از انگیزه‌های مهم استفاده از ترکیب‌های گیاهیست. ازاین‌رو، عصاره گیاهان دارویی می‌تواند یکی از روش‌های جایگزین دوستدار محیط‌زیست برای کنترل بیماری‌های گیاهی برای مصرف انسان باشد (Rongai *et al.*, 2015). با توجه به نتایج بدست‌آمده از آزمون دیسک کاغذی مشخص شد که به‌طور کلی با افزایش غلظت عصاره‌ها، میزان فعالیت ضد قارچی افزایش پیدا می‌کند. بیشترین میزان فعالیت قارچ‌کشی در آزمون دیسک کاغذی مربوط به غلظت ۲۵۰ppm عصاره آبی آویشن باغی است. البته هر چه بر میزان غلظت عصاره آویشن باغی افزوده می‌شود، میزان فعالیت قارچ‌کشی آن نیز زیاد می‌گردد.

سپس عصاره آبی رازیانه در غلظت ۲۵۰ppm بهترین نتیجه و بیشترین کنترل‌کنندگی را از خود نشان داد. کمترین فعالیت ضد قارچی در آزمون دیسک کاغذی مربوط به غلظت ۵۰ppm نعناع فلفلی بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد افزودن ترکیب‌های ضدقارچی (عصاره‌های گیاهی)، به محیط کشت باعث کنترل قارچ بیمارگر می‌شود. همچنین به علت خاصیت آب‌گیری که الکل دارد، خود الکل به تنهایی نیز خاصیت ضدمیکروبی و قارچ‌کشی دارد. بنابراین عصاره آبی آویشن باغی و رازیانه که بهترین نتیجه را در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند، انتخاب و برای آزمایش‌های گلخانه‌ای استفاده شدند. در مورد آزمون بررسی اثر عصاره‌های گیاهی بر میزان علائم بیماری‌زایی در شرایط گلخانه، هر دو عصاره آبی (آویشن باغی و رازیانه) تأثیر معنی‌داری در کاهش این بیماری در گیاه خیار رقم ناگین در مقایسه با شاهد داشتند. عصاره آبی آویشن باغی در این آزمون قادر به کنترل بیشتر بیماری نسبت به عصاره آبی رازیانه و شاهد بود، این مورد را می‌توان به ترکیب‌های قارچ‌کشی در عصاره آبی آویشن باغی مرتبط دانست. این نتایج با نتایج Abo-Elyousr و همکاران (۲۰۲۰) همخوانی داشت. در مطالعات آنان عصاره‌های آبی و اتانولی هندوانه ابوجهل، خرزهره و اکالیپتوس در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای باعث کاهش رشد بیمارگر *Xanthomonas axonopodis* در گیاه گوجه‌فرنگی شد (Abo-Elyousr *et al.*, 2020). عصاره‌های گیاهی علاوه‌بر اینکه خاصیت ضدمیکروبی دارند قادرند بعضی از سازوکارهای دفاعی گیاه را در برابر عوامل میکروبی ازجمله قارچ‌ها فعال کنند. پیش نیاز تولید ارقام مقاوم شناسایی سازوکارهای گیاهی درگیر در واکنش به عوامل بیماری‌زا است که منجر به ظهور مقاومت در ارقام مقاوم و حساسیت در ارقام حساس می‌شود (Baker *et al.*, 1997). یک مجموعه از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در گیاه بعد از تماس با بیمارگر بیان می‌شوند که تعداد بیشتری از این ترکیب‌ها به‌طور مستقیم خاصیت ضد میکروبی دارند. چنین پروتئین‌هایی با اثر بر روی غشای سلولی بیمارگرها حفاظت علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را فراهم می‌کنند (Butler *et al.*, 1982). این پروتئین‌ها هم به‌صورت سیستمیک و هم به‌صورت موضعی در طی حمله عوامل بیماری‌زا در غلظت‌های بالاتری تولید می‌شوند و نقش مهمی در حفاظت گیاه بر عهده دارند (Glazebrook, 2005). چنین پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، پروتئین‌های Pathogenesis-related proteins خوانده می‌شوند که شامل گروه مختلفی از پروتئین‌های گیاهی‌اند. وجود پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی با مقاومت القایی ارتباط دارد. از نتایج آزمایش گلخانه‌ای مربوط به میزان فعالیت آنزیم‌ها در گیاه خیار رقم ناگین تحت تنش بیمارگر و عصاره آبی آویشن باغی چنین استنباط می‌شود که عصاره آبی آویشن باغی، فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، پراکسیداز و β (۱و۳) گلوکاناز را در گیاه خیار رقم ناگین هم در حضور و هم در عدم حضور بیمارگر افزایش می‌دهد. حضور قارچ بیمارگر در کنار عصاره‌های گیاهی باعث افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌ها در مقایسه با کاربرد عصاره گیاهی به تنهایی است. به عبارت دیگر، قارچ بیمارگر باعث افزایش فعالیت آنزیم در گیاه خیار رقم ناگین می‌شود و میزان این

افزایش فعالیت آنزیم در مقایسه با عصاره تنها بیشتر است. بنابراین مشخص شده است که افزایش فعالیت پراکسیداز با القاء مقاومت سیستمیک در خیار و توتون در مقابل بسیاری از بیمارگرها مرتبط می‌باشد (Yu *et al*., 2007). آنزیم پراکسیداز از مهمترین آنتی‌اکسیدانت‌ها است که باعث شکسته شدن پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به آب و مولکول اکسیژن می‌شود (Yang & Poovaiah, 2002). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز با القاء مقاومت ارتباط دارد (Lurie *et al*., 1997؛ Prusky, 2002). این آنزیم در دفاع علیه بیمارگرها بسیار فعال عمل می‌کند. در گیاهانی که دفاع خیلی دیر اتفاق می‌افتد، بیمارگر به راحتی بافت گیاه را کلونیزه می‌کند (Kuc, 2001). در پژوهشی اثر عصاره آبی اکالیپتوس بر روی القاء آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کیتیناز، β (۱و۳) گلوکاناز و فنیل‌آلانین آمونیالیاز در مقاومت گیاه خیار علیه بیماری آنتراکنوز خیار بررسی شد که نتایج این پژوهش نشان‌دهنده مؤثر بودن عصاره در ایجاد مقاومت در خیار و افزایش القاء آنزیم‌های پراکسیداز و β (۱و۳) گلوکاناز بود (Franzener *et al*., 2017). در پژوهشی اثر هفت عصاره (چریش، رازیانه، اسطوخودوس، آویشن، پونه، مریم‌گلی و آنغوزه) در کنترل پس از برداشت میوه سیب ناشی از کپک خاکستری در شرایط آزمایشگاه و گلخانه ارزیابی شد که تمام تیمارهای عصاره گیاهی، جوانه‌زنی اسپور را مهار می‌کنند و نتایج فعالیت آنزیم‌ها نشان داد که عصاره‌های گیاهی می‌تواند فعالیت پراکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، β (۱و۳) گلوکاناز و پلی‌فنل اکسیداز را در حضور عوامل بیماری‌زا در میوه سیب افزایش دهد (Gholamnezhad, 2019). البته آنزیم β (۱و۳) گلوکاناز در اثر مقاومت در برابر بیماری می‌تواند تجزیه هیدرولیکی بتا– (۱و۳) گلوکان‌ها، یک جزء اصلی از ساختار موجود را در دیواره سلولی قارچ کاتالیز و رشد پاتوژن‌ها را مهار کند. همچنین از الیگوساکارید هیدرولیزات آن می‌توان به‌عنوان القاءکننده برای القای زنجیره‌ای از مقاومت سیستمیک در گیاهان استفاده کرد، از این طریق باعث تولید بسیاری از پروتئین و محصولات دفاع می‌شود (Chen *et al*., 2006؛ Shi *et al*., 2001). در پژوهشی، بررسی اثرهای مارمارین یک فرمولاسیون عصاره گیاه دریایی از *Ascophyllum nodosum* بر روی *Phytophthora melonis* در گیاه خیار بررسی شد. گیاهان تحت درمان با مارمارین فعالیت‌های مختلف آنزیم‌های مرتبط با دفاع شامل β (۱و۳) گلوکاناز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز نشان دادند که نتایج نشان داد عصاره جلبک دریایی مقاومت به بیماری در خیار را احتمالاً از طریق آنزیم‌های دفاعی تقویت می‌کند (Abkhoo & Sabbagh, 2015). پلی‌فنل اکسیداز مانند پراکسیداز از آن دسته آنزیم‌هایی است که در اکسیداسیون فنل‌ها، کینون‌ها و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی در موقع حمله بیمارگرها نقش دارد. آنزیم پلی‌فنل اکسیداز باعث تغییراتی در ترکیب‌های پروتئینی هیدروکسی پرولین موجود در دیواره سلولی می‌گردد و از این راه باعث مقاوم‌سازی گیاه در برابر بیمارگرها می‌شود (Kuc, 2001). در پژوهشی، بررسی القای آنزیم‌های دفاعی و پروتئین‌های PR در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به *Alternaria solani* از طریق استفاده از عصاره *Rhizophora apicalata* انجام شد. به‌نحوی که نتایج نشان‌دهنده کاهش روند بروز بیماری زودرس در گیاهان گوجه‌فرنگی شد و یافته‌ها تجمع زودرس و افزایش آنزیم‌های دفاعی و پروتئین‌های PR را نشان دادند. β (۱و۳) گلوکاناز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، پلی‌فنل اکسیداز، پراکسیداز و کیتیناز در گیاهان گوجه‌فرنگی منجر به کاهش قابل توجهی در عفونت زودرس می‌شود (Mahalakshmi *et al*., 2020).

با توجه به نتایج و بحث، همان‌طور که در تحقیقات متعدد بارها به اثبات رسیده است القاء مقاومت در گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا با افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاهی همراه خواهد بود. از سویی ما در این تحقیق به وضوح مشاهده کردیم که عصاره آبی آویشن باغی، علاوه بر اینکه به صورت مستقیم اثر قارچ‌کشی دارد قادر به افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی در گیاه خیار رقم ناگین است. بنابراین پیشنهاد می‌شود با توجه به نتایج این تحقیق برای جلوگیری از استفاده از سموم قارچ‌کش که باعث تهدید سلامت انسان و محیط‌زیست می‌شود می‌توان عصاره آبی آویشن باغی را به‌عنوان یک ترکیب صددرصد طبیعی با خاصیت ضد قارچ‌کشی بالا معرفی و بعد از رسیدن به فرمولاسیون مناسب به‌صورت یک محلول قابل عرضه آن را وارد بازار کرد.

منابع مورد استفاده

- Abeles, F.B., Bosshart, R.P., Forrence, L.E. and Habig, W.E., 1971. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. Plant Physiology, 47(1): 129-134.
- Abkhoo, J. and Sabbagh, S.K., 2015. Control of *Phytophthora melonis* damping-off, induction of defense responses, and gene expression of cucumber treated with commercial extract from *Ascophyllum nodosum*. Journal of Applied phycology, 28(2): 1333-1342.
- Abo-Elyousr, K.A.M., Almasoudi, N.M., Abdelmagid, A.W.M., Roberto, S.R. and Youssef., K., 2020. Plant extract treatments induce resistance to bacterial spot by tomato plants for a sustainable system. Horticulturae, 6(2): 36.
- Al-Tuwaigri, M.M., 2008. Biological control of *Fusarium* root-rot of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by rhizospheric isolates of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride*. The Egyptian journal of Experimental Biology (Botany), 4: 79-86.
- Anguelova-Merhar, V.S., Vander Westhuizen, A.J. and Pretorius, Z.A., 2008. β-1,3-Glucanase and chitinase activities and the resistance response of wheat to leaf rust. Journal of phytopathology, 149(7-8): 381-384.
- Ataei Azimi, A., Hashemloian Delnavaz, B. and Mansoorghanaei, A., 2006. Antifungal effects of water, alcoholic and phenolic extracts of seeds and leaves of *Sorghum bicolor* (L.) Moench on *Fusarium solani* and *F. poae*. Journal of Medicinal Plants, 6(Supplement3): 26-32.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and Dinesh-Kumar, S.P., 1997. Signaling in plant microbe interactions. Science, 276(5313): 726-733.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. Food and Chemical Toxicology, 46(2): 446-475.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistr, 72: 248-254.
- Butler, J.E., Hamilton, W.C., Sasser, R.G., Ruder, C.A., Hass, G.M. and Williams, R.J., 1982. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy specific proteins. Biology of Reproduction, 26(5): 925-933.
- Chen, B., Zhong, D. and Monteiro, B., 2006. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. BMC Genomics, 7(1): 156.
- Daayf, F., Platt, H.W., Mahuku, G. and Peters, R.D., 2001. Relationship between RAPDs, Gpi-allozyme patterns, mating types, and resistance to metalaxyl of *Phytophthora infestans* in Canada in 1997. American Journal of Potato Research, 78(2): 129-139.
- El-Sheekh, M.M., Mousa, A.S.H. and Farghl, A.A.M., 2020. Biological control of *Fusarium* wilt disease of tomato plants using seaweed extracts. Arabian Journal for Science and Engineering, 45: 4557-4570.
- Franzener, G., Schwan-Estrada, K.R.F., Moura, G.S., Kuhn, O.J. and Stangarlin, J.R., 2017. Induction of defense enzymes and control of anthracnose in cucumber by *Corymbia citriodora* aqueous extract. Summa Phytopathologica, 44(1): 10-16.
- Fravel, D., Olivain, C. and Alabouvette, C., 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist, 157(3): 493-502.
- Ghaderi, S., Falahati-Hossein-Abad, A., Sarailoo, M.H. and Ghanbari, V., 2012. Investigation of the components and antibacterial effects of three plants essential oil *Coriandrum sativum*, A*chillea millefolium*, *Anethum graveolens* in vitro. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 14(5): 74-82.
- Gholamnezhad, J., 2019. Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. Journal of Integrative Agriculture. 18(1): 115-123.
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology, 43: 205-227.
- Gonçalves, G.M.S., Srebernich, S.M., Bragagnolo, N., Madalozzo, E.S., Merhi, V.L. and Pires, D.C., 2013. Study of the composition of *Thymus vulgaris* essential oil, developing of topic formulations and evaluation of antimicrobial efficacy. Journal of Medicinal Plant Research, 7(17): 1736-1745.
- Hadian, S., Rahnama, K., Jamali, S. and 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.
- Huang, S., Li, R., Zhang, Z., Li, L., Gu, X., Fan, W., Lucas, W., Wang, X., Xie, B. and Ni, P., 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. Nature Genetics, 41: 1275-1281.
- Jasenka, C., Karolina, V., Jelena, P., Drazenka, J. and Ravlic, M., 2010. In vitro antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. Plant Archives, 16: 25-28.
- Kuc, J., 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European Journal of Plant Pathology, 107: 7-12.
- Leung, A.Y. and Faster, S., 1996. Encyclopedia of common natural ingredients used food, drugs and comsmetics: 446-448. In: Abourashed, E.A. and Khan, I.A., (Eds.). Leungs Encylopedia of Common

Phisiology and Pathology of Vegetables. CRC Press, 744p.
- Renjie, L., Zhenhong, L. and Shidi, S., 2010. GC-MS analysis of fennel essential oil and its effect on microbiology growth in rats' intestine. African Journal of Microbiology Research, 4(12): 1319-1323.
- Reuveni, R., 1995. Biochemical Markers for Disease Resistance: 99-114. In: Singh, R.P. and Singh, U.S., (Eds.). Molecular Methods in Plant Pathology. Boca Raton, CRC Press, 544p.
- Rongai, D., Pucini, P., Pesce, B. and Milano, F., 2015. Antifungal activity of some botanical exracts on *Fusarium oxysporum*. Open Life Sciences, 10: 409-416.
- Shi, CH., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y. and Liu, Q., 2001. The purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 381-382.
- Tamuli, P., DaS, J. and Paran, B., 2014. Antifungal activity of polygonum hydropiper and *Solanum melongena* against plant pathogenic fungi. Plant Archives, 14(1): 15-17.
- Toyang, N.J. and Verpoorte, R., 2013. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacolog, 146(3): 681-723.
- Vakalounakis, D.J., 1995. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-cueumerinum. Plant Disease, 80: 313-316.
- Yang, T. and Poovaiah, B.W., 2002. Hydrogen Proxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium-calmodulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(6): 4097-4102.
- Yu, Q., Tsao, R., Chiba, M. and Potter, J., 2007. Elucidation of the nematicidal activity of bran and seed meal of oriental mustard (*Brassica juncea*) under controlled conditions. Journal of Food Agriculture & Environment, 5(3&4): 374-379.

Natural Ingredients. John Witey & Sons, New York, 688p.
- Liu, L., Kloepper, J.W. and Tuzun, S., 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, 85: 695-698.
- Lokman, A., 2010. Inhibitory effectt of essential oil on aflatoxin activities. African Journal of Biotechnology, 9(17): 2474-2481.
- 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(3): 141-149.
- Mahalakshmi, G., Vengadeshkumar, L., Rajamohan K., Sanjaygandhi S. and Sharmila, A.M., 2020. Leaf extract of *Rhizophora apiculata* as a potential bio-inducer of early bight disease resistance in tomato plant. Novel Research in Microbiology Journal, 4(2): 714-724.
- Maddahi, P. and Nematollahi, S., 2019. The effect of some medicinal plant extracts on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of tomato wilts disease in laboratory and greenhouse conditions. International Journal Molecular and Clinical Microbiology, 9(2): 1188-1196.
- Mucciarelli, M., Scannerini, S., Bertea, C. and Maffei, M., 2003. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by non-mycorrhizal fungal colonization. New Phytologist. 158(3): 579-591.
- Nosrati, S., Zamani Zadeh, H.R., Morid, B. and Eslami, G., 2017. The use of SCAR markers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-cucumerinum. Modern Genetics Journal, 12(3): 477-482.
- Prusky, D., 2002. Mechanism of resistance of fruits and vegetables to postharvest diseases: 634-652. In: Jerry, A.B. and Jeffrey, K.B., (Eds.). Postharvest

Effects of some medicinal plants water extracts on reducing *Fusarium* rot disease of cucumber and activity of polyphenol oxidase, *β*-1, 3-glucanase, and peroxidase enzymes in cucumber plants infected

S. Malekpur[1], S. Nosrati[2*], B. Behboodian[3], J. Gholamnezhad[4] and M. Armin[5]

1- Ph.D. student, Department of Agricultural- Biotechnology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran, E-mail: siminnosrati@yahoo.com
3- Department of Animal Science, Kashmar Branch, Islamic Azad University, Kashmar, Iran
4- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan Branch, Ardakan University Ardakan, Iran
5- Department of Agronomy, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

Received: July 2021 Revised: November 2021 Accepted: November 2021

Abstract

In the present study, first, an *in vitro* experiment was conducted to study the effects of *Thymus vulgaris* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Rosmarinus officinalis* L., and *Mentha piperita* L. water extracts on reducing the growth of *Fusarium* rot disease factor of cucumber (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (forc)) by the saturated paper disk method. According to the results, the water extracts of *Th. vulgaris*, *F. vulgare*, *R. officinalis*, and *M. piperita* at a concentration of 250 ppm with the inhibitory zone diameter of 24.66, 17.33, 11.66, and 10.33 mm, respectively, showed the highest antifungal activity compared to the control (the inhibitory zone diameter of 3.66 mm). Then, it followed by a greenhouse experiment to investigate the effects of *Th. vulgaris* and *F. vulgare* water extracts on the cucumber cv. Nagene treated with *F. oxysporum*. The water extract of *Th. vulgaris* at a concentration of 200 ppm with the disease index of 31% showed the greatest reduction in the disease symptoms compared to the infected control and the *F. vulgare* treatment with the disease indices of 82.66 and 42%, respectively. Study on the activity of polyphenol oxidase, *β*-1, 3-glucanase, and peroxidase enzymes under the greenhouse conditions showed that the activity of all three enzymes had an increasing trend. So that the activity of enzymes in the combined treatment of *Th. vulgaris* water extract (200 ppm) and pathogen increased respectively from 1.12, 1.11, and 0.27 ΔOD/min/mg protein on the first day after the inoculation to 5.25, 4.81, and 2.88 ΔOD/min/mg protein on the 12^{th} day, and it had a significant difference with the control. Considering the results of this research, it was found that the water extract of *Th. vulgaris*, in addition to the direct fungicidal effect, could increase the activity of defense enzymes in the cucumber plants resulted in the host plant resistance induction against the pathogen.

Keywords: Polyphenol oxidase, *β*-1,3-glucanase, peroxidase, water extract, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*.