The University of Tehran Press

Iranian Journal of Plant Protection Science

Online ISNN: 2008-4781

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

The effect of Resveratrol drug on induced resistance of two Captain and Termeh tomato cultivars against fusarium wiltting disease

Seyed Kaem Sabbagh [1]✉, Mohammad Reza Sarafraz Ardakani[2], Seyed Ebrahim Seifati[3], Abbas Kafiri[4]

1. Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran. Email: sksabbagh@yazd.ac.ir
2. Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran. Email: sarafraz.ardakani@yazd.ac.ir
3. Department of Department of Arid Land and Desert Management, Faculty of Natural Resources of Desert, Yazd University, Yazd, Iran. Email: seifati@yazd.ac.ir
4. Department of Department of Arid Land and Desert Management, Faculty of Natural Resources of Desert, Y Yazd University, Yazd, Iran. Email: abbas.kafiri71@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 2 July 2024

Revised: 27 July 2024

Accepted: 18 September 2024

Published online: Spring and Summer 2024

Keywords:

Antioxidants enzymes,

Gene expression,

Fungi,

Induced resistance,

Plant disease.

ABSTRACT

Biological control of plant disease using phytohormones and secondary metabolites is the goal of sustainable agriculture. In this research, the effect of Resveratrol drug on inducing resistance in two tomato cultivars against fusarium wilting disease in greenhouse conditions was investigated. Commercial Captain and Termeh cultivars and *Fusrium oxysporum* fsp. *lycopersici* fungus were used in a randomized block design with four repetitions. Two 100 and 150 µg/mL concentrations of Resveratrol at 3-4 leaf stage were applied for this test. Some of the growth traits such as root dry and fresh weight and aerial parts height, and also the change of some defense enzyme activity such as catalase, peroxidase, polyphenoloxidase, and total phenol, and expression of some genes involved in plant resistance mechanisms were measured. The results showed a significant difference in growth parameters between all treatments in comparison to the control, especially at 150 µg/mL concentration of resveratrol. However, the highest rate change of enzyme activity was observed in infected Termeh cv. The high gene expression was concerned with *Npr1* in the Captain cv. The results of this research show that resveratrol drugs could be used as a resistance inducer in plant disease stress. However, in comparison to current resistance inducers in plant pathology salicylic acid and jasmonic acid, resveratrol has less efficiency.

Cite this article: Sabbagh, S. K., Sarafraz Ardakani, M. R., Seifati, S. E. & Kafiri, A. (2024). The effect of Resveratrol drug on induced resistance of two Captain and Termeh tomato cultivars against fusarium wiltting disease. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 55 (1), 81-97. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.378235.1007061

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.378235.1007061

Extended Abstract

Introduction

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is an annual plant belonging to the Solanaceae family. The fungus *Fusarium oxysporum* fsp. *Lycopersici is* the most common wilt disease in tomato plant which cause a graet economic losses, especially in greenhouse conditions. Symptoms of tomato wilting disease intiate with small spots of wilting. The first symptoms appear when fruit are ripping. Leaves of infected plants show yellowing spots on one side of the leaves fowllwed by wilting. Chemical pesticides are the first strategy for disease control, but despite their benefits and effectiveness in crop production and disease management, the use of pesticides poses significant hazards to the environment and public health.

Therefore, the best defense is to induce acquired resistant using biological agentsvia integrated pest management. Biological control of plant diseases using phytohormones and secondary metabolites is the goal of sustainable agriculture. In this research, the effects of Resveratrol as a drug base on phytohormones property on inducing resistance in two tomato cultivars against fusarium wilting disease in greenhouse conditions was investigated.

Material Methods

Two tomato cultivars, Captain and Termeh, were used in this research. The tomato seeds were surface sterilized with 1% sodium hypochlorite solution for three minutes to produce seedling plant. The Seedlings were carefully transfered into 18 cm pots. *Fusrium oxysporum* fsp. *lycopersici* funguswas used for pathogenicity test in a randomized block design with four repetitions. The plants were sprayed with 100 and 150 µM concentrations of Resveratrol twice at 4-6 leaf stage. Some agricultural traits and also the activity of some defense enzymes, such as catalase, peroxidase, polyphenoloxidase, and total phenol were assayed. The expression levels of three *eds1*, *npr1*, and *pds* genes involved in plant resistance were analyzed using qRT-PCR methods. Acquired data were analyzed by SAS software and gene expression analysis was conducted using the comparative ΔΔct method.

Results and Discussion

The comparison of the effect of resveratrol on the growth parameters in two tomato cultivars showed that resveratrol significantly increased measured growth parameters at a statistical level of 5% compared to control plants. The results showed that resveratrol had a conciderable effect on stem height than on other parameters, and the Termeh cultivar was more affected by resveratrol than the Captain cultivar. The lowest rate of changes in the root characteristics was observed in the dry weight of the aerial parts compared to control plants. Among the measured enzymes, the highest increase was observed in catalase enzyme at 100µg/mL concentration of resveratrol 48 h after plant infection. Considering the rapid role of antioxidant enzymes such as catalase and peroxidase in scavenging free radicals, such results are expected. Similar studies with spermidine compounds had shown an increase in enzyme activity level, but the amount of each enzyme activity varied according to the variety and time perion after inoculation. Under tested conditions and considering the type of inducer agent, these results are expected. However, in compared to spermidine compounds, resveratrol seems to have a lower effect on inducing resistance.

Although the expression levels of *Npr1* and *Pds* genes in both infected varieties treated with resveratrol were elevated compared to the control plant while *Npr1* gene expression was higher than other genes. The high expression level of all the tested genes in the captain cultivar compared to the termeh cultivar, indicates that the captain cultivar was more affected by resveratrol than termeh cultivar to resistance againts the disease.

Conclusion

Biocontrol strategies, in biotic and abiotic conditions, can be effective against different pathogens by preparing cultural conditions. Several factors influence their effectiveness, including the introduction of biological agents on a commercial scale, such as cost, efficacy, and reliability. Cultural practices such as good sanitation, soil condition, nutrition, and host resistance significantly contribute to controlling many plant diseases. Therefore, for increase of effeciencyof bio-control agents on plant disease, agronomic practices must be sufficient. The results of this research showed that resveratrol can be used as a resistance inducer in disease stress. However, in comparison to other resistance inducers such as salicylic acid and jasmonic acid, Resveratrol is less efficient in plant pathology.

نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۵۵، شماره ۱

شاپا الکترونیکی: ۷۸۶۸-۲۴۲۳

انتشارات دانشگاه تهران

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

تاثیر داروی رزوراترول (Resveratrol) در القای مقاومت دو رقم ترمه و کاپتین گوجه‌فرنگی به پژمردگی فوزاریومی

سید کاظم صباغ [۱]✉| محمد رضا سرافراز اردکانی [۲] | سید ابراهیم سیفتی [۳] | عباس کفیری [۴]

۱. نویسنده مسئول، گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه یزد، یزد، ایران، یارانامه: sksabbagh@yazd.ac.ir

۲. گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه یزد، یزد، ایران. رایانامه: sarafraz.ardakani@yazd.ac.ir

۳. گروه احیاء و مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی و کویر شناسی دانشگاه یزد، یزد، ایران. رایانامه seifati@yazd.ac.ir

۴. گروه احیاء و مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی و کویر شناسی دانشگاه یزد، یزد، ایران. رایانامه: ab_kafiri_1992@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۵/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۸
تاریخ انتشار: بهار و تابستان ۱۴۰۳

کلیدواژه‌ها:
آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، قارچ، بیان ژن، مقاومت القایی، بیماری گیاهی.

چکیده

کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی با فیتوهورمون‌ها یا متابولیت‌های ثانویه گیاهی یکی از اهداف نیل به کشاورزی پایدار می‌باشد. در این تحقیق تاثیر داروی رزوراترول در القای مقاومت دو رقم گوجه فرنگی به پژمردگی فوزاریومی در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. از رقم‌های تجاری کاپتین و ترمه و همچنین گونه *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* در قالب طرح بلوک‌های کاملا تصادفی با چهار تکرار استفاده گردید. گیاهچه‌ها دو مرتبه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از داروی رزوراترول در مرحله ۴-۶ برگی محلول پاشی شدند. وزن تر و خشک ریشه و ساقه و ارتفاع اندام‌های هوایی گیاهان به عنوان ویژگی‌های زراعی، و میزان تغییر در فعالیت برخی آنزیم‌های دفاعی مانند کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و فنل کل، و بیان برخی ژن‌های دخیل در مقاومت و پاسخ‌های دفاعی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آزمایش اختلاف معنی‌دار رشدی بین تمام تیمارها با شاهد به ویژه در تیمار ۱۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از رزوراترول را نشان داد. به طور متوسط، بیشترین میزان تغییرات آنزیمی در رقم ترمه آلوده به بیماری مشاهده شد. بررسی بیان ژن‌ها نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن مربوط به ژن *Npr1* در رقم کاپتین بود. نتایج این تحقیق نشان می دهد که داروی رزوراترول می‌تواند به عنوان یک القاکننده مقاومت به تنش بیماری در گیاه مورد استفاده قرار گیرد هر چند در مقایسه با القاگرهای مقاومت متداول دیگر در بیماری‌های گیاهی، مانند اسید سالیسیلیک و جاسمونیک اسید، اثر کمتری دارد.

استناد: صباغ، سیدکاظم؛ سرافراز اردکانی، محمدرضا؛ سیفتی، سیدابراهیم و کفیری، عباس (۱۴۰۳). تاثیر داروی رزوراترول (Resveratrol) در القای مقاومت دو رقم ترمه و کاپتین گوجه‌فرنگی به پژمردگی فوزاریومی. *نشریه دانش گیاهپزشکی ایران*، ۵۵ (۱)، ۹۷-۸۱. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.378235.1007061

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.378235.1007061

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae) از گیاهان عالی گلدار دو لپه است که دارای واریته‌های بسیار متنوع از نظر ارزش غذایی، شرایط کشت، کیفیت میوه و مقاومت به آفات و بیماری‌های گیاهی می‌باشد (Sabrol & Satish, 2016). این محصول در حال حاضر در بازار میوه و تره‌بار بعد از سیب‌زمینی، کاهو و پیاز، چهارمین سبزی از نظر محبوبیت در میان مصرف‌کنندگلن سبزی و صیفی می‌باشد. با توجه به نقش حرارت و رطوبت در کشت گوجه‌فرنگی به ویژه در شرایط گلخانه، این محصول همواره مورد هجوم بیماری‌های مختلفی قرار می گیرد که در میان آنها بیماری‌های قارچی از مهمترین عوامل مخرب و محدودکننده تولید این محصول در ایران و دنیا به حساب می آیند.

بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجهفرنگی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f sp. *lyopersici* یکی از بیماری‌های مخرب این گیاه به ویژه در گلخانه‌ها می باشد که باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌شود (Hernández-Aparicio *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021). استفاده از سموم شیمیایی یکی از رایجترین روش‌های کنترل بیماری در گلخانه‌ها می‌باشد که علاوه بر هزینه‌های بالا و خطرات زیست محیطی ناشی از مصرف سموم، باقیمانده سم نیز می‌تواند باعث ایجاد بیماری‌های خطرناکی در انسان شود. استفاده از ترکیبات ثانویه گیاهی و فیتوهورمون‌ها در کنترل بیماری‌های گیاهی مورد توجه تولید کنندگان و مصرف‌کنندگان گیاهان ارگانیک قرار گرفته است (Lahlali *et al.*, 2022). استفاده از ترکیباتی نظیر اسید سالیسیلیک، جاسمونیک اسید و اتیلن در افزایش مقاومت گیاهان آلوده به بیماری‌های گیاهی گزارش شده است. مطالعات نشان داده است که کاربرد ترکیبات استیلبین‌ها مانند اسپرمیدین نقش موثری در افزایش مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی به بیماری پژمردگی فوزاریومی در شرایط گلخانه داشته است (Sabbagh *et al.*, 2020). در بین ترکیبات هورمونی نیز ترکیباتی مانند استریگولاکتون‌ها علاوه بر افزایش جوانه زنی اسپور میکوریزها در افزایش مقاومت گوجه فرنگی الوده به فوزاریوم موثر بوده است (Mirrahimi *et al.*, 2023).

پیشینه تحقیق

نقش عوامل و مواد تقویت‌کننده رشد گیاهی در سراسر دوره رشدی و زندگی گیاهان به اثبات رسیده است. در حال حاضر، این مواد در کشاورزی برای اهداف مختلفی از قبیل به تاخیر یا به جلو انداختن رسیدن میوه، ریشه‌دهی، تسریع در ریزش برگ، گل و میوه، مهار علف‌های هرز، مهار اندازه قسمت‌های مختلف گیاه به کار برده می‌شوند (Basra, 2000; Kang *et al.*, 2022). تاثیر مستقیم رزوراترول روی عوامل بیماریزا به ویژه قارچ‌ها و باکتری‌ها و همچنین نقش این دارو در القای مقاومت در مقابل بیماری‌های قارچی روی محصولات کشاورزی تعیین نشده است. هر چند در حضور عوامل بیماریزا میزان تولید آن افزایش یافته است. رزوراترول، یک نوع فنل طبیعی از کلاس استیلبن‌ها که توسط چندین گیاه در پاسخ به آسیب یا زمانی که گیاه مورد حمله عوامل بیماری‌زا، مانند باکتری‌ها یا قارچ‌ها قرار می‌گیرد، تولید می‌شود (Dubrovina & Kiselev, 2017). رزوراترول در محصولات و منابع غذایی اصلی انسان (بادام زمینی، کره بادام زمینی، انگور و شراب قرمز) وجود داشته و به راحتی جذب می‌شود. این ترکیب دارای ساختمانی است که با ایجاد فعالیت آنتی اکسیدانی می‌تواند مرگ سلولی ناشی از اکسیدان و اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها با چگالی کم (low density lipids) را کاهش دهد (Kang *et al.*, 2022).

ترکیبات فنلی و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در شرایط رشدی طبیعی، باعث ایجاد مقاومت گیاه دربرابر انواع مختلف تنش‌های زیستی از جمله بیماری‌های گیاهی می‌شوند. آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قادراند یون‌های پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های آزاد را که در وضعیت فعالیت‌های

مقاومتی گیاه افزایش می‌یابند، کنترل و گیاه را در مقابل صدمات آن‌ها محافظت نمایند (Gomes *et al.*, 2022). آنزیم پلی‌فنل اکسیداز نیز با تشکیل موادی نظیر کینون‌ها از ترکیب مواد فنلی، قادر به افزایش مقاومت از طریق کاهش رشد بیمارگرها و توسعه آن‌ها در گیاهان تحت تنش شوند (Mirzamasoumzadeh *et al.*, 2013). ژن *Npr1* از خانواده فاکتورهای نسخه برداری هستند که ارتباط مستقیمی در بیان ژن‌های مرتبط با القای مقاومت سیستمیک در گیاهان در هنگام مواجه شدن با تنش‌های زیستی و در نهایت افزایش مقاومت دارد (Backer *et al.*, 2019). این ژن نقش مهمی در تولید پروتئین‌های مقاوتی به ویژه در تاثیر گذاری هورمون‌های گیاهی از جمله اسید سالیسیلیک و جیبرلیک اسید دارد و باعث فعال نمودن مسیرهای ژنی دخیل در مقاومت سیستمیک می‌شود (Zavaliev & Dong, 2023). در گیاه گوجه‌فرنگی نیز این ژن برای مقاومت به دامنه وسیعی از بیمارگرها (قارچی، باکتریایی و ویروسی) مورد نیاز می‌باشد است (Hu *et al.*, 2005). ژن *Eds1* درمسیر پیام رسانی مکانیسم‌های مقاومتی، در پایین دست ژن‌های مقاومت کیفی قرار گرفته و در بالادست مسیرهای علامت‌دهی ژنه‌ای مقاومتی قرار دارد و مکانیسم‌های این ژن ها را فعال می‌کند (Wiermer, 2005). تولید رنگدانه‌های کارتنوئیدی در گوجه‌فرنگی به وسیله ژن *PDS* کنترل می‌شود و از طریق تولید آنزیم فیتون واسرشت ساز این مکانیسم کنترل و اجرا می‌شود که نقص در تولید این ماده در حالت بیماری می‌تواند منجر به ایجاد زردی در میوه گوجه فرنگی شود (Orzaez et al., 2006). در این تحقیق القای مقاومت سیستمیک در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش بیماری پژمردگی فوزاریمی با کاربر ماده رزوراترول مورد بررسی قرار گرفت و بررسی تغییرات مقاومتی با استفاده از بررسی میزان تغییرات چند آنزیم آنتی اکسیدانی به‌عنوان نشانگر بیوشیمیایی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

روش شناسایی پژوهشی

کاشت گیاه

در این پژوهش از دو رقم گوجه فرنگی ترمه (شرکت زرین‌دان جنوب) و کاپتین (شرکت یوکسل ترکیه) به عنوان دو رقم پر مصرف و حساس به بیماری پژمردگی به بیماری فوزاریوزی گوجه‌فرنگی در گلخانه‌های استان یزد استفاده گردید. در ابتدا، لایه قارچکش روی بذر با استفاده از هیپوکلریت سدیم رقیق‌شده ۱٪ برداشته شد و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و در زیر هود بیولوژیک روی کاغذ واتمن استریل خشک شدند. بذرها در سینی‌های سخت پلی استرونی حاوی خاک پیت ماس و کوکوپیت به نسبت مساوی استریل کاشته و در ژرمیناتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۵٪ نشای گوجه‌فرنگی تولید شد و نشاها در مرحله دو برگی به گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک پیت ماس و کوکوپیت استریل با قطر ۱۸ سانتی‌متر منتقل شدند و به صورت مرتب با آب شیر آبیاری صورت گرفت. در مرحله پنجه‌دهی تعداد بوته در هر گلدان با تنک کردن به یک بوته رسید. گیاهان در داخل گلخانه‌ای شیشه‌ای با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و رطوبت گلخانه با استفاده از دستگاه مه‌پاش به ویژه در مراحل اولیه بیماری تا زمان نمونه‌برداری تامین گردید.

تهیه محلول رزوراترول

ماده رزوراترول با وزن مولکولی ۲۲۸/۲۵ گرم/مول برای بررسی القاکنندگی مقاومت در گیاهان بیمار مورد استفاده قرار گرفت. از حلال آب برای حل قرص ترانس رزوراترول (Hexagon, France) با غلظت اولیه ۵۰۰ میلی‌گرم در حلال آب استفاده و غلظت محلول بر حسب مولار تهیه و سپس غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار جهت اسپری برگی تهیه گردید. از روغن

توئین ۲۰ برای محلول‌پاشی استفاده گردید. با استفاده از یک مه‌پاش عمل اسپری دارو روی گیاهان قبل از تلقیح بیماری در مرحله ۴-۶ برگی، دو مرتبه انجام گردید.

تهیه مایه تلقیح قارچ

از قارچ *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* تهیه شده از گروه گیاه پزشکی دانشگاه رفسنجان، برای آزمون بیماریزایی استفاده شد. برای تایید بیماریزابودن قارچ، ابتدا آزمون بیماری‌زایی روی رقم حساس رویال گوجه‌فرنگی انجام و مجداد قارچ جداسازی گردید. جدایه قارچی روی محیط کشت برگ میخک – آگار کشت و به مدت یک هفته در انکوباتور تحت دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید. اسپورهای تولید شده قارچ بر روی محیط کشت شسته شده و پس از عبور از پارچه ململ، اسپورها در ظرف سترون جمع‌آوری و نگهداری شدند. غلظت و تعداد اسپورها در محلول با استفاده از لام هماسیتومتر تعیین و غلظتی از اسپور به میزان 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. در مرحله چهار برگی، به منظور آزمون بیماریزایی، ابتدا با استفاده از یک اسکالپل استریل زخم کوچکی در ناحیه زیر طوقه ایجاد و یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپوری (تعداد 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر) به پای بوته اضافه شد و اطراف محل زخم با ماسه استریل پوشانده شد (Sabbagh, et al., 2020) و سپس نمونه‌برداری از برگ گیاه در مقاطع زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تلقیح قارچ عامل بیماری، انجام گرفت. جهت تهیه عصاره گیاهی، مقداری از بافت برگ‌ها در داخل بافر عصاره‌گیری شامل فسفات پتاسیم ۰/۵ میلی‌مولار (pH ۷)، EDTA (۰/۱ میلیمولار) و پلی وینیل پیرولیدون (۱٪) کاملا خرد گردید. عصاره بدست آمده به مدت ۲۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید و پس از اتمام سانتریفیوژ، از فاز بالایی عصاره برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی استفاده شد (Celep et al., 2019).

سنجش میزان فنل کل برگ

از ماده اسید گالیک برای بررسی میزان تغییرات فنل و تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. بدین منظور، مقادیر متفاوتی از محلول الکلی گالیک اسید (۰/۰۲۴، ۰/۰۷۵، ۰/۱۰۵ و ۰/۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) با ۵ میلی‌لیتر معرف فولین (ده برابر رقیق شده) و ۴ میلی‌لیترکربنات سدیم (۷۵ گرم/لیتر) مخلوط گردید. میزان جذب نوری بعد از مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با طول موج نوری ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف سنج (Analytik Jena, Spekol 1300, Germany) قرائت گردید و منحنی استاندارد رسم شد. مقدار یک میلی‌لیتر از عصاره گیاهی با معرف‌های فوق به همان اندازه مخلوط گردید و بعد از یک ساعت میزان جذب نوری اندازه گیری شد. برای هر تیمار سه تکرار اندازه گیری شد (Temraz and Tantway, 2008).

سنجش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

به منظور تهیه عصاره گیاهان بیمار و شاهد مقدار ۲۰۰ میلی گرم از بافت گیاهی حاصل دو تکرار بیولوژیکی را با محلول عصاره‌گیری (۱۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم با pH ۶/۸، ۲۰ میکرولیتر EDTA۰/۱ مولار و ۳۸۰ میکرولیتر آب مقطر) ترکیب و در هاون چینی سرد خرد و مخلوط یکنواختی ایجاد شد. سپس به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، از فاز بالایی عصاره برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد (Gong et al., 2001).

ارزیابی فعالیت آنزیم کاتالاز

جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، ابتدا در یک محلول واکنش به حجم ۳ میلی‌لیتر، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (۱۰۰ میلی مولار (pH ۷)، ۲۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵۰ میلی مولار (۷ pH) و ۱۵۰۰ میکرو لیتر آب مقطر اضافه شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه و بر حسب Abs/min با طول مج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. در نهایت، میزان فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه در واحد گرم وزن تر گیاه محاسبه گردید. (Paudel et al., 2010).

ارزیابی فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز

جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی،۴۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۰/۲ مولار (۷/۶ pH) ، پیروگالول ۰/۰۲ مولار به میزان ۱ میلی‌لیتر، ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر و اضافه شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن پیروگالول به مخلوط واکنش شروع شد. فعالیت آنزیم در طول موج ۴۲۰ نانومتر طیف سنج در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه پس از افزودن پیروگالول اندازه‌گیری شد (Kar and Mishra, 1976).

ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با استفاده از معرف گایاکول به عنوان سوبسترا با توجه به میزان افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتراندازه گیری شد. در محلول واکنش به حجم ۱ میلی‌لیتر، ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی‌مولار (PH ۷/۶)، ۳۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱۰ میلی‌مولار، معرف گایاکول ۳ میلی‌مولار اضافه شد. مقدار ده میکروگرم پروتئین کل به محلول واکنش اضافه گردید و میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت پنج دقیقه مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفت. مقدار آنزیم پراکسیداز بر حسب میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم از پروتئین اندازه گیری شد (Haplin & Lee, 1987).

اندازه‌گیری بیان ژن

جهت اندازه‌گیری میزان تغییرات بیان ژن در این آزمایش (جدول ۱)، در ابتدا مقدار ۵ میلی گرم برگ گیاهان تیمار شده و شاهد مورد استفاده قرار گرفت. استخراج مولکول‌های mRNA ابا استفاده از کیت کیاژن (Qiagene, Germany) انجام شد. رشته اول DNA از ملکول های mRNA با استفاده از کیت تجاری (Vivantis, Cinngene) 2-Steps RT-PCR kit ساخته شد. کمیت و کیفیت مولکول‌های cDNA به ترتیب با دستگاه طیف سنج (Nanodrop1000, Thermo Scientiic) و ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. مقدار ۵۰ نانو گرم cDNA برای انجام آنالیز بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده برای qRT-PCR توسط نرم افزار آنلاین Primer3 (http://Fokker.wiPrimer3.mit.deu/primer3/input.htm) طراحی و توسط شرکت سیناژن ساخته شد (جدول ۱). واکنش qRT-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA (50 ng/µl)، ۲ میکرولیتر مخلوط دو آغازگر (20 µM)،۴ میکرولیتر Mastermix (Hot Tag EvaGreen, Cinnagene Iran)؛ با استفاده از دستگاه کوربت (HRM3500, Curbet, Australia) با برنامه دمایی ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه، و به دنبال آن ۳۵ چرخه حرارتی شامل ۹۵ °C برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ °C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی برای هر تیمار انجام شد.

جدول۱. مشخصات آغازگرهای بکاررفته برای واکنش‌های PCR در این پژوهش.

Gene name	Primer sequence (5′- 3′)	Termal melting (°C)	PCR product (bp)
(Non-expressor of pathogenesis-related) *Npr1*	F- GAGGCTGTTGCACGATC R-GCTCTTGTACTCAGGCCAA	59/2 °C	450
Eds1 (Enhanced disease susceptibility)	F-GTTGAGAATCCAGATGCTGT R-ACGAAGACACAACCTTGCTC	59 °C	414
Pds (Phytoene desaturase)	F-GCCATTTGAAGCCGATGTCAC R-AGATAACCTTCACCCGGTTGC	59.5 °C	409

اندازه گیری صفات زراعی گیاهچه

به منظور آنالیز صفات زراعی بوته‌های گوجه فرنگی کشت شده در تیمارهای مختلف، گیاهان بعد از نمونه برداری در مرحله ۶ برگی تحت شرایط گلخانه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ روز نگهداری و آبیاری شده و سپس به آزمایشگاه انتقال داده شدند و صفات رشدی همانند ارتفاع اندام هوایی و زمینی، وزن‌تر و خشک اندام های هوایی و زمینی، با استفاده از ابزارهایی

مثل خط‌کش و ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد و معنی‌دار بودن تأثیر دارو بر این صفات با مقایسه مقدار میانگین این صفات توسط نرم افزارهای Excel ver.16 و Spss 24 با بوته‌های شاهد انجام گردید.

واکاوی آماری

پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با روش کلموگروف - اسمرینوف، تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 تحت آنالیز واریانس یکطرفه قرار گرفتند و میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. معیار $P < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد و نمودارها توسط نرم افزار Excell version16 رسم گردیدند. واکاوی داده‌های به‌دست آمده برای بررسی بیان ژن به صورت کمی با روش $\Delta\Delta Ct$ انجام گردید (Pfaffl, 2001).

نتایج

تجزیه واریانس صفات مربوط به فعالیت آنزیمی در دو بازه زمانی بعد از تلقیح

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در تمام شاخص‌های اندازه‌گیری شده به جز صفت فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز، طی ۴۸ ساعت سپری شده از آلودگی، تاثیر انفرادی مولفه‌های رقم، بیماری و رزوراتول معنی‌دار بوده است. تاثیر تیمار انفرادی رقم بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز طی ۴۸ ساعت سپری شده از آلودگی نیز معنی‌دار نبود. در برهمکنش دوتایی مولفه‌ها، برهمکنش بیماری × رزوراتول و رقم × رزوراتول تاثیر معنی‌داری بیشتری (تعداد بیشتر حالت‌های معنی‌دار در سطوح خطای ۵٪ و ۱٪) نسبت به برهمکنش رقم × بیماری بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده داشت. با اینحال، برهمکنش معنی دار هر سه تیمار تنها بر محتوای فنل کل طی سری شدن ۷۲ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد (جدول۲ .

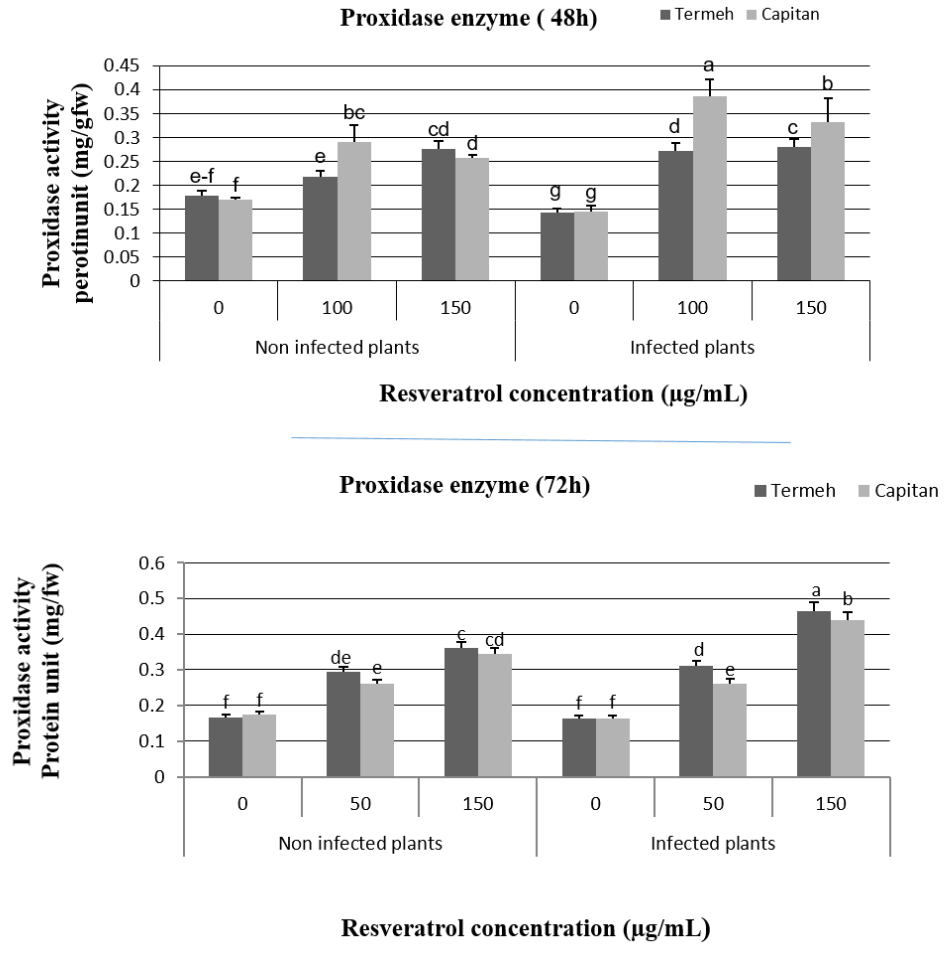
جدول ۲. تجزیه واریانس شاخص‌های فعالیت آنزیمی پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز و محتوای فنل تام در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی تلقیح دو رقم ترمه و کاپیتان گوجه فرنگی تحت کاربرد داروی رزوراتول قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

منابع تغییرات	درجه آزادی	پراکسیداز		پلی فنل اکسیداز		کاتالاز		محتوای فنل	
		۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
بیماری	۱	۵/۰۸ *	۲۷/۸۲ **	۰/۰۰۰۱ ns	۷۳/۷۹ **	۹۲/۶۴ **	۷۲/۲۲ **	۱۴۲۶/۶۹ **	۲۰/۰۸۱ **
رزوراتول	۲	۴۸/۰۱ **	۴۳۴/۱۶ **	۰/۰۰۰۱ ns	۳۲۵۲/۱ **	۴۹۱/۱۵ **	۱۰۶۰/۴۷ **	۲۹۲۵/۶۷ **	۶۲۶/۱۸ **
رقم	۱	۸/۲۱ **	۹/۱۵ **	۰/۰۰۰۱ ns	۰/۸۲۳ ns	۱۸۲/۷۷ **	۱۸/۳۳ **	۲۹/۶۹ **	۲۱۷/۱۰ **
بیماری × رزوراتول	۲	۶/۰۵ **	۲۶/۳۱ **	۰/۰۰۲۱ ns	۶۰/۳۵ **	۶/۵۸ **	۲۲/۶۷ **	۳۴۵/۲۷ **	۱۰۱/۳۲ **
رقم × بیماری	۱	۲/۶۷ ns	۰/۶۲۸ ns	۰/۰۰۱۹ ns	۸۲۲/۲۳ **	۱۰/۵۴ **	۱۰/۸۱ **	۰/۴۳۸ ns	۶۲۶/۱۸ **
رقم × رزوراتول	۲	۵/۴۹ *	۳/۶۷ *	۰/۰۰۰۱ ns	۱۳۲/۴۱ **	۳۱/۰۰۳ **	۹/۰۱ **	۶/۰۴ **	۱۳۱/۲۷ **
بیماری × زوراتول× رقم	۲	۰/۴۶۱ ns	۰/۰۳ ns	۰/۰۰۰۱ ns	۱۳۳۵/۶ **	۰/۰۸۳ ns	۱/۴۴ ns	۲/۵۲ ns	۱۰۳/۶۰ **
خطا	۲۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۳/۵	۳/۰۳۶	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳۲
ضریب تغییرات		۰/۳۲	۰/۳۶	۰/۴۲	۰/۴	۰/۵۳	۰/۵۳	۰/۶۷	۰/۵۵

* و **،نشان دهنده معنی‌داری در سطوح ۵٪ و ۱٪ می باشند. Ns، نشانه بیانگر عدم ارتباط معنی‌دار است.

فعالیت آنزیم پراکسیداز

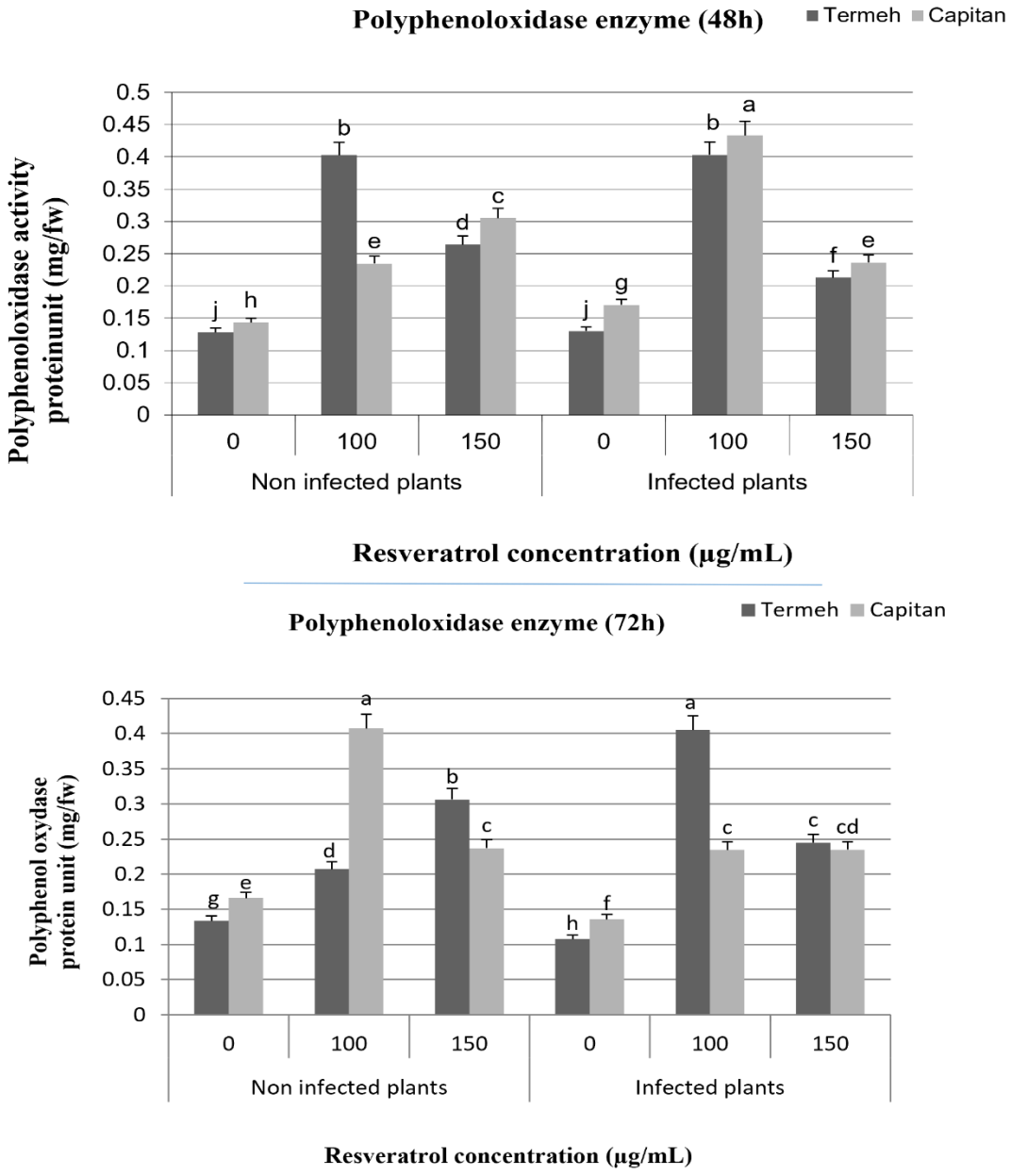
نتایج مربوط به تاثیر داروی رزوراترول بر روی افزایش آنزیم پراکسیداز در دو بازه زمانی پس از تلقیح در دو رقم گوجه فرنگی ترمه و کاپتین با شاهد مورد مقایسه قرار گرفت (شکل۱). میزان آنزیم پراکسیداز در نمونه شاهد در هر دو رقم و در هر دو بازه زمانی متغیر می‌باشد. در نمونه‌های آلوده به بیماری با کاربرد داروی رزوراترول (با توجه به غلظت) میزان افزایش بیان آنزیم در دو رقم متغیر بود. در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از تلفیح بیشترین میزان تغییر آنزیم مربوط به غلظت ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از دارو و در رقم آلوده کاپتین مشاهده گردید. با افزایش غلظت دارو میزان آنزیم در هر دو رقم کاهش یافته است ولی کاهش میزان آنزیم در رقم کاپتین و ترمه یکسان مشاهده نگردید. در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی نیز بیشترین میزان تغییر آنزیم مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار از دارو و در رقم آلوده کاپتین مشاهده گردید ولی در غلظت ۱۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از دارو، میزان تغییرات آنزیم در هر دو رقم تقریباً برابر با هم بود (شکل۱).



شکل ۱. تاثیر تیمار داروی رزوراترول بر مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو رقم گوجه‌فرنگی ترمه و کاپتین تلقیح شده با قارچ *Fusarum oxysporum* f. sp. *lycopersici* در دو بازه زمانی بعد از تلقیح: تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند برپایه آزمون دانکن (Duncan) در سطح ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

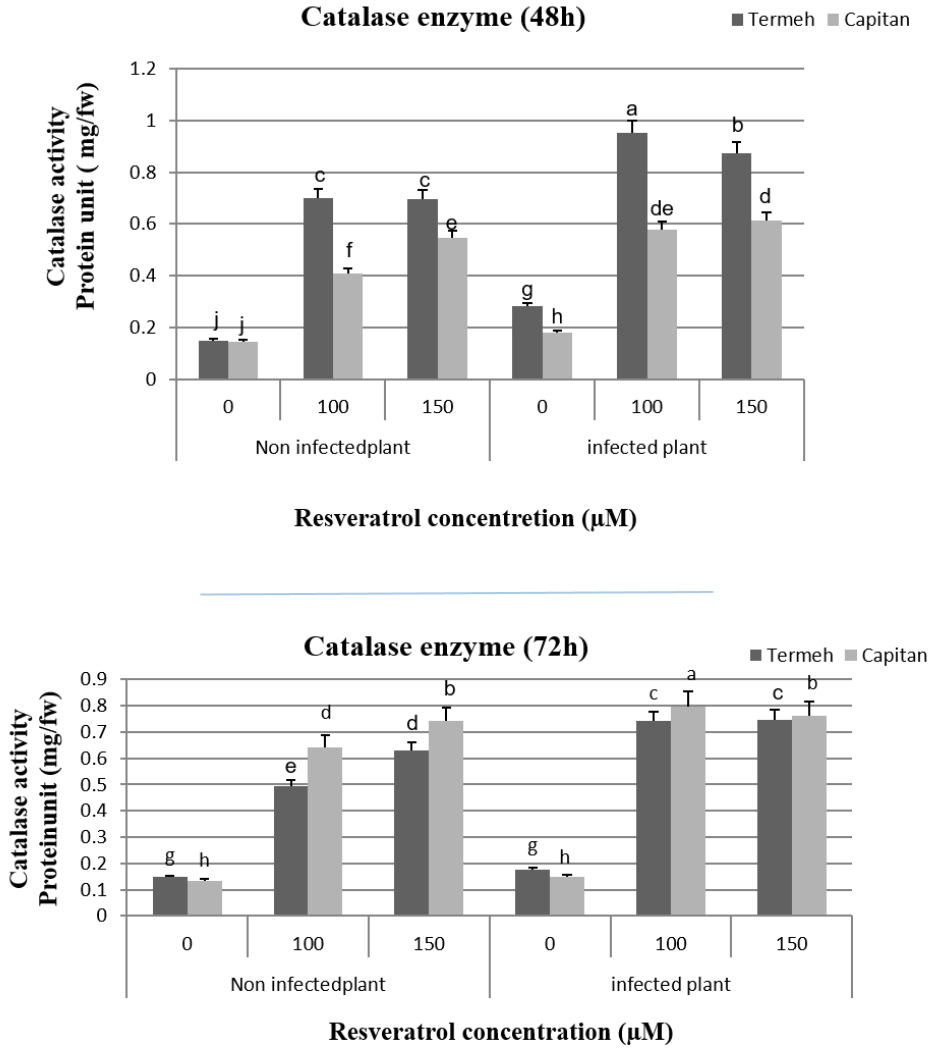
با آلوده‌سازی گیاهچه‌ها با قارچ عامل بیماری و کاربرد داروی رزوراترول، میزان آنزیم پلی‌فنل اکسیداز نسبت به شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. غلظت این آنزیم در هر ۲ رقم بین ۰/۴۲- ۰/۲۵ میلی‌گرم در یک گرم از وزن تر گیاه متغیر می باشد (شکل۲). درگیاهچه‌های الوده به بیماری میزان آنزیم در هر دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت ۱۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از داروی رزوراترول بیشتر از غلظت ۱۵۰ بوده و این افزایش در رقم ترمه افزایش بیشتری را نشان داده است.



شکل ۲. تاثیر تیمارهای مختلف رزوراترول بر مقدار فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در دو رقم گوجه فرنگی ترمه و کاپتین تلقیح شده با قارچ *Fusarum oxysporum* fsp. *lycopercisi* در دو بازه زمانی بعد از تلقیح. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، برپایه آزمون دانکن (Duncan) در سطح ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

فعالیت آنزیم کاتالاز

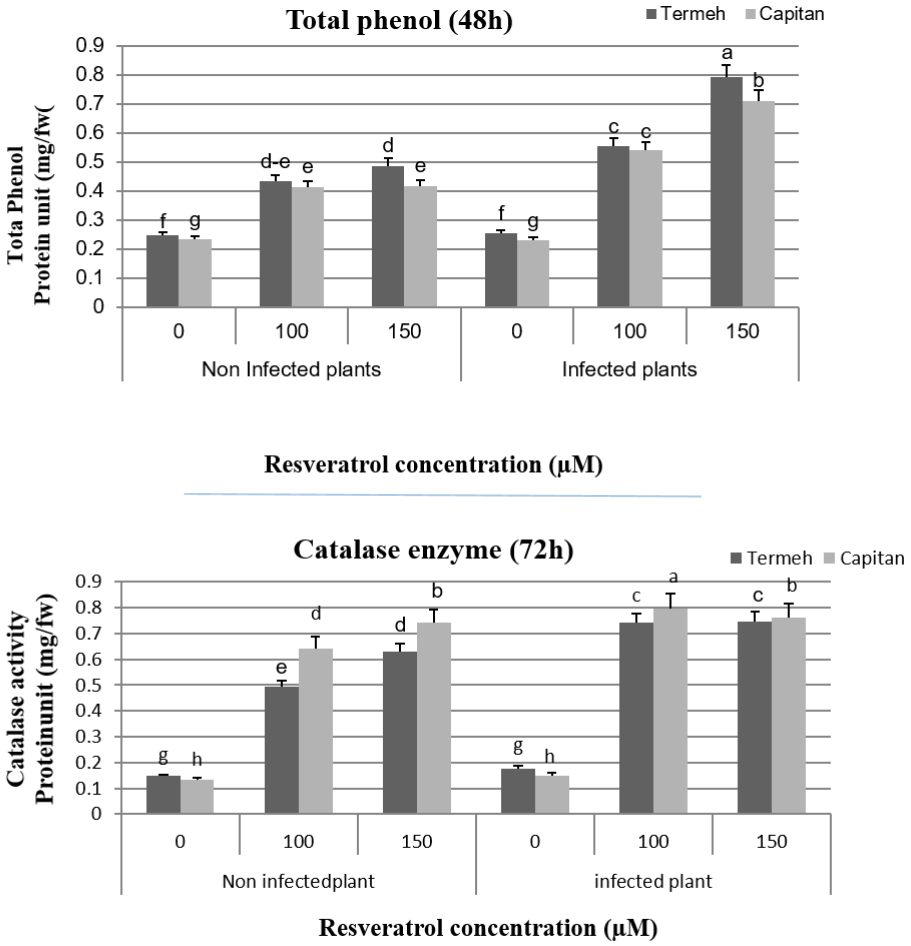
تغیرات بیانی در میزان آنزیم کاتالاز در ۳ بازه زمانی صفر، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد تلقیح تحت تاثیر داروی رزوراترول در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد در شکل ۳ نشان داده شده است. بیشترین میزان تغییر و افزایش آنزیم در گیاهان آلوده تیمار شده مربوط به بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از تلقیح در رقم ترمه می‌باشد. این میزان افزایش آنزیم بین ۰/۶ تا ۰/۹ برای هر دو غلظت دارو تعیین گردید که نوسانات میزان عددی بیان آنزیم در رقم ترمه بیشتر از کاپتین بوده و رقم کاپتین واکنش مشابهی را در هر دو غلظت از داروی رزوراترول از خود نشان داد. در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از تلقیح، اگر چه باز هم رقم ترمه در مقایسه با رقم کاپتین در برابر داروی رزوراترول تاثیر پذیر بود ولی تغییرات درهر دو رقم نزدیک به هم ثبت گردید (شکل ۳).



شکل۳. تاثیر تیمار داروی رزوزراترول بر مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز در دو رقم گوجه فرنگی ترمه و کاپتین تلفیح شده با قارچ *Fusarum oxysporum* f. sp. *lycopersici* **در دو بازه زمانی.** تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند برپایه آزمون (Duncan) در سطح ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

میزان فنل کل

ارزیابی میزان تغییرات فنل کل نشان داد که در هر دو بازه زمانی کاربرد رزوراترول قادر به تغییر این عامل شده است. ولی با توجه به داده‌های ثبت شده که در شکل ۴ نشان داده شده، چنین بر میآید که با گذشت زمان، فنل کل گیاه افزایش قابل توجهی داشته و بیشترین میزان تغییرات مربوط به غلظت ۱۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در رقم ترمه (۴/۸۳ واحد پروتئینی) نسبت به شاهد غیرآلوده (۲/۱–۲/۳ میلی گرم) است. در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از تلقیح میزان فنل کل در هر دو گروه بیمار و غیربیمار، افزایش قابل ملاحظه‌ای را نسبت به شاهد در تیمار با داروی رزوراترول نشان دادند. میزان افزایش در هر دو گروه در رقم ترمه از کاپتین بیشتر بود ولی در گروه بیمار برای هر دو رقم میزان افزایش بیشتر از گروه غیربیمار ثبت و مشاهده گردید (شکل ۴). مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اثر بازه‌های زمانی در تجمع میزان پروتئین برگ نشان داد که بیشترین مقدار تولید (۰/۸ میکروگرم پروتئین) در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی عامل بیماری در گیاهان تیمار شده با دارو رخ داده است (شکل ۵). در مقایسه با زمان صفر و مراحل اولیه بیماری، میزان افزایش ۵ برابری در تولید پروتئین در گیاهان تیمار شده دیده شده است (شکل ۴).



شکل ۴. تاثیر تیمار داروی رزوراترول بر مقدار فنل کل در دو رقم گوجه فرنگی ترمه و کاپتین تلقیح شده با قارچ *Fusarum oxysporum* fsp. *lycopersici* در ۲ بازه زمانی. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند برپایه آزمون دانکن (Duncan) **د**ر سطح ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

تأثیر رزوراترول بر برخی صفات زراعی دو رقم گوجه فرنگی

نتایج مربوط به مقایسه میانگین‌ها در طرح کاملاً تصادفی، مقایسه اثر رزوراترول را بر روی صفات زراعی مورد مطالعه در دو رقم گوجه فرنگی با گیاهچه‌های شاهد مشاهده می‌گردد (جدول ۳). نتایج آنالیز آماری نشان می‌دهد که این ماده دارویی در سطح آماری ۹۵درصد با شاهد در همه صفات باعث بهبود صفات زراعی گیاهچه‌های گوجه فرنگی گردید. نتایج نشان می‌دهد که رزوراترول بر ارتفاع ساقه نسبت به سایر صفات اثر محسوستری دارد (جدول ۳). و این در حالی است که رقم ترمه بیشترین اثرپذیری را داشته است. کمترین میزان تغییر صفات نسبت به ریشه مربوط به صفت وزن خشک اندام‌های هوایی نسبت به شاهد مشاهده گردید.

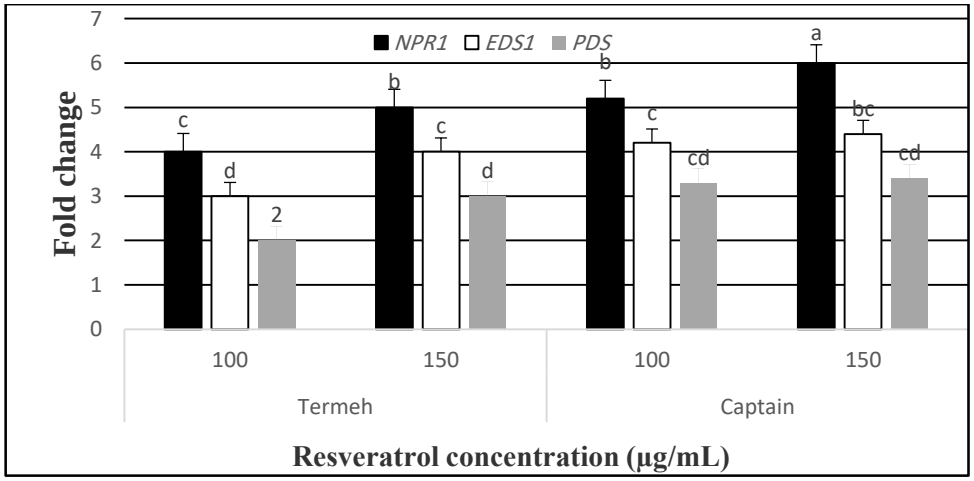
جدول۳. مقایسه میانگین تغییر برخی صفات زراعی دو رقم گوجه‌فرنگی تحت اثر داروی رزوراترول برپایه آزمون دانکن (Duncan)

تیمار (ارقام)	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک ریشه (g)	ارتفاع ساقه (cm)	ارتفاع ریشه (cm)	وزن تر اندام هوایی (g)	وزن خشک اندام هوایی (g)
کاپتین	b۰/۰۹۰	b۰/۰۱۸	bc۱۰/۱۷۵	ab۴/۹۵۰	d۱/۵۱۲	fg۰/۱۳۸
ترمه	a۰/۰۹۶	a۰/۰۲۰	a۱۱/۰۵۰	a۵/۱۶۲	a۲/۴۰۰	a۰/۲۰۷
شاهد	c۰/۰۸۴	c۰/۰۱۶	e۸/۶۷۵	d۳/۹۸۸	d۱/۴۷۵	g۰/۱۳۴

در هر ستون حروف مشابه نشان‌دهنده غدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

ارزیابی بیان برخی ژن‌های دخیل در مسیرهای مقاومتیبا توجه به داده‌های بدست آمده در بخش ارزیابی آنزیمی و بررسی صفات رشدی گیاهان تلقیح شده با عامل بیماری مشخص گردید که تا حدودی واکنش مقاومتی گیاه در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی بیشتر از بازه ۴۸ ساعت می باشد بنابراین، بیان تعدادی ژن دخیل در مقاومت در این بازه زمانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

میزان بیان ژن‌های *Npr1* و *Pds* در دو رقم آلوده تیمار شده با رزوراترول اگر چه تقریباً یکسان بود ولی نسبت به شاهد میزان افزایش بیشتری را نشان دادند. میزان بیان تمام ژن‌های مورد آزمون در رقم کاپتین بیشتر از رقم ترمه بود. با توجه به این داده‌ها چنین نتیجه‌گیری می شود که کاربرد داروی رزوراترول باعث افزایش فعالیت ژن‌های مورد نظر شده است که نشان از القای مقاومت اکتسابی از طریق مکانیسم‌های مولکولی در هر دو رقم دارد. این القا در رقم کاپتین نسبت به ترمه بیشتر و مشخص‌تر می باشد. هر چند صفات رویشی در رقم ترمه تا حدود اندکی در مقایسه با رقم کاپتین افزایش نشان دادند (شکل ۵).



شکل ۵. واکاوی بیان ژن‌های مورد آزمون در مطالعه کاربرد داروی رزوراترول در القای مقاومت دو رقم ترمه و کاپتین گوجه‌فرنگی به بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند برپایه آزمون دانکن (Duncan) در سطح ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

بحث

کنترل بیماری‌های خاکزاد گیاهی با استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی، علاوه بر تحمیل هزینه بالا، می‌تواند منجر به آلودگی های زیست محیطی شود. روش‌های مختلفی بر مبنای حفاظت از محیط زیست در راستای مهار بهینه بیماری‌های گیاهی به ویژه بیماری‌های خاکزاد برای محصولات مختلف گیاهی بوسیله گروه‌های تحقیقاتی مختلف ارایه شده است (García-Fraile et al., 2017; Mishra et al., 2015; Pathak et al., 2017; Sarma et al., 2015). بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* یکی از بیماری‌های قارچی مهم گلخانه‌ای در ایران بشمار می‌آید که خسارت قابل توجهی را به محصولات صیفی و سبزی از جمله گوجه فرنگی وارد می کند (Sabbagh et al., 2017). در این پژوهش از روش القای مقاومت به وسیله داروی رزوراترول جهت مبارزه با این بیماری استفاده گردید. تاثیر کاربرد خارجی رزوراترول بر روی تغییرات آنزیمی در گیاهان تیمار نشان داد که این دارو علاوه بر افزایش سطح آنزیم‌ها سبب افزایش رشد رویشی گیاه شده است که این افزایش رشد می‌تواند در نتیجه افزایش جذب مواد غذایی و تحرکات هورمونی باشد.

بررسی صفات زراعی نشان داد که اغلب صفات مورد بررسی تحت تاثیر تیمار دارویی قرار گرفته ند هرچند صفات زیرزمینی مانند ریشه تاثیر به مراتب کمتری از ساقه را از عملکرد تولیدی خود نشان داد. استفاده از ترکیباتی مشابه نظیر استریگولاکتون‌ها، البته مخلوط با قارچ میکوریز ریزوفاگوس، نیز نتایج مشابهی را در افزایش اجزاء عملکرد داشته است (Mirrahimi *et al.*, 2021). نتایج فنوتیپی بدست آمده نشان از افزایش محسوس پارامترهای رشدی گیاهان تیمار شده در دو رقم نسب به شاهد می‌باشد اگر چه این افزایش نسبت به شاهد در صفاتی از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ولی در صفاتی مانند وزن تر اندام‌های هوایی این افزایش زیاد محسوس نمی‌باشد که به علت حضور قارچ در اندام‌های هوایی این نتایج قابل پیش بینی می‌باشد ولی در ریشه گیاه افزایش محسوستر به نظر می‌رسید.

پراکسیدازها نقش مهمی در تشکیل ارتباط سخت میان سلولز، پکتین و لیگنین در دیواره سلولی گیاه و در نهایت مقاومت بیشتر دیواره سلولی دربرابر نفوذ بیمارگر را ایفا می کنند (Fagerstedt et al., 2010; Voxeur & Höfte, 2016). شروع مقاومت القایی همزمان با بیان هماهنگ آنزیم‌های مربوط به دفاع مانند پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و پلی فنل آمونیالیاز است (Tomás-Barberán & Espin, 2001). در بین آنزیم‌های بررسی شده بیشترین میزان افزایش آنزیم مربوط به انزیم کاتالاز و در .غلظت.۱۰۰ میکرومولار از رزوراترول و در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از بیماری و در رقم ترمه مشاهده گردید. با توجه به نقش سریع آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در تخریب رادیکال های آزاد، چنین نتیجه ایی دور از تصور نیست. مطالعات مشابه با ترکیبات اسپرمیدین ها نیز شاهد افزلیش میزان آنزیمی بوده ایم ولی میزان هر یک از انزیم ها با توجه به رقم و بازه زمانی متفاوت ثبت گردید (Sabbagh *et al*., 2020) که با توجه به شرایط ازمایش و نوع ماده تحریک کننده دور از انتظار نمی باشد ولی در ارتباط با ترکیبات ذکر شده (اسپرمیدین ها)، رزوراترول به نظر اثر افزایشی کمتری در القای مقاومت داشته است که می توان این امر را به تاثیر کم این ماده در افزایش ترکیبات فنلی گیاه نسبت داد. افزایش تعدادی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی درکاربرد خارجی اسید جاسمونیک در گیاه گندم آلوده به بیماری اسکب گندم نشان داده شده است. در گیاه خیار آلوده به بیماری بوته میری نیز کاربرد القا کنندگان مقاومت اثر مشابه را داشته است (Sabbagh et al., 2018).

بررسی تغییرات میزان فنل‌کل در گیاهان تیمار شده نشان داد که در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از الودگی میزان تغییر برای هر دو حالی بیمار و غیر بیمار تقریبا مقداری برابر بوده است ولی با گذشت زمان و رسیدن به بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از بیماری میزان تغییر فنل کل برای غلظت ۱۵۰ میکرومولار از دارو در گیاهان بیمار بیشتر بوده است که این نتایج با توجه به افزایش مقاومت اکتسابی گیاه بعد از تنش و القای قابل تصور می باشد و نشان از تاثیر گذاری دارو داشته است. تفاوت در مقدار بیان و تولید آنزیم می‌تواند ناشی از نقش آن آنزیم در واکنش های دفاعی به ویژه در ابتدای دوره بیماری زایی و برخورد گیاه با بیماری باشد. احتمالاً تاثیر بالای غلظت رزوراترول (۱۵۰میکرومولار) در افزایش تعدادی از پارامترهای اندازه گیری شده، حکایت از نیاز به غلظت بیشتر این دارو برای فعال کردن واکنش های دفاعی به صورت غیرمستقیم و از طریق فعال نمودن آنزیم‌های

دفاعی باشد (Sabbagh *et al*., 2018). ژن *Eds1* یکی از ژن های مهم در فعالیت های مقاوتی گیاهان می‌باشد که در تولید هورمون های گیاهی نظیر اسید سالیسیلیک دخالت دارد و قادر به افزایش مقاومت اکتسابی گیاه در برابر بیماری می‌شود. با استفاده از تکنیک ژن خاموشی نشان داده شده است که خاموش کردن این ژن در گوجه فرنگی آلوده به بیماری شانکر باکتریایی، منجر به افزایش شدت بیماری به ویژه در روزهای ابتدایی جوانه زدن بذر و رشد گیاهچه شده است که نشان از نقش کلیدی این ژن در القای مقاومت می‌باشد (Bolok Yazdi et al., 2018). در این تحقیق نیز نشان داده شد که میزان بیان ژن با کاربرد خارجی رزوراترول نسبت به شاهد بیشتر بوده که با نتایج مشابه مطابقت دارد هر چند در این دو رقم با رقم های قبلی اختلاف بیان دارد که این اختلاف بیان می تواند به دلیل نوع عامل بیمارگر باشد و داده‌های متغییری را نشان دهد. در این تحقیق نیز میزان بیان این ژن با کاربرد رزوراترول با شاهد اختلاف معنی داری را نشان داد.

کاربرد متیل جاسمونات نیز در گوجه فرنگی الوده به بیماری پژمردگی فوزاریومی باعث افزایش بیان ژن های *Eds1* و *Pds1* شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد تغییر مقدار ترکیبات فنلی و نقش آن‌ها در ایجاد مقاومت در گیاهان مبتلا به بیماری‌های مورد مطالعه پژوهشگران قرار گرفته و گزارش‌های این پژوهشگران نشان می‌دهد که تجمع مواد فنلی اغلب در ارتباط با یک آنتی اکسیدان اولیه است که به طور مستقیم با رادیکال هیدروکسیل، سوپراکسید و اکسیژن یکتایی واکنش می‌دهد (Noctor & Foyer, 1998). با توجه به ارزان بودن و در دسترس بودن این دارو، در صورت مطالعات تکمیلی و مزرعه‌ای امکان استفاده از ان در کشت های محدود و اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد. ولی در حال حاضر با این نتایج می‌توان توصیه نمود که این ترکیب در تولید نشاء گیاهانی مانند چوجه‌فرنگی، خیار و فلفل می‌تواند نقش کاربردی داشته باشد

نتیجه گیری کلی و پیشنهادها

اطلاعات در ارتباط با نقش داروی رزوراترول در افزایش مقاومت به بیماری های گیاهی بسیار اندک می باشد و با توجه به بررسی منابع بعمل آمده، تاکنون تحقیقی بر این مضمون به ویژه در ایران صورت نگرفته است. با توجه به منابع موجود رزوراترول در جلوگیری از پیشرفت قارچ و تاثیر مستقیم ممکنست تاثیر گذار نباشد ولی مقدار آن با حضور عامل خارجی در گیاه افزایش یافته و نظر به ماهیت فنلی و انتی اکسیدانی خود ممکن نقش القا کنندگی مقاومت در گیاه را ایفا کند. ولی اگر بصورت موضعی (local) عمل کند باید باعث ایجاد واکنش فوق حساسیت شود که این اتفاق حداقل در ازمایش ما مشاهد نشد در صورتی که گیاهان تا مرحله میوه دهی هم نگه داشته شدند. با توجه به نتایج تحقیقات انجام شده چنین بر می آید که تنش های زیستی در گیاهان می توانند مسیرهای مولکولی مقاومتی را در آنها تحت تاثیر و فعال نمایند. چنین مسیرهایی می تواند منجر به ایجاد سدهای دفاعی با تولید پلی ساکاریدهایی مانند لیگنین و سوبرین نموده و واکنش های مقاومتی فوق حساسیت را در مناطق آلوده گیاهای از طریق محصور کردن و بدام انداختن عامل بیمارگر تداعی بخشد .در این مطالعه واکنش فوق حساسیت از طریق کاربرد داروی رزوراترول مشاهده نگردید. ولی با توجه به مشاهدات موجود پیشنهاد می‌شود اثر مقایسه ای این ترکیب با ترکیبات هورمونی مشابه مانند استرگولاکتون ها و استیلبن‌ها در شرایط مشابه و با همین بیماری مقایسه شود و همچنین اثر این ماده دارویی در القای مقاومت به بیماری و یا حتی در راستای افزایش پارامترهای رشدی به ویژه در تولید نهال‌های سبزی و صیفی مورد استفاده قرار گیرد.

قدردانی

این تحقیق در گلخانه آزمایشی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه یزد انجام گردید که در اینجا از تمام مسئولان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه یزد، به ویژه ریاست محترم مزرعه آموزشی و گلخانه‌های دانشگاه و همچنین از مدیریت گروه بیابان تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

صباغ، سید کاظم؛ گلستانی، منصور؛ سرافراز اردکانی، محند رضا؛ عباسی، اسماعیل و طاهری، مرضیه (۱۳۹۸). فیتوهورمون اسپرمیدین و القای مقاومت به دو رقم گوجه فرنگی ترمه و کاپتین به بیماری پژمردگی فوزاریومی ایجاد شده به وسیله قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. مجله حفاظت از گیاهان، ۵۱(۲)، ۲۷۹-۳۱۳.

میررحیمی، سید محمدرضا؛ صباغ، سید کاظم؛ سیفتی، سید ابراهیم؛ کیخاه صابر، مجتبی و طاهری، عبدالحسین (۱۴۰۲). مقایسه تأثیر فیتوهورمون GR24 و دو گونه قارچی به تنهایی و در ترکیب با هم در افزایش مقاومت دو رقم گوجه‌فرنگی نسبت به بیماری پژمردگی فوزاریومی. پژوهش های کاربردی در گیاهپزشکی، ۲(۱)، ۴۳-۵۶.

REFERENCES

Backer, R., Naidoo, S., & Van den Berg, N. (2019). The Nnoexpressor of pathogenesis-related genes*NPR1*) and related family: mechanistic insights in plant disease resistance. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 430215.

Basra, A. (2000). Plant growth regulators in agriculture and horticulture: their role and commercial uses. CRC Press, United State of America.

Bolok Yazdi, H. R., Sabbagh, S. K., Mazaheri, M., Salari, M., & Moshtaghioun, S. M. (2018). Virus-induced gene silencing for functional analysis of eds1 gene in tomato infected with *Ralstonia solanacearum*. *Zemdirbyste-Agriculture*, 4; 357-362Celep, E., Seven, M., Akyüz, S., İnan, Y., & Yesilada, E. (2019). Influence of extraction method on enzyme inhibition, phenolic profile and antioxidant capacity of Sideritis trojana Bornm. *South African Journal of Botany*, *121(1.)* 360-365.

Fagerstedt, K. V., Kukkola, E. M., Koistinen, V. V., Takahashi, J., & Marjamaa, K. (2010). Cell wall lignin is polymerised by class III secretable plant peroxidases in Norway spruce. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52*(2), 186-194.

García-Fraile, P., Menéndez, E., Celador-Lera, L., Díez-Méndez, A., Jiménez-Gómez, A., Marcos-García, M., Cruz-González, X. A., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P. F., & Rivas, R. (2017). Bacterial probiotics: a truly green revolution. In *Probiotics and plant health* (pp. 131-162). University of Salamanca, Spain.

Gomes, M. P., Kitamura, R. S. A., Marques, R. Z., Barbato, M. L., & Zámocký, M. (2022). The role of H2O2-scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and catalase) in the tolerance of Lemna minor to antibiotics: implications for phytoremediation. *Antioxidants*, *11*(1), 151.

Hernández-Aparicio, F., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J. M., & López-Gresa, M. P. (2021). Signaling in the tomato immunity against *Fusarium oxysporum*. *Molecules*, *26*(7), 1818.

Hu, G., DeHart, A. K., Li, Y., Ustach, C., Handley, V., Navarre, R., Hwang, C. F., Aegerter, B. J., Williamson, V. M., & Baker, B. (2005). EDS1 in tomato is required for resistance mediated by TIR-class R genes and the receptor-like R gene Ve. *The Plant Journal*, *42*(3), 376-391.

Kang, J. E., Yoo, N., Jeon, B. J., Kim, B. S., & Chung, E.-H. (2022). Resveratrol Oligomers, Plant-Produced Natural Products With Anti-virulence and Plant Immune-Priming Roles. *Frontiers in Plant Science*, *13(??)*, 885625.

Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological control of plant pathogens: A global perspective. *Microorganisms*, *10*(3), 596.

Mirrahimi, S. R., Pirnia, M., Sabbagh, S. K., Seifati, S. E., Keikha, S. M., & Taheri, A. (2023). Comparative effect of gr24 phytohormone and two fungal species alone or in combination in increasing resistance of two tomato cultivars against fusarium wilt disease. *Journal of Applied Research in Plant Protection*. 12(10). 43-56.

Mirzamasoumzadeh, B., Ghalichechi, S., Salami, M., Karimi, M., & Baghal Mohseni, A. (2013). The study of wheat genotypes is planted in Ardabil using multivariate statistical methods. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, *2*(8), 188-189.

Mishra, S., Singh, A., Keswani, C., Saxena, A., Sarma, B., & Singh, H. (2015). Harnessing plant-microbe interactions for enhanced protection against phytopathogens. In *Plant Microbes*

Symbiosis: Applied Facets (pp. 111-125). Springer link, United Kingdom.

Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of Plant Biology*, *49*(1), 249-279.

Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W. H., & Granell, A. (2006). Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology*, *140*(1), 3-11.

Pathak, D., Kumar, M., & Rani, K. (2017). Biofertilizer application in horticultural crops. In *Microorganisms for Green Revolution* (pp. 215-227). Springer, Hisar, India. .

Paudel, K., Kumar, S., Meur, S., & Kumaresan, A. (2010). Ascorbic Acid, Catalase and Chlorpromazine Reduce Cryopreservation-induced Damages to Crossbred Bull Spermatozoa a. *Reproduction in domestic animals*, *45*(2), 256-262.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, *29*(9), e45-e45.

Sabbagh, E., Sabbagh, S. K., Panjehkeh, N., & Bolok-Yazdi, H. R. (2018). Jasmonic acid induced systemic resistance in infected cucumber by pythium aphanidermatum. *Tarim Bilimleri Dergisi J Agric Sci*, *24(1)*, 143-152.

Sabbagh, S. K., Golestani, M., Sarafaraz, M. R., Abbasi, E., & Taheri, M. (2020). Spermidin phytohormone and induce resistance of two tolerant Termeh and sensitive Capitan cultivar of tomato against Fusarium wilting disease caused by Fusarium oxysporum fsp. Lycopersici. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, *51*(2), 297-313.

Sabbagh, S. K., Poorabdollah, A., Sirousmehr, A., & Gholamalizadeh Ahangar, A. (2017). Bio-fertilizers and Systemic Acquired Resistance in Fusarium Infected Wheat. *Jounal of Agricultural Science and Technology (JAST)*, *19(2)*, 453-464.

Sabrol, H., & Satish, K. (2016). Tomato plant disease classification in digital images using classification tree. 2016 international conference on communication and signal processing (ICCSP), India.

Sarma, B. K., Yadav, S. K., Singh, S., & Singh, H. B. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, *87*, 25-33.

Tomás-Barberán, F. A., & Espin, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(9), 853-876.

Voxeur, A., & Höfte, H. (2016). Cell wall integrity signaling in plants:"To grow or not to grow that's the question". *Glycobiology*, *26*(9), 950-960.

Wiermer, M. (2005). Molecular and spatial characterisation of Arabidopsis EDS1 defence regulatory complexes Universität zu Köln]. PhD Tesism, University of Kolnm, Germany.

Zavaliev, R., & Dong, X. (2023). NPR1, a key immune regulator for plant survival under biotic and abiotic stresses. *Molecular Cell. ??(??), ??-??*.

Zhou, X., Wang, J.-T., Wang, W. -H., Tsui, C. K., & Cai, L. (2021). Changes in bacterial and fungal microbiomes associated with tomatoes of healthy and infected by Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. *Microbial ecology*, *81*(4), 1004-1017.