نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵، ص. ۴۴۸-۴۴۱

Journal of Plant Protection
Vol. 30, No. 3, Fall 2016, P. 441-448

امکان القای مقاومت در گوجه فرنگی علیه *Rhizoctonia solani* و برخی مکانیسم‌های آن

فریبا نیک رفتار[1]- پریسا طاهری[2*]- سعید طریقی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۶

چکیده

به منظور بررسی امکان القای مقاومت در گیاه گوجه فرنگی رقم حساس موبیل علیه قارچ *Rhizoctonia solani*، از ویتامین‌ها و هموسرین لاکتون‌ها استفاده شد. تیمار تیامین ۲۰ میلی‌مولار بهترین تأثیر را در القای مقاومت علیه این بیمارگر داشت. جهت بررسی نقش پراکسیداز در مقاومت القایی ناشی از تیامین، از سدیم آزید به عنوان بازدارنده پراکسیداز استفاده شد و در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی قارچ، میزان ترکیبات فنلی در نمونه‌های تیمار شده و شاهد اندازه‌گیری شد. بین محتوای فنل کل در نمونه‌های مختلف و زمان‌های متفاوت مورد بررسی، تفاوت قابل توجهی مشاهده شد. در نمونه‌های تیمار شده با سدیم آزید میزان ترکیبات فنلی نسبت به دیگر نمونه‌ها کمتر بود. جلوگیری از فعالیت این آنزیم منجر به کاهش تولید ترکیبات فنلی و کاهش میزان مقاومت به بیمارگر در برگ‌های تیمار شده با تیامین و سدیم آزید گردید. بر اساس نتایج این تحقیق، پراکسیداز و ترکیبات فنلی نقش مهمی در مقاومت القایی ناشی از تیامین در گوجه فرنگی علیه *R. solani* ایفا می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: القای مقاومت، پراکسیداز، گوجه فرنگی، محتوای فنل کل، ویتامین B1

مقدمه

قارچ نکروتروف *Rhizoctonia solani* یک بیمارگر مخرب و از جمله مهمترین عوامل خسارت‌زا در بسیاری از محصولات کشاورزی نظیر پنبه، سیب زمینی، برنج، کاهو، گوجه فرنگی می‌باشد. این قارچ باعث گیاهچه میری قبل و بعد از جوانه‌زنی گیاه، پوسیدگی بذر، غدد، پوسیدگی ریشه و طوقه و پوسیدگی قاعده ساقه می‌شود (۳۰). بیماری مرگ گیاهچه در بسیاری از مناطق کشت گوجه فرنگی در جهان دیده شده است (۹، ۱۵ و ۲۴). علایم گیاهچه میری پس از سبز شدن گیاه که توسط قارچ رایزوکتونیا ایجاد می‌شود به صورت زخم‌های فرورفته قهوه‌ای تا سیاه و بیضی شکل بر روی ریشه و هیپوکوتیل با یک مرز مشخص بین بافت آلوده و سالم می‌باشد (۲۰). این بیمارگر به وسیله ارقام مقاوم کاملا کنترل نمی‌شود و رقمی که کاملا مقاوم به این بیمارگر باشد در هیچ گونه گیاهی وجود ندارد (۹، ۳۰ و ۳۱). کاربرد مواد بیولوژیکی یا شیمیایی جهت فعال‌سازی واکنش‌های دفاعی گیاهی از استراتژی های مؤثر در مدیریت تلفیقی بیماری‌ها می‌باشد.

القای مقاومت در گیاهان به وسیله طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها و همچنین بعضی ترکیبات شیمیایی و ویتامین‌ها امکان‌پذیر است. این پدیده با افزایش سطح مقاومت گیاه طی حمله عوامل بیماریزا از طریق فعال شدن شبکه‌ای از مسیرهای انتقال سیگنال به وقوع می‌پیوندد (۱۴). یک گروه از ترکیبات شیمیایی بی‌خطر برای محیط زیست که کاربرد آنها منجر به القای مقاومت در گیاه می‌گردد ویتامین‌ها هستند (۲، ۳، ۲۰ و ۲۱). گروه ویتامین‌های B شامل کوفاکتورهای آنزیمی قابل حل در آب دخیل در فرآیندهای متابولیکی می‌باشد (۱۰). تاکنون آزمایشاتی جهت القای مقاومت توسط ویتامین‌ها در گیاهان تک لپه و دو لپه مختلف علیه انواعی از بیمارگرها صورت گرفته است (۲، ۳، ۳۳ و ۳۴). از تیامین برای القای مقاومت در پاتوسیستم‌های مختلف استفاده شده است. تیامین (ویتامین B1) از بیماری‌هایی که توسط بیمارگرهای بیوتروف، همی بیوتروف و نکروتروف ایجاد می‌شود جلوگیری می‌کند (۲ و ۴). بررسی‌های انجام شده نشانگر این است که تیامین ۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش مقاومت سیستمیک در برنج علیه *R. solani* می‌شود (۴). همچنین این ویتامین در غلظت ۳۰ میلی‌مولار باعث القای مقاومت علیه *Plasmopara viticola* در انگور می‌گردد و پاسخ‌های دفاعی میزبان را فعال می‌کند (۶). بررسی‌های انجام شده نشانگر این است که تیامین باعث حفاظت گیاهچه‌های خیار علیه آنتراکنوز با عامل *Colletotrichum lagenarium* و سفیدک پودری با عامل *Sphaerotheca fuliginea* می‌شود (۲).

پیریدوکسین (ویتامین B_6) در دفاع سلولی علیه تنش‌های

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌های گیاهی و دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email:p-taheri@um.ac.ir

اکسیداتیو ناشی از تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن شرکت دارد و به عنوان یک آنتی اکسیدانت فعالیت می‌کند. غلظت بالای پیریدوکسین، پاسخ‌های فوق حساسیت را تضعیف و به تأخیر می‌اندازد. این ویتامین باعث حفاظت در برابر تنش‌های غیر زیستی می‌شود (۷). نتایج آزمایشات انجام شده با استفاده از پیریدوکسین نشان داد که تیمار بذرهای ارزن با این ویتامین موجب افزایش جوانه‌زنی بذرها گردید. همچنین، اسپری گیاهچه‌ها به همراه تیمار بذر منجر به افزایش مقاومت گیاه ارزن به بیماری سفیدک سطحی با عامل *Sclerospora graminicola* شد (۲۰). در ایران در مورد نقش تیامین و پیریدوکسین در القای مقاومت در گیاهان علیه بیمارگرها تاکنون تحقیقی صورت نگرفته است. بسیاری از باکتری‌های گرم منفی از N– اسیل هموسرین لاکتون‌ها (AHLs[1]) به عنوان یک مولکول سیگنالی در بسیاری از ارتباطات استفاده می‌کنند (۲۵ و ۲۶).

در سال‌های اخیر، بررسی‌های انجام شده نشان داده‌اند که گیاهان تکامل یافته، AHLs را دریافت و با تغییر در بیان ژن یا رشد خود به آن‌ها پاسخ می‌دهند. شواهد غیر مستقیمی مبنی بر نقش AHLs در ایمنی گیاه وجود دارد (۲۵). شیکورا و همکاران در سال ۲۰۱۱ دریافتند که تیمار ریشه آرابیدوپسیس با N-3-oxo-tetradecanoyl-L-homoserine lactone (oxo-C14- HSL) باعث تقویت مقاومت سیستمیک علیه قارچ بیوتروف *Golovinomyces orontii* عامل بیماری سفیدک می‌شود (۲۵). همچنین همین اثر را در جو علیه *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* اثبات کردند. شوگر و همکاران (۲۶) نشان دادند که *Serratia liquefaciens* MG1 و *Pseudomonas putida* IsoF ریشه گوجه فرنگی را کلونیزه کرده و منجر به تولید AHL در ریزوسفر می‌شوند و باعث افزایش مقاومت سیستمیک گوجه فرنگی علیه پاتوژن برگی *Alternaria alternata* می‌شود. مکانیسم اثر هموسرین لاکتون‌ها روی سیستم ایمنی گیاه هنوز مشخص نشده است. پاسخ گیاهان به AHLs به گونه گیاه و ساختار شیمیایی این ترکیبات بستگی دارد. در زمینه بررسی امکان القای مقاومت در گیاهان علیه بیمارگرها با استفاده از این ترکیبات تاکنون تحقیقی در ایران صورت نگرفته است.

در گوجه فرنگی، متابولیت‌های ثانویه گیاه شامل ترکیبات فنلی نظیر تانن‌ها ، فلاونول‌ها و فنل‌ها در برگ‌ها و ساقه می‌باشد که در مقاومت گیاه علیه بیمارگرها دخالت دارند. ویژگی ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی در بسیاری از گونه‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است (۸، ۱۶ و ۳۴). گیاه برای حفاظت سلول‌ها تحت شرایط تنش، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت نظیر پراکسیداز (POX) تولید می‌کند که تنظیم کننده میزان هیدروژن پراکسید می‌باشد (۱۳). پراکسیداز در تولید ترکیبات فنلی نظیر لیگنین در سلول گیاه نقش داشته و نیز محصولات حاصل از فعالیت آن در حضور هیدروژن پراکسید فعالیت ضدمیکروبی مستقیم دارند (۲۹). ترکیبات فنلی توسط پراکسیداز با مصرف هیدروژن پراکسید طی تشکیل لیگنین، اکسید می‌شوند (۸). هدف از انجام تحقیق حاضر، ۱) ارزیابی امکان القای مقاومت در گوجه فرنگی علیه *R. solani* عامل بیماری مرگ گیاهچه با استفاده از ویتامین‌ها (تیامین و پیریدوکسین) و هموسرین لاکتون‌ها و ۲) بررسی نقش پراکسیداز و ترکیبات فنلی در مقاومت القایی ناشی از کاربرد تیامین در رقم سی اچ فلات گوجه فرنگی علیه قارچ نکروتروف *R. solani* بوده است.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه گوجه فرنگی در گلخانه

رقم سی اچ فلات به عنوان یک رقم حساس به (AG4) *Rhizoctonia solani* انتخاب شد. بذور این رقم از گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی تهیه شد. بذرها ابتدا با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت یک دقیقه شستشوی سطحی داده شده، سپس ۳ بار با آب مقطر استریل شسته شدند. این بذرها به مدت ۵ روز در پتری‌های حاوی کاغذ صافی استریل مرطوب در انکوباتور با دمای ۲۸°C قرار گرفتند. بذرهای جوانه زده به گلدان‌های حاوی خاک اتوکلاو شده (۲ حجم خاک مزرعه، ۱ حجم ماسه، ۱ حجم خاک برگ و ۱ حجم پرلیت) منتقل شدند. گلدان‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۶°C روزانه و ۱۸°C شبانه قرار گرفتند. در تمامی آزمایش‌ها از گیاهچه‌های ۴ هفته‌ای برای مایه‌زنی قارچ بیمارگر استفاده شد (۱۸).

ارزیابی القای مقاومت در برگ گوجه فرنگی علیه *R. solani* با ویتامین‌ها و هموسرین لاکتون‌ها

در این پژوهش از پیریدوکسین (P) و تیامین (T) در غلظت‌های ۵، ۲۰ و ۵۰ میلی‌مولار (تیمارهای T20، T50 ، T5، P20، P50، P5) و دو نوع هموسرین لاکتون به نام‌های PQS[2] و 3- oxo- C_6- HSL[3] در غلظت ۶ میکرومولار استفاده شد (۱، ۶، ۲۰ و ۲۵). این آزمون در شرایط آزمایشگاه و با استفاده از دیسک‌های برگی به قطر ۲ سانتی‌متر که روی لام، داخل پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار گرفتند، انجام شد. جهت انجام این آزمون ابتدا برگ‌ها به مدت ۵ ساعت در هر یک از محلول‌ها قرار گرفتند. سپس یک دیسک میسیلیومی از قارچ رایزوکتونیا به قطر ۰/۵ سانتی‌متر در مرکز هر یک از برگ‌ها قرار داده شد. پتری‌ها در شرایط آزمایشگاه (دمای ۲۵ درجه

1 - N-acyl-L-homoserine lactone

2 - Pseudomonas aeruginosa quinolone signal

3- N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone

سانتی‌گراد؛ ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگه‌داری و علایم ۵ روز بعد از تلقیح بررسی شدند (۳۴). نمونه‌های کنترل با آب مقطر استریل تیمار شدند. برای هر یک از غلظت‌ها ۴ تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش ۳ بار تکرار شد. بهترین ماده القا کننده مقاومت با مؤثرترین غلظت انتخاب و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

شدت بیماری برحسب سطح بافت آلوده با ۵ درجه دسته‌بندی گردید: (۰= عدم آلودگی، ۱= ۱-۲۵٪، ۲= ۲۶-۵۰٪، ۳=۵۱-۷۵٪ و ۴= ۷۶-۱۰۰٪). برای تعیین درصد آلوده سطح هر دیسک برگی از نرم افزار MATLAB (R2010b) استفاده شد. برای تعیین درصد آلودگی هر دیسک برگی عکس‌برداری از سطوح دیسک‌های برگی سالم و آلوده دارای تیمارهای مختلف انجام شد و سپس تصاویر تهیه شده به نرم افزار مذکور منتقل شدند و با استفاده از امکان پردازش تصویر این نرم افزار پردازش رنگی تصاویر انجام شد و درصد تغییر رنگ داده سطح هر برگ به عنوان درصد آلوده آن برگ در مقایسه با شاهد سالم فاقد تغییر رنگ مشخص شد. سپس شاخص بیماری با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۳۳):

شاخص بیماری (DI^1) $= [(0n_0+1n_1+2n_2+3n_3+4n_4)/4N] \times 100$

n_0 : تعداد نمونه‌ها با درجه ۰ آلودگی؛ n_1 : تعداد نمونه‌ها با درجه۱ آلودگی؛ n_2 : تعداد نمونه‌ها با درجه ۲ آلودگی؛ n_3 : تعداد نمونه‌ها با درجه ۳ آلودگی؛ n_4 : تعداد نمونه‌ها با درجه ۴ آلودگی ؛ N : تعداد کل نمونه‌ها.

به منظور بررسی اثر مستقیم مواد مورد استفاده در القای مقاومت در این پاتوسیستم بر روی رشد قارچ بیمارگر در محیط کشت، یک دیسک میسلیومی به قطر ۵ میلی‌متر تهیه شده از حاشیه پرگنه ۵ روزه قارچ *R. solani* (AG4) روی محیط کشت PDA بر روی همین محیط نوع کشت در پتری‌های ۹ سانتی‌متری حاوی غلظت‌های ۰، ۵ ، ۲۰ و ۵۰ میلی‌مولار تیامین و یا پیریدوکسین و محیط کشت‌های حاوی غلظت ۶ میکرومولار PQS و 3- oxo- C_6- HSL کشت شد. پس از ۶ روز رشد در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، قطر کلنی قارچ در محیط کشت PDA حاوی هر یک از غلظت‌های مواد مورد استفاده در القای مقاومت اندازه‌گیری شد و با قطر کلنی قارچ شاهد رشد یافته در محیط کشت PDA فاقد تیمارهای مذکور مقایسه شد. در این آزمایش برای هر قارچ در هر غلظت، ۴ تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش ۳ بار تکرار شد.

ارزیابی نقش آنزیم پراکسیداز در تولید ترکیبات فنلی

جهت بررسی نقش پراکسیداز در مقاومت القایی ناشی از کاربرد تیامین در گوجه فرنگی علیه قارچ *R. solani*، دیسک‌های برگی ابتدا به مدت ۲ ساعت با محلول سدیم آزید (NaN_3) یک میلی‌مولار به عنوان بازدارنده فعالیت پراکسیداز تیمار شده و سپس مایه‌زنی با قارچ بیمارگر انجام گردید (۳۴). از دیسک‌های برگی تیمار شده در آب مقطر استریل به عنوان کنترل استفاده شد. شاخص بیماری برای دیسک‌های برگی محاسبه و میزان ترکیبات فنلی در نمونه‌های تیمار شده با سدیم آزید مورد بررسی قرار گرفت.

نقش ترکیبات فنلی در مقاومت القایی ناشی ازکاربرد تیامین درگوجه فرنگی علیه *R. solani*

برای استخراج ترکیبات فنلی، ۰/۵ گرم از بافت درون هاون چینی ساییده و با استفاده از ازت مایع به صورت پودر نرمی درآورده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ اسیدی با pH معادل ۲ به آن اضافه و به خوبی یکنواخت گردید. نهایتاً عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در g ۴۰۰۰ سانتریفوژ و رونشست به عنوان عصاره فنلی مورد استفاده قرار گرفت (۲۹). به ۵۰ میکرولیتر عصاره فنلی به دست آمده، ۷۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر معرف فولین اضافه و مخلوط شدند. بعد از ۵ دقیقه،۱۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و به خوبی مخلوط شد. بعد از یک ساعت نگهداری در تاریکی، میزان جذب نور با طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید (۴). لوله‌های شاهد شامل آب و معرف بود. از هر نمونه عصاره در ۳ بار تکرار آزمایش تهیه و اندازه-گیری ترکیبات فنلی در طول موج فوق الذکر انجام شد. سپس میانگین داده‌ها در محاسبات مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه منحنی استاندارد و تعیین معادله رگرسیون فنل کل، غلظت‌های ۵ ،۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم اسیدکافئیک، تهیه و جذب نوری آن در دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید (۲۸). میزان ترکیبات فنلی موجود در نمونه‌ها به صورت میلی‌گرم اسیدکافئیک در هر گرم وزن تر گیاه محاسبه شد.

آنالیز آماری داده‌ها

آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار در هر بار انجام آزمایش اجرا شدند. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و نهایتا داده‌ها مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند.

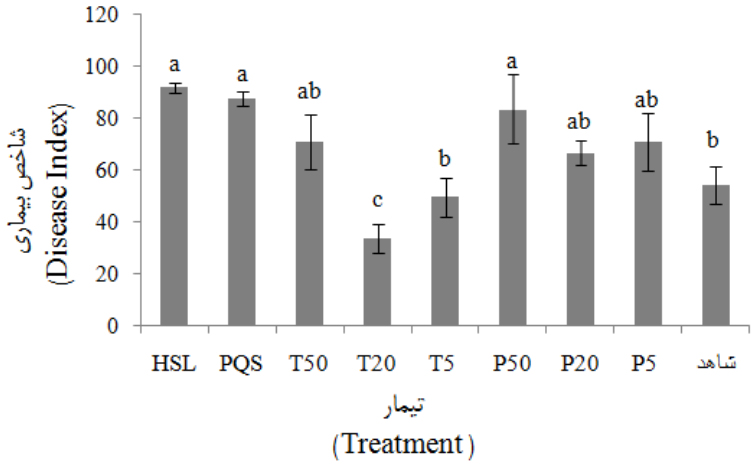
نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمایش بررسی اثر تیمارهای مختلف جهت القای مقاومت در گوجه فرنگی علیه *R. solani* (AG4) نشان داد که

1 - Disease Index

هموسرین لاکتون‌ها (PQS و 3-oxo- C_6- HSL)، پیریدوکسین و نیز غلظت‌های ۵ و ۵۰ میلی‌مولار تیامین باعث کاهش شدت بیماری نشدند. تنها غلظت ۲۰ میلی‌مولار تیامین باعث کاهش معنی‌دار شدت بیماری رایزوکتونیایی در برگ‌های گوجه فرنگی شد (شکل ۱). این نتایج نشانگر این است که غلظت ۲۰ میلی‌مولار تیامین از مؤثرترین غلظت‌های تیامین برای القای مقاومت در پاتوسیستم گوجه فرنگی- رایزوکتونیا می‌باشد.

هر یک از تیمارها در غلظت‌های مورد استفاده در القای مقاومت به محیط کشت PDA افزوده شدند تا اثر مستقیم آن‌ها بر روی رشد رایزوکتونیا بررسی گردد. هیچ یک از تیمارها اثر مستقیمی بر رشد قارچ رایزوکتونیا در محیط کشت نداشتند (جدول ۱).



شکل ۱- ارزیابی امکان القای مقاومت در گوجه فرنگی علیه *Rhizoctonia solani* با استفاده از ویتامین‌ها و هموسرین لاکتون‌ها. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر در سطح ۵٪ هستند

Figure 1- Investigating the possibility of inducing resistance in tomato to *Rhizoctonia solani* using vitamins and homoserine lactones. Treatments with similar letter are not significantly different at P=0.05

جدول ۱- تأثیر مستقیم تیمارهای مورد استفاده در القای مقاومت بررشد *Rhizoctonia solani* در محیط کشت

Table 1- Direct effect of treatments on *Rhizoctonia solani* growth in *vitro*

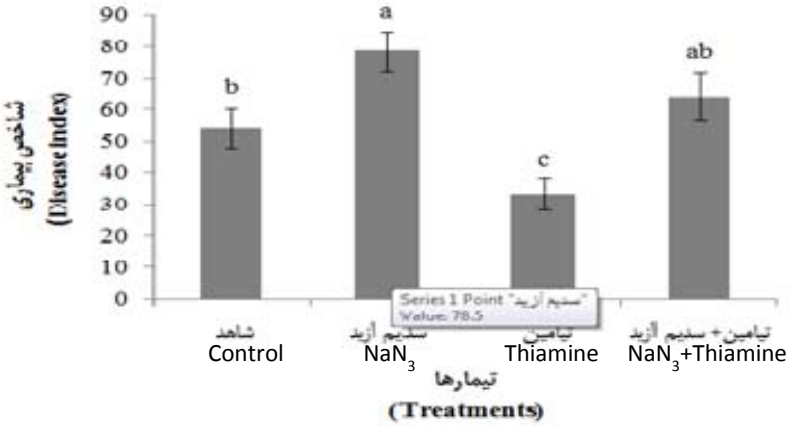
تیمارها Treatments	غلظت Concentration	قطر پرگنه *Rhizoctonia solani* (سانتی‌متر) Colony diameter *Rhizoctonia solani* (cm)
Thiamine تیامین	0	8.2 ± 0.8 [1]
Thiamine تیامین	5	8.1 ± 0.5
Thiamine تیامین	20	8.1 ± 1.1
Thiamine تیامین	50	8.3 ± 1.0
Pyridoxine پیریدوکسین	0	8.3 ± 0.5
Pyridoxine پیریدوکسین	5	8.5 ± 0.3
Pyridoxine پیریدوکسین	20	8.0 ± 0.7
Pyridoxine پیریدوکسین	50	8.1 ± 0.8
PQS	6	8.2 ± 1.2
3- oxo- C_6- HSL	6	8.3 ± 0.6

۱: میانگین‌ها و انحراف معیار اندازه‌گیری شده در ۴ تکرار براساس آنالیز آماری به روش دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار هستند

1: Means followed by standard deviations estimated for 4 replications are not significantly different based on statistical analysis via Duncan method at P= 0.05

سدیم آزید بازدارنده اختصاصی پراکسیداز می‌باشد (۵). به منظور ارزیابی نقش این آنزیم آنتی اکسیدانت در مقاومت گیاه علیه قارچ بیمارگر دیسک‌های برگی با سدیم آزید تیمار و سپس مایه‌زنی شدند. دیسک‌های تیمار شده با سدیم آزید بیشترین شدت بیماری را نشان دادند که تفاوت معنی‌داری با دیسک‌های شاهد داشتند (شکل ۲). تیمار با تیامین منجر به کاهش معنی‌دار شاخص بیماری نسبت به

دیسک های شاهد (تیمار نشده) شد. دیسک‌های تیمار شده با تیامین و سدیم آزید تفاوت معنی‌داری با دیسک‌های شاهد نداشتند. بنابراین تیمار با سدیم آزید تا حدودی از القای مقاومت توسط تیامین جلوگیری می‌کند. بیشترین میزان ترکیبات فنلی ۷۲ ساعت بعد از تلقیح و در برگ‌های تیمار شده با تیامین مشاهده شد که اختلاف قابل توجهی با برگ‌های تیمار شده با آب، سدیم آزید و نیز برگ‌هایی که ابتدا با سدیم آزید سپس با تیامین تیمار شدند، در همین زمان داشتند (شکل ۳). تیمار تیامین همراه با سدیم آزید (NaN_3+T) مربوط به دیسک‌های برگی است که ابتدا به مدت ۲ ساعت با NaN_3 تیمار شده بودند و بعد از آن ۵ ساعت با تیامین تیمار شدند، می‌باشد. در زمان صفر تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت. ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی تیمار تیامین بیشترین میزان فنل را داشت. بعد از تیامین، تیمار کنترل میزان فنل بیشتری داشت. ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی هم برگ‌های تیمار شده با تیامین بیشترین میزان فنل را داشتند. اختلاف قابل توجهی بین تیمارها در این ساعت وجود داشت و بعد از تیمار تیامین، تیمارهای شاهد، NaN_3+T و NaN_3 به ترتیب فنل بیشتری داشتند. تیمار شاهد روند افزایش در میزان فنل طی ساعات متوالی داشت. دیسک‌های برگی مربوط به تیمار NaN_3 نیز بعد از ۲۴ ساعت کاهش میزان فنل داشتند.



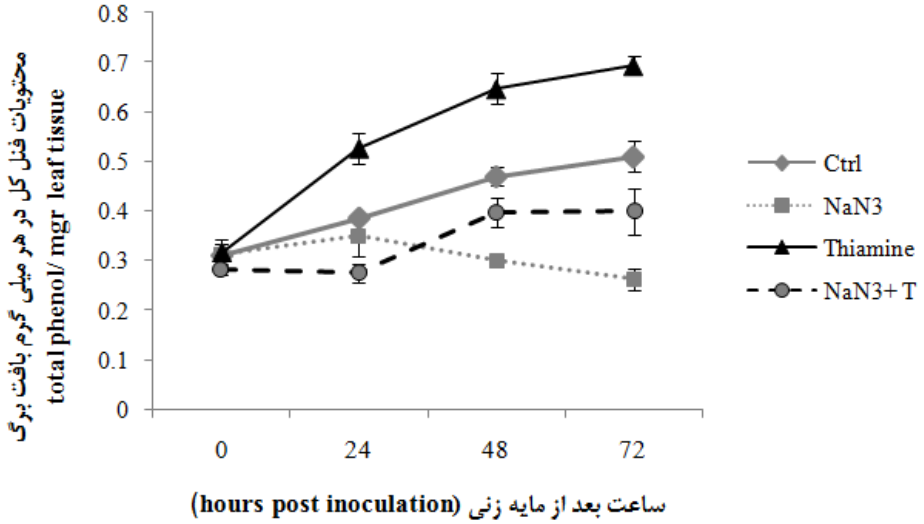
شکل ۲- مقایسه میزان ترکیبات فنلی در دیسک‌های برگی تیمار شده با سدیم آزید ، تیامین و شاهد (تیمار شده با آب) در ساعات مختلف بعد از مایه‌زنی با *Rhizoctonia solani*. Ctrl: گیاهان شاهد تیمار شده با آب،NaN3 : تیمار با سدیم آزید، Thiamine: گیاهان تیمار شده با تیامین، NaN_3+T: گیاهان تیمار شده با سدیم آزید و سپس تیامین

Figure 2- Comparsion phenolics component in the leaf disks treated with NaN_3, thiamine, and control (treated with water)at different hours after inoculation with *Rhizoctonia solani*. Ctrl:control, NaN_3:treated with NaN_3, Thiamine: treated with Thiamine, NaN_3+T: treated with NaN_3 and then thiamine

در این بررسی میزان ترکیبات فنلی در نمونه‌های تیمار شده با سدیم آزید در همه ساعات مورد بررسی به استثناء زمان ۲۴ hpi، کمتر از تیمار NaN_3+ T و میزان ترکیبات فنلی تیمار تیامین بیشتر از تیمار NaN_3+ T بود (شکل ۳) که بیان کننده اثر بازدارندگی NaN_3 در افزایش میزان ترکیبات فنلی توسط تیامین می‌باشد.

نتایج بدست آمده در این پژوهش با تحقیقات انجام شده در مورد نقش پراکسیداز و افزایش بیان این ژن در رقم Sunny گوجه فرنگی به عنوان رقم نسبتاً مقاوم به *R. solani* و اهمیت آن در مکانیسم های دفاعی مطابقت دارد (۳۵). افزایش اولیه در بیان ژن پراکسیداز مشابه آنچه در این تحقیق بدست آمد، در بقولات گرمسیری آلوده به *Colletotrichum gloeosporides* هم گزارش شده است که بیان می‌کند القای سریع آن می‌تواند در مقاومت گیاه علیه بیمارگر نقش داشته باشد (۱۱). تحقیقات نشان داده است که افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در پاسخ به آلودگی بیمارگر، منجر به کاهش گسترش علائم و جلوگیری از مرگ گیاهچه ناشی از *R. solani* در گوجه فرنگی می‌شود که نشان دهنده اهمیت مسیر فنیل پروپانوئید و پراکسیداز در پاسخ های دفاعی گوجه فرنگی علیه بیمارگر است (۳۵). در بررسی فعالیت پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، و ترکیبات فنلی در ارقام متحمل و حساس گوجه فرنگی به قارچ *Fusarium oxsyporum* f.sp. *lycopersici* مشاهده شد که در این پاتوسیستم هم مقدار مواد فنلی و فعالیت این آنزیم‌ها درارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس بوده است (۲۲). این نتایج تأیید کننده یافته‌های پژوهش حاضر در مورد سرعت و شدت بیشتر بیان ژن پراکسیداز و تولید ترکیبات فنلی در گیاهان تیمار شده با تیامین و نقش پراکسیداز و فنل

کل در مقاومت القایی ناشی از کاربرد این ویتامین می‌باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین شاخص بیماری در نمونه‌های تیمار شده با سدیم آزید و تیامین در گوجه فرنگی علیه *Rhizoctonia solani*. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند دارای اختلاف ار با یکدیگر هستند. $T+NaN_3$: تیمار با سدیم آزید و تیامین

Figure 3- Mean Comparsion of disease index in samples treated with sodium azid and thiamine in tomato to *Rhizoctonia solani*. Treatments with different letter are significantly different at P=0.05. $T+NaN_3$: treated with sodium azid and thiamine

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در گیاه گوجه فرنگی مکانیسم‌های مشترکی در مقاومت پایه و القایی علیه بیمارگرهای نکروتروف دخالت دارند. آنزیم پراکسیداز در رسوب ترکیبات فنلی در دیواره سلولی طی پاسخ‌های دفاعی گیاه علیه تنش‌های ناشی از عوامل زنده و غیرزنده نقش مهمی ایفا می‌کند. بنابراین جلوگیری از فعالیت این آنزیم به کمک بازدارنده‌ها منجر به کاهش تولید ترکیبات فنلی و در نهایت کاهش مقاومت گیاه در برابر حمله بیمارگرها و افزایش حساسیت نسبت به پاتوژن می‌شود (۵، ۱۲ و ۳۴). اولین مرحله در فعالیت دفاعی گیاه، تجمع ترکیبات فنلی در محل آلودگی می‌باشد که باعث توقف و یا کند شدن رشد و گسترش بیمارگر در بافت‌های گیاه می‌شود (۱۷). نتایج تحقیقات انجام شده با استفاده از سدیم آزید به عنوان بازدارنده فعالیت پراکسیداز نشان داد که میزان ترکیبات فنلی در بافت‌های گیاهی تیمار شده با سدیم آزید کمتر از تیمار ریبوفلاوین همراه با سدیم آزید بود (۳۴). تحقیقات محققان دیگر نیز نشان داد که سدیم آزید کاملاً از فعالیت پراکسیدازهای داخلی جلوگیری می‌کند و موجب کاهش میزان ترکیبات فنلی می‌شود (۲۳). بنابراین، نتایج به دست آمده توسط این پژوهشگران تأیید کننده مشاهدات ما در زمینه نقش پراکسیداز در القای مقاومت توسط تیامین در پاتوسیستم گوجه فرنگی –رایزوکتونیا و اهمیت پراکسیداز در تولید ترکیبات فنلی به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های دفاعی گیاه علیه بیمارگرهای قارچی می‌باشد.

منابع

1- Abdel- Monaim M.F. 2011. Role of riboflavin and thiamine in induced resistance against charcoal rot disease of soybean. African Journal of Biotechnology , 10: 10842-10855.
2- Ahn I. P., Kim S., and Lee Y.H. 2005. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. Journal of Plant Physiology, 138:1505-1515.
3- Ahn I.P., Kim S., Lee, W.H., and Suh S.C. 2007. Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in *Arabidopsis*. Journal of Plant Physiology, 143: 838–848.
4- Bahuguna R.N., Joshi R., Shukla A., Pandey M., and Kumar J. 2012. Thiamine primed defense provides reliable alternative to systemic fungicide carbendazim against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Physiology and Biochemistry, 57: 159-167.
5- Blokhina O.B., Chirkova T.V., and Fagerstedt K.V. 2001. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in

plant cells. Journal of Experimental Botany, 52, 1179–90
6- Boubakri H., Wahab M.A., Chong J., Bertsch C., Mliki A., and Gacougnolle I.S. 2012. Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host defense responses, including HR like-cell death. Plant Physiology and Biochemistry, 57: 120-13.
7- Denslow Sh.A., Rueschhoff E.E., and Daub M.E. 2007. Regulation of the *Arabidopsis thaliana* vitamin B6 biosynthesis genes by abiotic stress. Plant Physiology and Biochemistry, 45: 152-161.
8- Djébali N., Mhadhbi H., Lafitte C., Dumas B., Esquerré-Tugayé M. T., Aouani M. E., and Jacquet C. 2011. Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are componentsof *Medicago truncatula* partial resistanceto *Aphanomyces euteiches*. European Journal of Plant Pathology, 131: 559-571.
9- González G., Portal Onco M.A., and Rubio SusanV. 2006. Biology and systematic of form genus *Rhizoctonia*. Spanish Journal of Agricultural Research, 4: 55-79.
10- Goyer A. 2010. Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions, Phytochemistry, 17: 1615–1624.
11- Harrison S., Curtis M., McIntyre C., Maclean D., and Manners J. 1995. Differential expression of peroxidase isogenes during the early stages of infection of the tropical forage legume *Stylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. Molecular Plant-Microbe Interaction, 8: 398-406.
12- Hung K.T., and Kao C.H. 2004. Hydrogen peroxide is necessary for abscisic acid-induced senescence of rice leaves. Journal of Plant Physiology, 161: 1347-1357.
13- Hilaire E., Young S.A., Willard L.H., McGee J.D., Sweat T., Chittoor J.M., Guikema J.A., and Leach J.E. 2001. Vascular defense responses in rice: Peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. Molecular Plant-Microbe Interaction. 14: 1411-1419.
14- Jung W.J., Mabood F., Kim T.H., and Smith D.L. 2007. Induction of pathogenesis-related proteins during biocontrol of *Rhizoctonia solani* with *Pseudomonas aureofaciens* in soybean (Glycine max L. Merr.) plants. BioControl, 52: 895–904.
15- Kuramae E.E., Buzeto A.L., Ciampi M.B., and Souza N.L. 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in lettuce, AG 4 HG-I in tomato and melon, and AG 4 HG-III in broccoli and spinach, in Brazil. European Journal of Plant Pathology, 109: 391–395.
16- Luzzatto T., Golan A., Yishay M., Bilkis I., Ben-Ari J., and Yedidia I. 2007. Priming of antimicrobial phenolics during induced resistance response towards *Pectobacterium carotovorumin* the ornamenta lmonocot calla lily. Journal Agricultural and Food Chemistry, 55: 10315–10322.
17- Matern U., and Kneusal R.E. 1998. Phenolic compounds in plant disease resistance. Phytoparasitica, 16: 153–170.
18- Nikraftar F., Taheri P., Flahati-Rastgar M., and Tarighi S. 2013. Tomato partial resistance to *Rhizoctonia solani* involves antioxidative defense mechanisms. Physiological and Molecular Plant Pathology 81:74–83.
19- Oñate-Sánchez L., and Vicente-Carbajosa J. 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. BMC Research Notes, 1: 1-7.
20- Pushpalatha H.G., Mythrashree S.R., Shetty R., Geetha N.P., Sharathchandra R.G., Amruthesh K.N., and Shetty H.S. 2007. Ability of vitamins to induce downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. Crop Protection, 26: 1674–1681.
21- Pushpalatha H.G., Sudisha J., Geetha N.P., Amruthesh K.N., and Shekar Shetty H. 2011. Thiamine seed treatment enhances LOX expression, promotes growth and induces downy mildew disease resistance in pearl millet. Biologia Plantarum, 55: 522-527.
22- Rai G.K., Kumar R., Singh J., Rai P.K., and Rai S.K. 2011. Peroxidase, polyphenol oxidase activity, protein profile and phenolic content in tomato cultivars tolerant and susceptible to *Fusarium oxsyporum* f.sp. *lycopersici*. Journal of Botany, 43: 2987-2990.
23- Rajasekaran K., Cary J.W., Jacks T.J., Stromberg K.D., and Cleveland T.E. 2000. Inhibition of fungal growth in planta and in vitro by transgenic tobacco expressing a bacterial nonheme chloroperoxidase gene. Plant Cell Reports, 19:333–338
24- Sadrovi M., and Setayeshmehr F. 2008. Fungal diseases of tomato in North Khorasan province and the reaction of four commercial cultivars to their Pathogens. Journal of plant diseases,44: 255- 261. (in Persian)
25- Schikora A., Schenk S.T., Stein E., Molitor A., Zuccaro A., and Kogel K.H. 2011. N-Acyl-homoserine lactone confers resistance toward biotrophic and hemibiotrophic pathogens via altered activation of AtMPK6. Plant Physiology, 157: 1407–1418.
26- Schuhegger R., Ihring A., Gantner S., Bahnweg G., Knappe C.,Vogg G., Hutzler P., Schmid M., Breusegem F.N., Eberl L., Hartmann A., and Langebartels C. 2006. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. Plant, Cell and Environment, 29: 909–918.
27- Schwartz H.F., and Gent D.H. 2007. Homepage of high plains integrated pest management. Damping off and seedling blight. wiki.bugwood.org, Visited: 2007/01/04
28- Seevers P.M., Daly J.M., and Catedral F.F. 1971. The Role of Peroxidase Isozymes in Resistance to Wheat Stem Rust Disease. Journal of Plant physiology, 48: 353-360.
29- Shahbazi H., Aminian H., Sahebani N., and Halterman D. A. 2010. Biochemical Evaluation of Resistance

Responses of Potato to Different Isolates of *Alternaria solani.* Phytopathalogy, 100: 454-459.
30- Sneh B., Burpp L., and Ogoshi A. 1991. Identification of Rhizoctonia species. APS Press, 133 Pp.
31- Taheri P., Gnanamanickam S., and Hofte M. 2007. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases. Phytopathology, 97: 373–83.
32- Taheri P., and Tarighi S. 2009. A study on the effect of riboflavin as a defense activator in rice against Rhizoctonia diseases. Journal of Plant Protection, 23: 68- 80.(in Persian)
33- Taheri P., and Tarighi S. 2010. Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. Journal of Plant Physiology, 167: 201–208.
34- Taheri P., and Tarighi S. 2011. A survey on basal resistance and riboflavin-induced defense responses of sugar beet against *Rhizoctonia solani*. Journal of Plant Physiology, 168: 1114–1122.
35- Taheri P., and Tarighi S. 2012. The Role of Pathogenesis-Related Proteins in Tomato-*Rhizoctonia solani* Interaction. Journal of Botany, 2012. http://dx.doi.org/10.1155/2012/37037.