

بررسی اثر فلاونوئیدها در القای مقاومت علیه پوسیدگی طوقه و ریشه گیاه لوبیا ناشی از *Rhizoctonia solani*

فهیمة مروی^۱، پریسا طاهری^{۲*} و مجتبی ممرآبادی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۰)

چکیده

در این پژوهش، برای تعیین سطوح مقاومت رقم‌های لوبیا به *Rhizoctonia solani* عامل پوسیدگی طوقه و ریشه آزمون بیماری‌زایی به دو روش دیسک برگی در شرایط آزمایشگاه و مایه‌زنی گیاهچه‌ها در گلخانه انجام شد. سپس حساس‌ترین رقم لوبیا (رقم ناز، به دلیل دارا بودن توجیه اقتصادی) برای ارزیابی امکان القای مقاومت با فلاونوئیدهایی نظیر کوئرستین (Quercetin) نارینجین (Naringenin) و بررسی برخی سازوکارهای دخیل در القای مقاومت استفاده شد. جهت بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف (۱۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) این فلاونوئیدها در القای مقاومت در لوبیا علیه *R. solani* گیاهچه‌ها با غلظت‌های مختلف فلاونوئیدها تیمار شدند. گیاهان تیمار شده و شاهد با قارچ بیمارگر مایه‌زنی شدند و شاخص بیماری یک هفته بعد از مایه‌زنی محاسبه شد. نتیجه‌ها نشان دادند که غلظت‌های مختلف کوئرستین و نارینجین در کاهش شاخص بیماری تأثیر متفاوتی داشتند. کوئرستین در غلظت‌های ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب کاهش معنی‌دار پیشرفت بیماری شد و بهترین فاصله زمانی بین تیمار و مایه‌زنی سه روز بود. غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نارینجین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کوئرستین باعث کاهش معنی‌دار پیشرفت بیماری نشد. ارزیابی سطوح کالوز، سوپراکسید و هیدروژن پراکسید در گیاهچه‌های تیمار شده با کوئرستین در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی توسط *R. solani* نشان داد که کوئرستین با افزایش سرعت و شدت تولید این ترکیب‌های دفاعی موجب القای مقاومت در لوبیا علیه بیمارگر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سازوکارهای دفاعی، کالوز، کوئرستین، مقاومت القایی، نارینجین.

Investigating the effect of flavonoids in induction of resistance in the bean plant against crown and root rot caused by *Rhizoctonia solani*

Fahimeh Marvi¹, Parissa Taheri^{2*} and Mojtaba Mamarabadi³

1, 2, 3. Ph.D. Candidate, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(Received: May 22, 2018 - Accepted: Nov. 1, 2018)

ABSTRACT

In this research, pathogenicity tests were done using two different methods including inoculation of leaf discs under laboratory conditions and infecting the seedlings in the greenhouse in order to determine resistance levels of bean cultivars to *Rhizoctonia solani* AG4 HG-II, the causal agent of the crown and root rot. Furthermore, the most susceptible bean cultivar (cv. Naz, because of economic justification) was used to examine the possibility of inducing resistance against the pathogen, using flavonoids such as quercetin and naringenin and investigate some mechanisms involved in induced resistance. To study the effects of different concentrations of flavonoids in the induction of resistance in bean against *R. solani*, the seedlings were treated with 100 to 400 µg/mL concentrations of flavonoids. The treated and control plants were inoculated with the pathogen and the disease index was calculated one week following inoculation. Results showed that various concentrations of quercetin and naringenin had different effects in reducing the disease index. Quercetin at 200 to 400 µg/mL significantly decreased the progression of the disease caused by *R. solani* in the bean. The best time interval between treatment and inoculation was 3 days. Naringenin at 100 and 200 µg/mL and quercetin at 100 µg/mL did not significantly reduce the disease progression. Investigating callose, superoxide, and hydrogen peroxide levels at various time points after *R. solani* inoculation in the seedlings pretreated with quercetin revealed that quercetin-induced resistance in bean against the fungal pathogen via priming the defense components.

Keywords: Callose, defense mechanisms, induced resistance, naringenin, quercetin.

* Corresponding author E-mail: p-taheri@um.ac.ir

مقدمه

لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris*) یکی از حبوبات مهم در جهان است که در بسیاری از کشورها کشت شده و به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی محسوب می‌شود (Gavan *et al.*, 2006). یکی از عواملی که باعث کاهش عملکرد لوبیا می‌شود بروز بیماری‌های مختلفی است که محصول لوبیا را تحت تأثیر قرار می‌دهند. یکی از مهم‌ترین این بیماری‌ها مرگ گیاه‌چه و پوسیدگی طوقه و ریشه در اثر قارچ نکروتروف *Rhizoctonia solani* است که می‌تواند تولید لوبیای معمولی را تا ۶۰ درصد کاهش دهد (Navarrete-Maya *et al.*, 2009; Valentin Torres *et al.*, 2016). وجود لکه‌های قهوه‌ای مایل به قرمز و کمی فرورفته بر روی طوقه و ریشه که در اثر پیشرفت بیماری این لکه‌ها بزرگ شده و به هم می‌پیوندند از علائم ایجادشده توسط قارچ *R. solani* در گیاه لوبیا محسوب می‌شود. این علائم در نهایت منجر به کاهش رشد گیاه می‌شوند و در صورتی که این زخم‌ها دور ساقه را فراگیرند، موجب مرگ گیاه می‌شوند (Nerey *et al.*, 2010). به دلیل تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت ریزوکتونیا، دامنه میزبانی وسیع و بقای طولانی مدت آن در خاک، کنترل این بیمارگر خاک‌زاد مشکل است (Taheri *et al.*, 2007). تاکنون رقم‌هایی کاملاً مقاوم به این بیمارگر در هیچ‌گونه گیاهی شناخته نشده‌اند. از طرفی اثرات مخرب زیست‌محیطی قارچ‌کش‌ها و ظهور جدایه‌های مقاوم بیمارگرها به این قارچ‌کش‌ها، پژوهش‌ها را به سمت روش‌های تلفیقی مدیریت بیماری‌های گیاهی سوق می‌دهند. استفاده از رقم‌های با مقاومت بالا و کاربرد مواد زیستی یا شیمیایی جهت القای واکنش‌های دفاعی گیاه از راهبردهای مؤثر در مدیریت نوین و مؤثر بیماری‌ها هستند.

ترکیب‌های القاکننده مقاومت عمدتاً به عنوان مواد زیستی فعال در کنترل بیمارگرهای مختلفی نظیر *Sclerotinia sclerotiorum* (Marcucci *et al.*, 2010)، *R. solani* (Taheri & Tarighi, 2011)، *Peronospora parasitica* (Jan *et al.*, 2012) و *Plasmopara viticola* (Boubakri *et al.*, 2013) و *Botrytis cinerea* (Finiti *et al.*, 2014) مؤثر هستند.

فلاونوئیدها از ترکیب‌های فعال‌کننده سامانه دفاعی گیاهان بوده (Yang *et al.*, 2016) که در گروه ترکیب‌های فنلی طبقه‌بندی می‌شوند. تاکنون بیش از ۸۰۰۰ فلاونوئید شناخته شده است. نقش ترکیب‌های فنلی از سال‌ها قبل در مقاومت گیاهان به عوامل بیماری‌زای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است (Samanta *et al.*, 2011). کاربرد برون‌زاد کوئرستین منجر به کاهش لکه‌های موضعی در بیماری لکه حلقوی گوجه‌فرنگی شد. ساکورانتین نیز که یکی از مشتقات متیل اتری نارینجین است که در مقاومت گیاهان برنج علیه آلودگی به قارچ عامل بیماری بلاست دخیل است (Madhuri & Reddy, 1999). همچنین Jia *et al.* (2010) گزارش نمودند که کوئرستین باعث القای سازوکارهای دفاعی در گیاه آرابیدوپسیس در برابر آلودگی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 می‌شود. تولید گونه‌های فعال اکسیژن (نظیر هیدروژن پراکسید، سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل) و تجمع کالوز از مهم‌ترین پاسخ‌های دفاعی گیاهان در برابر حمله بیمارگر هستند که عمدتاً در محل نفوذ بیمارگر مشاهده می‌شوند. در برهمکنش گیاهان و بیمارگرهای نکروتروف نظیر قارچ خاک‌زاد *R. solani* تجمع این ترکیب‌های دفاعی در بافت‌های گیاه پس از آلودگی به بیمارگر موجب کاهش پیشرفت بیماری و محدود شدن توسعه قارچ بیمارگر می‌شود (Noorbakhsh & Taheri, 2016). همچنین برخی از ترکیب‌های القاکننده مقاومت با تحریک بافت‌های گیاهی به تولید این مواد دفاعی سبب افزایش سطح مقاومت گیاه در برابر تنش‌های ناشی از عوامل زنده و غیرزنده می‌شوند (Ton & Mauch-Mani, 2004; Ton *et al.*, 2009). با توجه به اینکه برخی ترکیب‌های فلاونوئیدی با القای مقاومت در گیاهان، باعث کاهش توسعه بیماری شده‌اند و تاکنون گزارش‌های متعددی در مورد ارتباط مقاومت گیاهان با تغییر در واکنش‌های دفاعی گیاه از جمله تغییر در تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تجمع کالوز وجود دارد (Sewelam *et al.*, 2016; Khaledi *et al.*, 2017). در پژوهش حاضر امکان القای مقاومت علیه پوسیدگی طوقه و ریشه لوبیا ناشی از قارچ

در آزمون دیسک برگ، با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن دیسک‌هایی دایره‌ای شکل به قطر دو سانتی‌متر از برگ‌های گیاهان لوبیای یک‌هفته‌ای تهیه شد. هر یک از این دیسک‌ها به قطر ۰/۵ سانتی‌متر روی یک لام شیشه‌ای داخل پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار گرفت. یک دیسک میسیلیومی از قارچ بیمارگر به قطر در مرکز هر یک از دیسک‌های برگ قرار داده شد. تشتک‌های پتری در شرایط آزمایشگاه (۲۵ درجه سلسیوس؛ ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری و علائم چهار روز بعد از تلقیح بررسی شدند (Taheri & Tarighi, 2011). در آزمون بیماری‌زایی بر روی دیسک برگ شاخص بیماری محاسبه شد. شدت بیماری برحسب درصد سطح بافت آلوده با پنج درجه دسته‌بندی شد: (۰ = نبود آلودگی، ۱ = ۱-۲۵٪، ۲ = ۲۶-۵۰٪، ۳ = ۵۱-۷۵٪ و ۴ = ۷۶-۱۰۰٪). سپس شاخص بیماری با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (Taheri & Tarighi, 2010):

شاخص بیماری

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

n_0 : تعداد بوته با درجه ۰ آلودگی؛ n_1 : تعداد دیسک برگ با درجه یک آلودگی؛ n_2 : تعداد دیسک برگ با درجه دو آلودگی؛ n_3 : تعداد دیسک برگ با درجه سه آلودگی؛ n_4 : تعداد دیسک برگ با درجه چهار آلودگی؛ N : تعداد کل دیسک‌های برگ هستند. برای بررسی شدت بروز بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از قارچ *R. solani* روی گیاهچه‌های رقم‌های مختلف لوبیا قرمز از روش (D'aes et al., 2011) با اندکی تغییر استفاده شد. چهار هفته پس از سبز شدن گیاهچه‌ها مایه تلقیح تهیه‌شده به وسط ردیف‌ها با فاصله سه سانتی‌متر از گیاهچه‌ها درون شیارها برای هر گلدان ۶۰ عدد بذر گندم آلوده به رایزوکتونیا قرار داده شد. برای حفظ رطوبت، گلدان‌ها داخل شاسی پلاستیکی با رطوبت بالا نگهداری شدند. پیشرفت علائم یک هفته بعد از تلقیح قارچ بررسی شد و ارزیابی شدت بیماری با محاسبه میانگین طول زخم برای هر رقم انجام شد (Taheri & Tarighi, 2010; Nikraftar et al., 2013; Singh et al., 2002). در نهایت مجدداً عامل بیماری از گیاهچه‌های آلوده جداسازی شد.

R. solani با کاربرد دو فلاونوئید کوئرستین و نارنجین و همچنین برخی از سازوکارهای دخیل در بروز واکنش مقاومت بررسی شد.

مواد و روش‌ها

آزمون بیماری‌زایی و تعیین حساسیت رقم‌های لوبیا قرمز به *R. solani*

جدایه *R. solani* AG4 HG-II از کلکسیون قارچ گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و روی محیط کشت PDA نگهداری شد. برای تهیه مایه تلقیح قارچ *R. solani*، در سطح تشتک پتری محتوی محیط کشت PDA مقدار ۱۲ گرم بذر گندم استریل پخش شد و با افزودن قطعه میسیلیومی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر در مرکز تشتک پتری به مدت هفت روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بذرها توسط قارچ بیمارگر کلونیزه شدند (Misava & Kuninaga, 2010). گندم‌هایی که بر روی محیط کشت PDA فاقد قارچ قرار داده شده بودند، به‌عنوان کنترل منفی در آزمون بیماری‌زایی استفاده شدند.

در این بررسی از چهار رقم لوبیا قرمز به نام‌های صیاد، گلی، ناز، اختر تهیه‌شده از مرکز تحقیقات لوبیای خمین استفاده شد. بذرها ابتدا با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شده، سپس سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. بذرهای فوق روی کاغذ صافی استریل مرطوب در پتری قرار داده شده و در محلی تاریک در دمای اتاق به مدت سه روز نگهداری شدند. بذرهای لوبیا بعد از سه روز در خاک معمولی با ماسه و خاک‌برگ به نسبت (۱:۱) که قبلاً دو بار به فاصله یک روز در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت اتوکلاو شده بود، کشت شدند. کشت در گلدان‌هایی به ابعاد ۶×۱۵×۲۲ سانتی‌متر و به فاصله سه سانتی‌متر از یکدیگر در دو ردیف انجام شد. گلدان‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت 26 ± 2 درجه سلسیوس روزانه و 18 ± 2 درجه سلسیوس شبانه در گلخانه قرار گرفتند.

برای ارزیابی مقاومت چهار رقم لوبیا قرمز به قارچ بیمارگر از دو روش مایه‌زنی دیسک‌های برگ (در شرایط آزمایشگاه) و مایه‌زنی گیاهچه‌ها (در گلخانه) استفاده شد.

Tarighi, 2010; Nikraftar *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2002).

اثر مواد فلاونوئیدی بر رشد عامل بیماری‌زا

جدایه قارچی مورد استفاده در این پژوهش روی محیط کشت PDA حاوی غلظت‌های مختلف کوئرستین و نارینجین شامل ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت شد تا تأثیر این فلاونوئیدها بر رشد رویشی قارچ ارزیابی شود. شش روز پس از رشد *R. solani* در انکوباتور ۲۸ درجه سلسیوس، قطر پرگنه اندازه‌گیری شد. در این آزمایش، برای هر غلظت شش تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش دو بار تکرار شد.

بررسی احتمال بروز مرگ سلولی در اثر کاربرد کوئرستین

جهت ردیابی مرگ سلولی، گیاهان لوبیا با کوئرستین در غلظت‌های مختلف (۱۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) محلول‌پاشی شده و چهار روز پس از تیمار با این ماده از نظر بروز مرگ سلولی احتمالی ارزیابی شدند. گیاه تیمارنشده و مایه‌زنی‌شده با قارچ نکروتروف *R. solani* (که سبب بروز مرگ سلولی در گیاه می‌شود) به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. رنگ‌آمیزی با تریپان بلو جهت ردیابی میکروسکوپی مرگ سلولی انجام شد (Yin *et al.*, 2000).

بررسی سازوکارهای سلولی دخیل در مقاومت القایی ناشی از کوئرستین

ردیابی هیدروژن پراکسید

به‌منظور بررسی تجمع هیدروژن پراکسید، رنگ‌آمیزی دیسک‌های برگی با دی‌آمینوبنزیدین (3,3'-Thordal-Diaminobenzidine; DAB) انجام شد (Christensen *et al.*, 1997). مشاهده‌ها در زمان‌های مختلف بعد از تلقیح انجام گرفت. دیسک‌های برگی لوبیا آلوده به قارچ رایزوکتونیا در محلول یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر AB-HCl قرار گرفتند. پلیمراسیون DAB در محل تجمع پراکسیداز و هیدروژن پراکسید منجر به ایجاد رنگ قهوه‌ای می‌شود که با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است (Asselbergh *et al.*, 2007).

بررسی اثر فلاونوئیدها در القای مقاومت در گیاهان لوبیا قرمز علیه قارچ *R. solani*

تاکنون در زمینه القای مقاومت در لوبیا قرمز به کمک فلاونوئیدها پژوهشی صورت نگرفته است. برای ارزیابی امکان القای مقاومت در لوبیا قرمز علیه قارچ *R. solani* از دو فلاونوئید کوئرستین و نارینجین در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (Jia *et al.*, 2010). در این بخش از پژوهش از رقم ناز به‌عنوان حساس‌ترین رقم لوبیا قرمز به بیماری رایزوکتونیا پوسیدگی ریشه و طوقه استفاده شد. بذره‌های ضدعفونی‌شده این رقم در پتری‌های حاوی کاغذ صافی استریل با رطوبت نسبی ۹۵ درصد در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت سه روز خیسانده شدند. سپس پنج عدد بذر جوانه‌زده در گلدان‌های به قطر ۲۰ سانتی‌متر حاوی خاک رس، ماسه، خاک‌برگ به نسبت مساوی و تحت شرایط گلخانه شامل دمای 28 ± 2 درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در شبانه‌روز، کشت شدند. کوئرستین و نارینجین خریداری‌شده از شرکت سیگما در آب مقطر استریل حاوی ۰/۴ درصد دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide; DMSO) حل شده، سپس به هر محلول حاوی فلاونوئید ۰/۵ درصد توئین ۲۰ اضافه شد و فلاونوئیدها در غلظت‌های مذکور بر روی گیاهچه‌های چهارهفته‌ای محلول‌پاشی شدند. سپس مایه‌زنی قارچ بیمارگر انجام شد. گیاهان شاهد با آب مقطر استریل حاوی ۰/۴ درصد DMSO و ۰/۵ درصد توئین ۲۰ محلول‌پاشی شدند. بهترین ماده القاکننده مقاومت با مؤثرترین غلظت (کوئرستین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در آزمون انجام‌شده در شرایط گلخانه برای استفاده در سایر آزمایش‌ها انتخاب شد. برای تعیین بهترین فاصله زمانی بین تیمار گیاهان با کوئرستین و تلقیح بیمارگر جهت بروز بیشترین میزان القای مقاومت، گیاهچه‌های لوبیا در فاصله‌های زمانی یک، سه و پنج روز قبل از تلقیح با این ماده تیمار شدند. علائم بیماری هفت روز پس از مایه‌زنی بررسی و میزان پیشرفت بیماری با تعیین میانگین طول زخم ارزیابی شد (Taheri &

مقاومت کاملی به بیماری پوسیدگی رایزوکتونایی ریشه و طوقه از خود نشان ندادند. رقم‌های لوبیای قرمز اختر، گلی و صیاد به این بیماری نسبتاً مقاوم بودند و تفاوت معنی‌داری در سطوح مقاومت آن‌ها به قارچ بیمارگر مشاهده نشد. نتیجه‌های حاصل از ارزیابی مقاومت رقم‌ها به قارچ بیمارگر در هر دو آزمون انجام‌شده با استفاده از دیسک‌های برگی و گیاهچه مشابه و تأییدکننده یکدیگر بود (شکل ۱). گزارش‌هایی که از ارزیابی مقاومت رقم‌های لوبیا به رایزوکتونیا در ایران وجود دارد با نتیجه‌های این پژوهش هم‌خوانی دارند. حساسیت رقم ناز و مقاومت نسبی رقم‌های صیاد و گلی که قبلاً نسبت به قارچ رایزوکتونیا گزارش شده بود (Bahluli & Kashani, 2011) در این پژوهش نیز تأیید شد. به‌طور کلی تاکنون مقاومت کامل به جدایه‌های قارچ *R. solani* در هیچ‌گونه گیاهی گزارش نشده است و مقاومت انواع گیاهان تک‌لپه و دولپه به این بیمارگر از نوع مقاومت نسبی است (Nikraftar *et al.*, 2013; Taheri & Tarighi, 2010;) (Nerey *et al.*, 2010) که تأییدکننده نتیجه‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش است؛ بنابراین استفاده از رقم‌های نسبتاً مقاوم به همراه سایر تدابیر مدیریت بیماری نظیر کاربرد مواد محرک واکنش‌های دفاعی گیاه، می‌تواند روشی بسیار مؤثر برای حفاظت از گیاهان میزبان در برابر بیمارگر و کاهش شدت توسعه بیماری‌های مخرب ناشی از این قارچ خاک‌زاد باشد.

القای مقاومت در گیاه لوبیا علیه *R. solani* با کاربرد فلاونوئیدها

نتیجه‌های حاصل از بررسی اثر غلظت‌های مختلف مواد فلاونوئیدی موردآزمایش جهت القای مقاومت در لوبیا قرمز علیه *R. solani* نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نارینجین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کوئرستین باعث کاهش معنی‌دار شدت بیماری در مقایسه با شاهد نشدند. غلظت‌های ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کوئرستین باعث کاهش معنی‌دار طول زخم ایجادشده توسط *R. solani* در لوبیا شدند (شکل ۲). نتیجه‌های به‌دست‌آمده نشانگر این هستند که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کوئرستین کم‌ترین غلظت

ردیابی سوپراکسید

واکنش نیتروبولوترازولیوم کلرید (Nitro blue tetrazolium chloride; NBT) با رادیکال سوپراکسید، تغییر رنگ محل تجمع رادیکال سوپراکسید به آبی‌رنگ است که به راحتی توسط میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است. بررسی تغییر رنگ به روش شرح داده‌شده توسط Adám *et al.* (1989) و روش Schrauder *et al.* (1998) با کمی تغییر انجام شد. قطعه‌های برگی در زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی در مخلوط واکنش شامل NBT ۰/۰۵ درصد، بافر HEPES ۵۰ میلی‌مولار، سدیم‌آزید ۱۰ میلی‌مولار به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس دیسک‌ها خارج و به گلیسرول:اتانول خالص به نسبت ۹:۱ منتقل شدند تا به کمک اتانول برگ بی‌رنگ شود. سپس برگ‌ها برای آنالیز میکروسکوپی استفاده شدند.

بررسی رسوب کالوز

جهت ارزیابی رسوب کالوز در تعامل لوبیا قرمز-*R. solani* تیمار شده با کوئرستین از روش Ton & Mauch-Mani (2005) استفاده شد. به‌طور مختصر، برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۹۸ درصد به‌منظور رنگ‌بری نگهداری شدند. سپس در بافر فسفات ۰/۰۷ مولار (pH ۹) آبخوبی شدند و به مدت یک تا دو ساعت در بافر فسفات حاوی آنیلین بلو ۰/۰۱ درصد قرار داده شدند. رسوب کالوز توسط میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر UV مشاهده شد.

نتایج و بحث

ارزیابی مقاومت رقم‌های لوبیا قرمز به قارچ نکروتروف *R. solani*

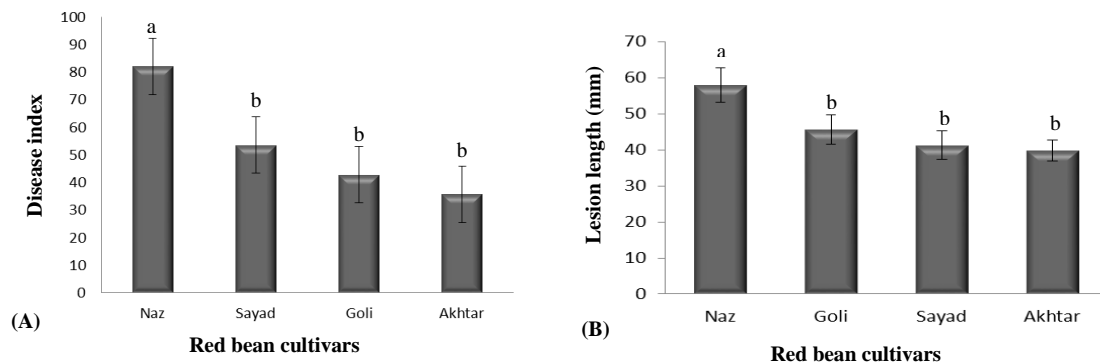
در بین رقم‌های موردبررسی در این پژوهش، رقم اختر با شاخص بیماری ۳۵/۷ مقاوم‌ترین و ناز با شاخص بیماری ۸۲/۱۴ حساس‌ترین رقم بودند (شکل A-۱). با توجه به نتیجه‌های تجزیه‌وتحلیل آماری، در هر دو آزمون انجام‌شده بر روی دیسک‌های برگی (شکل A-۱) و گیاهچه‌های لوبیا قرمز (شکل B-۱) بین رقم ناز و سایر رقم‌ها از نظر شاخص بیماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت. هیچ‌یک از رقم‌های موردآزمایش در این بررسی

نتيجه‌هاى آزمون‌هاى گلخانه‌اى بررسى فاصله‌هاى زمانى مختلف بين تيمار و مايه‌زنى بيمارگر هم نشان‌دهنده بهترين اثر حفاظتى كوئراستين عليه *R. solani* و کاهش معنى دار طول زخم در فاصله زمانى سه روز بين تيمار و مايه‌زنى بود. گياهانى كه سه روز قبل از مايه‌زنى با كوئراستين تيمار شده بودند نسبت به گياهانى كه يك و پنج روز قبل تيمار شده بودند، طول زخم كمترى داشتند (شكل ۳)؛ بنا بر اين بعد از تيمار گياهان با كوئراستين مدت زمانى لازم است تا اين فلاونوئيد باعث فعال شدن سامانه دفاعى گياه شود. به طور مشابهى، نتيجه‌هاى محلول پاشى *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) در زمان‌هاى يك، سه و پنج روز پس از تيمار با غلظت ۲۵۰ ميكروگرم بر ميلي‌ليتر كوئراستين نشان داد كه در گياهان شاهد تيمار شده با آب ۱۲-۳۶ ساعت پس از مايه‌زنى، Pst در برگ‌هاى آرابيدوپسيس تكثير مى‌شود، اما در برگ‌هاى تيمار شده با كوئراستين دو روز پس از آلودگى نرخ رشد Pst متوقف مى‌شود. درحالى كه كوئراستين اثر مستقيم بر روى رشد Pst نداشته است (Jia *et al.*, 2010).

تأثير كوئراستين بر رشد رويشى قارچ بيمارگر و گياهان لوبيا قرمز

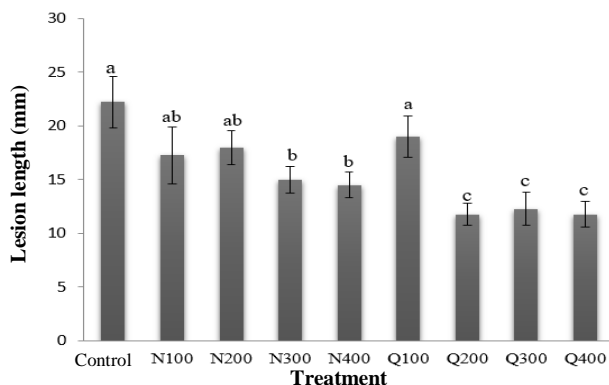
غلظت‌هاى مورد استفاده كوئراستين در آزمون القاي مقاومت به محيط كشت PDA افزوده شدند تا اثر هر يك از آن‌ها روى رشد قارچ بيمارگر ارزيباى شود.

مؤثر براى ايجاد مقاومت در پاتوسيستم رقم ناز لوبيا قرمز- *R. solani* است و در آزمون‌هاى بعدى براى ارزيباى سازوكارهاى سلولى و مولكولى دخيل در ايجاد مقاومت در اين پاتوسيستم از اين غلظت استفاده شد. غلظت‌هاى مختلف از نارينجين سطح پائين‌ترى از حفاظت گياهان را در برابر اين عامل بيمارى‌زا نشان دادند. ميانگين طول زخم در گياه‌چه‌هاى تيمار شده با كوئراستين ۱۲/۵۰ ميلي‌متر بود كه در مقايسه با گياهان شاهد (تيمار شده با آب مقطر حاوى ۰/۴ درصد DMSO و ۰/۵ درصد توين ۲۰) کاهش معنى دارى داشت. بر پايه نتيجه‌هاى ساير پژوهشگران، گياه‌چه‌هاى لوبياى تيمار شده با اتفون به *R. solani* افزايش مقاومت نشان دادند (Arora & Bajaj, 1985). در القاي مقاومت با كاربرد كوئراستين، گياهان چهار هفته‌اى آرابيدوپسيس تيمار شده با غلظت ۲۵۰ ميكروگرم بر ميلي‌ليتر *Pseudomonas syringae* pv *Tomato* DC3000 مقاومت نشان دادند. اكثر برگ‌هاى شاهد (فاقد تيمار كوئراستين) علائم بيمارى را ۲۰ تا ۳۶ ساعت پس از مايه‌زنى نشان دادند. درحالى كه علائمه مشابه در برگ‌هاى تيمار شده با كوئراستين ۲۵۰ ميكروگرم بر ميلي‌ليتر و تلقیح شده با بيمارگر ديده نشد (Jia *et al.*, 2010). تاكنون كاربرد كوئراستين و نارينجين جهت القاي مقاومت در پاتوسيستم لوبيا قرمز- *R. solani* گزارش نشده است و اين اولين پژوهش در زمينه ارزيباى امكان القاي مقاومت در لوبيا عليه رايزوكتونيا است.



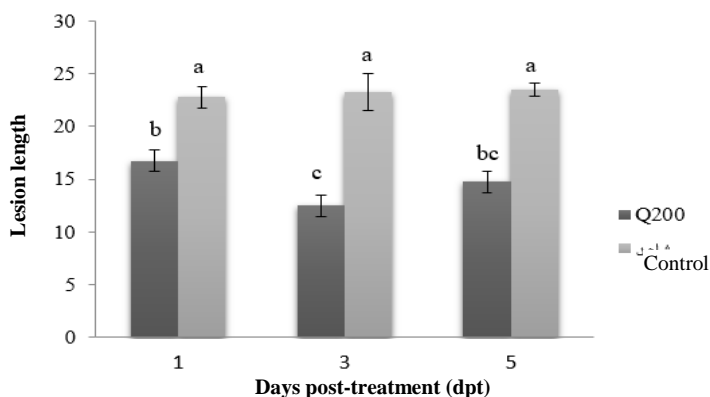
شكل ۱. شاخص بيمارى و طول زخم پوسيدگى طوقه و ريشه ناشى از *Rhizoctonia solani* AG4 HG-II در ديسك‌هاى برگى (A) و گياه‌چه‌هاى (B) رقم‌هاى مختلف لوبيا قرمز. خط‌هاى روى ستون‌ها خطاى استاندارد (\pm SE) را نشان مى‌دهند. تيمارهاى كه با حروف‌هاى مختلف نشان داده شده‌اند داراى اختلاف معنى دار با يكديگر هستند.

Figure 1. Disease index and lesion length of crown and root rot caused by *Rhizoctonia solani* AG4 HG-II on the leaf discs of different cultivars of the red bean. Lines on the columns represent the standard error (\pm SE). Treatments marked with different letters have significant difference with each other.



شکل ۲. مقایسه میانگین طول زخم در گیاهچه‌های لوبیا قرمز تیمار شده با غلظت‌های مختلف کوئرستین و نارینجین جهت القای مقاومت علیه *Rhizoctonia solani*. تیمارهایی که با حرف‌های مختلف نشان داده شده‌اند دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند. هر عدد میانگین چهار تکرار است. Q: کوئرستین، N: نارینجین.

Figure 2. Comparison between the mean lesion length in red bean seedlings treated with various concentrations of quercetin and naringenin for induction of resistance against *Rhizoctonia solani*. Treatments marked with different letters have a significant difference with each other. Each number is the average of 4 replicates. Q: Quercetin, N: Naringenin.



شکل ۳. میانگین طول زخم ناشی از *Rhizoctonia solani* روی گیاهچه‌های لوبیای تیمار شده با کوئرستین (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با شاهد در فاصله‌های زمانی مختلف بین تیمار و مایه‌زنی گیاه. هر عدد میانگین چهار تکرار است و خط‌های روی ستون‌ها نشانگر خطای استاندارد (±SE) هستند. تیمارهایی که با حرف‌های مختلف نشان داده شده‌اند دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگرند. Q200: تیمار کوئرستین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر. شاهد: گیاهچه‌های محلول‌پاشی شده با آب مقطر حاوی ۰/۴ درصد DMSO و ۰/۵ درصد توئین ۲۰.

Figure 3. The mean lesion length caused by *Rhizoctonia solani* on quercetin-treated bean seedlings (200 µg/mL) compared with the control at different time intervals between treatment and inoculation of plants. Each number is the average of 4 replicates and the lines (bars) on the columns are standard errors (± SE). Treatments marked with different letters have a significant difference with each other. Q200: Quercetin treatment at a concentration of 200 µg/mL. Control: Spray with distilled water containing 0.4% DMSO and 0.5% Tween 20.

اسپور *P. oryzae* نشان دادند. بررسی‌های انجام‌شده درباره تأثیر ضدقارچی انواعی از فلاونوئیدها علیه *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* نشان داد که فلاونوئیدهای مختلف در غلظت‌های بسیار کم قادر به بازدارندگی خفیف رشد قارچ بیمارگر مذکور هستند (Steinkellner & Mammerler, 2007). از طرفی هیچ‌یک از ترکیب‌های فلاونوئیدی موردپژوهش توانا به مهار رشد قارچ *Rhizoctonia* sp. نبودند (Padmavati et al., 1997).

هیچ‌یک از غلظت‌های مورداستفاده اثر مستقیمی بر رشد قارچ در محیط کشت نداشتند و موجب کاهش رشد بیمارگر نشدند. در پژوهش‌ها پیشین سایر پژوهشگران سمیت نارینجین (فلاوانون)، دی‌هیدروکوئرستین، کامپرفول و کوئرستین روی بیمارگرهای برنج ارزیابی شد. فعالیت ضدقارچی این ترکیب‌ها به‌وسیله اثرشان روی رشد اسپور و میسیلیوم *Pyricularia oryzae* اندازه‌گیری شد. نارینجین و کامپرفول اثر بازدارندگی قابل‌توجهی در جوانه‌زنی

یکی از پاسخ‌های دفاعی مهم در برهمکنش بیمارگر و گیاه است، تجمع H_2O_2 در محل مایه‌زنی قارچ با استفاده از رنگ‌آمیزی DAB بررسی شد. DAB بعد از تماس با H_2O_2 و در حضور پراکسیداز سریعاً پلیمریزه می‌شود (Thordal-Christensen *et al.*, 1997) و رسوب قهوه‌ای‌رنگی در محل تجمع H_2O_2 تشکیل می‌شود. در دیسک برگ گیاهان مایه‌زنی‌شده با *R. solani* و تیمار شده با کوئرستین ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و گیاهان شاهد بعد از گذشت ۱۲ ساعت از مایه‌زنی بیمارگر تجمع H_2O_2 در بخش‌هایی که با هیف‌های قارچ *R. solani* در تماس بودند مشاهده شد. با گذشت زمان، H_2O_2 از محل تماس سلول‌های گیاه با ساختارهای قارچ به دیگر قسمت‌ها منتشر شد و گسترش یافت.

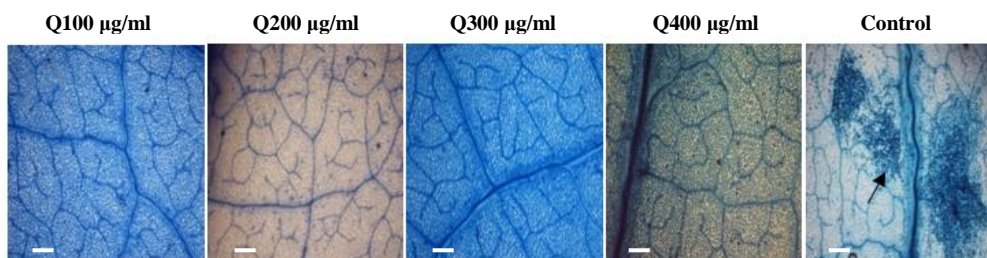
در برگ‌های تیمار شده با کوئرستین در زمان ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی تجمع H_2O_2 در بافت‌های تیمار شده با کوئرستین نسبت به بافت‌های شاهد افزایش قابل‌توجهی داشت و به‌صورت پراکنده مشاهده شد، در حالی که تا این زمان در بافت‌های شاهد با شیب ملایمی افزایش یافت. میزان تجمع هیدروژن پراکسید در نمونه‌های شاهد در زمان ۳۶ ساعت پس از مایه‌زنی به حداکثر خود رسید ولی در نمونه تیمار شده در همین زمان کاهش نشان داد و دوباره در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش تجمع H_2O_2 در گیاهان تیمار شده با کوئرستین مشاهده شد (شکل ۵).

با توجه به نتیجه‌های به‌دست‌آمده و گزارش‌های پیشین ظاهراً این قارچ سریع‌الرشد توانایی سم‌زدایی انواعی از فلاونوئیدها را دارد (Padmavati *et al.*, 1997). در ارزیابی اثرات احتمالی گیاه‌سوزی ناشی فلاونوئیدها با غلظت‌های مورد استفاده در گیاهان لوبیا، گیاهان تیمار شده فاقد هرگونه تغییر در رشد و وضعیت ظاهری بودند.

بررسی احتمال بروز مرگ سلولی در اثر تیمار برگ‌ها با کوئرستین

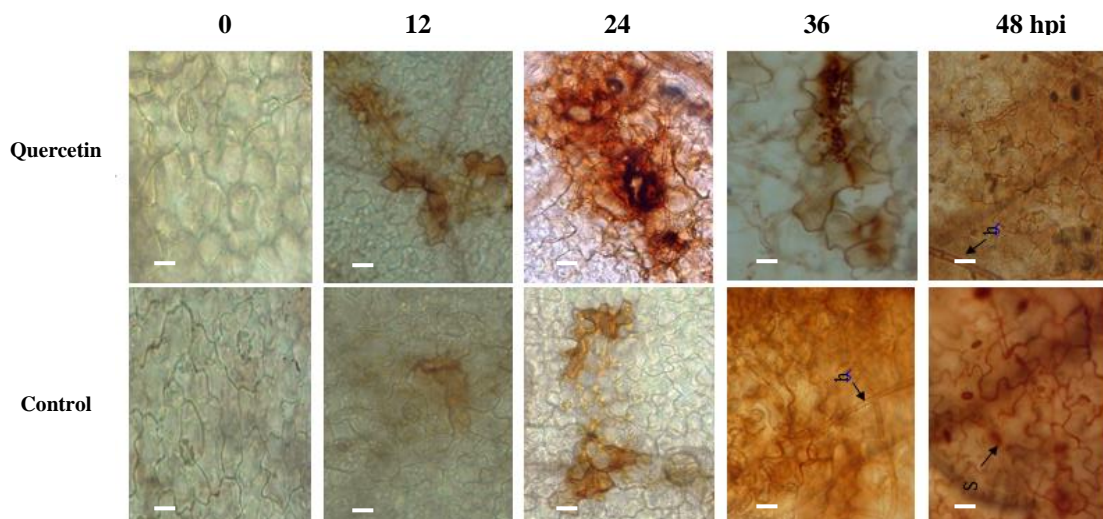
جهت بررسی اثر احتمالی کوئرستین در بروز مرگ سلولی از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو استفاده شد و نقطه‌های آبی تیره که در شکل ۴ با پیکان نشان داده شده‌اند بیانگر مرگ سلولی هستند. برای شاهدهی که مرگ سلولی در آن قابل‌مشاهده است از رنگ‌آمیزی دیسک برگ لوبیا چهار روز بعد از مایه‌زنی با *R. solani* استفاده شد. مشابه آنچه در نتیجه‌های حاصل از پژوهش Jia *et al.* (2011) در بررسی بروز مرگ سلولی در گیاه آرابیدوپسیس تیمار شده با کوئرستین بیان شد، در هیچ‌یک از چهار غلظت کوئرستین مورد استفاده تغییر رنگ مربوط به مرگ سلولی مشاهده نشد؛ بنابراین کوئرستین موجب بروز مرگ سلولی در گیاه لوبیا قرمز نمی‌شود.

ارزیابی تجمع هیدروژن پراکسید (H_2O_2) در گیاه به دلیل این‌که تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن



شکل ۴. بررسی میکروسکوپی بروز مرگ سلولی ناشی از تیمار برگ‌های گیاهان لوبیا قرمز با غلظت‌های مختلف کوئرستین (Q) به روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو. عددهای بالای شکل بیانگر غلظت برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر هستند. نمونه‌های شاهد با *Rhizoctonia solani* مایه‌زنی شدند. خط نشانه: ۶۰ میکرومتر.

Figure 4. Microscopic evaluation of the cell death caused by leaf treatment of red bean plants with different concentrations of quercetin (Q) using trypan blue staining method. The numbers presented in the figure indicate the concentration in µg/ml. Control samples were inoculated with *Rhizoctonia solani*. Scale bar: 60 µm.



شکل ۵. بررسی تجمع H_2O_2 به روش رنگ آمیزی DAB در دیسک‌های برگ‌ی تیمار شده با کوئرستین و نمونه‌های شاهد در زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی *Rhizoctonia solani*. h: هیف قارچ، S: روزنه، hpi: ساعت پس از مایه‌زنی بیمارگر. آزمایش سه بار با نتیجه‌های مشابه تکرار شد. خط نشانه: ۳۰ میکرومتر.

Figure 5. Evaluation of H_2O_2 accumulation in the leaf discs treated with quercetin and control samples at different times after inoculation by *Rhizoctonia solani*, using DAB staining method. h: Hypha, S: Stoma, hpi: hour after inoculation of the pathogen. The experiment was repeated three times, with similar results. Scale bar: 30 μm .

در برهمکنش گوجه‌فرنگی با *R. solani* نیز به‌طور مشابهی شروع تشکیل O_2^- در رقم نسبتاً مقاوم نسبت به رقم حساس زودتر و شدیدتر مشاهده شده است (Noorbakhsh & Taheri, 2015)؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تولید سوپراکسید در زمان‌های اولیه پس از تیمار و تلقیح در مقایسه با شاهد به‌نوعی سازوکار مقاومت القایی ایجاد شده توسط کوئرستین است.

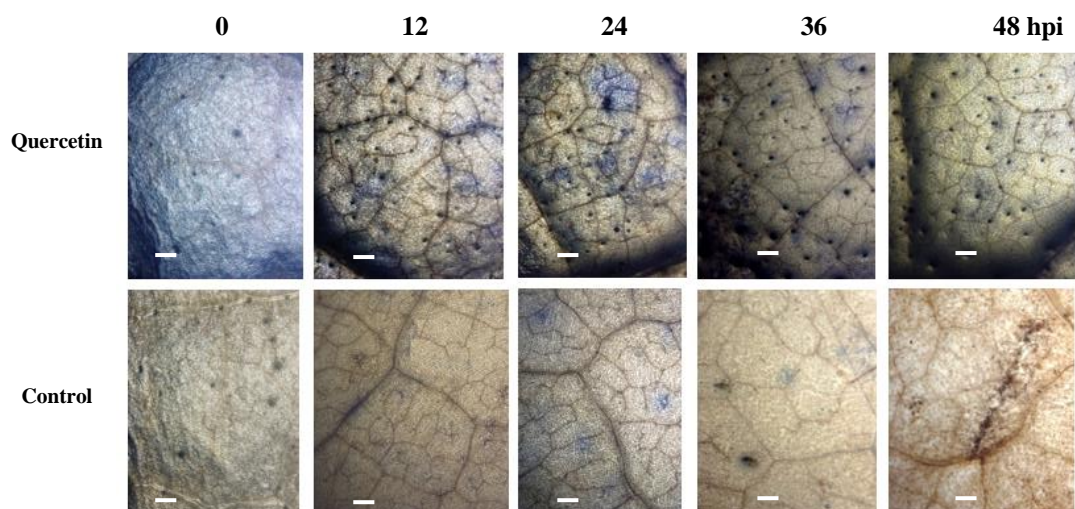
ردیابی کالوز

در نمونه‌های تیمار شده با کوئرستین آلوده به *R. solani* در تمام زمان‌های مورد بررسی، رسوب کالوز مشاهده شد. رسوب کالوز در گیاهان تیمار شده با کوئرستین و مایه‌زنی شده در مقایسه با گیاهان تیمار نشده و مایه‌زنی شده شدیدتر و زودتر مشاهده شد. با توجه به تصویرهای میکروسکوپ فلورسنت در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ hpi در گیاهان تیمار شده با کوئرستین نقطه‌های روشن که نشانگر تولید کالوز هستند قابل مشاهده بودند. در نمونه‌های شاهد مقدار کمی کالوز در زمان ۲۴ hpi دیده شد اما بیشترین تراکم نقطه‌های روشن مربوط به تجمع این پلیمر دفاعی در زمان ۴۸ hpi در گیاهان شاهد ردیابی شد (شکل ۷).

بررسی‌های بیوشیمیایی، افزایش میزان ROS را در گیاهان گندم آلوده به *R. solani* AG8 نشان داد (Foley et al., 2016). هیدروژن پراکسید (H_2O_2) در استحکام دیواره سلولی با افزایش پیوندهای پروتئینی، تجمع ترکیب‌های فنلی و پلیمریزاسیون لیگنین دخالت می‌کند که از سازوکارهای دفاعی مؤثر علیه بیمارگرهای بیوتروف و نکروتروف است؛ در نتیجه از گسترش بیمارگر در بافت‌های گیاه جلوگیری می‌کند (Taheri & Tarighi, 2011).

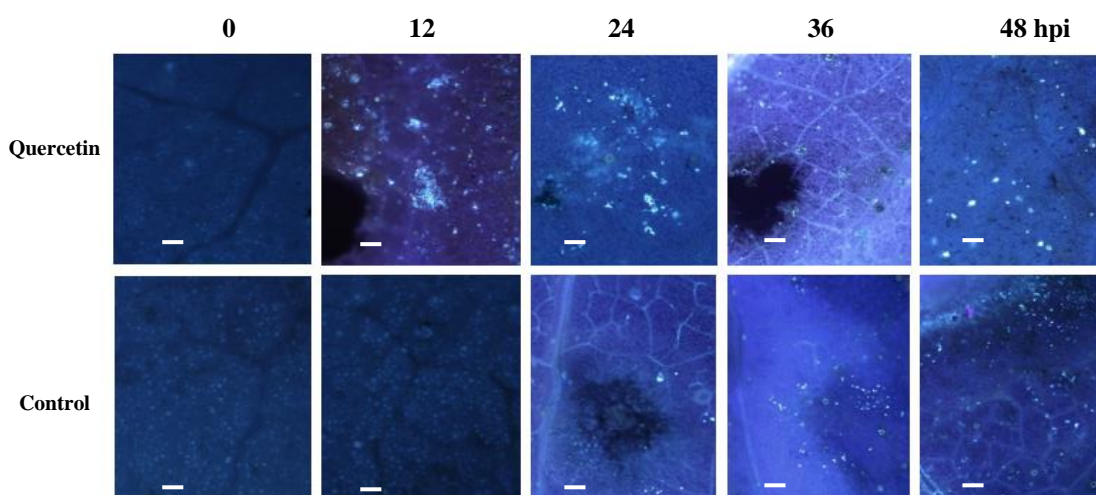
ردیابی آنیون سوپراکسید

تولید آنیون سوپراکسید در تعامل لوبیا قرمز-*R. solani* پیش تیمار شده با کوئرستین بررسی شد. در نمونه‌های دیسک برگ‌ی تیمار شده با کوئرستین ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تجمع سریع رنگ آبی که نشانگر تولید سوپراکسید است، در زمان ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی مشاهده شد. این افزایش تا زمان ۲۴ hpi روند صعودی داشت و از ۳۶ hpi به بعد کاهش یافت. این در حالی است که در نمونه‌های شاهد در ۱۲ hpi مقدار کمی آنیون سوپراکسید تولید و تا ۲۴ hpi افزایش یافت، اما در ۳۶ hpi و ۴۸ hpi تقریباً تجمع این آنیون ناچیز بود (شکل ۶).



شکل ۶. بررسی تولید آنیون سوپراکسید (O_2^-) تولیدشده در دیسک‌های برگ‌ی تیمار شده با کوئرستین و شاهد تیمار شده با آب در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی قارچ *Rhizoctonia solani* به روش رنگ‌آمیزی NBT. آزمایش سه بار با نتیجه‌های مشابه تکرار شد. hpi: ساعت پس از مایه‌زنی بیمارگر. خط نشانه: ۶۰ میکرومتر.

Figure 6. Evaluation of superoxide anion production (O_2^-) in the leaf discs treated with quercetin and control samples treated with water at different times after inoculation by *Rhizoctonia solani*, using NBT staining method. The experiment was repeated three times, with similar results. hpi: hour post inoculation of the pathogen. Scale bar: 60 μ m.



شکل ۷. ردیابی رسوب کالوز به روش رنگ‌آمیزی آنیلین بلو در دیسک‌های برگ‌ی لوبیا قرمز رقم ناز تیمار شده با کوئرستین و نمونه‌های شاهد در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی قارچ *Rhizoctonia solani*. آزمایش سه بار با نتایج مشابه تکرار شد. hpi: ساعت پس از مایه‌زنی بیمارگر. خط نشانه: ۶۰ میکرومتر.

Figure 7. Detection of callose deposition in the leaf discs of red bean cv. Naz, treated with quercetin and control samples at different time points after inoculation of *Rhizoctonia solani*, using aniline blue staining method. The experiment was repeated three times, with similar results. hpi: hour post inoculation of the pathogen. Scale bar: 60 μ m.

عامل بیماری سفیدک کرکی (Kortekamp *et al.*, 1997) و در رقم نسبتاً مقاوم گوجه‌فرنگی پس از آلودگی به قارچ نکروتروف *R. solani* مشاهده شده است (Noorbakhsh & Taheri, 2015) که نشان‌دهنده سازوکارهای دفاعی مشابه گیاهان در برابر بیمارگرهای دارای سبک زندگی متفاوت است. بررسی‌ها نشان داده‌اند

پس از شناسایی بیمارگر، پاسخ‌های دفاعی گیاه شاید از طریق تولید سریع گونه‌های فعال اکسیژن، تقویت دیواره سلولی به وسیلهٔ اکسیداسیون اتصالات عرضی اجزای دیواره سلولی و همچنین تشکیل کالوز فعال شود (Abdel-Fattah *et al.*, 2011). تجمع کالوز در رقم‌های متحمل گیاه انگور بعد از آلودگی به بیمارگر بیوتروف

و ظهور جدایه‌های مقاوم بیمارگر به این مواد، پژوهشگران به دنبال یافتن راهبردهای جدید و روش‌های تلفیقی مؤثر برای کنترل بیماری‌ها هستند (Taheri & Tarighi, 2010). یکی از این روش‌ها استفاده از مواد با منشأ طبیعی یا شیمیایی الفاکننده مقاومت همچون ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدهاست که علاوه بر این که خطری برای محیط زیست ندارند محدودکننده توسعه و کاهش‌دهنده خسارت‌های کمی و کیفی ناشی از بیماری‌های گیاهی هستند (Jia *et al.*, 2010). در این پژوهش از میان رقم‌های مورد آزمایش رقم ناز بیشترین حساسیت به بیماری پوسیدگی رایزوکتونایی ریشه و طوقه را نشان داد و سایر رقم‌های دارای مقاومت نسبی در برابر *R. solani* بودند. بهترین ماده جهت القای مقاومت و تحریک سازوکارهای دفاعی لوبیا علیه رایزوکتونیا کوئرستین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که در کاهش رشد *R. solani* در محیط کشت و مرگ سلولی در گیاه لوبیا اثر نداشت. تیمار گیاهان با کوئرستین در غلظت مذکور منجر به بروز تغییرهای بیوشیمیایی در سلول‌های گیاهان آلوده به بیمارگر نظیر افزایش سرعت و شدت گونه‌های فعال اکسیژن و کالوز شد که این تغییرها مرتبط با افزایش مقاومت گیاه در برابر بیمارگر در اثر تیمار مذکور است. به‌طور کلی استفاده از کوئرستین با توجه به نتیجه‌های این پژوهش و گزارش‌های پژوهشگران دیگر می‌تواند در کنترل بیمارگرهای نکروتروف و بیوتروف مؤثر باشد و در مدیریت نوین و پایدار بیماری‌های گیاهی استفاده شود.

که گروه‌های آناستوموزی ضعیف یا غیر بیمارزای *Rhizoctonia spp.* باعث تشکیل کالوز و ترکیب‌های فنلی در سلول‌های گیاه گشته که این واکنش‌های دفاعی موجب کاهش یا توقف رشد قارچ بیمارگر می‌شوند (Pannecouque & Höfte, 2009). در بررسی القای مقاومت علیه بیماری سفیدک کرکی انگور با کاربرد BABA کمترین میزان اسپورانژیوم در گیاهان تیمار شده با بتا آمینوبوتیریک اسید (Beta amino butyric acid; BABA) مشاهده شد. تعداد اسپورانژیوم‌ها با افزایش غلظت بازدارنده کالوز (DDG) در گیاهان تیمار شده با BABA افزایش یافت که نشانگر نقش کالوز در شدت آلودگی گیاه به بیمارگر دارد و مؤید یافته‌های این پژوهش است. رسوب کالوز و لیگنینی‌شدن سلول‌ها از آلودگی گیاهان تیمار شده با BABA جلوگیری می‌کند. این فرایند بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان مایه‌زنی مشاهده شده و در روزهای بعد افزایش می‌یابد. در درمقایسه بین گیاهان تیمار شده و شاهد انگور میزان رسوب کالوز در گیاهان تیمار شده با BABA به‌عنوان یک الفاکننده مقاومت بیشتر بود (Hamiduzzaman & Mauch-Mani, 2005). افزایش تجمع کالوز و در گیاهان آراییدوپسیس تیمار شده با ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کوئرستین سه روز قبل از مایه‌زنی با *Pseudomonas syringae* pv tomato (Pst) گزارش شده است (Jia *et al.*, 2010) که با یافته‌های پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری

امروزه به‌دلیل اثرات زیست‌محیطی مخرب قارچ‌کش‌ها

REFERENCES

1. Abdel-Fattah, G. M., El-Haddad, S. A., Hafez, E. E. & Rashad, Y. M. (2011). Induction of defense responses in common bean plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiological Research*, 166, 268-281.
2. Adám, A., Farkas, T., Somlyai, G., Hevesi, M. & Király, Z. (1989). Consequence of O₂ generation during bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 34, 13-26.
3. Arora, Y. K. & Bajaj, K. L. (1985). Peroxidase and polyphenol oxidase associated with induced resistance of mung bean to *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Journal of Phytopathology*, 114, 325-331.
4. Asselbergh, B., Curvers, K., Franca, S. C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Breusegem, F. V. & Hofte, M. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology*, 144, 1863-1877.
5. Bahluli, A. & Farhangian Kashani, S. (2011). Evaluation of reaction of different bean cultivars to five isolates of *Rhizoctonia solani* in greenhouse. *Journal of Plant and Biomass Research*, 7, 85-97 (in Farsi)

6. Boubakri, H., Chong, J., Poutaraud, A., Schmitt, C., Bertsch, C., Mliki, A., Masson, J. & Soustre-Gacougnolle, I. (2013). Riboflavin (Vitamin B2) induces defence responses and resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 837-855.
7. D'aes, J., Hua, G. K. H., De Maeyer, K., Pannecouque, J., Forrez, I., Ongena, M., ... Hofte, M. (2011). Biological control of Rhizoctonia root rot on bean by phenazine- and cyclic lipopeptide-producing *Pseudomonas* CMR12a. *Phytopathology*, 101, 996-1004.
8. El-Mohamedy, R. S. R., Jabnoun-Khiareddine, H. & Daami-Remadi, M. (2014). Control of root rot diseases of tomato plants caused by *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* using different chemical plant resistance inducers. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 9, 45-55.
9. Finiti I, de la O Leyva M, Vicedo B, Gómez-Pastor R, López-Cruz J, García-Agustín P, Dolores Real M, & González-Bosch, C. (2014). Hexanoic acid protects tomato plants against *Botrytis cinerea* by priming defence responses and reducing oxidative stress. *Molecular Plant Pathology*, 15, 550-562.
10. Foley, R. C., Kidd, B. N., Hane, J. K., Anderson, J. P. & Singh, K. B. (2016). Reactive oxygen species play a role in the infection of the necrotrophic fungi, *Rhizoctonia solani* in wheat. *Plos One*, 11, e0152548.
11. Galvan, M. Z., Menndez-Sevillano, M. C., De Ron, A. M., Santalla, M. & Balatti, P. A. (2006). Genetic diversity among wild common beans from northwestern Argentina based on morpho-agronomic and RAPD data. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 891-900.
12. Hamiduzzaman, M. M. & Mauch-Mani, B. (2005). *β -aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew (Plasmopara viticola)*. Ph. D. thesis, University of Neuchâtel Institute of Botany, Laboratory of Biochemistry.
13. Jia, Z., Zou, B., Wang, X., Qiu, J., Ma, H., Gou, Z. & Dong, H. (2010). Quercetin-induced H₂O₂ mediates the pathogen resistance against *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396, 522-527.
14. Khaledi, N., Taheri, P. & Falahati-Rastegar, M. (2017). Evaluation of resistance and the role of some defense responses in wheat cultivars to *Fusarium* head blight. *Journal of Plant Protection Research*, DOI: 10.1515/jppr-2017-0054.
15. Kortekamp, A., Wind, R. & Zvprian, E. (1997). The role of callose deposits during infection of two downy mildew-tolerant and two-susceptible *Vitis* cultivars. *Vitis-Geil Weilerhof*, 36, 103-104.
16. Madhuri, G. & Reddy, A. R. (1999). Plant biotechnology of flavonoids. *Plant Biotechnology*, 16, 179-200.
17. Marcucci, E., Aleandri, M. P., Chilosi, G. & Magro, P. (2010). Induced resistance by b-aminobutyric acid in artichoke against white mould caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Phytopathology*, 158, 659-667.
18. Melillo, M. T., Leonetti, P., Leone, A., Veronico, P. & Bleve-Zacheo, T. (2011). ROS and NO production in compatible and incompatible tomato-*Meloidogyne incognita* interactions. *Plant Pathology*, 130, 489-502.
19. Misawa, T. & Kuninaga, S. (2010). The first report of tomato foot rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-3 PT and AG-2-Nt and its host range and molecular characterization. *Journal of General Plant Pathology*, 76, 310-319.
20. Navarrete-Maya, R., Trejo-Albarrán, E., Navarrete-Maya, J., Prudencio-Sains, J. M. & Acosta Gallegos, J. A. (2009). Reaction of common bean genotypes to *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia solani* under field and greenhouse conditions. *Agricultura Técnica en México*, 35, 459-470.
21. Nerey, Y., Pannecouque, J., Hernandez, H. P., Diaz, M., Espinosa, R., Vos, S. D., Beneden, S. V., Herrera, L. & Hofte, M. (2010). *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Journal of Phytopathology*, 158, 236-243.
22. Nikraftar, F., Taheri, P., Falahati Rastegar, M. & Tarighi, S. (2013). Tomato partial resistance to *Rhizoctonia solani* involves antioxidative defense mechanisms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 81, 74-83.
23. Noorbakhsh, Z. & Taheri, P. (2015). Nitric oxide: a signaling molecule which activates cell wall-associated defense of tomato against *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology*, 144, 551-568.
24. Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K. V. & Reddy, A. R. (1997). Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*, 46, 499-502.
25. Pannecouque, J. & Höfte, M. (2009). Interactions between cauliflower and *Rhizoctonia* anastomosis groups with different levels of aggressiveness. *BMC Plant Biology*, 9, 95.
26. Samanta, A., Das, G. & Das, S. K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 6, 1-3.
27. Schrauder, M., Moeder, W., Wiese, C., van Camp, W., Inze, D., Langebartels, C. & Sandermann, J. H. (1998). Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant tobacco Bel W3. *Plant Journal*, 16, 235-245.

28. Sewelam, N., Kazan, K. & Schenk, P. M. (2016). Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Frontiers in Plant Science*, 7, 187.
29. Singh, A., Rohilla, R., Singh, U. S., Savary, S., Willocquet, L. & Duveiller, E. (2002). An improved inoculation technique for sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24, 65-68.
30. Steinkellner, S. & Mammerler, R. (2007). Effect of flavonoids on the development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Plant Interactions*, 2, 17-23.
31. Taheri, P., Gnanamanickam, S. & Hofte, M. (2007). Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia spp.* associated with rice sheath diseases. *Phytopathology*, 97, 373-83.
32. Taheri, P. & 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.
33. Taheri, P. & 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.
34. Taheri, P. & Tarighi, S. (2012). The role of pathogenesis-related proteins in tomato-*Rhizoctonia solani* interaction. *Journal of Botany*, 2, 1-6.
35. Thordal Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. & Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plant. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11, 1187-1194.
36. Ton, J. & Mauch-Mani, B. (2004). Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal*, 38, 119-130.
37. Ton, J., Ent, van der Hulten, S., van Pozo, M. H. A., Oosten, M., van Loon, L. C., Mauch-Mani, B., Turlings, T. C. J. & Pieterse, C. M. J. (2009). Priming as a mechanism behind induced resistance against pathogens, insects and abiotic stress. *IOBC/wprs Bulletin*, 44, 3-13.
38. Valentin Torres, S., Vargas, M. M., Godoy-Lutz, G., Porch, T. G., Beaver, J. B. 2016. Isolates of *Rhizoctonia solani* can produce both web blight and root rot symptoms in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Disease*, 100, 1351-1357.
39. Van der Wolf, J. M., Michta, A., Van der Zouwen, P. S., de Boer, W. J., Davelaar, E. & Stevens, L. H. (2012). Seed and leaf treatments with natural compounds to induce resistance against *Peronospora parasitica* in Brassica oleracea. *Crop Protection*, 35, 78-84.
40. Yang, W., Xu, X., Li, Y., Wang, Y., Li, M., Wang, Y., et al. (2016). Rutin-mediated priming of plant resistance to three bacterial pathogens initiating the early SA signal pathway. *Plos One*, 11, e0146910. doi:10.1371/journal.pone.0146910.
41. Yin, Z., Chen, J., Zeng, L., Goh, M., Leung, H., Khush, G. S. & Wang, G. L. (2000). Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad- spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 13, 869-876.