بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۸ / شماره ۴/ سال ۱۴۰۱: ۳۰۰-۲۸۱
DOI: 10.22034/ijpp.2023.2011943.430

CC BY

مقاله پژوهشی

# تأثیر آماده‌باش زیستی و شیمیایی بذر بر پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.)

آمنه جوکار[۱]، مهدی سعادتی[۲]، ناصر صفایی[۳] و مسعود شمس‌بخش[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۴)

## چکیده

**بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) که توسط *Rhizoctonia solani* AG4 ایجاد می‌شود، یکی از بیماری‌های مهم لوبیا در جهان است. استفاده از عوامل آماده‌باش زیستی و غیرزیستی به جایگزینی امیدوارکننده و سازگار با محیط زیست در مدیریت بیماری‌های گیاهی تبدیل شده است. از این‌رو پژوهش حاضر با هدف مقایسه تأثیر جدایه A4 باکتری *Bacillus subtilis* (آماده‌باش زیستی) و بتا آمینو بوتریک اسید (BABA) (آماده‌باش غیرزیستی) در مدیریت بیماری پوسیدگی ریشه در دو رقم تلاش و صدری لوبیا انجام شد. بذور لوبیا به عوامل یادشده آغشته شده و پس از خشک شدن کشت و در گلخانه ۲۰±۲ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. در مرحله کوتیلدونی، گیاهان با زادمایه *R. solani* AG4 مایه‌زنی شدند. میزان مقاومت القاء شده در گیاهان با اندازه‌گیری شاخص شدت بیماری، فاکتورهای ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک بعد از گذشت سه هفته از مایه‌زنی بررسی شد. نتایج نشان داد که عوامل آماده‌باش باعث بهبود صفات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده نسبت به شاهد شدند. میزان شاخص شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با عوامل آماده‌باش کم‌تر از شاهد بود و کم‌ترین شاخص شدت بیماری در رقم تلاش تیمار شده با *B. subtilis*، به میزان ۵۹ درصد کاهش مشاهده شد. محتوای فنول، فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز تحت تیمار با جدایه *B. subtilis* و BABA در حضور بیمارگر نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی‌دار نشان دادند. در مجموع، با توجه به نتایج به دست آمده تیمار آماده‌باش زیستی در مقایسه با تیمار شیمیایی در هر دو رقم لوبیا اثر بهتری در مهار بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه لوبیا داشت که می‌تواند برای مدیریت این بیماری در مزرعه مورد بررسی قرار گیرد.**

**کلمات کلیدی: آنزیم پراکسیداز، بتا آمینو بوتریک اسید، شاخص شدت بیماری، *Bacillus subtilis*، *Rhizoctonia solani***

---

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارایه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbaksh@modares.ac.ir
۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۲ دانش آموخته دکتری، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۳ دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۴ استاد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

DOI: 10.22034/ijpp.2023.2011943.430

## Research Article

# Effect of seed bio- and chemo-priming on Rhizoctonia root rot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

**Ameneh Joukar[1], Mehdi Saadati[2], Naser Safaie[3], Masoud Shams-bakhsh[4*]**

(Received: 19.09.2023; Accepted: 25.12.2023)

## Abstract

Rhizoctonia root rot disease of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), caused by *Rhizoctonia solani* AG4, is one of the most important bean diseases worldwide. The use of biological and non-biological prime agents has become a promising and environmentally friendly alternative to the management of soil-borne pathogens. Therefore, the present study aimed to compare the effect of *Bacillus subtilis* isolate A4 (biological prime) and beta-aminobutyric acid (BABA) (non-biological prime) on the management of Rhizoctonia root rot disease in Talash and Sadri cultivars of common bean plants. The seeds were coated with the mentioned priming agents and after drying, they were planted and kept in the greenhouse at a temperature of 20±2 °C. Plants at the cotyledon stage were inoculated by *R. solani* AG4 inoculum. The induction of resistance in plants was evaluated by measuring disease severity, morphological, and physiological factors three weeks after inoculation. The priming factors increased almost all morphological and physiological measured traits, compared to the control. The plants treated with prime agents had a lower disease severity index (DSI) compared to the control plants and the Talash cultivar treated with *B. subtilis* had the lowest DSI, with a 59% reduction. The phenol content, catalase and peroxidase enzyme activities under bio-priming and chemo-priming treatments in the presence of the pathogen showed a significant increase compared to the control plants. In general, according to the obtained results, bio-priming treatment compared to chemo-priming treatment in both investigated cultivars had a better effect on the management of the Rhizoctonia root rot disease of common bean, which could be investigated in the direction of managing this disease under field conditions.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Beta-aminobutyric acid, Disease severity index, Peroxidase enzyme, *Rhizoctonia solani*

*. A part of Msc. thesis of the first author submitted to Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University
**. Corresponding author, e-mail: shamsbaksh@modares.ac.ir.
1. Graduate M.S. student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Graduate Ph.D. student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4. Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

## مقدمه

پوسیدگی‌های ریشه از عمده‌ترین بیماری‌های ناشی از قارچ‌های خاک‌برد در گیاهان مختلف هستند، که در لوبیا نیز شیوع دارند (Mayo *et al.* 2015). پوسیدگی ریشه ریزوکتونیایی ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* Kühn از بیماری‌های مهم و اقتصادی لوبیا در بیش‌تر مناطق جهان محسوب و به طور معمول سبب کاهش عملکرد بین ۵-۱۰ درصد می‌شود. با این حال کاهش عملکرد تا ۶۰ درصد نیز گزارش شده است (Abdel-Fattah *et al.* 2011). این قارچ یک بیمارگر خاک‌برد با دامنه میزبانی وسیع است که سبب ایجاد بیماری پوسیدگی ریشه در مناطق تولید لوبیا در سراسر جهان می‌شود. علاوه بر این می‌تواند به‌صورت پوده‌رُست در خاک زنده بماند (Valentín Torres *et al.* 2016). آلودگی از طریق زخم‌ها یا توسط پوشش اندام‌ها با میسلیوم قارچ رخ می‌دهد. بیمارگر *R. solani* در دمای بین ۱۵ تا ۱۸ درجه سلسیوس و در خاک‌های مرطوب دارای قدرت تهاجمی بالاتری است (Mayo *et al.* 2015).

استفاده از تیمار بذر با قارچ‌کش روشی بسیار رایج برای مدیریت بیمارگرهای خاک‌برد و بذربرد است و برای مهم‌ترین محصولات زراعی کاربرد دارد (Lamichhane *et al.* 2020). به طورکلی، تیمار بذر با قارچ‌کش‌های شیمیایی برای مهار بیماری مؤثر است، اما می‌تواند علاوه بر تأثیر سوء بر سلامت انسان و محیط زیست، بر جوانه‌زنی بذر نیز تأثیر نامطلوبی داشته‌باشد. هم‌چنین بروز جدایه‌های مقاوم قارچ به قارچ‌کش چالش‌های بیش‌تری در مسیر مدیریت بیماری به وجود آورده‌است (Lamichhane *et al.* 2017). بنابراین، روش‌های مبتنی بر استفاده از میکروارگانیسم‌های سودمند و القای پاسخ‌های دفاعی گیاه با محیط زیست و سلامتی انسان سازگار بوده و با القای مقاومت پایدار در مقابل بیمارگرهای گیاهی می‌تواند جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی باشد.

مقاومت گیاه در برابر عوامل تنش‌زای زنده را می‌توان با فعال کردن دفاع گیاه از طریق استفاده از محرک‌های زیستی و غیرسمی تقویت کرد. چنین محرک‌هایی می‌توانند سیستم دفاعی گیاهان را از پیش آماده کنند و پاسخ‌دهی گیاه را در برابر عوامل تنش‌زا افزایش دهند، که به آن آماده‌باش (priming) گفته شده‌است. بنابراین می‌توانند جایگزینی پایدار برای قارچ‌کش‌های شیمیایی در محافظت از گیاهان باشند (Westman *et al.* 2019). علاوه بر این تیمار گیاهان با عوامل القا کننده مقاومت، گیاهان را از ظرفیت دفاعی پیشرفته‌تری برخوردار می‌کند، که منجر به واکنش دفاعی سریع‌تر و یا قوی‌تر گیاه در واکنش به تنش زنده و غیرزنده می‌شود. آماده‌باش باعث افزایش توانایی گیاه برای فعال-سازی مسیرهای دفاعی گیاه می‌شود. در شرایط فشار بیماری، گیاهان تیمار شده دارای آمادگی بالاتری نسبت به گیاهان شاهد هستند (Ton *et al.* 2009). از آن جایی که القای مقاومت در گیاه بدون این که اثر سوء قابل توجهی روی رشد، تولید بذر و میوه گیاه داشته باشد سبب برانگیختن مقاومت گیاهان در برابر طیف وسیعی از بیمارگرها می‌شود، در برنامه‌های مدیریت بیماری‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است (van Hulten *et al.* 2006).

بتا آمینوبوتریک اسید =Beta Aminobutyric Acid (BABA) یک اسید آمینه غیرپروتئینی است که به ندرت در طبیعت مشاهده می‌شود. اگرچه BABA به ندرت در گیاهان یافت می‌شود، اما ثابت شده است که یک القاگر قوی مقاومت اکتسابی است. BABA دارای فعالیت گسترده‌ای در برابر بسیاری از بیمارگرها مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها، اُاُمیست‌ها، قارچ‌ها و نماتدها است (Jakab *et al.* 2001). باکتری گرم مثبت *Bacillus subtilis* که به فراوانی در محیط وجود دارد عمده‌ترین عامل مهارزیستی است که به طور گسترده در کشاورزی پایدار کاربرد دارد. دو سازوکار مستقیم و غیر مستقیم مهارزیستی برای مدیریت بیمارگرها توسط این باکتری به کار گرفته می‌شود. سازوکار مستقیم شامل سنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه، هورمون‌ها،

آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی و آنتی‌اکسیدان‌هایی است که به گیاه برای دفاع در برابر حمله بیمارگر کمک می‌کند. در حالی‌که سازوکار غیرمستقیم شامل تحریک رشد گیاه و القای مقاومت سیستمیک اکتسابی است. هم‌چنین می‌تواند فسفر خاک را حل کند، تثبیت نیتروژن را افزایش دهد و سیدروفورهایی تولید کند که رشد گیاه را تقویت کرده و بیمارگرها را مهار کند. جدایه‌های *B. subtillis* با القای بیان ژن‌های پاسخ به تنش‌ها، هورمون‌ها گیاهی و متابولیت‌های مرتبط با تنش، تحمل تنش را در میزبان گیاهی خود افزایش می‌دهند (Hashem *et al.* 2019).

تیمار بذرها با عوامل زیستی و غیرزیستی به منظور مدیریت بیماری‌های بذر و گیاهچه جایگزینی برای مدیریت شیمیایی این بیماری‌ها است. مشخص شده‌است که مایه‌زنی گیاهان لوبیای معمولی با باکتری همزیست *Rhizobium etli* منجر به مقاومت در برابر *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* می‌شود (Díaz-Valle *et al.* 2019). تیمار بذر لوبیا با جدایه‌های *P. fluorescens* WM35، *P. aureofaciens* WM09 و *P. putida* WM06 توانسته‌است به طور قابل توجهی با ایجاد مقاومت سیستمیک القایی بیماری زنگ لوبیا را در شرایط گلخانه و مزرعه مهار و از برگ‌های لوبیا در برابر بیماری محافظت کند (Abeysinghe 2009). دو جدایه ALB629 و UFLA285 از *B. amyloliquefaciens* به تنهایی و همراه با قارچ‌کش متالاکسیل + فلادیاکسونیل روی قارچ عامل پوسیدگی ریشه دو رقم لوبیا سبب کاهش میزان بیماری تا ۱۶۴ درصد شده است (Martins *et al.* 2018). بررسی اثر سه عامل بیومهار شامل جدایه INR7 *Bacillus pumilus*، *Trichoderma harzianum* و *Rhizophagus intraradices* تنها و همراه با هم روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا به دو روش هم‌زمان با قارچ عامل بیماری و یک ماه قبل از مایه زنی قارچ، نشان داده است که تیمارهای حاوی باکتری بهترین تیمار برای کاهش بیماری در حالت تیمار هم‌زمان با بیمارگر بوده درحالی که در شرایط مایه‌زنی بیمارگر یک ماه بعد از اعمال تیمارهای مهار زیستی به استثنای تیمار با *T. harzianum* کاهش معنی‌دار آماری در شاخص شدت بیماری نشان نداده است (Nasir Husein *et al.* 2018). بررسی اثر جدایه‌های GBO3 و MB1600 باکتری *B. subtilis* همراه با گونه‌های از *Rhizobium* در وقوع و شدت بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا در شرایط گلخانه و مزرعه بیانگر افزایش زیست‌توده‌ی گیاه و کاهش شاخص شدت بیماری تحت تأثیر تیمار جدایه GBO3 در شرایط گلخانه بوده‌است، ولی در شرایط مزرعه فقط ترکیب تیماری گونه *Rhizobium tropici* و جدایه MB1600 تفاوت معنی‌دار آماری در کاهش بیماری در مقایسه با شاهد نشان داده‌اند (De Jensen *et al.* 2002). تیمار جدایه QST713 باکتری *B. subtilis* به شکل پاشیدن روی برگ به تنهایی و همراه با هیدروکسید مس علیه بیماری بلایت باکتریایی لوبیا نشان داده است که بیش‌ترین کاهش بیماری در کاربرد هم‌زمان دو عامل زیستی بوده، هم‌چنین تیمار باکتری به تنهایی نسبت به هیدروکسید مس به تنهایی بیماری را بهتر مهار کرده است (Belete *et al.* 2021).

در بررسی اثر هشت ماده شیمیایی القا کننده مقاومت به همراه قارچ‌کش هگزاکونازول روی بیماری زنگ لوبیای فرانسوی، حداقل شدت بیماری (۸/۵ درصد) در گیاهان محلول‌پاشی شده با $KH_2PO_4$ در مقایسه با شاهد ثبت شد. در غلظت یک میلی‌مولار از BABA نیز شاخص شدت بیماری معادل با ۲۱/۳۳ درصد گزارش شده است (Devi *et al.* 2020). استفاده از سه ترکیب، BABA، متیل جاسمونات (MeJA) و سالسیلیک اسید (SA)، القاء کننده مقاومت برای مهار *R. solani* AG-2-2 در چغندرقند تحت شرایط گلخانه نشان داده‌است که بیش‌ترین میزان مهار بیماری در تیمار بذور با غلظت ۱۰ میلی مولار BABA و یک میلی مولار MeJA مشاهده شده است (Karimi *et al.* 2015). به کارگیری BABA در خاک سبب القاء مقاومت در لوبیا علیه بیماری بلایت باکتریایی شده و میزان تجمع باکتری و

اندازه لکه‌ها در گیاهان تیمار شده با شاهد تفاوت معنی‌دار آماری داشته است (Martínez-Aguilar *et al*. 2016).

شدت بیماری ایجاد شده توسط *R. solani* به حساسیت رقم میزبان، تأثیر شرایط محیطی و خاک بستگی دارد (Martins *et al*. 2018). در بین راهبردهای مدیریت بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه لوبیا استفاده از گیاه مقاوم بهترین شیوه بوده ولی تا به حال رقم مقاوم تجاری علیه آن معرفی نشده است، بنابراین مدیریت بیماری بر پایه استفاده از قارچ‌کش‌ها انجام می‌شود. با توجه به مشکلات ناشی از استفاده از قارچ‌کش‌ها، به نظر می‌رسد استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی برای القای مقاومت علیه بیمارگرهای خاک‌برد یک روش مؤثر باشد. از این رو در پژوهش حاضر تأثیر پوشش‌گذاری بذر لوبیا با جدایه A4 باکتری *B. subtilis* و ماده شیمیایی BABA برای القای مقاومت علیه *R. solani* AG4 در دو رقم صدری و تلاش لوبیا بررسی شد.

## مواد و روش

### منابع گیاهی و تیمار بذر با باکتری و BABA

در این پژوهش دو رقم تلاش و صدری لوبیا از مرکز تحقیقات لوبیای خمین تهیه شد. برای تهیه سوسپانسیون باکتری از کشت تازه جدایه A4 باکتری *B. subtilis* دریافت شده از کلکسیون آزمایشگاه گروه بیماری شناسی دانشگاه تربیت مدرس یک پرگنه در محیط LB کشت و به مدت ۲۴ ساعت در ۲۸ درجه سلسیوس روی شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه رشد داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از کشت تازه باکتری به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB افزوده و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط یاد شده تکثیر شد. هر کشت باکتری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی حذف شد. رسوب سلول‌های باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حل شده و دوباره با همان شرایط قبل سانتریفیوژ شد. مایع رویی حذف و با افزودن محلول کربوکسی متیل سلولز یک درصد (CMC 1%) سترون، جهت پوشش کامل بذور، سوسپانسیونی از جدایه باکتری با غلظت $9\times10^{8}$ CFU/mL برای پوشش کامل بذور تهیه شد. بذرهای لوبیا به مدت سه دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۴٪ گندزدایی سطحی شد و سپس سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند. پس از آن، بذرها سه دقیقه در اتانول ۷۰٪ گندزدایی و سه مرتبه با آب مقطر سترون شسته شدند. بذرهای لوبیا در باکتری‌های فرموله شده در محلول CMC یک درصد خیسانده شدند و به مدت سه ساعت در دمای اتاق روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. بذرهای تیمار شده به مدت یک شب روی کاغذ صافی‌های سترون زیر هود لامینار نگه‌داری شد تا به خوبی خشک شوند و در بستر حاوی پیت، پرلیت و خاک به نسبت مساوی کشت و در گلخانه ۲±۲۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. برای تیمار بذور با غلظت ۱۰ میلی‌مولار از BABA (سیگما، آمریکا)، ابتدا محلول پایه با غلظت ۲۰ میلی‌مولار در آب مقطر سترون تهیه شد. سپس حجم مناسبی از محلول CMC 2% سترون به آن اضافه شد تا غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار تهیه شود. پس از آن بذرهای گندزدایی سطحی شده به آن اضافه و در شرایط قبل نگه‌داری شدند.

### تهیه زادمایه قارچ و مایه زنی آن

جهت بررسی بیماری‌زایی *R. solani* AG4 از روش گریشام و اندرسون (Grisham and Anderson 1983) در گلخانه استفاده شد. به منظور تهیه زادمایه ابتدا ۱۰۰ گرم بذر ذرت خیس خورده به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری افزوده و دو روز متوالی در ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شد. سپس پنج قرص، با قطر پنج میلی‌متر، از حاشیه فعال کشت سه روزه *R. solani* به فلاسک‌ها اضافه و به مدت سه هفته در ۲۸ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. برای شاهد، به تعدادی فلاسک قرص‌های محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز- آگار سترون اضافه و در شرایط یاد شده نگه‌داری

شدند. هر سه تا چهار روز دانه‌های ذرت جهت جلوگیری از چسبندگی تکان داده شدند. در مرحله کوتیلدونی گیاهچه‌ها خاک کنار ریشه هر بوته لوبیا کنار زده شده و تعداد پنج عدد بذر ذرت حاوی زادمایه قارچ در مجاورت ریشه هر گیاه گذاشته شد.

### بررسی شاخص شدت بیماری

در هفته سوم پس از مایه‌زنی گیاهان با *R. solani* AG4، شاخص شدت بیماری در تیمارها بر اساس روش نمره‌دهی کادارابک و همکاران (Kaderabek *et al.* 2013) با اندکی تغییرات، شامل گیاه سالم، فاقد علایم (۰)، زخم‌های کوچک قهوه‌ای یا تیره (۱)، پوشش زخم‌های کم‌تر از ۷۵ درصد سطح طوقه یا ریشه (۲)، پوشش زخم بیش‌تر از ۷۵ درصد سطح طوقه و ریشه (۳)، مرگ گیاهچه (۴) مورد بررسی قرار گرفت.

### وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه گیاه

جهت اندازه‌گیری وزن تر و خشک اندام هوایی گیاهان، بوته‌ها از سطح خاک گلدان قطع شد و وزن تر آن‌ها توزین و یادداشت گردید. به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک بوته‌ها به صورت جداگانه در پاکت‌های کاغذی قرار گرفت و در آون با ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس توزین و یادداشت شد.

### استخراج عصاره متانولی و اتانولی

به‌منظور استخراج عصاره متانولی به ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های تیمارهای مورد بررسی و شاهد پودر شده، ۵۰۰ میکرولیتر متانول ۹۵٪ خیلی سرد اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد. این فرایند سه بار تکرار و فاز رویی به منظور اندازه گیری صفات مورد بررسی در منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شد.

برای استخراج عصاره اتانولی به ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های تیمارهای مورد بررسی و شاهد پود شده مقدار ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰٪ اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. روشناور به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری جدید منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول جدید اضافه و در همان شرایط قبل قرار داده شد. این فرایند، چهار مرتبه تکرار شد. به طوری که حجم نهایی به دو میلی‌لیتر رسید.

### اندازه گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای اندازه گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی، ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه عصاره متانولی، به چاهک‌های بشقابک‌پلی-استرن ریخته و میزان جذب در طول موج‌های ۶۶۵ ، ۶۵۲ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت (BioTek, Epoch) خوانش و ثبت شد (Warren 2008). محتوای کلروفیل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بر اساس روش (Lichtenthaler 1987) محاسبه شد.

### ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

ارزیابی فعالیت کاتالاز براساس نرخ تجزیه پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) (مرک، آلمان) موجود در بستره آنزیمی متناسب با کاهش جذب در ۲۴۰ nm طبق روش (Li & Schellhorn 2007) انجام شد. بر این اساس، به ۳۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده برای اندازه‌گیری پروتئین مقدار ۱۵۵ میکرولیتر از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH ۷) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس مقدار ۱۵ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۲۰ میلی‌مولار به هر چاهک بشقابک اضافه شد. نمونه به سرعت داخل دستگاه بشقابک خوان (BioTek, Epoch) قرار داده شد و میزان کاهش جذب در ۲۴۰ nm به مدت دو دقیقه هر ۳۰ ثانیه ثبت شد. سپس میزان فعالیت آنزیم بر اساس هر واحد در هر گرم وزن تر محاسبه شد.

### ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)

ارزیابی آنزیم پراکسیداز بر اساس روش (Siguemoto & Gut 2017) با اندکی تغییرات انجام گرفت. درون هر چاهک بشقابک ۴۲ میکرولیتر از عصاره آنزیمی ، به ۱۲۵ میکرولیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH ۷) اضافه و مخلوط حاصل همراه با ۱۷ میکرولیتر از $H_2O_2$، ۱۲ میلی‌مولار و ۱۷ میکرولیتر گایاکول (سیگما، آمریکا) ۲۴ میلی‌مولار به منظور تعادل در دما به مدت دو دقیقه در اتاق نگه‌داری شدند. پس از آن به ترتیب محلول گایاکول و $H_2O_2$ به منظور آغاز واکنش اضافه شدند. تغییرات جذب به فواصل هر ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۷۰ nm به مدت سه دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت یک واحد آنزیم بر حسب افزایش جذب در هر دقیقه بر اساس گرم وزن تر ارزیابی شد.

### اندازه‌گیری میزان فنول کل

به منظور ارزیابی محتوای فنول کل، منحنی استاندارد با استفاده از گالیک اسید (مرک، آلمان) رسم گردید. برای سنجش محتوای فنول کل نمونه‌ها، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی تهیه شده ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالتو ۱۰٪ (مرک، آلمان) اضافه و پس از انجام ورتکس شدید، مقدار ۸۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ($Na_2CO_3$) (مرک، آلمان) ۷۰۰ میلی‌مولار افزوده و به مدت دو ساعت در دمای اتاق در تاریکی نگه‌داری شد. پس از طی این مدت زمان به هر چاهک بشقابک ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه اضافه و میزان جذب در طول موج ۷۶۵ nm ثبت شد. میزان فنول کل بر اساس میزان معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم برگ محاسبه شد (Ainsworth & Gillespie 2007).

### محتوای قند محلول کل

برای سنجش میزان قند محلول، ۵۰ میکرولیتر از عصاره اتانولی هر نمونه به چاهک‌های بشقابک منتقل و ۱۵۰ میکرولیتر سولفوریک اسید غلیظ (۱۰۰ درصد) (مرک، آلمان) اضافه شد. بلافاصله ۳۰ میکرولیتر فنول ۵ درصد (مرک، آلمان) اضافه و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری با ۹۰ درجه سلسیوس قرار داده و سپس به بن ماری آب سرد منتقل شد تا به سرعت خنک شود. میزان جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانش و ثبت شد. (Masuko *et al*. 2005).

### تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش با استفاده از آزمون فاکتوریل با سه فاکتور بیمارگر، آماده‌باش و رقم در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۶ تکرار انجام شد. آزمایش دو بار تکرار شد و نتایج مشابهی در هر دو آزمایش به دست آمد، بنابراین نتایج یک آزمون ارایه شده است. تیمارهای مورد بررسی در پژوهش حاضر در جدول ۱ آورده شده است. با توجه به نتایج مشابه تیمار شاهد منفی و شاهد بدون بیمارگر فقط نتایج تیمار شاهد منفی بیان شده است.

**جدول ۱. تیمارهای مورد بررسی در رقم‌های تلاش، صدری لوبیا.**

**Table 1. Treatments investigated in Talaash and Sadri cultivars of common bean**.

| Treatment | *Rhizoctonia solani* AG4 | *Bacillus subtilis* Isolate | BABA** |
|---|---|---|---|
| Negative Control ($C^-$) | M* | - | - |
| Positive Control ($C^+$) | + | - | - |
| Bio-priming | + | + | - |
| Control for bio-priming | M | + | - |
| Chemo-priming | + | - | + |
| Control for chemo-priming | M | - | + |

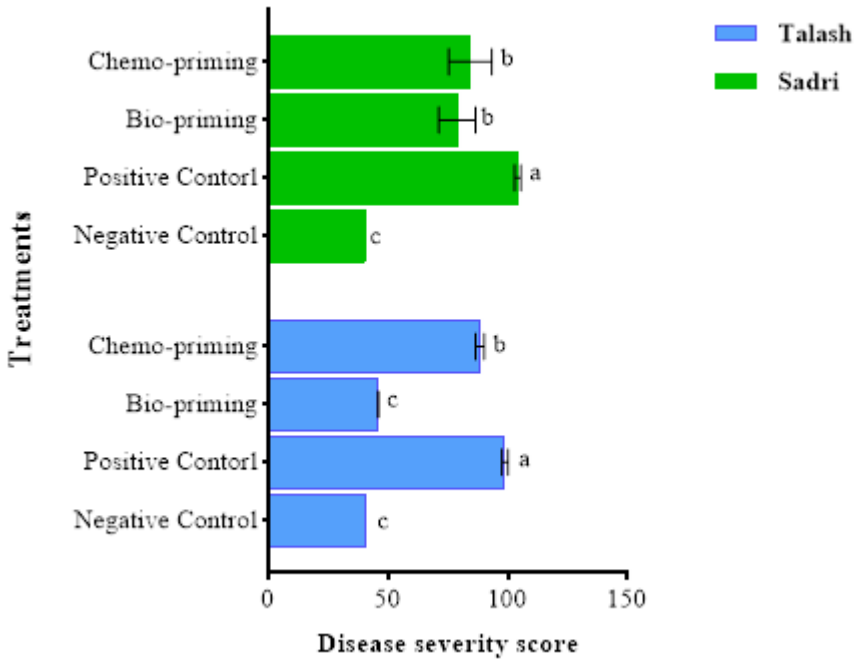
*M: Mock inoculation of *Rhizoctonia solani*

**BABA: Beta aminoisobutyric acid

واکاوی داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای SAS 9.4، ترسیم نمودارها با GraphPad و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD انجام شد.

## نتایج

نتایج بررسی واکنش دو رقم لوبیا نسبت به آلودگی *R. solani* در هفته سوم بعد از مایه‌زنی نشان داد که رقم صدری بیش‌ترین شاخص شدت بیماری را داشت. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر عامل آماده‌باش زیستی و غیرزیستی (شیمیایی) روی شاخص شدت بیماری معنی‌دار بود. عوامل آماده‌باش روی هر دو رقم مورد مطالعه سبب کاهش شاخص شدت بیماری نسبت به شاهد مثبت شدند. کاهش شاخص شدت بیماری در رقم صدری برای تیمارهای آماده‌باش زیستی و آماده‌باش شیمیایی به ترتیب ۲۴ و ۱۹ درصد بود، که تفاوت معنی‌دار آماری در کاهش شاخص شدت بیماری نسبت به هم نشان ندادند. بالاترین میزان کاهش شدت بیماری در رقم تلاش در تیمار آماده‌باش زیستی به میزان ۵۹ درصد مشاهده شد، در این رقم تیمار آماده‌باش شیمیایی سبب کاهش شدت بیماری به میزان ده درصد شد. شاخص شدت بیماری مشاهده شده در تیمار آماده‌باش زیستی نسبت به شاهد منفی تفاوت معنی‌دار آماری نداشت (شکل ۱).



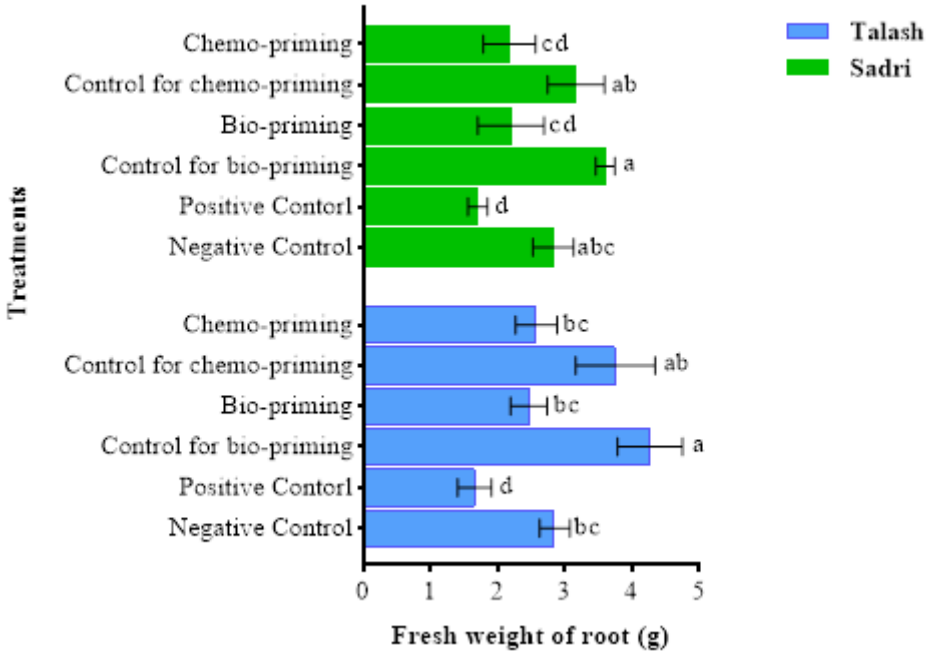

**شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر و آماده‌باش بر شدت بیماری در رقم‌های تلاش و صدری لوبیا.**

***میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.**

**Figure1. Comparison of the mean interaction effect of pathogen and priming in disease severity on Talash and Sadari cultivars of common bean.**

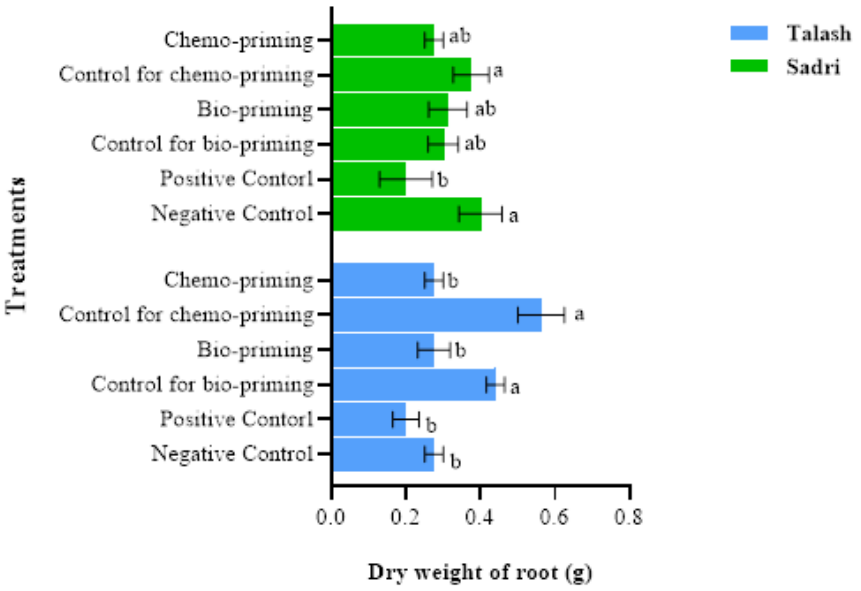
***Means with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$.**

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که وزن تر و خشک ریشه، در سه سطح ساده آماده‌باش- بیمارگر و آماده‌باش-رقم و اثر متقابل سه گانه آن‌ها معنی‌دار بود. اثر ساده بیمارگر، دوگانه بیمارگر- آماده‌باش و اثر سه گانه در ارتفاع ریشه نیز تفاوت معنی‌دار آماری داشتند. بالاترین وزن تر ریشه در رقم تلاش مربوط به تیمار شاهد - آماده‌باش زیستی بود و کم‌ترین میزان آن هم در تیمار شاهد مثبت مشاهده شد. در رقم صدری بالاترین وزن تر ریشه مربوط به تیمار شاهد آماده‌باش زیستی بود. تیمار آماده‌باش زیستی و آماده‌باش شیمیایی نیز باعث افزایش میزان وزن تر ریشه شدند، ولی این افزایش در هیچ‌کدام از تیمارهای آماده‌باش زیستی و آماده‌باش شیمیایی در رقم صدری و در تیمار آماده‌باش شیمیایی در رقم تلاش نسبت به شاهد مثبت معنی‌دار نبود (شکل ۲). هر چند وزن خشک ریشه در هر دو رقم در تیمارهای آماده‌باش‌زیستی و آماده‌باش شیمیایی افزایش یافت ولی این افزایش نسبت به تیمار شاهد مثبت معنی‌دار نبود (شکل ۳). تیمارهای آماده‌باش زیستی و آماده‌باش شیمیایی سبب افزایش طول ریشه شدند، ولی این افزایش در تیمار آماده‌باش شیمیایی نسب به تیمار شاهد مثبت در هیچ‌کدام از رقم‌های مورد بررسی معنی‌دار نبود (شکل ۴). اثر بیمارگر و اثر آماده‌باش بر بیمارگر در صفات اندازه‌گیری شده ارتفاع، وزن تر و خشک اندام هوایی معنی‌دار نبود (جدول ۲).



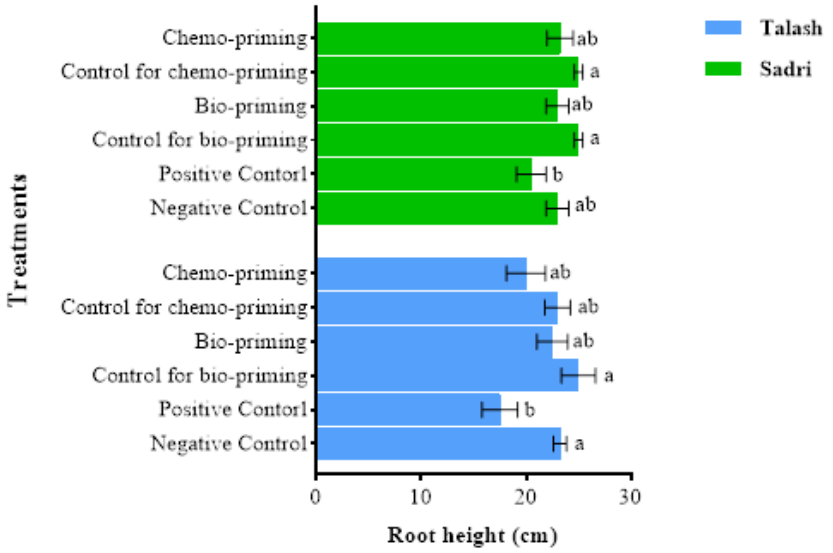

**شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر، آماده‌باش و رقم بر وزن‌تر ریشه رقم‌های تلاش و صدریلوبیا.**
***میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.**

**Figure 2. Comparison of the mean interaction effect of pathogen, priming, and cultivar on root fresh weight in Talash and Sadari cultivars of common bean.**
***Means with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$.**




شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر، آماده‌باش و رقم بر وزن خشک ریشه در رقم‌های تلاش و صدری لوبیا.
*میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

**Figure 3. Comparison of the mean interaction effect of pathogen, priming and cultivar on dry weight of root in Talash and Sadari cultivars of bean.**
***Means with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$.**




شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر، آماده‌باش و رقم بر طول ریشه در رقم‌های تلاش و صدری لوبیا.
*میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

**Figure 4. Comparison of the mean interaction effect of pathogen, priming and cultivar on root length in Talash and Sadari cultivars of bean plants.**
***Means with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$.**

**جدول ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل آماده‌باش (بابا و باسیلوس) و رقم ( تلاش و صدری) بر وزن تر، وزن خشک و ارتفاع ساقه.**

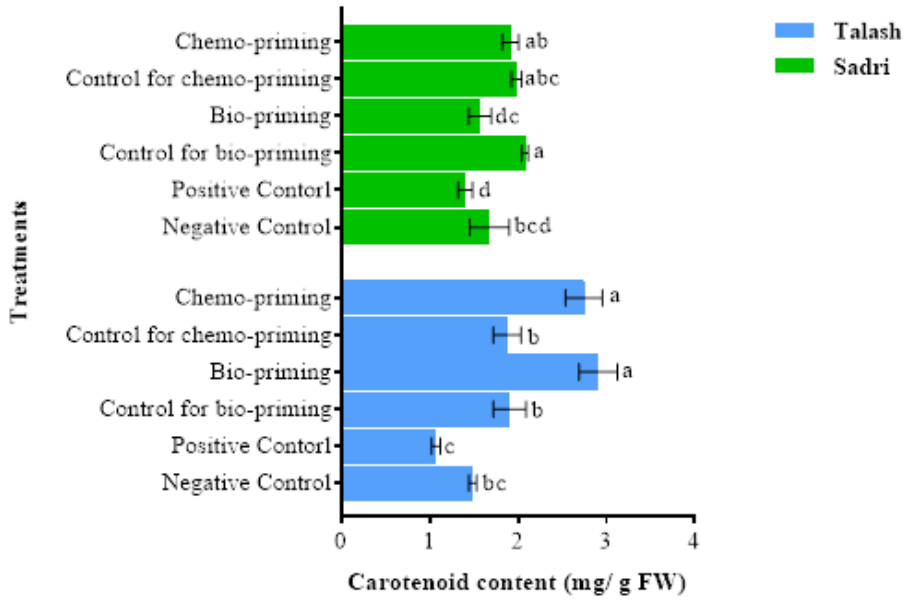
**Table 2. Comparison of mean interaction effect of priming (BABA and *B. subtilis*) and common bean cultivars (Talash and Sadri) on fresh weight (FWs), dry weight (DWs) and height shoot (Hs).**

| | Parameters | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | FWs (g) | | DWs (g) | | Hs (cm) | |
| Treatments | Talash | Sadri | Talash | Sadri | Talash | Sadri |
| Negative control | 7.96± 0.31$^{bc}$ | 8.33 ± 0.49$^{b}$ | 1.24± 0.05$^{bc}$ | 1.28± 0.09$^{b}$ | 63.85±3.34$^{bc}$ | 69.05±4.53$^{b}$ |
| Bio-priming | 6.97± 0.23$^{c}$ | 10.38± 0.41$^{a}$ | 1.17± 0.06$^{bc}$ | 1.59± 0.07$^{a}$ | 54.87±1.63$^{c}$ | 81.80±3.96$^{a}$ |
| Chemo-priming | 8.58± 0.21$^{b}$ | 7.09± 0.45$^{c}$ | 1.32± 0.05$^{b}$ | 1.07± 0.08$^{c}$ | 69.45±2.41$^{b}$ | 61.70±3.43$^{bc}$ |

* میانگین‌های دارای حروف یکسان در هر صفت مورد بررسی سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

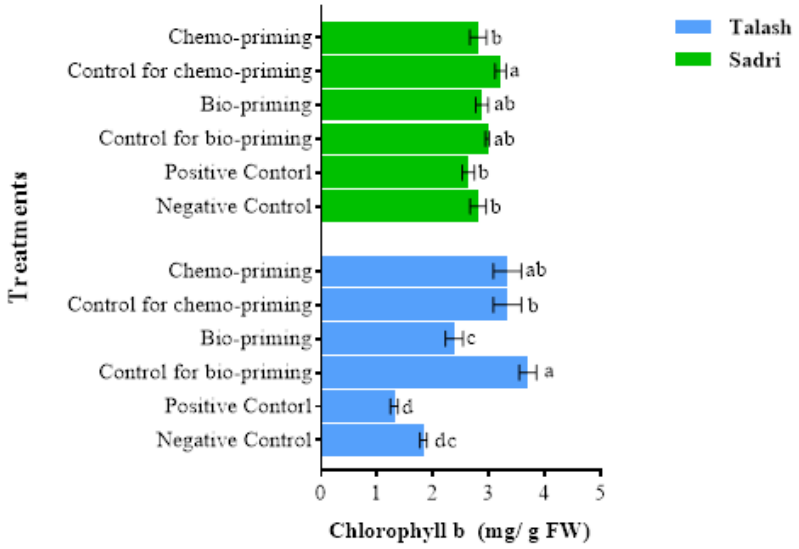
*Means with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$

تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر این بود که برهم‌کنش سه گانه فاکتورهای مورد بررسی بر میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کارتنوئید) اندازه‌گیری شده در این پژوهش معنی‌دار بود. در همه صفات اندازه‌گیری شده عوامل آماده‌باش در رقم‌های مورد بررسی در تیمارهای شاهد آماده‌باش سبب افزایش این صفات نسبت به تیمار شاهد منفی شدند (شکل ۵، ۶ و ۷). بالاترین میزان افزایش کارتنوئید به میزان ۴۸ درصد در رقم تلاش تیمار شده با شاهد آماده‌باش زیستی و هم‌چنین برای کلروفیل a و b اندازه‌گیری شده به ترتیب به ۵۰ و ۴۶ درصد در رقم تلاش تیمار شده با شاهد آماده‌باش زیستی و آماده‌باش غیرزیستی بود. روند تغییرات این صفات در هر دو رقم مورد بررسی در تیمار شاهد مثبت متفاوت بود، به گونه‌ای که در شاهد مثبت هر سه صفت مورد بررسی در هر دو رقم کاهشی بود، کاهش میزان کارتنوئید و کلروفیل a در رقم صدری نسبت به شاهد منفی اختلاف معنی‌دار آماری نداشت. آماده‌باش زیستی و شیمیایی نسبت به تیمار شاهد مثبت نیز سبب افزایش این صفات در هر دو رقم شدند. افزایش کارتنوئید برای هر دو رقم تحت تأثیر هر دو عامل آماده‌باش نسبت به تیمار شاهد مثبت معنی‌دار بود به گونه‌ای که برای رقم تلاش بالاترین میزان کارتنوئید در تیمارهای آماده‌باش زیستی و آماده‌باش شیمیایی ثبت شد. برای کلروفیل a و b عوامل آماده‌باش مشابه با میزان کارتنوئید باعث افزایش آن‌ها شدند، افزایش کلروفیل b در رقم صدری فقط در تیمار شاهد آماده‌باش شیمیایی نسبت به تیمار شاهد مثبت معنی دار بود اما کلروفیل a در این رقم در همه تیمارها به جز در آماده‌باش زیستی نسبت به شاهد مثبت معنی‌دار نبود، افزایش این دو رنگدانه فتوسنتزی در همه تیمارهای مورد بررسی در رقم تلاش نسبت به شاهد مثبت معنی‌دار بودند (شکل ۵، ۶ و ۷).



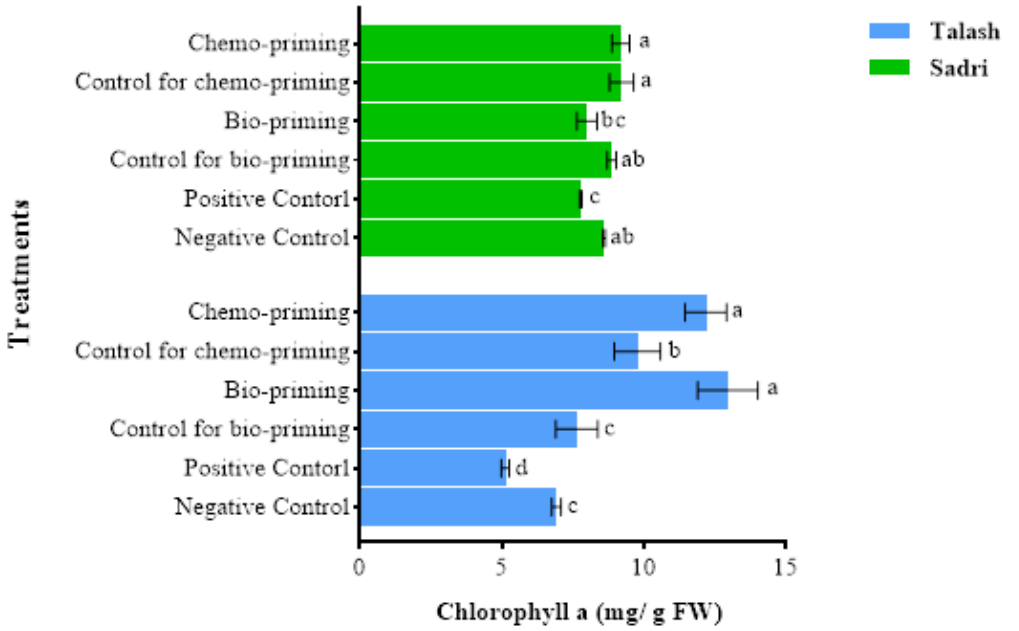

شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر، آماده‌باش و رقم بر محتوای کارتنوئید در رقم‌های تلاش و صدری لوبیا.
*میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

**Figure 5. Comparison of the mean interaction effect of pathogen, priming and cultivar on carotenoid content in Talash and Sadari cultivars of bean.**
***Means with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$.**




شکل ۶. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر، آماده‌باش و رقم بر محتوای کلروفیل **b** در رقم‌های تلاش و صدری لوبیا.
*میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

**Figure6. Comparison of the mean interaction effect of pathogen, priming, and cultivar on chlorophyll b in Talash and Sadari cultivars of bean.**
***Means with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$.**




**شکل ۷. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر، آماده‌باش و رقم بر محتوای کلروفیل a در رقم‌های تلاش و صدری لوبیا.**
*** میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.**

**Figure7. Comparison of the mean interaction effect of pathogen, priming, and cultivar on chlorophyll a in Talash and Sadari cultivars of bean.**
***Means with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$.**

میزان کربوهیدارت اندازه‌گیری شده در سطح ساده فاکتور بیمارگر و رقم و برهم‌کنش بین بیمارگر و عوامل آماده‌باش و بیمارگر با رقم‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌دار آماری داشتند. مقایسه میانگین برهم‌کنش بیمارگر و عوامل آماده‌باش نشان داد، که شاهد آماده‌باش زیستی و شیمیایی نسبت به تیمار شاهد مثبت سبب افزایش میزان کربوهیدرات شدند. اما افزایش آن تفاوت معنی‌دار آماری را بین شاهد عوامل آماده‌باش وشاهد مثبت نشان نداد. شاهد مثبت سبب کاهش معنی‌دار آماری میزان کربوهیدارت نسبت به شاهد منفی شد. تیمارهای آماده‌باش زیستی و شیمیایی سبب افزایش میزان کربوهیدارت شدند که این افزایش نسبت به شاهد مثبت معنی‌دار نبود (جدول ۳).

تجزیه واریانس داده‌های فنول بیانگر این بود که میزان فنول در تیمارهای مورد بررسی تحت تأثیر فاکتورهای بیمارگر و آماده‌باش و برهم‌کنش اثرات سه گانه فاکتورهای مورد بررسی قرار گرفت. شاهد مثبت در هر دو رقم مورد بررسی نسبت به شاهد منفی سبب کاهش میزان فنول شد. تیمارهای شاهد عوامل آماده‌باش سبب افزایش میزان فنول در هر دو رقم لوبیا نسبت به شاهد منفی شد، این افزایش در تیمار شاهد آماده‌باش شیمیایی در رقم صدری و شاهد آماده‌باش زیستی در رقم تلاش معنی‌دار بود. علاوه بر این، افزایش فنول در رقم تلاش در تیمار آماده‌باش زیستی نسبت به شاهد مثبت معنی‌دار بود (شکل ۸).

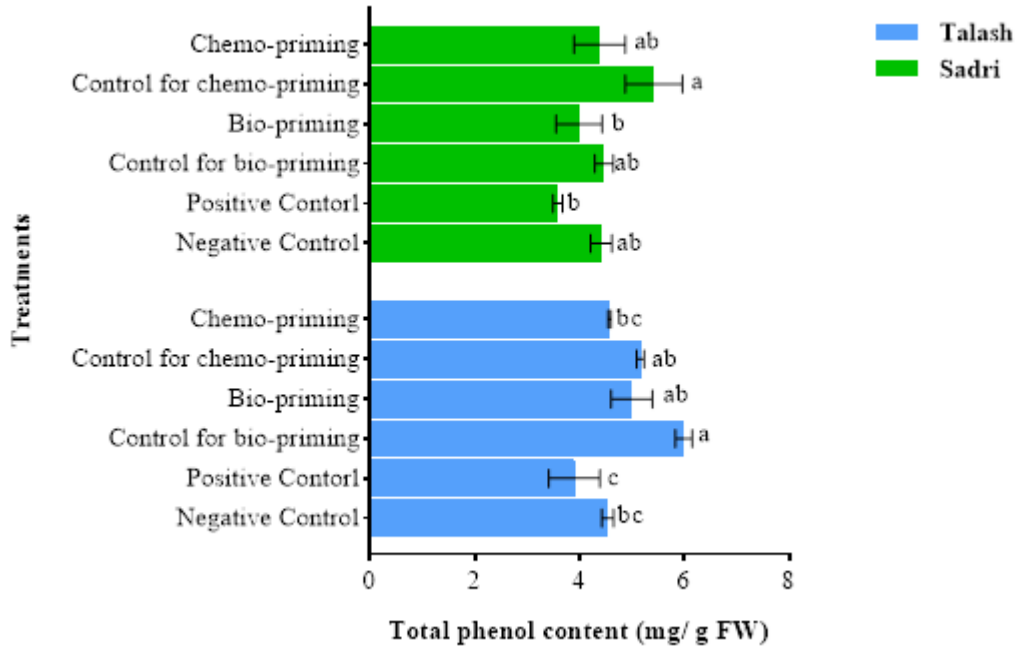
**جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر، آماده‌باش (بابا و باسیلوس) بر محتوای کربوهیدرات و فعالیت کاتالاز در گیاهان لوبیا تیمار شده با *Rhizoctonia solani* AG4 و شاهد.**

**Table 3. Comparison of the mean interaction effect of pathogen, priming (BABA and *B. subtilis*) on carbohydrate content (mg/g fresh weight) and catalase activity in plants treated with *Rhizoctonia solani* AG4 and control.**

| | Carbohydrate (mg/ g FW) | | | Catalase activity | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Treatments | Negative Control | Chemo-priming | Bio-priming | Negative Control | Chemo-priming | Bio-priming |
| Positive Control | 4.05±0.75$^{b}$ | 6.17± 0.95$^{ab}$ | 6.72± 1.01$^{ab}$ | 84.16± 20.76$^{bc}$ | 141.98± 31.02$^{b}$ | 235.11± 25.35$^{a}$ |
| Mock | 8.68±1.79$^{a}$ | 6.73± 1.49$^{ab}$ | 7.25±1.13$^{ab}$ | 52.73± 7.77$^{c}$ | 88.77± 12.92$^{bc}$ | 85.20± 10.74$^{bc}$ |

*میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند

*Means with the same letters are not significantly different at P≤ 0.0

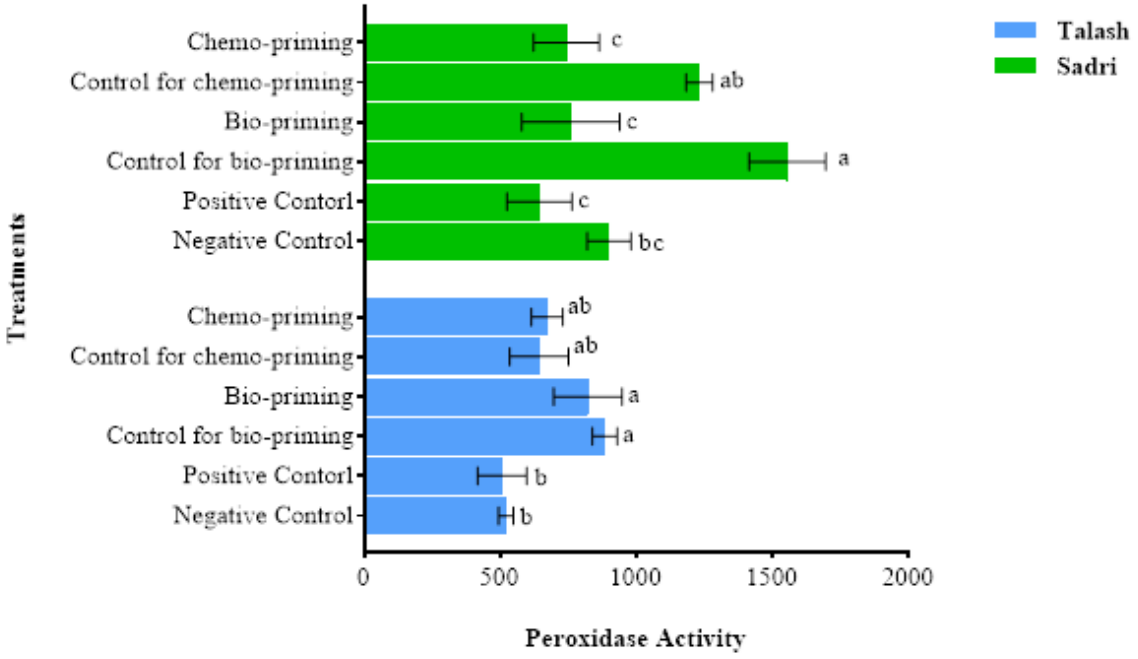



**شکل ۸. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر، آماده‌باش و رقم بر محتوای فنول کل در رقم‌های تلاش و صدری لوبیا.**
***میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.**

**Figure 8. Comparison of the mean interaction effect of pathogen, priming, and cultivar on total phenol content in Talash and Sadari cultivars of bean.**
***Means with the same letters are not significantly different at *P*≤ 0.01.**

میزان فعالیت دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در تیمارهای مورد بررسی اندازه گیری شد، تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر معنی‌دار بودن فعالیت پراکسیداز در تمامی اثرات ساده و متقابل فاکتورهای مورد بررسی بود. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که تیمارهای آماده‌باش زیستی و شیمیایی و تیمار شاهد آن‌ها سبب افزایش فعالیت این آنزیم در رقم تلاش شدند که افزایش آن برای تیمار آماده‌باش شیمیایی و شاهد آن معنی‌دار نبوده ولی در

تیمار شاهد آماده‌باش زیستی و تیمار آن میزان فعالیت این آنزیم افزایش معنی‌دار آماری داشت. در رقم صدری با اینکه تیمارهای آماده‌باش زیستی و شیمیایی و تیمارهای شاهد آن‌ها باعث افزایش فعالیت آنزیم پرکسیداز شدند ولی افزایش آن فقط در تیمار شاهد آماده‌باش زیستی نسبت به شاهد مثبت و منفی معنی‌دار بود (شکل ۹). نتایج این بررسی نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر سطوح ساده و دوگانه فاکتورها به جز آماده‌باش-رقم قرار گرفت و همچنین اثر سه گانه فاکتورها در آن معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین برهم‌کنش عوامل آماده‌باش و بیمارگر بر فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که هر دو عامل آماده‌باش سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شدند. افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز فقط در تیمار آماده‌باش زیستی نسبت به شاهد مثبت و شاهد منفی افزایش معنی‌دار آماری را نشان دادند. افزایش فعالیت این آنزیم در هر دو رقم تیمار شده با شاهد مثبت افزایشی بود که این افزایش فقط در تیمار تلاش نسبت به شاهد منفی معنی دار بود (جدول‌های ۴ و۳).




**شکل ۹. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر، آماده‌باش و رقم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم‌های تلاش و صدری لوبیا.**
***میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.**

**Figure 9. Comparison of the mean interaction effect of pathogen, priming, and cultivar on peroxidase enzyme activity in Talash and Sadari cultivars of bean.**

***Means with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$.**

**جدول ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل بیمارگر و رقم بر محتوای کربوهیدرات و فعالیت کاتالاز.**

**Table 4. Comparison of the mean interaction effect of pathogen and cultivar on carbohydrate content (mg/ g fresh weight) and catalase activity.**

| | Carbohydrate (mg/ g FW) | | Catalase activity | |
|---|---|---|---|---|
| Treatments | Talash | Sadri | Talash | Sadri |
| Positive Control | 3.81± 0.52$^{c}$ | 7.48± 0.51$^{b}$ | 200.94± 26.98$^{a}$ | 106.56± 23.02$^{b}$ |
| Mock | 4.42± 0.29$^{c}$ | 10.68± 0.66$^{a}$ | 95.17± 9.54$^{b}$ | 55.97± 4.62$^{b}$ |

*میانگین‌های دارای حروف یکسان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

*Means with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$.

## بحث

در پژوهش حاضر پوشش‌گذاری بذر لوبیا با عامل آماده‌باش زیستی (*B. subtilis*) و غیرزیستی یا شیمیایی (BABA) در مجموع سبب کاهش شاخص شدت بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه لوبیا در دو رقم صدری و تلاش شد، اما میزان واکنش گیاه نسبت به بیمارگر و عوامل آماده‌باش (BABA و *B. subtilis*) بستگی به رقم گیاه میزبان و عامل آماده‌باش متفاوت بود. بیشترین کاهش شاخص شدت بیماری در رقم تلاش تیمار شده با *B. subtilis* (آماده‌باش زیستی) مشاهده شد، درحالیکه در رقم صدری بین عوامل آماده‌باش در کاهش شدت بیماری تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد. کاهش بیماری در اثر استفاده از عوامل آماده‌باش زیستی و غیرزیستی در مطالعات مختلف گزارش شده است. تیمار بذور لوبیا با *B. pumilus* به تنهایی سبب کاهش ۴۱ درصدی بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه لوبیا شده است (Nasir Hussein *et al*. 2018). هم‌چنین بذور تیمار شده با جدایه *B. subtilis* GBO3 منجر به کاهش شدت بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا در شرایط گلخانه شده است (De Jensen *et al*. 2002).

فنولیک‌ها ترکیبات آروماتیک حلقوی بنزن با یک یا چند گروه هیدروکسیل هستند، که به طور عمده توسط گیاهان برای محافظت در برابر تنش‌ها تولید می‌شوند. این ترکیبات، نقش مهمی در رشد گیاه، به ویژه در سنتز لیگنین و رنگدانه‌ها دارند (Bhattacharya *et al*. 2010). ثابت شده است که تغییر سطح ترکیبات فنولی در گیاهان حساسیت به بیماری را تغییر می‌دهد (Yao *et al*. 1995). در پژوهش حاضر، حضور بیمارگر در هر دو رقم تلاش و صدری سبب کاهش میزان فنول شد. درحالیکه تیمار عوامل آماده‌باش سبب افزایش میزان فنول در حضور و عدم حضور بیمارگر شدند. بنابراین، به‌نظر می‌رسد کاهش میزان ترکیبات فنولی به سبب سرکوب واکنش‌های دفاعی گیاه در مراحل آلودگی توسط بیمارگر رخ می‌دهد (Markakis *et al*. 2010). این نتایج مطابق با نتایج گزارش شده در مورد برهم‌کنش‌های قارچی، ویروسی و باکتریایی است که نشان داده‌اند، برخی از مواد فنولی برای بیمارگرها سمی هستند و به عنوان ترکیبات مهم مرتبط با دفاع در نظر گرفته می‌شوند و سطح آن‌ها به طور طبیعی در انواع مقاوم در بسیاری از محصولات بالا است (Gogoi *et al*. 2001) و پس از آلودگی به ویژه در گیاهان مقاوم تجمع می‌یابد (Agrios 2005).

تجمع قندها، پرولین و اسیدهای آمینه به عنوان آنتی‌اکسیدان برای خنثی‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species, ROS) سمی در شرایط تنش، منجر به حفظ ساختار پروتئین‌ها و غشاها می‌شود (Hashem *et al*. 2017). در این پژوهش محتوای کربوهیدرات گیاه در برهمکنش با بیمارگر به طور معنی‌داری کاهش یافت. هم‌چنین، از بین عوامل آماده‌باش *B. subtilis* سبب افزایش میزان کربوهیدرات بیشتر در گیاه شد. کاهش محتوای کربوهیدرات در گیاهان را می‌توان به

حساسیت گیاهان در برهمکنش با بیمارگرها و عدم توانایی در مقاومت نسبت به بیمارگر نسبت داد. دلیل دیگر برای کاهش سطح کربوهیدرات می‌تواند کاهش در مقدار فعالیت روبیسکو یا مهار محصول نهایی در فتوسنتز، و یا نشانه‌ای از اثر مخرب گونه‌های اکسیژن فعال مانند آنیون سوپراکسید باشد، که سبب کاهش در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی نیز می‌شود (Hura *et al*. 2015). هم‌چنین میزان بالاتر کربوهیدرات در برهمکنش با *B. subtilis* می‌تواند مقاومت بالاتری را در گیاهان نسبت به بیماری ایجاد کند. نتایج افزایش میزان کربوهیدرات در برهمکنش با *B. subtilis* هم‌جهت با نتایج (Hashem *et al*. 2017) است، که آن‌ها نیز با استفاده از این باکتری تجمع قند همراه با سایر عوامل مقاومت در برابر بیماری پوسیدگی زغالی را گزارش کرده‌اند.

بیمارگرها به گیاهان حمله می‌کنند و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) سمی تولید می‌کنند و با شروع زنجیره واکنش‌های خسارت‌زا به سلول‌ها آسیب قابل توجهی می‌رسانند (Hashem *et al*. 2017). آنزیم‌های مرتبط با دفاع یک سامانه محافظتی مهم برای گیاهان در برابر حمله بیمارگر تشکیل می‌دهند (Xie *et al*. 2017). پراکسیداز، یکی از اولین آنزیم‌هایی است که به سرعت در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی پاسخ می‌دهد (Sulman *et al*. 2001) و یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز لیگنین و سوبرین است. پراکسیدازها با تعدادی از عملکردهای فیزیولوژیک همراه هستند که ممکن است به مقاومت از طریق پاسخ فوق حساسیت، اکسیداسیون الکل هیدروکسیل سینامیل به واسطه رادیکال‌های آزاد، اکسیداسیون فنول، اتصال متقابل پلی‌ساکارید، پیوند عرضی مونومرهای گسترش یافته و رسوب مواد فنولی در دیواره سلول‌های گیاهی در طی واکنش مقاومت کمک کنند. هنگامی که سطح پراکسیداز به دلیل مقاومت سیستمیک ناشی از آن افزایش می‌یابد، سنتز سریع مشتقات اکسیژن فعال با انفجار اکسیداتیو منجر به مرگ سلول می‌شود و فعالیت‌های بیمارگر را مهار می‌کند (Prasannath 2017). چندین مطالعه، هم‌سو با پژوهش حاضر، توانایی رایزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) را برای تحریک واکنش‌های دفاعی در گیاهان میزبان، در پاسخ به بیمارگر، به ویژه فعالیت آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان نشان می‌دهد (Jain *et al*. 2017). جدایه *B. subtilis* CBR05 با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز، پلی‌فنول اکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز) در دفاع اولیه در برابر پوسیدگی نرم باکتریایی در گوجه‌فرنگی، ممکن است نقشی اساسی در کاهش تنش اکسیداتیو داشته باشند (Chandrasekaran & Chun 2016). نتایج مشابه در گیاهان لوبیای تیمار شده با *B. subtilis*، در این پژوهش نشان داد که *B. subtilis* سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با دفاع، پراکسیداز و کاتالاز، و پاسخ سلولی فعال شده و در نتیجه احتمالا باعث مقاومت سیستمیک لوبیا در برابر بیمارگرها می‌شود.

در پژوهش حاضر، BABA نسبت به *B. subtilis* اثر کم‌تری در القای مقاومت و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نشان داد. این اثر کم‌تر احتمالا به غلظت، نحوه کاربرد، زمان استفاده BABA و اثر اختصاصی BABA بر هر پاتوسیستم بستگی دارد (Justyna & Ewa 2013). به طوری که در برخی پژوهش‌ها نیز گزارش شده‌است که BABA اثری بر میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدان نداشته است، اما سبب افزایش محتوای فنول کل شده است که احتمالا به زمان و نحوه نمونه‌برداری نیز بستگی دارد (Barilli *et al*. 2010). افزایش میزان فعالیت آنزیم با کاربرد BABA و عدم افزایش معنی‌دار آن در تعامل با عوامل دیگر در برخی تیمارها همسو با نتایج به دست آمده توسط (Sahebani & Hadavi 2009) است.

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد، توانایی باکتری *B. subtilis* در کاهش شدت بیماری پوسیدگی

ریزوکتونیایی لوبیا نسبت به غلظت ۱۰ میلی‌مولار BABA بیشتر است. بنابراین، برای مدیریت این بیماری، می‌توان به جای تیمار بذور با قارچ‌کش که برای محیط زیست و سلامت انسان مضر هستند از *B. subtilis* استفاده کرد، که هم به‌عنوان یک کود زیستی خوب باعث افزایش عملکرد گیاه می‌شود و هم سبب کاهش خسارت بیماری می‌شود.

## تعارض منافع

نویسندگان در انجام این پژوهش هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

## منابع

## References


Abdel-Fattah G. M., El-Haddad S. A., Hafez E. E. and Rashad Y. M. 2011. Induction of defense responses in common bean plants by arbuscular mycorrhizal fungi. Microbiological Research 166(4): 268-281.

Abeysinghe S. 2009. Induced systemic resistance (ISR) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) mediated by rhizobacteria against bean rust caused by *Uromyces appendiculatus* under greenhouse and field conditions. Archives of Phytopathology and Plant Protection 42(11): 1079-1087.

Agrios GN. 2005. Plant pathology. 5th ed. San Diego (CA): Academic Press.

Ainsworth E. A. and Gillespie K. M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Protocols 2(4): 875-877.

Barilli E., Sillero J. C. and Rubiales D. 2010. Induction of systemic acquired resistance in pea against rust (*Uromyces pisi*) by exogenous application of biotic and abiotic inducers. Journal of Phytopathology 158(1): 30-34.

Belete T., Bastas K. K., Francesconi S. and Balestra G. M. 2021. Biological effectiveness of *Bacillus subtilis* on common bean bacterial blight. Journal of Plant Pathology 103: 249-258.

Bhattacharya A., Sood P. and Citovsky V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. Molecular Plant Pathology 11(5): 705-719.

Chandrasekaran M. and Chun S. C. 2016. Expression of PR-protein genes and induction of defense-related enzymes by *Bacillus subtilis* CBR05 in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants challenged with *Erwinia carotovora* subsp. carotovora. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 80(11): 2277-2283.

De Jensen C. E., Percich J. A. and Graham P. H. 2002. Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. Field Crops Research 74(2-3): 107-115.

Devi B., Singh G., Dash A. K. and Gupta S. K. 2020. Chemically induced systemic acquired resistance in the inhibition of French bean rust. Current Plant Biology 23: 100151.

Díaz-Valle A., López-Calleja A. and C. Alvarez-Venegas R. 2019. Enhancement of pathogen resistance in common bean plants by inoculation with *Rhizobium etli*. Frontiers in Plant Science 10: 1317.

Gogoi R., Singh D. V. and Srivastava K. D. 2001. Phenols as a biochemical basis of resistance in wheat against Karnal bunt. Plant Pathology 50(4): 470-476.

Grisham M. P. and Anderson N. A. 1983. Pathogenicity and host specificity of *Rhizoctonia solani* isolated from carrots. Phytopathology 73(11): 1564-1569.

Hashem A., Abd_Allah E. F., Alqarawi A. A., Radhakrishnan R. and Kumar A. 2017. Plant defense approach of *Bacillus subtilis* (BERA 71) against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in mung bean. Journal of Plant Interactions 12(1): 390-401.

Hashem A., Tabassum B. and Abd_Allah, E. F. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi Journal of Biological Sciences 26(6): 1291-1297.

Hura K., Hura T., Dziurka K. and Dziurka M. 2015. Carbohydrate, phenolic and antioxidant level in relation to chlorophyll a content in oilseed winter rape (*Brassica napus* L.) inoculated with *Leptosphaeria maculans*. European Journal of Plant Pathology 143: 291-303.

Jain S., Vaishnav A., Kumari S., Varma A., Tuteja N. and Choudhary D. K. 2017. Chitinolytic Bacillus-mediated induction of jasmonic acid and defense-related proteins in soybean (*Glycine max* L. Merrill) plant against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. Journal of Plant Growth Regulation 36: 200-214.

Jakab G., Cottier V., Toquin V.,Rigoli G., Zimmerli L., Métraux J. P. and Mauch-Mani B. 2001. β-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. European Journal of Plant Pathology 107: 29-37.

Justyna P. G. and Ewa K. 2013. Induction of resistance against pathogens by β-aminobutyric acid. Acta Physiologiae Plantarum 35: 1735-1748.

Kaderabek L. E., Lookabaugh E. C., Owen W. G., Judd L. A., Jackson B. E., Shew H. D. and Benson D. M. 2013. Measuring disease severity of *Pythium* spp. and *Rhizoctonia solani* in substrates containing pine wood chips. Proceedings of the Southern Nursery Association Research Conference, Atlanta, GA, USA. 135-142.

Karimi E., Safaie N., Shams-bakhsh M. and Mahmoodi S. B. 2015. Control of seedling damping-off disease on sugarbeet caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 by endophytic fungi and resistance inducer compounds as seed treatment. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture) 38(4): 33-52.

Lamichhane J. R., Dürr C., Schwanck A. A., Robin M. H., Sarthou J. P., Cellier V. and Aubertot J. N. 2017. Integrated management of damping-off diseases. A review. Agronomy for Sustainable Development 37: 1-25.

Lamichhane J. R., You M. P., Laudinot V., Barbetti M. J. and Aubertot J. N. 2020. Revisiting sustainability of fungicide seed treatments for field crops. Plant Disease 104(3): 610-623.

Li Y. and Schellhorn H. E. 2007. Rapid kinetic microassay for catalase activity. Journal of Biomolecular Techniques: JBT 18(4): 185.

Lichtenthaler H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in enzymology Enzymology 148: 350-382.

Markakis E. A., Tjamos S. E., Antoniou P. P., Roussos P. A., Paplomatas E. J. and Tjamos E. C. 2010. Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. Plant Disease 94(9): 1156-1162.

Martínez-Aguilar K., Ramírez-Carrasco G., Hernández-Chávez J. L., Barraza A. and Alvarez-Venegas R. 2016. Use of BABA and INA as activators of a primed state in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Frontiers in Plant Science: 7, 653.

Martins S. A., Schurt D. A., Seabra S. S., Martins S. J., Ramalho M. A. P., de Souza Moreira F. M. and de Medeiros F. H. V. 2018. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth promotion and biocontrol by rhizobacteria under *Rhizoctonia solani* suppressive and conducive soils. Applied Soil Ecology 127: 129-135.

Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S. I., and Lee Y. C. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. Analytical Biochemistry 339(1): 69-72.

Mayo S., Gutierrez S., Malmierca M.G., Lorenzana A., Campelo M.P., Hermosa R., Casquero P.A. 2015. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. Frontiers in Plant Science 6: 685.

Nasir Hussein A., Abbasi S., Sharifi R. and Jamali S. 2018. The effect of biocontrol agents consortia against Rhizoctonia root rot of common bean *Phaseolus vulgaris*. Journal of Crop Protection 7(1): 73-85.

Prasannath K. 2017. Plant defense-related enzymes against pathogens: a review. Journal of Agricultural Sciences 11 (1): 38-48

Sahebani N. and Hadavi N. 2009. Induction of $H_2O_2$ and related enzymes in tomato roots infected with root knot nematode (*M. javanica*) by several chemical and microbial elicitors. Biocontrol Science and Technology 19(3): 301-313.

Siguemoto E. S. and Gut J. A. W. 2017. Validation of spectrophotometric microplate methods for polyphenol oxidase and peroxidase activities analysis in fruits and vegetables. Food Science and Technology 37: 148-153.

Sulman M., Fox G., Osman A., Inkerman A., Williams P. and Michalowitz M. 2001, September. Relationship between total peroxidase activity and susceptibility to black point in mature grain of some barley cultivars. In Proceeding of the 10th Australian barley technical symposium pp. 16-20.

Ton J., Ent S., van Hulten M. H. A., Pozo M., Oosten V. V., Van Loon L. C. and Pieterse C. M. 2009. Priming as a mechanism behind induced resistance against pathogens, insects and abiotic stress. IOBC/wprs Bulletin 44: 3-13.

Valentín Torres S., Vargas M. M., Godoy-Lutz G., Porch T. G. and Beaver J. S. 2016. Isolates of *Rhizoctonia solani* can produce both web blight and root rot symptoms in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Disease 100(7): 1351-1357.

van Hulten M., Pelser M., Van Loon L. C., Pieterse C. M. and Ton J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in

Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(14): 5602-5607.
Warren C. R. 2008. Rapid measurement of chlorophylls with a microplate reader. Journal of Plant Nutrition 31(7): 1321-1332.
Westman S. M., Kloth K. J., Hanson J., Ohlsson A. B. and Albrectsen B. R. 2019. Defence priming in Arabidopsis–a meta-analysis. Scientific Reports 9(1): 13309.
Xie J. H., Chai T. T., Xu R., Liu D., Yang Y. X., Deng Z. C. and He H. 2017. Induction of defense-related enzymes in patchouli inoculated with virulent *Ralstonia solanacearum*. Electronic Journal of Biotechnology 27: 63-69.
Yao K., De Luca V. and Brisson N. 1995. Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. The Plant Cell 7(11): 1787-1799.