

ارزیابی تأثیر قارچ بذرزاد *Alternaria brassicicola* روی میزان تولید و بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوستنز تیمول و کارواکرول در *Thymus vulgaris* L.

نیما خالدی^{۱*} و فرشید حسینی^۲

۱- نویسنده مسئول، استادیار، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

پست الکترونیک: n_khaledi@areeo.ac.ir

۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۰

چکیده

گیاه دارویی آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) سرشار از مونوترین‌های فنولی از جمله ترکیب‌های تیمول و کارواکرول است. قارچ‌های بذرزاد می‌توانند با تأثیر روی سلامت بذر، منجر به کاهش کمیت و کیفیت محصول و همچنین تغییر در میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان شوند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی قارچ‌های بذرزاد از نمونه‌های بذری آویشن باغی و ارزیابی تأثیر آلودگی بذرها روی میزان تولید و بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوستنز تیمول و کارواکرول است. برای شناسایی قارچ‌های بذرزاد از نمونه‌های بذری آویشن باغی جمع‌آوری شده از مزارع استان البرز، نمونه‌برداری بر اساس ضوابط انجمن بین‌المللی آزمون بذر صورت گرفت. میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا اندازه‌گیری و بررسی بیان ژن‌های *DXR*، *TvTPS1*، *CYP178* و *CYP180* با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با رونویسی معکوس انجام شد. براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شش جدایه *Alternaria brassicicola* شناسایی شدند. تجزیه و تحلیل فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی نشان داد که سلولاز و پکتیناز در مقایسه با زایلاناز و کیتیناز اهمیت بیشتری روی میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌ها دارند. آلودگی بذر به قارچ *A. brassicicola* به‌طور قابل توجهی روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی بذر تأثیرگذار بود. یافته‌های این پژوهش نشان داد که میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجمی جدایه‌های قارچی *A. brassicicola* از طریق سازوکارهای مختلفی از جمله تولید آنزیم‌های خارج سلولی می‌تواند در گیاهچه‌های حاصل از پیش‌تیمارهای بذری با جدایه‌های مختلف باعث تغییر در سطح بیان ژن‌های مختلف رمزکننده ترکیب‌های تیمول و کارواکرول و در نتیجه موجب افزایش (جدایه‌های Ab4 و Ab5) و یا کاهش (جدایه‌های Ab1، Ab6، Ab2 و Ab3) میزان تولید و انباشت مونوترین‌های فنولی در گیاهچه‌های آویشن باغی شود. این اولین گزارش در مورد شناسایی قارچ بذرزاد *A. brassicicola* از نمونه‌های بذری آویشن باغی در ایران و نقش آلودگی بذرها روی میزان تولید و بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوستنز تیمول و کارواکرول است.

واژه‌های کلیدی: آویشن، بذرزاد، بیماری‌زایی، سلامت بذر، مونوترین‌های فنولی.

مقدمه

آویشن باغی با نام علمی *Thymus vulgaris* L. گیاهی دارویی و چندساله از تیره نعناعیان (Lamiaceae) و بومی نواحی شرقی مدیترانه است (Lebaschi et al., 2018). اسانس آویشن باغی سرشار از متابولیت‌های ثانویه از جمله تیمول، گاما-ترینن، پارا-سیمن، کارواکرول و لینانول بوده و به دلیل خواص ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی دارای ارزش اقتصادی زیادی می‌باشند (Pavela et al., 2018). متابولیت‌های ثانویه آویشن از گروه ترینوئیدها (ترین‌ها) هستند که از ترکیب‌های پنج کربنه‌ای به نام ایزوپرن تشکیل شده‌اند. به‌طورکلی، در گیاهان ترینوئیدها از دو مسیر بیوسنتزی مستقل که مسئول تولید ایزوپنتیل دی فسفات می‌باشند و شامل مسیر ۲-C-متیل-D-اریتریتول ۴- فسفات در پلاستیدها برای تولید مونوترپن‌ها، دی‌ترین‌ها و تترترین‌ها و مسیر موالونیک اسید در سیتوسول برای تولید سزکوئی‌ترین‌ها، تری‌ترین و پلی‌ترین‌ها هستند، تولید می‌شوند (Aharoni et al., 2006). ترینوئیدها در گیاهان نقش‌های مهمی در فرایندهای ساختاری، عملکردی و اکولوژیک دارند (Malmierca et al., 2015؛ Leeder et al., 2011). مونوترپن‌ها ترکیب‌هایی بی‌رنگ، چربی‌دوست و فرار هستند که در برهم‌کنش گیاه با سایر میکروارگانیسم‌ها و جذب عوامل گرده‌افشان و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی نقش داشته و می‌توانند موجب محافظت گیاهان در مقابل گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زا شوند (Maroufi et al., 2017). در گیاهان نوع متابولیت‌های ثانویه تولیدی تحت کنترل عوامل ژنتیکی است اما میزان تولید و عملکرد آنها متأثر از عوامل محیطی از جمله آب، دما، کیفیت خاک، طول روز، شدت و طول موج نور قرار دارد (Novak et al., 2010؛ Maffei & Scannerini, 2011).

تیمول و کارواکرول از اجزای اصلی متابولیت‌های ثانویه تیره نعناعیان به‌ویژه آویشن باغی هستند و از طریق مسیر ۲-C-متیل-D-اریتریتول ۴- فسفات در پلاستیدها تولید می‌شوند (Mondak et al., 2020). این ترکیب‌ها در گروه مونوترپن فنولی قرار می‌گیرند و از نظر ساختار شیمیایی به‌صورت ۵-ایزوپروپیل-۲-متیل فنول بوده و دارای سه گروه

متیل، یک حلقه بنزن و یک گروه هیدروکسیل با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}O$ هستند که بسیار به هم شبیه‌اند و فقط جایگاه گروه هیدروکسیل در آنها متفاوت است (Kaeidi et al., 2020). همبستگی بسیار بالایی بین میزان ژن‌های سنتزکننده مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترین‌ها با میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول در متابولیت‌های ثانویه گیاهان وجود دارد (Morshedloo et al., 2017). تیمول و کارواکرول دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت‌های ضد قارچی و باکتریایی هستند (Ramak et al., 2013). این ترکیب‌ها از طریق تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی و ریخت‌شناسی قارچ‌ها، اکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌ها و تجزیه دیواره سلولی موجب اختلال در عملکرد سلول و فعالیت‌های حیاتی می‌شوند (Ramak et al., 2015؛ Höferl et al., 2009؛ Soyly et al., 2007). ترکیب‌های ترینوئیدی به‌ویژه تیمول و کارواکرول موجب مهار رشد میسلیمی قارچ‌های *Fusarium* و *Alternaria* spp. می‌شوند (Shcherbakova et al., 2021؛ Saghrouchni et al., 2021).

بذر به‌عنوان یکی از مهمترین نهاده‌ها در کشاورزی پایدار بوده و نقش مهمی در انتقال صفات ژنتیکی و دستیابی به قابلیت واقعی عملکرد کمی و کیفی ژنوتیپ گیاهی دارد. بیماری سوختگی و لکه‌برگی آلترناریایی با عامل *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire یکی از مهمترین بیماری‌های قارچی آویشن و گیاهان تیره شب‌بو به‌ویژه کلم به‌صورت بذرزاد است که موجب کاهش جوانه‌زنی، نکروز بذر، پژمردگی و سوختگی گیاهچه می‌شود (Nowakowska et al., 2019؛ Khare et al., 2014). قارچ *Alternaria* spp. ساختاری تخصصی برای نفوذ در سلول‌های گیاهی ندارد، اما به‌طور مستقیم توسط ساختار ویژه هیف آپرسوریوم در دیواره سلول‌های اپیدرمی و یا از طریق منافذ طبیعی یا زخم‌ها در میزبان نفوذ می‌کند (Boedo et al., 2007). عوامل بیماری‌زایی گیاهی برای غلبه بر دیواره سلولی به‌عنوان اولین لایه دفاعی فیزیکی در گیاهان میزبان تکامل یافته‌اند و از طریق تولید و ترشح آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی به‌عنوان اصلی‌ترین

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه برداری در طی سال زراعی ۱۳۹۹ پس از رسیدگی کامل بذرها و برداشت از سه نمونه بذری آویشن در استان البرز (شهرستان کرج) براساس دستورالعمل انجمن بین‌المللی آزمون بذر انجام شد و همراه ثبت مشخصات در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه سلامت بذر مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل گردید.

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی

برای جداسازی جدایه‌های قارچی، پس از ضدعفونی بذرها با محلول رقیق شده هیپوکلریت سدیم (حاوی ۱٪ کلر فعال) به مدت یک دقیقه غوطه‌ور و در نهایت سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از خشک شدن بذرها روی کاغذ صافی سترون، بذرها در سطح تشتک‌های پتری (به قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت عمومی سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت و در اتاقک رشد با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بدین ترتیب جدایه‌ها جداسازی شدند. جدایه‌های قارچی با استفاده از روش نوک ریشه و تک اسپور کردن روی محیط کشت آب آگار ۲٪ خالص‌سازی شدند (Simmons, 2007).

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌ها

برای شناسایی ریخت‌شناختی، جدایه‌های خالص‌سازی شده به تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی هویج آگار منتقل و در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت نور فلورسنت با دوره نوری متناوب ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی نگهداری و پس از هفت روز بررسی شدند. شناسایی جدایه‌ها براساس خصوصیات ریخت‌شناختی، میکروسکوپی و کلید شناسایی معتبر انجام شد (Simmons, 2007). برای تأیید گونه شناسایی شده براساس مشخصات ریخت‌شناختی از آغازگر اختصاصی گونه *A. brassicicola* (Forward: 5')

فاکتورهای بیماری‌زایی قادر به نفوذ، توسعه و ایجاد آلودگی در بافت گیاهی می‌باشند (Taheri, 2019; Underwood, 2012; Cho et al., 2009). میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌های مختلف *Alternaria* spp. متفاوت است (Ramezani et al., 2019; Khaledi et al., 2021; Sharma et al., 2013). قدرت تهاجم، عاملی مهمی در سازگاری عوامل بیماری‌زا است که نشان‌دهنده توانایی احتمالی آنها در ظهور علائم بیماری روی میزبان در کوتاه‌ترین زمان ممکن و ایجاد همه‌گیری بیماری است (Sacristan & García-Arenal, 2008). مطالعات انجام شده در مورد قارچ‌های *A. burnsii*، *A. alternata* و *A. tenuissima* نشان داد که رابطه مستقیمی بین آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و میزان بیماری‌زایی این قارچ‌ها وجود دارد (Taheri, 2019; Khaledi et al., 2021). کاهش تولید و فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی حاصل از بیمارگرها با کاهش قدرت تهاجم و بیماری‌زایی آنها ارتباط مستقیمی دارد (Voigt et al.; Noda et al., 2010; al., 2005). سنجش و ارزیابی آنزیم‌های خارج سلولی ترشح شده توسط بیمارگرها می‌تواند به‌عنوان روش مفیدی برای ارزیابی توان بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گیرد (Gibson et al., 2011; Khaledi et al., 2017).

با وجود اهمیت اقتصادی آویشن، اطلاعات ما در مورد بیماری‌های ناشی از قارچ‌های بذرزاد این گیاه در ایران بسیار محدود است و تاکنون مطالعه‌ای در مورد تأثیر آنها بر روی متابولیت‌های ثانویه و بیان ژن‌های آویشن باغی انجام نشده است. هدف از این پژوهش، الف) شناسایی قارچ‌های بذرزاد در نمونه‌های بذری آویشن، ب) ارزیابی تأثیر آنها روی میزان تغییر بیان برخی ژن‌های دخیل در مسیر پلاستییدی تولید تیمول و کارواکرول و ج) همچنین ارزیابی ارتباط بین میزان بیماری‌زایی، قدرت تهاجم و فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح شده توسط جدایه‌های قارچی با میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در آویشن باغی می‌باشد.

روش تیمار بذرها

برای تیمار بذرها با جدایه‌های قارچی شناسایی شده از روش شرح داده شده توسط Koch و همکاران (۲۰۲۰) استفاده شد. برای این منظور بذرها قبل از تیمار توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی شده و بعد با آب مقطر استریل سه بار شستشو شدند. سوسپانسیون اسپور جدایه‌های قارچ *A. brassicicola* در غلظت 1×10^5 اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از روش سری رقت سریالی با آب مقطر استریل تهیه شد. برای بهتر چسبیدن اسپورهای قارچ به سطح بذرها مقدار ۱٪ کربوکسی متیل سلولوز به عنوان چسباننده به سوسپانسیون اسپور قارچ اضافه شد و در نهایت از سوسپانسیون مذکور به نسبت ۵۰ میلی‌لیتر در هر ۱۰۰ عدد بذر مخلوط شده و در داخل ارلن و روی شیکر با سرعت ۱۲۸ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس بذره‌های تیمار شده روی کاغذهای سترون قرار گرفتند و در زیر هود لامینار فلو خشک شدند. برای ارزیابی میزان آغشتگی اسپورها به بذرها با قرار دادن تصادفی ۵ عدد بذر تیمار شده از هر جدایه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی توپین ۲۰ و بعد با استفاده از روش سری رقت سریالی و شمارش روی لام هموسیتمتر به‌طور متوسط میزان اسپور روی سطح بذر محاسبه شد. برای اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی اسپورهای قارچ روی سطح بذر، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون را برداشته و روی محیط کشت آب-آگار در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از ۲۴ ساعت تعداد اسپورهای جوانه زده شمارش شدند (Harman *et al.*, 2008).

سنجش میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول

پس از گذشت حدود ۸ هفته در مرحله ۱۲ تا ۱۴ برگی، اندام هوایی گیاهچه‌های آویشن حاصل از بذر تیمارهای مختلف جداسازی، پس از شستشو و خشک کردن در سایه و دمای اتاق، با استفاده از آسیاب خرد شد. برای استخراج ترکیب‌های تیمول و کارواکرول از روش شرح داده شده توسط Ghaedi و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد. برای این منظور به ۱۰ گرم از پودر گیاهی

3' ACC TCA GCA GCA TCT GCT GTT G و Reverse: 5' GGC TTT ATG GAT GCT GAC (CTT G 3' استفاده شد (Singh *et al.*, 2014). اختصاصی بودن آغازگر به وسیله انجام تجزیه و تحلیل BLAST در NCBI مورد تأیید قرار گرفت. برای استخراج DNA از جدایه‌های قارچ از کیت DNA isolation kit ساخت شرکت Pishgam Biotech ایران با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استفاده و ردیابی باندهای DNA با استفاده از رنگ‌آمیزی با فلورسنت سایبرگرین (SYBR® Green) و بعد عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه Gel Documentation Syngene Gene Flash Bio مدل (USA) انجام شد. هر آزمایش شامل کنترل مثبت (DNA یک جدایه شناخته‌شده) و کنترل‌های منفی (یک واکنش PCR بدون DNA) بود.

ارزیابی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه

آزمون جوانه‌زنی استاندارد براساس دستورالعمل انجمن بین‌المللی آزمون بذر (International Seed Testing Association; ISTA) انجام شد. برای این منظور تعداد ۴۰۰ بذر (چهار تکرار با ۱۰۰ عدد بذر) از نمونه‌های بذری به‌صورت تصادفی انتخاب و روی کاغذ صافی واتمن در داخل پتری دیش قرار داده شده و به اتاقک رشد با رطوبت نسبی ۹۰٪ و در تناوب دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی منتقل شدند (Nasiri *et al.*, 2016). پس از ۱۵ روز، میانگین درصد جوانه‌زنی (خروج ریشه‌چه حداقل دو میلی‌متر یا بیشتر به‌عنوان معیار جوانه‌زنی)، میانگین درصد گیاهچه‌های عادی و غیرعادی (تغییر شکل یافته و بیمار)، میانگین ارتفاع ساقچه‌چه و ریشه‌چه، میانگین وزن تر و وزن خشک (با قرار دادن در آون به مدت ۴۸ ساعت در ۷۵ درجه سانتی‌گراد) و همچنین شاخص طولی و وزنی بنیه اندازه‌گیری شد.

= درصد شاخص بیماری

$$\frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5}{5N} \times 100$$

n_0 : تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۰ آلودگی، n_1 : تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۱ آلودگی، n_2 : تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۲ آلودگی؛ n_3 : تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۳ آلودگی؛ n_4 : تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۴ آلودگی؛ n_5 : تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۵ آلودگی؛
N: تعداد کل گیاهچه‌ها

همچنین میزان قدرت تهاجم جدایه‌های قارچی روی گیاهچه با استفاده از روش شرح داده‌شده توسط Taheri (۲۰۱۹) بررسی شد. میزان قدرت تهاجم جدایه‌ها براساس مدت زمان ظهور علائم بیماری پس از ظهور گیاهچه‌ها تعیین شد. هر تیمار دارای چهار تکرار در هر بار انجام آزمایش بود و آزمایش دو بار تکرار شد.

روش سنجش فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده توسط جدایه‌ها

برای استخراج آنزیم‌های سلولاز، زایلاناز، پکتیناز و کیتیناز توسط جدایه‌های قارچی به ترتیب از محیط کشت‌های مایع حاوی کربوکسی متیل سلولز، زایلان جو دوسر، پکتین پرتقال و کیتین کلونیدی (Khaledi et al., 2017; Ulhoa & Peberdy, 1992) استفاده و میزان فعالیت آنزیم‌ها به ترتیب در طول موج‌های ۵۵۰، ۵۴۰، ۵۴۰ و ۵۴۴ نانومتر بررسی شد. شاهد منفی شامل محیط کشت مایع بدون ترکیب‌های ذکر شده به همراه هر یک از جدایه‌های قارچی بود. میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی، ۲۴ ساعت پس از تلقیح ارزیابی شد. میزان فعالیت آنزیم سلولاز براساس جذب در غلظت‌های مختلف گلوکز با معرف اسید دی‌نیترو سالیسیلیک اندازه‌گیری شد و یک واحد

۱۰۰ میلی‌لیتر متانول اضافه و به مدت ۲ ساعت توسط دستگاه اولتراسونیک عصاره‌گیری شد. برای تفکیک و شناسایی میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل Knauer آلمان مجهز به دتکتور UV-Vis Spectrophotometer با ستون C_{18} (Nucleosil 100) دارای اندازه ذرات ۵ میکرومتر، طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ۴ میلی‌متر استفاده شد. فاز متحرک مورد استفاده شامل آب و استونیتریل و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با طول موج ۲۸۰ نانومتر بود. ترکیب‌های تیمول (CAS Number: 89-83-9) و کارواکرول (CAS Number: 499-75-2) از شرکت سیگما آلدریج خریداری و برای تهیه منحنی‌های استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند. سپس با استفاده از رابطه خطی منحنی استاندارد میزان هر یک از این ترکیب‌ها تعیین شد. درصد تیمول و کارواکرول در عصاره بر حسب وزن عصاره در یک گرم ماده خشک به صورت میلی‌گرم بر گرم ماده خشک محاسبه گردید.

آزمون‌های بیماری‌زایی و سنجش قدرت تهاجم جدایه‌ها

بستر کشت مورد استفاده در این آزمایش، ترکیبی از بیت‌ماس، پرلیت و کوکویت با نسبت حجمی ۲:۱:۲ بود. برای ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها، نمونه بذر آویشن که فاقد هر گونه آلودگی طبیعی بود از مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تهیه شد. سپس در هر گلدان پلاستیکی (قطر ۱۵ سانتی‌متر) ۱۰ عدد بذر تیمار شده از هر تیمار کشت و در شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از ظهور علائم آلودگی، شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی گیاهچه، براساس نسبت میزان لکه‌برگی با استفاده از مقیاس ۰-۵ (= بدون علائم لکه‌برگی، ۱ = کمتر از ۱۰٪، ۲ = بین ۱۱٪ تا ۲۵٪، ۳ = بین ۲۶٪ تا ۵۰٪، ۴ = بین ۵۱٪ تا ۷۵٪، ۵ = بیش از ۷۶٪ علائم لکه‌برگی) درجه‌بندی شد (Nowakowska et al., 2019) و شاخص بیماری‌زایی با فرمول زیر محاسبه شد.

قرار داده شدند. پس از انتقال تیوپ‌ها به روی یخ، ۴ میکرولیتر آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase (Cinnagen, Iran)، ۲ میکرولیتر بافر رونوشت RT (5X)، ۱ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر مهارکننده RNase و در نهایت آب دیونیزه استریل (RNase free) تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به تیوپ‌ها اضافه شد. واکنش ساخت cDNA به مدت ۸۰ دقیقه در دمای ۴۲°C در ترموسایکلر انجام شد. در پایان واکنش برای حذف اثر آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase و حذف آلودگی‌های اضافی RNA به ترتیب تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفته و بعد ۱ میکرولیتر آنزیم RNase A افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷°C نگهداری شدند. از آغازگرهای اختصاصی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول در آویشن باغی استفاده شد (Majdi *et al.*, 2017). واکنش تکثیر این ژن‌ها شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴°C، سپس ۴۰ چرخه در مرحله واسرشت ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، مرحله اتصال ۳۰ ثانیه در دماهای مختلف (جدول ۱) و مرحله گسترش ۴۵ ثانیه در ۷۲°C و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. برای بررسی میزان بیان ژن‌ها در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد، مقدار مساوی از محصول PCR هر یک از ژن‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ به صورت جداگانه بارگذاری شد. مقایسه بیان ژن‌ها از روش نیمه کمی RT-PCR و از روی شدت باندها، پس از نرمال کردن با ژن اکتین با استفاده از نرم‌افزار Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) و تبدیل به داده‌های کمی و عددی ارزیابی گردید. باندهای حاصل از ژن‌های مورد نظر و اکتین با استفاده از میزان Gray value در امتیازدهی شدند. تمامی لکه‌ها براساس میزان Gray value در باند ژن اکتین توسط نرم‌افزار استاندارد شد. به این صورت که نسبت میزان Gray value موجود در باند هر یک از ژن‌های مورد نظر به میزان Gray value موجود در باند اکتین بدست آمد و نمودار اعداد حاصل در نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 رسم گردید.

از فعالیت سلولاز به عنوان مقدار آنزیمی که ۰/۱ میکرومول گلوکز را در هر دقیقه طی واکنش هیدرولیز تولید می‌کند، تعیین شد. یک واحد از فعالیت زایلاناز به صورت مقدار آنزیمی که یک میکرومول زایلوز را در هر دقیقه تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد آزاد می‌کند، اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت پکتیناز براساس میزان کاهش اسید D-گالاکترونیك با استفاده از روش رنگ‌سنجی اسید دی‌نیتروسالیسیلیک اندازه‌گیری شده و یک واحد از فعالیت پکتیناز به عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرومول اسید گالاکترونیك را در هر دقیقه از پکتین‌های دیواره آزاد می‌کند، در نظر گرفته شد. همچنین یک واحد از فعالیت کیتیناز به عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرومول ان-استیل گلوکزآمین را در هر ساعت آزاد می‌کند، اندازه‌گیری شد (Zhao *et al.*, Ortega *et al.*, 2013؛ Ulhoa & Peberdy, 1992؛ 2013). آزمایش برای هر آنزیم چهار تکرار داشت و آزمایش دو بار تکرار شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با رونویسی معکوس

استخراج RNA از بافت اندام هوایی گیاهچه‌های آویشن در مرحله ۴ برگی پس از گذشت ۶ هفته با استفاده از معرف تریزول (TRI Reagent®, Aldrich) براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. غلظت و سلامت RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراب اسپکتروفوتومتری (NanoDrop 2000; Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA) و بارگیری بر روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. مقادیر مختلف RNA پس از اندازه‌گیری، همگی به غلظت ۱۱۰ نانوگرم در میکرولیتر با افزودن مقادیر مناسب آب تیمار شده با DEPC یکسان‌سازی شدند. پس از همسان‌سازی غلظت RNAهای مختلف، برای ساخت cDNA ابتدا ۱۰ میکرولیتر از RNA استخراج شده هر تیمار را جداگانه با ۱ میکرولیتر پرایمر عمومی oligo(dT)₁₈ به تیوپ‌های ۰/۲ اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در سنجش بیان ژنهای دخیل در مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول

Table 1. Primers sequences used to measure the expression of genes involved in the thymol and carvacrol biosynthesis pathway

Gene	Forward primer sequences (5'→3')	Reverse primer sequences (5'→3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>TvTPS1</i> (Gamaterpenin)	AGGATCCAAAGGCTAGAGGC	CACGTCCCCTCTCTCAGC	733	50
<i>DXR</i> (Methyl erythritol phosphate)	GCCTTTTGTCTTCCTCTTGC	TCCGCTCGATGCTTGTCGC	689	56
<i>CYP178</i> (Thymol)	TGGCCTTTGGAAGCGTCG	TCAGGCTCATTCCAATAGAGG	674	58
<i>CYP180</i> (Carvacrol)	GGTAAACTGGCGGACTTGGT	CGAACGGGATTAAGTAACTCGAAA	699	60
<i>Actin</i> (Reference gene)	AGCAACTGGGATGATATGGAG	CTGGGGTTAAGAGGAGCC	111	55

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف پس از نرمال‌سازی داده‌ها با تبدیل لگاریتمی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.2) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ ارزیابی گردید. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 استفاده شد.

نتایج

براساس مشاهدات ریخت‌شناسی در مجموع شش جدایه از نمونه‌های بذری آویشن در استان البرز جداسازی شدند که متعلق به جنس *Alternaria* بودند. سپس این جدایه‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی به ترتیب با استفاده از کلیدهای شناسایی و آغازگرهای

اختصاصی شناسایی شدند. تشخیص گونه براساس ویژگی‌های کلیدی ذکر شده توسط Simmons (۲۰۰۷) انجام شد. پرگنه‌های قارچ به رنگ قهوه‌ای تیره مایل به سیاه هستند. کنیدیوم‌ها به رنگ قهوه‌ای تیره و دارای سطح صاف، استوانه‌ای شکل، دارای ۳ تا ۷ بند عرضی و حداکثر ۲ بند طولی، فاقد نوک و به ابعاد ۱۰-۱۳ × ۳۰-۳۸ میکرومتر بودند. کنیدیوم به رنگ قهوه‌ای زیتونی، زنجیره‌ای ساده و یا منشعب و به ابعاد ۴-۶ × ۲۰-۶۰ میکرومتر تشکیل شده بودند. براساس بررسی‌های ریخت‌شناسی شش جدایه جداسازی شده متعلق به *A. brassicicola* بودند که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به روش مولکولی تأیید شدند (شکل ۱). این گونه برای اولین بار به‌عنوان قارچ بذرزاد آویشن در ایران جداسازی و گزارش می‌شود.



شکل ۱- ویژگی‌های ریخت‌شناختی کنیدیوم‌ها (a و b) و شناسایی مولکولی (c) جدایه‌های قارچ *Alternaria brassicicola* از نمونه‌های بذری آویشن (*Thymus vulgaris* L.) (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر)

Figure 1. Morphological characteristics of conidia (a, b) and molecular identification (c) of *Alternaria brassicicola* fungal isolates from thyme (*Thymus vulgaris* L.) seed samples (Scale bars= 20 μ m)

حاصل از آزمون استاندارد جوانه‌زنی نشان داد که شاخص بنیه گیاهچه از جمله شاخص طولی بنیه از ۱۸۷/۵۲ تا ۳۴۲/۵۶ و شاخص وزنی بنیه از ۰/۹۵ تا ۲/۵۱ متغیر بود (جدول ۲). در میان نمونه‌های بذری مختلف مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه مورد ارزیابی مشاهده شد. میانگین طول ساقه‌چه از ۱۰/۷ تا ۱۶/۳ سانتی‌متر و طول ریشه‌چه از ۱۴/۹ تا ۱۹/۲ سانتی‌متر متغیر بود. همچنین وزن تر گیاهچه از ۰/۱۸۷ تا ۰/۲۵۷ گرم و وزن خشک از ۰/۰۲۶ تا ۰/۰۱۳ گرم متغیر بود (جدول ۲).

در این پژوهش هیچگونه آلودگی قارچی در نمونه بذری کرج (۲) مشاهده نشد. از نظر فراوانی جدایه‌های قارچی جداسازی شده از نمونه‌های بذری مورد بررسی، در نمونه بذری کرج (۱) و کرج (۳) به ترتیب ۲ و ۴ جدایه قارچی *A. brassicicola* جداسازی و شناسایی شد. نتایج درصد جوانه‌زنی نمونه‌های بذری آویشن کرج در آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذرها در نمونه‌ها از ۷۳/۲۵ تا ۹۶/۵۰٪ متغیر بود (جدول ۲). میانگین درصد گیاهچه‌های غیرعادی تغییر شکل داده و بیمار در نمونه‌ها به ترتیب کمتر از ۱/۷۵٪ و ۱/۰۰٪ شد. گیاهچه‌های غیرعادی فقط در نمونه بذری کرج (۲) مشاهده شد. نتایج

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی در نمونه‌های بذری آویشن (*Thymus vulgaris* L.)

Table 2. Means comparison of vigor and germination indices in thyme (*Thymus vulgaris* L.) seed samples

Seed samples	GP (%)	DS (%)	SD (%)	SL (mm)	RL (mm)	FW (g)	DW (g)	SLVI	SWVI
Karaj (1)	86.50 b*	0.75 b	0.50 ab	148 b	183 b	0.221 b	0.021 b	286.31 b	1.82 b
Karaj (2)	96.50 a	0 c	0 b	163 a	192 a	0.257 a	0.026 a	342.56 a	2.51 a
Karaj (3)	73.25 c	1.75 a	1.00 a	107 c	149 c	0.187 c	0.013 c	187.52 c	0.95 c
LSD (0.05)	1.75	0.65	0.92	5.89	4.94	0.003	0.002	8.37	0.15

Abbreviations- GP: germination percentage, DS: percentage of deformed seedlings, SD: percentage of diseased seedlings, SL: plumule length, RL: radicle length, FW: seedling fresh weight, DW: seedling dry weight, SLVI: seedling longitudinal vigor index, and SWVI: seedling weight vigor index.

*In each column, different letters indicate significant differences according to the least significant difference (LSD) test at 5% probability level.

میزان قدرت تهاجم مربوط به جدایه Ab1 بود که اولین علائم بیماری را ۸۴ ساعت پس از ظهور گیاهچه‌ها به صورت لکه‌های کوچک نکروزی روی برگ و ساقه ظاهر کردند. همچنین کمترین قدرت تهاجم مربوط به جدایه Ab4 است که علائم بیماری ۱۷۴ ساعت پس از ظهور گیاهچه‌ها مشاهده شد (جدول ۳). بررسی فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی ترشح شده توسط جدایه‌های آنزیم‌های سلولاز، زایلاناز، پکتیناز و کیتیناز به‌عنوان اصلی‌ترین آنزیم‌های هیدرولیزکننده دیواره سلولی بودند. به‌طور متوسط حداکثر سطح فعالیت سلولاز، زایلاناز، پکتیناز و کیتیناز در بسیاری از جدایه‌های مورد بررسی

مقایسه داده‌های بدست آمده از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *A. brassicicola* روی گیاهچه در جدول ۳ ارائه شده است. تمامی جدایه‌های *A. brassicicola* شناسایی شده قادر به بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های آویشن بودند. آزمون بیماری‌زایی نشان داد که شاخص بیماری برای جدایه‌ها از $0.9 \pm 12.7\%$ تا $1.3 \pm 62.7\%$ متغیر بود. به‌طوری که بیشترین و کمترین شاخص بیماری‌زایی به ترتیب مربوط به جدایه‌های Ab1 (جداسازی شده از نمونه بذری کرج (۳)) و Ab4 (جداسازی شده از نمونه بذری کرج (۱)) بود. قدرت تهاجم جدایه‌های *A. brassicicola* مورد مطالعه متفاوت بود (جدول ۳). نتایج آزمون قدرت تهاجم روی گیاهچه‌ها نشان داد که بیشترین

بررسی مربوط به جدایه Ab1 است. کمترین میزان فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و زایلاناز ارزیابی شده مربوط به جدایه‌های Ab4 و Ab5 (جداسازی شده از نمونه بذری کرج (۳)) بوده که تفاوت معنی‌داری میان آنها مشاهده نشد. همچنین تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم زایلاناز توسط جدایه‌های Ab2 (جداسازی شده از نمونه بذری کرج (۱)) و Ab3 (جداسازی شده از نمونه بذری کرج (۳)) مشاهده نشد (جدول ۳).

به ترتیب در ۷۲، ۹۶، ۱۴۴ و ۷۲ ساعت پس از کشت در محیط مایع مشاهده شد (جدول ۳). در زمانی که بیشتر جدایه‌ها حداکثر سطح فعالیت آنزیمی را نشان دادند، سطح فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی در میان جدایه‌های *A. brassicicola* برای سلولاز از ۱۴۲ تا $۱۶۹ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ، زایلاناز از ۲۰۶ تا $۲۶۰ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ، پکتیناز از ۲۵۵۵ تا $۳۳۳۲ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ و کیتیناز از ۵/۷ تا $۸/۳ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ دیده شد (جدول ۳). بیشترین فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی مورد

جدول ۳- بیماری‌زایی، قدرت تهاجم و حداکثر فعالیت آنزیم‌های ترشح شده توسط جدایه‌های مختلف *Alternaria brassicicola*

Table 3. Pathogenicity, aggressiveness, and maximum enzymes activity secreted by different isolates of *Alternaria brassicicola*

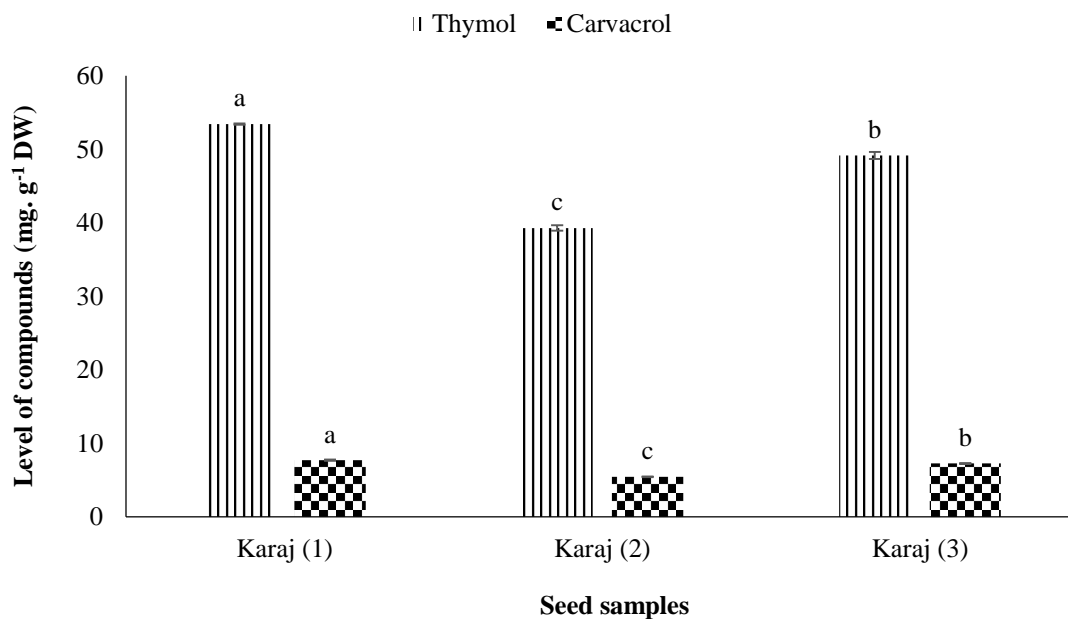
Isolate code	Seed sample	Maximum enzyme activity ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				Disease index (%)	Aggressiveness (hpes)
		Cellulase	Xylanase	Pectinase	Chitinase		
		(72 hpc)	(96 hpc)	(144 hpc)	(72 hpc)		
Ab1	Karaj (3)	169 ± 1.0* a**	260 ± 3.5 a	3332 ± 1.1 a	8.3 ± 0.3 a	62.7 ± 1.3 a	84
Ab2	Karaj (3)	159 ± 1.5 c	223 ± 1.1 c	2790 ± 0.6 c	8.0 ± 0.3 a	35.5 ± 1.2 c	108
Ab3	Karaj (3)	155 ± 0.6 d	219 ± 0.6 c	2708 ± 2.3 d	7.7 ± 0.3 a	24.7 ± 1.2 d	138
Ab4	Karaj (1)	142 ± 1.1 f	206 ± 0.6 d	2555 ± 3.2 f	5.7 ± 0.3 b	12.7 ± 0.9 f	198
Ab5	Karaj (3)	148 ± 2.1 e	208 ± 1.5 d	2579 ± 3.5 e	6.3 ± 0.6 b	18.2 ± 0.9 e	174
Ab6	Karaj (1)	165 ± 0.6 b	250 ± 2.3 b	3025 ± 1.7 b	8.0 ± 0.6 a	50.2 ± 1.3 b	126
LSD (0.05)		3.91	5.9	7.2	1.33	2.98	-

Abbreviations- hpc: hours post inoculation, hpes: hours after emergence of seedlings (incidence of disease symptoms according to time).

*Standard error, **In each column, different letters indicate significant differences according to the least significant difference (LSD) test at 5% probability level (The experiment was repeated two times with similar results).

تولید متابولیت‌های تیمول و کارواکول در گیاهچه‌های حاصل از بذره‌های شاهد (نمونه بذری کرج (۲)) فاقد آلودگی نسبت به گیاهچه‌های حاصل از تیمارهای بذری دارای آلودگی‌های قارچی مشاهده شد. میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکول بدست آمده از نمونه بذری کرج (۲) فاقد هر گونه آلودگی در مقایسه با بقیه نمونه‌های بذری مورد مطالعه دارای آلودگی بیشتر بود (شکل ۲).

نتایج حاصل از مقایسه میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکول از گیاهچه‌های حاصل از نمونه‌های بذری آویشن نشان داد که در میزان تولید متابولیت‌های تیمول و کارواکول تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۲). میزان ترکیب تیمول از ۳۹/۳ تا ۵۳/۴ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک و ترکیب کارواکول از ۵/۴ تا ۷/۷ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک متغیر است. به‌طور کلی، سطح بالاتری از میزان



شکل ۲- میزان تیمول و کارواکرول در گیاهچه‌های حاصل از نمونه‌های بذری آویشن (*Thymus vulgaris* L.) استان البرز

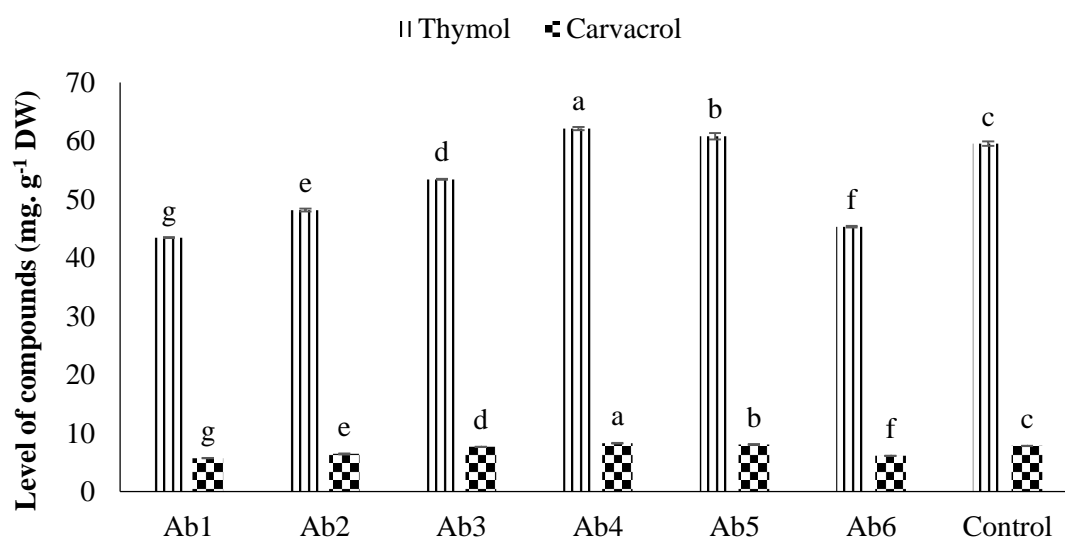
Figure 2. The amount of thymol and carvacrol in seedlings obtained from thyme (*Thymus vulgaris* L.) seed samples of Alborz province

Ab4 به ترتیب ۶۲/۱ و ۸/۳ میلی گرم بر گرم ماده خشک و در گیاهچه‌های حاصل از تیمار بذری با جدایه Ab5 به ترتیب ۶۰/۸ و ۸/۱ میلی گرم بر گرم ماده خشک بود. به طور کلی، میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول در گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمار بذری با جدایه‌های Ab4 و Ab5 در مقایسه با تیمار بذری شاهد فاقد آلودگی و تیمارهای بذری تحت آلودگی با سایر جدایه‌ها بالاتر بود. نتایج نشان داد که میزان ترکیب تیمول در گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمار بذری با جدایه‌های Ab4 و Ab5 در مقایسه با شاهد به ترتیب به میزان ۴/۴٪ و ۲/۱٪ افزایش و میزان ترکیب کارواکرول نیز به ترتیب به میزان ۵/۹٪ و ۳٪ افزایش یافته بود (شکل ۳). در گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمارهای بذری مختلف میزان ترکیب تیمول از ۴۳/۵٪ تا ۶۲/۱٪ و ترکیب کارواکرول از ۵/۷٪ تا ۸/۳٪ متغیر بود. نتایج این پژوهش نشان داد که تفاوت در میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌های *A. brassicicola* از طریق تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده دیواره سلولی

میزان تولید ترکیب‌های تیمول و کارواکرول در گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمارهای بذری آویشن با جدایه‌های قارچ *A. brassicicola* جداسازی شده بررسی شد. میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های حاصل از نمونه شاهد فاقد آلودگی به ترتیب ۵۹/۵ و ۷/۸ میلی گرم بر گرم ماده خشک می‌باشد. البته بین میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمارهای بذری مختلف در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. با توجه به نتایج بدست آمده، سطح بالاتری از میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول در گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمارهای بذری با جدایه‌های Ab4 و Ab5 در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری شد، اما میزان این ترکیب‌ها در گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمار بذری با جدایه‌های Ab3، Ab2، Ab6 و Ab1 در مقایسه با شاهد در سطح پایین‌تری قرار داشت. نتایج نشان داد که میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول در گیاهچه‌های حاصل از تیمار بذری با جدایه

کارواکرو در گیاهچه‌های حاصل از پیش‌تیمار بذری با جدایه Ab1 اندازه‌گیری شده بود و پس از آن به ترتیب در گیاهچه‌های حاصل از تیمار بذری با جدایه‌های Ab6، Ab2 و Ab3 بودند. میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرو در گیاهچه‌های حاصل از بذره‌های تیمار شده با جدایه Ab1 در مقایسه با شاهد فاقد آلودگی به ترتیب به میزان ۲۷٪ و ۲۶/۸٪ کمتر بود (شکل ۳). نتایج نشان داد که اعمال پیش‌تیمارهای بذر با جدایه‌ای مختلف قارچ *A. brassicicola* موجب تغییر در میزان تولید ترکیب‌های تیمول و کارواکرو در مقایسه با تیمار شاهد می‌شود (شکل ۳).

موجب تفاوت در میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرو در گیاهچه‌های بذره‌های تیمار شده با جدایه‌های مختلف می‌شود. از این رو، به نظر می‌رسد نوع و میزان سطح تولید این آنزیم‌ها روی میزان تولید این ترکیب‌ها مؤثر است. بیشترین میزان متابولیت‌های تیمول و کارواکرو در گیاهچه‌های حاصل از بذره‌های تیمار شده با جدایه Ab4 که دارای کمترین میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم بود، مشاهده شد. همچنین کمترین میزان این ترکیب‌ها در گیاهچه‌های حاصل از بذره‌های تیمار شده با جدایه Ab1 که بیشترین میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم را در مقایسه با سایر جدایه‌ها داشتند، اندازه‌گیری شد. در مقایسه با شاهد فاقد آلودگی کمترین میزان متابولیت‌های تیمول و



Seed treatments infected by different isolates of *Alternaria brassicicola*

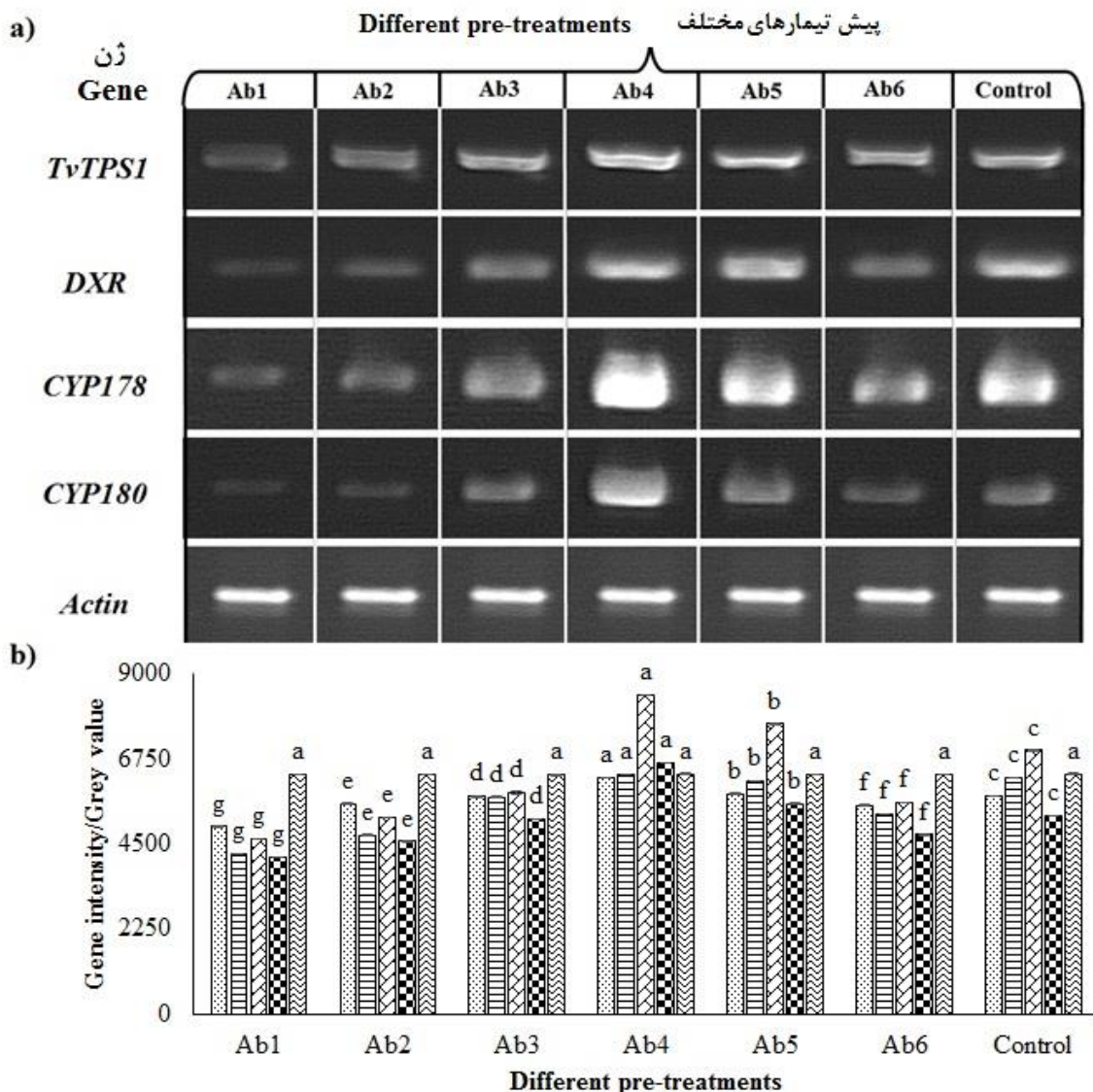
شکل ۳- میزان تیمول و کارواکرو در گیاهچه‌های حاصل از پیش‌تیمارهای بذری آویشن (*Thymus vulgaris* L.) با جدایه‌های مختلف *Alternaria brassicicola*

Figure 3. The amount of thymol and carvacrol in seedlings obtained from thyme (*Thymus vulgaris* L.) seed pre-treatments with different isolates of *Alternaria brassicicola*

Isolates Ab1, Ab2, Ab3, and Ab5 from seed sample of Karaj (3) and isolates Ab4 and Ab6 isolated from seed sample of Karaj (1)

دخیل در مسیر تولید ترکیب‌های تیمول و کارواکرو بین گیاهان تیمارهای مختلف بذری وجود داشت (شکل ۴).

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از کمی‌شدن مشاهدات رونویسی معکوس نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های *CYP178*, *DXR*, *TvTPS1* و *CYP180* به‌عنوان ژن



شکل ۴- بیان ژنهای *TvTPS1* (گاما-ترپینن)، *DXR* (متیل اریتريتول فسفات)، *CYP178* (تیمول)، *CYP180* (کارواکرول) و اکتین در

گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمارهای مختلف بذری آویشن (*Thymus vulgaris L.*) با استفاده از روش RT-PCR (a)

Figure 4. Expression of *TvTPS1* (γ -terpinene), *DXR* (methyl erythritol phosphate), *CYP178* (thymol), *CYP180* (carvacrol), and *actin* genes in seedlings obtained from different seed pre-treatments using RT-PCR method (a) Intensities of the obtained bands (b) was quantified using Image J software.

Isolates Ab1, Ab2, Ab3, and Ab5 from seed sample of Karaj (3) and isolates Ab4 and Ab6 isolated from seed sample of Karaj (1) Columns with different letters indicate significant differences at 5% probability level according to Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney comparison tests.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها نشان داد که تغییر در سطح بیان این ژن‌ها در گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمارهای بذری مختلف در مقایسه با شاهد فاقد آلودگی وجود دارد. با توجه به نتایج، در تیمارهایی که میزان این ترکیب‌ها بالاتر بود، سطح بالاتری از بیان این

نتایج حاصل از بررسی سطح بیان ژن‌های دخیل در مسیر تولید ترکیب‌های تیمول و کارواکرول در گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمارهای بذری آویشن با جدایه‌های قارچ *A. brassicicola* نشان داد که ژن‌های مورد مطالعه در تمامی گیاهچه‌های حاصل از پیش تیمار بذری بیان شده است.

شاخص‌های جوانه‌زنی از جمله درصد جوانه‌زنی، میانگین درصد گیاهچه‌های غیرعادی، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه، وزن تر و خشک گیاهچه وجود دارد. با توجه به آنکه نمونه‌های بذری از نظر ژنتیکی مشابه هستند به نظر می‌رسد تفاوت مشاهده شده در شاخص‌های بنبه و جوانه‌زنی مربوط به آلودگی بذرها به جدایه‌های بذرزاد *A. brassicicola* است که به‌طور قابل توجهی روی شاخص‌های بنبه و جوانه‌زنی بذر تأثیر گذاشته و موجب کاهش سلامت بذرها و گیاهچه‌ها می‌شود. محققان گزارش کردند که شاخص‌های بنبه و جوانه‌زنی با افزایش آلودگی بذرها به قارچ‌های بذرزاد کاهش می‌یابد (Turner et al., 2020) که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. نتایج نشان داد که هرچه میزان فراوانی قارچ‌های بذرزاد بیماری‌زا در نمونه‌های بذری بیشتر باشد تعداد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته و بیمار به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. وجود گیاهچه‌های تغییر شکل یافته و بیمار نشان‌دهنده ضعیف بودن بنبه بذر است. بذرهایی که دارای بنبه قوی‌تری باشند، توانایی بالایی در تحمل تنش‌های زنده و غیر زنده دارند و ضمن داشتن درصد بالایی از جوانه‌زنی، قادرند گیاهچه‌های قوی و عادی تولید کنند. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که با افزایش آلودگی‌های ناشی از قارچ‌های بذرزاد در گیاهان مختلف شاخص‌های بنبه و جوانه‌زنی کاهش می‌یابد (Suthar et al., 2014; Pant, 2011; Hashem et al., 2010) که با مشاهدات ما مطابقت دارد.

نتایج حاصل از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *A. brassicicola* نشان داد که تمامی جدایه‌های جداسازی شده بیماری‌زا بوده و میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم متفاوتی دارند. نتایج این پژوهش مشابه با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان در برهم‌کنش *A. brassicicola* با گیاهان مختلف از جمله خردل هندی (Pramila et al., 2014) و کاملینا (Nowakowska et al., 2019) است. پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی گیاهان شامل سلولز، همی‌سلولز و پکتین هستند (Zhao et al., 2013). قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی برای نفوذ در دیواره سلولی، آنزیم‌هایی را

ژن‌ها مشاهده شد و بعکس. البته سطح بیان ژن اکتین به‌عنوان کنترل داخلی در پیش‌تیمارهای بذری مختلف تفاوت نداشت (شکل ۴). شدت باندها از نظر بصری پس از کمی شدن نشان داد که سطح بیان ژن‌های دخیل در مسیر تولید ترکیب‌های تیمول و کارواکرول در گیاهچه‌های حاصل از پیش‌تیمار بذر با جدایه‌های Ab4 و Ab5 در مقایسه با تیمار بذری شاهد فاقد آلودگی و تیمارهای بذری تحت آلودگی با سایر جدایه‌ها بالاتر بود (شکل ۴). همچنین پیش‌تیمار بذری با جدایه‌های Ab1، Ab2، Ab3 و Ab6 موجب کاهش سطح بیان ژن‌های مورد بررسی (شکل ۴) و میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول (شکل ۳) اندازه‌گیری شده در مقایسه با شاهد فاقد آلودگی می‌شود. نتایج نشان داد که تیمارهای بذر آویشن با جدایه‌های قارچ *A. brassicicola* موجب تغییر در سطح بیان ژن‌ها و میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول در گیاهچه‌ها می‌شوند.

بحث

در این پژوهش، نقش آلودگی بذرها آویشن باغی به قارچ‌های بذرزاد روی میزان تولید و بیان برخی ژن‌های دخیل در مسیر پلاستیدی تولید متابولیت‌های تیمول و کارواکرول بررسی شد. نتایج حاصل از شناسایی نوع و میزان آلودگی نمونه‌های بذری آویشن به قارچ‌های بذرزاد در این پژوهش نشان داد که در مجموع شش جدایه قارچ *A. brassicicola* از توده‌های بذری آویشن در استان البرز براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شدند. این اولین گزارش در مورد شناسایی قارچ *A. brassicicola* به‌عنوان قارچ بذرزاد در نمونه‌های بذری آویشن در ایران است. این مشاهدات با گزارش Ishak و همکاران (۲۰۲۰) در مصر مطابقت دارد. این قارچ به‌عنوان عامل بیماری بذرزاد کلزا در ایران توسط Noorani و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده است.

نتایج آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که در میان نمونه‌های بذری مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در

سبب افزایش بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز ترینوئیدها می‌شوند (Pateraki & Kanellis, 2010). گیاهان میزان تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه ترکیب‌های تریپنی را تحت شرایط تنش افزایش می‌دهند تا بقای خود را تضمین کنند (Rebey et al., 2012; Bettaieb et al., 2009). بنابراین به نظر می‌رسد جلوگیری از اکسیداسیون سلولی علت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تحت شرایط تنش است (Mirzaei et al., 2017).

نتایج حاصل از فیتوشیمی نشان داد که آلودگی بذرها با جدایه‌های مختلف قارچ *A. brassicicola* اثر معنی‌داری روی میزان تولید و بیان ژن‌های مورد مطالعه داشت، به‌طوری که تیمار بذرها با جدایه‌های قارچ با میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجمی کمتر موجب افزایش میزان تولید و بیان ژن‌های مونوترپن‌های فنولی تیمول و کارواکرول در مقایسه با سایر جدایه‌های مورد بررسی می‌شود. با توجه به میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجمی جدایه‌های مختلف قارچ *A. brassicicola* مشاهده شد که میزان ترکیب تیمول در تیمارهای مختلف بذری در مقایسه با شاهد می‌تواند از ۲۷٪ کاهش تا ۴/۴٪ افزایش داشته باشد. این در حالیست که میزان ترکیب کارواکرول می‌تواند از ۲۶/۸٪ کاهش و تا ۵/۹٪ افزایش یابد. نتایج نشان داد که اعمال تیمار با جدایه‌های مختلف قارچ *A. brassicicola* موجب تغییر در میزان تولید هر دو ترکیب مونوترپنی فنولی تیمول و کارواکرول در مقایسه با شاهد می‌شود. به‌طور کلی، تفاوت در میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌های *A. brassicicola* موجب تفاوت سطح القای بیان ژن‌ها و میزان تولید ترکیب‌های تیمول و کارواکرول در گیاهچه‌های حاصل از بذره‌های پیش‌تیمار شده می‌شود. میزان بیان ژن‌های دخیل در مسیر پلاستیدی تولید مونوترپن‌های تیمول و کارواکرول تحت تأثیر محرک‌های مختلف تغییر می‌کند (Majdi et al., 2017). در آویشن باغی اعمال تنش‌های مختلف سبب افزایش میزان تولید و بیان ژن‌های دخیل در تولید تیمول، کارواکرول، گاما-ترپینن و پی‌سیمن می‌شود (Eguchi; Habibi et al., 2017; Mondak et al., 2020).

تولید می‌کنند که توانایی تخریب پلیمرهای دیواره سلولی از جمله سلولز، زایلان و پکتین را دارند. قارچ نکروتروف *A. brassicicola* به آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی از جمله پکتیناز، سلولاز و زایلاناز در زمان مراحل نفوذ و گسترش در میزبان نیاز دارد، زیرا فاقد ساختارهای نفوذ تخصصی هستند (Cho, 2015). در طول مدت بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی، در این پژوهش مشاهده شد که حداکثر میزان فعالیت هر آنزیم برای جدایه‌های مختلف متفاوت، ولی زمان رسیدن به اوج این فعالیت برای بیشتر جدایه‌ها مشابه بود. رابطه بین نوع و میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و میزان بیماری‌زایی و تهاجم جدایه‌ها ساده نیست اما جدایه‌هایی که سطح بالاتری از فعالیت آنزیم‌های پکتیناز و سلولاز را نشان می‌دادند میزان بیماری‌زایی آنها بیشتر بوده و تهاجمی‌تر از دیگر جدایه‌ها بودند. با مقایسه فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و بیماری‌زایی جدایه‌ها به‌نظر می‌رسد که آنزیم‌های کیتیناز و زایلاناز تأثیر کمتری روی میزان بیماری‌زایی جدایه‌ها در مقایسه با آنزیم‌های پکتیناز و سلولاز دارند. محققان گزارش کردند که آنزیم‌های پکتیناز و سلولاز در بیماری‌زایی قارچ *A. brassicicola* نقش مهمی دارند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (Deep et al., 2014; Srivastava et al., 2012; Cho et al., 2009).

نتایج حاصل از بررسی میزان ترکیب‌های تیمول و کارواکرول در گیاهچه‌های حاصل از نمونه‌های بذری مورد بررسی نشان داد که هرچه میزان آلودگی‌های طبیعی به قارچ بذرزد *A. brassicicola* در نمونه‌های بذری بیشتر باشد، میزان این مونوترپن‌های فنولی ردیابی شده کمتر است. بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه تیمول و کارواکرول نه تنها تحت تأثیر عوامل ژنتیکی قرار ندارد بلکه با توجه به شرایط محیطی و تنش‌های زنده و غیرزنده تغییر می‌کند (Crocoll et al., 2010). محرک‌ها و تنش‌های مختلف از طریق القای پاسخ‌های دفاعی و تجمع فیتوآلکسین باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (Esmailzadeh Bahabadi & Sharifi, 2013). تنش‌ها

آنزیم‌های سیتوکروم P450 مونوکسیژناز خود را با شرایط سازگار کنند. نتایج این پژوهش مشابه با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان در برهم‌کنش علف هفت‌بند- *Fusarium oxysporum* (Samad et al., 2019)، سویا - *Phakopsora pachyrhizi* (Parmezan et al., 2020)، پرتقال - *Penicillium digitatum* (Rodríguez et al., 2014) و همچنین اکالیپتوس - *Chrysoporthe austroafricana* (Visser et al., 2015) است.

این مطالعه نشان داد که قارچ بذرزاد *A. brassicicola* باعث کاهش شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی و در نتیجه کیفیت و سلامت بذر و گیاهچه‌های آویشن باغی می‌شود. همچنین، بین نوع و میزان آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح شده جدایه‌های *A. brassicicola* در شرایط آزمایشگاهی و میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌های قارچ روی گیاهچه‌ها ارتباط وجود دارد. بنابراین به نظر می‌رسد علت تغییر در میزان بیان ژن‌ها و تولید مونوترین‌های فنولی در گیاهچه‌های آویشن باغی حاصل از تیمار بذرها با جدایه‌های مختلف قارچ می‌تواند به دلیل نقش تیمول و کارواکرول در سازوکار دفاعی باشد. همچنین با توجه به تغییر میزان بیان و تولید تیمول و کارواکرول با میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌های *A. brassicicola* پیشنهاد می‌گردد سازوکار تأثیر این عوامل بیماری‌زای قارچی روی مسیرهای دخیل در تولید متابولیت‌های ثانویه در آویشن باغی بررسی شود. در نتیجه شناخت و مطالعه مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و نحوه پاسخ‌های دفاعی به عوامل بیماری‌زای قارچی می‌تواند اطلاعات مناسبی را در مورد نوع و میزان متابولیت‌های ثانویه تولیدی در گیاهان تحت تأثیر تنش‌های زنده به‌ویژه عوامل بیماری‌زای گیاهی قرار دهد.

سپاسگزاری

نویسندگان از مسئولان محترم مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای حمایت مالی از این پژوهش (با

et al., 2016). ژن *DXR* در بیوسنتز مونوترین‌های تیمول و کارواکرول در گیاه آویشن باغی نقش دارد و تغییر در بیان این ژن می‌تواند بر مقدار تولید این مونوترین‌ها تأثیرگذار باشد (Mirzaei et al., 2017; Hosseini et al., 2018).

ژن سیتوکروم P450 به‌عنوان یکی از ژن‌های کلیدی است که در سنتز مونوترین‌ها نقش دارد (Mohammadi & Tohidfar, 2020). گاما-ترپین به‌عنوان پیش‌ماده تولید تیمول و کارواکرول در گیاه آویشن توسط آنزیم گاما-ترپین سنتتاز تولید و با کمک آنزیم‌های سیتوکروم P450 مونوکسیژناز به‌ویژه بیان ژن‌های *CYP71D178* و *CYP71D180* در برگ و گل به‌طور مستقیم به تیمول و کارواکرول به‌عنوان ترکیب‌های نهایی و همچنین پی‌سیمن به‌عنوان محصول جانبی تبدیل می‌شود (Majdi et al., 2017). Majdi و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که بیشترین میزان بیان ژن‌های مربوط به مسیر تولید ترپنوئیدها در گیاه آویشن در پاسخ به محرک‌های مختلف به‌ترتیب مربوط به ژن‌های *DXR*، *TvTPS1* و سیتوکروم‌ها است. Mondak و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که تنش‌های غیر زنده موجب تغییر در میزان بیان ژن‌های *CYP71D178* و *CYP71D180* می‌شود. محرک‌های مختلف و همچنین تنش‌های غیرزنده موجب تغییر میزان تولید و بیان ژن‌های دخیل در مسیر ترپنوئیدها در گیاهان آویشن باغی (Majdi et al., 2017)، مرزه تابستانه (Ghobadi et al., 2017)، بابونه گاوی (Majdi et al., 2015) و مرزه خوزستانی (Ramak et al., 2015) می‌شود.

البته، همبستگی مثبتی بین میزان بیان و فعالیت برخی آنزیم‌های سیتوکروم P450 مونوکسیژناز با میزان تولید تیمول و کارواکرول و دیگر مونوترین‌ها مشاهده شده است (Ramak et al., 2015). افزایش میزان تیمول و کارواکرول در هنگام مواجهه با بیمارگرهای قارچی با قدرت تهاجم کمتر می‌تواند نتیجه نوعی پاسخ دفاعی و سازگاری برای مقابله با آثار مخرب بیمارگرهای قارچی باشد. سلول‌های گیاهی وقتی به مدت طولانی در معرض بیمارگرهای قارچی با قدرت تهاجم کمتر قرار می‌گیرند، سعی می‌کنند با کمک

- metabolites using biotic elicitors. *Journal of Cell & Tissue*, 4: 119-128.
- Ghaedi, M., Roosta, M., Khodadoust, S. and Daneshfar, A., 2015. Application of optimized vortex-assisted surfactant-enhanced dlme for preconcentration of thymol and carvacrol, and their determination by HPLC-UV: response surface methodology. *Journal of Chromatographic Science*, 53: 1222-1231.
 - Ghobadi, S., Maroufi, A. and Majd, M., 2017. Differential expression of the key genes involved in the biosynthesis of monoterpenes in different tissues and in response to abiotic elicitors in Summer savory (*Satureja hortensis*). *Journal of Cell & Tissue*, 7: 275-291.
 - Gibson, D.M., King, B.C., Hayes, M.L. and Bergstrom, G.C., 2011. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 264-270.
 - Habibi, S., Qaderi, A. and Fatehi, F., 2017. The study of relative expression of key genes of thymol biosynthesis pathway in *Thymus vulgaris* cv. 'Varico 3' under cold stress using Real-Time PCR. *Journal of Medicinal Plants*, 16: 50-58.
 - Harman, G.E., Björkman, T., Ondik, K. and Shoresh, M., 2008. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outlooks on Pest Management*, 19: 24-29.
 - Hashem, M., Moharam, A.M. and Zaied, A.A., 2010. Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection*, 29: 1111-1117.
 - Höferl, M., Buchbauer, G., Jirovetz, L., Schmidt, E., Stoyanova, A., Denkova, Z., Slavchev, A. and Geissler, M., 2009. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *Journal of Essential Oil Research*, 21, 459-463.
 - Hosseini, H., Fatehi, F., Mousavi Fard, S. and Qaderi, A., 2018. Gene expression analysis of thymol and carvacrol biosynthesis pathway in *Thymus vulgaris* under salinity stress. *Modern Genetics Journal*, 13: 409-418.
 - Ishak, M.H., Abdel-Latif Harby, M.R., Abd Alla, M. and Shaat, M.M.N., 2020. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) root rot/wilt in minia governorate, Egypt. *Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research*, 5: 44-57.

شماره پروژه ۹۸۰۸۹۲-۹۸۰۲۴-۹۸۰۲۱-۰۸-۰۸-۰۸-۰۸ (۱۲۴-۰۸-۰۸-۰۲۱-۹۸۰۲۴-۹۸۰۸۹۲)
تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

- Aharoni, A., Jongsma, M., Kim, T., Ri, M., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Schwab, W. and Bouwmeester, H.J., 2006. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry Reviews*, 5: 49-58.
- Bettaieb, I., Zakhama, N., Aidi-Wannes, N., Kchouk, M. and Marzouk, B., 2009. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae*, 120: 271-275.
- Boedo, C., Le Clerc, V., Briard, M., Simoneau, P., Chevalier, M., Georgeault, S. and Poupard, P., 2007. Impact of carrot resistance on development of the *Alternaria* leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*). *European Journal of Plant Pathology*, 121: 55-66.
- Cho, Y., 2015. How the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* kills plant cells remains an enigma. *Eukaryot Cell*, 14: 335-344.
- Cho, Y., Kim, K.H., Rota, M.L., Scott, D., Santopietro, G., Callihan, M., Mitchell, T.K. and Lawrenc, C.B., 2009. Identification of novel virulence factors associated with signal transduction pathways in *Alternaria brassicicola*. *Journal of Molecular Microbiology*, 72: 1316-1333.
- Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J. and Degenhardt, J., 2010. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 73: 587-603.
- Deep, S., Sharma, P. and Behera, N., 2014. Optimization of extracellular cellulase enzyme production from *Alternaria brassicicola*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3: 127-139.
- Eguchi, Y., Widiastuti, A., Odani, H., Chinta, Y.D., Shinohara, M., Misu, H., Kamoda, H., Watanabe, H. and Hasegawa, M., 2016. Identification of terpenoids volatilized from *Thymus vulgaris* L. by heat treatment and their *in vitro* antimicrobial activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94: 83-89.
- Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Sharifi, M., 2013. Increasing the production of plant secondary

- thymol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115: 152-162.
- Malmierca, M.G., McCormick, S.P., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., Monte, E. and Gutierrez, S., 2015. Production of trichodiene by *Trichoderma harzianum* alters the perception of this biocontrol strain by plants and antagonized fungi. *Environmental Microbiology*, 17: 2628-2646.
 - Mirzaei, F., Fatehi, F., Ismaili, A., Yaghotipoor, A. and Qaderi, A., 2017. Expression of genes 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR), Sabinen Synthase (Tctps1) and α -terpineol synthase (Tctps5) and its relation to thymol and carvacrol biosynthesis in *Thymus vulgaris* under water deficit stress. *Journal of Medicinal Plants*, 16: 58-70.
 - Mohammadi, M. and Tohidfar, M., 2020. Identification, isolation and cloning of cytochrome p450 from *Thymus vulgaris*. *Journal of Medicinal Plants Biotechnology*, 5: 13-23.
 - Mondak, B., Mohammadi, V., Hadian, J. and Zeynali Khanghah, H., 2020. The impact of temperature on metabolites and the expression of genes involved in thymol and carvacrol biosynthesis pathway in *Thymus vulgaris*. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 51: 195-205.
 - Morshedloo, M.R., Craker, L.E., Salami, A., Nazeri, V., Sang, H. and Maggi, F., 2017. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111: 119-128.
 - Nasiri, M., Seedian, S.E. and Sharifi Ashorabadi, E., 2016. Investigation of seed germination, establishment and identification of different *Thymus* species available in Natural Resources Gene Bank of Iran. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 32: 115-126.
 - Noda, J., Brito, N. and Gonzalez, C., 2010. The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biology*, 10: 38.
 - Noorani, S.L., Minasian, V. and Safaei, N., 2008. Identification, pathogenicity and distribution of *Alternaria* spp. of canola in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 44: 137-153.
 - Kaeidi, A., Rahmani, M. and Hassanshahi, J., 2020. The protective effect of carvacrol and thymol as main polyphenolic compounds of thyme on some biologic systems in disease condition: A narrative review. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 19: 81-96.
 - Khaledi, N., Dehshiri, A. and Hassani, F., 2021. Effect of seed-borne fungi on seed health of native populations of Iranian cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Indian Phytopathology*, 74: 659-668.
 - Khaledi, N., Taheri, P. and Falahati-Rastegar, M., 2017. Identification, virulence factors characterization and analysis virulence together with aggressiveness of *Fusarium* spp., causing wheat head blight in Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 147: 897-918.
 - Khare, M.N., Tiwari, S.P. and Sharma, Y.K., 2014. Disease problems in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) cultivation and their management for production of quality pathogen free seeds. *International Journal of Seed Spices*, 4: 11-17.
 - Koch, E., Zink, P., Pfeiffer, T., von Galen, A., Linkies, A., Drechsel, J. and Birr, T., 2020. Artificial inoculation methods for testing microorganisms as control agents of seed- and soil-borne *Fusarium*-seedling blight of maize. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127: 883-893.
 - Lebaschi, M.H., Sharifi Ashoorabadi, E., Makizadeh Tafti, M. and Asadi-Sanam, S., 2018. Effect of plant density on quality and quantity yield of *Thymus vulgaris* in dry farming conditions in seven provinces of Iran. *Journal of Crops Improvement*, 20: 113-127.
 - Leeder, A.C., Palma-Guerrero, J. and Glass, N.L., 2011. The social network: deciphering fungal language. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 440-451.
 - Maffei, M. and Scannerini, S., 2011. Photomorphogenic and chemical responses to blue light in *Mentha piperita*. *Journal of Essential Oil Research*, 72: 712-718.
 - Majdi, M., Abdollahi, M.R. and Maroufi, A., 2015. Parthenolide accumulation and expression of genes related to parthenolide biosynthesis affected by exogenous application of methyl jasmonate and salicylic acid in *Tanacetum parthenium*. *Plant Cell Reports*, 34: 1909-1918.
 - Majdi, M., Malekzadeh-Mashhady, A., Maroufi, A. and Crocoll, C., 2017. Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with

- mevalonate pathway enhances carvacrol biosynthesis and DXR gene expression in shoot cultures of *Satureja khuzistanica* Jamzad. *Journal of Plant Physiology*, 170: 1187-1193.
- Ramezani, Y., Taheri, P. and Mamarabadi, M., 2019. Identification of *Alternaria* spp. associated with tomato early blight in Iran and investigating some of their virulence factors. *Journal of Plant Pathology*, 101: 647-659.
 - Rebey, B., Jabri-Karoui, I., Hamroumi-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F. and Marzouk, B., 2012. Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*, 36: 238-245.
 - Rodríguez, A., Shimada, T., Cervera, M. Alquézar, B., Gadea, J., Gómez-Cadenas, A., De Ollas, C.J., Rodrigo, M.J., Zacarías, L. and Peña, L., 2014. Terpene downregulation triggers defense responses in transgenic orange leading to resistance against fungal pathogens. *Plant Physiology*, 164: 321-339.
 - Sacristan, S. and García-Arenal, F., 2008. The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology*, 9: 369-384.
 - Saghrouchni, H., El Barnossi, A., Salamatullah, A.M., Bourhia, M., Alzahrani, A., Alkaltham, M.S., Alyahya, H.K., Tahiri, N.E.H., Imtara, H. and Var, I., 2021. Carvacrol: A promising environmentally friendly agent to fight seeds damping-off diseases induced by fungal species. *Agronomy*, 11: 1-15.
 - Samad, A.F.A., Rahnamaie-Tajadod, R., Sajad, M., Jani, J., Murad, A.M.A., Noor, N.M. and Ismail, I., 2019. Regulation of terpenoid biosynthesis by miRNA in *Persicaria minor* induced by *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics*, 20(1): 586.
 - Sharma, Y.K., Choudappa, P.C. and Anwer, M.M., 2013. Efficacy of fungicides for the management of *Alternaria* blight of cumin. *International Journal of Seed Spices*, 3: 48-49.
 - Shcherbakova, L., Mikityuk, O., Arslanova, L., Stakheev, A., Erokhin, D., Zavriev, S. and Dzhavakhiya, V., 2021. Studying the ability of thymol to improve fungicidal effects of tebuconazole and difenoconazole against some plant pathogenic fungi in seed or foliar treatments. *Frontiers in Microbiology*, 12: 1-13.
 - Simmons, E.G., 2007. *Alternaria: an identification manual*. CBS, Utrecht, 775p.
 - Novak, J., Lukas, B. and Franz, C., 2010. Temperature influences thymol and carvacrol differentially in *Origanum* spp. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 22: 412-418.
 - Nowakowska, M., Wrzesińska, M., Kamiński, P., Szczechura, W., Lichočka, M., Tartanus, M., Elżbieta, U.K. and Nowicki, M., 2019. *Alternaria brassicicola* (Brassicaceae) pathosystem: insights into the infection process and resistance mechanisms under optimized artificial bio-assay. *European Journal of Plant Pathology*, 153: 131-151.
 - Ortega, L.M., Kikot, G.E., Astoreca, A.L. and Alconada, T.M., 2013. Screening of *Fusarium graminearum* isolates for enzymes extracellular and deoxynivalenol production. *Journal of Mycology*, 358140: 1-7.
 - Pant, R., 2011. Seed mycoflora of coriander and effect of some fungal metabolite on seed germination and seedling growth. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 2: 127-130.
 - Parmezan, T.R., Brito Júnior, S.L., de Carvalho, K., de Aquino, M., Birkett, M., Pickett, J., de Oliveira Nunes, E., Vilela Abdelnor, R., Hoffmann Campo, C.B. and Marcelino-Guimarães, F.C., 2020. Transcriptional profile of genes involved in the production of terpenes and glyceollins in response to biotic stresses in soybean. *Genetics and Molecular Biology*, 43: 1-12.
 - Pateraki, A. and Kanellis, K., 2010. Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Cell Report*, 29: 629-641.
 - Pavela, R., Žabka, M., Vrchatová, N. and Tříška, J., 2018. Effect of foliar nutrition on the essential oil yield of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Industrial Crops and Products*, 112: 762-765.
 - Pramila, P.G., Tasleem, M., Taj, G., Mal, R. and Kumar, A., 2014. Morphological, cultural, pathogenic and molecular variability amongst India isolates of *Alternaria brassicae* in Uttarakhand. *African Journal of Biotechnology*, 13: 441-448.
 - Ramak, P., Kazempour Osaloo, S., Ebrahimzadeh, H., Sharifi, M. and Behmanesh, M., 2015. Gene expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and carvacrol biosynthesis in *Satureja khuzestanica*. *Journal of Plant Research*, 27: 622-634.
 - Ramak, P., Osaloo, S.K., Ebrahimzadeh, H., Sharifi, M. and Behmanesh, M., 2013. Inhibition of the

- N., Golden, B.R., Irby, J.T. and Martin, S., 2020. Effects of purple seed stain on seed quality and composition in soybean. *Plants*, 9: 1-10.
- Ulhoa, C.J. and Peberdy, J.F., 1992. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 236-240.
 - Underwood, W., 2012. The plant cell wall: A dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*, 85: 1-6.
 - Visser, E.A., Mangwanda, R., Becker, J.V.W., Külheim, C., Foley, W.J., Myburg, A.A., Naidoo, S., 2015. Foliar terpenoid levels and corresponding gene expression are systemically and differentially induced in *Eucalyptus grandis* clonal genotypes in response to *Chrysosporthe austroafricana* challenge. *Plant Pathology*, 164: 1320-1325.
 - Voigt, C.A., Schäfer, W. and Salomon, S., 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a novel virulence factor during infection of cereals. *The Plant Journal*, 42: 364-375.
 - Zhao, Z., Liu, H., Wang, C. and Xu, J.R., 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*, 14: 274.
 - Singh, R., Kumar, S., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K., Mishra, S. and Sharma, A.K., 2014. Identification and characterization of microsatellite from *Alternaria brassicicola* to assess cross-species transferability and utility as a diagnostic marker. *Molecular Biotechnology*, 56: 1049-1059.
 - Soyulu, S., Yigitbas, H., Soyulu, E.M. and Kurt, S., 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1021-1030.
 - Srivastava, A., Ohm, R.A., Oxiles, L., Brooks, F., Lawrence, C.B., Grigoriev, I.V. and Cho, Y., 2012. A zinc-finger-family transcription factor, AbVf19, is required for the induction of a gene subset important for virulence in *Alternaria brassicicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25: 443-452.
 - Suthar, R.S., Bhatt, D.P. and Bhatt, P.N., 2014. Effect of culture filtrate of *Fusarium equiseti* on seed germination and seedling growth of cumin (*Cuminum cyminum*). *Indian Phytopathology*, 67: 193-194.
 - Taheri, P., 2019. Disease resistance and virulence screen in *Solanum tuberosum-Alternaria tenuissima* interaction: the role of pathogenicity factors. *Euphytica*, 215: 1-10.
 - Turner, R.E., Ebelhar, M.W., Wilkerson, T., Bellaloui,

Evaluation of seed-borne fungus *Alternaria brassicicola* effects on production and expression of genes involved in thymol and carvacrol biosynthesis pathway in thyme (*Thymus vulgaris* L.)

N. Khaledi^{1*} and F. Hassani²

1* - Corresponding author, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, E-mail: n_khaledi@areeo.ac.ir

2- Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: September 2021

Revised: January 2022

Accepted: January 2022

Abstract

Thyme (*Thymus vulgaris* L.) is rich in phenolic monoterpenes such as thymol and carvacrol. Seed-borne fungi can reduce the quality and quantity of crop and also change the amount and type of secondary metabolites in plants by affecting seed health. The aim of this study was to isolate and identify the seed-borne fungi from thyme seed samples and to evaluate the effects of seeds infection on the production and expression of genes involved in the biosynthesis pathway of thymol and carvacrol compounds. To identify seed-borne fungi of thyme seed samples collected from fields of Alborz province, sampling was done according to the criteria of the International Seed Testing Association (ISTA). The amount of thymol and carvacrol compounds was measured using high performance liquid chromatography (HPLC) and the expression of *TvTPS1*, *DXR*, *CYP178*, and *CYP180* genes was assayed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Six *Alternaria brassicicola* isolates were identified based on morphological and molecular characteristics. Analysis of cell wall degrading enzymes activity revealed that cellulase and pectinase were more important than xylanase and chitinase on the pathogenicity and aggressiveness of isolates. Seeds infection by *A. brassicicola* significantly affected vigor and seed germination indices. The findings of this study showed that the pathogenicity and aggressiveness of *A. brassicicola* fungal isolates can change the expression level of different genes encoding thymol and carvacrol compounds in seedlings obtained from seed pretreatments with different isolates through different mechanisms including production of extracellular enzymes resulted in increasing (isolates Ab4 and Ab5) and/or decreasing (isolates Ab1, Ab6, Ab2, and Ab3) the production and accumulation of phenolic monoterpenes in thyme seedlings. This is the first report on the identification of seed-borne fungus *A. brassicicola* from thyme seed samples in Iran and also the role of seeds infection on the production and expression of genes involved in the thymol and carvacrol biosynthesis pathway.

Keywords: Thyme, seed-borne, pathogenicity, seed health, phenolic monoterpenes.