

بررسی تأثیر پرایمینگ بذر روی شاخص‌های جوانه‌زنی و برخی مکانیسم‌های بیوشیمیایی زیره سبز (*Cuminum cyminum*) علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی

نیما خالیدی[✉]، لیلا زارع

موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. [✉] n_khaledi@areeo.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۹

بازنگری: ۱۴۰۰/۳/۸

دریافت: ۱۴۰۰/۲/۲۱

چکیده

پرایمینگ بذر موجب بهبود جوانه‌زنی و مولفه‌های رشدی گیاهچه‌ها تحت شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده می‌شود. هدف از این پژوهش مقایسه تأثیر پرایمینگ بذر با قارچ‌کش‌های شیمیایی و جدایه‌های قارچ *Trichoderma harzianum* روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه توده بومی زیره سبز بود. همچنین میزان فعالیت و بیان آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز به‌عنوان نشانگرهای اصلی مسیر انتقال سیگنال فنیل پروپانویید و تجمع متابولیت‌های ثانویه فنلی ارزیابی گردید. نتایج غلظت‌های مؤثر بازدارندگی نشان داد که کمترین مقادیر حداقل غلظت‌های مهارکنندگی و کشندگی قارچ‌کش‌های شیمیایی علیه *Fusarium oxysporum* به ترتیب مربوط به قارچ‌کش ایپروودیون-کاربندازیم (Rovral-TS[®]), کاربندازیم (Bavistin[®]) و کاربوکسین تیرام (Vitavax thiram[®]) بود. نتایج همچنین نشان داد که جدایه‌های قارچ *T. harzianum* دارای فعالیت قارچ ایستایی علیه *F. oxysporum* بوده و فاقد فعالیت قارچ‌کشی می‌باشند. نتایج بررسی مکانیسم‌های بیوشیمیایی نشان داد که میزان محتوای پروتئینی و تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاهچه‌های حاصل از بذور پرایم شده در مقایسه با شاهد سالم به طور معنی داری افزایش یافت. رابطه معنی داری بین بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز با ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مشاهده شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های قارچ *T. harzianum* و قارچ‌کش‌های شیمیایی سبب فعال شدن سیستم آنتی اکسیدانی گیاه شده و از طریق افزایش محتوای پروتئینی و القای بیان ژن فنیل آلانین آمونیالایز منجر به تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه فنلی در زیره سبز می‌شوند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که پرایمینگ بذر به ویژه با جدایه‌های *T. harzianum* ضمن بهبود کیفیت بذر و سلامت گیاهچه موجب افزایش میزان تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه فنلی می‌شود.

کلمات کلیدی: پرایمینگ، زیره سبز، فنیل پروپانویید، کیفیت بذر، متابولیت‌های ثانویه

Effect of seed priming on germination indices and some biochemical mechanisms of cumin (*Cuminum cyminum*) against *Fusarium* wilt disease

Nima Khaledi[✉], Leila Zare

Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. [✉] n_khaledi@areeo.ac.ir

Received: 11 May 2021

Revised: 29 May 2021

Accepted: 19 June 2021

Abstract

Seed priming improves germination and growth components of seedlings under biotic and abiotic stress conditions. The aim of this study was to compare the effect of seed priming with chemical fungicides and isolates of *Trichoderma harzianum* on germination and vigor indices of native cumin population. Also, the activity and expression of phenylalanine ammonia lyase enzyme were evaluated as main markers of phenylpropanoid signal transduction pathway and accumulation of phenolic secondary metabolites. The results of effective inhibitory concentrations showed that the lowest values of minimum inhibitory and fungicidal concentrations of chemical fungicides against *Fusarium oxysporum* were related to Iprodione-Carbendazim (Rovral-TS[®]), Carbendazim (Bavistin[®]) and Carboxin thiram (Vitavax thiram[®]), respectively. The results also showed that *T. harzianum* isolates had fungistatic but not fungicide activity against *F. oxysporum*. The results of biochemical mechanisms showed that protein content and accumulation of phenolic and flavonoid compounds increased significantly in seedlings obtained from bioprimered seeds compared to healthy control. A significant relationship was observed between gene expression and phenylalanine ammonia lyase enzyme activity with phenolic and with flavonoid compounds, as well. Moreover, the results showed that isolates of *T. harzianum* and chemical fungicides caused activation of the antioxidant system and by increasing protein content and inducing the expression of phenylalanine ammonia lyase gene led to the production and accumulation of phenolic secondary metabolites in cumin. The findings of this research showed that seed priming, especially with *T. harzianum* isolates while improving seed quality and seedling health, increase the production and accumulation of phenolic secondary metabolites.

Keywords: Cumin, Priming, Phenylpropanoid, Seed Quality, Secondary Metabolites

How to cite:

Khaledi N, Zare L, 2022. Effect of seed priming on germination indices and some biochemical mechanisms of cumin (*Cuminum cyminum*) against *Fusarium* wilt disease. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (1): 81-95.

مقدمه

گیاه دارویی زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* L. دارای طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه مقادیر فراوانی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بوده که به دلیل خواص دارویی دارای ارزش اقتصادی زیادی می‌باشد (Karamian & Kamalnejade 2017). متابولیت‌های ثانویه ترکیباتی با وزن مولکولی معمولاً کمتر از سه کیلوالتون و ساختار متنوع هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها و گیاهان تولید شده و به سازگار شدن آنها به خصوص در شرایط تنش کمک می‌کند (Vinale & Sivasithamparam 2020). متابولیت‌های ثانویه در گیاهان معمولاً بر اساس مسیر متابولیسمی آنها از لحاظ ساختاری و بیوشیمیایی در سه گروه عمده ترپن‌ها، فنول‌ها و ترکیبات نیتروژن دار و سولفوردار قرار دارند (Gholami 2017). مسیر فنیل پروپانوئید به عنوان مسیر عمده بیوسنتز انواع متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی و فلاونوئید در گیاهان شناخته شده است (Mishra & Sangwan 2019). آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز کاتالیزور اولین مرحله در مسیر فنیل پروپانوئید بوده که ترکیبات فنیل پروپانوئیدی تولید شده نقش اساسی در مکانیسم‌های دفاعی، رشد و نمو گیاهان داشته و همچنین در تعاملات ناسازگار و سازگار بین گیاهان و عوامل بیماری‌زا افزایش می‌یابد (Habibollahi et al. 2020). میزان تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی اند و همچنین میزان فعالیت و بیان ژن آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز به عنوان نشانگر بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده افزایش می‌یابد (Ghasemi et al. 2019). سطح بیان و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز بسته به نوع گیاه و نوع تنش متفاوت است (Wang et al. 2016; Jiang et al. 2013).

روش‌های متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه پیشنهاد شده است. استفاده از الیسیتورهایی با منشا زیستی و غیرزیستی از طریق القای پاسخ‌های دفاعی موجب سنتز زیستی و انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (Esmaeilzadeh Bahabadi & Sharifi 2013; Zhao et al. 2005).

زیره سبز در تمامی مراحل رشد به‌ویژه در طی دوره تکامل بذر به عوامل بیماری‌زا قارچی بسیار حساس بوده و تحت تأثیر آنها قرار می‌گیرد. بیماری پژمردگی، پوسیدگی ریشه و بوته میری زیره سبز با عامل *Fusarium oxysporum* Schltdl. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد و بذرزاد زیره سبز است (Özer & Bayraktar 2015). این بیماری از مزارع زیره سبز در سبزوآر، کاشمر، نیشابور، تربت حیدریه، گناباد، تربت جام و طبس گزارش

شده است (Nooras Mofrad et al. 2005; Ghorbani et al. 2010). گونه‌های مختلفی از قارچ *Trichoderma Pers.* به ویژه *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & *T. harzianum* Rifai *T. koningiopsis* Samuels, Carm. Suárez & Nirenberg و H.C. Evans از خاک‌های ریزوسفر زیره سبز جداسازی شده و فعالیت آنتاگونیستی آنها علیه قارچ بیمارگر *F. oxysporum* گزارش شده است (Sharma et al. 2012).

بذر به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و موثرترین مولفه‌ها نقش مهمی در افزایش میزان عملکرد و کاهش خسارت ناشی از بیماری‌ها دارد. پرایمینگ بذر تکنیکی تحت عنوان پیش تیمار بذر با استفاده از مواد شیمیایی، هورمونی و عوامل زیستی بوده که ضمن بهبود کیفیت بذر به لحاظ فیزیولوژیکی، زیستی و بیوشیمیایی، گیاهچه‌ها را پیش از مواجهه شدن با شرایط اکولوژیکی مختلف و عوامل بیماری‌زای بذرزاد و خاکزاد آماده می‌نماید (Ansari et al. 2012; Safari et al. 2020; Viani et al. 2021). پرایمینگ بذر موجب افزایش معنی دار درصد جوانه‌زنی و شاخص‌های رشدی گیاه از جمله طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و وزن گیاهچه زیره سبز می‌شود (Tabatabaei & Shakeri 2014). امروزه روش‌های مختلفی برای پرایمینگ بذر مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از انواع پرایم‌ها، استفاده از پیش تیمارهای زیستی به‌ویژه قارچ‌های *Trichoderma* مایکوریزا و یا همچنین باکتری‌های محرک رشد گیاهی می‌باشد که از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله تولید آنزیم‌های خارج سلولی، آنتی‌بیوتیک‌ها و شبه هورمون‌های گیاهی به‌عنوان الیسیتور با منشا زیستی موجب بهبود رشد گیاه و کنترل عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Pu et al. 2009). در پاسخ به حمله بیمارگرها و همچنین پرایمینگ بذر با *T. harzianum* میزان محتوای پروتئینی و آنتی‌اکسیدانت‌ها در گیاهچه‌ها افزایش یافته و این فرآیند ممکن است به محدود کردن انواع آلودگی ناشی عوامل بیماری‌زای گیاهی کمک کند. پرایمینگ زیستی بذر روشی است که با ادغام جنبه‌های زیستی (تلقیح بذر با میکروارگانیسم‌های زنده مفید) و فیزیولوژیکی (آب‌نوشی بذر) باعث بهبود کیفیت بذر می‌شود (Bennett & Whipps 2008). پرایمینگ زیستی بذر زیره سبز با *T. harzianum* ضمن افزایش شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی و موجب بهبود توانایی گیاهچه‌ها در مقابل تحمل تنش‌های زنده و غیر زنده می‌شوند (Piri et al. 2019; Singh et al. 2007). به طور کلی پرایمینگ زیستی بذر با عوامل کنترل زیستی به دلیل سازگاری با محیط زیست می‌تواند جایگزین مناسبی برای پرایمینگ بذر با قارچ‌کش‌های شیمیایی شود. تیمار بذر با *T.*

قارچ (Minimum fungicidal concentration; MFC) و غلظت ممانعت کنندگی ۵۰ (Inhibitory concentration 50; IC50) از روش استاندارد رقیق سازی در محیط کشت مایع (Broth microdilution) شرح داده شده توسط Plodpai et al. (2013) استفاده شد. این آزمایشات سه بار تکرار شدند.

تیمار پرایمینگ زیستی و پرایمینگ بذور

تیمار پرایمینگ زیستی بذور با استفاده از روش Entesari et al. (2013) انجام شد. برای تسریع در فرآیند جوانه‌زنی، ابتدا بذور زیره سبز به مدت پنج روز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد مرطوب نگه داشته شدند. سپس قبل از تیمار، بذور به مدت ۳۰ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم (حاوی یک درصد کلر فعال) به منظور ضدعفونی سطحی قرار گرفته و سپس با آب مقطر استریل سه بار شستشو شدند. آنگاه سوسپانسیون اسپور جدایه‌های قارچ *T. harzianum* در حداقل غلظت مهارکنندگی هر جدایه با استفاده از روش سری رقت سریالی با آب مقطر استریل تهیه شد. به منظور بهتر چسبیدن اسپورهای *T. harzianum* به سطح بذور مقدار یک درصد کربوکسی متیل سلولز به عنوان چسباننده به سوسپانسیون اسپور قارچ اضافه شد و در نهایت از سوسپانسیون مذکور به نسبت ۵۰ میلی‌لیتر در هر ۱۰۰ گرم بذور مخلوط شده و در داخل ارلن و روی شیکر با سرعت ۱۲۸ دور در دقیقه به مدت ۱۸۰ دقیقه قرار گرفت تا پوشش مناسب روی بذور ایجاد شود. سپس، بذورهای تیمار شده روی کاغذهای سترون قرار گرفته و در زیر هود لامینار فلو خشک شدند. جهت ارزیابی میزان آغشتگی اسپورها به بذور با قرار دادن تصادفی پنج عدد بذور تیمار شده از هر جدایه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی توئین ۲۰ و سپس با استفاده از روش سری رقت سریالی و شمارش روی لام گلیول شمار به طور متوسط میزان اسپور روی سطح بذور محاسبه شد. جهت اندازه‌گیری میزان زنده ماندن اسپورهای *T. harzianum* روی سطح بذور، 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. همچنین جهت پرایمینگ بذور با قارچ‌کش‌های شیمیایی، بذور به صورت دستی با افزودن سوسپانسیون‌های تهیه شده از هر قارچ‌کش به نسبت‌های مورد نظر به ازای هر کیلوگرم بذور در حداقل غلظت مهارکنندگی، به ۱۰۰ گرم بذور و آغشته کردن یکنواخت بذور با قارچ‌کش به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس، بذورهای تیمار شده روی کاغذهای سترون قرار گرفت و در زیر هود لامینار فلو خشک شدند.

harzianum و *Pseudomonas fluorescens* Migula ضمن بهبود شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی زیره سبز موجب کاهش بیماری پژمردگی زیره سبز می‌شود (Chawla & Gangopadhyay 2013). تیمار همزمان بذور و خاک با قارچ‌های *T. harzianum* و *T. aureoviride* Rifai ضمن افزایش درصد جوانه‌زنی بذور زیره سبز موجب کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌شوند (Vyas & Mathur 2002).

پژوهش حاضر به منظور درک برخی مکانیسم‌های بیوشیمیایی دخیل در مقاومت زیره سبز علیه قارچ *F. oxysporum* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی زیره سبز انجام شد. هدف از این پژوهش (الف) بررسی غلظت‌های مؤثر بازدارندگی قارچ‌کش‌های شیمیایی و جدایه‌های قارچ *T. harzianum* روی رشد میسلومی *F. oxysporum* (ب) مقایسه تأثیر پرایمینگ زیستی بذور با جدایه‌های قارچ *T. harzianum* و پرایمینگ بذور با قارچ‌کش‌های شیمیایی روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی، و (ج) بررسی و مقایسه میزان تولید و تجمع محتوای متابولیت‌های ثانویه فنلی در گیاهچه‌های حاصل از بذور پرایم شده

مواد و روش‌ها

تهیه مواد پژوهش

در این پژوهش پنج جدایه‌های آنتاگونیست قارچ *T. harzianum* و جدایه FO4 بیماری‌زای *F. oxysporum* که از آزمایشگاه ملی سلامت بذور موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذور و نهال تهیه شده بودند مورد استفاده قرار گرفت. قارچ *F. oxysporum* از توده‌ی بذری زیره سبز مشهد جداسازی و با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و بررسی‌های مولکولی شناسایی و بیماری‌زایی آنها روی زیره سبز اثبات شده بود (Khaledi et al. 2021). توده بذری زیره سبز مشهد از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذور و نهال تهیه شد. همچنین قارچ-کش‌های ایپرودیون-کاربندازیم (نام تجاری (WP 52.5%) (Rovral-TS®)، کاربوکسین تیرام (نام تجاری Vitavax thiram® (WP 75%)) و کاربندازیم (نام تجاری Bavistin® (WP 50- (60%)) به صورت پودر و تابل ساخت شرکت گیاه (Gyah Company) تهیه شد. سازمان حفظ نباتات کشور این قارچ‌کش‌ها را برای کنترل بیماری‌های فوزاریومی بذرزاد در سایر محصولات کشاورزی به صورت ضدعفونی بذور قبل از کاشت توصیه نموده است.

تعیین غلظت‌های مؤثر بازدارندگی

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration; MIC)، حداقل غلظت کشندگی

استفاده از روش شرح داده شده توسط Ramamoorthy et al. (2002) انجام شد. برای هر نمونه، عصاره‌گیری از یک گرم بافت گیاهی در سه میلی‌لیتر بافر سدیم بورات (pH 7) ۱۰ میلی مولار حاوی ۲- مرکاپتواتانول ۱/۴ میلی‌مولار و ۰/۱ گرم پلی وینیل پیرولیدون انجام شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی (عصاره آنزیمی) برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. محلول واکنش حاوی ۲۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲۵۰ میکرولیتر سوبسترای L- فنیل آلانین (۵۰ میلی-مولار)، ۲۵۰ میکرولیتر بافر بورات سدیم ۱۰ میلی‌مولار (۸/۸ pH) و ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر بود که به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌منظور انجام واکنش قرار گرفت. سپس واکنش‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول آبی اسید کلریدریک ۶ نرمال متوقف شد. فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب اکسیداسیون سینامیک اسید $M^{-1} \text{cm}^{-1} \times 963 \times 10^3$ (Dickerson et al. 1984). تغییرات فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز برحسب نانومول ترانس سینامیک اسید تولید شده در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

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

استخراج RNA از بافت اندام هوایی گیاهچه‌های زیره سبز با استفاده از معرف تریزول (TRI Reagent®, Aldrich) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای اطمینان از حذف کامل DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم RNase-Free DNase Set (Dena Zist, Iran) تیمار شد. سپس غلظت و سلامت RNA استخراج‌شده به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتری (NanoDrop 2000; Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA) و بارگیری بر روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر مختلف RNA پس از اندازه‌گیری، همگی به غلظت ۱۱۰ نانوگرم در میکرولیتر با افزودن مقادیر مناسب آب تیمار شده با DEPC (آب فاقد ریبونوکلاز) یکسان‌سازی شدند. پس از همسان‌سازی غلظت RNAهای مختلف، به‌منظور ساخت cDNA، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از RNA استخراج شده هر تیمار را جداگانه با یک میکرولیتر پرایمر عمومی $oligo(dT)_{18}$ به تیوب-های ۰/۲ اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 65°C قرار داده شدند. پس از انتقال تیوب‌ها به روی یخ، چهار میکرولیتر آنزیم (Cinnagen, Iran) M-MuLV Reverse Transcriptase

ارزیابی تأثیر پرایمینگ زیستی و پرایمینگ بذور روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه

آزمون جوانه زنی استاندارد براساس دستورالعمل انجمن بین المللی آزمون بذر (International Seed Testing Association; ISTA) انجام شد. برای این منظور تعداد ۴۰۰ بذر (چهار تکرار با ۱۰۰ عدد بذر) از بذور پرایم شده به صورت تصادفی انتخاب و روی کاغذ صافی واتمن در داخل تشک پتری قرار داده شده و به اتاقک رشد در دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی منتقل شدند (Piri et al. 2019). پس از ۲۱ روز، میانگین درصد جوانه‌زنی (خروج ریشه‌چه حداقل دو میلی‌متر یا بیشتر به‌عنوان معیار جوانه زنی)، میانگین درصد گیاهچه‌های عادی و غیرعادی (تغییر شکل یافته و بیمار)، میانگین ارتفاع ساقه‌چه و ریشه‌چه، میانگین وزن تر و وزن خشک (با قرار دادن در آون به مدت ۲۴ ساعت در ۷۵ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شد. همچنین شاخص طولی و وزنی بنیه با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید:

$$\left(\text{میانگین طولی ریشه چه} + \text{میانگین طول ساقه چه} \right) = \text{شاخص طولی بنیه}$$

$$\text{درصد جوانه زنی نهایی} \times \text{وزن خشک گیاهچه} = \text{شاخص وزنی بنیه}$$

درصد جوانه زنی نهایی $\times$ وزن خشک گیاهچه = شاخص وزنی بنیه

ارزیابی تغییرات میزان پروتئین، ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل

اندازه‌گیری پروتئین کل با روش Bradford (1976) در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام و بر اساس منحنی استاندارد برحسب میلی گرم پروتئین در هر گرم بافت گیاه بیان گردید. ارزیابی مقدار ترکیبات فنلی بر اساس تغییر رنگ عصاره فنلی توسط معرف فولین انجام شد (Li et al. 2007). تغییرات فنل در طول موج ۷۲۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید اندازه‌گیری و برحسب میلی گرم گالیک اسید در هر گرم بافت تازه بیان گردید. استخراج فلاونوئید کل با استفاده از روش (Siddhuraju & Becker 2003) انجام شد. مقدار فلاونوئید کل در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد محلول‌های کوئرستین (Quercetin, Sigma Chemical Co.) متانولی اندازه‌گیری و برحسب میلی گرم در گرم بافت تازه بیان گردید. هر تیمار دارای چهار تکرار در هر بار انجام آزمایش بود و آزمایش دو بار تکرار شد.

ارزیابی فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز

بررسی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز، به‌عنوان آنزیم تبدیل‌کننده L- فنیل آلانین به اسید ترانس سینامیک، با

تأثیر قارچ‌کش‌های شیمیایی و آنتاگونیست‌ها روی رشد میسلومی *Fusarium oxysporum*

نتایج حاصل از غلظت‌های مؤثر بازدارندگی روی رشد میسلومی قارچ بیمارگر *F. oxysporum* در اثر تیمار جدایه‌های قارچ *T. harzianum* و قارچ‌کش‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که قارچ‌کش‌های ایپرودیون-کاربندازیم، کاربوکسین تیرام و کاربندازیم به ترتیب در غلظت‌های ۹۸۵، ۱۴۶۱ و ۱۳۲۰ ppm موجب عدم رشد میسلومی قارچ بیمارگر *F. oxysporum* شدند. مقادیر میزان غلظت مؤثر ۵۰ درصدی قارچ‌کش‌های مورد بررسی بین ۳۸۸ تا ۷۶۲ ppm متغیر است. حداقل غلظت کشندگی قارچ‌کش‌های ایپرودیون-کاربندازیم، کاربوکسین تیرام و کاربندازیم به ترتیب به میزان ۱۹۲۷، ۱۵۶۹، ۱۸۴۳ ppm می‌باشد. در میان تمام تیمارهای قارچ‌کشی مورد آزمایش قرار گرفته علیه قارچ *F. oxysporum* کمترین میزان حداقل غلظت کشندگی، حداقل غلظت مهارکنندگی و میزان غلظت مؤثر ۵۰ درصد مربوط قارچ‌کشی ایپرودیون-کاربندازیم است. هیچگونه فعالیت قارچ‌کشی توسط جدایه‌های قارچ *T. harzianum* مشاهده نشد. مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی برای جدایه‌های T8، T14، T7 و قارچ *T. harzianum* به ترتیب $10^3 \times 216$ ، $10^3 \times 483$ و $10^3 \times 119$ اسپور بر میلی‌لیتر محاسبه شد. مقادیر میزان غلظت مؤثر ۵۰ درصدی برای جدایه‌های قارچ *T. harzianum* بین $10^3 \times 4$ تا $10^3 \times 11$ اسپور بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

تأثیر تیمارهای بذری زیره سبز پرایم شده روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه، تیمارهای بذری زیره سبز پرایم شده به همراه تیمارهای شاهد در گروه آماری مختلف قرار گرفتند و از لحاظ آماری بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند (جدول ۲).

نتایج درصد جوانه‌زنی بذری زیره سبز پرایم شده در آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذری تیمارها با جدایه‌های قارچی *T. harzianum* از ۸۱/۲۵ تا ۸۶/۲۵ درصد و در تیمارها با قارچ‌کش‌های شیمیایی از ۷۳/۵۰ تا ۷۸/۲۵ درصد متغیر بود. تیمارهای بذری زیره سبز پرایم شده در مقایسه با تیمارهای شاهد سالم تأثیر معنی‌داری روی میانگین درصد گیاهچه‌های غیرعادی تغییر شکل یافته نداشتند.

دو میکرولیتر بافر رونوشت RT (5X)، یک میکرولیتر dNTP، یک 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 42°C در ترموسایکلر انجام شد. در انتهای واکنش به منظور حذف اثر آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase و حذف آلودگی‌های اضافی RNA به ترتیب تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 70°C قرار گرفته و سپس یک میکرولیتر آنزیم RNase A افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 37°C نگهداری شدند. از آغازگرهای PAL به عنوان ژن اصلی (Forward: 5' ATG TTT CCA GGA و Reverse: 5' CCT CAA GTC TAT و ACA AGG C 3' (AGC TTG GCA 3' و 5' CCT CCT TCC TCA CAA CAT CC 3') و توپولین به عنوان ژن کنترل داخلی (Reverse: 5' CAA CTT CGT CTT TGG GCA ATC 3') و NCBI در BLAST به وسیله انجام آنالیز استفاده شد (Habibollahi et al. 2020). واکنش تکثیر این ژن‌ها شامل مرحله واسرشت سازی اولیه سه دقیقه‌ای در دمای 94°C ، سپس ۳۵ چرخه در مرحله واسرشت سازی ۴۵ ثانیه در 94°C ، مرحله اتصال (برای PAL: ۶۰ ثانیه در 58°C و برای توپولین: ۳۰ ثانیه در 60°C) و مرحله گسترش در 72°C (برای PAL: ۶۰ ثانیه و برای توپولین: ۴۵ ثانیه) و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت هشت دقیقه در دمای 72°C بود. به منظور بررسی میزان بیان ژن PAL در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد، مقدار مساوی از محصول PCR هر کدام از ژن‌ها (PAL و توپولین) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به صورت جداگانه بارگذاری شدند. مقایسه بیان ژن PAL از روش نیمه کمی RT-PCR و از روی شدت باندها، پس از نرمال کردن با ژن توپولین با استفاده از نرم افزار Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) و تبدیل به داده‌های کمی و عددی ارزیابی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آنالیز آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف پس از نرمال سازی 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 $P < 0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 استفاده گردید.

نتایج

جدول ۱. غلظت‌های مؤثر بازدارندگی قارچ‌کش‌های شیمیایی و جدایه‌های *Trichoderma harzianum* در کنترل *Fusarium oxysporum*.

Table 1. Effective inhibitory concentration of chemical fungicides and *Trichoderma harzianum* isolates in the control of *Fusarium oxysporum*.

Treatment	IC50*	MIC†	MFC‡
Fungicides			
Rovral-TS	388	985	1569
Vitavax thiram	762	1461	1927
Bavistin	691	1320	1843
<i>Trichoderma harzianum</i> isolates			
TH14	8×10 ³	216×10 ³	IN
TH8	11×10 ³	483×10 ³	IN
TH7	4×10 ³	119×10 ³	IN

IN: بی اثر، واحدهای غلظت‌های قارچ‌کش‌های شیمیایی و قارچ‌های آنتاگونیست به ترتیب قسمت در میلیون و اسپور در میلی‌لیتر می‌باشد. * غلظت ممانعت کنندگی با ۵۰ درصد اثر مهار کنندگی روی رشد قارچ (قسمت در میلیون). † حداقل غلظت کشندگی (قسمت در میلیون). ‡ حداقل غلظت مهار کنندگی (قسمت در میلیون).

IN: Ineffective, the units of chemical fungicides concentrations and the fungal antagonist are presented as parts per million (ppm) and spore per ml, respectively. *Inhibitory concentration with 50% inhibitory effect on the fungal growth (ppm).

†Minimum fungicidal concentration (ppm). ‡Minimum inhibitory concentration (ppm).

در تیمارهای بذری پرایم شده به ترتیب مربوط به بذور پرایم شده با جدایه TH7 و قارچ‌کش کاربوکسین تیرام بود.

تغییرات محتوای پروتئین، ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل

محتوای پروتئین کل در گیاهچه‌های حاصل از بذور آلوده و غیر آلوده متفاوت بود. مقدار پروتئین کل در گیاهچه‌های حاصل از بذور آلوده کمتر از تیمار شاهد فاقد آلودگی و تیمارهای بذری زیره سبز پرایم شده بودند. بالاترین سطح محتوای پروتئین کل در گیاهچه‌های حاصل از تیمارهای بذری زیره سبز بیوپرایم شده مربوط به جدایه T7 قارچ *T. harzianum* (۱۲۹/۸ mg. g⁻¹ FW) و پس از آن به ترتیب مربوط به جدایه‌های قارچی T14 (۱۲۴/۱ mg. g⁻¹ FW) و T8 (۱۱۷/۹ mg. g⁻¹ FW) مشاهده شد (شکل ۱a).

بررسی فعالیت و بیان آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز در گیاهچه‌های حاصل از تیمارهای مختلف بذری برای ارزیابی نقش این آنزیم‌ها در مقاومت زیره سبز به *F. oxysporum* مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز در گیاهچه آلوده نسبت به گیاهان غیر آلوده بالاتر بود.

میانگین درصد گیاهچه‌های بیمار در نمونه‌های پرایم شده با جدایه‌های قارچ *T. harzianum* و قارچ‌کش‌های شیمیایی کاهش یافت. بالاترین درصد گیاهچه عادی مربوط به بذور پرایم شده با قارچ‌کش ایپرودیون-کاربندازیم و جدایه قارچی T7 می‌باشد. نتایج حاصل از آزمون استاندارد جوانه‌زنی نشان داد که شاخص بنیه گیاهچه در بذور پرایم شده نسبت به تیمارهای شاهد افزایش یافته و این افزایش در بذور بیوپرایم شده با جدایه‌های قارچی *T. harzianum* نسبت به قارچ‌کش‌های شیمیایی بیشتر بود. میزان شاخص طولی بنیه در تیمارهای بذری بیوپرایم شده از ۱۲۷۵/۵ تا ۱۴۶۶/۳ و شاخص وزنی بنیه از ۲/۱۱ تا ۲/۷۶ متغیر بود. میزان شاخص طولی بنیه در بذور پرایم شده با قارچ‌کش‌های شیمیایی از ۹۶۴/۶ تا ۱۱۶۰ و شاخص وزنی بنیه از ۱/۳۶ تا ۱/۷۹ متغیر بود (جدول ۲). در میان تیمارهای بذری پرایم شده اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه مورد ارزیابی مشاهده شد. میانگین طول و وزن گیاهچه در تیمارهای پرایم شده بیشتر از تیمارهای شاهد بوده و میانگین طول ساقه‌چه در تیمارهای بیوپرایم شده از ۵۶/۷۵ تا ۸۲/۲۵ سانتی‌متر و میانگین طول ریشه‌چه از ۵۲/۲۵ تا ۷۵/۵۰ سانتی‌متر متغیر بود. همچنین میانگین طول ساقه‌چه در تیمارهای پرایم شده با قارچ‌کش‌های شیمیایی از ۵۶/۷۵ تا ۸۲/۲۵ سانتی‌متر و میانگین طول ریشه‌چه از ۵۲/۲۵ تا ۷۵/۵۰ سانتی‌متر متغیر بود. میانگین وزن تر گیاهچه‌های حاصل از بیوپرایم از ۰/۱۵۱ تا ۰/۱۵۹ گرم و وزن خشک از ۰/۰۲۶ تا ۰/۰۳۲ گرم متغیر بود. میانگین وزن تر گیاهچه‌های حاصل از پرایم شده با قارچ‌کش‌های شیمیایی از ۰/۱۳۷ تا ۰/۱۴۳ گرم و وزن خشک از ۰/۰۱۸ تا ۰/۰۲۳ گرم متغیر بود (جدول ۲). بیشترین و کمترین شاخص بنیه گیاهچه

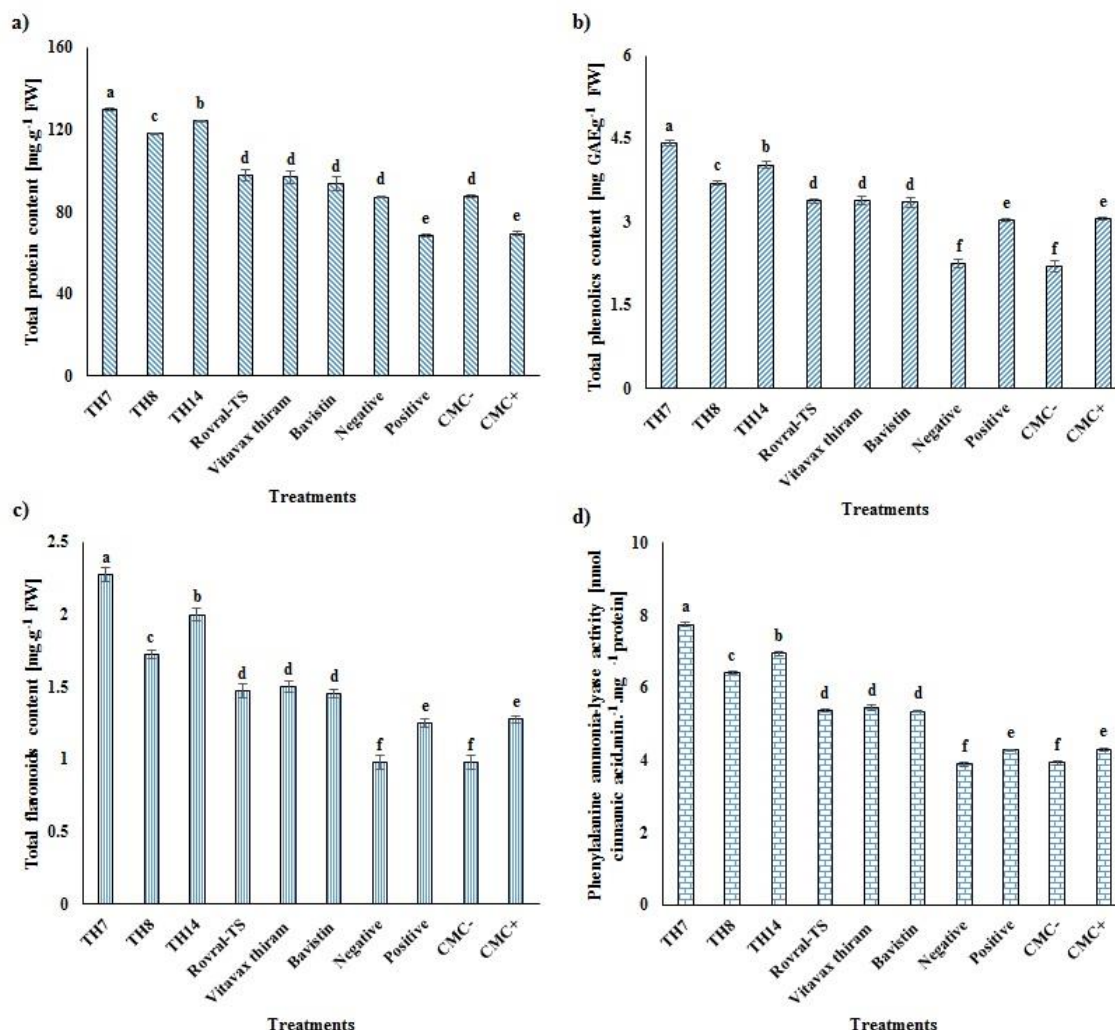
جدول ۲. مقایسه میانگین‌های شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه تیمارهای بذری زیره سبز بیوپرایم شده با جدایه‌های *Trichoderma harzianum* و قارچ‌کش‌های شیمیایی.

Table 1. Means comparison of germination and vigor indices of biopriming seed treatments with *Trichoderma harzianum* isolates and chemical fungicides.

Treatment	GP	DS	SD	SL	RL	FW	DW	SLVI	SWVI
<i>Trichoderma harzianum</i> isolates									
TH14	83.25 b	1.75 b	5.5 c	7.9 b	8.4 b	0.153 b	0.029 b	1359.1 b	2.41 b
TH8	81.25 c	2 b	7.25 b	7.6 c	8.1 c	0.151 b	0.026 c	1275.5 c	2.11 c
TH7	86.25 a	1.25 b	0.5 f	8.3 a	8.7 a	0.159 a	0.032 a	1466.3 a	2.76 a
Fungicides									
Rovral-TS	78.25 d	2 b	0 f	7.1 d	7.7 d	0.143 c	0.023 d	1160 d	1.79 d
Vitavax thiram	73.50 f	2.25 b	3.5 d	6.4 f	6.7 f	0.137 d	0.018 f	964.6 f	1.36 f
Bavistin	75.75 e	2 b	2.25 e	6.9 e	7.3 e	0.139 d	0.022 e	1071.9 e	1.65 e
Control									
Negative	70.75g	2.25 b	0 f	5.9 g	6.4 g	0.133 e	0.012 g	870.3 g	0.87 g
Positive	57 h	16.5 a	13.5 a	3.3 h	3.5 h	0.117 f	0.009 h	392.2 h	0.54 h
CMC ⁻	70.5 g	2.25 b	0 f	5.9 g	6.3 g	0.133 e	0.012 g	863.9 g	0.86 g
CMC ⁺	55.75 h	15.75 a	13.0 a	3.2 h	3.5 h	0.117 f	0.009 h	379.5 h	0.51 h
LSD (0.05)	2.42	1.61	0.89	0.16	0.19	0.003	0.001	-	-

Negative: بذور زیره سبز فاقد آلودگی بدون پرایم، Positive: بذور زیره سبز آلوده بدون پرایم، CMC⁻: تیمارهای بذری زیره سبز فاقد آلودگی پرایم شده با کربوکسی متیل سلولز، CMC⁺: تیمارهای بذری زیره سبز آلوده پرایم شده با کربوکسی متیل سلولز، GP: درصد جوانه‌زنی، DS: میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته، SD: میانگین درصد گیاهچه‌های بیمار، SL: میانگین ارتفاع ساقه‌چه، RL: میانگین ارتفاع ریشه‌چه، FW: میانگین وزن تر، DW: میانگین وزن خشک، SLVI: شاخص طولی بنیه، SWVI: شاخص وزنی بنیه، اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌دار داشتند.

Negative: cumin seeds uninfected without primed, Positive: cumin seeds infected without prime, CMC⁻: cumin seed treatments uninfected primed with carboxymethyl cellulose, CMC⁺: cumin seed treatments infected primed with carboxymethyl cellulose, GP: Germination percent, DS: average of deformed seedling percentage, SD: average of seedling disease percentage, SL: average shoot length, RL: average root length, FW: average fresh weight, DW: average dry weight, SLVI: seedling length vigor index, SWVI: seedling weight vigor index. Different letters indicate significant differences at the 5% level according to the least significant difference (LSD) test.



شکل ۱. بررسی تغییرات میزان محتوای متابولیت‌های ثانویه فنلی در گیاهچه‌های حاصل از تیمارهای مختلف پرایمینگ بذری زیره سبز، a. تغییرات محتوای پروتئینی، b. محتوای فنلی کل، c. محتوای فلاونوئید، d. فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیز. میانگین داده‌ها $\pm$ خطای استاندارد ارائه شده‌اند، آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد. بیوپرایمینگ بذر با قارچ *Trichoderma harzianum*؛ جدایه‌های T7، T8 و T14، پرایمینگ بذر با قارچ‌کش‌ها؛ Rovral-TS: Iprodione-Carbendazim، Bavistin. Carbendazim و Vitavax thiram: Carboxin thiram، Control؛ Negative: بذور زیره سبز فاقد آلودگی بدون پرایم، Positive. بذور زیره سبز آلوده بدون پرایم، CMC⁻. تیمارهای بذری زیره سبز فاقد آلودگی پرایم شده با کربوکسی متیل سلولز، CMC⁺. تیمارهای بذری زیره سبز آلوده پرایم شده با کربوکسی متیل سلولز. اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح پنج درصد تفاوت معنی دار داشتند.

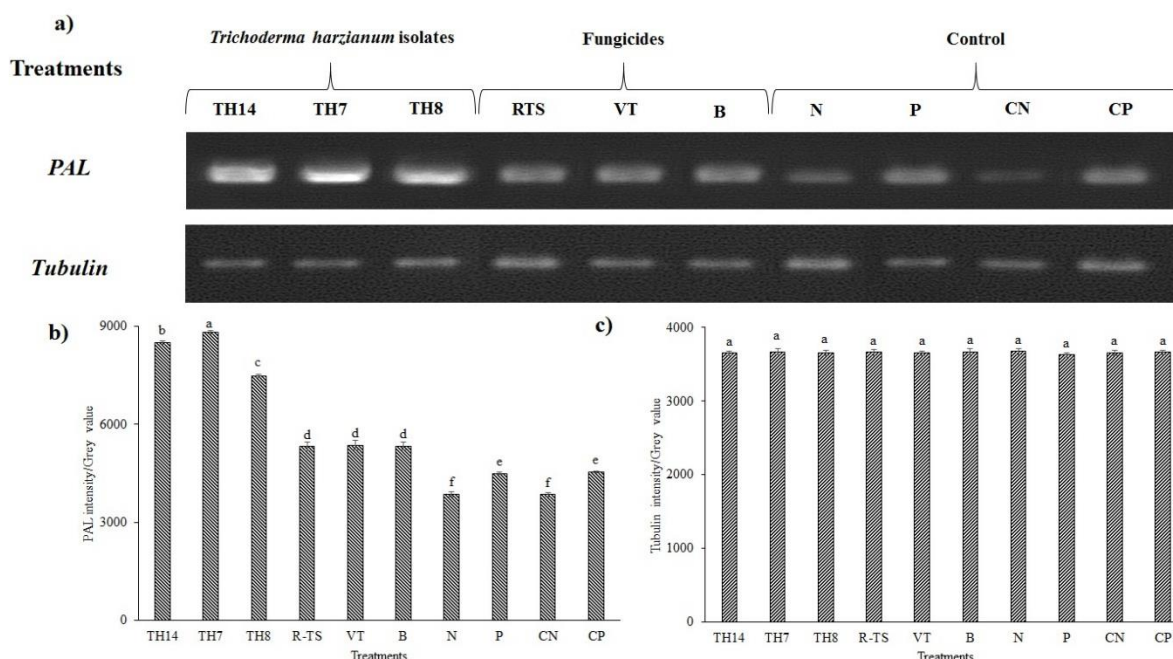
Figure 1. Investigation of changes in the content of phenolic secondary metabolites in seedlings obtained from different priming treatments of cumin seed, a. changes in protein content, b. total phenolics content, c. content of flavonoids, d. phenylalanine ammonia lyase activity. Data are means $\pm$ standard error, the experiment was repeated two times with similar results. Seed biopriming with *Trichoderma harzianum*; Isolates T7, T8 and T14, Seed priming with fungicide; Rovral-TS. Iprodione-Carbendazim, Bavistin. Carbendazim and Vitavax thiram: Carboxin thiram, Control; Negative: cumin seeds uninfected without primed, Positive. Cumin seeds infected without prime, CMC⁻. Cumin seed treatments uninfected primed with carboxymethyl cellulose, CMC⁺. Cumin seed treatments infected primed with carboxymethyl cellulose. Different letters indicate significant differences at the 5% level according to the least significant difference (LSD) test.

فنیل آلانین آمونیالیز بین گیاهان آلوده و غیر آلوده وجود داشت (شکل ۲). نتایج نشان داد که ژن مورد نظر در تمامی گیاهچه‌های

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از کمی شدن مشاهدات رونویسی معکوس نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن

harzianum در تجزیه و تحلیل بیان ژن مشاهده شد. مقایسه شدت باند فنیل آلانین آمونیاز از نظر بصری پس از کمی شدن نشان داد که بیان ژن در گیاهچه‌های حاصل از بذور پرایم شده با جدایه‌های قارچ *T. harzianum* بیشتر از گیاهچه‌های حاصل از بذور پرایم شده با قارچ‌کش‌های شیمیایی بود (شکل ۲).

حاصل از بذور پرایم شده بیان شده است. با توجه به نتایج، ارتباط معنی‌داری بین بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز مشاهده شد. به عبارتی در تیمارهایی که فعالیت آنزیمی بالاتر بود سطح بالاتری از بیان ژن مشاهده شد. همچنین، تغییر در سطح القای پس از آلودگی با قارچ *F. oxysporum* و همچنین تیمار بذر با قارچ‌کش‌های شیمیایی و جدایه‌های قارچ *T.*



شکل ۲. بررسی بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیاز (*PAL*) و *توبولین* در گیاهچه‌های حاصل از تیمارهای مختلف پرایمینگ بذری زیره سبز با استفاده از روش RT-PCR. a. شدت باندهای بدست آمده از بیان ژن *PAL* و *توبولین* در تیمارهای مختلف. b. نسبت شدت باندهای بدست آمده از بیان ژن *PAL*. c. شدت باندهای بدست آمده از بیان ژن *توبولین*، اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون Kruskal-Wallis از آن در آزمون مقایسه‌ای Mann-Whitney در سطح پنج درصد تفاوت‌های معنی‌دار داشتند. میانگین داده‌ها $\pm$ خطای استاندارد ارائه شده‌اند. بیوپرایمینگ بذر با قارچ *Trichoderma harzianum*: جدایه‌های T7، T8 و T14، پرایمینگ بذر با قارچ‌کش‌ها؛ R-TS: ایپرودیون-کاربندازیم، B: کاربندازیم، VT: کاربوکسین تیرام، کنترل، N: بذور زیره سبز فاقد آلودگی بدون پرایم، P: بذور زیره سبز آلوده بدون پرایم، CN: تیمارهای بذری زیره سبز فاقد آلودگی پرایم شده با کربوکسی متیل سلولز، CP: تیمارهای بذری زیره سبز آلوده پرایم شده با کربوکسی متیل سلولز.

Figure 2. Expression of *phenylalanine ammonia lyase (PAL)* and *tubulin* genes in seedlings obtained from different priming treatments of cumin seed using RT-PCR method, a. intensities of the obtained bands from expression of *PAL* and *tubulin* genes in different treatments, b. the ratio of the obtained bands intensities of *PAL* expression, c. bands intensities obtained from *tubulin* expression. Different letters indicate significant differences at the 5% level according to Kruskal-Wallis followed by the Mann-Whitney comparison tests. Data are means $\pm$ standard error. Seed biopriming with *Trichoderma harzianum*; Isolates T7, T8 and T14, Seed priming with fungicide; R-TS: Iprodione-Carbenidazole, B: Carbenidazole, VT: Carboxin thiram, Control; N. Cumin seeds uninfected without primed, P. Cumin seeds infected without prime, CN. Cumin seed treatments uninfected primed with carboxymethyl cellulose, CP. Cumin seed treatments infected primed with carboxymethyl cellulose.

بحث

سبز، به ارزیابی میزان متابولیت‌های ثانویه فنلی تولید شده نیز پرداخته شد. توده‌ی بذری زیره سبز مشهود همواره تحت تأثیر آلودگی‌های طبیعی به قارچ‌های بذرزار قرار دارند. Beygtash (2013) shiviary گزارش داد که نمونه‌های بذری زیره سبز جمع آوری شده از استان خراسان رضوی به‌ویژه منطقه مشهد به قارچ

در این پژوهش ضمن مقایسه تأثیر پرایمینگ زیستی بذور با جدایه‌های قارچ *T. harzianum* با پرایمینگ بذور با قارچ-کش‌های شیمیایی روی بهبود شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی زیره

گذاشته و موجب افزایش کیفیت به‌ویژه سلامت گیاهچه‌ها می‌شوند. نتایج این پژوهش با مشاهدات Piri et al. (2019) مطابقت داد. این محققین گزارش کردند که بیوپرایم بذری زیره سبز با *T. harzianum* موجب افزایش شاخص‌های رشدی و ظهور گیاهچه می‌شوند که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. خصوصیات رشدی زیره در تیمار با گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* بهبود یافت (Haggag & Abo-sedra 2005) که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. تیمار بذری با *harzianum* ضمن افزایش شاخص‌های بنیه، جوانه‌زنی و همچنین عملکرد زیره سبز در مزرعه موجب کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌شود (Singh et al. 2007) که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. پرایمینگ زیستی بذری با قارچ‌های آنتاگونیست به‌ویژه قارچ *T. harzianum* و *T. viride* Pers. ضمن بهبود شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی زیره سبز موجب کاهش بیماری پژمردگی زیره سبز می‌شود (Sharma et al. 2011). بیوپرایم بذری با *Trichoderma* باعث بهبود مولفه‌های رشدی گیاه به‌ویژه در مراحل استقرار و رشد اولیه آن گردید (Rezalou et al. 2020).

نتایج آزمون جوانه‌زنی استاندارد در تیمارهای بذری زیره سبز پرایم شده با قارچ‌های شیمیایی نشان داد که در میان تیمارهای بذری پرایم شده اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های طولی و وزنی بنیه و همچنین شاخص‌های جوانه‌زنی از جمله درصد جوانه‌زنی، میانگین درصد گیاهچه‌های بیمار، طول ساقچه و ریشه‌چه، وزن تر و خشک گیاهچه وجود دارد. ضدعفونی بذری با قارچ‌های کاربوکسین تیرام موجب بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه شد (Haghanifar et al. 2018). Siddiqui & Ahmed (1996) گزارش کردند که در بذری پرایم شده با قارچ‌های شیمیایی میزان درصد جوانه‌زنی، میانگین طول ساقچه و ریشه‌چه به‌طور قابل توجهی بیشتر از شاهد سالم بود که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. تیمار بذری با قارچ‌های تیوفانات متیل و کاربندازیم ضمن کاهش پژمردگی فوزاریومی موجب افزایش عملکرد زیره سبز می‌شوند (Didwania 2019). نتایج این پژوهش با مشاهدات Sandeep & Patel (2011) مطابقت دارد. آنها گزارش کردند که کاربندازیم ضمن بهبود افزایش درصد جوانه‌زنی (۸۱/۷ درصد) موجب کاهش بروز بیماری (۲۴/۵ درصد) می‌شوند. تیمار بذری با کاربندازیم و بنومیل موجب کاهش مؤثر بروز پژمردگی زیره سبز می‌شود (Deepak & Lal, 1991). (Chompawat & Pathak, 2009) گزارش کردند که تیمار بذری با کاربندازیم موجب کاهش

بذریاد *F. oxysporum* آلوده بودند. وجود آلودگی بالا در توده بذری مشهد به قارچ‌های بذریاد را می‌توان به حساسیت بالا، اختلاط و عدم خلوص ژنتیکی توده بذری، شرایط محیطی و تناوب زراعی با گیاهان حساس نسبت داد (Khaledi 2021). ضدعفونی بذرها با قارچ‌های شیمیایی و عوامل زیستی، یکی از راه‌های مؤثر در کنترل بیماری‌های بذریاد و خاکزاد است. نتایج حاصل از غلظت‌های مؤثر بازدارندگی قارچ‌های شیمیایی روی رشد میسلیمی قارچ بیمارگر *F. oxysporum* نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی به ترتیب مربوط به قارچ-کش‌های ایپرودیون-کاربندازیم، کاربندازیم و کاربوکسین تیرام می‌باشد. (Sandeep & Patel 2011) گزارش کردند که قارچ‌کش کاربوکسین تیرام در غلظت ۱۵۰۰ ppm موجب عدم رشد میسلیمی *F. oxysporum* می‌شود که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. (Aghnoom et al. 1999) گزارش کردند که قارچ-کش ایپرودیون-کاربندازیم در غلظت ۱۰۰ ppm موجب عدم رشد میسلیمی قارچ *F. oxysporum* می‌شود در حالیکه قارچ-کش کاربوکسین تیرام در همان غلظت موجب مهار ۸۱/۷ درصدی رشد میسلیمی شدند. به نظر می‌رسد این اختلاف در غلظت‌های بازدارندگی به علت تفاوت در جدایه‌ی بیمارگر *F. oxysporum* و نوع واکنش جدایه به قارچ‌های شیمیایی و حتی میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم آن باشد. همچنین توجه به این موضوع نیز حائز اهمیت است که اطلاعاتی در مورد غلظت‌های مؤثر بازدارندگی قارچ‌های شیمیایی و شرکت‌هایی که تولید کننده آنها توسط محققان ارائه نشده است. حداقل غلظت مهارکنندگی به ترتیب مربوط به جدایه‌های T14، T8 و T7 قارچ *T. harzianum* می‌باشد. همچنین جدایه‌های قارچ *T. harzianum* دارای فعالیت قارچ‌ایستایی بوده و فاقد فعالیت قارچ‌کشی می‌باشند. فعالیت ضدقارچی قارچ‌های جدایه‌های قارچ *T. harzianum* با افزایش غلظت و مقدار آنها افزایش یافته است. نتایج این پژوهش با مشاهدات Deepak et al. (2008) مطابقت داد. این محققین گزارش کردند که قارچ *T. harzianum* به ترتیب موجب مهار ۸۲/۹ و ۸۵/۴ درصدی از رشد میسلیمی قارچ‌های *F. oxysporum* و *Alternaria burnsii* Uppal, Patel & Kamat (2011) عامل بیماری پژمردگی و سوختگی زیره سبز می‌شوند. قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* موجب عدم رشد میسلیمی *F. oxysporum* می‌شوند (Patel & Patel 1998).

نتایج آزمون جوانه‌زنی در تیمارهای بذری زیره سبز پرایم شده با جدایه‌های قارچ *T. harzianum* نشان داد که پرایمینگ به‌طور قابل توجهی روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی بذری تأثیر

بروز بیماری پژمردگی زیره سبز می‌شود که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد.

قارچ *F. oxysporum* بیمارگری همی بیوتروفیک است. روند آلودگی قارچ *F. oxysporum* شامل یک مرحله بیوتروفی کوتاه مدت پس از آلودگی است که با فعال شدن مکانیسم‌های وابسته به مسیر سالیسیلیک اسید در میزبان همراه است. مرحله دوم، که پس از آلودگی شروع می‌شود، مرحله نکروتروفی است و با فعال شدن مسیر جاسمونیک اسید / اتیلن و یکسری پاسخ‌های دفاعی پایه در گیاه از جمله انفجار اکسیداتیو، تقویت دیواره سلولی گیاه از طریق تجمع و سنتز ترکیبات فنلی و تغییرات در رونویسی و بیان ژن‌ها که موجب محدود شدن فعالیت و پیشروی بیمارگر می‌شوند همراه است (Lyons et al. 2015). در شرایط تنش، پرایمینگ بذری می‌تواند ضمن بهبود واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی موجب افزایش مقاومت در گیاهچه‌ها شود (Moradi & Piri 2018).

مقاومت پایه در بیمارگرهای همی بیوتروف همانند بیوتروف‌ها معمولاً بر اساس مکانیسم‌های وابسته به سالیسیلیک اسید است. آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز در مکانیسم‌های مقاومت علیه گونه‌های *Fusarium* به عنوان آنزیم کلیدی در مکانیسم‌های وابسته به سالیسیلیک اسید شناخته شده است. بیان و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز در میزان بیوسنتز ترکیبات بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوییدی از جمله متابولیت‌های ثانویه فنلی در مسیر فنیل پروپانویید و همچنین مهار آسیب‌های ناشی از تنش‌های مختلف در زیره سبز حائز اهمیت است (Habibollahi et al. 2020). القای بیان و افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز در پاسخ به عوامل مختلف موجب افزایش تولید و تجمع ترکیبات فنلی از طریق متابولیسم فنیل پروپانویید به عنوان یکی از مکانیسم دفاعی القایی در گیاهان می‌باشد (Cetin et al. 2014; Kosyk et al. 2017). تفاوت معنی‌داری در بیان ژن و سطح فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز، محتوای پروتئینی، تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئید در گیاهچه‌های حاصل از تیمارهای بذری زیره سبز پرایم شده با قارچ‌کش‌های شیمیایی و تیمارهای شاهد غیرآلوده مشاهده شد. نتایج این پژوهش با مشاهدات Siddiqui Zaman (2004) & مطابقت دارد. این محققین گزارش کردند که میزان ترکیبات فنلی در بذور پرایم شده با قارچ‌کش‌های شیمیایی در مقایسه شده با تیمارهای شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. به نظر می‌رسد افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئید در گیاهچه‌های حاصل از بذور پرایم شده با قارچ‌کش‌های شیمیایی نوعی اقدام پیشگیرانه علیه

عوامل بیماری‌زای گیاهی و مقابله با تنش شیمیایی ناشی قارچ-کش‌ها می‌باشد. همچنین قارچ‌کش‌های شیمیایی با ایجاد لایه‌ای محافظ در مقابل عامل بیماری‌زای خاکزاد موجب بهبود شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی می‌شوند (Mamenko et al. 2019). فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز، محتوای پروتئینی، تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئید در گیاهچه‌های حاصل از تیمارهای بذری زیره سبز بیوپرایم شده افزایش یافت. نتایج این پژوهش با مشاهدات Singh et al. (2016) مطابقت داد. این محققین گزارش کردند که بیوپرایم بذور با قارچ *Trichoderma* موجب افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و تجمع ترکیبات فنلی در گیاهچه‌ها می‌شود. به‌طور کلی در تیمارهای بذری مورد بررسی در این پژوهش، بیشترین میزان تأثیر در بهبود شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی مربوط به بذور بیوپرایم شده با جدایه TH7 بود که گیاهچه‌های حاصل از آن بذور دارای بالاترین میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز و سطح بالاتری از محتوای پروتئینی، تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئید در مقایسه با سایر تیمارهای پرایم شده بذری بودند. تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئید به طبع آن افزایش بیان و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز در گیاهچه‌های حاصل از بذور زیره سبز آلوده نیز مشاهده شد که البته میزان تجمع این ترکیبات و فعالیت آنزیمی در مقایسه با گیاهچه‌های حاصل از بذور پرایم شده و بیوپرایم شده کمتر بود. Bhardwaj et al. (2016) گزارش کردند که آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز و ترکیبات فنلی و فلاونوئید نقش قابل توجهی در مقاومت زیره سبز علیه *F. oxysporum* دارد که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. اهمیت تجمع ترکیبات فنلی به عنوان آنتی اکسیدان غیرآنزیمی قوی در گیاهان در پاسخ به آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش‌های مختلف مشخص شده است. ترکیبات فنلی عملکرد نامطلوب گونه‌های فعال اکسیژن را مختل می‌کنند و باعث افزایش قدرت دفاعی آنتی اکسیدانی گیاهان می‌شوند (Pereira et al. 2009). میزان بیان و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز و تجمع ترکیبات فنلی در زیره سبز تحت تأثیر تیمارهای مختلف از جمله سالیسیلیک اسید، زخم، سرما و سمیت کادمیوم افزایش یافت (Habibollahi et al. 2020). تنش‌ها موجب افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز و همچنین تجمع فنل‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، آلکالوئیدها، بتاکاروتن و لیکوپن می‌شوند (Ghasemi et al. 2019). میزان محتوای پروتئین در گیاهچه‌های حاصل از تیمارهای بذری شاهد آلوده در مقایسه با

دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاه میزبان می‌شوند که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد (Zhao et al. 2005; Namdeo 2007). بنابراین پرایمینگ بذر با تأثیر روی مکانیسم‌های وابسته به سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید نقش مهمی را در مقاومت پایه دارند. به‌طور کلی، تبادل اطلاعات بین سیگنال‌های سالیسیلیک و جاسمونیک اسید، و همچنین دیگر مسیرهای هورمونی گیاه باعث ایجاد بروز پاسخ‌های دفاعی در گیاه علیه عوامل بیمارگرهای مختلف می‌شود (Gimenez-Ibanez & Solano 2013)، که با نتایج ما مطابقت دارد.

با توجه به آنکه میزان محتوای پروتئینی و اندوخته بذر زیره سبز بسیار اندک می‌باشد و همچنین میزان درصد جوانه‌زنی و بنیه توده بومی پایین بوده و گیاهچه‌های استقرار یافته ضعیف می‌باشند، بنابراین پرایمینگ بذر زیره سبز توصیه می‌گردد زیرا موجب بهبود و ارتقای کیفیت، سلامت و استقرار گیاهچه‌های حاصل می‌شوند. میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز، تولید و تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئید و همچنین ارزیابی سایر واکنش‌های بیوشیمیایی دخیل در پاسخ‌های دفاعی می‌تواند به عنوان ابزاری مناسب جهت بررسی میزان مقاومت و یا حساسیت زیره سبز علیه *F. oxysporum* مورد توجه قرار گیرد. در نتیجه مطالعه در زمینه‌ی پرایمینگ بذر و ارزیابی میزان تأثیر آن در القای پاسخ‌های دفاعی و مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهان می‌تواند ضمن کاهش اثرات مخرب بیماری‌های ناشی از بذر و خاک موجب افزایش میزان تولید و بهبود کیفیت محصول شود. پژوهش حاضر دیدگاه‌های جدیدی در تعامل زیره سبز با *F. oxysporum* و همچنین تجزیه و تحلیل فعالیت و بیان آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز را در مسیرهای سیگنالی دفاعی و ترکیبات تولیدشده مرتبط با آن‌ها در گیاهچه‌های حاصل از بذور پرایم شده ارائه می‌دهد.

سپاسگزاری

نگارندگان از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای حمایت مالی از این پژوهش با شماره پروژه ۹۹۰۵۵۲-۹۸۰۲۴-۰۵-۰۸-۱۲۴ تشکر و قدرانی می‌نمایند.

گیاهچه‌های حاصل از سایر تیمارهای بذری کاهش یافت. این نتیجه مطابق با گزارش Ahmadpour Dehkordi & Balouchi (2012) بود که مشاهده کردند با افزایش تنش میزان محتوای پروتئینی کاهش یافته اما در اثر اعمال پرایمینگ فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و محتوای پروتئینی در مقایسه با گیاهچه‌های تیمار نشده در سطح بالاتری قرار داشت. در شرایط تنش میزان محتوای پروتئینی به شدت کاهش یافت که می‌تواند ناشی از کاهش فراوانی پیش ماده‌های تولیدکننده پروتئین‌ها (مواد معدنی و آلی) و کاهش بیان ژن‌های آنها باشد (Ghorbani et al. 2007). (Javid et al. 2015). Yousefi et al. گزارش کردند که الیستورها سبب افزایش محتوای فلاونوئید کل و آنتوسیانین و همچنین محتوای پروتئین کل زیره سبز می‌شوند. در شرایط تنش میزان تخریب ماکرومولکول‌ها، اسیدهای نوکلئیک، سنتز پروتئین و افزایش ناگهانی مقادیر گونه‌های فعال اکسیژن در بذور پرایم شده کمتر از بذور پرایم نشده می‌باشد (Marthandan et al. 2020). پرایمینگ بذر موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای پروتئینی و همچنین کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (Iseri et al. 2014). پرایمینگ بذر به طور قابل توجهی میزان فعالیت میتوکندری و بیان پروتئین‌ها را افزایش داده و موجب القای سنتز اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها، تولید آدنوزین سه فسفات، فعال سازی استرول‌ها و فسفولیپیدها و همچنین ترمیم DNA های آسیب دیده می‌شوند (Marthandan et al. 2020). در برهمکنش قارچ *Trichoderma* با بیمارگرهای گیاهی، ترکیبات آلی فرار تولید و ترشح شده توسط *Trichoderma* موجب غیر فعال سازی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و القای مقاومت سیستمیک در گیاه می‌شوند (Gomes et al. 2017). در برهمکنش قارچ *Trichoderma* با گیاه میزبان مقاومت سیستمیک القا شده ناشی از جاسمونیک اسید / اتیلن و یا مقاومت اکتسابی سیستمیک ناشی از سالیسیلیک اسید مشاهده شد، مشابه پاسخی که در برهمکنش عوامل بیماری‌زا نکروتروپی با گیاه میزبان مشاهده شد (Singh et al. 2019; Shores et al. 2010).

به نظر می‌رسد قارچ *Trichoderma* ضمن تولید و ترشح ترکیبات آلی فرار، غیرفرار و پروتئینی از جمله آنزیم‌های کیتیناز، سلولاز، زایلناز، بتا ۱ و ۳ گلوکاناز و پروتئاز و همچنین ترکیبات موجود در قارچ‌کش‌های شیمیایی موجب القای مقاومت در گیاه میزبان و بیان ژن‌های مرتبط با تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Chen et al. 2019). محققان گزارش کردند که الیستورهای زیستی و غیرزیستی از طریق القای پاسخ‌های

References

- Aghnoom R, Falahati Rastegar M, Jafarpour B, 1999. Comparison of chemical and biological control of cumin wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*) in laboratory and green house conditions. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 30: 619–630.
- Ahmadpour Dehkordi S, Balouchi HR, 2012. Effect of seed priming on antioxidant enzymes and lipids peroxidation of cell membrane in Black cumin (*Nigella sativa*) seedling under salinity and drought stress. *Journal of Crop Production* 5 (4): 63–85.
- Ansari O, Choghazardi HR, Sharif Zadeh F, Nazarli H, 2012. Seed reserve utilization and seedling growth of treated seeds of mountainray (*Secale montanum*) as affected by drought stress. *Cercetări Agronomice în Moldova* 2: 43–48.
- Bennett A, Whipps J, 2008. Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during drum priming. *Biological control* 44: 349–361.
- Beygtash shivary S, 2013. Identification of seedborne fungal pathogens of cumin and caraway and biological control of dominant pathogens. Masters thesis, University of Zabol. Iran.
- Bhardwaj G, Ravi I, Sharma A, Sharma V, Nimmy MS, 2016. Stimulation of polyphenol, flavonoids and phenylalanine ammonia lyase (PAL) affected by the infection of wilt disease of *Cuminum cyminum* caused by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5 (4): 427–431.
- Bradford MM, 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Cetin E, Babalik Z, Hallac-Turk F, Gokturk-Baydar N, 2014. The effects of cadmium chloride on secondary metabolite production in *Vitis vinifera* cv. cell suspension cultures. *Biological Research* 47 (1), 47.
- Champawat RS, Pathak VN, 1991. Effect of fungicidal seed treatment on wilt disease of cumin. *Journal of Turkish Phytopathology* 20: 23–26.
- Chawla N, Gangopadhyay S, 2013. Performance of bioagents in management of wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*) and their resultant effect on growth and productivity of cumin (*Cuminum cyminum*) under field conditions of arid region of Rajasthan. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 83: 561–565.
- Chen SC, Ren JJ, Zhao HJ, Wang XL, Wang TH, et al., 2019. *Trichoderma harzianum* improves defense against *Fusarium oxysporum* by regulating ROS and RNS metabolism, redox balance and energy flow in cucumber roots. *Phytopathology* 109, 972–982.
- Deepak B, Lal G, 2009. Integrated strategy to control wilt disease of cumin (*Cuminum cyminum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* (Schlecht) Prasad & Patel. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 18 (1):13–18.
- Deepak P, Saran L, Lal G, 2008. Control of wilt and blight diseases of cumin through antagonistic fungi under *in vitro* and field conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 36(2): 91–96.
- Dickerson DP, Pascholati SF, Hagerman AE, Butler LG, Nicholson RL, 1984. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxyl cinnamate CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. *Physiological Plant Pathology* 25: 111–123.
- Didwania N, 2019. Diseases of Cumin and its management. In: Rakesh Pandey AK, Misra HB, Singh Alok K, Dinesh S (eds). *Diseases of Medicinal and Aromatic Plants Aromatic and their Management*. Indian Phytopathological Society, New Delhi. Pp. 339–352.
- Entesari M, Sharifzadeh F, Dashtaki M, Ahmadzadeh M, 2013. Effects of bioprimering on the germination traits, physiological characteristics, antioxidant enzymes and control of *Rhizoctonia solani* of a Bean cultivar (*Phaseolus vulgaris* L.). *Iranian Journal of Field Crop Science*, 44: 35–45 (In Persian with English abstract).
- Esmailzadeh Bahabadi S, Sharifi M, 2013. Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. *Journal of Cell & Tissue* 4: 119–128.
- Ghasemi S, Hassani Kumleh H, Kordrostami M, 2019. Changes in the expression of some genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites in *Cuminum cyminum* L. under UV stress. *Protoplasma* 256 (1): 279–290.
- Gholami AA, 2017. Production of secondary metabolites through genetic engineering and plant tissue culture. *Journal of Biosafety* 10: 17–36 (In Persian with English abstract).
- Ghorbani Javid, M, Moradi F, Akbari G, Allahdadi A, 2007. Some metabolite role in osmotic regulation mechanism of medic *Medicago laciniata* (L.) Mill under drought stress. *Iranian Journal of Crop Sciences* 8: 90–105 (In Persian with English abstract).
- Gimenez-Ibanez S, Solano R, 2013. Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk

- in defense against pathogens. *Frontiers in Plant Science* 4: 72.
- Gomes EV, Ulhoa CJ, Cardoza RE, Silva RN, Gutiérrez S, 2017. Involvement of *Trichoderma harzianum* Epl-1 protein in the regulation of Botrytis virulence- and tomato defense-related genes. *Frontiers in Plant Science* 8, 880.
- Habibollahi M, Kavousi HR, Lohrasbi-Nejad A, Alsadat Rahpeyma S, 2020. Cloning, characterization and expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene (CcPAL) from cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 18 (100253): 1–9 (In Persian with English abstract).
- Haggag WM, Abo-sedera SA, 2005. Characteristics of three *Trichoderma* species in peanut haulms compost involved in biocontrol of cumin wilt disease. *International Journal Agriculture Biology* 7: 222–229.
- Haghanifar S, Hamidi A, Ilikae MN, 2018. Effect of treatment by Carboxin Thiram fungicide and Imidacoloroprid pesticide on some indicators of seed germination and vigor of maize (*Zea mays* L.) single cross hybrid704. *Iranian Journal of Seed Science and Technology* 7(1): 65–83 (In Persian with English abstract).
- Iseri OD, Sahin F, Hberal, M, 2014. Sodium chloride priming improves salinity responses of tomato at seedling stage. *Journal of Plant Nutrition* 37: 374–392.
- Jiang Y, Xia N, Li X, Shen W, Liang L, et al., 2011. Molecular cloning and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (LrPAL) from *Lycoris radiata*. *Molecular Biology Reports* 38: 1935–1940.
- Karamian R, Kamalnejade J, 2017. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous seed extract of *Cuminum cyminum* L. and evaluation of their biological activities. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* 26 (5): 128–141.
- Khaledi N, 2021. Investigation of constituents and antifungal effects of essential oils of native cumin seed populations on seed-borne fungi. *Iranian Journal of Seed Science and Research* 8: 325–351 (In Persian with English abstract).
- Khaledi N, Dehshiri A, 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.
- Kosyk OI, Khomenko I, Batsmanova LM, Taran YN, 2017. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin content in different varieties of lettuce under the cadmium influence. *The Ukrainian Biochemical Journal* 89: 85–91.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, et al., 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102: 771–776.
- Lyons R, Stiller J, Powell J, Rusu A, Manners JM, et al., 2015. *Fusarium oxysporum* triggers tissue-specific transcriptional reprogramming in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 10: e0121902.
- Mamenko TP, Khomenko YO, Kots SY, 2019. Influence of fungicides on activities of enzymes of phenolic metabolism in the early stages of formation and functioning of soybean symbiotic apparatus. *Regulatory Mechanisms in Biosystems* 10 (1): 111–116.
- Marthandan V, Greetha R, Kumutha K, Ranganathan VG, Karthikeyan A, et al., 2020. Seed priming: a feasible strategy to enhance drought tolerance in crop plants. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 8258.
- Mishra B, Sangwan NS, 2019. Amelioration of cadmium stress in *Withania somnifera* by ROS management: active participation of primary and secondary metabolism. *Plant Growth Regulation* 87: 403–412.
- Moradi A, Piri R, 2018. Plant growth promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in Cumin (*Cuminum cyminum* L.) during germination stage. *Journal of Plant Process and Function* 6(22): 47–54.
- Namdeo AG, 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. *Pharmacognosy Reviews* 1: 69–79.
- Nooras Mofrad N, Farrokhi Nejad R, Alizadeh A, 2005. Genetic diversity in populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, the causal agent of cumin wilts in Khorasan using vegetative compatibility groups. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41: 437–453.
- Özer G, Bayraktar H, 2015. Determination of fungal pathogens associated with *Cuminum cyminum* in Turkey. *Plant Protection Science* 51: 74–79.
- Patel SM, Patel BK, 1998. Inhibiting effect of different fungal bioagents on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* causing cumin wilt. *Annals of Plant Protection Sciences* 6: 25–27.
- Pereira DM, Valentao, P, Pereira, JA, Andrade PB, 2009. Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules* 14: 2202–2211.
- Piri R, Moradi A, Balouchi H, Salehi A, 2019. Improvement of cumin (*Cuminum cyminum*) seed performance under drought stress by seed coating and biopriming. *Scientia Horticulturae* 257: 1–8.
- Plodpai P, Chuenchitt S, Petcharat V, Chakthong S, Voravuthikunchai SP, 2013. Anti-Rhizoctonia solani activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. *Crop Protection* 43: 65–71.

- Pu GB, Dong-Ming M, Chen JL, Ma LQ, Wang H, *et al.*, 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Report* 28: 1127–1135.
- Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R, 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant and Soil* 239: 55–68.
- Rezalou Z, Shahbazi S, Askari H, 2020. Effect of biopriming with *Trichoderma* on germination and vegetative characteristics of sweet corn, sugar. *Iranian Journal of Seed Science and Technology* 8: 199–210 (In Persian with English abstract).
- Safari E, Sharifi R, Abbassi S, 2020. Inhibition of wheat take-all disease using defenses-inducing compounds. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 9(3):1–10.
- Sandeep R, Patel RL, 2011. Evaluation of different fungicides as seed dressers against cumin wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini*. *Plant Disease Research* 26 (1): 20–25.
- Sharma YK, Sriram S, Lodha SK, Ramanujam B, Anwer MM, 2012. Biological control of cumin wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini*) using *Trichoderma* species and other antagonists. *3rd Global Conference Plant Pathology for Food Security*, Jan 10-13, Maharana Pratap University of Agriculture and Technology, Udaipur, Rajasthan, India.
- Sharma YK, Kant K, Saxena SN, Anwar MM, Lodha SK, *et al.*, 2011. Effect of biopriming with antagonists on wilt and seedling growth of cumin. *International Journal of Seed Spices* 1: 56–59.
- Shoresh M, Harman GE, Mastouri F, 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* 48: 21–43.
- Siddhuraju P, Becker K, 2003. Antioxidant properties of various extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* L.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2144–2155.
- Siddiqui ZS, Ahmed S, 1996. Effect of systemic fungicides on seed germination, seedling growth and phenolic content of *Vigna radiata*. *Pakistan Journal of Botany* 28: 191–193.
- Siddiqui ZS, Zaman A, 2004. Effects of benlate systemic fungicide on seed germination, seedling growth, biomass and phenolic contents in two cultivars of *Zea mays* L. *Pakistan Journal of Botany* 36 (3): 577–582.
- Singh V, Sanmukh R, Kumar B, Bahadur H, 2016. *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops. *Microbiological Research* 193: 74–86.
- Singh HB, Shrivastava S, Singh A, Katiyar RS, 2007. Field efficacy of *Trichoderma harzianum* application on wilt disease of cumin caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*. *Journal of Biological Control* 21: 317–319.
- Singh UB, Malviya D, Singh S, Kumar M, Sahu PK, *et al.*, 2019. *Trichoderma harzianum*- and methyl jasmonate-induced resistance to *Bipolaris sorokiniana* through enhanced phenylpropanoid activities in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Microbiology* 10: 1–19.
- Tabatabaei SA, Shakeri E, 2014. Effect of seed priming on germination traits Cumin (*Cuminum cyminum*) under drought and salinity stresses. *Arid Biome Scientific and Research Journal* 4: 66–74.
- Viani A, Pouralibaba HR, Abolfathzadeh S, 2021. Effect of lentil seed priming as hydropriming, biopriming and with resistance inducing materials in management of *Fusarium* wilt disease under laboratory, glasshouse and field conditions. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 22: 10(4):47–59.
- Vinale F, Sivasithamparam K, 2020. Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. *Phytotherapy Research* 34: 2835–2842.
- Vyas RK, Mathur K, 2002. *Trichoderma* spp. in cumin rhizosphere and their potential in suppression of wilt. *Indian Phytopathology* 55: 455–457.
- Wang Z, Li JZ, Jia CH, Li JZP, Xu BY, *et al.*, 2016. Molecular cloning and expression of four phenylalanine ammonia lyase genes from banana interacting with *Fusarium oxysporum*. *Biologia Plantarum* 60 (3): 459–468.
- Yousefi K, Riahi-Madvar A, Baghizadeh A, 2015. Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavone synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on *Cuminum cyminum* L. endemic from Iran. *Iranian Journal of Biology* 28 (1): 210–223 (In Persian with English abstract).
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R, 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283–333.

