Journal of Vegetables Sciences, Spring & summer 2025, Vol 9, No 17(1), Pages 201-222

doi: 10.22034/iuvs.2023.2013385.1321 Article Type: Research Online ISSN: 2676-4822

Effect of the pure extract of some medicinal plants on the control of crown gall in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.)

Omid Sohrabi[1*], Abdullah Hatamzadeh[2], Azim Ghasemnezhad[3], Habibollah Samizadeh[4] , Vahid Erfani-Moghadam [5]

1- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences and Engineering (Medicinal plant), Faculty of Agriculture Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran.

2- Professor, Department of horticultural sciences and engineering, Faculty of Agriculture Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3- Professor Department of horticultural sciences and engineering, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran

4- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

5- Assistant Professor, Department of Nanotechnology, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

[*]**Corresponding author:** o.sohrabi@razi.ac.ir

(**Received:** 11 October 2023 **Revise:** 14 November 2023 **Accepted:** 21 November 2023)

Extended Abstract

1. **Introduction:** Today, due to the indiscriminate use of chemical fertilizers and poisons during production, humans and agricultural products have suffered a lot of physical and environmental damage. With the advancement of technology, new findings from researchers and scientists, as well as the discovery of the positive effects of natural compounds, the approach of using medicinal plants has taken the place of chemicals and is progressing day by day. Plant metabolites in plants have various roles and functions. Generally, play a role in protecting the plant and contributing to some biological mechanisms such as pollination, resistance to pathogenic agents, and living enemies of the plant. With this point of view, researchers presented allelopathic plants for sustainable agricultural production, and their products, which show herbicidal, antifungal, insecticidal, and pesticide properties, have received much attention. These biological compounds or secondary metabolites have different types. Biochemically, these compounds are included in categories such as essential oils, phenols, alkaloids, steroids, glycosides, etc. These compounds, today, have a special place in the industry in various fields such as medicine, pesticides and insecticides, spices, and edible colors. These compounds also have important effects inside the plant. The role of these compounds on growth regulators, resistance against pests and diseases in plants, and defense against biological disturbance agents. In this regard, in recent decades, many plant extracts have been widely researched and investigated to examine their effect on the prevention and control of diseases. A large number of reports have documented that the use of plant extracts helps control certain plant and animal diseases. Based on this and considering the goal of organic production and green agriculture, extracts of six medicinal plants were investigated on the growth process and control of crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*) disease in tomato plants.
2. **Materials and Methods:** The present research was conducted in two parts, in vitro and ex vitro, to investigate the effect of extracts of some medicinal plants on the control of crown gall disease (*Agrobacterium tumefaciens*) in a completely randomized design. For this purpose, in an *ex-vitro* (greenhouse) experiment, after contamination of the crown gall through wounding with T9 strain and the appearance of symptoms of contamination of the site of gall formation, were treated with the extracts of *Juniperus sabina*, *Taraxacum officinale*, *Dorema aucheri*, *Rheum ribes*, *Conocarpus erectus,* and *Allium jesdianum* were treated in three concentrations of 1000, 5000, and 8000 mg/L. The investigated traits in this experiment included gall weight, gall diameter, auxin and cytokinin regulator levels, total phenol, and total flavonoid. *In-vitro* experiment was conducted by two types of protocols. First protocol to investigate the effect of the extracts on the gall bacteria growth, directly, plant extracts were added to the LB culture medium, and the bacteria were cultivated to check the inhibitory effect of the extracts. Second protocol, *Agrobacterium tumefaciens* was cultured in LB medium, and then the effect of plant extracts was investigated by placing disks containing extracts in concentrations of 1000, 5000, and 8000 mg/L.
3. **Results and Discussion:** It was observed that under the effect of using plant extracts in the greenhouse, the weight of gall decreased by 23% and the best result was observed in the treatment of *Taraxacum officinale* with 8000 mg/L. In this regard, the growth diameter trend of gall decreased between 4-60% compared to the control. The best result was observed in the treatment of *Dorema aucheri* 5000 mg/L.

The growth regulator of auxin had a downward trend, and cytokinin also decreased by 1%. In examining the direct effect of the extracts on the bacteria cultured in the LB environment, no significant difference was observed in both protocols. The results showed that plant extracts had a significant difference at the levels of 1 and 5%. Based on this, the effect of plant extracts on the diameter of crown gall showed a significant difference at 5% and in other traits such as weight of gall, total phenol, and flavonoid, 1% significant difference was observed compared to the control plant. Although this reduction process did not prevent gall formation, the growth process slowed down compared to the control. Also, the lowest amount of total phenol and flavonoid (2.123 and 1.077 mg/g FW) was observed in the control treatment. The effect of different concentrations of the extracts was different (all treatments), but in general, the application of plant extracts could increase plant metabolites in the gall mass compared to the control. Related to the difference between treatments, an increasing trend in the amount of total phenols and flavonoids was observed with the increase in the concentration of the extracts. The observed trend differs, and this difference is likely related to the variation in the internal levels of secondary metabolites among different plants. Now, by comparing the results of biochemical, morphological, and growth regulators in the plant, it is clear that this decrease in the amount of auxin and cytokinin levels has shown itself in the morphology of the collar gall.

4. **Conclusion:** Biochemical analysis of plant extracts showed that the used extracts are rich in phenolic, flavonoid, antioxidant, and auxin compounds. According to the obtained results, it was found that the pure extracts of the mentioned medicinal plants were able to have an inhibitory effect on the growth of crown gall under greenhouse conditions. As mentioned, plants activate their defense system when they are exposed to external compounds. Non-significant difference in *in-vitro* conditions and significant difference in plant conditions (*ex-vivo*) related to several issues. Probably, the observed antioxidant and phytohormone contents and the stimulation of the plant's defense system (SAR) are the main reasons for the observed results.

***Keywords*:** Agrobacterium, Auxin, Antioxidant activity, Plant for plant, Organic.

Citation: Sohrabi, O., Hatamzadeh, A., Ghasemnezhad, A., Samizadeh, H. & Erfani Moghadam, V. (2025). Effect of the pure extract of some medicinal plants on the control of crown gall in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Vegetables Sciences*, 17(1), 201-222. doi: 10.22034/iuvs.2023.2013385.1321

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/ by/4.0).

دوفصلنامه علمی علوم سبزی‌ها، سال۹ ، دوره ۱۷، شماره۱، بهار و تابستان، صفحات (۲۲۲-۲۰۱)

شاپا الکترونیکی: ۴۸۲۲-۲۶۷۶ نوع مقاله: پژوهشی doi: 10.22034/iuvs.2023.2013385.1321

تأثیر عصاره خالص برخی از گیاهان دارویی بر کنترل گال طوقه در گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.)

امید سهرابی[1*]، عبدالله حاتم‌زاده[2]، عظیم قاسم‌نژاد[3]، حبیب‌الله سمیع‌زاده[4]، وحید عرفانی‌مقدم[5]

۱- استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی (گیاهان دارویی)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲- استاد گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استاد گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

۴- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۵- استادیار گروه نانو فناوری، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

***نویسنده مسئول:** o.sohrabi@razi.ac.ir

(**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۲/۰۷/۱۹ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۸/۲۳ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۸/۳۰)

چکیده

امروزه استفاده بی‌رویه و نامناسب از مواد شیمیایی در تمام زمینه‌های زندگی بشر، سبب ایجاد مشکلات متعددی برای خود بشر و محیط‌زیست گردیده است. تحقیق حاضر در دو بخش درون و برون‌شیشه‌ای، با هدف بررسی اثر عصاره برخی از گیاهان دارویی بر کنترل بیماری گال طوقه (*Agrobacterium tumefaciens*) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. به این منظور در آزمایش برون‌شیشه‌ای (گلخانه) پس از آلوده‌سازی طوقه از طریق زخم‌زنی با سویه T9 و بروز علائم آلودگی، محل تشکیل گال با عصاره گیاهان اورس (*Juniperus sabina*)، گل‌قاصدک (*Taraxacum officinale*)، کندل (*Dorema aucheri*)، ریواس (*Rheum ribes*)، کهورآمریکایی (*Conocarpus erectus*) و بن‌سرخ (*Allium jesdianum*) در سه غلظت ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از طریق تزریق به ساقه گیاه، تیمار شد. نتایج نشان داد که تحت تأثیر استفاده از عصاره‌های گیاهی در گلخانه، وزن توده گال تا ۲۳ درصد کاهش یافت که بهترین نتیجه در تیمار گل‌قاصدک ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. در همین راستا، روند رشدی توده گال بین ۶۰ -۴ درصد در مقایسه با شاهد، کاهش یافت. بهترین نتیجه در تیمار کندل ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده گردید. تنظیم‌کننده رشدی اکسین روند نزولی داشت و سایتوکینین نیز به میزان ۱ درصد کاهش یافت. در بررسی تأثیر مستقیم عصاره‌ها بر باکتری‌های کشت‌شده در محیط LB، اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. آنالیز بیوشیمیایی عصاره‌های گیاهی نشان داد که عصاره‌های استفاده شده غنی از ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، آنتی-اکسیدانی و اکسین هستند. احتمالاً محتویات آنتی‌اکسیدانی و فیتوهورمونی مشاهده شده و تحریک سیستم دفاعی گیاه، عامل اصلی نتایج به دست آمده باشد.

***واژه‌های کلیدی*: ارگانیک، اکسین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، گیاه برای گیاه، آگروباکتریوم.**

استناد: سهرابی، ا.، حاتم‌زاده، ع.، قاسم‌نژاد، ع.، سمیع‌زاده، ح.، عرفانی‌مقدم، و. (۱۴۰۴). تأثیر عصاره خالص برخی از گیاهان دارویی بر کنترل گال طوقه در گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.)، *علوم سبزی‌ها*، ۱۷(۱)، ۲۲۲-۲۰۱.

حق چاپ:

حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به‌صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل‌دسترس است.

مقدمه

با پیشرفت تکنولوژی، یافته‌های جدید محققان و دانشمندان و کشف اثرات مثبت ترکیبات طبیعی، رویکرد استفاده از گیاهان دارویی جایگاه مواد شیمیایی را تصاحب نموده است و روز به روز در حال پیشرفت می‌باشد. استفاده از مواد شیمیایی، اثرات مخرب زیستی و غیرزیستی را به ارمغان خواهد آورد. اما امروزه با توجه به شناخت فواید این گیاهان و کشفیات جدید دانشمندان، توجه و بازگشت به سمت استفاده از گیاهان دارویی در حال افزایش می‌باشد (Vasisht *et al*., 2016). متابولیت‌های گیاهی در گیاهان دارای نقش و عملکردهای گوناگونی هستند و به طور کلی در محافظت از گیاه و کمک به برخی مکانیسم‌های زیستی از جمله گرده‌افشانی، مقاومت در مقابل عوامل پاتوژنی و دشمنان زنده گیاه، نقش دارند. این ترکیبات زیستی یا متابولیت-های ثانویه دارای انواع گوناگونی هستند. از نظر بیوشیمیایی این ترکیبات در درون دسته‌هایی از جمله اسانس‌ها، فنل‌ها، آلکالوئیدها، استروئیدها، گلیکوزیدها و غیره قرار می‌گیرند. این ترکیبات امروزه در صنعت دارای جایگاه ویژه‌ای در زمینه‌های مختلفی از جمله دارو، آفت‌کش و حشره‌کش، ادویه‌جات و رنگ‌های خوراکی هستند (Petrovska *et al*., 2012).

علاوه بر نقشی که متابولیت‌های ثانویه بر خارج از خود گیاه دارند، این ترکیبات در خود گیاه نیز دارای اثرات مهمی هستند. نقش این ترکیبات بر تنظیم‌کننده-های رشدی، مقابله با آفات و بیماری‌ها در گیاهان، نقش مثبت در گرده‌افشانی (جذب عوامل گرده‌افشان) و نقش دفاعی در دور کردن عوامل مزاحم زیستی مشخص گردیده است. این ترکیبات از این طریق توانایی زنده-مانی و حیات را در گیاهان افزایش خواهند داد (Karuppusamy, 2009; Sumner *et al*., 2015). بر همین اساس، آللوپاتی یک پدیده اکولوژیکی است که به موجب آن گیاه از طریق آزادسازی ترکیبات شیمیایی/ ثانویه بر رشد، فیزیولوژی و رشد گیاه دیگری که در مجاورت آن زندگی می‌کند، تأثیر می‌گذارد (Farooq *et al*., 2011; Hussain *et al*., 2011; Pan *et al*., 2015). با این دیدگاه، محققان گیاهان آللوپاتیک را برای تولید پایدار کشاورزی ارائه دادند و محصولات آن‌ها که خصوصیات علف‌کشی، ضد قارچی، حشره‌کشی و آفت‌کشی را نشان می‌دهند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Khamare *et al*., 2022; Ain *et al*., 2023). گیاهان آللوپاتیک که مواد شیمیایی در محیط آزاد می‌کنند، زیست‌تخریب‌پذیر هستند (Duke *et al*., 2002). در همین راستا، در دهه‌های اخیر، بسیاری از عصاره‌های گیاهی به طور گسترده به منظور بررسی اثر آن‌ها بر مهار و کنترل بیماری‌ها مورد تحقیق و بررسی گرفت و تعداد زیادی از گزارش‌ها به طور مستند تاکید نمودند که استفاده از عصاره‌های گیاهی بیماری-های گیاهی و جانوری را کنترل می‌کنند (Milutinović *et al*., 2021; Akhlaghi *et al*., 2021). در بررسی که در خصوص تاثیر عصاره دو گیاه گارم زنگی (*Terminalia catappa*) و تارو یا گوش-فیل خوراکی (*Colocasia esculenta*) انجام گردید، فعالیت عصاره گیاه گارم زنگی بر روی ده باکتری گرم منفی و مثبت و ۵ قارچ بررسی گردید. نتایج آزمایش از طریق ناحیه بازدارندگی دیسک‌های حاوی باکتری‌ها و قارچ بررسی گردید (Chanda *et al*., 2013). در مطالعه‌ای، تاثیر عصاره برخی گیاهان دارویی از جمله جنتیانا (*Gentiana asclepiadea* L.)، گل راعی (*Hypericum perforatum* L.)، مرزه زمستانی (*Satureja montana* L.) و بومادران (*Achillea millefolium* L.) بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از جمله سه باکتری گرم مثبت (*E. faecalis*[1]، *L. monocytogenes*[2] و *S. aureus*[3]) و دو باکتری گرم منفی (*E. coli*[4] و *P. aeruginosa*[5]) مورد بررسی قرار گرفت (Milutinović *et al*., 2021). غلظت عصاره های گیاهی در محدوده ۰.۰۱۶ تا ۲۰ میلی‌گرم بر میلی-

[1] *Enterococcus faecalis*
[2] *Listeria monocytogenes*
[3] *Staphylococcus aureus*
[4] *Escherichia coli*
[5] *Pseudomonas aeruginosa*

لیتر متغیر بود. نتایج نشان داد که به طور کلی، باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، نسبت به عصاره‌های گیاهی حساس‌تر بودند. حساس ترین پاتوژن به عصاره‌های گیاهی مورد آزمایش، *L. monocytogenes* بود که با کمترین مقدار MIC برابر با ۰.۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داده شد. از طرفی رشد باکتری‌های *S. aureus* و *L. monocytogenes* توسط همه عصاره‌ها مهار شدند. باکتری *E. coli* و *C. albicans* فقط به مرزه زمستانی و جنتیانا حساس بودند. MIC معنادار به ترتیب از غلظت ۵ و ۲۰ میلی-گرم در میلی‌لیتر از دو عصاره گیاه مرزه زمستانی و جنتیانا برای *E. coli* و ۲۰ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای *C. albicans* مشاهده گردید (Milutinović *et al.*, 2021). بیماری‌های گیاه یکی از فاکتورهای محدودکننده در کشاورزی هست. علاوه بر این، در تولید محصولات کشاورزی همواره کاهش مصرف مواد شیمیایی مدنظر قرار گرفته است. این نگرانـــی‌ها ما را به سمت یافتن یک روش مناسب که در تضاد با سلامتی مصرف‌کننده نباشد، سوق می‌دهد. راهبرد مبارزه بیـــولوژیک روشی هست که از گذشته تا امروز مورد استفاده قرار گرفته است. این روش به عنوان روشی در جهت حفظ محیط‌زیست امروزه در کل دنیا مورد قبول واقع شده است (Cazorla & Mercado-Blanco, 2016). در همین راستا، چالش‌ها و دیدگاه‌های مختلفی در خصوص کنترل بیماری‌های درختان با به‌کارگیری عوامل کنترل بیولوژیک (BCA[1]) در جلوگیری و کنترل بیماری‌ها، مد نظر قرار گرفته است (Milgroom & Cortesi 2004; Pliego & Cazorla, 2013). در تحقیقی دیگر اثر ضدباکتریایی اسانس نعناع بر گال طوقه در گیاه گوجه‌فرنگی انجام گردید و مشاهده شد که در غلظت‌های ۲۰۰ و ۲۵۰ هیچگونه گال طوقه‌ای دیده نشد. نتایج نشان داد که یک همبستگی مثبتی بین افزایش غلظت و کاهش وزن تومور مشاهده گردید (Hsouna *et al.*, 2019).

گوجه‌فرنگی یکی از سبزیجات پرمصرف جهان بعد از سیب‌زمینی و قبل از پیاز است. در سال ۲۰۱۱ تقریبا ۱۶۰ میلیون تن گوجه‌فرنگی در جهان تولید شد و هفتمین محصول باغبانی از نظر اهمیت بعد از ذرت، برنج، گندم، سیب‌زمینی، سویا و کاساوا می‌باشد (Bergougnoux, 2014). از نظر گیاه‌شناسی گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) از خانواده Solanaceae است. گوجه‌فرنگی، بوته‌ای کوچک است که میوه سبز رنگ با بوی صابون دارد که حاوی طعم بسیار محرک است. طول گیاه تقریبا بین ۵۰ تا ۸۰ سانتی‌متر است و دارای ساقه بسیار ضعیف چوبی می‌باشد (Gautam, 2013; Bahaadini *et al.*, 2025). ساقه این گیاه کرک‌دار بوده و برگ‌ها کرک‌دار و بیضی شکل هستد و از به هم پیوستن برگچه‌های کوچک تشکیل شده است که به صورت متناوب بر روی ساقه قرار گرفته است. گل آذین ۶ تا ۱۲ گل تولید می کند. گل‌ها زرد رنگ، دوجنسی و منظم هستند (Massimi, 2021). یکی از تکنیک‌های جدید که به حفظ بهره‌برداری و کاهش خسارات بیماری‌های گیاهی کمک می‌کند استفاده از ترکیبات طبیعی و عصاره‌های گیاهی به عنوان جایگزینی برای سموم شیمیایی به منظور مبارزه با بیماری‌های گیاهی می‌باشد (RM & Canellas, 2022; Sadeghi *et al.*, 2023). بیماری های گیاهی یکی از عوامل محدودکننده‌ی تولید گوجه فرنگی در دنیاست. علت اصلی این بیماری‌ها قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌باشد که منجر به خسارت شدید در تولید گوجه‌فرنگی می‌شود (Panno *et al.*, 2021). یکی از بیماری‌های مهم که امروزه مشکلات بسیاری را در گیاهان مختلف از جمله صیفی‌جات، گیاهان زینتی و درختان میوه، ایجاد نموده است، بیماری گال طوقه می باشد. باکتری اگروباکتریوم جز دسته باکتری‌های گرم منفی، از لحاظ شکل و مورفولوژی میله‌ای، اسپور ندارد، در درون خاک رشد می‌نماید و توانایی تحرک دارد. بیشتر گونه‌های این جنس هوازی هستند اما در برخی

[1] Biological Control Agents

سویه‌ها در زمان فراهمی نیترات، در شرایط بی‌هوازی هم زنده می‌مانند. بیشتر جدایه‌ها توانایی رشد در بافت گیاه با فشار پایین اکسیژن را دارند. باکتری‌های این جنس معمولا در گیاهان میزبان و در درون خاک، جهت فراهمی نیاز خود به کربن از کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی استفاده می‌کنند. معمولا دامنه دمایی مناسب برای رشد این باکتری ۲۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد گزارش گردیده است. این باکتری در محیط LB به خوبی رشد می‌کند (Brown *et al.*, 2023).

با توجه به سودمندی گیاهان دارویی و مخرب بودن بیماری گال طوقه، در راستای کشاورزی ارگانیک، گیاهان دارویی مورد بررسی در این تحقیق از گیاهان موجود در فلور ایران بوده‌اند که شامل اورس (*Juniperus sabina*)، گل‌قاصدک (*Taraxacum officinale*)، ریواس (*Rheum ribes*)، بن‌سرخ (*Allium jesdianum*)، کندل کوهی (*Dorema aucheri*) و کهور آمریکایی (*Conocarpus erectus*) می‌باشد. این گیاهان بر اساس بررسی‌های انجام شده شامل طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی هستند که می توانند تاثیر آنها را در روند رشدی و کنترل عوامل بیماری‌زا چه در انسان و چه در سایر گیاهان مورد بررسی قرار داد. بر همین اساس و با توجه به هدف تولید ارگانیک و کشاورزی سبز، عصاره شش گیاه دارویی بر روند رشدی و کنترل بیماری گال طوقه در گیاه گوجه فرنگی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

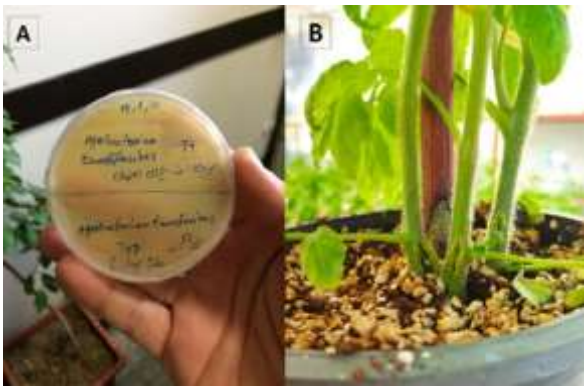
تیمارها شامل عصاره خالص شش گیاه دارویی ریواس، بن‌سرخ، کندل، کهور آمریکایی و گل‌قاصدک بودند. آزمایش در خصوص تاثیر این عصاره‌ها بر باکتری گال‌زا (A.T: *Agrobacterium tumefaciens*) سویه T9 بود که در دو آزمایش بررسی گردید.

آزمایش اول: آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، انجام گردید. عصاره گیاهان مورد نظر، با سه غلظت ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه و هر هفته تیمار انجام گردید. شرایط گلخانه شامل رطوبت نسبی ۵۵ تا ۶۵ درصد، میزان شدت نور ۳۵ تا ۴۵ هزار لوکس و دمای ۲۳-۲۵ در روز و ۱۵-۱۸ درجه سانتی گراد در شب بود. بستر کشت ترکیب پرلیت، کوکوپیت و پیت‌ماس به نسبت ۵۰-۳۰-۲۰ تعیین گردید. از زمان جوانه‌زنی بذور تا مرحله چهاربرگی تغذیه گیاهان انجام نشد. پس از چهاربرگی با توجه به شرایط رشدی گیاه و بررسی وضعیت ظاهری برگ و ریشه‌ها، با کود کامل حاوی عناصر ماکرو از طریق آبیاری و عناصر میکرو از طریق محلول پاشی، تغذیه گیاهان انجام شد. باکتری گال‌زا (A.T: *Agrobacterium tumefaciens*) سویه T9مورد استفاده در تحقیق از آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی دانشگاه اصفهان تهیه گردید. بذور گوجه‌فرنگی رقم فلات (CH) در سینی‌های نشا، کشت گردید. گیاهان گوجه‌فرنگی حدودا ۱۵ روز بعد از چهاربرگی شدن و در زمانی که ساقه به قطر یک تا نیم‌سانت رسید (حدودا اندازه قطر یک مداد)، از طریق زخم‌زنی به باکتری آلوده شده (شکل ۱) (New & Kerr, 1972).

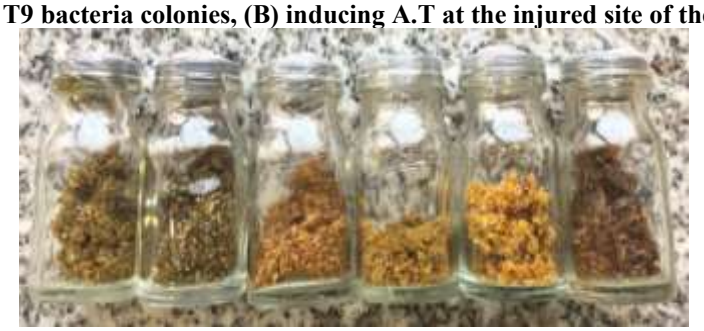
جمع‌آوری گیاهان، عصاره‌گیری و تهیه پودر خشک عصاره خالص

همه گیاهان به غیر از کهور آمریکایی و اورس، در فصل بهار (فروردین ماه) در استان کرمانشاه از منطقه کوهستانی در رشته کوه‌های زاگرس (دالاهو) در قسمت غربی استان کرمانشاه (34°14'-34°24' N,45°52'-46°14'E) برداشت و بر اساس منبع موجود شناسایی گردید (Nemati & Jalilian, 2012). برگ درخت کهور آمریکایی نیز در همین تاریخ (فروردین ماه) از شهر شیراز (29°36'N,52°31'E) تهیه و توسط گروه گیاه-شناسی دانشگاه شیراز، جنس و گونه این گیاه تعیین گردید. میوه گیاه اورس نیز از جنگل‌های توسکستان گلستان (36°50'N, 54°26'E) تهیه و توسط گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی منابع طبیعی گرگان، شناسایی گردید. گیاهان بعد از جمع‌آوری، سایه خشک شده و با نسبت ۱ به ۱۰ (گیاه به حلال) عصاره‌گیری گردید. سپس عصاره بدست آمده توسط

دستگاه روتاری مدل (IKA HB10) تغلیظ گردید و در نهایت از طریق دستگاه فریزدرایر مدل (Christ Beta 2-8 LB plus, made in Germany)، پودر خشک از عصاره خالص آن‌ها تهیه گردید (شکل ۲).



شکل ۱- (A) کلونی‌های باکتری T9 ، (B) القا باکتری به گیاهان گوجه‌فرنگی در محل زخم
Figure 1 - (A) T9 bacteria colonies, (B) inducing A.T at the injured site of the tomato plant



شکل ۲- پودر عصاره خالص گیاهان دارویی
Figure 2- powder of pure medicinal plant extract

آماده سازی عصاره‌ها و باکتری

عصاره‌های گیاهی، در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در آب مقطر، تهیه گردیدند. برای این مرحله، اگروباکتریوم تهیه شده در محیط کشت LB (Luria-Bertani Agar) جهت ازدیاد، در انکوباکتور دمای ۲۸ درجه سانتیگراد، در محیط LB کشت گردید. جهت تهیه محیط LB جامد، ۰/۷۵ گرم تریپتون، ۰/۲۵ گرم مخمر و ۰/۵ گرم آگار در ۵۰ سی‌سی آب مقطر حل گردید و اتوکلاو شد و سپس جهت کشت باکتری، در پتری دیش توزیع گردید .

اعمال تیمار

در این مرحله، زمانی که قطر ساقه بوته‌های گوجه‌فرنگی به اندازه یک مداد شد (حدودا ۰/۵ تا ۱ سانتیمتر)، سوسپانسیونی از اگروباکتریوم با غلظت OD:0/2 تهیه گردید و از طریق زخم زنی به گیاهان تزریق گردید (New & Kerr, 1972). برای این عمل، از دیسک‌های کشت شده با اگروباکتریوم، مقدار باکتری برداشته و در آب مقطر حل گردید و خوب مخلوط شد. سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر غلظت آن سنجش گردید. بعد از ظاهر شدن گال طوقه، هر هفته cc ۲ عصاره گیاهان مورد نظر به صورت تزریقی ازطریق سرنگ، وارد توده گال گردید (شکل ۳).

شکل ۳- (A) تثبیت آلودگی گیاه با باکتری، (B) تزریق عصاره گیاهان دارویی به بافت گال طوقه

Figure 3- (A) Infection fixation by A.T., (B) Injection of medicinal plant extract into the crown gall tissue

صفات مورد بررسی

بعد از پایان دوره تزریق، صفات زیر اندازه‌گیری گردید:

وزن و قطر گال طوقه

توده گال را برش داده با ترازوی دیجیتال وزن توده اندازه‌گیری گردید. جهت اندازه‌گیری قطر گال، قطر ساقه تلقیح شده در مرحله تلقیح اندازه‌گیری گردید. برای این مورد، قطر ساقه در سه قسمت اندازه‌گیری شد. سپس دو مرحله دیگر، اندازه‌گیری به همین روش انجام گردید. در نهایت با محاسبه آماری نسبت به مرحله اول، میزان رشد قطر گال نسبت به گیاهان شاهد و روز اول محاسبه شد.

سنجش میزان تنظیم‌کننده اکسین و سایتوکینین (به ترتیب معادله ۱ و۲)

از روش (Pan *et al*., 2010) برای سنجش با اندکی تغییرات، استفاده گردید. میزان ۵۰ میلی‌گرم از توده گال داخل تیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج، شامل دوپروپانول (2-propanol) -distilled H_2O و HCL بود. نسبت بین این ترکیبات به ترتیب ۱۰۰ میلی‌لیتر، ۵۰ میلی‌لیتر و ۱۰۰ میکرولیتر (۲:۱: ۰/۰۰۲) بود. سپس میکروتیوب‌ها در سانترفیوژ با دور 100 rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از تمام این زمان، ۱ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به نمونه‌ها اضافه گردید و دوباره مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه برروی شیکـــر با دور 100 rpm قرار داده شد. بعد از این مرحله، نمونه‌ها در سانترفیوژ یخچال‌دار ۴ درجه، به مدت ۵ دقیقه در 13000 g قرار داده شد. بعد از این مرحله دو فاز در درون میکروتیوب ایجاد گردید. با سرنگ استریل قسمت پایینی برداشته شد. تمام این مراحل در دمای ۴ درجه انجام گردید. سپس عصاره مورد نظر از فیلتر ۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده به دستگاه گازکروماتوگرافی (HPLC) تزریق گردید.

۱- معادله خط اکسین (IAA):

$y = 29274517.66\ x - 47311910.50\ (R^2 = 0.99)$

۲- معادله خط سایتوکینین (زئاتین):

$y = 522415x - 521459\ (R^2 = 0.99)$

فنل کل

جهت اندازه‌گیری میزان فنل‌کل از پروتکل اشاره شده، پیروی گردید .(Ordonez *et al*., 2006) در ابتدا، از توده گال ایجاد شده، ۱ گرم بافت برداشته شد و با ده میلی‌لیتر متانول عصاره‌گیری گردید. سپس از این عصاره متانولی برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی، استفاده گردید. از عصاره متانولی تهیه شده در یخچال، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و ۲/۸ میلی‌لیتر آب دیونیزه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (Na_2CO_3) 2 درصد و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین ($C_{10}H_5NaO_5S$) 50 درصد به آن اضافه گردید. نمونه‌ها بر روی دستگاه ورتکس جهت مخلوط شدن مناسب، قرار داده شد و سپس نیم ساعت در مکان تاریک نگهداری گردید. مکان تاریک جهت کاهش هرگونه تخریب نوری و کاهش راندمان خطا می‌باشد. قرائت در طول موج ۷۲۰ نانومتر از طریق دستگاه

اسپکتوفتومتر انجام گردید. جهت رسم منحنی استاندارد برای تعیین مقدار فنل، از اسیدگالیک برای استاندارد استفاده گردید (معادله ۳) و اعداد بر اساس معادل میلی‌گرم اسیدگالیک ($C_7H_6O_5$) در گرم وزن‌تر گیاه بیان شد.

۳- معادله خط: $y = 0.0005x + 0.0257$ ($R^2 = 0.99$)

فلاونوئید کل

سنجش میزان فلاونوئید گیاهان تیمار شده، بر اساس پروتکل زیر انجام گردید (Kim *et al*., 2002). ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی متانولی به ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ($AlCl_3$) ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم (CH_3CO_2K) یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد. سپس نمونه‌ها ورتکس گردیدند و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. برای تعیین منحنی استاندارد در این روش از کوئرستین استفاده شد (معادله ۴).

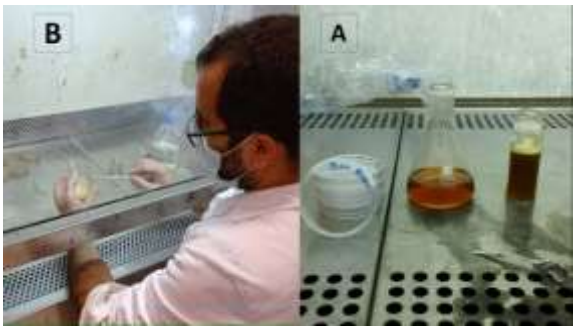
۴- معادله خط: $y = 0.002x - 0.0282$ ($R^2 = 0.99$)

آزمایش دوم

بررسی اول: جهت بررسی بیشتر تاثیر عصاره‌ها به صورت مستقیم بر باکتری مولد گال طوقه، آزمایش در شرایط درون‌شیشه‌ای نیز در قالب طرح کاملا تصادفی با شش تیمار و سه تکرار انجام گردید. در این بخش، هدف بررسی میزان رشد باکتری در پتری‌دیش بود. برای انجام این بخش، محلول‌های حاوی عصاره‌های گیاهان دارویی ذکر شده از پودرهای تهیه شده در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه گردید. جهت تهیه محیط کشت LB به حجم ۵۰ سی‌سی، ۰/۷۵ گرم تریپتون، ۰/۲۵ گرم مخمر و ۰/۵ گرم آگار وزن گردید. جهت اضافه نمودن عصاره‌ها، مقدار وزن مورد نیاز جهت حل شدن در ۵۰ سی‌سی آب در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید. از آنجاییکه این عصاره‌ها استریل نبودند، ابتدا وزن مورد نظر را در حجم مشخصی آب مقطر حل و جهت آلودگی زدایی، فیلتر نموده و تا زمان توزیع در یخچال و تاریکی نگهداری گردید. سپس محیط LB را در حجمی کمتر از ۵۰ سی‌سی تهیه و اتوکلاو گردید. عصاره‌های گیاهی جهت استریل شدن، از فیلتر سرسرنگی ۴۵ میکرون عبور داده شد. قبل از توزیع محیط کشت در پتری‌دیش‌ها، این دو محلول با هم مخلوط گردید و به حجم ۵۰ سی‌سی رسانده شد. بعد از منجمد شدن محیط کشت، در روز بعد، باکتری به روش چمنی کشت گردید تا میزان تاثیر بازدارندگی اثر عصاره‌ها بررسی گردد. دمای اتوکلاو برای رشد باکتری ۲۸ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید (Hudzicki, 2009) (شکل ۴).

بررسی دوم: باکتری را در محیط کشت LB کشت نموده و سپس تاثیر عصاره‌های گیاهی از طریق قرار دادن دیسک‌های آغشته شده به این عصاره‌ها در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مورد بررسی قرار گرفت. در این بخش نیز، آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی، با شش عصاره و سه تکرار حاوی سه دیسک آغشته شده به عصاره گیاهان مورد نظر، انجام گردید (Matuschek *et al*., 2023) (شکل ۵).

آنالیز داده‌ها از طریق نرم افزار SAS ورژن 9.4 و رسم نمودارها از طریق نرم‌افزار Excel انجام گردید.



شکل ۴- (A): آماده‌سازی عصاره‌ها و اضافه نمودن به محیط کشت LB (B): کشت باکتری به روش چمنی در محیط حاوی عصاره گیاهی

Figure 4 - (A): Preparation of extracts and addition to LB culture medium. (B): Bacterial culture using lawn method in medium containing herbal extract

شکل ۵- اعمال عصاره گیاهان دارویی از طریق قرار دادن دیسک‌های آغشته به عصاره گیاهان دارویی

Figure 5 - Application of medicinal plant extract through placement of disks soaked with the plant extract

نتایج و بحث

آزمایش اول

تاثیر عصاره‌های گیاهی بر صفات مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیتوهورمونی گال طوقه در کشت گلخانه گیاه گوجه‌فرنگی

وزن گال طوقه

همانگونه که از شکل ۶ نمایان گردیده است، مشاهده می‌گردد که بشترین وزن گال مربوط به گیاه شاهد (۴/۸۶۱ گرم) بوده است و سایر تیمارها دارای مقداری کمتر از وزن توده گال در مقایسه با گیاه شاهد بودند و روندی نزولی مشاهده گردید (شکل ۶) هرچند این روند کاهشی به گونه‌ای مشاهده نگردید که مانع گال‌زایی گردد اما روند رشدی را کند نموده است. البته با نگاهی دقیق‌تر به شکل ۶، مشخص گردید که اثرات گیاهان مختلف با هم متفاوت می‌باشد. برای مثال در گیاه ریواس با افزایش غلظت، روند رشدی گال طوقه دارای روندی کاهشی بوده است. اینکه بیان شود یک غلظت مشخص، غلظت بهینه برای کنترل بیماری گال طوقه می‌باشد، قطعی نیست. برای مثال، در عصاره گیاه بن-سرخ با افزایش غلظت روند رشدی یک سیر نزولی-صعودی داشته است. در خصوص این موضوع مطالعات دانشمندان روشن نموده است که عصاره گیاهان حاوی طیف گسترده و متنوعی از ترکیبات می‌باشد. این ترکیبات در برخی موارد به صورت منفرد دارای اثرات زیستی هستند و گاهی همراه باهم (به صورت ترکیب باهم) دارای اثرگذاری هستند که این اثرات می‌تواند مثبت یا منفی باشد (Reigosa *et al*., 1999). از سویی دیگر، مطالعات دانشمندان و محققان مشخص نموده است که محلول‌پاشی عصاره‌های گیاهی در حالت عادی یا در مبارزه با عوامل مهاجم در سایر گیاهان، سبب بروز پاسخ دفاعی و تحریک سیستم ایمنی می‌گردد (SAR) (Arif *et al*., 2023). پاسخ دفاعی در گیاهان معمولا با فعال شدن سیستم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی همراه هست (Taiz *et al*., 2015). از سیستم‌های غیرآنزیمی، تولید ترکیبات ثانویه می‌باشد که این ترکیبات می‌توانند فنل‌ها، فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها باشند. با بررسی

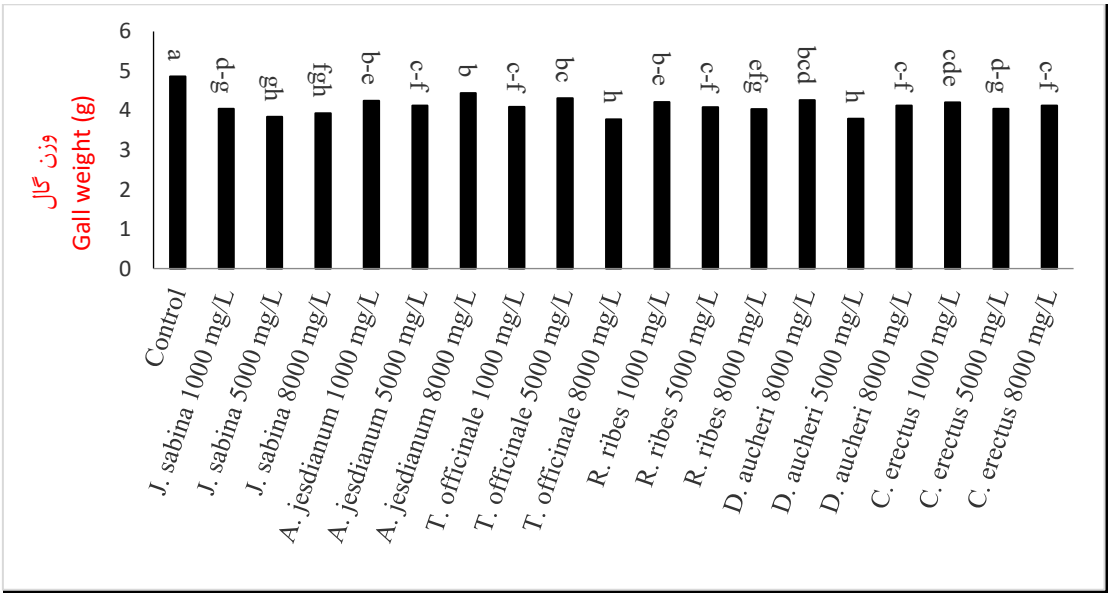
مطالعات مشخص گردید که ترکیبات گیاهی دارای موادی هستند که می‌توانند بر رشد و تکثیر عوامل بیماری‌زا اثر مثبتی داشته باشند. این ترکیبات می‌تواند فنل و فلاونوئیدی باشند (Gil & Cout., 2013, Mukamal *et al*., 2002). همچنین مشخص گردیده شده است که این ترکیبات هرکدام می‌توانند بر گیاهان دیگر دارای اثرات متفاوتی باشند چون متابولیت‌های ثانویه یک گیاه طیف گوناگونی را شامل می‌گردد. در جهت اثبات این نکته، محققان عصاره استخراج شده از ریشه برنج را مورد بررسی قرار دادند. ترکیبات شاخصی که دارای فراوانی بالا در این عصاره بودند شامل اسید آزلاییک، اسید ρ-کومائیک، H۱-ایندول-۳-کارباکسالدهید، H۱-ایندول-۳-کربوکسیلیک اسید، H۱-ایندول-۵-کربوکسیلیک اسید و ۱،۲ بنزن دی کربوکسیلیک اسید و بیس (۲-اتیل هگزیل) استر بودند که به عنوان ترکیبات آللوپاتیک شناخته می‌شوند. با توجه به نتایج این مطالعه، با این حال، به جز ترکیب فنلی اسید ρ-کومائیک در غلظت‌های بیش از ۳میلی مولار (mM)، هیچ یک از این مواد شیمیایی آللوپاتیک فوق، قادر به جلوگیری از رشد گیاهچه کاهو (*Lactuca sativa*) نبودند (Rimando *et al*., 2001). این یافته بیان می‌دارد ترکیبات مختلف دارای اثرات متفاوت هستند و همچنین گیاه مورد بررسی نیز امکان دارد رفتاری متفاوت با گیاه دیگر داشته باشد.

با توجه به شکل ۶، کمترین وزن توده گال، به‌ترتیب مربوط به تیمارهای قاصدک ۸۰۰۰ و کندل ۵۰۰۰ بود (۳/۷۷۷ و ۳/۷۸۹ گرم). همسو با نتایج حاضر، محققان در تحقیقی دیگر نشان دادن که اسانس برگ گیاه اکالیپتوس، توانست روند رشدی گال طوقه را تا ۹۵٪ کاهش دهد. از آنجاییکه اسانس‌ها دارای ترکیبات متنوع بی‌شماری می‌باشند، بررسی اسانس با دستگاه GC-MASS، مشخص نمود که اسانس دارای ترکیبات ضدباکتری از جمله: گالیک اسید، شیکمیک اسید و کاتچین بودند. قطعا این روند کاهشی مربوط به ترکیبات مختلف موجود در عصاره گیاهان دارویی هست. این مکانیسم امکان دارد به صورت مستقیم سبب جلوگیری از رشد را نشان دهد و یا به صورت غیر مستقیم و با فعال کردن سازوکارهای دفاعی در سیستم دفاعی گیاه همراه باشد. این نکته در تحقیقات بیشتر و دقیق‌تر باید بررسی گردد. در همین راستا و هم سو با نتایج ما، مطالعه‌ای نشان داد که تزریق ماده موثره در درون ساقه در غلظت ۱ گرم، بیشترین مرگ و میر آفت را سبب گردید که به طور کلی با نتایج ما در خصوص تاثیر گذاری تزریق ماده در ساقه گیاه، هم سو بود (Rolando *et al*., 2011).

قطر گال یا روند رشدی قطر گال

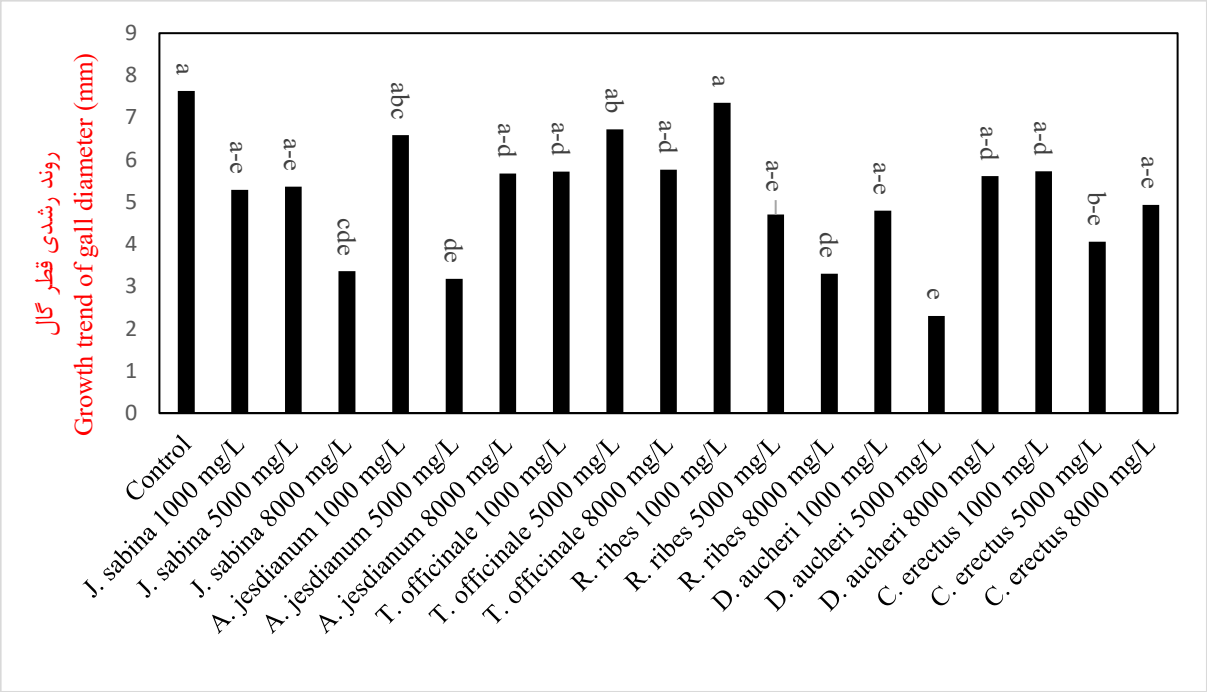
اثر عصاره‌های گیاهی بر قطر توده گال معنادار نشد اما شکل ۷ مشخص می‌نماید که عصاره‌های گیاه توانستند روند رشدی افزایش قطر گال طوقه را کاهش دهند. بیشترین روند رشدی گال طوقه مربوط به گیاه شاهد (۷/۶۳۰) و کمترین (۲/۲۹۸) مربوط به عصاره گیاه کندل ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود (شکل ۷). با نگاهی به شکل ۷، مشخص می‌گردد که اثر عصاره‌های گیاهی از نظر نوع عصاره و غلظت اعمال شده متفاوت بوده است. برای مثال، روند کاهشی رشد گال طوقه در تیمار کندل ۵۰۰۰ نسبت به ریواس و اورس ۵۰۰۰، بیشتر بوده است. همچنین نکته مهم در نتایج آزمایش حاضر، تغییرات روند رشدی با تغییر غلظت عصاره‌ها، می‌باشد. برای مثال، در عصاره گیاه ریواس، یک روند خطی منفی با افزایش غلظت ریواس مشاهده گردید. بدینصورت که با افزایش غلظت از ۱۰۰۰ تا ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، روند رشدی، کاهش یافت. اما در مقابل، برای مثال در گیاه کندل، در غلظت ۱۰۰۰، روند کاهشی در مقایسه با شاهد مشاهده گردید که با افزایش غلظت به ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، این روند کاهشی به بیشترین مقدار خود رسید اما در غلظت ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، این روند مقدار کمتری داشت. تفسیر نتایج و چگونگی دقیق این یافته‌ها در مراحل بعدی با بررسی ترکیبات درون عصاره‌های گیاهی، انجام خواهد گرفت اما به طور کلی، اثر عصاره‌های گیاهی از نظر نوع و غلظت می‌تواند

متفاوت باشد. در راستای نتایج حاضر، مطالعات قبلی نشان داد که اسانس نعنا توانست از فرایند گال‌زایی جلوگیری نماید و ترکیبات غالب در اسانس نیز گالیک-اسید، شیکمیک‌اسید و کاتچین بودند (Kahla *et al*., 2017). بر همین اساس، بررسی طیف ترکیبات گیاهی و نقش آنها در کاهش روند رشدی توده گال، در مطالعات آتی در این مورد، مورد بررسی قرار خواهد گرفت. در همین راستا، همانگونه که در بخش قبلی ذکر گردید، نحوه تحویل هر ماده‌ای به گیاه، متفاوت هست. محلول-پاشی، بذرمال کردن، آبیاری، تنه‌مال کردن و غیره از روش‌های موجود می‌باشد. امروزه، استراتژی تزریق به تنه، استراتژی‌ای کاربردی می‌باشد که خطرات سمپاشی را کاهش خواهد داد و امروزه به عنوان آندوتراپی، شناخته شده است (Berger & Laurent, 2019). در راستای مطالعات هم‌سو با مطالعه حاضر، دانشمندان نشان دادند که برای کنترل بیماری مشخص شد که تزریق ساقه F2 هفت روز قبل از پیوند نهال‌ها به خاک آلوده به میکرواسکلروتیا (*V. dahlia*) منجر به کاهش شدت بیماری در مقایسه با تیمار شاهد در گیاه بادمجان، گردید که این نتایج تایید کننده مفید بودن این تکنینک می‌باشد که در نتایج ما نیز این روند کنترل بیماری، مشهود بود (Gizi *et al*., 2011). از طرفی همانگونه که مشخص گردیده است، عصاره گیاهان دارای طیف گسترده‌ای از ترکیبات گیاهی (فنل، فلاونوئید و اسانس-ها) هستند که این ترکیبات در غلظت‌های مشخص، می‌توانند دارای اثرات متنوعی باشند. از این روز با توجه به این اثرات مثبت ترکیبات درون گیاهان دارویی (Kahla *et al*., 2017) و مفید بودن تکنیک تزریق در گیاه (Berger & Laurent, 2019)، نتایج ما کاملا مشهود خواهد شد.



شکل ۶ – مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهان دارویی بر وزن گال طوقه گیاه گوجه‌فرنگی در گلخانه (در هرشکل، میانگین-های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگراختالف معنی‌داری ندارند).

Figure 6- Mean comparison effect of medicinal plant extracts on the weight of tomato gall plant in the greenhouse (In each figure, means followed by the same letters are not significantly different according to the LSD test, P≤0.05).



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهی بر روند رشدی قطر طوقه در گیاه گوجه‌فرنگی در گلخانه (در هرشکل، میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگراختلاف معنی‌داری ندارند).

Figure 7- Mean comparison effect of medicinal plant extracts on the tomato crown gall diameter growth in the greenhouse (In each figure, means followed by the same letters are not significantly different according to the LSD test, P≤0.05)

شکل ۸- (A): گیاهان آلوده شده با اگروباکتریوم که توسط عصاره ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گیاه کهور تیمار گردید، (B): گیاه شاهد آلوده به اگروباکتریوم که هیچگونه تیماری بر آن اعمال نگردید

Figure 8- (A): Infected plant by A.T with medicinal plant extract treatment (*C. erectus* 5000 mg/L), (B): Control plants infected with Agrobacterium, without any treatment

فنل و فلاونوئید کل

با نگاهی به جدول ۱، مشخص می‌گردد به ترتیب کمترین مقدار فنل و فلاونوئید کل (۲/۱۲۳ و ۱/۰۷۷ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) در تیمار شاهد مشاهده گردید (جدول ۱). معمولا دگرتاثیری (آللوپاتی) عبارت است از تاثیر ترکیب شیمیایی خارج شده از گیاهی بر گیاه دیگر که می‌تواند تاثیری مستقیم یا غیرمستقیم بر گیاهان یا میکروارگانیسم‌ها داشته باشد (De Albuquerque *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). امروزه مطالعات انجام شده بیان می‌دارد که عصاره‌های گیاهی زمانی که به هر طریقی وارد گیاه دیگری می‌گردند، سبب بروز واکنش دفاعی و ایمنی در گیاه می‌گردند (Arif *et al.*,

2023). همانگونه که می‌دانیم گیاه دو سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی جهت مقابله با تنش‌های زنده و غیر زنده دارد. از سیستم دفاعی غیرآنزیمی می‌توان به ترکیبات و متابولیت-های ثانویه (فنل، فلاونوئید، اسانس و آلکالوئیدها) اشاره نمود. بر همین اساس، نتایج حاضر نیز بیانگر تحت تاثیر قرار گرفتن سیستم دفاعی گیاه به دلیل تاثیر عصاره‌های اعمال شده، می‌باشد (جدول ۱). در خصوص روند افزایشی و نوع عصاره، تفاوت‌هایی مشاهده می‌گردد. بیان این نکته بسیار مهم است که گاهی در درون یک عصاره برخی ترکیبات دارای اثرات مختلفی هستند. مثلا ترکیب لواساتین از سنتز اسید-موالونیک جلوگیری می‌نماید، حال اگر غلظت ترکیبی که حاوی لواساتین می‌باشد، افزایش یابد، به طبع آن، سنتز اسیدموالونیک کاهش خواهد یافت (Laureys *et al*., 1998). همچنین با نگاهی به جدول ۲، غنای این عصاره‌های گیاهی از نقطه نظر ترکیبات ثانویه، مشخص می‌گردد (جدول ۲). بر اساس نتایج بدست آمده از جدول ۱، مشخص می‌گردد که با افزایش غلظت عصاره-های اعمال شده، روند میزان فنل و فلاونوئید کل، روندی افزایشی از خود نشان داد. برای نمونه و بر اساس جدول مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین میزان فنل و فلاونوئید در تیمارهای ریواس ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده گردید (جدول ۱). در سایر تیمارها نیز، روند افزایشی در میزان فنل و فلاونوئید با افزایش غلظت عصاره‌ها، مشاهده گردید. روند مشاهده شده، گوناگون است که این تفاوت قطعا به تفاوت در سطوح داخلی متابولیت‌های ثانویه گیاهان مختلف، مربوط خواهد بود.

اکسین و سایتوکینین

همانگونه که قبلا ذکر گردید، رشد و تقسیم سلولی تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی می‌باشند که بر اساس مطالعات مولکولی و ژنتیکی، دو تنظیم‌کننده اکسین و سایتوکینین نقش اول را دارند (Taiz *et al*., 2015). همچنین خود باکتری مولد گال طوقه بعد از ورود به داخل سلول، خود، القا کننده‌ی ترشح تنظیم‌کننده اکسین و سایتوکینین می‌باشد، مخصوصا سایتوکینین. بر روی T-DNA ژن‌های مسئول سنتز هورمون‌های اکسین و سیتوکینین و اپین‌ها وجود دارد که قبلا مفصل بحث گردیده است (Citovsky *et al*., 2007). با این تفاسیر، بیان می‌دارد که میزان تنظیم‌کننده‌های اکسین و سایتوکینین تحت تاثیر عصاره‌های گیاهی، اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. با بررسی صفات مورفولوژیکی، وزن گال، حجم گال، شرایط یکسان موجود در گلخانه، هزینه‌های بالای HPLC و مشورت با اساتید ، تیمار گیاه اورس از لحاظ میزان تنظیم‌کننده های گیاهی مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس جدول ۳، بیشترین میزان اکسین و سایتوکینین به ترتیب ۰/۰۶۲ و ۰/۰۳۴۹ میلی‌گرم برگرم، در گیاه شاهد مشاهده گردید. از طرفی مشاهده گردید که روند میزان اکسین در گیاهان تیمار شده با عصاره اورس، روندی کاهشی بوده است. در ادامه با مقایسه نسبت اکسین / سایتوکینین، نتایج نشان میدهد که این نسبت نیز روند کاهشی داشته است. حال با مقایسه نتایج بیوشیمیایی و مورفولوژی (شکل ۶، ۷ و ۸ و جدول ۳) مشخص می‌گردد که این کاهش مقدار سطوح اکسین و سایتوکینین در مورفولوژی گال طوقه خود را نمایان نموده است.

آزمایش دوم

همانگونه که در بخش مواد و روش ذکر گردید، در راستای نتیجه‌گیری بهتر در خصوص تاثیر عصاره‌ها بر کنترل باکتری مولد گال طوقه (*Agrobacterium tumefaciens*)، در کشت درون‌شیشه‌ای نیز دو آزمایش دیگر انجام گردید.

آزمایش دوم، بررسی اول

همانگونه که در بخش مواد روش، توضیح داده شد، در آزمایش اول، عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های مشخص با محیط کشت LB، مخلوط گردید و بعدا باکتری به صورت چمنی کشت گردید. اما نتایج و بررسی‌های اولیه نشان داد که عصاره‌ها نتوانستند جلوی رشد باکتری در محیط کشت را بگیرند و اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. تصاویر زیر بیانگر میزان رشد باکتری‌ها می‌باشد (شکل ۹ تا ۱۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین داده‌های بیوشیمیایی گال طوقه در گیاه گوجه‌فرنگی در گلخانه

Table 1- Mean comparison of biochemical data of tomato crown gall in greenhouse

فنل کل Total phenol (mg/g FW)	فلاونوئید کل Total flavonoid (mg/g FW)	تیمار Treatment
2.123 ^{j}	1.077^{i}	شاهد Control
2.536^{i}	1.254^{fg}	اورس ۱۰۰۰ *J. sabina* 1000 mg/L
2.913^{gh}	1.340^{def}	اورس ۵۰۰۰ *J. sabina* 5000 mg/L
3.006^{fg}	1.346^{def}	اورس ۸۰۰۰ *J. sabina* 8000 mg/L
3.094^{ef}	1.150^{hi}	بن‌سرخ ۱۰۰۰ *A. jesdianum* 1000 mg/L
3.403^{d}	1.465^{ab}	بن‌سرخ ۵۰۰۰ *A. jesdianum* 5000 mg/L
3.476^{cd}	1.446^{bc}	بن‌سرخ ۸۰۰۰ *A. jesdianum* 8000 mg/L
2.501^{i}	1.177^{gh}	قاصدک ۱۰۰۰ *T. officinale* 1000 mg/L
2.791^{h}	1.421^{bcd}	قاصدک ۵۰۰۰ *T. officinale* 5000 mg/L
2.899^{gh}	1.479^{ab}	قاصدک ۸۰۰۰ *T. officinale* 8000 mg/L
3.598^{c}	1.186^{gh}	ریواس ۱۰۰۰ *R. ribes* 1000 mg/L
4.099^{a}	1.544^{a}	ریواس ۵۰۰۰ *R. ribes* 5000 mg/L
4.136^{a}	1.544^{a}	ریواس ۸۰۰۰ *R. ribes* 8000 mg/L
2.583^{i}	1.148^{hi}	کندل ۱۰۰۰ *D. aucheri* 1000 mg/L
3.086^{ef}	1.428^{bcd}	کندل ۵۰۰۰ *D. aucheri* 5000 mg/L
3.169^{e}	1.482^{ab}	کندل ۸۰۰۰ *D. aucheri* 8000 mg/L
3.508^{cd}	1.156^{hi}	کهور ۱۰۰۰ *C. erectus* 1000 mg/L
3.798^{b}	1.323^{ef}	کهور ۵۰۰۰ *C. erectus* 5000 mg/L
3.821^{b}	1.356^{cde}	کهور ۸۰۰۰ *C. erectus* 8000 mg/L

*در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

*In each column, means followed by the same letters are not significantly different according to LSD test (P≤0.05).

جدول ۲- پروفایل بیوشمیایی و میزان اکسین موجود در عصاره گیاهان دارویی

Table 2- Biochemical profile and amount of auxin in medicinal plant extracts

گیاهان دارویی Medicinal plant	فنل کل Total phenol (mg/g DW)	فلاونوئیدکل Total Flavonoid (mg/g DW)	توانمندی آنتی‌اکسیدانی Antioxidant potential (%)	میزان اکسین Auxin content (mg/g DW)
J. sabina	31.187	15.893	74.285	0.3838
A. jesdianum	21.087	15.898	12.780	0.3260
T. officinale	22.595	14.757	80.483	0.2832
C. erectus	62.545	18.56	67.568	0.2553
D. aucheri	31.663	17.043	58.46	0.3567
R. ribes	40.269	15.5	80.805	0.1483

جدول۳- مقایسه میانگین تغییرات تنظیم‌کننده‌های رشدی گال طوقه تحت تیمار گیاه اورس

Table 3- Mean comparison of change in plant growth regulators of tomato crown gall under the effect of *Juniperus sabina* extract treatment

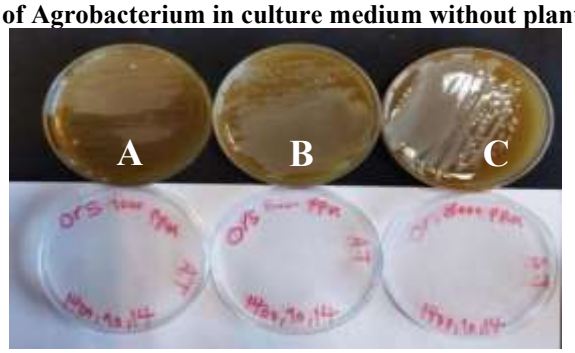
اکسین Auxin (mg/g FW)	سایتوکینین CK (mg/g FW)	اکسین/ سایتوکینین Auxin / CK	تیمار Treatment
0.062[a]	0.0349[a]	1.777[a]	شاهد Control
0.061[b]	0.0346[c]	1.750[b]	اورس ۱۰۰۰ *J. sabina* 1000 mg/L
0.060[b]	0.0347[b]	1.742[b]	اورس ۵۰۰۰ *J. sabina* 1000 mg/L
0.060[b]	0.0347[b]	1.739[b]	اورس ۸۰۰۰ *J. sabina* 1000 mg/L

*در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمونLSD در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

*In each column, means followed by the same letters are not significantly different according to LSD test (P≤0.01).

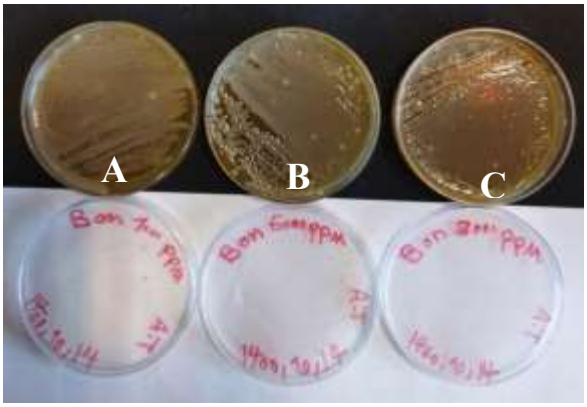
شکل ۹- رشد باکتری اگروباکتریوم در محیط کشت بدون عصاره گیاهی (شاهد)

Figure 9 - Growth of Agrobacterium in culture medium without plant extract (Control)



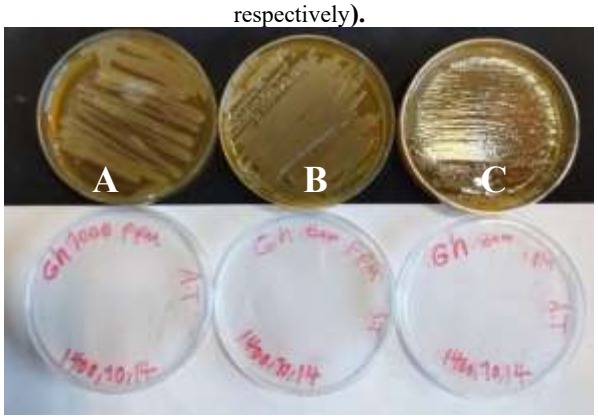
شکل ۱۰- رشد باکتری در پتری‌دیش‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اورس (C, B, A به‌ترتیب غلظت‌های ۱۰۰۰ ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخلوط شده با محیط کشت LB می‌باشد).

Figure 10- Bacterial growth in Petri dishes containing different concentrations of *J. sabina* plant extract (A, B, and C correspond to concentrations of 1000, 5000, and 8000 mg/L of extract mixed with LB culture medium, respectively)



شکل ۱۱- رشد باکتری در پتری‌دیش‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه بن‌سرخ (C, B, A به‌ترتیب غلظت‌های ۱۰۰۰ ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخلوط شده با محیط کشت LB می‌باشد).

Figure 11- Bacterial growth in Petri dishes containing different concentrations of *Allium jesdianum* plant extract
(A, B, and C correspond to concentrations of 1000, 5000, and 8000 mg/L of extract mixed with LB culture medium, respectively**).**

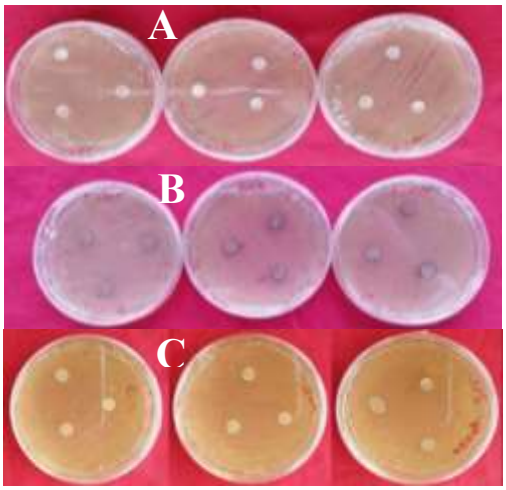


شکل ۱۲- رشد باکتری در پتری‌دیش‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه قاصدک (C, B, A به‌ترتیب غلظت‌های ۱۰۰۰ ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخلوط شده با محیط کشت LB می‌باشد).

Figure 12- Bacterial growth in Petri dishes containing different concentrations of *Taraxacum officinale* plant extract (A, B, and C correspond to concentrations of 1000, 5000, and 8000 mg/L of extract mixed with LB culture medium, respectively)

آزمایش دوم، بررسی دوم

آزمایش دوم بر اساس روش (Hudzicki, 2009) انجام گردید. نتایج نشان داد که همانند مرحله اول در هیچکدام از گیاهان و غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) اختلاف معناداری مشاهده نگردید. در واقع هاله مناسبی مبنی بر جلوگیری از رشد و یا مرگ باکتری در پتری‌دیش مشاهده نگردید. تصاویر زیر بیانگر نتایج می‌باشند(شکل ۱۳).



شکل ۱۳- A ، B و C به ترتیب تیمارهای شاهد، عصاره گیاه کهور و اورس می‌باشند که در هیچ غلظت آزمایشی، اختلاف معنی‌داری بر جلوگیری از رشد باکتری نشان نداده نشد.

Figure 13 - Respectively, A, B, and C are the Control, *Conocarpus erectus*, and *Juniperus sabina* treatments, which showed no significant differences in the inhibition of bacterial growth across all tested concentrations

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده، مشخص گردید که عصاره‌های خالص گیاهان دارویی ذکر شده، توانستند بر رشد باکتری گال طوقه در درون گیاه، اثر بازدارنده داشته باشند. همانطور که ذکر گردید گیاهان علی‌رغم داشتن داشتن ترکیبات ثانویه در درون خود، زمانی که در معرض ترکیبات خارجی قرار می‌گیرند، دچار تحریک در سیستم دفاعی خود می‌شوند که تشابه به تهاجم دارد. حال گیاه در این شرایط، سیستم‌های دفاعی و ایمنی خود که می‌تواند آنزیمی و غیرآنزیمی باشد را فعال نموده و به مبارزه با آن عامل مهاجم می‌پردازند. اینکه عصاره‌های گیاهی در شرایط مستقیم درون شیشه‌ای (*in-vitro*) نتوانستند اختلاف معنی‌داری از خود نشان دهند، اما در شرایط درون گیاهی (*ex-vivo*) توانستند دارای اختلاف معنی‌داری باشند و تا حدی روند رشدی را کاهش دهند، به چند موضوع اشاره دارد. عصاره‌های گیاهی دارای طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات گیاهی هستند که برخی از ترکیبات فلاونوئیدی، فعالیت ضدمیکروبی نیز دارند. برای نظر کاملاً قطعی، یکسری بررسی‌های آنزیمی و ژنومی می‌تواند روشنگر این نظر باشد. به طور کلی، با توجه به نتایج تحقیق حاضر، اعمال عصاره‌های گیاهی در دوره کشت در گلخانه مفید خواهد بود و توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

از جناب دکتر بهار عضو هیات علمی دانشگاه اصفهان بخاطر کمک در تهیه باکتری، سپاسگزاریم.

References

Ain, Q., Mushtaq, W., Shadab, M., & Siddiqui, M. B. (2023). Allelopathy: an alternative tool for sustainable agriculture. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 29(4), 495-511. https://doi.org/10.1007/s12298-023-01305-9

Akhlaghi, M., Barjesteh, A. R., Alymanesh, M. R., Akhyani, A. and Dezianian, A. (2021). Antibacterial Effect of Essential Oils and Monoterpene Compounds Against Bacterial Brown Blotch Disease of White Button Mushroom. *Journal of Vegetables Sciences*, 4(8), 161-175. https://doi.org/10.22034/iuvs.2021.523995.1145

Arif, Y., Bajguz, A., & Hayat, S. (2023). Moringa oleifera extract as a natural plant biostimulant. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(3), 1291-1306. https://doi.org/10.1007/s00344-022-10630-4

Bahaadini, M., Mohayeji, M. & Naseralavi, S. (2025). Genetic analysis of salt tolerance in some tomato genotypes. *Journal of Vegetables Sciences*, 9(17), 43-56. https://doi.org/10.22034/iuvs.2024.2010421.1315

Berger, C., & Laurent, F. (2019). Trunk injection of plant protection products to protect trees from pests and diseases. *Crop Protection*, 124, 104831. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.05.025

Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, 32(1), 170-189. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003

Brown, P. J., Chang, J. H., & Fuqua, C. (2023). Agrobacterium tumefaciens: a transformative agent for fundamental insights into host-microbe interactions, genome biology, chemical signaling, and cell biology. *Journal of Bacteriology*, 205(4), e00005-23. https://doi.org/10.1128/jb.00005-23

Cazorla, F.M., Mercado-Blanco, J. (2016). Biological control of tree and woody plant diseases: an impossible task? *BioControl*, 61(3), 233-242. https://doi.org/10.1007/s10526-016-9737-0

Chanda, S., Rakholiya, K., Dholakia, K., Baravalia, Y. (2013). Antimicrobial, antioxidant, and synergistic properties of two nutraceutical plants: *Terminalia catappa* L. and *Colocasia esculenta* L. *Turkish Journal of Biology*, 37, 81-91. https://doi.org/10.3906/biy-1203-41

Citovsky, V., Kozlovsky, S.V., Lacroix, B., Zaltsman, A., Dafny-Yelin, M., Vyas, S., Tovkach, A. and Tzfira, T. (2007). Biological systems of the host cell involved in Agrobacterium infection. *Cellular microbiology*, 9(1), 9-20. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00830.x

De Albuquerque, M. B., dos Santos, R. C., Lima, L. M., de Albuquerque Melo Filho, P., Nogueira, R. J. M. C., Da Câmara, C. A. G., & de Rezende Ramos, A. (2011). Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(2), 379-395. https://doi.org/10.1051/agro/2010031

Duke, S. O., Dayan, F. E., Rimando, A. M., Schrader, K. K., Aliotta, G., Oliva, A., & Romagni, J. G. (2002). Chemicals from nature for weed management. *Weed Science*, 50(2), 138-151.

Farooq, M., Jabran, K., Cheema, Z. A., Wahid, A., & Siddique, K. H. (2011). The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest Management Science*, 67(5), 493-506. https://doi.org/10.1002/ps.2091

Gautam, G. K. (2013). A review on the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of *solanum lycopersicum* linn. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 1(8), 521-527. https://doi.org/10.3906/biy-1203-41

Gil, E. S., & Cout, R. O. (2013). Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(3), 542-558. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000031

Gizi, D., Stringlis, I. A., Tjamos, S. E., & Paplomatas, E. J. (2011). Seedling vaccination by stem injecting a conidial suspension of F2, a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain, suppresses Verticillium wilt of eggplant. *Biological Control*, 58(3), 387-392. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.009

Hsouna, A.B., Touj, N., Hammami, I., Dridi, K., Al-Ayed, A.S., Hamdi, N. (2019). Chemical Composition and in vivo Efficacy of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. in the Suppression of Crown Gall Disease on Tomato Plants. *Journal of oleo science*, p. ess18261. https://doi.org/10.5650/jos.ess18261

Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American society for microbiology, 15(1), 1-23.

Hussain, M. I., Gonzalez, L., & Reigosa, M. J. (2011). Allelopathic potential of *Acacia melanoxylon* on the germination and root growth of native species. *Weed Biology and Management*, 11(1), 18-28. https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2011.00401.x

Kahla, Y., Zouari-Bouassida, K., Rezgui, F., Trigui, M., & Tounsi, S. (2017). Efficacy of *Eucalyptus cinerea* as a source of bioactive compounds for curative biocontrol of crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens* strain B6. *BioMed research international*, 1-10. https://doi.org/10.1155/2017/9308063

Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of medicinal Plants research*, 3(13), 1222-1239. https://doi.org/10.5897/JMPR.9000026

Khamare, Y., Chen, J., & Marble, S. C. (2022). Allelopathy and its application as a weed management tool: A review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1034649. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1034649

Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, HJ., & Lee, C.Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713-3717. https://doi.org/10.1021/jf020071c

Laureys, F., Dewitte, W., Witters, E., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Onckelen, H. (1998). Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS letters*, 426(1), 29-32. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00297-X

Massimi, M. (2021). Tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) anatomical, physiological, biochemical and production responses to drought stress-A mini-review essay. *International Journal of Horticultural Science*, 27, 40-45.

https://doi.org/10.31421/ijhs/27/2021/8439

Matuschek, E., Copsey-Mawer, S., Petersson, S., Åhman, J., Morris, T. E., & Kahlmeter, G. (2023). The European committee on antimicrobial susceptibility testing disc diffusion susceptibility testing method for frequently isolated anaerobic bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 29(6), 795-e1. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.01.027

Milgroom, M.G., & Cortesi, P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. Annual Review of Phytopathology, 42, 311-338. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140325

Milutinović, M., Dimitrijević-Branković, S., & Rajilić-Stojanović, M. (2021). Plant extracts rich in polyphenols as potent modulators in the growth of probiotic and pathogenic intestinal microorganisms. *Frontiers in Nutrition*, 8, 688843. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.688843

Mukamal, K.J., Maclure, M., Muller, J.E., Sherwood, J.B., & Mittleman, M.A. (2002). Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation*, 105(21), 2476-2481. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000017201.88994.F

Nemati, P.M. & Jalilian, N. (2012). Medicinal plants of Kermanshah province. *Taxonomy and Biosystematics journal*, 11, 69-77 (In Persian). https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.20088906.1391.4.11.8.9

New, P.B. & Kerr, A. (1972). Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. *Journal of Applied Bacteriology*, 35(2), 279-287. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1972.tb03699.x

Ordonez, A.A.L., Gomez, J.D. & Vattuone, M.A. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*, 97(3), 452-458. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.024

Pan, L., Li, X. Z., Yan, Z. Q., Guo, H.R., & Qin, B. (2015). Phytotoxicity of umbelliferone and its analogs: Structure–activity relationships and action mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 272-277. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.020

Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nature protocols*, 5(6), 986-992. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.37

Panno, S., Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., ... & Matić, S. (2021). A review of the most common and economically important diseases that undermine the cultivation of tomato crop in the mediterranean basin. *Agronomy*, 11(11), 2188. https://doi.org/10.3390/agronomy11112188

Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1.

https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849

Pliego, C., & Cazorla, F. M. (2013). Biocontrol of tree root diseases. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, 1, 655-663. https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch62

Reigosa, M. J., Souto, X. C., & Gonz, L. (1999). Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regulation*, 28(2), 83-88. https://doi.org/10.1023/A:1006269716762

Rimando, A.M., Olofsdotter, M., Dayan, F.E. and Duke, S.O. (2001). Searching for rice allelochemicals: An example of bioassay-guided isolation. *Agronomy Journal*, 93(1), 16-20. https://doi.org/10.1023/A:1006269716762

RM, S., & LP, C. (2022). Organic matter in the pest and plant disease control: A meta-analysis. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 9(1), 70. https://doi.org/10.1186/s40538-022-00332-0

Rolando, C.A., Gous, S.F., Berndt, L.A., Bulman, L.S., Carlson, C.A. (2011). Stem injection of a systemic insecticide to control *Uraba lugens* on urban *Lophostemon confertus* trees. *Pest Management Science*, 67(9),1062-1068. https://doi.org/10.1002/ps.2146

Sadeghi Ghahnasir, A. , Aboutalebi Jahromi, A. , Behrooznam, B. , Hassanzadeh Khankahdani, H. and Ejraei, A. (2023). The Influence of Foliar Application of Humic Acid, Amino Acid and Extract of Otostegia persica, Artemisia abrotanum and Teucrium polium Medicinal Plants on Yield and Yield Components of Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Vegetables Sciences*, 7(13), 113-130. https://doi.org/10.22034/iuvs.2022.1971285.1241

Sumner, L. W., Lei, Z., Nikolau, B. J., & Saito, K. (2015). Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects. *Natural product reports*, 32(2), 212-229. https://doi.org/10.1039/C4NP00072B

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M. and Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (No. Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated.

Vasisht, K., Sharma, N., & Karan, M. (2016). Current perspective in the international trade of medicinal plants material: an update. *Current pharmaceutical design*, 22(27), 4288-4336. https://doi.org/10.2174/1381612826661606070736

Yang, C.Y., Liu, S.J., Zhou, S.W., Wu, H.F., Yu, J.B., & Xia, C.H. (2011). Allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) induces oxidative damage and antioxidant responses in *Phaeodactylum tricornutum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100 (1), 93-103. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.014