

## اثر سالیسیلیک اسید در القاء مقاومت سیستمیک در گیاه خیار به بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *Pythium aphanidermatum*

سید کاظم صباغ<sup>۱\*</sup>، ابراهیم صباغ<sup>۲</sup>، جواد آبخو<sup>۳</sup> و فاطمه زینتی فخرآباد<sup>۴</sup>

۱- دانشیار گروه زیست‌شناسی مجتمع علوم دانشگاه یزد.

۲- استادیار گروه زراعت دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان.

۳- مربی پژوهشی پژوهشکده زیست‌فناوری گیاهی دانشگاه زابل.

۴- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه زابل.

\*مسئول مکاتبه: Email: sksabbagh@yazd.ac.ir

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۱۰/۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۳/۵

### چکیده

بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp یکی از بیماری‌های مخرب خیار در گلخانه های تجاری است که موجب کاهش قابل توجهی از محصول می‌شود. در این پژوهش اثر اسید سالیسیلیک در القاء مقاومت به خیار آلوده به بیماری مرگ گیاهچه مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، تغییر در سطح بیان ژن‌های *cupi4* و *Lipoxygenase* و فعالیت چند آنزیم بیوشیمیایی، مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با چهار تکرار در شرایط گلخانه در دمای ۲۵ تا ۲۷ °C با رطوبت نسبی ۷۰٪ و دوره نوری ۸:۱۴ ساعت روشنایی: تاریکی انجام شد. نتایج ارزیابی وقوع بیماری نشان داد که بین شدت بیماری زایی در گیاهان تیمار شده با غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک (صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام) و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد. ارزیابی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتهی در گیاهان تیمار شده نشان داد که فعالیت آنزیم های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز به میزان قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با شاهد افزایش یافت در حالیکه فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاکاز افزایش معنی‌داری با گیاهان تیمار نشده نشان نداد. آنالیز بیان ژن با روش qRT-PCR نشان داد که کاربرد اسید سالیسیلیک قادر به افزایش سطح بیان ژن های بررسی شده می‌باشد اما بیشترین میزان بیان برای ژن *Cupi4* ثبت گردید. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که کاربرد اسید سالیسیلیک می‌تواند نقش مهمی در افزایش مقاومت گیاه خیار در برابر بیماری مرگ گیاهچه ایفا کند.

واژه‌های کلیدی: مقاومت القایی، اسید سالیسیلیک، مرگ گیاهچه، لیپوکسی ژناز و ژن *Cupi4*.

### مقدمه

گلخانه‌ای محسوب می‌شود. گونه‌ی قارچی *Pythium aphanidermatum* از جمله بیمارگرهای مهم گیاهی و عامل پوسیدگی ریشه و طوقه خیار، با گسترش جهانی و در برابر عامل بیماری می‌باشد. اخیراً تحقیقات بسیاری پیرامون مقاومت القایی گیاه که توسط محرک‌های خارجی در گیاه اعمال می‌شود، صورت گرفته است

بیماری مرگ گیاهچه خیار یکی از مهم ترین عوامل محدود کننده‌ی کشت این محصول به ویژه در شرایط دامنه‌ی میزبانی وسیع بخصوص در مناطق گرم و گلخانه‌ها می‌باشد (فروین و همکاران، ۱۹۸۸). یکی از مهمترین راههای کنترل این بیماری، القاء مقاومت در گیاه

جمله‌ی این نوع پروتئین‌ها، کیتیناز و بتا-۱ و ۳-گلوکاناز هستند که همواره با سایر آنزیم‌های دفاعی مثل بتا ۱ و ۴- گلوکاناز و پراکسیداز و غیره در فعالیت‌های دفاعی موثرند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی که اغلب پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی<sup>۳</sup> (PR) خوانده می‌شوند، شامل گروه متنوعی از پروتئین‌های گیاهی هستند که توزیع گسترده‌ای در گیاهان داشته ولی در مقادیر بسیار پایینی وجود دارند اما به دنبال حمله‌ی عوامل بیماری‌زا یا تنش‌های محیطی، در غلظت بسیار بالاتری تولید می‌شوند (وان لون و وان استرین ۱۹۹۹). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی به صورت درون سلولی و برون سلولی، به ویژه در دیواره‌های سلولی بافت‌های مختلف گیاهی وجود دارند. انواع متفاوتی از پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی از گیاهان مختلف جدا شده‌اند. القاء تولید پروتئین‌های مرتبط با دفاع در بسیاری از گونه‌های گیاهی در برابر آلودگی با باکتری، قارچ، ویروس و یا حمله‌ی حشرات ثابت شده است. این نوع پروتئین‌ها در تک لپه‌ای‌ها و دو لپه‌ای‌ها، تکامل خود را حفظ نموده‌اند (وان لون و همکاران ۱۹۹۴). مشخص گردیده است که بیان هم زمان دو یا چند ژن مرتبط با پروتئین‌های بیماری‌زا (PR)، با اثر تشدید کنندگی باعث افزایش مقاومت و در نتیجه کنترل موثرتر بیماری می‌گردد (زو و همکاران ۱۹۹۴). تلقیح گیاه خیار با پاتوژن‌های مختلفی نشان داده که مولکول‌های mRNA مربوط به ژن *Cupi4* به صورت سیستمیک در برابر پاتوژن‌ها در گیاه خیار تجمع یافته و با تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی موجب ایجاد مقاومت در برابر این پاتوژن‌ها می‌شود (فونتومارت و همکاران ۲۰۰۶). ژن *Lipoxygenase* یکی از این ژن‌های کد کننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌باشد که نقش آن

(ادروا ۲۰۰۴). بطور کلی پس از شناسایی عامل بیمارگر (یا عوامل غیر بیمارگر) توسط میزبان، مکانیزم‌های دفاعی آن به صورت موضعی یا سیستمیک، فعال می‌شوند. مقاومت سیستمیک اکتسابی<sup>۱</sup> (SAR) و مقاومت سیستمیک القایی<sup>۲</sup> (ISR) دو نوع واکنش در گیاهان هستند که سبب مقاومت و یا تحمل گیاه در مقابل بیمارگرها می‌شوند. ترکیبات و یا عواملی که سبب القا مقاومت در گیاه می‌شوند، تحریک کننده نامیده شده و می‌توانند جزو عوامل زنده و یا غیر زنده باشند (موش مانی و مترو ۱۹۹۸). تاکنون عوامل متعددی در گیاهان به عنوان مکانیزم‌های دفاعی شناخته شده اند که از جمله‌ی آنها می‌توان به سنتز و ترشح ترکیبات فنلی داخل و خارج سلول، سنتز فیتوالکسین‌ها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی اشاره کرد (هاماند کوساک و جون ۱۹۹۶، اوکا و همکاران ۱۹۹۷، پاکسون ۱۹۸۱). پیش تیمار گیاهان با برخی از تحریک کننده‌ها، باعث پاسخ‌های دفاعی در پاتوسیستم‌های مختلف شده است. سالیسیلیک اسید یکی از ترکیبات فنلی تولید شده توسط گیاه است که در برابر پاسخ‌های دفاعی به استرس‌های زنده و غیر زنده تولید شده و یکی از عوامل اصلی در القاء مقاومت اکتسابی گیاه در مقابل عوامل بیمارگر به حساب می‌آید (دورنر و همکاران ۱۹۹۷). گزارش‌های متعددی از موفقیت در کنترل بیماری یا کاهش علائم آن بوسیله‌ی تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید ارایه شده است (جایاراج و همکاران ۲۰۰۸، ماندل و همکاران ۲۰۰۹، ولادی و همکاران ۲۰۱۳). القاء مقاومت اکتسابی در گیاهان همراه با تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌باشد. در واقع بیان ژن‌های دفاعی مثل ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی به عنوان یکی از شاخص‌های مقاومت به کار می‌رود. از

<sup>3</sup> Pathogenesis Related protein

<sup>1</sup> Systemic Acquired Resistance

<sup>2</sup> Induced Systemic Resistance

خيار در گلدان‌های کوچک کاشته شده و در گلخانه در دمای ۲۵ تا ۲۷ °C با رطوبت نسبی ۷۰٪ و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شده و آبیاری به طور روزانه انجام گرفت. در مرحله گیاهچه-ای، گلدان‌ها با حذف دو گیاهچه تنک شده و تا مرحله ی دو تا چهار برگگی مراقبت‌های لازم از آنها به عمل آمد. از دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام اسید سالیسیلیک جهت تحریک گیاه و القاء مقاومت در حضور عامل بیماری‌گر به صورت اسپری روی برگ‌های گیاهچه‌های دو هفته‌ای استفاده شد. این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل ۳×۴ بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام و در چهار بازه زمانی ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی نمونه برداری بعمل آمد

#### تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح *Pythium aphanidermatum*

از جدایه‌ی استاندارد قارچ *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی ایران جهت تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح استفاده شد. به منظور تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح جهت آزمون بیماری زایی، قطعاتی از محیط کشت حاوی پرگنه قارچ به تشتک پتری حاوی محیط کشت جامد CMA<sup>۱</sup> منتقل گردید. جهت تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح از روش رامورتی و همکاران (۲۰۰۲) با کمی تغییرات استفاده گردید. در این روش ۲۰۰ سانتی‌متر مکعب خاک باغچه (دارای بافت لومی شنی)، ۲۰۰ سانتی‌متر مکعب ماسه‌ی بادی شسته شده، ۴۰ گرم آرد ذرت و ۸۰ میلی لیتر آب مقطر، در یک ارلن مایر ۱۰۰۰ میلی لیتری به خوبی مخلوط و دو مرتبه، به فاصله ۲۴ ساعت، در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۳۰ دقیقه استریل شد. سپس چهار قطعه از محیط کشت

در مقاومت به عوامل میکروبی در گیاهان مختلف از جمله خیار به *Didymella Alternaria cucumerinum* و *Botrytis cinerea* اثبات شده است (جایاراج و همکاران ۲۰۱۱). از آنجایی که مقاومت میزبان‌های گیاهی توسط نژادهای مختلف قارچ‌های بیمارگر شکسته می‌شود، استفاده از روش‌های دیگر مانند فعال‌کننده‌های مصنوعی مقاومت که کم‌خطر و کم‌هزینه‌تر هستند، ضروری به نظر می‌رسد. مواد شیمیایی القاکننده مقاومت که قادرند مقاومت را علیه طیف وسیعی از بیماری‌ها القاء کنند، یک فرصت و ابزار مناسبی را برای کشاورزان ایجاد کرده و کامل‌کننده مقاومت ژنتیکی گیاهان به بیماری‌ها می‌باشند. از آنجا که کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد به دلیل شرایط پیچیده موجود در خاک و ریزوسفر و تبدلات بیوشیمیایی و بیولوژیک گیاه و محیط اطراف آن، همواره با مشکلاتی مضاعف توأم بوده است، بررسی امکان استفاده از روش‌های تلفیقی و القای مقاومت در کنترل بیماری‌های خاکزاد به نحوی که افزایش عملکرد و کاهش خسارات زیست محیطی را در بر داشته باشد، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (رینولت و والترز ۲۰۰۷). در این تحقیق اثر سالیسیلیک اسید در القاء مقاومت در گیاه خیار آلوده به بیماری مرگ گیاهچه و تغییرات فعالیت تعدادی از آنزیم‌های بیوشیمیایی و ژن‌های درگیر در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### کاشت خیار و انجام آزمایش

در این تحقیق از رقم کیان خیار گلخانه‌ای (F1) استفاده شد. برای کاشت خیار از مخلوط کمپوست برگ، ماسه، پرلیت و خاک مزرعه به نسبت ۱:۱:۲:۱ و سترون شده در اتو کلاو استفاده گردید. سپس چهار عدد بذر

<sup>1</sup>Corn Meal Agar (Merck, Germany)

عصاره‌ی حاصل به میکروتیوب دو میلی لیتر منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در میکرو سانتریفوژ یخچال‌دار (۱۵۰۰۰ دور در دقیقه) قرار داده شد و رو نشست آن به عنوان عصاره‌ی پروتئینی جدا و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. مخلوط واکنش حاوی ۲۵ میکرو لیتر عصاره‌ی آنزیمی، ۲/۷۷ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (PH=۷)، ۱۰۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه ۱٪ و ۱۰۰ میکرو لیتر محلول گایاکول ۴٪ بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. هر واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقداری از آنزیم تعریف می‌شود که باعث ۱٪ تغییر در جذب می‌شود (زانگ و همکاران ۲۰۰۵).

#### اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز<sup>۲</sup> (PPO)

جهت اندازه‌گیری میزان تغییرات آنزیم پلی فنل اکسیداز، به عصاره‌ی نمونه گیاهی حاوی ۴۰ میکروگرم پروتئین در یک لوله‌ی آزمایش، ۲۰ میکرو لیتر محلول پرولین اضافه و حجم نهایی مخلوط واکنش با اضافه نمودن بافر سیترات-فسفات ۲۵ میلی مولار به دو میلی لیتر رسانده شد. محلول فوق در لوله‌ی آزمایش کاملاً مخلوط و توسط دستگاه تکان دهنده به مدت دو دقیقه هوادهی شد. سپس دستگاه طیف سنج با استفاده از این مخلوط صفر شد و ۴۰ میکرو لیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی مولار به مخلوط فوق اضافه و بلافاصله تغییرات جذب نور با فواصل زمانی ۱۰ ثانیه و به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات جذب نور در دقیقه در میلی گرم پروتئین عصاره گیاهی محاسبه گردید (محمدی و کاظمی ۲۰۰۲).

حاوی میسیلیوم قارچ رشد کرده جهت تکثیر به ارلن مایر اضافه و به مدت سه هفته در دمای  $27 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از رشد کامل قارچ، محتوی ارلن مایر به هم زده شده و به نسبت حجمی پنج درصد به عنوان اینوکولوم با خاک گلدان ها مخلوط گردید.

#### تعیین درصد وقوع بیماری

در این آزمایش درصد وقوع بیماری (Disease index) که عبارت است از تعداد یا نسبت واحدهای گیاهی بیمار شده نسبت به تعداد کل واحدهای موجود (مقیاس صفر تا ۷)، ۴ روز پس از مایه‌زنی و با بررسی تک تک تیمارهای مربوط به سطوح مختلف تیمار اسید سالیسیلیک و در نهایت با محاسبه‌ی میانگین آنها تعیین شد (آلتیر و دیس ۱۹۹۵، پانلا ۱۹۹۸). محتوای پروتئین کل با روش برادفورد و استفاده از آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (برادفورد ۱۹۷۶). از بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار (PH=۷) برای استخراج پروتئین کل از بافت ریشه استفاده شد. همگنای حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و بخش رویی برای سنجش آنزیم‌های مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت (گاپینسکا و همکاران ۲۰۰۸).

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز<sup>۱</sup> (PO)

مقدار ۰/۵ گرم از ریشه‌های نمونه برداری شده پس از آب‌گیری سطحی با دستمال کاغذی، در هاون چینی سرد با استفاده از ازت مایع به صورت پودر نرمی ساییده شد. سپس یک میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (PH=۶)، به آن اضافه و به خوبی یکنواخت گردید.

<sup>1</sup> Proxidase (PO)

<sup>2</sup> Polyphenol Oxidase

واکنش مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام واکنش های Real-time PCR از دستگاه Curbet Rotor-Gene (3000, Australia) استفاده شد. واکنش PCR در ۴۰ چرخه، شامل ۲۰ ثانیه در ۹۴ درجهی سانتیگراد، ۲۰ ثانیه در ۶۱ درجهی سانتیگراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجهی سانتیگراد انجام شد. یک مرحله اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه و یک مرحله پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه نیز در ابتدا و انتهای چرخه‌ها برای PCR انجام شد. برنامه دمایی هر دو ژن یکسان می باشند. پس از اتمام چرخه‌های PCR، منحنی ذوب با برنامه، دمایی یک درجهی سانتیگراد در هر چرخه و بین دمایی ۵۵-۹۹ درجهی سانتیگراد به منظور بررسی اختصاصیت واکنش PCR رسم گردید.

#### آنالیز آماری

تاثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در چهار بازه زمانی پس از کاربرد، بر روی فعالیت آنزیمی و بیان ژن با انجام یک آزمایش فاکتوریل بر پایه ی طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور اسید سالیسیلیک شامل سه سطح ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام و فاکتور زمان شامل چهار سطح ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کاربرد اسید سالیسیلیک روی گیاهان خیار بود. تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 صورت گرفته و میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند (اوشیدا و همکاران ۲۰۰۹). تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن با استفاده از روش فافی (۲۰۰۱) و با نرم افزار REST 2009 که تخصصی داده-های خروجی Real time PCR می باشد، انجام گرفت. شاخص شدت بیماری مرگ بوته‌های خیار چهار روز پس از مایه زنی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس

#### ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاژ (PAL)<sup>۱</sup>

تعیین میزان فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاژ با استفاده از روش صاحبانی (۲۰۰۴) انجام شد. در این روش دو میلی لیتر مخلوط واکنش شامل ۱۸۰۰ میکرو لیتر محلول بافر تریس اسیدی ۰/۵ مول (PH=۶/۸) و همراه ۰/۵ میلی لیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار که به آن ۲۰۰ میکرو لیتر عصاره‌ی گیاهی اضافه شده بود، تهیه گردید. سپس این مخلوط به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجهی سانتی گراد قرار داده شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر کلریدریک اسید ۶ مولار متوقف شد و جذب نمونه در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

#### آنالیز بیان ژن

استخراج RNA در دوره های زمانی ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه زنی قارچ در گیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک انجام شد. RNA کل بافت برگ با استفاده از محلول استخراج کیت توپاز (شرکت توپاز ژن کاوش، ایران) انجام و براساس روش ذکر شده در دستورالعمل شرکت سازنده کیت، استخراج گردید. جهت سنتز رشته اول cDNA، از کیت فرمنتاز (Fermentase, France) استفاده گردید. محلول واکنش با حجم دو ۰ میکرو لیتر در تیوب‌های مخصوص تهیه گردید. این محلول شامل دو میکرو لیتر (۵۰ نانوگرم) cDNA، یک میکرو لیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکومولار)، ۱۰ میکرو لیتر Hot Tag EvaGreen (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA)، دو میکرو لیتر بافر ۱۰× و سپس حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر عاری از آنزیم RNase به ۲۰ میکرو لیتر تنظیم و برای انجام

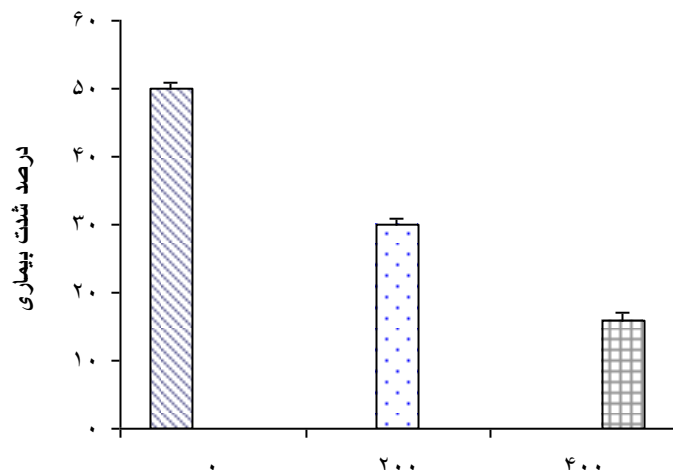
<sup>۱</sup>Phenylalanine Ammonia Lyase

غلظت ۴۰۰ پی پی ام سبب حداکثر میزان القاء مقاومت گردید به نحوی که شاخص شدت بیماری زایی در گیاهان تیمار شده با این تیمار ۱/۶۶۷ بود این در حالی بود که این شاخص برای سالیسیلیک اسید ۲۰۰ پی پی ام و کنترل به ترتیب ۳/۳۳۳ و ۵ ارزیابی گردید (شکل ۱).

مشاهدات ماکروسکوپی علایم بیماری بر روی گیاهچه‌های مورد آزمایش نشان داد که سالیسیلیک اسید در تمام تیمارهای به کار برده شده باعث تقویت رشد ساقه و افزایش حجم ریشه گیاهچه‌ها نسبت به شاهد آنالیز آماری صورت گرفته، بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود داشت. تیمار سالیسیلیک اسید با

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه اثر سالیسیلیک اسید در القاء مقاومت خیار به بیماری بوته میری پیتومی خیار با استفاده از ژن *Actin* به عنوان ژن مرجع.

شماره دسترسی	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	طول قطعه تکثیری	آغازگر برگشت 5'-3'	آغازگر رفت 5'-3'	ژن
U36339	60.5	149	CACCGGGTTCGGAAAGG	CACCGGGTTCGGAAAGG -	Lipoxygenase
DQ482461	59.5	180	ACTCAAGCCATTGCCTTCCA	TCACTGTGGTGTGTGCTCTC	Cup4
DQ115882	60	117	ACACAGTTCCTCATCTACGAG	GAAGGAATAACCACGCTCAG	Actin



غلظت اسید سالیسیلیک (پی پی ام)

شکل ۱- مقایسه میانگین شدت بیماری بوته میری پیتومی خیار در غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک (۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام) چهار روز بعد از تیمار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪.

## نتایج

### ارزیابی شدت بیماری زایی

بیشترین میزان این تاثیر مربوط به تیمار ۴۰۰ پی پی ام اسید سالیسیلیک در گیاه شاهد بدون تیمار آلودگی مشاهده گردید. (شکل ۲).

### تغییرات میزان فنل و پروتئین کل

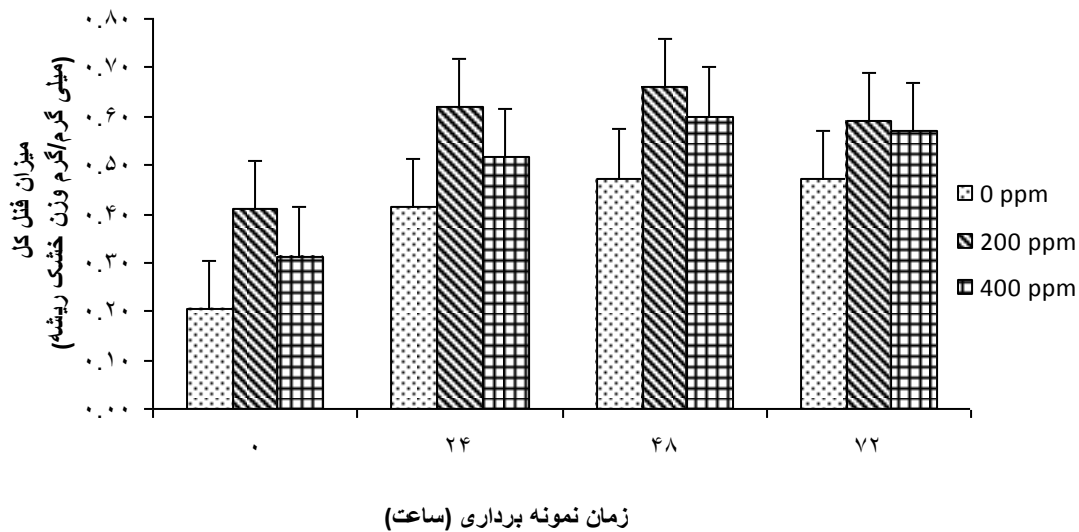
نتایج نشان داد که بین غلظت و زمان‌های نمونه برداری از نظر میزان پروتئین کل و فنل کل اختلاف معنی دار ( $p < 0/05$ ) وجود دارد (بیشترین میزان فنل کل در

کاربرد اسید سالیسیلیک، هیچ تفاوت معنی داری بین غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام مشاهده نگردید (شکل ۳).

غلظت ۲۰۰ پی پی ام و ۴۸ ساعت بعد از کاربرد اسید سالیسیلیک استخراج شد ولی بعد از گذشت ۷۲ ساعت از



شکل ۲- اثر سالیسیلیک اسید در غلظت های مختلف در روند رشد و ریشه زایی گیاهچه ها: (A): گیاهچه شاهد بدون آلودگی + اسید سالیسیلیک (۴۰۰ پی پی ام)، (B): گیاهچه آلوده بدون تیمار اسید سالیسیلیک، (C): تیمار اسید سالیسیلیک (۲۰۰ پی پی ام)، (D): تیمار اسید سالیسیلیک (۴۰۰ پی پی ام).

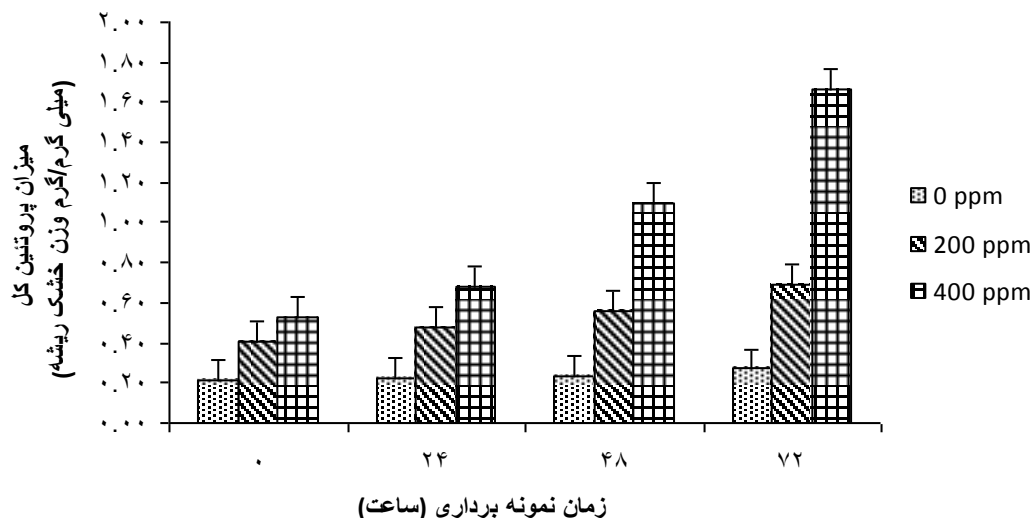


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت های اسید سالیسیلیک بر میزان فنل کل در برگهای گیاه خیار تحت شرایط پیش تیمار و مایه کوبی در سطح احتمال ۰.۰۵. هم پوشانی استاندارد بار نشان می دهد که تفاوت معنی دار وجود ندارد.

ساعت پس از کاربرد می باشد. ولی در تمام بازه های زمانی میزان تغییرات برای غلظت ۴۰۰ پی پی ام روند افزایشی بیشتری داشته است. در تمام غلظت ها میزان

بررسی میزان تغییرات پروتئین کل نشان داد که بالاترین میزان پروتئین اندازه گیری شده مربوط به کاربرد غلظت ۴۰۰ پی پی ام اسید سالیسیلیک و ۷۲

پروتئین کل مربوط به نمونه های شاهد کمتر از تیمارهای مربوط به کاربرد اسید سالیسیلیک مشاهده گردید (شکل ۴).



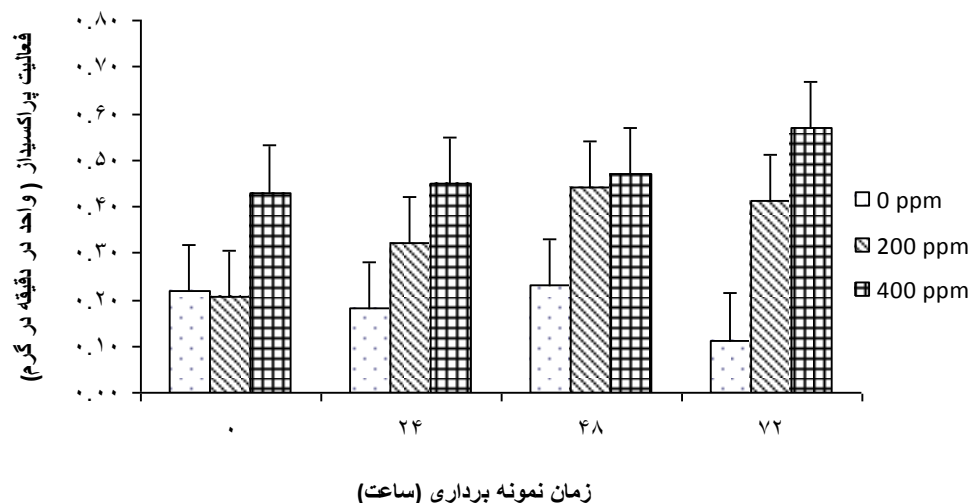
شکل ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت های اسید سالیسیلیک بر میزان پروتئین کل در برگ های گیاه خیار تحت شرایط پیش تیمار و مایه کوبی در سطح احتمال ۰.۵٪ هم پوشانی استاندارد بار نشان می دهد که تفاوت معنی دار وجود ندارد.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در غلظت ۴۰۰ پی پی ام بود. در این غلظت با گذشت زمان میزان فعالیت آنزیم رو به افزایش گذاشت به نحوی که بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ۷۲ ساعت بعد از کاربرد القا کننده بود. اگر چه میزان بیان آنزیم فوق در غلظت ۲۰۰ پی پی ام نیز اندکی با گذر زمان افزایش یافت اما در حالت کلی هیچ اختلافی بین شاهد و غلظت ۲۰۰ پی پی ام در تمامی زمان های نمونه برداری مشاهده نشد (شکل ۶).

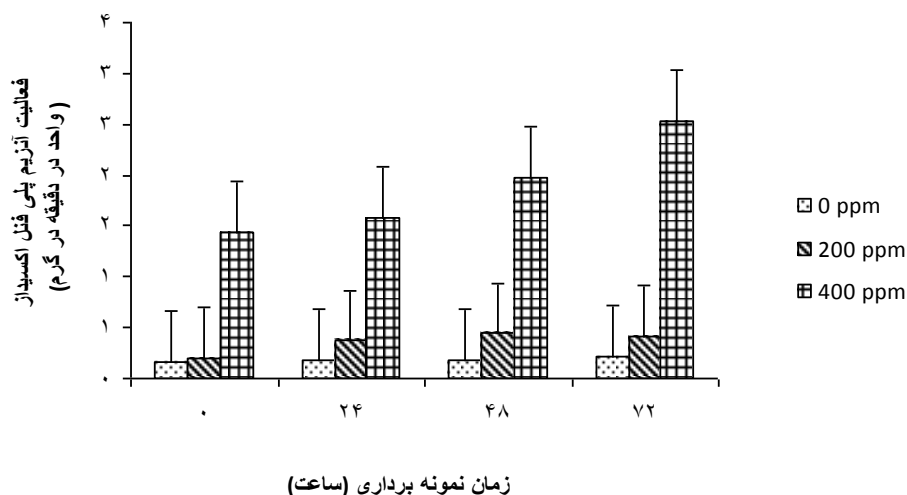
#### فعالیت آنزیم پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمولیاژ

بررسی تغییرات فعالیت دو آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در بازه های زمانی بعد از کاربرد، نشان داد که بیشترین مقدار تغییرات مربوط به غلظت ۴۰۰ پی پی ام اسید سالیسیلیک می باشد. فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ۲۰۰ پی پی ام در ۴۸ ساعت بعد از کاربرد سالیسیلیک اسید به بیشترین مقدار خود رسیده و سپس روند کاهشی را نشان داد. در غلظت ۴۰۰ پی پی ام در تمام بازه های زمانی میزان فعالیت این آنزیم افزایش نشان داد (شکل ۵).





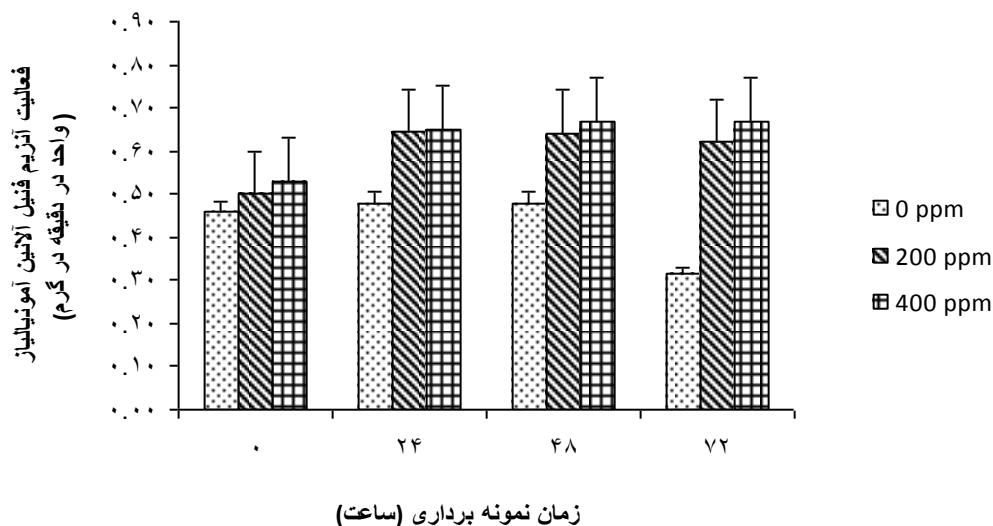
شکل ۵- مقایسه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (واحد در دقیقه در هر گرم وزن خشک) در غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و در زمان‌های مختلف بعد از کاربرد آن‌ها در برگ‌های گیاه خیار در سطح احتمال ۰.۵٪. هم پوشانی استاندارد بار نشانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین فاکتورها است.



شکل ۶- مقایسه میانگین تیمارها بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (واحد در دقیقه در هر گرم وزن خشک) در برگ‌های گیاه خیار تحت شرایط پیش تیمار و مایه کوبی در سطح احتمال ۰.۵٪. هم پوشانی استاندارد بار نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌دار وجود ندارد.

داری در میزان فعالیت این آنزیم بین دو غلظت ذکر شده مشاهده نشد. در شاهد آلوده نیز، ۷۲ ساعت بعد از استفاده از القا کننده، میزان فعالیت این آنزیم کاهش یافت (شکل ۷).

میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام از اسید سالیسیلیک، ۲۴ ساعت پس از کاربرد آنها، اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان داد ولی با گذشت زمان، تغییر محسوس و معنی-

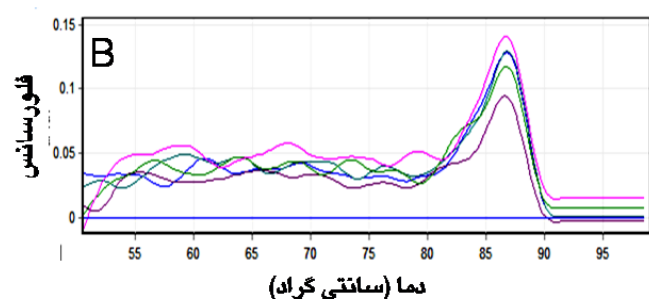
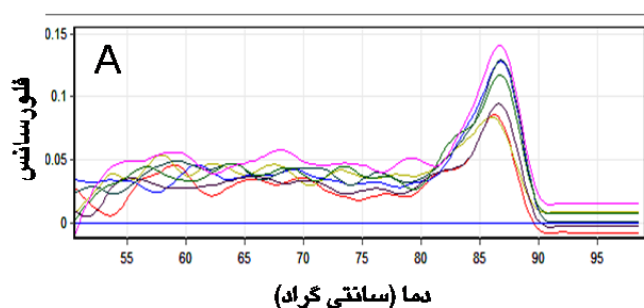


شکل ۷- مقایسه میانگین تیمارها بر فعالیت فنیل آلانین آمونیالایز (واحد در دقیقه در هر گرم وزن خشک) در برگهای گیاه خیار تحت شرایط پیش تیمار و مایه کوبی در سطح احتمال ۰.۰۵٪. هم پوشانی استاندارد بار نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌دار وجود ندارد.

ملکول‌های هدف یک منحنی مشخص با نقطه اوج دمایی در محدوده‌ی ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد دارا می‌باشند (شکل ۸).

#### بیان ژن‌های مسئول مقاومت

بررسی منحنی ذوب آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که هر دو آغازگر در مراحل تکثیر



شکل ۸- منحنی ذوب آغازگرهای مورد استفاده. (A): ژن *Cupi4*. (B): ژن *Lipoxygenase*.

سطح پنج درصد معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). میزان بیان ژنهای فوق در پاسخ به آلودگی در ساعات پس از مایه زنی افزایش یافت. بیشترین میزان بیان برای ژنهای *Cupi4* و لیبوکسی ژناز مربوط به زمان ۲۴ ساعت بعد از آلودگی با قارچ تعیین گردید.

اثر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر روی بیان ژن‌های *Cupi4* و لیبوکسی ژناز نشان داد که بیشترین میزان بیان هر دو ژن در تیمار ۴۰۰ پی پی ام از اسید سالیسیلیک بدست آمد ولی میزان این تغییرات برای ژن *Cupi4* در تمام بازه‌های زمانی بیشتر از ژن لیبوکسی ژناز ثبت شد (جدول ۲ و ۳). میزان بیان ژن‌های فوق در

ژن ها پس از زمان اوج کاهش یافته است که می توان دلیل این امر را فعال شدن سیستم دفاعی گیاه در پاسخ به کاربرد اسید سالیسیلیک دانست.

همچنین داده ها نشان می دهد که در هر دو ژن بررسی شده در زمان ۷۲ ساعت بعد از تلقیح اختلاف معنی داری در میزان بیان ژن ها در غلظت های مختلف مصرفی اسید سالیسیلیک وجود نداشت و میزان بیان این

جدول ۲- تغییرات بیان ژن *Cupi4* در فواصل زمانی قبل از آلودگی (زمان صفر)، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از اسپری کردن و غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک ( صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام) در گیاه خیار در برابر *Pythium. aphanidermatum*.

زمان (ساعت)	میزان بیان ژن <i>Cupi4</i>		
	غلظت اسید سالیسیلیک ( پی پی ام)		
	صفر	۲۰۰	۴۰۰
۰	۱/۰۳۷ e	۲/۸۷۰ d	۴/۱۳۳ c
۲۴	۱/۰۴۸ e	۶ b	۱۲/۶۷a
۴۸	۱/۰۳۱ e	۴/۵c	۶b
۷۲	۱/۰۴۰ e	۱/۰۲۵ e	۱/۰۴۸e

میانگین های دارای حروف مشترک در هر شکل، اختلاف معنی دار بر اساس ازمون LSD در سطح احتمال یک درصد ندارند.

جدول ۳- تغییرات بیان ژن *Lipoxygenase* در فواصل زمانی قبل از آلودگی (زمان صفر)، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از اسپری کردن و غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک ( صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام) در گیاه خیار در برابر *Pythium aphanidermatum*.

زمان (ساعت)	میزان بیان ژن <i>Lipoxygenase</i>		
	غلظت اسید سالیسیلیک ( پی پی ام)		
	صفر	۲۰۰	۴۰۰
صفر	۱/۰۲۳ f	۲۰	۵ d
		۲/۳ e	
۲۴	۱/۰۲۲ f	۵d	۱۲ b
۴۸	۱/۰۲۷ f	۸/۵C	۳۰a
۷۲	۱/۰۴۴ f	۱/۰۳۱f	f

میانگین های دارای حروف مشترک در هر شکل، اختلاف معنی دار بر اساس ازمون LSD در سطح احتمال یک درصد ندارند.

افزایش زمان کاهش پیدا کرده و به کمترین مقدار در زمان ۷۲ ساعت بعد از تلقیح رسید (جدول ۳). در هر دو ژن مورد بررسی میزان بیان، در غلظت ۴۰۰ پی پی ام بیشتر از ۲۰۰ پی پی ام تعیین گردید که دلیل این امر را می توان تاثیر غلظت بیشتر عامل القایی بر افزایش بیان ژن های دفاعی ژن *cupi4* و لیپوکسی ژناز دانست.

میزان بیان ژن *cupi4* در غلظت ۴۰۰ پی پی ام، ۴۸ ساعت بعد از تلقیح افزایش یافت و دوباره این مقدار در ۷۲ ساعت بعد از تلقیح کاهش چشم گیری نشان داد (جدول ۲). میزان بیان ژن لیپوکسی ژناز نیز در غلظت ۴۰۰ پی پی ام، ۲۴ ساعت بعد از تلقیح بیشترین میزان بیان را در گیاه تیمار شده دارا بود که این مقدار با

## بحث

واکنش‌های دفاعی گیاهان توسط شبکه‌ی پیچیده‌ای از مولکول‌های سیگنالی و فاکتورهای تنظیم‌کننده نسخه برداری ژن‌ها تنظیم می‌شوند. سه مولکول به نام‌های سالسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن سبب بیان واکنش‌های دفاعی خاص و اساسی می‌شوند. سالسیلیک اسید (SA) به عنوان یکی از مولکول‌های علامت‌رسان تنش در گیاهان شناخته شده و نقش مهمی در پاسخ‌های گیاه به عوامل بیمارگر و دیگر عوامل تنش‌زا ایفا می‌کند. این مولکول دارای ماهیت فنلی است که در فیزیولوژی گیاه به ویژه تحریک واکنش‌های دفاعی گیاه علیه عوامل بیماری‌زای قارچی نقش داشته (پریتوییراج و همکاران ۲۰۰۵) و کاربرد خارجی آن سبب بیان مقاومت و افزایش ظرفیت دفاعی بافت‌ها به صورت بروز مقاومت سیستمیک اکتسابی می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهند که سالسیلیک اسید اثر ضد قارچی ندارد بلکه باعث فعال شدن مسیر SAR و القای پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌شود که مستقیماً رشد قارچ را تحت تاثیر قرار می‌دهند (دورانت و دانگ ۲۰۰۴). در ارتباط با عوامل آنتاگونیستی قارچی، کاربرد این عوامل نظیر گونه‌های میکوریزی، تریکودرما و گونه‌های غیر بیمارگر فوزاریوم قبل از آلوده‌سازی گیاه با یک بیمارگر گیاهی، کنترل بهتری از بیماری را نشان داده است (دانتوف و همکاران ۱۹۹۵) که این می‌تواند به دلیل پوشش سطح ریشه و اشغال آن توسط عامل آنتاگونیست قبل از نفوذ عامل بیمارگر باشد. بسیاری از باکتری‌های تقویت‌کننده‌ی رشد بدون تولید آنتی‌بیوتیک، باعث ایجاد مقاومت اکتسابی در گیاهان میزبان‌شان می‌شوند (زندر و همکاران ۲۰۰۱). کاربرد باکتری‌های آنتاگونیست نظیر گونه‌های *Bacillus* باعث افزایش مقاومت گیاه به عوامل بیمارگر قبل از نفوذ آنها

شده است. پوشش بذری هویج، جو و بادام زمینی با سویه *Bacillus subtilis A13* و کشت آنها در شرایط گلخانه باعث مقاومت اکتسابی به بیمارگرهای مورد استفاده شده است (مریمان و همکاران ۱۹۷۴). باکتری‌های تولیدکننده فلورسانس در گیاهان از طریق تولید مواد ضد قارچی، القاء مقاومت و تداخل با فاکتورهای بیماری‌زای قارچی باعث ایجاد مقاومت قبل از تماس بیمارگر با ریشه‌ی گیاهان تیمار شده می‌شود (هاس و دفاگو ۲۰۰۵). مشاهدات ما در این تحقیق نیز نشان داد که کاربرد اسید سالسیلیک قبل از اعمال عامل بیمارگر باعث بهبود شرایط رشدی و افزایش رشد ریشه می‌شود (شکل ۲). با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر که نشان‌دهنده‌ی افزایش میزان تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی است، می‌توان چنین نتیجه گرفت که پیش‌تیمار گیاه خیار با سالسیلیک اسید سبب کنترل موثر مرگ پیتیومی گیاه می‌شود (شکل ۱). مطالعات نشان داده است که استفاده از این ماده در مقادیر غیر سمی برای گیاهان حساس (توتون) توانسته است مقاومت به عوامل بیماری‌زای قارچی نکروتروفیک را در گیاه افزایش دهد (مورفی ۲۰۰۰) که این نظریه با داده‌های این آزمایش که سبب کاهش نکروز بافتی در گیاهان تیمار شده با دوز ۴۰۰ پی‌پی‌ام بوده است، مطابقت داشت. حفاظت از گیاه، حاصل تحریک پاسخ‌های مختلف دفاعی است. سیستم یکپارچه دفاعی با تحریک همزمان چندین آنزیم دفاعی توسط تحریک‌کننده به کار رفته، آغاز می‌شود. در ارتباط با کاهش یا افزایش این ترکیبات در میزبان‌های بیمار توسط عوامل بیماری‌زای عفونی، نتایج متفاوتی از تحقیقات مختلف به دست آمده است که این می‌تواند ناشی از طبیعت و نحوه‌ی تحریک متفاوت سیستم‌های دفاعی میزبان بوسیله‌ی عوامل القاء‌کننده مقاومت باشد

برخی از ژن های مربوط به پروتئین های بیماری زا (PR) در گیاه خیار باعث افزایش مقاومت به آلودگی در برابر قارچ های *Didymella Alternaria cucumerinum*، *Botrytis cinerea* و *Fusarium oxysporum applanata* شده است (فانتومارت ۲۰۰۶). نتایج آماری حاصل از بررسی اثر غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک بر روی بیان ژن های *Cupi4* و *Lipoxygenase* با روش دانکن نشان داد که میزان بیان ژن *Cupi4* در بین زمان های مختلف نمونه برداری نسبت به ژن *Lipoxygenase* افزایش بیشتری داشته است که این می تواند دلیلی بر اهمیت بسیار زیاد و نقش کلیدی این ژن در مقاومت گیاه به بیماری به ویژه در ساعات اولیه مواجهه با بیماری باشد. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که القای گیاه با استفاده از القاگرهایی چون سالیسیلیک اسید و نیز عوامل بیماری زای قارچی سبب افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم می شود و می توان آن را به عنوان یک نشانگر مقاومت در گیاه خیار در نظر گرفت (یوسفی و همکاران ۲۰۰۹). به نظر میرسد متفاوت بودن غلظت القاء کنندگی در هر یک از آزمایشهای این تحقیق از نظر اثر بر رقم مورد استفاده (کیان)، میزان قدرت تهاجمی بیمارگر و نوع ماده القاگر باعث تفاوت در میزان مقاومت القایی و تفاوت پاسخ های دفاعی در رقم مورد آزمایش شده است. تنوع بالای مسیرهای پاسخ دفاعی گیاهان در برابر عوامل بیماری زا و پیچیدگی و ابهامات جنبه های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دفاع گیاهی، باعث شده است که همچنان بسیاری از زوایای پاسخ های دفاعی گیاهان و مسیرهای مستقیم آن ناشناخته باقی بماند. در نتیجه، مطالعه و تحقیقات گسترده در این زمینه باعث رفع ابهامات و بهبود روش های مبتنی بر کنترل غیر شیمیایی، بخصوص در زمینه القای

(آگروال و همکاران ۲۰۰۲). فعالیت پراکسیداز با مقاومت در برابر بیماری در گیاهان مرتبط بوده (هامرشیمیت و کوک ۱۹۸۲) و به دنبال مایه کوبی بیمارگر در گیاهان میزبان افزایش می یابد (اسکوت کریچ و همکاران ۱۹۹۵). نتایج ما در این تحقیق نشان داد که با استفاده از القا کننده ی سالیسیلیک اسید، میزان فعالیت این آنزیم افزایش پیدا کرد (شکل ۳) که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. در نتیجه ی فعالیت آنزیم PAL دو مسیر بیوسنتزی فعال می شود که یکی از این مسیرها مربوط به سنتز سالیسیلیک اسید است. این هورمون در مراحل آغازین مسیر فنیل پروپانویید ساخته می شود و باعث فعال شدن مسیر SAR و القای مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاه خواهد شد (چن و همکاران ۲۰۰۹). در این مطالعه، پس تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید باعث افزایش فعالیت PAL نسبت به گیاه شاهد گردیده است که نشان دهنده ی نقش این آنزیم در مکانیسم دفاعی گیاه در برابر تنش مذکور است (شکل ۷). پلی فنل اکسیدازها سبب اکسیداسیون دی هیدروکسی فنل ها به کینون ها که برای عوامل بیماری زا سمی تر هستند، می شوند. سمیت مستقیم کینون ها بر علیه عوامل بیماری زا پیشنهاد شده است (مایر و هارل ۱۹۷۹). مقایسه ی تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بین تیمارهای گوناگون در این تحقیق نشان داد که در غلظت ۴۰۰ پی پی ام افزایش فعالیت آنزیم بعد از کاربرد القا کننده و مایه زنی عامل بیماری وجود دارد (شکل ۶). نتایج حاصل از آزمایش بررسی کمی دو ژن دخیل در مقاومت گیاهان به عوامل بیمارگر نشان داد که میزان بیان نسبی ژن های *Lipoxygenase* و *Cupi4* در گیاهان بیمار القاء شده توسط اسید سالیسیلیک نسبت به گیاهان کنترل افزایش قابل توجهی داشت. همچنین، نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که افزایش بیان ژن *Lipoxygenase* و

### سپاسگزاری

بخشی از این تحقیق با مساعدت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان انجام شد که در اینجا از معاونت محترم پژوهشی آن واحد تقدیر و تشکر بعمل می آید. از آقای مهندس خاقانی به خاطر در اختیار گذاشتن بذور خیار گلخانه‌ای تشکر و قدردانی می شود.

مقاومت خواهد شد. در سالهای اخیر القای مقاومت از طریق تیمار گیاهان با عوامل زنده و غیر زنده به‌طور وسیعی تبدیل به یکی از روشهای با پتانسیل قوی جهت کنترل بیماریهای گیاهی شده است. بنابراین القاء مقاومت به عنوان یک تکنولوژی جدید جهت کنترل بیماری های گیاهی جایگاه خود را پیدا کرده و تأثیر آن در شرایط آزمایشگاه و برخی از مزارع به اثبات رسیده است.

### منابع مورد استفاده

- Agrawal AA, Tuzun S and Bent E, 2002. Maternal effects associated with herbivory: mechanisms and consequences of transgenerational induced plant resistance. *Ecology* 83: 3408-3415
- Altier NA and Theis JA, 1995. Identification of resistance to *Pythium* seedling diseases in alfalfa using a culture plate method. *Plant Disease* 97: 341-346.
- Bradford MM, 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analalytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chen C, Zheng Z, Huang J, Lai Z and Fan B, 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling Behavior* 4: 493-496.
- Datnoff L, Nemecek S and Pernezny K, 1995. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological Control* 5: 427-431.
- Durrant WE and Dong X, 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209.
- Durner J, Shah J and Klessig DF, 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trend Plant Science* 2: 266-274.
- Edreva A, 2004. A novel strategy for plant protection: Induce resistance. *Journal of Cell and Molecular Biology* 3: 61-69.
- Favrin RJ, Rahe JE and Mauza B, 1988. *Pythium* spp. associated with crown rot of cucumbers in British Columbia greenhouses. *Plant Disease* 72: 683-687.
- Gapińska M, Skłodowska M and Gabara B, 2008. Effect of short-and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 11-18.
- Hammand-Kosack E and Jones DJ, 1996. Resistance gene- dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773- 1791.
- Hammerschmidt R and Kuc J, 1982. Lignifications as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 20: 61-69.
- Haas D and Défago G, 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3: 307-319.
- Jayaraj J, Wan A, Rahman M and Punja ZK, 2008. Seaweed extracts reduces foliar fungal disease on carrot. *Crop Protection* 27: 1360-1366.

- Jayaraj J, Jeff N and Zamir KP, 2011. Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. *Journal of Applied Physiology* 23: 353–361.
- Mandal S, Hazra B, Sarkar R, Biswas S and Mandal N, 2009. *Hemidesmus indicus* an age-old plant: study of its in vitro antioxidant and free radical scavenging potentials. *Pharmacologyonline* 1: 604-617.
- Mauch-Mani B and Métraux JP, 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annal Botany* 82: 535-540.
- Mayer AM and Harel E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215.
- Merriman P, Price R, Kollmorgen J, Piggott T and Ridge E, 1974. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Crop and Pasture Science* 25: 219-226.
- Mohammadi M and Kazemi H, 2002. Changes in peroxidase and polyphenol activity in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science* 162: 491-499.
- Murphy A, 2000. Characteristic of Salicylic acid induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiological and Molecular Plant pathology* 57: 47-54.
- Oka Y, Chet I and Spiegel Y, 1997. Are pathogenesis-related proteins induced by *Meloidogyne javanica* or *Heterodera avenae* invasion. *Journal of Nematology* 29: 501-508.
- Panella LW, 1998. Screening and utilizing beta genetic resources with resistance to *Rhizoctonia* root rot and *Cercospora* leaf spot in sugar beet breeding program. p.150. 4<sup>th</sup> International Beta Genetic Resources Workshop and World Beta Network Conference, Izmir, Turkey.
- Paxton JD, 1981. Phytoalexins-a working redefinition. *Phytopathology* 101: 106-109.
- Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.
- Phuntumart V, Marro P, Métraux JP and Sticher L, 2006. A novel cucumber gene associated with systemic acquired resistance. *Plant Science* 555: 564-571.
- Prithiviraj B, Bis HP, Jha AK and Vivanco JM, 2005. *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA dependent, NPR1 independent host responses. *Plant Journal* 42: 417-432.
- Ramoorthy V, Raguchander T and Samiyappan R, 2002. Enhancing Resistance of tomato and hot peper to Pythium disease by seed treatment with fluorescent Pseudomonas. *European Journal of Plant Pathology* 108: 429-441.
- Reignault P and Walters D, 2007. Induced resistance for plant defense, a sustainable approach to crop protection. Blackwell. Oxford. UK.
- Sahebani N. 2004. Interaction *M. javanica* with *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* and evaluation some defense biochemical mechanisms. PhD. thesis. University of Tehran.
- Scott-Craig JS, Kerby KB, Stein BD and Somerville SC, 1995. Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley *Hordeum vulgare*. by the powdery mildew pathogen *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*.. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 407-418.
- Uchida K, Takamatsu S, Matsuda S, Kazuhiro S and Yukio S, 2009. Morphological and molecular characterization of Oidium subgenus Reticuloidium powdery mildew. Newly occurred on cucumber in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75: 92–100.

- Van Loon L, Pierpoint W, Boller T and Conejero V, 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 245-264.
- Van Loon L and Van Strien E, 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Veladi S, Soleimani MJ, Khodakarmian GH and, Ghyasvand T, 2013. Effect of salicylic acid and chitosan on induction of resistance in chickpea against fusarium wilt and root rot. *Iranian Journal of Plant Pathology* 492: 181-199.
- Yusefi H, sahebani NA, MirAbolfathi M, Fravardeh L and Mahdavi V, 2009. The effect of salicylic acid and *Bacillus subtilis* on cucumber root and stem rot, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*. *Iranian Journal of Plant Pathology* 464: 293-308.
- Zehnder GW, Murphy JF, Sikora and EJ, Kloepper JW, 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107: 39-50.
- Zhang Z, Pang X, Duan X, Ji ZL and Jiang Y, 2005. Role of peroxidase in anthocyanine degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry* 90: 47-52.
- Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA and Lamb CJ, 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of *Chitinase* and *Glucanase* genes in transgenic tobacco. *Nature Biotechnology* 128: 807-81.



## The Effect of Salicylic Acid to Induce Systemic Resistance in Cucumber Plant to Damping-off Disease Caused by *Pythium aphanidermatum*

S K Sabbagh<sup>1\*</sup>, E Sabbagh<sup>2</sup>, J Abkhoo<sup>3</sup> and F Zinati Fakhrabad<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Associate Professor, Department of Biology, Campus of Science, Yazd University.

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Agronomy, Islamic Azad University, Zahedan Branch.

<sup>3</sup>Instructor, Institute of Plant Biotechnology, University of Zabol.

<sup>4</sup>PhD Student of Plant Protection, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol,

\*Corresponding Author Email: sksabbagh@yazd.ac.ir

Received 21 Dec 2014

Accepted 26 May 2016

### Abstract

Damping-off disease caused by *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. is one of the destructive diseases of cucumber in commercial greenhouses which led to considerable loss of yield. In this study, the effect of Salicylic acid on induced resistance in infected cucumber with damping-off disease was investigated. For this propose, expression level of *cupi4* and *Lipoxygenase* genes and the activity of several biochemical enzymes was investigated. A factorial experiment based on randomized complete design with four replications was carried out in the greenhouse condition at 25-27°C with 70% moisture and 14:8 h light:dark photoperiod. The results of disease incidence assay showed that there were a significant difference at the 5% level among treated plants with different concentration of salicylic acid (0, 200 and 400 ppm) and control plants. The assay of antioxidant enzymes activity in treated plant showed that the activity of Proxidase and Polyphenoloxidase enzymes were considerably increased compared to control while the Phenylalanine ammonia-lyase was not significantly increased when compared to non treated plants. Gene expression analysis by qRT-PCR method showed that salicylic acid application is able to increase the expression level of tested genes, but the highest expression level was recorded for *Cupi4* gene. The results of this research indicate that application of salicylic acid could play an important role in enhancing the cucumber resistance against damping-off disease.

**Keywords:** induced resistance, salicylic acid, damping-off, *Lipoxygenase*, *cupi4* gene.