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

سید کاظم صباغ[1*]، ابراهیم صباغ،[2] جواد آبخو[3] و فاطمه زینتی فخراباد[4]

۱- دانشیار گروه زیست شناسی مجتمع علوم دانشگاه یزد.

۲- استادیار گروه زراعت دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان.

۳- مربی پژوهشی پژوهشکده زیست فناوری گیاهی دانشگاه زابل.

۴- دانشجوی دکتری بیماری شناسی 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 می شود. 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 ۱۶:۸ 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 اکسیدانتی 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 آمونیالیاز 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 می باشد 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 سالسیلیک، مرگ گیاهچه، لیپوکسی ژناز و ژن *Cupi4*.

مقدمه

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 می باشد (فروین و همکاران، ۱۹۸۸). یکی از مهمترین راههای کنترل این بیماری، القاء مقاومت در گیاه گلخانه‌ای محسوب می شود. گونه‌ی قارچی *Pythium aphanidermatum* از جمله بیمارگرهای مهم گیاهی و عامل پوسیدگی ریشه و طوقه خیار، با گسترش جهانی و در برابر عامل بیماری می باشد. اخیراً تحقیقات بسیاری پیرامون مقاومت القایی گیاه که توسط محرک‌های خارجی در گیاه اعمال می‌شود، صورت گرفته است

Archive of SID

www.SID.ir

(ادروا ۲۰۰٤). بطور کلی پس از شناسایی عامل بیمارگر (یا عوامل غیر بیمارگر) توسط میزبان، مکانیزم های دفاعی آن به صورت موضعی یا سیستمیک، فعال می شوند. مقاومت سیستمیک اکتسابی [1](SAR) و مقاومت سیستمیک القایی [2](ISR) دو نوع واکنش در گیاهان هستند که سبب مقاومت و یا تحمل گیاه در مقابل بیمارگرها می شوند. ترکیبات و یا عواملی که سبب القا مقاومت در گیاه می شوند، تحریک کننده نامیده شده و می توانند جزو عوامل زنده و یا غیر زنده باشند (موش مانی و مترو ۱۹۹۸). تاکنون عوامل متعددی در گیاهان به عنوان مکانیزم های دفاعی شناخته شده اند که از جمله ی آن ها می توان به سنتز و ترشح ترکیبات فنلی داخل و خارج سلول، سنتز فیتوالکسین ها و پروتئین های مرتبط با بیماری زایی اشاره کرد (هاماند کوساک و جون ۱۹۹٦، اوکا و همکاران ۱۹۹۷، پاکسون ۱۹۸۱). پیش تیمار گیاهان با برخی از تحریک کننده ها، باعث پاسخ های دفاعی در پاتوسیستم های مختلف شده است. سالیسیلیک اسید یکی از ترکیبات فنلی تولید شده توسط گیاه است که در برابر پاسخ های دفاعی به استرس های 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 بوسیله ی 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 پروتئین های مرتبط با بیماری زایی می باشد. در واقع بیان ژن های دفاعی مثل ژن های کد کننده‌ی پروتئین های مرتبط با بیماری‌زایی به عنوان یکی از شاخص های مقاومت به کار می رود. از جمله‌ی این نوع پروتئین ها، کیتیناز و بتا-۱ و۳-گلوکاناز هستند که همواره با سایر آنزیم های دفاعی مثل بتا ۱و٤- گلوکاناز و پراکسیداز و غیره در فعالیت‌های دفاعی موثرند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی که اغلب پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی [3](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 بیماری زا یا تنش‌های محیطی، در غلظت بسیار بالاتری تولید می شوند (وان لون و وان استرین ۱۹۹۹). پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی به صورت درون سلولی و برون سلولی، به ویژه در دیواره های سلولی بافت‌های مختلف گیاهی وجود دارند. انواع متفاوتی از پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی از گیاهان مختلف جدا شده‌اند. القاء تولید پروتئین‌های مرتبط با دفاع در بسیاری از گونه های گیاهی در برابر آلودگی با باکتری، قارچ، ویروس و یا حمله‌ی حشرات ثابت شده است. این نوع پروتئین‌ها در تک لپه‌ای ها و دو لپه‌ای ها، تکامل خود را حفظ نموده‌اند (وان لون و همکاران ۱۹۹٤). مشخص گردیده است که بیان هم زمان دو یا چند ژن مرتبط با پروتئین های بیماری زا (PR)، با اثر تشدید کنندگی باعث افزایش مقاومت و در نتیجه کنترل موثرتر بیماری می گردد (زو و همکاران ۱۹۹٤). تلقیح گیاه خیار با پاتوژن های مختلفی نشان داده که مولکول های mRNA مربوط به ژن *Cupi4* به صورت سیستمیک در برابر پاتوژن‌ها در گیاه خیار تجمع یافته و با تولید پروتئین-های مرتبط با بیماری‌زایی موجب ایجاد مقاومت در برابر این پاتوژن‌ها می شود (فونتومارت و همکاران ۲۰۰٦). ژن *Lipoxygenase*، یکی از این ژن‌های کد کننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می باشد که نقش آن

[1] Systemic Acquired Resistance
[2] Induced Systemic Resistance
[3] Pathogenesis Related protein

Archive of SID

www.SID.ir

در مقاومت بـه عوامـل میکروبـی در گیاهـان مختلـف از جمله خیار به *Alternaria cucumerinum*، *Didymella applanata*، *Fusarium oxysporum* و *Botrytis cinerea* اثبات شده است (جایاراج و همکاران ۲۰۱۱). از آنجایی که مقاومت میزبان های گیاهی توسـط نژادهـای مختلف قارچ های بیمارگر شکسته می شود، اسـتفاده از روش های دیگر مانند فعال کننده های مصنوعی مقاومت که کم خطر و کم هزینه تـر هسـتند، ضـروری بـه نظـر می رسد. مواد شیمیایی القا کننـده مقاومـت کـه قادرنـد مقاومت را علیه طیف وسیعی از بیماری ها القاء کنند، یک فرصت و ابزار مناسبی را برای کشاورزان ایجاد کرده و کامل کننده مقاومت ژنتیکی گیاهـان بـه بیمـاری‌هـا مـی-باشند. از آنجا که کنترل عوامـل بیمـاریزای خـاکزاد بـه دلیـل شـرایط پیچیـده موجـود در خـاک و ریزوسـفر و تبادلات بیوشیمیایی و بیولوژیک گیـاه و محـیط اطـراف آن، همـواره بـا مشـکلاتی مضـاعف تـوام بـوده اسـت، بررسی امکـان اسـتفاده از روش هـای تلفیقـی و القـای مقاومت در کنترل بیمـاری‌هـای خـاکزاد بـه نحـوی کـه افزایش عملکرد و کاهش خسارات زیست محیطـی را در بر داشته باشد، بسـیار مـورد توجـه قـرار گرفتـه اسـت (رینولت و والترز ۲۰۰۷). در این تحقیـق اثـر سالیسـیلیک اسید در القاء مقاومـت در گیـاه خیـار آلـوده بـه بیمـاری مرگ گیاهچه و تغییـرات فعالیـت تعـدادی از آنـزیم هـای بیوشیمیایی و ژن‌هـای درگیـر در مکانیسـم هـای دفـاعی گیاهان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کاشت خیار و انجام آزمایش

در این تحقیـق از رقـم کیـان خیـار گلخانـه‌ای (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 چهـار عـدد بـذر خیار در گلدان‌های کوچک کاشـته شـده و در گلخانـه در دمای ۲۵ تا ۲۷ $^{\circ}$C با رطوبـت نسـبی ۷۰٪ و دوره نـوری ۱٤ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شـده و آبیاری به طور روزانه انجام گرفت . در مرحله گیاهچـه-ای، گلدان ها با حذف دو گیاهچه تنک شده و تا مرحله ی دو تا چهار برگی مراقبت های لازم از آنها به عمـل آمـد. از دو غلظت ۲۰۰ و ٤۰۰ پی پی ام اسید سالیسیلیک جهـت تحریک گیاه و القاء مقاومت در حضور عامل بیمـارگر بـه صورت اسپری روی برگ های گیاهچه‌هـای دو هفتـه‌ای استفاده شد. این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل ۳×٤ بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام و در چهار بازه زمـانی ۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی نمونه‌برداری بعمل آمد

تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح *Pythium aphanidermatum*:

از جدایـــه‌ی اســـتاندارد قـــارچ *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp تهیـــه شـــده از موسسه تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی ایران جهت تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح استفاده شد. به منظور تهیـه‌ی مایـه‌ی تلقیح جهت آزمون بیماری زایی، قطعاتی از محـیط کشـت حاوی پرگنه قارچ به تشـتک پتـری حـاوی محـیط کشـت جامد CMA[1] منتقل گردید. جهت تهیه‌ی مایـه‌ی تلقـیح از روش رامـورتی و همکـاران (۲۰۰۲) بـا کمـی تغییـرات استفاده گردید. در این روش ۲۰۰ سانتی‌متر مکعب خاک باغچه (دارای بافت لومی شـنی)، ۲۰۰ سـانتی‌متـر مکعـب ماسه‌ی بادی شسته شده، ٤۰ گـرم آرد ذرت و ۸۰ میلـی لیتر آب مقطر، در یک ارلـن مـایر ۱۰۰۰ میلـی لیتـری بـه خوبی مخلوط و دو مرتبه، به فاصله ۲٤ ساعت، در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر بـه مـدت ۳۰ دقیقه استریل شـد. سـپس چهـار قطعـه از محـیط کشـت

[1]Corn Meal Agar (Merck, Germany)

Archive of SID

www.SID.ir

حاوی میسیلیوم قارچ رشد کرده جهت تکثیر به ارلن مایر اضافه و به مدت سه هفته در دمای ۲±۲۷ درجه‌ی سانتی گراد 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)، ٤ 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 اندازه گیری شد (برادفورد ۱۹۷٦). 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 سرعت۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و بخش رویی برای سنجش آنزیم های مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت (گاپینسکا و همکاران ۲۰۰۸).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز (PO)[1]

مقدار ۰/۵ گرم از ریشه‌های نمونه‌برداری شده پس از آب گیری 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=٦)، به آن اضافه و به خوبی یکنواخت گردید. 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 عصاره ی پروتئینی جدا و در دمای ۲۰- درجه ی سانتی گراد 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 ٤٪ بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ٤۷۰ نانومتر در مدت ۳ دقیقه اندازه گیری شد. هر واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقداری از آنزیم تعریف می شود که باعث ۱٪ تغییر در جذب می شود (زانگ و همکاران ۲۰۰۵).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)[2]

جهت اندازه‌گیری میزان تغییرات آنزیم پلی فنل اکسیداز، به عصاره‌ی نمونه گیاهی حاوی ٤۰ میکروگرم پروتئین در یک لوله‌ی آزمایش، ۲۰ میکرولیتر 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 لوله ی آزمایش کاملا مخلوط و توسط دستگاه تکان دهنده به مدت دو دقیقه هوادهی شد. سپس دستگاه طیف سنج با استفاده از این مخلوط صفر شد و ٤۰ 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).

[1] Proxidase (PO)

[2] Polyphenol Oxidase

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)[1]

تعیین میزان فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز با استفاده از روش صاحبانی (۲۰۰٤) انجام شد. در این روش دو میلی لیتر مخلوط واکنش شامل ۱۸۰۰ میکرو لیتر محلول بافر تریس اسیدی ۰/۵ مول (PH=٦/۸) 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 ٦ مولار متوقف شد و جذب نمونه در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

آنالیز بیان ژن

استخراج RNA در دوره های زمانی ۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعدازمایه 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 سنتزرشته اول cDNA، ازکیت 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 میکرولیتر بافر ×۱۰ وسپس حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر عاری از آنزیم RNase به ۲۰ میکرولیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام واکنش های Real-time PCR از دستگاه (Curbet Rotor-Gene 3000, Australia)، استفاده شد. واکنش PCR در ٤۰ چرخه، شامل ۲۰ ثانیه در ۹٤ درجه‌ی سانتیگراد، ۲۰ ثانیه در ٦۱درجه‌ی سانتیگراد و ۳۰ ثانیه در۷۲ درجه‌ی سانتیگراد انجام شد. یک مرحله اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه و یک مرحله پایانی دردمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه نیز در ابتدا و انتهای چرخه‌ها برای PCR انجام شد . برنامه دمایی هردو ژن یکسان می باشند. پس از اتمام چرخه‌های PCR، منحنی ذوب با برنامه، دمایی یک درجه‌ی سانتیگراد در هر چرخه و بین دمایی۵۵-۹۹ 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 کاملا تصادفی در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور اسید سالیسیلیک شامل سه سطح ۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ پی پی ام و فاکتور زمان شامل چهار سطح ۰، ۲٤، ٤۸ 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

[1]Phenylalanine Ammonia Lyase

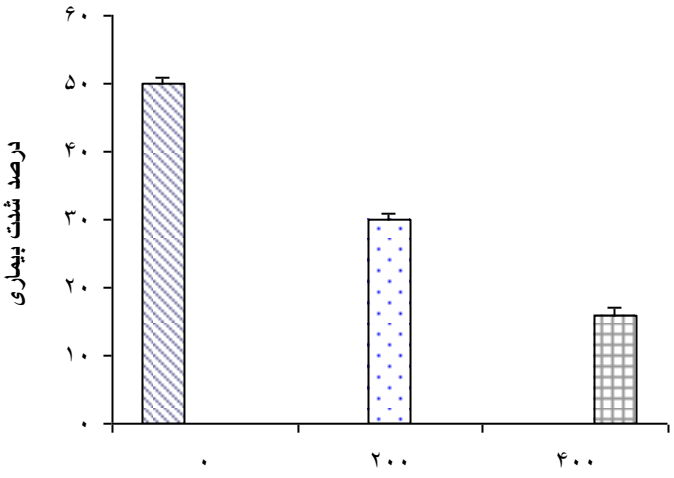
Archive of SID

www.SID.ir

مشاهدات ماکروسکپی 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 سالسیلیک اسید با غلظت ٤٠٠ پی پی ام سبب حداکثر میزان القاء مقاومت گردید به نحوی که شاخص شدت بیماری‌زایی در گیاهان تیمار شده با این تیمار ۱/٦٦٧ بود این در حالی بود که این شاخص برای سالسیلیک اسید ۲۰۰ پی پی ام و کنترل به ترتیب ۳/۳۳۳ و ۵ ارزیابی گردید (شکل ۱).

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

ژن	آغازگر رفت 5'-3'	آغازگر برگشت 5'-3'	طول قطعه تکثیری	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	شماره دسترسی
Lipoxygenase	CACCGGGTTCGGAAAGG -	CACCGGGTTCGGAAAGG	149	60.5	U36339
Cupi4	TCACTGTGGTGTGTGCTCTC	ACTCAAGCCATTGCCTTCCA	180	59.5	DQ482461
Actin	GAAGGAATAACCACGCTCAG	ACACAGTTCCCATCTACGAG	117	60	DQ115882



شکل ۱- مقایسه میانگین شدت بیماری بوته میری پیتیومی خیار در غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک (۰، ۲۰۰ و ٤٠٠ 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 ٤٠٠ پی پی ام اسید سالیسیلیک در گیاه شاهد بدون تیمار آلودگی مشاهده گردید. (شکل ۲).

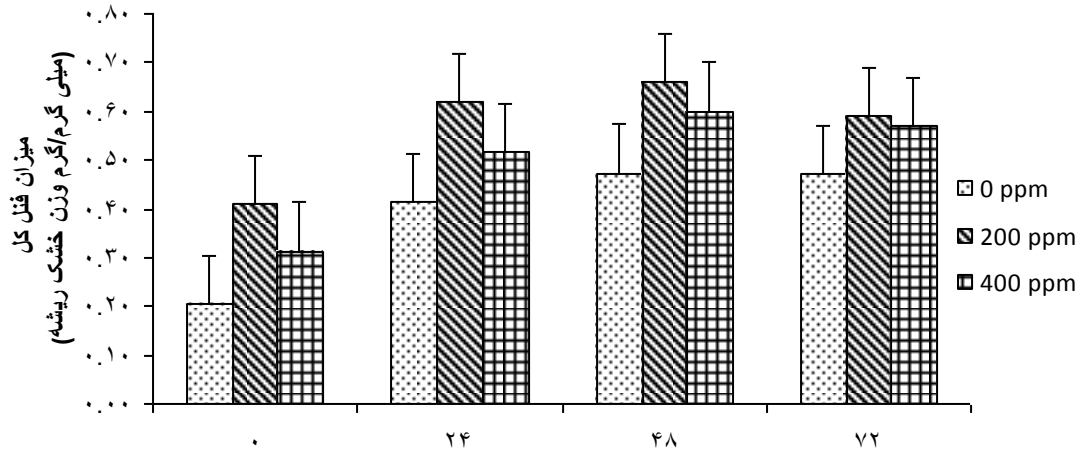
تغییرات میزان فنل و پروتئین کل

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

www.SID.ir

غلظت ۲۰۰ پی پی ام و ٤٨ ساعت بعد از کاربرد اسید سالیسیلیک استخراج شد ولی بعد از گذشت ۷۲ ساعت از کاربرد اسید سالیسیلیک، هیچ تفاوت معنی داری بین غلظت ۲۰۰ و ٤۰۰ پی پی ام مشاهده نگردید شکل ۳).

شکل ۲- اثر سالیسیلیک اسید در غلظت های مختلف در روند رشد و ریشه زایی گیاهچه ها: (A): گیاهچه شاهد بدون آلودگی + اسید سالیسیلیک (٤۰۰ پی پی ام)، **(B)**: گیاهچه آلوده بدون تیمار اسید سالیسیلیک، **(C)**: تیمار اسید سالیسیلیک (۲۰۰ پی پی ام)، **(D)**: تیمار اسید سالیسیلیک (٤۰۰ پی پی ام).

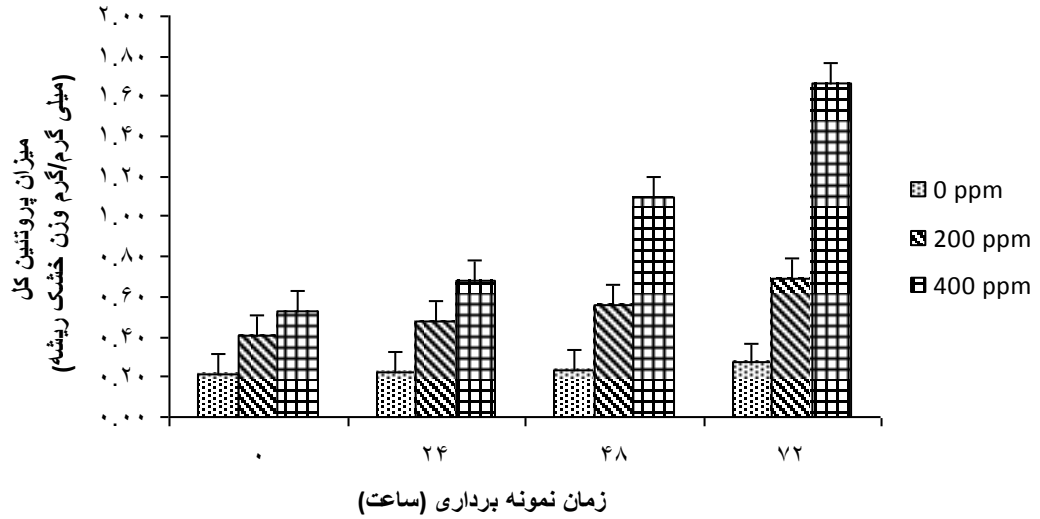


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت های اسید سالیسیلیک بر میزان فنل کل در برگهای گیاه خیار تحت شرایط پیش تیمار و مایه کوبی در سطح احتمال ۵٪ . هم پوشانی استاندارد بار نشان می دهد که تفاوت معنی دار وجود ندارد.

بررسی میزان تغییرات پروتئین کل نشان داد که بالاترین میزان پروتئین اندازه گیری شده مربوط به کاربرد غلظت ٤۰۰ پی پی ام اسید سالیسیلیک و ۷۲ ساعت پس از کاربرد می باشد. ولی در تمام بازه های زمانی میزان تغییرات برای غلظت ٤۰۰ پی پی ام روند افزایشی بیشتری داشته است. در تمام غلظت ها میزان

www.SID.ir

پـروتئین کـل مربـوط بـه نمونـه هـای شـاهد کمتـر از تیمارهای مربوط به کـاربرد اسـید سالیسـیلیک مشـاهده گردید (شکل ٤).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های اسید سالیسیلیک بر میزان پروتئین کل در برگهای گیاه خیار تحت شرایط پیش تیمار و مایه‌کوبی در سطح احتمال ۵٪ هم پوشانی استاندارد بار نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌دار وجود ندارد.

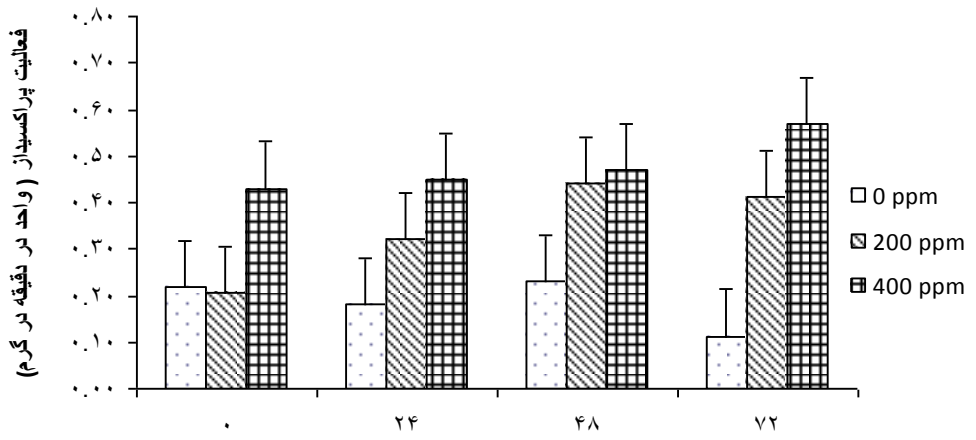
فعالیت انزیم پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیاز

بررسی تغییرات فعالیـت دو آنـزیم پراکسـیداز و پلـی فنل اکسیداز در بازه‌های زمانی بعـد از کـاربرد، نشـان داد که بیشترین مقدار تغییرات مربوط به غلظت ٤۰۰ پی پـی ام اسید سالیسیلیک مـی باشـد. فعالیـت آنـزیم پراکسـیداز در غلظـت ۲۰۰ پـی پـی ام در ٤۸ سـاعت بعـد از کـاربرد سالسیلیک اسید به بیشترین مقـدار خـود رسـیده و سـپس روند کاهشی را نشان داد. در غلظت ٤۰۰ پی پی ام در تمام بازه های زمانی میزان فعالیت این آنزیم افزایش نشـان داد (شکل ٥).

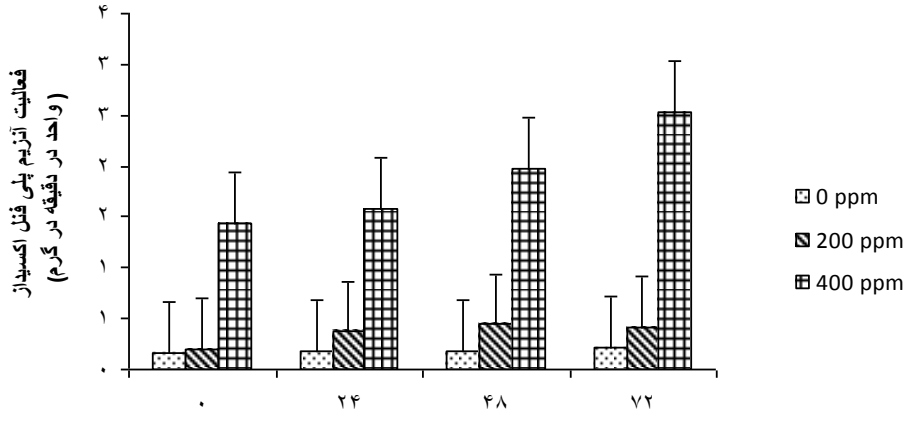
بیشترین میزان فعالیـت آنـزیم پلـی فنـل اکسـیداز در غلظت ٤۰۰ پی پی ام بود. در ایـن غلظـت بـا گذشـت زمـان میزان فعالیت آنزیم رو به افـزایش گذاشـت بـه نحـوی کـه بیشـترین میـزان فعالیـت آنـزیم پلـی فنـل اکسـیداز در ۷۲ ساعت بعد از کاربرد القا کننده بـود. اگـر چـه میـزان بیـان آنزیم فوق در غلظت ۲۰۰ پی پی ام نیز اندکی با گذر زمـان افزایش یافت اما در حالت کلی هـیچ اختلافـی بـین شـاهد و غلظت ۲۰۰ پی پی ام در تمامی زمـان هـای نمونـه بـرداری مشاهده نشد (شکل٦).

Archive of SID

www.SID.ir



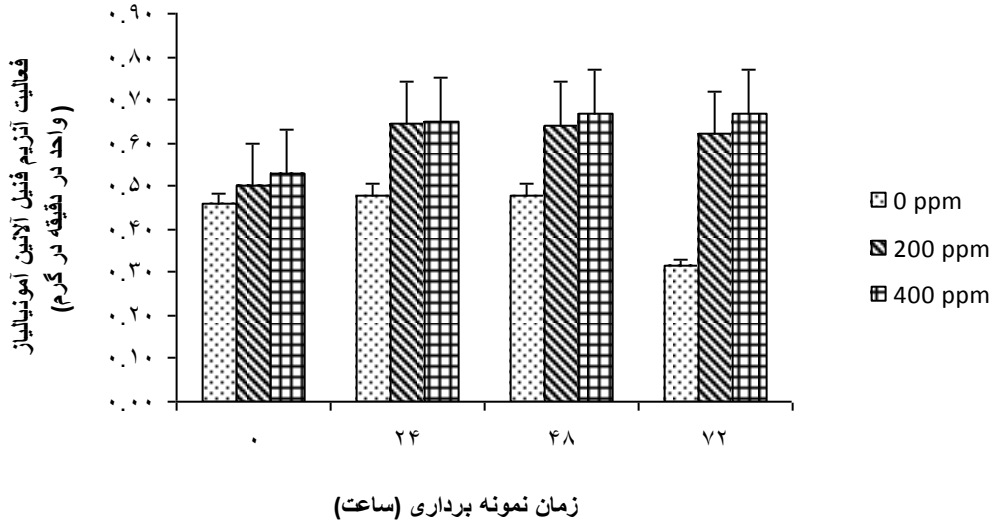
شکل۵- مقایسه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (واحد در دقیقه در هر گرم وزن خشک) در غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و در زمان-های مختلف بعد از کاربرد آن ها در برگ های گیاه خیار در سطح احتمال ۵٪ . هم پوشانی استاندارد بار نشانگرعدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین فاکتورها است.



شکل٦- 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 ۵٪ . هم پوشانی استاندارد بار نشان می دهد که تفاوت معنی دار وجود ندارد.

میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در هر دو غلظت ۲۰۰ و ٤۰۰ پی پی ام از اسید سالیسیلیک، ۲٤ ساعت پس از کاربرد آنها، اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان داد ولی با گذشت زمان، تغییر محسوس و معنی-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).

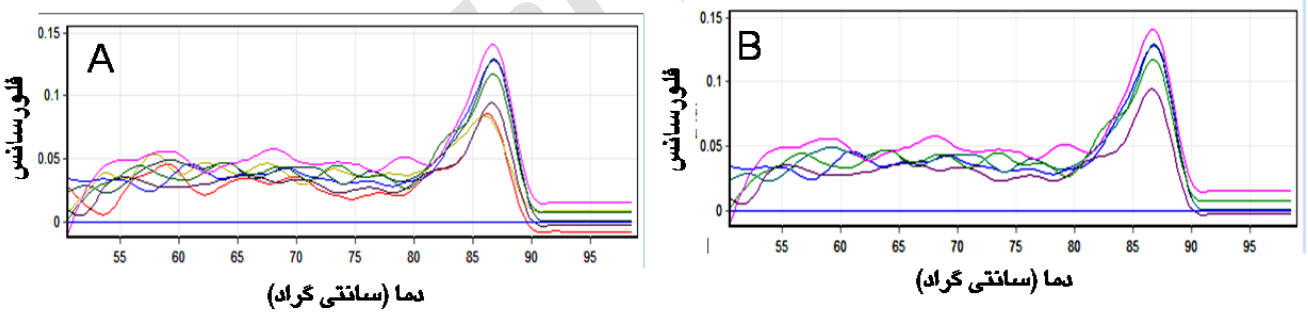
www.SID.ir



شکل۷- مقایسه میانگین تیمارها بر فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز (واحد در دقیقه در هر گرم وزن خشک) در برگهای گیاه خیار تحت شرایط پیش تیمار و مایه کوبی در سطح احتمال ۵٪ . هم پوشانی استاندارد بار نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌دار وجود ندارد.

بیان ژن های مسئول مقاومت

بررسی منحنی ذوب آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که هر دو آغاز گر در مراحل تکثیر ملکول های هدف یک منحنی مشخص با نقطه اوج دمایی در محدوده‌ی ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد دارا می‌باشند (شکل ۸).



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

اثر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک برروی بیان ژن های *Cupi4* و لیپوکسی 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 لیپوکسی ژناز ثبت شد (جدول ۲ و ۳). میزان بیان ژن های فوق در 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 سطح بیان برای ژنهای *Cupi4* و لیپوکسی ژناز مربوط به زمان ۲۴ ساعت بعد از آلودگی با قارچ تعیین گردید.

www.SID.ir

همچنین داده‌ها نشان می دهد که در هر دوژن 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 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.

جدول ۲- تغییرات بیان ژن ***Cupi4*** در فواصل زمانی قبل از آلودگی (زمان صفر)، ۲٤ ساعت، ٤۸ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از اسپری کردن و غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک (صفر، ۲۰۰ و٤۰۰ پی پی ام) در گیاه خیار در برابر ***Pythium. aphanidermatum*** .

میزان بیان ژن ***Cupi4***			
غلظت اسید سالیسیلیک (پی پی ام)			
٤۰۰	۲۰۰	صفر	زمان (ساعت)
٤/۱۳۳ **c**	۲/۸۷۰ **d**	۱/۰۳۷ **e**	۰
۱۲/٦۷**a**	٦ **b**	۱/۰٤۸ **e**	۲٤
٦**b**	٤/٥**c**	۱/۰۳۱ **e**	٤۸
۱/۰٤۸**e**	۱/۰۲٥ **e**	۱/۰٤۰ **e**	۷۲

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

جدول ۳- تغییرات بیان ژن ***Lipoxygenase*** در فواصل زمانی قبل از آلودگی (زمان صفر)، ۲٤ ساعت، ٤۸ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از اسپری کردن و غلظت-های مختلف اسید سالیسیلیک (صفر، ۲۰۰ و٤۰۰ پی پی ام) در گیاه خیار در برابر ***Pythium aphanidermatum*** .

میزان بیان ژن ***Lipoxygenase***			
غلظت اسید سالیسیلیک (پی پی ام)			
٤۰۰	۲۰۰	صفر	زمان (ساعت)
٥ **d**	۲۰ ۲/۳ **e**	۱/۰۲۳ **f**	صفر
۱۲ **b**	٥**d**	۱/۰۲۲ **f**	۲٤
۳۰**a**	۸/٥**C**	۱/۰۲۷ **f**	٤۸
f ۰/٥	۱/۰۳۱**f**	۱/۰٤٤ **f**	۷۲

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

میزان بیان ژن *cupi4* در غلظت ٤۰۰ پی پی ام، ٤۸ ساعت بعد از تلقیح افزایش یافت و دوباره این مقدار در ۷۲ ساعت بعد از تلقیح کاهش چشم گیری نشان داد (جدول۲). میزان بیان ژن لیپوکسی ژناز نیز در غلظت ٤۰۰ پی پی ام، ۲٤ ساعت بعد از تلقیح بیشترین میزان بیان را در گیاه تیمار شده دارا بود که این مقدار با 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 ٤۰۰ 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.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

واکنش‌های دفاعی گیاهان توسط شبکه ی پیچیده ای از مولکول های سیگنالی و فاکتورهای تنظیم کننده نسخه برداری ژن‌ها تنظیم می شوند. سه مولکول به نام های سالسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن سبب بیان واکنش های دفاعی خاص و اساسی می شوند. سالیسیلیک اسید (SA) به عنوان یکی از مولکول های علامت رسان تنش در گیاهان شناخته شده و نقش مهمی در پاسخ های گیاه به عوامل بیمارگر و دیگر عوامل تنش زا ایفا می کند. این مولکول دارای ماهیت فنلی است که در فیزیولوژی گیاه به ویژه تحریک واکنش های دفاعی گیاه علیه عوامل بیماری زای قارچی نقش داشته (پریتیویراج و همکاران ۲۰۰۵) و کاربرد خارجی آن سبب بیان مقاومت و افزایش ظرفیت دفاعی بافت ها به صورت بروز مقاومت سیستمیک اکتسابی می شود. تحقیقات نشان می دهند که سالسیلیک اسید اثر ضد قارچی ندارد بلکه باعث فعال شدن مسیر SAR و القای پروتئین های مرتبط با بیماری زایی می شود که مستقیما رشد قارچ را تحت تاثیر قرار می دهند (دورانت و دانگ ۲۰۰٤). در ارتباط با عوامل آنتاگونیستی قارچی، کاربرد این عوامل نظیر گونه های میکوریزی، تریکودرما و گونه های غیر بیمارگر فوزاریوم قبل از آلوده سازی گیاه با یک بیمارگر گیاهی، کنترل بهتری از بیماری را نشان داده است (داتنوف و همکاران ۱۹۹۵) که این می تواند به دلیل پوشش سطح ریشه و اشغال آن توسط عامل آنتاگونیست قبل از نفوذ عامل بیمارگر باشد. بسیاری از باکتری های تقویت کننده ی رشد بدون تولید آنتی بوتیک، باعث ایجاد مقاومت اکتسابی در گیاهان میزبانشان می‌شوند (زندر و همکاران ۲۰۰۱). کاربرد باکتری‌های آنتاگونیست نظیر گونه های 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 ۱۹۷٤). باکتری های تولید کننده فلورسانس در گیاهان از طریق تولید مواد ضد قارچی، القاء مقاومت و تداخل با فاکتورهای بیماری زای قارچی باعث ایجاد مقاومت قبل از تماس بیمارگر با ریشه ی گیاهان تیمار شده می شود (هاس و دفاگو ۲۰۰۵). مشاهدات ما در این تحقیق نیز نشان داد که کاربرد اسید سالیسیلیک قبل از اعمال عامل بیمارگر باعث بهبود شرایط رشدی و افزایش رشد ریشه می شود (شکل ۲). با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه-ی حاضر که نشان دهنده‌ی افزایش میزان تولید آنزیم های آنتی اکسیدانتی است، می‌توان چنین نتیجه گرفت که پیش تیمار گیاه خیار با سالیسیلیک اسید سبب کنترل موثر مرگ پیتیومی گیاه می شود (شکل ۱). مطالعات نشان داده است که استفاده از این ماده در مقادیر غیر سمی برای گیاهان حساس (توتون) توانسته است مقاومت به عوامل بیماری زای قارچی نکروتروفیک را در گیاه افزایش دهد (مورفی ۲۰۰۰) که این نظریه با داده های این آزمایش که سبب کاهش نکروز بافتی در گیاهان تیمار شده با دوز ٤۰۰ پی پی ام بوده است، مطابقت داشت. حفاظت از گیاه، حاصل تحریک پاسخ های مختلف دفاعی است. سیستم یکپارچه دفاعی با تحریک همزمان چندین آنزیم دفاعی توسط تحریک کننده به کار رفته، آغاز می شود.در ارتباط با کاهش یا افزایش این ترکیبات در میزبان‌های بیمار توسط عوامل بیماری زای عفونی، نتایج متفاوتی از تحقیقات مختلف به دست آمده است که این می تواند ناشی از طبیعت و نحوه‌ی تحریک متفاوت سیستم های دفاعی میزبان بوسیله‌ی عوامل القاء کننده مقاومت باشد

Archive of SID

www.SID.ir

(آگراوال و همکاران ۲۰۰۲). فعالیت پراکسیداز با مقاومت در برابر بیماری در گیاهان مرتبط بوده (هامرشمیت و کوک ۱۹۸۲) و به دنبال مایه کوبی بیمارگر در گیاهان میزبان افزایش می یابد (اسکوت کریج 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 نتیجه‌ی فعالیت آنزیم PAL دو مسیر بیوسنتزی فعال می شود که یکی از این مسیرها مربوط به سنتز سالسیلیک اسید است. این هورمون در مراحل آغازین مسیر فنیل پروپانوئید 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 ٤۰۰ پی پی ام افزایش فعالیت آنزیم بعد از کاربرد القا کننده و مایه زنی عامل بیماری وجود دارد (شکل ٦). نتایج حاصل از آزمایش بررسی کمی دو ژن دخیل در مقاومت گیاهان به عوامل بیمارگر نشان داد که میزان بیان نسبی ژن‌های *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 برخی از ژن های مربوط به پروتئین های بیماری زا (PR) در گیاه خیار باعث افزایش مقاومت به آلودگی در برابرقارچ‌های*Alternaria cucumerinum*، *Didymella applanata*، *Fusarium oxysporum* و *Botrytis cinerea* شده است (فانتومارت ۲۰۰٦). نتایج آماری حاصل از بررسی اثر غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک برروی 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 مواجه 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 هریک 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 پاسخ‌های 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 پاسخ‌های 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

Archive of SID

www.SID.ir

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.

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.

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. Annalytical 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, Nemec 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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. 4th 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. Nnewly occurred on cucumber in Japan. Journal of General Plant Pathology 75: 92–100.

Archive of SID

www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir

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

S K Sabbagh[1]*, E Sabbagh[2], J Abkhoo[3] and F Zinati Fakhrabad[4]

[1]Associate Professor, Department of Biology, Campus of Science, Yazd University.
[2]Assistant Professor, Department of Agronomy, Islamic Azad University, Zahedan Branch.
[3]Instructor, Institute of Plant Biotechnology, University of Zabol.
[4]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.

Archive of SID

www.SID.ir