

مطالعه تأثیر القاگرهای اسید سالیسیلیک و اسید آزلایک بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی و مولکولی در پاسخ به بیماری سفیدک داخلی در *Cucumis sativus* L.

هانیه عابدین‌پور^۱، نادعلی بابائیان جلودار^{۳*}، علی دهستانی^۲، قربانعلی نعمت‌زاده^۳ و

۱. گروه ژنتیک و به‌نژادی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۲. پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۳. استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۴. استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶)

Effect of exogenous Salicylic Acid and Azelaic Acid on some biochemical and molecular responses to downy mildew disease in *Cucumis sativus* L.

Hanieh Abedinpour^{1,2}, Nadali Babaiean Jeloudar^{3*}, Ali Dehestani², Ghorbanali Nematzadeh^{1,2}

1. Plant breeding and Biotechnology department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran

2. Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

3. Professor, Sari Agriculture Science and Natural Resource University (SANRU), Sari, Iran

4. Assistant Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

(Received: 12 Dec. 2020 - Accepted: 17 Mar. 2021)

Abstract

Downy mildew is one of the most important diseases of cucumber plants reducing production in the world. Despite the availability of some fungicides to control the disease, demands for new and reliable natural products has been increased. In this study, the effects of salicylic acid (SA) and Azelaic acid (AZA) on some biochemical properties and expression of defense genes in cucumber plants were studied. Gene expression analysis indicated that expression of both β -1,3-glucanase and chitinase genes were increased after inoculation with *Pseudoperonospora cubensis*, but this increase was much higher for chitinase gene in SA-treated plants and for β -1,3-glucanase in AZA-treated plants. Also, chlorophyll a, b and total flavonoids contents in AZA and SA-treated plants were higher compared to control 6 hours after inoculation with pathogen. Total phenolic content was also increased in SA and AZA treated plants compared to the control 6 and 72 hours after treatment, respectively. These findings indicate that pretreatment of cucumber plants with SA and AZA prompts faster defense responses and increases the efficiency of the defense system against downy mildew.

Keywords: Azelaic acid, Cucumber, Downy mildew, resistance inducer, Salicylic acid.

چکیده

سفیدک داخلی (*Pseudoperonospora cubensis* (*P. cubensis*)) یکی از مهمترین بیماری‌های گیاه خیار است که موجب کاهش تولید آن در جهان می‌شود. با وجود در دسترس بودن بعضی از قارچ‌کش‌ها برای کاهش خسارت این بیماری، تمایل به استفاده از محصولات طبیعی جدید و قابل اطمینان افزایش یافته است. در این پژوهش اثر دو ماده اسید سالیسیلیک (SA) و اسید آزلایک (AZA) با غلظت یک میلی‌مولار بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی و بیان برخی ژن‌های دفاعی در گیاه خیار به‌صورت آزمایش اسپلیت - فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی بیان ژن نشان داد با وجود این‌که بعد از مایه‌زنی گیاهان با قارچ، بیان هر دو ژن کیتیناز بتا-۱ و ۳- گلوکاناز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، مقدار بیان ژن کیتیناز در گیاهان تیمار شده با SA و سطح بیان ژن بتا-۱ و ۳- گلوکاناز در گیاهان تیمار شده با AZA بیشتر بود. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که مقدار کلروفیل a, b و فلاونوئید در گیاهان تیمار شده با SA و AZA در ۶ ساعت بعد از مایه‌زنی با قارچ در مقایسه با شاهد بیشتر بود. مقدار فنل کل هم در گیاهان تیمار شده با SA و AZA نسبت به شاهد بیمار به‌ترتیب در ساعات ۶ و ۷۲ بعد از تیمار افزایش یافته بود. این نتایج نشان می‌دهد که پیش تیمار گیاهان خیار با القاگرهای SA و AZA موجب پاسخ‌های سریع‌تر و افزایش کارایی سیستم دفاعی در برابر بیماری سفیدک داخلی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بیماری سفیدک داخلی، اسید سالیسیلیک، اسید آزلایک، خیار، القاگر.

مقدمه

خیار (*Cucumis sativus* L.,; $2n=2x=14$) (Huang et al., 2009; Liu et al., 2017) یک محصول پراهمیت اقتصادی در کشور بوده و ایران رتبه سوم تولید آن را در جهان دارا می‌باشد (Fao, 2019). در تولید و کشت خیار، تنش‌های زیستی و غیر زیستی بر عملکرد و کیفیت آن تأثیر گذاشته و منجر به زیان‌های اقتصادی می‌شوند. به‌عنوان مثال، سفیدک داخلی که توسط *Pseudoperonospora cubensis* ایجاد می‌شود، یک بیماری مهم در سراسر جهان است و باعث خسارات اقتصادی قابل‌توجهی به محصول خیار به ویژه در شرایط گلخانه‌ای می‌شود (Sujoy et al., 2017). این قارچ انگل اجباری بوده و تنها روی گیاه زنده فعالیت می‌کند. اولین علائم در سطح برگ به‌صورت نواحی سبز روشن یا زرد و زاویه‌ای شکل ظاهر شده که توسط رگبرگ‌ها محدود می‌شوند. با پیشرفت بیماری، لکه‌های بیماری به‌صورت زرد رنگ شده و باعث کاهش فتوسنتز و در نهایت منجر به خشک شدن و مرگ برگ آلوده می‌شوند (Olczak-Woltman et al., 2011).

ترکیبات شیمیایی متعددی برای کنترل بیماری سفیدک داخلی در خیار در دسترس می‌باشد، اما با توجه به اثرات ثانویه نامطلوب آنها و این که خیار دوره زمانی برداشت نسبتاً طولانی و مداوم دارد، تمایل به یافتن و استفاده از محصولات طبیعی جدید قابل اطمینان و کم‌خطرتر برای سلامتی انسان و محیط زیست افزایش یافته است (Haggag, 2002; Farouk et al., 2008). بنابراین، یافتن برخی استراتژی‌های جایگزین حفاظت از گیاه، نه تنها از توسعه مقاومت توسط عوامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کند، بلکه برای ترویج کشاورزی سبز نیز مهم می‌باشد (Butt et al., 2019). القای سیستم ایمنی گیاه قبل از حمله پاتوژن یک روش کنترل بیماری سازگار با محیط زیست می‌باشد که در سال‌های اخیر

توجه زیادی را به خود جلب نموده است. فعال‌سازی سیستم ایمنی توسط القاگرهای زیستی و شیمیایی می‌تواند یک روش جایگزین برای بهبود تحمل گیاه به تنش‌های زیستی باشد (Lim et al., 2013). استفاده از مولکول‌های القاگر در کشاورزی دارای مزایای زیادی مانند ایجاد مقاومت در برابر چندین عامل مهاجم بصورت هم‌زمان (میکروب‌ها، حشرات، نماتدها، تنش‌های محیطی)، اثرات طولانی‌مدت، هزینه نسبتاً پایین، ضرر کمتر برای سلامتی انسان و سازگاری اکولوژیکی قابل‌قبول با شرایط کشت ارگانیک می‌باشد (Anderson et al., 2006; Walters et al., 2013).

متأسفانه استفاده از مولکول‌های القاگر در کشاورزی به‌علت عدم وجود دانش پایه‌ای درباره نحوه پاسخ‌دهی به تنش‌های مختلف، غلظت بهینه، تعداد دفعات استفاده و اثربخشی در شرایط محیطی مختلف، محدود می‌باشد (Walters et al., 2013). به‌منظور درک اثرات مولکول‌های القاگر و افزایش کارایی آن‌ها، شناخت دقیق از نحوه تعامل گیاه با بیمارگر بسیار مهم می‌باشد. استفاده از مولکول‌های القاگر منجر به ایمنی گسترده و طولانی‌مدت گیاهان شده و در نهایت منجر به کاهش کاربرد سموم شیمیایی می‌شود (Kuć, 2001). این القاگرهای مقاومت، مکانیسم طبیعی دفاع گیاه میزبان را تحریک کرده که منجر به مقاومت سیستماتیک اکتسابی (Systemic Acquired resistance) یا SAR می‌شود. مکانیسم SAR در گیاهان اغلب با انواع پاسخ‌های دفاعی سلول از جمله تقویت دیواره سلولی، تولید ترکیبات فنلی مانند فیتوالکسین‌ها، القای فعالیت برخی آنزیم‌ها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis-related protein) همراه است (Castro et al., 2005). پروتئین‌های PR از عناصر اصلی SAR هستند که پاسخ ایمنی القایی برای جلوگیری از آلودگی بیشتر در نواحی آلوده نشده گیاه میزبان ایجاد می‌کنند (Ali et al., 2018).

ترکیب طبیعی القاکننده سیستم دفاع گیاهی و با استفاده از مکانیسم پرایمینگ عمل می‌کند (Shah *et al.*, 2013). اسید آزلائیک از اولئیک اسید یا مشتقات غیر اشباع لینولئیک اسید یا لینولنیک اسید مشتق می‌شود اما مسیر بیوسنتز آن تا حد زیادی ناشناخته است (Yu *et al.*, 2013). Jung و همکاران (۲۰۰۹) پیشنهاد کرده‌اند که AZA در آراییدوبسیس، موجب تحریک بیوسنتز اسید سالیسیلیک شده و در القا SAR نقش دارد که منجر به ایجاد پاسخ سریع‌تر و قوی‌تر به مایه‌زنی بیمارگر می‌شود. همچنین Shah و همکاران (۲۰۱۳) نشان داده‌اند که تجمع SA و بیان ژن PR1 بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر در گیاهان تیمارشده یا AZA سریع‌تر اتفاق افتاد که این نشان‌دهنده آن است که AZA حالت پرایمینگ (آماده باش) را در گیاه ایجاد می‌کند. Djami-Tchatchou و همکاران (۲۰۱۷) اثر AZA در بیان ژن‌های دخیل در پیام‌رسانی، پرایمینگ و پاسخگو به دفاع را گزارش کردند.

با توجه به این‌که خیار یکی از تولیدات مهم در کشت‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای کشور است و برای مصرف خام و تازه‌خوری استفاده می‌شود، لذا استفاده از سموم شیمیایی جهت مبارزه با بیماری‌های آن خطرناک می‌باشد، زیرا ممکن است منجر به سطح غیرقابل قبولی از باقی‌مانده‌های سموم در این میوه‌ها شود. بنابراین، استفاده القاگرهای زیستی و شیمیایی می‌تواند یک روش جایگزین برای بهبود تحمل گیاه به بیماری و کاهش خسارت‌های ناشی از آنها باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر اسید سالیسیلیک و اسید آزلائیک در القای پاسخ‌های دفاعی گیاه خیار در برابر *Pseudoperonospora cubensis* بود که طی آن جنبه‌های مختلف پاسخ‌های فیزیوبیوشیمیایی و بیان ژن‌های کیتیناز و بتا-۱ و ۳-گلوکاناز در گیاه خیار تحت تنش بیماری سفیدک داخلی مورد مطالعه قرار گرفتند.

اسید سالیسیلیک (Salicylic acid) یک ترکیب فنلی است که توسط گیاهان تولید می‌شود و مسیرهای بیوسنتز و پیام‌رسانی آن به خوبی شناخته شده که نشان‌دهنده نقش مهم آن به‌عنوان یک سیگنال درگیر در دفاع گیاهان در برابر بیمارگر می‌باشد (Mauch-mani, 1998; Coqueiro *et al.*, 2015). بیوسنتز SA بیان ژن‌های دفاعی که مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) را ایجاد می‌کنند، افزایش می‌دهد. در طول آلودگی، SA در مکان نفوذ بیمارگر تجمع پیدا می‌کند که در پاسخ‌های فوق حساسیت نقش دارد و همچنین عنوان یک سیگنال متحرک به شکل متیل‌سالسیلات به نقاط دیگر در گیاه انتقال می‌یابد تا طیف وسیعی از پاسخ‌های گیاهی را القا کند (Zhao *et al.*, 2005). مطالعات روی گیاهان مختلف نشان داده است که تیمار SA می‌تواند مقاومت سیستماتیک را القا کرده و موجب تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی شود (Coqueiro *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای Liu و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که تیمار اسید سالیسیلیک در گیاه توتون بعد از آلودگی با باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (DC3000 (Pst DC3000 موجب بیان برخی از پروتئین‌های مرتبط به بیماری‌زایی (PR) شده است. همچنین در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که پیش تیمار گیاهان توتون با اسید سالیسیلیک منجر به بیان بالای ژن‌های PR و مقاومت به بیماری *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Farajollahi *et al.*, 2018). Sabagh و همکاران (۲۰۱۶) اثر پیش تیمار اسید سالیسیلیک را در گیاه خیار در پاسخ به بیماری *Pythium aphanidermatum* بررسی کردند و بیان داشتند که کاربرد اسید سالیسیلیک می‌تواند نقش مهمی در برابر بیماری مرگ گیاهچه داشته باشد. اسید آزلائیک (Azelaic acid) یک دی‌کربوکسیلیک نه کربنه است که به‌عنوان یک

مواد و روش‌ها

کشت خیار

در این پژوهش از بذور خیار رقم هیبرید ویکتور، حساس به بیماری سفیدک دروغی (Gerami *et al.*, 2019) استفاده گردید. بذور به مدت یک شب در پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده و سپس به خاک استریل (مخلوط کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس به نسبت ۱:۱:۱) منتقل شدند. ابتدا روی گلدان‌ها به منظور تسریع در جوانه‌زنی با پلاستیک پوشانده و گیاهچه‌ها در گلخانه با دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد نگهداری شدند.

آماده سازی سوسپانسیون قارچ

برگ‌های آلوده به بیماری سفیدک داخلی خیار از یک گلخانه در شهرستان امل جمع‌آوری شدند. ابتدا برگ‌ها با آب مقطر شستشو شدند. با استفاده از قلم موی استریل شده تک‌کلون‌هایی از روی هر کدام از نمونه‌های برگ جمع‌آوری شده از گلخانه برداشته شد و به سطح برگ گیاهچه‌های خیار منتقل گردید. برای تسهیل چسبیدن اسپورهای قارچ به سطح برگ‌ها قبل از مایه‌زنی، سطح برگ‌ها خیس شد. پس از ظهور علائم قارچ، نمونه‌های برگ آلوده جدید جهت تهیه سوسپانسیون مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه سوسپانسیون قارچ، لکه‌های بیماری روی برگ‌ها برش داده شدند و در یک بشر حاوی آب مقطر به مدت یک ساعت روی شیکر تکان داده شدند تا اسپورها کامل از برگ جدا شوند. سوسپانسیون حاصل از صافی رد شدند تا تکه‌های برگ حذف شود و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانترفیوژ شدند. رسوب قارچ با آب تا غلظت نهایی 1×10^5 رقیق شدند و با هموسایتومتر شمارش شدند (Ramezani *et al.*, 2018).

اعمال تیمارها و نمونه‌برداری

از دو القاگر اسید سالیسیلیک و اسید آزلائیک برای تیمار گیاهان خیار رشدیافته در شرایط کنترل شده استفاده شد. اعمال تیمار در مرحله چهارم برگگی (۴ هفته بعد از کاشت) انجام شد که شامل شش گروه مختلف تیماری گیاهان شاهد (Ctr)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (SA)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید آزلائیک (AZA)، گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با سوسپانسیون قارچ (P)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و سوسپانسیون قارچ (P+SA) و گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید آزلائیک و سوسپانسیون قارچ (P+AZA) بود. تیمار القاگرها به صورت محلول‌پاشی روی برگ گیاهچه‌ها انجام شد. ۴۸ ساعت بعد از محلول‌پاشی با القاگرها، سوسپانسیون قارچ به صورت لکه‌گذاری مایه‌زنی شده و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. به منظور حفظ رطوبت و جلوگیری از بسته شدن روزنه روی گیاهچه‌ها با نایلون پلاستیکی پوشانده شد. به منظور تسریع در فرایند بیماری‌زایی، گیاهچه‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب نگهداری شدند. در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی قارچ از برگ‌های اول و دوم گیاهچه‌های خیار نمونه‌برداری شد و بلافاصله در ازت مایع منجمد شدند. نمونه‌های فریز شده تا زمان بررسی‌های بیوشیمیایی یا استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش کلروفیل a و b

برای سنجش محتوای کلروفیل a و b، یک دهم گرم برگ پودر شده در متانول خالص حل شد. نمونه‌ها به مدت ده دقیقه روی شیکر قرار گرفته و سپس در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ده دقیقه سانترفیوژ شدند. سپس فاز رویی در طول موج‌های ۶۶۶، ۶۵۳ و ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. از و متانول به عنوان نمونه خالی استفاده شد.

مطابق دستور عمل کیت انجام شد. بدین منظور یک میکروگرم RNA با یک میکرولیتر آغازگر dT مخلوط شده و با آب استریل به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط واکنش در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس بر روی یخ قرار گرفت تا به آرامی خنک گردد. مخلوطی شامل ۴ میکرولیتر بافر 5x یک میکرولیتر Ribonuclease Inhibitor (20 U/ μ L)، دو میکرولیتر مخلوط dNTP (10mM) و یک میکرولیتر آنزیم Reverse Transcriptase به هر تیوب اضافه گردید و در دستگاه ترموسایکلر بمدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. cDNA ساخته شده تا زمان استفاده در فریزر دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

واکنش qPCR

به منظور انجام واکنش qPCR، از آغازگرهای ژن GPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد (Liang *et al.*, 2018). توالی آغازگرها در جدول شماره یک آورده شده است. برای بررسی ژن‌های مورد نظر، مخلوط واکنش در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر PCR Master Mix SYBER Green (Amplicon, Denmark)، ۰/۲۵ میکرولیتر آغازگر رفت، ۰/۲۵ میکرولیتر آغازگر برگشت، ۲ میکرولیتر از cDNA به عنوان رشته الگو و ۳/۷۵ میکرولیتر آب مقطر آماده شد.

برنامه واکنش شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه بود. واکنش PCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystems StepOne™ انجام گرفت. برای هر نمونه سه تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد.

مقدار کلروفیل a و b با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (Lichtenthaler *et al.*, 1983).

$$\text{Chlorophyll a} = 12.7(A663) - 2.69(A645)$$

$$\text{Chlorophyll b} = 22.9(A645) - 4.68(A663)$$

سنجش محتوای فنل کل

استخراج ترکیبات فنلی از برگ‌های گیاهان شاهد و تیمار شده طبق روش Xu و همکاران (۲۰۰۷) انجام و مقدار آن با معرف Folin-Ciocalteu و با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید سنجش شد (Singleton *et al.*, 1999). محتوای فنلی در طول موج ۷۵۰ نانومتر قرائت و مقدار آن با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه و به صورت میکروگرم در گرم وزن نمونه بیان شد.

سنجش محتوای فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل، از معرف کلرید آلومینیوم استفاده گردید (Marinova *et al.*, 2005). در این روش یک میلی‌لیتر عصاره متانولی و یک میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم با هم مخلوط شدند. بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت یک ساعت، جذب آن‌ها در ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. با استفاده از کوئرتستین منحنی استاندارد رسم شد و محتوای فلاونوئید کل بر حسب میکروگرم در گرم وزن نمونه بیان شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

به منظور بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه، استخراج RNA از یک دهم گرم از برگ‌های پودر شده با استفاده از کیت تریزول RNX Plus (شرکت سیناژن) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. کیفیت RNAهای استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت Thermo Fisher

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه و اندازه قطعه تکثیرشده

اندازه محصول	دمای ذوب	توالی رفت و برگشت آغازگر	شماره دسترسی	نام آغازگر
bp۱۳۳	۶۱/۴۶ ۵۸/۶۳	5-GCCTTGGTCCTCCCTTCTCTT 5-ATGCAGCATTACCTCTTCAG	NM_001305758	GAPDH
bp۱۵۳	۶۰/۲۵ ۵۸/۳۹	5-AGTTTCCACTGCGTTCCACACT 5-TAAGGGTACAAGTTGAGGAGCA	XM_011661051	β -1,3- glucanase
bp۱۴۱	۵۹/۸۲ ۵۹/۳۵	5-GCGGTTTTGGATGGCGTTGAT 5-GTCTAGCTGAGCGTCTGGTA	M24365.1	chitinase class III or PR-8

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این پژوهش به صورت آزمایش اسپلیت- فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 16) تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 رسم شدند. داده‌های بیان ژن، بیان ژن‌ها نسبت به شاهد در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید (Livak et al., 2001).

مکانیسم‌های دفاعی در برابر بیمارگر را فراهم می‌کند (Butt et al., 2019). در گیاهان مختلف، مقاومت می‌تواند با القاگرهایی مانند SA (Amin et al., 2007) و AZA (Jung et al., 2009) علیه طیف گسترده‌ای از بیمارگرها القا شود. در این پژوهش اثر دو القاگر اسید سالیسیلیک و اسید آزالائیک بر میزان تغییرات کلروفیل a و b، محتوای فنل کل، محتوای فلاونوئید کل و تغییرات بیانی ژن‌های کیتیناز اسیدی (PR8) و بتا-۱ و ۳- گلوکاناز (PR2) در گیاه خیار در پاسخ به بیماری سفیدک داخلی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج بیان ژن‌های کیتیناز و بتا-۱ و ۳- گلوکاناز

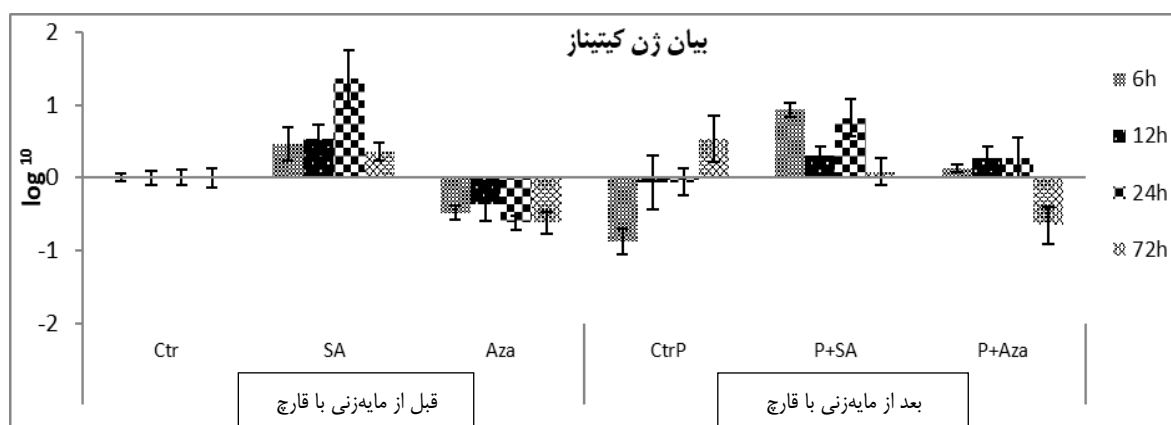
کیتیناز و بتا ۱- و ۳- گلوکاناز با هیدرولیز کردن اجزای دیواره سلولی هیف قارچ‌های مهاجم، موجب افزایش مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی می‌شوند. دیواره سلولی قارچ‌ها عمدتاً از گلوکان‌ها و کیتین‌ها تشکیل شده است که می‌تواند توسط آنزیم‌های بتا ۱- و ۳- گلوکاناز و کیتیناز تولید شده توسط دیواره سلولی گیاه هیدرولیز شوند (Collinge et al., 1993). در تیمار گیاهان خیار با اسید سالیسیلیک بیان ژن کیتیناز افزایش معنی‌داری پیدا کرد و در ۲۴ ساعت بعد از تیمار نسبت به شاهد (۲۲/۹۲ برابر) بیشترین مقدار را داشت. ولی در گیاهان خیار تیمار شده با اسید آزالائیک بیان ژن کیتیناز کاهش پیدا کرد و روند کاهشی داشت (شکل ۱). در تیمار گیاهان خیار با قارچ سفیدک داخلی بیان ژن کیتیناز در ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی با قارچ افزایش بیان (۳/۳۷ برابر) نشان داد (شکل ۱). Moradi و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی بیان

نتایج و بحث

گیاهان به حمله بیمارگر یا تیمار با القاگر با فعال کردن طیف گسترده‌ای از مکانیسم‌های دفاعی طراحی شده پاسخ می‌دهند تا از تکثیر و گسترش بیمارگر جلوگیری کنند (Małolepsza et al., 2005). این مکانیسم‌های دفاعی شامل تولید سریع گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species)، تغییر در ساختار دیواره سلولی، تجمع متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی شناخته شده مانند فیتوالکسین‌ها، فعال‌سازی و سنتز پروتئین‌ها و پپتیدهای دفاعی می‌باشد (Castro et al., 2005). تیمار گیاهان با القا کننده‌های مقاومت برای تکمیل یا جایگزین اثر قارچ‌کش‌های شیمیایی و کنترل بهتر بیماری به‌طور ویژه‌ای مورد توجه می‌باشد. مقاومت القاشده در بافت‌های گیاهی در واقع نوعی آماده‌سازی قبلی توسط القاگرها می‌باشد که اجازه واکنش سریع‌تر

جلوگیری کرد. همچنین کیتیناز کلاس III از خیار به عنوان یک مارکر برای مکانیسم SAR گزارش شده است چون که بیان این ژن در گیاهان شاهد کم و یا قابل تشخیص نبوده ولی بعد از مایه زنی با TNY و SA بیان آن افزایش یافت (Metraux *et al.*, 1989). همچنین در این مطالعه، نتایج بیان ژن کیتیناز در گیاهان خیار تیمار شده با اسید آزلائیک تفاوت معنی داری نشان داد که بعد از مایه زنی با قارچ تا ۲۴ ساعت روند افزایشی را در مقایسه با شاهد بیمار (۱/۸۷ برابر) دارد (شکل ۱). اما در مقایسه با گیاهان خیار تیمار شده با SA بعد از مایه زنی با قارچ، سطح بیان کمتری داشت. نتایج مشابهی هم در بررسی اثر اسید آزلائیک و هگزانوئیک اسید روی سلول های توتون گزارش شد که سطح بیان ژن های PR در گیاهان تیمار شده با AZA کمتر از گیاهان تیمار شده با هگزانوئیک اسید بود. ولی هردو القاگر منجر به پرایمینگ و بیان ژن های مقاومت شدند (Djami- *Tchatchou et al.*, 2017). بنابراین می توان نتیجه گرفت که تیمار گیاهان خیار با اسید آزلائیک و اسید سالیسیلیک می تواند گیاه را در حالت آماده باش قرار دهد و در بیان ژن کیتیناز نقش داشته باشد.

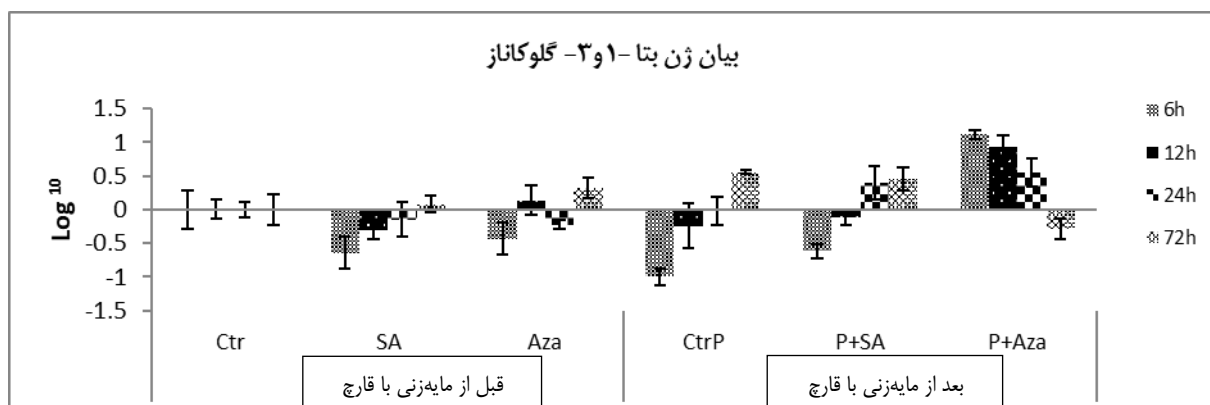
ژن کیتیناز در وارپته های حساس و مقاوم خیار بعد از مایه زنی با قارچ سفیدک پودی (*Sphaerotheca fuliginea*) بیان داشتند که ژن کیتیناز در وارپته حساس دیرتر از وارپته مقاوم افزایش بیان داشت. مایه زنی گیاهان خیار با بیمارگر در تیمار با اسید سالیسیلیک (P+SA) بیان ژن کیتیناز در ۶ و ۲۴ ساعت (۸/۸۵ و ۶/۶۶ برابر) بعد از مایه زنی افزایش داشت که نشان دهنده پاسخ دفاعی گیاه به بیماری در ساعات اولیه می باشد. نتایج محققان دیگر نشان داد که کاربرد SA در گیاهان شاهد می تواند مقاومت به بیماری را افزایش دهد. به این دلیل که SA موجب القا بیان پروتئین های مرتبط به بیماری زایی (PRs) می شود (Murphy *et al.*, 2000). علاوه بر پرایمینگ سلول ها به پاسخ سریع به حمله بیمارگر، همچنین SA سنتز PR پروتئین ها را القا می کند. PR پروتئین ها، گروه متنوعی از پروتئین های القا شونده با ویژگی های متفاوت هستند (Van Loon *et al.*, 1999). نتایج مطالعه Salzman و همکاران (۱۹۹۸) نشان داد که کیتیناز و پروتئین های PR تیپ اسمتین (-osmotin type PR proteins) تولید شده در طول رسیدن انگور از رشد *Botrytis cinerea* در شرایط آزمایشگاه



شکل ۱. تغییرات بیان ژن کیتیناز در گیاهان خیار تیمار شده با القاگرهای مختلف قبل از مایه زنی با قارچ و بعد از مایه زنی با قارچ *P. cubensis*. گیاهان شاهد (Ctr)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی مولار اسید سالیسیلیک (SA)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی مولار اسید آزلائیک (AZA) و گیاهان شاهد مایه زنی شده با سوسپانسیون قارچ (P)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی مولار اسید سالیسیلیک و سوسپانسیون قارچ (P+SA) و گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی مولار اسید آزلائیک و سوسپانسیون قارچ (P+AZA).

سالیسیلیک و مایه‌زنی با بیماری *Fusarium oxysporum f.s. pradis lycopersici* در گیاه گوجه‌فرنگی در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی افزایش یافت (Jendoubi et al., 2015). Ramezani و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای افزایش بیان ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز را در گیاه خیار بعد از تیمار با فسفیت پتاسیم گزارش کردند و بیان داشتند که افزایش بیان ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز ممکن است به‌علت تغییر در فرایندهای دیواره سلولی باشد. بیان ژن گلوکاناز در گیاهان خیار تیمار شده با اسید آزلائیک در ۶ ساعت بعد آلودگی (۱۳/۰۸ برابر) بیشترین افزایش بیان را داشت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که اسید آزلائیک می‌تواند بیان ژن‌های کیتیناز و بتا-۱ و ۳-گلوکاناز را در ساعت اولیه بعد از آلودگی افزایش دهد. این افزایش بیان نسبت به گیاهان خیار تیمار شده با SA (شش ساعت بعد از تیمار با قارچ) سریع‌تر اتفاق افتاد. در مطالعات قبلی نشان داده شد که AZA مکانیسم SAR را با پرایمینگ تجمع SA القا می‌کند و موجب پاسخ سریع‌تری به قارچ بعد از مایه‌زنی می‌شود (Jung et al., 2009).

نتایج بررسی بیان ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان داد به‌طوری که ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز در گیاهان خیار تیمار شده با اسید سالیسیلیک در ۷۲ ساعت بعد از تیمار، افزایش بیان (۱/۲۰ برابر) داشت (شکل ۲). اما در گیاهان خیار تیمار شده با آزلائیک نسبت به شاهد، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار (به‌ترتیب ۱/۳۵ و ۲/۰۸ برابر) افزایش بیان داشت. بیان ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز در گیاهان خیار مایه‌زنی شده با قارچ، ۷۲ ساعت بعد از آلودگی (۳/۵۸ برابر) افزایش پیدا کرد که می‌تواند نشان‌دهنده فعال شدن ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز در پاسخ به بیمارگر در گیاه خیار باشد (شکل ۲). این در حالیست که در گیاهان خیار تیمار شده با اسید سالیسیلیک که با قارچ مایه‌زنی شدند، بیان ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز در ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی، افزایش بیان (۲/۵۳ برابر) نشان داد که این می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که در تیمار همزمان اسید سالیسیلیک و بیمارگر پاسخ دفاعی گیاه زودتر فعال شده است. نتایج مشابهی توسط محققان دیگر گزارش شده است که بیان ژن‌های کیتیناز و بتا-۱ و ۳-گلوکاناز بعد از تیمار با اسید



شکل ۲. تغییرات بیان ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز در گیاهان خیار تیمار شده با الفاگرهای مختلف قبل از مایه‌زنی با قارچ و بعد از مایه‌زنی با قارچ P. *cubensis*. گیاهان شاهد (Ctr)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (SA)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید آزلائیک (AZA) و گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با سوسپانسیون قارچ (P)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و سوسپانسیون قارچ (P+SA) و گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید آزلائیک و سوسپانسیون قارچ (P+AZA).

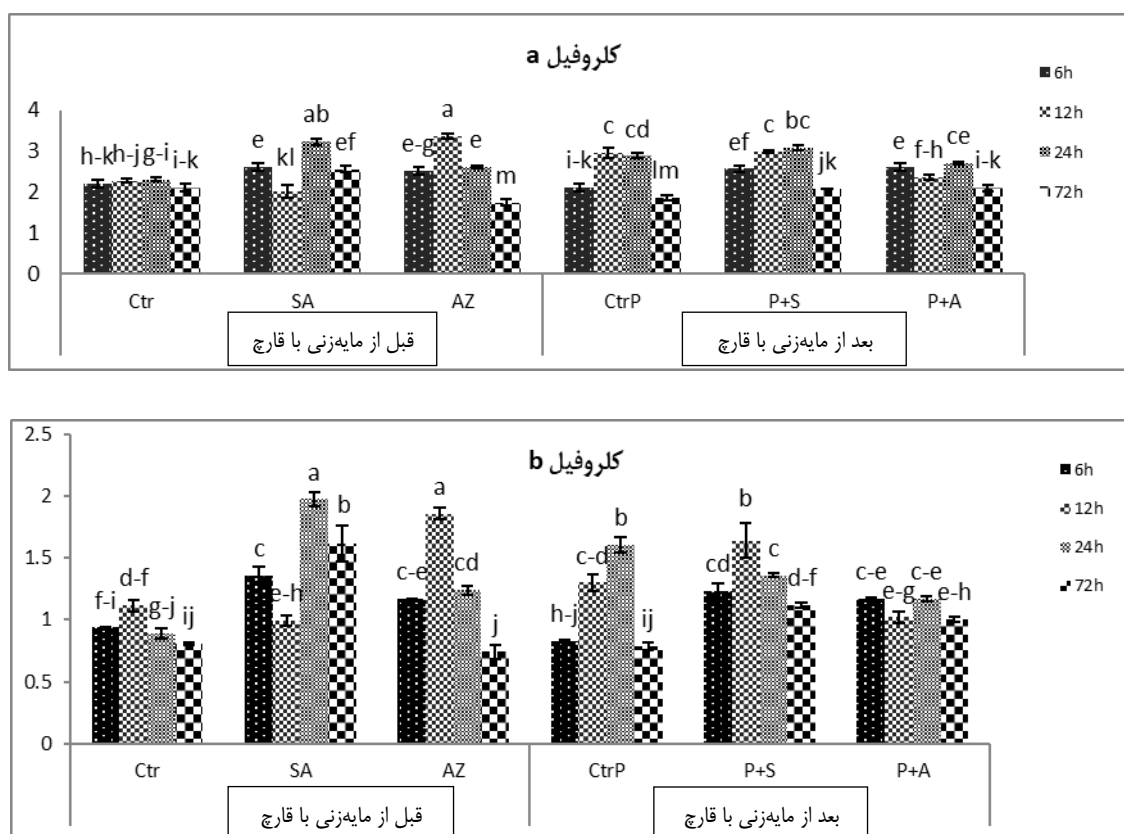
کلروفیل a و b

فتوستنتز یک فرآیند فیزیولوژیکی اولیه برای افزایش طول عمر گیاه از طریق استفاده از انرژی نور و سنتز ترکیبات آلی در گیاهان است (Xu et al., 2014). کارایی فتوستنتز وابسته به محتوای کلروفیل بوده و ROS (reactive oxygen species) ممکن است باعث کاهش قابل توجهی از مقدار کلروفیل‌ها در گیاه به‌علت ماهیت آن شود (Yakhin et al., 2017). این رو، بقاء، رشد و تولید گیاهان عمدتاً به افزایش محتوای کلروفیل بستگی دارد. در این تحقیق داده‌های حاصل از اندازه‌گیری کلروفیل a و b در گیاه خیار تحت تنش *P. cubensis* نشان داد که بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۳). مقدار کلروفیل a در گیاهان خیار تیمار شده با SA در مقایسه با گیاه شاهد افزایش پیدا کرد به طوری که بعد از ۲۴ ساعت به بیشترین مقدار خود رسید. ولی در گیاهان تیمار شده با AZA، بیشترین مقدار در ۱۲ ساعت بعد از تیمار مشاهده شد. بعد از مایه‌زنی گیاه خیار با قارچ مقدار کلروفیل a ابتدا افزایش پیدا کرد و سپس در ۷۲ ساعت به کمترین مقدار خود رسید. در گیاهان خیار تیمار شده با SA، مقدار کلروفیل a در مقایسه با شاهد بیمار در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشت ولی در ساعت ۷۲ مقادیر آن بیشتر از شاهد (۱۱/۹۸ درصد) بود. تیمار گیاه خیار با AZA، ابتدا در ۶ ساعت بعد تیمار مقدار کلروفیل a افزایش داشت و بعد از آن تقریباً ثابت بوده و در ۷۲ ساعت بعد از تیمار کاهش پیدا کرد ولی در مقایسه با شاهد (۱۳/۷۲ درصد) بیمار این مقدار بیشتر بود. روند تغییر کلروفیل b در گیاهان خیار تیمار شده با SA و AZA به ترتیب ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار با بیمارگر به بیشترین مقدار خود رسید. در گیاه خیار مایه‌زنی شده با بیمارگر تا ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی مقدار کلروفیل b افزایش نشان داد و سپس در ۷۲ ساعت به کمترین مقدار رسید. در گیاهان خیار تیمار شده با SA در مقایسه با شاهد تیمار شده با قارچ افزایش

داشت. ابتدا مقدار آن تا ۱۲ ساعت بعد از مایه‌زنی افزایش پیدا کرد و سپس روند کاهشی نشان داد. اما در گیاهان خیار تیمار شده با AZA در زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. ولی نسبت به شاهد بیمار مقدار آن در ۶ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار به ترتیب ۴۱/۵۶ و ۲۷/۹۳ درصد بیشتر از شاهد بود. افزایش کلروفیل ممکن است به دلیل تحریک تشکیل رنگدانه و افزایش کارایی دستگاه فتوستنتز که موجب پتانسیل بهتر برای مقاومت بعد از آلودگی با قارچ باشد (Kumaraswamy et al., 2019). Khan و همکاران (۲۰۱۵) نشان داده‌اند که SA با تنظیم فرایندهای متابولیسمی از جمله تنظیم روزنه، فتوستنتز، متابولیسم کربوهیدرات و انتقال سیگنال و تولید اسملیت‌ها، موجب افزایش مقاومت به تنش خشکی شده است. Farouk و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که محتوای کلروفیل II در گیاه خیار تیمار شده با کیتوزان و اسید سالیسیلیک بعد از آلودگی با قارچ سفیدک داخلی افزایش یافت. همچنین گزارش شده است که القاگرها محتوای پتاسیم در گیاه را افزایش می‌دهند، که باعث افزایش تعداد کلروپلاست در سلول، تعداد سلول در برگ و افزایش سطح برگ می‌شود (Possingham, 1980). علاوه بر این، اثبات شده است که SA تولید اتیلن را کاهش داده و موجب افزایش کلروفیل می‌شود (Leslie et al., 1986) و با فعال شدن سنتز کاروتنوئید، کلروفیل را از اکسیداسیون محافظت کرده و در نهایت محتوای کلروفیل را افزایش می‌دهد (Farouk et al., 2008).

محتوای فنل کل

ترکیبات فنلی گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در مقاومت علیه عوامل بیماری‌زا نقش دارند. در مطالعه حاضر مقدار فنل در گیاهان خیار تیمار شده با SA و AZA در مقایسه با گیاه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۴).



شکل ۳. مقایسه اثر تیمارها بر مقدار کلروفیل a و b در گیاه خیار تیمار شده با القاگرها قبل از مایه‌زنی با قارچ و بعد از مایه‌زنی با قارچ *P. cubensis* بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد. گیاهان شاهد (Ctr)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (SA)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید آزلائیک (AZA) و گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با سوسپانسیون قارچ (P)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و سوسپانسیون قارچ (P+SA) و گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید آزلائیک و سوسپانسیون قارچ (P+AZA).

در پاسخ به سفیدک داخلی گزارش شده است (Farouk *et al.*, 2008). القاکننده‌ها، به‌ویژه SA تجمع ترکیبات فنلی محلول در برگ‌های خیار را افزایش می‌دهند. این اثر ممکن است به‌دلیل تأثیر این مواد بر فعالیت آنزیمی و انتقال متابولیت‌ها در گیاه خیار باشد (Farouk *et al.*, 2008). همچنین، مقدار ترکیبات فنلی در گیاهان خیار تیمار شده با AZA بعد از مایه‌زنی با قارچ روند افزایش داشت و در ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی بیشترین مقدار (۱۸۳/۹۲ میکروگرم در وزن نمونه) را دارا بود. ترکیبات فنلی به ترکیبات ضد میکروبی و ضد قارچی معروفند که به‌طور طبیعی در گیاه وجود دارند (El-Sharkawy *et al.*, 2016).

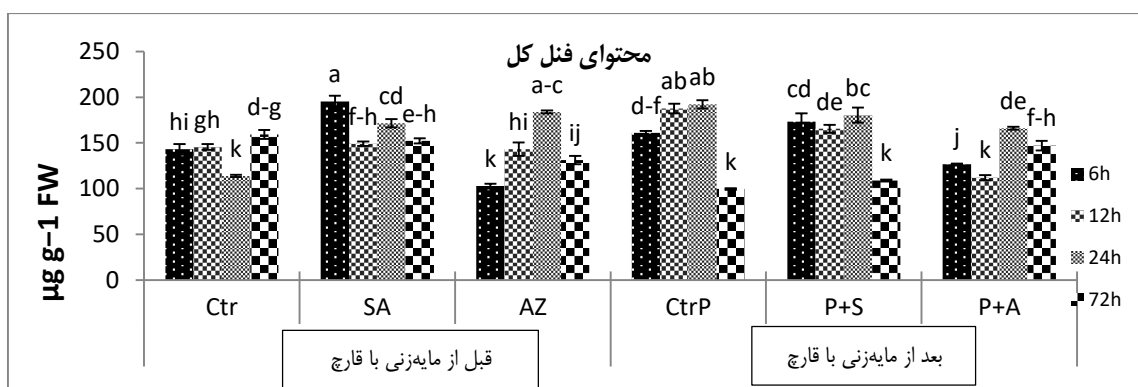
مقدار فنل در گیاهان خیار تیمار شده با اسید سالیسیلیک در ساعات ۶ و ۲۴ به ترتیب ۳۶/۵۸ و ۵۰/۵۸ درصد نسبت به شاهد بیشتر بود. در گیاهان خیار شاهد مایه‌زنی شده با قارچ مقدار فنل به تدریج افزایش پیدا کرد و در ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی به بیشترین مقدار (۱۹۲/۰۷ میکروگرم در وزن نمونه) رسید. مقدار ترکیبات فنلی در گیاهان خیار تیمار شده با SA در ۶ ساعت بعد از مایه‌زنی با قارچ نسبت به شاهد افزایش داشت. Shehata *et al.* (۲۰۰۱) و همکاران گزارش دادند که محتوای فنل در برگ‌های ذرت بعد از تیمار با استیل اسید سالیسیلیک (۲۰ و ۴۰ میکرومولار) افزایش پیدا کرد. همچنین در مطالعه دیگر نیز افزایش مقدار فنل را در گیاهان خیار تیمار شده با SA

به علت خاصیت ضد قارچی آن‌ها می‌باشد. ترکیبات فنلی برای مدت طولانی به عنوان یک ترکیب مرتبط به دفاع در نظر گرفته می‌شود به دلیل این که سطح آن‌ها در وارپته‌های مقاوم به بیماری در بسیاری از گیاهان بالا می‌باشد (Gogoi *et al.*, 2001).

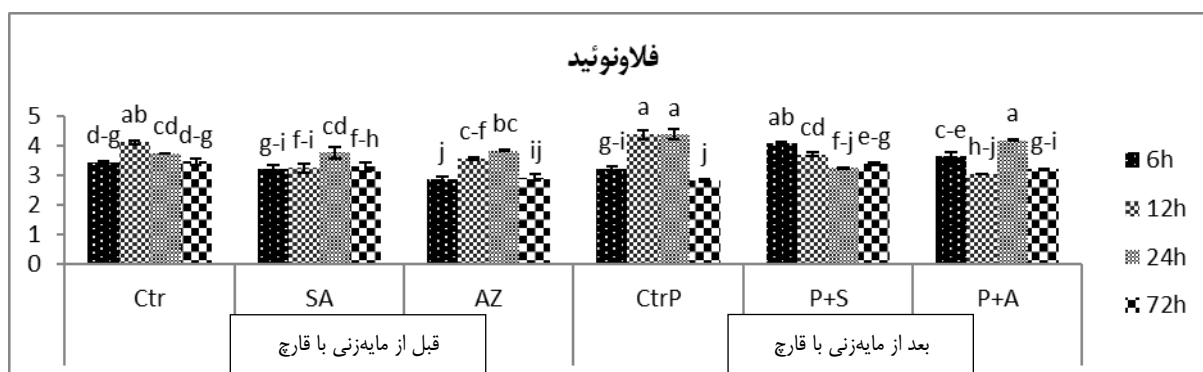
محتوای فلاونوئید کل

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل در شکل ۵ نشان داده شده است.

انجام شده توسط Matern و Kneusel (۱۹۸۸) اولین مرحله از مکانیسم دفاعی گیاه تجمع سریع ترکیبات فنلی در محل آلودگی است که رشد بیمارگر را کند یا محدود می‌کند. تجمع فنل در برگ‌ها ممکن است به دلیل مهار فعالیت کاتالاز باشد که موجب می‌شود بیان ژن فنیل آلانین آمونیاژ و سنتز ترکیبات فنلی القا گردد (Vermerris *et al.*, 2006). به طور طبیعی متابولیسم فنل در گیاهان در پاسخ به بیمارگر فعال می‌شود. این تنها به دلیل نقش آنها در دیواره سلولی نیست، بلکه



شکل ۴. مقایسه اثر تیمارها بر محتوای فنل کل در گیاه خیار تیمار شده با القاگرها قبل از مایه‌زنی با قارچ و بعد از مایه‌زنی با قارچ *P. cubensis* بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد. گیاهان شاهد (Ctr)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (SA)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید آزالائیک (AZA) و گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با سوسپانسیون قارچ (P)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و سوسپانسیون قارچ (P+SA) و گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید آزالائیک و سوسپانسیون قارچ (P+AZA).



شکل ۵. مقایسه اثر تیمارها بر محتوای فلاونوئید کل در گیاه خیار تیمار شده با القاگرها قبل از مایه‌زنی با قارچ و بعد از مایه‌زنی با قارچ *P. cubensis* بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد. گیاهان شاهد (Ctr)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (SA)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید آزالائیک (AZA) و گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با سوسپانسیون قارچ (P)، گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و سوسپانسیون قارچ (P+SA) و گیاهان تیمار شده با محلول یک میلی‌مولار اسید آزالائیک و سوسپانسیون قارچ (P+AZA).

کیتیناز در گیاهان تیمار شده با SA و سطح بیان ژن بتا-۱ و ۳- گلوکاناز در گیاهان تیمار شده با AZA بیشتر بود. نتایج تحقیق نشان می‌دهد که بیان ژن‌های PR پس از استفاده از SA و AZA ممکن است به افزایش مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا در خیار کمک کند. مقدار کلروفیل a و b، محتوای فنل کل و فلاونوئید در گیاهان خیار تیمار شده با SA در مقایسه با گیاهان خیار تیمار شده با AZA تقریباً مشابه بود ولی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پیش تیمار گیاهان خیار با القاگرهای SA و AZA موجب پاسخ سریع و افزایش دفاع در برابر بیماری سفیدک داخلی می‌شود. همچنین، مطالعات بیشتر برای ارزیابی رفتار این ژن‌ها در گیاهان تیمار شده با SA و AZA با عوامل بیماری‌زا و همچنین ارزیابی سایر بافت‌های گیاهی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

این پژوهش در چارچوب طرح مصوب پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان ساری و با اعتبار پژوهشی تخصیص یافته انجام شده است. از کارکنان آزمایشگاه‌های پژوهشکده برای همکاری‌های خالصانه‌شان، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

- Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microb. Res.* 212: 29-37.
- Amin A, Rashad M, El-Abagy H (2007) Physiological effect of indole-3-butyrac acid and salicylic acid on growth, yield and chemical constituents of onion plants. *J. Appl. Sci. Res.* 3(11): 1554-1563.

نتایج نشان می‌دهد که در گیاهان شاهد خیار در زمان‌های مختلف تغییر در میزان فلاونوئید وجود نداشت. در گیاهان خیار تیمار شده با SA و تیمار شده با AZA بیشترین مقدار فلاونوئید در ۲۴ ساعت بعد از تیمار به ترتیب ۳/۷۵ و ۳/۸۳ میکروگرم در وزن نمونه مشاهده شد. بعد از مایه‌زنی گیاهان خیار شاهد با قارچ مقدار فلاونوئید افزایش یافت و در ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی بیشترین مقدار را نشان دادند. همچنین در گیاهان خیار تیمار شده با SA بعد از مایه‌زنی با قارچ بیشترین مقدار در ۶ ساعت (۴/۰۷ میکروگرم در وزن نمونه) بود که این بیانگر القای فلاونوئید می‌باشد. اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید در گیاهان خیار تیمار شده با AZA بعد از تیمار با قارچ مقدار آن در ۶ و ۲۴ ساعت بعد، به ترتیب به ۳/۶۳ و ۴/۱۹ میکروگرم در وزن نمونه افزایش پیدا کرد. مطالعات متابولیکی کشت سلولی توتون نشان داد که تیمار AZA می‌تواند تجمع محصولات اولیه مسیر فنیل پروپانوئید را القا کند (Djami-Tchatchou *et al.*, 2017).

نتیجه‌گیری

در بررسی بیان ژن‌های گلوکاناز و کیتیناز مشاهده شد که بیان هر دو ژن بعد از مایه‌زنی با قارچ در گیاهان تیمار شده افزایش یافت ولی سطح بیان ژن

- Anderson AJ, Blee KA, Yang KY (2006). Commercialization of plant systemic defense activation: Theory, problems and successes. *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*, Springer US: 386-414.
- Butt UR, Naz R, Nosheen A, Yasmin H, Keyani R, Hussain I, Hassan MN (2019) Changes in pathogenesis-related gene expression in response to bioformulations in the apoplast of maize leaves against *Fusarium oxysporum*. *J. Plant Inter.* 14: 61-72.

- Castro M, Fontes W (2005) Plant Defense and Antimicrobial Peptides. *Protein & Peptide Letters*. 12: 11-16.
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinases. *Plant. J.* 3: 31-40.
- Coqueiro DSO, De Souza AA, Takita MA, Rodrigues CM, Kishi LT, Machado MA (2015) Transcriptional profile of sweet orange in response to chitosan and salicylic acid. *BMC Genomics*. 16: 288.
- Djami-Tchatchou AT, Ncube EN, Steenkamp PA, Dubery IA (2017) Similar, but different: Structurally related azelaic acid and hexanoic acid trigger differential metabolomic and transcriptomic responses in tobacco cells. *BMC Plant. Bio.* 17: 227.
- El-Sharkawy EES, Abdalla MY, El-Shemy AO (2016) Effect of some resistance chemical inducers on incidence of cucumber *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum f. Sp. cucumerinum*. *Egyptian J. Bio. Pest Control*. 26: 1-6.
- FAO. (2019). "Production quantities of Cucumbers and gherkins by country." from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- Farajollahi F, Babaezadeh V, Rahimian H (2018) Induction of several Pathogenesis-Related genes in tobacco plants treated by salicylic and jasmonic acid after challenging with *Pseudomonas syringae pv. Tabaci*. *Agri. Biotech. J.* 9(4): 129-150.
- Farouk S, Ghoneem KM, Ali AA (2008) Induction and Expression of Systemic Resistance to Downy Mildew Disease in Cucumber by Elicitors. *Egypt J. Phyto.* 36: 95-111.
- Gerami E, Azimi H, Beigi F (2019) Evaluation of the Efficacy of ametoctradin+dimethomorph (Orvego® SC 525) and mandipropamid+difenoconazole (Carial Star®SC500) Fungicides against Cucumber Downy Mildew Disease, Caused by *Pseudoperonospora cubensis*. *Pest. Plant Protec Sci.* 8(1): 26-37.
- Gogoi R, Singh DV, Srivastava KD (2001) Phenols as a biochemical basis of resistance in wheat against Karnal bunt. *Plant Pathol.* 50: 470-476.
- Haggag WM (2002) Application of epidermal coating antitranspirants for controlling cucumber downy mildew in greenhouse. *Plant Pathol.* 11: 69-78.
- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan W, Lucas WJ, Wang X, Xie B, Ni P, Ren Y, Zhu H, Li J, Lin K, Jin W, Fei Z, Li G, Staub J, Kilian A, Van Der Vossen EaG, Wu Y, Guo J, He J, Jia Z, Ren Y, Tian G, Lu Y, Ruan J, Qian W, Wang M, Huang Q, Li B, Xuan Z, Cao J, Asan, Wu Z, Zhang J, Cai Q, Bai Y, Zhao B, Han Y, Li Y, Li X, Wang S, Shi Q, Liu S, Cho WK, Kim J-Y, Xu Y, Heller-Uszynska K, Miao H, Cheng Z, Zhang S, Wu J, Yang Y, Kang H, Li M, Liang H, Ren X, Shi Z, Wen M, Jian M, Yang H, Zhang G, Yang Z, Chen R, Liu S, Li J, Ma L, Liu H, Zhou Y, Zhao J, Fang X, Li G, Fang L, Li Y, Liu D, Zheng H, Zhang Y, Qin N, Li Z, Yang G, Yang S, Bolund L, Kristiansen K, Zheng H, Li S, Zhang X, Yang H, Wang J, Sun R, Zhang B, Jiang S, Wang J, Du Y, Li S (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat. Genet.* 41: 1275-1281.
- Jendoubi W, Harbaoui K, Hamada W (2015) Salicylic acid-induced resistance against *Fusarium oxysporum f.s.pradicis lycopersici* in hydroponic grown tomato plants. *J. New Sci.* 21: 985-995.
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT (2009) Priming in systemic plant immunity. *Sci.* 324: 89-91.
- Khan MIR, Fatma M, Per TS, Anjum NA, Khan NA (2015) Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and

- underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 6: 462.
- Kuč J (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 7-12.
- Kumaraswamy R, Kumari S, Choudhary RC, Sharma S, Pal A, Raliya R, Biswas P, Saharan V (2019) Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: a sustainable biostimulant for plant. *Int. J. Biol. Macromol.* 123: 59-69.
- Leslie CA, Romani RJ (1986) Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 5(2): 144-146.
- Liang C, Hao J, Meng Y, Luo L, Li J (2018) Identifying optimal reference genes for the normalization of microRNA expression in cucumber under viral stress. *PloS one.* 13(3): e0194436.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans* 11: 591-592.
- Lim S, Borza T, Peters RD, Coffin RH, Al-Mughrabi KI, Pinto DM, Wang-Pruski G (2013) Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*. *J. Proteom.* 93: 207-223.
- Liu D, Xin M, Zhou X, Wang C, Zhang Y, Qin Z (2017) Expression and functional analysis of the transcription factor-encoding Gene CsERF004 in cucumber during *Pseudoperonospora cubensis* and *Corynespora cassiicola* infection. *BMC Plant Biol.* 17: 96.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods.* 25(4): 402-408.
- Małolepsza U, Rózalska S (2005) Nitric oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance: Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in o-hydroxyethylrutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiol Biochem.* 43: 623-635.
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M (2005) Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J. Univ. Chem. Technol. Metallurgy.* 40(3): 255-260.
- Matern U, Kneusel RE (1988). Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica:* 153-170.
- Mauch-Mani B (1998) Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack. *Ann. Bot.* 82: 535-540.
- Metraux JP, Burkhardt W, Moyer M, Dincher S, Middlesteadt W, Williams S, Payne G, Carnes M, Ryals J (1989) Isolation of a complementary DNA encoding a chitinase with structural homology to a bifunctional lysozyme/chitinase. *PNAS.* 86: 896-900.
- Moradi N, Rahimian H, Dehestani A, Babaeizad V (2016) Cucumber Response to *Sphaerotheca fuliginea*: Differences in Antioxidant Enzymes Activity and Pathogenesis-Related Gene Expression in Susceptible and Resistant Genotypes. *J. Plant Mol. Breeding.* 4: 33-40.
- Murphy AM, Holcombe LJ, Carr JP (2000) Characteristics of salicylic acid-induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57: 47-54.
- Olczak-Woltman H, Marcinkowska J, Niemirowicz-Szczytt K (2011) The genetic basis of resistance to downy mildew in *Cucumis* spp.—latest developments and prospects. *J. Appl. Genet.* 52(3): 249-255.
- Possingham JV (1980) Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31(1): 113-129.
- Ramezani M, Ramezani F, Rahmani F,

- Dehestani A (2018) Exogenous potassium phosphite application improved PR-protein expression and associated physio-biochemical events in cucumber challenged by *Pseudoperonospora cubensis*. *Sci. Horti*. 234: 335-343.
- Sabbagh S, Zinati FF (2016) The effect of salicylic acid to induce systemic resistance in cucumber plant to damping-off disease caused by *Pythium aphanidermatum*. *J Applied Res. Plant Protec.* 5(2):27-43.
- Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA (1998) Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 117: 465-472.
- Shah J, Zeier J (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 4: 30.
- Shehata S, Ibrahim S, Zaghlool S (2001) Physiological response of flag leaf and ears of maize plant induced by foliar application of kinetin, KIN and acetyl salicylic acid, ASA. *Annals Agri. Sci, Ain Shams Univ.(Egypt)*.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- Sujoy S, Ashtekar N, Rai A, Sharma B, Balaraman A (2017) Synergistic effect of Benalaxyl 8% and Mancozeb 65% WP in combating downy mildew of cucumber. *J. Mycopathol. Res.* 55(3): 227-230.
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97.
- Vermerris W, Nicholson R (2006) Phenolic compound biochemistry. Springer Science & Business Media. 1-276.
- Walters DR, Ratsep J, Havis ND (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. *J. Exp. Bot.* 64: 1263-1280.
- Xu BJ, Chang SKC (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.* 72(2):159-166.
- Xu W-Z, Deng X-P, Xu B-C, Gao Z-J, Ding W-L (2014) Photosynthetic activity and efficiency of *Bothriochloa ischaemum* and *Lespedeza davurica* in mixtures across growth periods under water stress. *Acta Physiol. Plant.* 36(4): 1033-1044.
- Yakhin OI, Lubyantsev AA, Yakhin IA, Brown PH (2017) Biostimulants in plant science: a global perspective. *Front. plant sci.* 7: 20-49.
- Yu K, Soares JM, Mandal MK, Wang C, Chanda B, Gifford AN, Fowler JS, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P (2013) A Feedback Regulatory Loop between G3P and Lipid Transfer Proteins DIR1 and AZI1 Mediates Azelaic-Acid-Induced Systemic Immunity. *Cell Rep.* 3: 1266-1278.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23: 283-333.