

تأثیر کودهای زیستی در مقاومت خیار گلخانه‌ای به بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *Pythium aphanidermatum* و افزایش اجزای عملکرد

۱. سید کاظم صباغ*؛ ۲. شاهو ولی زاده

۱. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد

۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه زابل، زابل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۱)

چکیده

بیماری مرگ گیاهچه خیار *Pythium aphanidermatum* یکی از بیماری‌های زیانبار خیار است. در این تحقیق، تأثیر سه کود زیستی (بیولوژیک) شامل: نیتروکسین، قارچ‌ریشه (میکوریز) و ورمی کمپوست به صورت تنها و تلفیق، در القای مقاومت و افزایش اجزای عملکرد خیار گلخانه‌ای (ES-2862) آلوده به بیماری مرگ گیاهچه بررسی شد. این آزمایش در شرایط گلخانه و در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. نتایج بررسی شدت بیماری‌زایی نشان داد که تیمار ورمی کمپوست + قارچ‌ریشه + نیتروکسین (۳۷ درصد) و تیمار ورمی کمپوست + نیتروکسین (۷۳ درصد) به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را در کاهش شدت بیماری دارند. تیمار مربوط به مخلوط سه کود بیشترین تأثیر را در افزایش اجزای عملکرد خیار داشت، در حالی که قارچ‌ریشه به تنهایی کمترین تأثیر را در اغلب صفات نشان داد. بررسی میزان تغییرپذیری ژن‌های *Cup4* و *Chitinase* با روش qRT-PCR نشان داد که بیان این دو ژن، تحت تأثیر تیمارها قرار گرفته و برای ژن *Cup4* (۲۳/۶۵) تیمار مخلوط سه کود و برای ژن *Chitinase* (۲/۴۵) تیمار قارچ‌ریشه، بیشترین تأثیر را در الگوی بیان ژن نشان داد. با توجه به نتایج به دست آمده، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که از این کودها می‌توان به عنوان عامل‌های بیوکنترل در برابر عامل‌های بیمارگر قارچی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: القای مقاومت، بونه‌میری خیار، بیان ژن، کودهای زیستی، کیتیناز.

مقدمه

خاکزاد در مزرعه و گلخانه است (Fravel et al. 2005) که همواره چالش‌های پرشماری از جمله آلودگی محیط‌زیست، مقاومت قارچ‌های بیمارگر به قارچ‌کش‌ها و باقی‌مانده سموم روی محصول را به همراه دارد. امروزه روش مناسب و مؤثری برای مبارزه کامل با بیماری در دسترس نیست (Folman et al. 2004). مصرف کودهای زیستی (بیولوژیک) برای دستیابی به کشاورزی پایدار، گسترش تولید محصولات بدون سموم و کودهای شیمیایی به عنوان گزینه‌ای جایگزین برای کودهای

بیماری مرگ گیاهچه خیار (*Cucumis sativus*) ناشی از قارچ خاکزی *Pythium aphanidermatum* یکی از زیانبارترین بیماری‌های این محصول است که هر ساله آسیب‌های زیادی را به تولیدکنندگان وارد می‌سازد (Al-Sa'di et al. 2007). از آنجایی که این بیماری در ایران نیز در بیشتر نقاط کشت خیار اهمیت دارد پیشگیری و مبارزه با آن بسیار ضروری به نظر می‌رسد. کاربرد قارچ‌کش‌ها، معمول‌ترین روش کنترل بیمارگرهای

بسیاری از گیاهان را کلنیزه می‌کنند (Smith and Read 2010). این گروه از قارچ‌ها، می‌توانند برای گیاه با تحریک تولید مواد تنظیم‌کننده رشد، افزایش نورساخت (فتوسنتز)، بهبود و تعدیل فشار اسمزی تحت تنش‌های شوری و خشکی و افزایش مقاومت به آفات و بیماری‌های خاکزاد سودمند باشند (Al-Karaki 2006). بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داده است که گیاهچه‌های خیار مایه‌زنی‌شده با سه گونه قارچ‌ریشه *Glomus fasciculatens* و *G. intraradices mosseae*، باعث افزایش غلظت نیتروژن و فسفر در ریشه‌ها و منیزیم، مس و روی در ساقه‌ها شده است (Wang et al. 2008). بررسی تأثیر قارچ‌ریشه *G. mosseae* بر تقویت گیاهچه‌های خیار و تأثیر آن بر کنترل بیماری بوته‌میری ناشی از *P. aphanidermatum* نشان داده که شدت آلودگی در بوته‌های مایه‌زنی‌شده با قارچ‌ریشه‌ها کاهش یافته است (Hosseini 2012). تلقیح مایه مخلوط چند قارچ‌ریشه آربوسکولار به ریشه خیار در گلخانه باعث افزایش رشد آن و کنترل بیماری پژمردگی آوندی ناشی از قارچ *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* شده است (Hu et al. 2010).

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در واکنش به تنش‌های زنده شامل عامل‌های عفونی بیماری‌زا، حشرات، زخم‌ها و عامل‌های نامساعد محیطی در گیاهان تولید و موجب فعال شدن سامانه دفاعی گیاه می‌شوند (Sinha et al. 2014). القای پروتئین‌های مرتبط با دفاع در بسیاری از گونه‌های گیاهی در برابر آلودگی باکتری، قارچ، ویروس و یا حمله حشره‌ها ثابت شده است (Van Loon et al. 2006). ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های مرتبط با پاسخ‌های دفاعی همچون کیتینازها، پراکسیدازها و فنیل آلانین آمونیلیاز که نقش ضد باکتریایی و ضد قارچی دارند در ارتباط با مقاومت اکتسابی سیستمیک بوده و نسخه‌های آن‌ها در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌یابد (El Hadrami et al. 2010). نتایج نشان داده است که رونوشت ژن‌های *Chitinase* و *Cup4* در بافت‌های مختلف بوته‌های خیار مایه‌زنی‌شده با *Pseudomonas lachrymans syringae* pv. به میزان شایان توجهی افزایش یافته و باعث ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه

شیمیایی به‌منظور افزایش حاصلخیزی خاک در تولید محصولات کشاورزی مطرح شده‌اند (Wu et al. 2005). انواع کودهای زیستی شامل: باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی (دیازوتروف‌ها)، قارچ‌ریشه‌ها (میکوریزا)، ریزجانداران (میکروارگانسیم‌های) حل‌کننده فسفات‌های نامحلول، باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، ریزجانداران تبدیل‌کننده مواد آلی زائد به کمپوست و کرم‌های خاکی تولیدکننده ورمی‌کمپوست برای گسترش کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شوند (Gunadi et al. 2003). ورمی‌کمپوست قابلیت بالای جذب و نگهداری آب و عناصر غذایی و در نتیجه تخلخل زیاد، تهویه و زهکشی مناسب دارد و استفاده از آن در کشاورزی پایدار، افزون بر افزایش جمعیت و فعالیت ریزجانداران سودمند خاک، مانند قارچ‌ریشه‌ها و باکتری‌های موجود در ریزوسفر، سبب بهبود رشد و عملکرد گیاهان زراعی می‌شود (Arancon et al. 2005). کاربرد کودهای ورمی‌کمپوست به همراه نیتروکسین در گیاه کنگد، تأثیر مثبت و معنی‌دار بر بیشتر صفات مورد ارزیابی داشت به طوری که در بعضی از صفات، شامل شمار کپسول در بوته، عملکرد دانه و عملکرد روغن، کاربرد این کودها، حتی تأثیری برابر با تأثیر نیمی از کود نیتروژن مصرفی داشتند (Sajadi et al. 2011). اختلاط ورمی‌کمپوست با خاک، پیش از کاشت کاهو، باعث سرکوب بیماری پوسیدگی ساقه و ریشه خیار در اثر قارچ خاکزاد *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis* شده است (Pavlou and Vakalounakis 2005). کود زیستی نیتروکسین حاوی مجموعه‌ای از مؤثرترین سویه (استرین)‌های باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن از جنس *Azotobacter*، *Azospirillum* و حل‌کننده فسفات از جنس *Pseudomonas* است. باکتری‌های جنس ازتوباکتر و آزوسپیریوم از مهم‌ترین باکتری‌های محرک رشد گیاه هستند که افزون بر تثبیت زیستی نیتروژن و کمک به دسترسی آسان گیاه به مواد غذایی خاک، با تولید میزان قابل توجهی از هورمون‌های تحریک‌کننده رشد به‌ویژه انواع اکسین، جیبرلین و سیتوکنین رشد و نمو و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Ahemad and Kibret 2014). گونه‌های مختلف قارچ‌ریشه در اغلب خاک‌ها وجود دارند و ریشه‌های

حاوی محیط کشت جامد (CMA, Corn Meal Agar, Merck, Germany) منتقل و برای تحریک قارچ به رشد سریع، شمار بیست عدد بذر ضدعفونی‌شده شاهدانه به محیط اضافه شد. سپس پتری‌دیش‌ها به درون اتاقک رشد (انکوباتور) در دمای $25 \pm 1^\circ\text{C}$ منتقل شدند. پس از بازبینی‌های مرتب با مشاهده کلنیزه شدن بذرهای شاهدانه توسط میسلیموم‌های قارچ، از آن‌ها برای مایه‌زنی در هر گلدان استفاده شد. بدین‌وسیله برای مایه‌زنی گیاهچه‌ها، در آغاز اطراف طوقه هر گیاهچه در مرحله ۲-۳ برگی در عمق ۱ سانتی‌متری از خاک، سه عدد بذر شاهدانه کلنیزه‌شده با میسلیموم قارچ قرار داده و سپس با ماسه سترون پوشانده شد. پس از مایه‌زنی، به‌منظور افزایش رطوبت محیط، روی گیاهان و سطح گلدان با آب مقطر مه پاشی صورت گرفت و پوشش پلاستیکی سلفان روی آن‌ها کشیده شد. رطوبت نسبی در زیر پوشش پلاستیکی ۹۵ درصد حفظ شد. پس از ۷۲ ساعت پوشش پلاستیکی برداشته و گیاهچه‌ها در دما و رطوبت طبیعی نگهداری شدند. یادداشت‌برداری از نمونه‌ها ۳-۴ روز پس از مایه‌زنی انجام شد. به‌منظور بررسی تغییرپذیری صفات زراعی، بوته‌های خیار در مرحله ۴-۶ برگگی به آزمایشگاه انتقال داده و صفاتی شامل ارتفاع اندام هوایی و زمینی، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و زمینی اندازه‌گیری شد. برای ارزش‌گذاری شدت آلودگی و ارزیابی واکنش گیاهان در برابر قارچ عامل بیماری و تعیین پیشرفت بیماری با شمارش لکه‌های بافت مرده (نکروزه) در تیمار آلوده با کود و مقایسه آن با شاهد آلوده بدون کود انجام شد (Ozgonen and Erkilic 2007). بدین منظور از نمره‌دهی بر پایه شمار لکه‌های بافت مرده استفاده شد. بدین ترتیب ۰ درصد شامل گیاهچه‌های بدون نشانه‌های بیماری، درصد پیشرفت بیماری در گیاهچه‌های با شمار ۱-۵۰ عدد لکه بافت مرده، ۳۰ درصد، گیاهچه با شمار لکه‌های بین ۷۰-۱ عدد لکه بافت مرده ۵۰ درصد و گیاهچه‌ها با شمار ۹۰-۱ عدد لکه بافت مرده، ۷۰ درصد در نظر گرفته شد (Ozgonen and Erkilic 2007).

طراحی آغازگرهای مورد استفاده

از توالی ژن *Cup4* (DQ482461.1) و ژن *Chitinase* (HM015248.1) که در بانک‌های اطلاعاتی ثبت شده بود برای طراحی آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن

آلوده نسبت به شاهد شده است (Phuntumart et al. 2006). بیشتر بررسی‌ها در زمینه کاربرد کودهای زیستی روی بهبود شرایط رشدی و اجزای عملکرد گیاه انجام شده است و در ارتباط با تأثیر کودهای مورد استفاده در این پژوهش در افزایش مقاومت گیاهان و مسیره‌های مقاومتی به‌ویژه بیان ژن‌های مسئول پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی اطلاعات کافی در دست نیست. با توجه به لزوم انجام تحقیقات در زمینه استفاده از روش‌های جایگزین کاربرد کودهای شیمیایی و درک مسیره‌های تحریک‌شده در گیاهان، برای القای مقاومت توسط کودهای زیستی، در این تحقیق اثر تنها و تلفیقی سه کود زیستی ورمی‌کمپوست، قارچ‌ریشه و نیتروکسین روی اجزای عملکرد و میزان تغییر بیان چند ژن مسئول مقاومت در گیاه خیار آلوده به بیماری بوته‌میری ناشی از قارچ *P. aphanidermatum* بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کاشت گلخانه‌ای

خیار رقم ES-2862 (بذر F1) برای کشت و آماده‌سازی گیاه استفاده شد. بذرهای خیار در قالب طرح کامل تصادفی در گلدان‌های ۱/۵ کیلویی با اعمال تیمارهای کودی کشت شد. بدین منظور مخلوط خاک شامل خاک مزرعه و ماسه شسته شده به نسبت ۱:۱، دو بار به مدت یک ساعت سترون و به گلدان‌های ۱/۵ کیلویی منتقل شد. تیمارهای ورمی‌کمپوست به نسبت ۱:۳ و مایه مایه‌زنی قارچ‌ریشه به نسبت ۱:۴ با خاک مخلوط شد (Kermanizadeh 2013). کود نیتروکسین به‌صورت بذر مال پیش از کاشت بذر (پنج دقیقه) در محلول نیتروکسین قرار داده شد. در نهایت در هر گلدان سه عدد بذر کشت و گلدان‌ها در گلخانه در دمای 25°C تا 27°C با رطوبت نسبی ۷۰ درصد قرار داده شدند و با آب مقطر سترون بدون مواد مغذی آبیاری انجام شد.

تهیه مایه مایه‌زنی و تعیین پیشرفت بیماری‌زایی

از جدایه استاندارد *Pythium aphanidermatum* دریافتی از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی به‌منظور تهیه مایه مایه‌زنی برای آزمون بیماری‌زایی استفاده شد. بدین منظور، قطعه‌هایی از محیط کشت حاوی پرگنه قارچ به پتری‌دیش

آگارز ۱ درصد و روش طیف‌سنجی با دستگاه اسکن دراپ (Scandrop, Analytika, Germany) انجام شد. ساخت رشته اول از مولکول‌های تک‌رشته‌ای mRNA با استفاده از کیت 2Steps RT-PCR kit (GeneAll, South Korea) و بنابر برنامه شرکت سازنده انجام شد.

بررسی میزان بیان ژن

بررسی بیان ژن‌های موردبررسی در حالت القای مقاومت در گیاه تحت تنش بیماری با استفاده از روش کمی‌سنجی با استفاده از دستگاه LightCycler (Curbet 3000, Qiagene) انجام شد. محلول واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر در تیوب‌های ویژه تهیه شد. این محلول شامل ۲ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) cDNA، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکومولار)، ۱۰ میکرولیتر Evagreen (Biotium, Inc. USA) حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر بدون آنزیم RNase به ۲۰ میکرولیتر تنظیم و برای انجام واکنش استفاده شد.

چرخه‌های گرمایی واکنش شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پانزده دقیقه و به دنبال آن چهل چرخه گرمایی شامل: ۹۴ درجه سلسیوس به مدت بیست ثانیه، ۶۰ درجه سلسیوس به مدت بیست ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت سی ثانیه تنظیم شد. هر آزمایش در سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی انجام شد. داده‌های به‌دست‌آمده از سطح آستانه چرخه‌های هر واکنش ($\Delta\Delta Ct$) برای بررسی میزان تغییرهای بیان هر ژن استفاده شد (Pfaffl 2001). تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده با نرم‌افزار REST 2009 که تخصصی داده‌های خروجی Real time PCR است، انجام شد.

استفاده شد. برای طراحی آغازگرها از نرم‌افزار Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) استفاده شد. توالی مربوط به ناحیه کدکننده ژن‌های موردنظر با فراسنجه (پارامتر)های مربوط به طول قطعه موردنظر و دمای ذوب بین ۶۳-۵۷ درجه سلسیوس برای طراحی آغازگرها استفاده شد. در بین آغازگرهای طراحی‌شده به‌وسیله نرم‌افزار، آغازگرهای دارای پایین‌ترین میزان درصد بازهای آلی سیتوزین و گوانین انتخاب و برای ساخت (سنتز) به شرکت سازنده سفارش داده شد (پیشگام، ایران) با آغازگرهای این ژن‌ها در منابع علمی ارزیابی شد. کارایی هر دو آغازگر با استفاده از DNA ژنومی با دماهای مختلف با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرایان (Eppendorf, Germany) ارزیابی شد. ژن *Actin* (AB01092) به‌عنوان ژن کنترل درونی استفاده شد (جدول ۱).

استخراج RNA و ساخت cDNA

با توجه به گسترش سریع بیماری در گیاه و ظهور سریع نشانه‌های بیماری، ۷۲ ساعت پس از آلودگی از گیاهچه‌های ۲۱ روزه در مرحله ۴-۶ برگی برای استخراج RNA استفاده شد. بدین منظور ۵۰ گرم از برگ‌های مربوط به هر تیمار با استفاده از نیتروژن مایع درون هاون چینی پودر و استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری Cinnapure RNA (شرکت سیناژن) و بنابر دستورکار شرکت سازنده انجام شد. از آنزیم DNase برای حذف مولکول‌های DNA استفاده شد. وضعیت آلودگی احتمالی به مولکول‌های DNA با استفاده از الکتروفورز محصول استخراج‌شده بررسی شد. کیفیت و کمیت مولکول‌های mRNA به ترتیب با استفاده از ژل

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی

Table 1. Characteristic of primers used in this study

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Primer size	Tm
Chitinase	CCGCAGTGTCCAATACCAGA	GCCGTCCACTGATTCCATGA	149	60.5
Cupi4	TCACTGTGGTGTGTGCTCTC	ACTCAAGCCATTGCCTTCCA	180	59.5
Actin	GAAGGAATAACCACGCTCAG	ACACAGTTCCTACGAG	117	60

جدول ۲. مواد مورد استفاده در واکنش Real time PCR

Table 2. Material used in Real-time PCR reaction

Reagent	Quantity (μL)
Master mix	4
Forward primer	1
Revers primer	1
cDNA	1
Nuclease free water	13

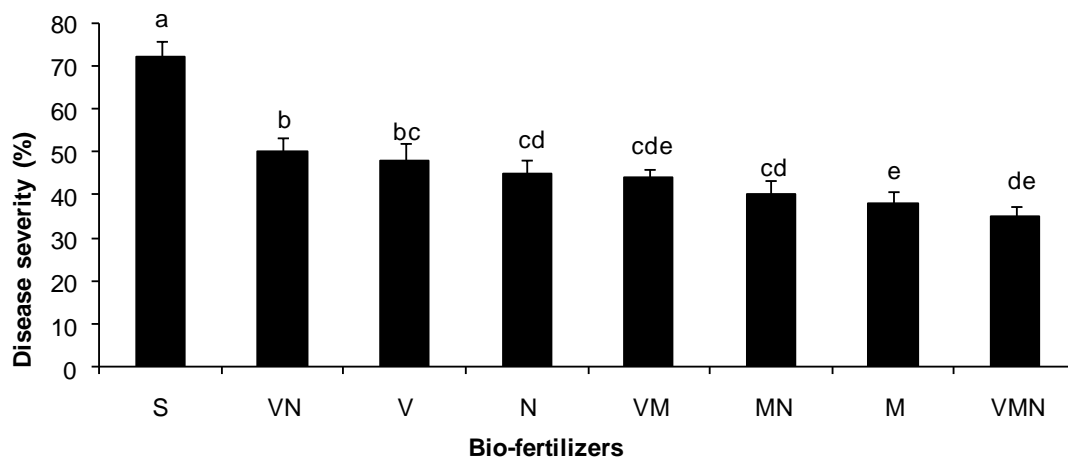
تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش در قلب یک طرح بلوک کامل تصادفی در چهار تکرار و در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. داده‌های به‌دست‌آمده از بررسی صفات و شدت بیماری‌زایی با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 تحت تجزیه واریانس یک‌سویه قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال $P < 0.05$ مقایسه صورت گرفت. نمودارها توسط نرم‌افزار Excell رسم شدند تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده از بیان ژن با نرم‌افزار REST (2009) که تخصصی داده‌های خروجی Real time PCR است، انجام شد (Derveaux et al. 2010). از ژن مرجع (رفرانس) اکتین برای نرمال‌سازی استفاده شد و داده‌های مربوط به گیاه شاهد برای واسنجی (کالیبراسیون) تغییرپذیری‌های چرخه آستانه استفاده شد.

نتایج

بررسی میزان شدت بیماری‌زایی

نتایج مربوط به شدت بیماری در تیمارهای کودهای زیستی در مقایسه با شاهد در شکل ۱ نشان داده شده است. شدت بیماری‌زایی شبه‌قارچ *P. aphanidermatum* در گیاهچه‌های شاهد که در خاک بدون تیمار کودی کاشت شده بودند، برابر ۷۳ درصد است که درصد بالایی از گیاهچه‌ها به بیماری آلوده شدند که با توجه به نتایج به‌دست‌آمده و درجه‌بندی‌های موجود مشخص می‌شود که این رقم جزء رقم‌های خیار حساس به این قارچ است. بیشترین تأثیر کودی در کاهش شدت بیماری مربوط به تیمار مخلوط سه کود قارچ‌ریشه نیتروکسی و ورمی‌کمپوست بوده (۳۸ درصد) و کمترین میزان در کاهش شدت بیماری مربوط به تیمار کودی ورمی‌کمپوست (۵۰ درصد) مشاهده شد.



شکل ۱. تأثیر کودهای زیستی بر شدت بیماری‌زایی خیار آلوده با *P. aphanidermatum*: قارچ‌ریشه (M)، ورمی‌کمپوست (V)، نیتروکسین (N)
Figure 1. The effect of bio-fertilizers on disease severity of infected cucumber with *P. aphanidermatum*. Mycorrhiza (M); Nitroxin (N); Vermicompost (V)

صفت ارتفاع ساقه بوده است. در وزن تر و خشک ریشه نیز کود قارچ‌ریشه تأثیر به‌نسبت بهتری را داشته است. کود ورمی‌کمپوست هم به‌عنوان کودی همراه با کودهای نیتروکسین و قارچ‌ریشه باعث اثر افزایشی این کودها شده است (جدول ۳). در بین تیمارهای کودی نیتروکسین به‌جز در متغیر ارتفاع ساقه در دیگر صفات اندازه‌گیری‌شده کمترین میزان تأثیر را در بین تیمارها از خود نشان داد ولی میزان تغییرپذیری‌ها در صفات اندازه‌گیری‌شده در تیمار نیتروکسین در حدود میزان تغییرپذیری‌های مربوط به کود زیستی قارچ‌ریشه به

تأثیر کودهای زیستی بر صفات زراعی خیار

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری صفات و فراسنجه‌های موردنظر در تیمارهای کودی نشان می‌دهد که همه کودها در سطح آماری ۹۵ درصد با شاهد در همه صفات باعث بهبود صفات زراعی گیاهچه‌های خیار آلوده شدند. همه صفات اندازه‌گیری‌شده مربوط به تیمار تلفیق سه کود قارچ‌ریشه، ورمی‌کمپوست و نیتروکسین، بیشترین میزان افزایش نسبت به شاهد را داشتند. بیشترین میزان تأثیر کود نیتروکسین بر صفات اندازه‌گیری‌شده مربوط به

دست آمد. با توجه به داده‌های حاصل چنین نتیجه‌گیری می‌شود کودهای مصرفی به‌تنهایی تأثیر شایان‌توجهی در افزایش صفات موردنظر نداشته و مؤثرترین ترکیب کودی مربوط به مخلوط سه کود است.

جدول ۳. تجزیه واریانس تأثیر کودهای زیستی متفاوت روی اجزای عملکرد خیار آلوده با *P. aphanidermatum*، با آزمون LSD. ورمی‌کمپوست (V)، نیتروکسین (N)، قارچ‌ریشه (M).

Table 3. Analysis of variance for effects of different biofertilizers on yield components of infected cucumber with *P. aphanidermatum* by LSD test. M: Mycorrhiza; N: Nitroxin; V: Vermicompost

Treatment	Root fresh weight (g)	Root dry weight	Plant height (cm)	Root height	Aerial fresh weight (g)	Aerial dry weight (g)
M+V+N	0.096a	0.02a	11.50a	5.162a	2.400a	0.207a
M+V	0.09b	0.018a	10.175bc	4.950ab	1.512d	0.138fg
V+N	0.09b	0.017b	9.628c	4.525bd	2.075b	0.188c
N+M	0.09b	0.019ab	10.775ab	4.825ab	2.155b	0.201b
N	0.088b	0.018b	8.975d	4.800b	1.495a	0.141f
V	0.088b	0.018b	7.700e	4.125d	1.620cd	0.145e
N	0.086b	0.017b	9.025a	4.125cd	1.793c	0.170d
Control	0.074c	0.017c	7.367e	3.988d	1.475d	0.134g

در هر ستون حروف همسان اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ ندارند.

Means followed by same letters in each column are not significantly different at the 5%.

خشک ریشه و شدت بیماری همبستگی توجیه‌پذیری وجود دارد (شکل ۲).

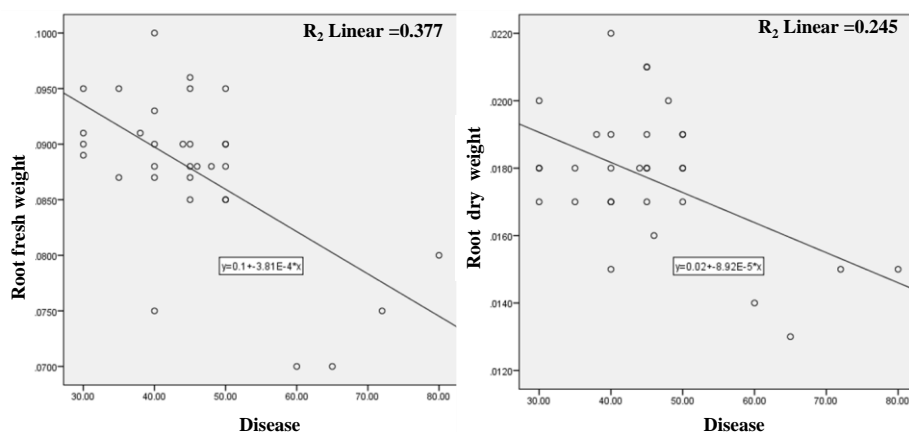
جدول ۴. ارتباط بین شدت بیماری و وزن خشک و تر ریشه خیار آلوده با *P. aphanidermatum* در تیمارهای مختلف کودهای زیستی

Table 4. Relation between disease severity and, root dry and fresh weight of infected cucumber with *P. aphanidermatum* under different bio-fertilizer treatment

	Correlation	
	Disease	P value ≤ 0.05
Root dry weight	-0.495**	-0.495**
Root fresh weight	0.004	0.004

بررسی آماری ارتباط بین وزن تر و خشک گیاه با شدت بیماری در حالت استفاده از کودهای زیستی نشان داد که این ارتباط در سطح چهار تکرار معنی‌دار بوده و دو فراسنجه در ارتباط مستقیم با شدت بیماری است و در مجموع تأثیر کودهای زیستی باعث بهبود شرایط رشدی گیاه شده است (جدول ۴). تجزیه و تحلیل آماری بین فراسنجه‌های هوای و شدت بیماری ارتباط معنی‌داری را نشان نداد.

تجزیه و تحلیل همبستگی داده‌های وزن تر و خشک ریشه با شدت بیماری در تیمارهای مختلف کودی در سطح چهار تکرار با توجه به ضریب R همبستگی مابین فراسنجه‌های یادشده نشان داد که بین وزن تر و وزن



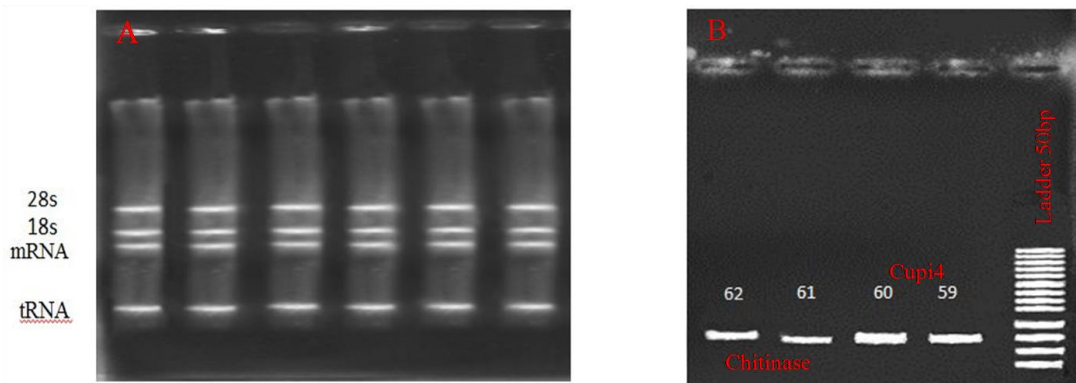
شکل ۲. تجزیه و تحلیل همبستگی بین شدت بیماری و وزن تر و خشک ریشه خیار آلوده با *P. aphanidermatum* تحت تیمارهای کود زیستی

Figure 2. Correlation analysis between disease severity and, root dry and fresh weight of infected cucumber with *P. aphanidermatum* under different bio-fertilizer treatments

دمای ذوب آن‌ها، واکنش زنجیره‌های پلیمرز با استفاده از DNA ژنومی و دماهای گرادیان انجام و مناسب‌ترین دما برای جفت ژن انتخاب شد (شکل ۳-A). بهترین دمای ذوب برای ژن *Cupi4* دمای ۶۰ درجه سلسیوس و برای ژن *Chitinase* دمای ۶۱°C تعیین شد و در برنامه دمایی بیان ژن در زمان واقعی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن

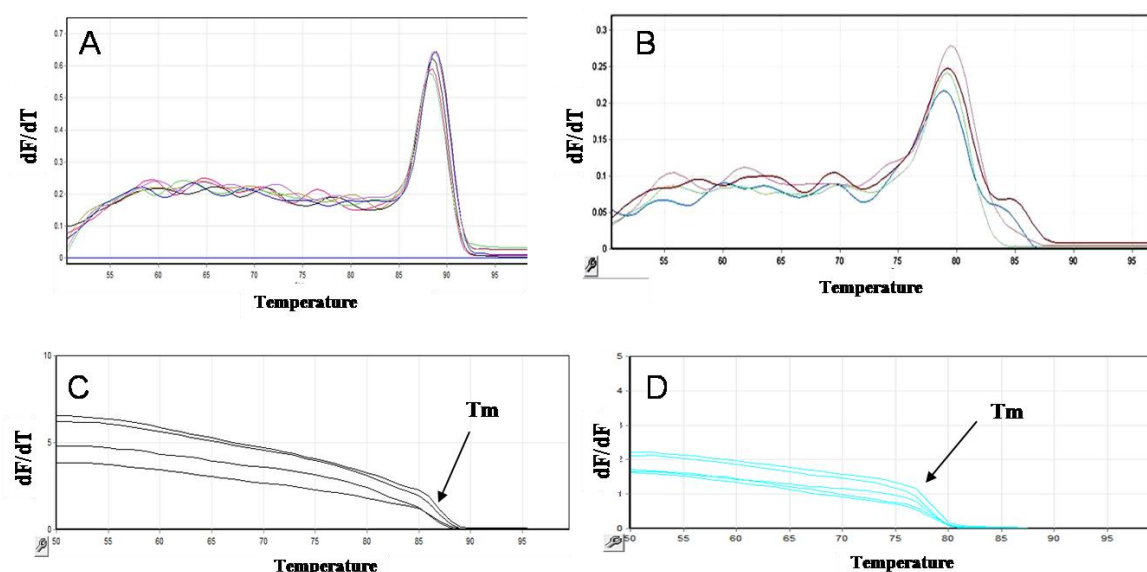
استخراج مولکول‌های RNA از بافت برگ گیاه با کیت‌های تجاری انجام و کمیت و کیفیت‌سنجی مولکول‌های به دست آمده نشان داد که غلظت شایان‌پذیرش با کیفیت مناسب به دست آمده است (شکل ۳-B). برای آزمایش کارایی آغازگرها و تعیین



شکل ۳. استخراج RNA گیاهی مورد استفاده در ساخت cDNA (A) و PCR شیب دمایی ژن‌های *Cupi4* و *Chitinase* (B) (نشانه 50bp).
 Figure 3. Extraction of plant RNA used in cDNA synthesis (A) and PCR thermal gradient for *Cupi4* and *Chitinase* genes (B). (Ladder 50 bp)

با دستگاه رسم شد. شیب منحنی برای همه ژن‌ها یک شیب منفی مشخص شد و با استفاده از آن بهترین غلظت برای ادامه واکنش‌ها با استفاده از دستگاه PCR نوری تهیه و استفاده شد (شکل ۴).

برای بررسی میزان بازدهی واکنش، منحنی استاندارد رسم شد. بدین منظور رقت‌های مختلف cDNA تهیه و برای آن‌ها واکنش Real time-PCR انجام شد. با توجه به میزان سطح آستانه (Ct) برای هر غلظت، منحنی استاندارد



شکل ۴. منحنی دمای ذوب ژن‌های *Cupi4* (A) و *Chitinase* (B) و منحنی استاندارد افزایش ژن‌های *Cupi4* (C) و *Chitinase* (D) genes
 Figure 4. Thermal melting curves of *Cupi4* (A) and *Chitinase* (B) genes and amplification standard curve of *Cupi4* (C) and *Chitinase* (D) genes

میزان را نشان داد. تیمار قارچ‌ریشه به‌تنهایی نیز در افزایش میزان بیان ژن تأثیر شایان‌پذیرشی را از خود نشان داد (جدول ۵). دیگر فراسنجه‌های اندازه‌گیری‌شده مربوط به کیفیت و کارایی واکنش‌های بررسی بیان ژن در حالت واقعی در جدول‌های ۵ و ۶ آمده است.

تجزیه و تحلیل داده‌های خروجی واکنش افزایشی نسخه‌های ژن کیتیناز در زمان واقعی نشان داد که در مجموع میزان بیان این ژن در همه تیمارها نسبت به شاهد آلوده، افزایش معنی‌دار نشان داد ولی در مقایسه با ژن *Cupi4* این میزان شایان‌ملاحظه نبود. بیشترین و کمترین میزان تغییرات مربوط به ترتیب مربوط به تیمارهای قارچ‌ریشه و ورمی‌کمپوست + نیتروکسین به دست آمد (جدول ۶).

نتایج مربوط به بیان دو ژن *Chitinase* و *Cupi4* گیاهان بیمار بدون حضور تیمارهای کودی (شاهد مثبت) و گیاه سالم بدون حضور کود (شاهد منفی) نشان داد که در گیاهان بیمار میزان هر دو ژن افزایش یافته است (جدول ۷).

با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده از رسم نمودار منحنی استاندارد مشخص شد که برای ژن *Cupi4* بازده واکنش برابر با ۱/۰۴ و میزان $R^2=0/95$ و برای ژن *Chitinase* بازده واکنش برابر با ۱/۰۱ و میزان $R^2=0/98$ است. با توجه به میزان شیب منحنی و ضریب رگرسیون زیر عدد ۱ برای هر دو آغازگر مشخص شد که کارایی دستگاه در افزایش و پلیمره کردن قطعه‌های موردنظر بالا و شایان‌پذیرش است. نتایج تجزیه و تحلیل منحنی ذوب نشان داد که این دو ژن دمایی ذوب متفاوت دارند به‌طوری‌که کاهش ناگهانی شیب دمایی که نشان از ذوب آغازگر است برای ژن *Cupi4* در حدود ۷۷ درجه سلسیوس و برای ژن *Chitinase* حدود ۸۷ درجه سلسیوس است (شکل ۵).

بررسی میزان تغییرپذیری در بیان ژن‌های *Cupi4* و *Chitinase* در حضور کودهای زیستی نشان داد که بیشترین میزان تغییرپذیری در همه تیمارها مربوط به ژن *Cupi4* است. میزان بیان این ژن در تیمار مخلوط سه کود بیشترین و در تیمار ورمی‌کمپوست + نیتروکسین کمترین

جدول ۵. تجزیه و تحلیل بیان ژن *Cupi4* در خیار آلوده به *P. aphanidermatum* تحت تیمارهای مختلف کود زیستی قارچ‌ریشه (M)،

ورمی‌کمپوست (V)، نیتروکسین (N)

Table 5. Expression analysis of *Cupi4* gene in infected cucumber with *P. aphanidermatum* under different bio-fertilizer treatments: Mycorrhiza (M); Nitroxin (N); Vermicompost (V)

Treatment	Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	P(H1)	Result
VMN	<i>Cupi4</i>	TRG	1.04	23.65	46.41-13.37	0.000	UP
M	<i>Cupi4</i>	TRG	1.04	21.21	26.21-16.61	0.004	UP
MN	<i>Cupi4</i>	TRG	1.04	11.61	12.94-9.63	0.000	UP
VM	<i>Cupi4</i>	TRG	1.04	10.61	13.804-7.062	0.000	UP
N	<i>Cupi4</i>	TRG	1.04	5.86	7.05-4.63	0.000	UP
V	<i>Cupi4</i>	TRG	1.04	3.92	4.73-2.79	0.000	UP
VN	<i>Cupi4</i>	TRG	1.04	2.9	3.29-2.49	0.000	UP

جدول ۶. میزان بیان ژن *Chitinase* در تیمارهای مختلف کود زیستی: قارچ‌ریشه (M)، ورمی‌کمپوست (V)، نیتروکسین (N)

Table 6. Expression analysis of *Chitinase* gene in infected cucumber with *P. aphanidermatum* under different bio-fertilizer treatments: Mycorrhiza (M); Nitroxin (N); Vermicompost (V)

Treatment	Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	P(H1)	Result
M	<i>Chitinase</i>	TRG	1.01	2.45	2.99-1.65	0.004	Up
VMN	<i>Chitinase</i>	TRG	1.01	1.41	1.60-1.16	0.000	UP
VM	<i>Chitinase</i>	TRG	1.01	1.34	1.20-0.94	0.501	Up
MN	<i>Chitinase</i>	TRG	1.01	0.929	1.08-0.78	0.296	Down
V	<i>Chitinase</i>	TRG	1.01	0.649	1.34-0.40	0.13	Down
N	<i>Chitinase</i>	TRG	1.01	0.642	0.76-0.56	0.033	Down
VN	<i>Chitinase</i>	TRG	1.01	0.530	0.666-0.418	0.022	Down

جدول ۷. سطح بیان ژن‌های *Cupi4* و *Chitinase* در خیار آلوده به *P. aphanidermatum* بدون کاربرد کودهای زیستی

Table 7. Expression level of *Cupi4* and *Chitinase* gene in infected cucumber with *P. aphanidermatum* without bio-fertilizer application

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	P(H1)	Result
<i>Cupi4</i>	TRG	1.04	12.529	38.684-10.1	0.000	UP
<i>Chitinase</i>	TRG	1.01	1.235	3.621-1.464	0.000	UP

بحث

خاک سطحی محل کشت خیار تأثیر بسیار خوبی بر روند رشد بوته‌های خیار داشته است (Saffari *et al.* 2013) که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. عامل‌های بیماریزای خاکزی افزون بر نفوذ به بافت‌های گیاه و تخریب آن‌ها باعث جلوگیری از جذب بعضی از عناصر غذایی توسط گیاه و ضعف بیشتر گیاه می‌شوند. قارچ‌ریشه‌ها یکی از عامل‌های کمک‌کننده در جذب عنصر غذایی به‌وسیله گیاه و تقویت آن هستند (Spann and Schumann, 2010). بررسی‌های چندی نقش قارچ‌ریشه‌ها را در بهبود شرایط رشدی گیاهان میزبان از راه جذب عناصر غذایی کم‌تحرک در محلول خاک مانند فسفر، روی و مس (Marschner and Dell 1994) و تقویت گیاهان در برابر عامل‌های عفونی بررسی کرده‌اند و مشخص شده است که تقویت دیواره یاخته‌ای گیاه از راه افزایش آنزیم‌های مرتبط مانند کیتیناز، باعث جلوگیری از مرگ یاخته‌ای و خروج مواد قندی موردنیاز عامل‌های بیماریزا برای رشد و گسترش شده و مقاومت القایی گیاه را افزایش می‌دهد (Heydari and Pessarakli 2010, Linderman 2000). با بررسی تأثیر کودهای زیستی بر شاخص‌های رشدی گیاه سیاه‌دانه مشخص شده است که مایه‌زنی بذر سیاه‌دانه با آزوسپریلوم و قارچ‌ریشه‌ها، بیشترین تأثیر را بر صفات رشدی این گیاه داشته است. و این افزایش در نتیجه تولید محرک‌های رشد است که به احتمال اکسین موجب تقسیم یاخته‌ای بیشتر و جیبرلین و مشتقات آن سبب افزایش رشد طولی یاخته‌ها به‌ویژه میانگره‌های ساقه می‌شوند (Zhang and Ao 2010). نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان داده‌اند که گیاهچه‌های شبدر قرمز همراه با قارچ‌ریشه، بیشترین وزن خشک و تر ریشه و اندام هوایی، ارتفاع گیاهچه و طول ریشه را نسبت به شاهد دارند که این تأثیرگذاری‌ها به دلیل افزایش جذب فسفر و روی و افزایش زیست‌توده گیاه بوده است (Bi *et al.* 2003). در بیشتر تیمارهای اعمال‌شده کودهای زیستی در این بررسی تغییر افزایش اجزای عملکرد نسبت به مشاهده شد ولی این مقادیر با توجه به نوع ترکیب کودی متفاوت بود. بیشترین میزان تغییر در بیشتر صفات مربوط به تیمار مخلوط سه کود زیستی ثبت شد که با توجه به این نتایج چنین استنباط

در این بررسی تأثیر سه کود زیستی قارچ‌ریشه، ورمی‌کمپوست و نیتروکسین در القای مقاومت خیار به بیماری بوته‌میری در شرایط گلخانه بررسی شد. شدت بیماری و ایجاد نشانه‌های بیماری روی ریشه بوته‌ها در همه حالت‌های کودی با گیاه شاهد مقایسه شد و درصد شدت بیماری با شاخص‌های شماره‌گذاری تعیین شد. نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری شدت بیماریزایی نشان داد که گیاهچه‌های خیار کشت‌شده در خاک‌های تقویت‌شده با کودهای زیستی قابلیت مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند و شدت بیماری به میزان زیادی کاهش یافت. احتمال دارد این کاهش شدت بیماری افزون بر تقویت گیاه در نتیجه رقابت مکانی و تغذیه‌ای باشد که در خاک‌های حاوی موجودهای سودمند خاکزی صورت می‌پذیرد. بدین‌صورت که عامل بیماری در نتیجه رقابت با این موجودها سرعت رشد و گسترش کمتری داشته و به‌طور شایان توجهی کنترل می‌شود به‌طوری‌که کاهش نیافتن شدت بیماری در گیاه شاهد آلوده تأییدکننده این موضوع است. به هر حال ایجاد شرایط تغذیه‌ای مناسب به‌ویژه در مراحل اولیه شیوع بیماری می‌تواند از شیوع بیماری به میزان فراوانی جلوگیری کند. در بررسی پیشین با کاربرد مواد القاکننده مقاومت مشخص شد که بیشترین میزان تولید آنزیم‌های دفاعی در ۷۲ ساعت اولیه مایه‌زنی عامل بیماری بوده و با افزایش زمان این مقادیر کاهش یافت (Abkhoo and Sabbagh 2015, Ghazimohseni *et al.* 2014). همچنین در این تحقیق مشاهده شد که بیشتر کودهای زیستی مورد استفاده با شدت و ضعف مختلف، قادر به افزایش اجزای عملکرد مؤلفه‌ها بررسی شدند که به نظر می‌رسد افزون بر مسئله کنترل بیماری، نیاز غذایی گیاه برای استقرار بهتر به‌ویژه در مراحل اولیه رشد و افزایش میزان عامل‌های مؤثر و دخیل در تولید نهایی محصول را بهبود می‌بخشد. دلیل این بهبود در صفات زراعی و زیست‌توده (بیوماس) گیاهچه‌های خیار می‌تواند ناشی از تأمین نیازهای غذایی، در دسترس قرار دادن عناصر غیرقابل جذب مستقیم و افزایش تولید محرک‌های رشدی در گیاه باشد. نتایج تحقیقات صفاری و همکاران نیز نشان داد کاربرد کود ورمی‌کمپوست با

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی همچون کیتیناز که نقش ضد باکتریایی و ضد قارچی دارند در ارتباط با مقاومت اکتسابی سیستمیک هستند (Sticher *et al.* 1997). با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده مشخص شد که در همه تیمارهای کودی میزان بیان ژن کیتیناز از ژن *Cupi4* در تیمارهای همسان کمتر است. بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به تیمار قارچ‌ریشه بود درحالی‌که برای ژن *Cupi4* بیشترین میزان مربوط به تیمار مخلوط سه کود بود. با توجه به میزان افزایش شایان توجه بیان ژن *Cupi4* مخلوط کودی اگرچه ممکن است هزینه بیشتری را برای کشاورز داشته باشد ولی می‌تواند در روند مقاوم‌سازی گیاه نقش مؤثرتری را ایفا کند. با توجه به میزان بسیار کم کیتین در ساختار دیواره یاخته‌ای شبه قارچ *P. aphanidermatum*، با احتمال بیان کمتر ژن کیتیناز نسبت به ژن *Cupi4* می‌تواند مربوط به ساختار این دیواره باشد. اگرچه کیتینازها بیشتر فعالیت ضد قارچی دارند و در برهمکنش‌های بین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی با گیاهان نقش عمده‌ای دارند ولی بررسی‌ها، نقش لیزوزیمی را نیز برای کیتینازها اثبات کرده و استنباط می‌شود که از این راه باعث تجزیه دیواره یاخته‌ای دیگر عامل‌های بیماری‌زای می‌شوند (Fritig and Legrand 2012, Grover 2012). همان‌طور که مشاهده شد بیان دو ژن در نتیجه مایه‌زنی گیاهچه‌ها افزایش نسبی از خود نشان می‌دهند، که تغییرپذیری‌های بیان ژن *Cupi4* به میزان بیشتری از ژن *Chitinase* است که در ژن *Chitinase* حدود ۲/۲۴ برابر افزایش دیده می‌شود اما در ژن *Cupi4* این میزان ۱۲/۵ برابر است (جدول ۴). در گیاهان بیمار بدون حضور کودهای زیستی و در مقایسه با شاهد سالم میزان بیان ژن‌های *Cupi4* و *Chitinase* دستخوش تغییر شده است ولی این تغییر در ارتباط با ژن *Cupi4* به مراتب بیشتر از ژن کیتیناز است که نشان‌دهنده نقش مؤثرتر این ژن در واکنش‌های دفاعی است (جدول ۴). تحقیق برای یافتن ژن و یا ژن‌های مسئول مقاومت برای یافتن یک نشانگر سودمند در انتخاب رقم‌های مقاوم ادامه دارد. با توجه به نحوه عملکرد چندگانه ژنی در فرآیند ایجاد مقاومت، رسیدن به مجموعه‌ای ژن‌های منتخب به یک طیف به‌نسبت شایان‌پذیرشی از عامل‌های بیمارگر

می‌شود که در کاربرد کودهای زیستی ترکیب کودی با نسبت‌های مناسب می‌تواند تأثیر آن‌ها را نسبت به کاربرد تکی افزایش دهد ولی در چنین مواردی باید تأثیر بازدارندگی این عامل‌ها روی هم ارزیابی دقیق شود. نتایج در این تحقیق از روش بررسی میزان بیان ژن در زمان واقعی برای تأیید نتایج بالا استفاده شد. از جمله سودمندی این روش، بررسی دقیق و سریع میزان نسخه‌های یک ژن در یک زمان واقعی و مشاهده مستقیم میزان این تغییرها است. ترسیم منحنی ذوب پس از اتمام فرآیند PCR اطلاعات دقیقی را نسبت به کارایی دستگاه و عملکرد آغازگرها برای انجام یک بررسی دقیق فراهم می‌کند (Vandesompele *et al.* 2002). بررسی منحنی‌های مربوط به ژن‌های مورد آزمایش نشان داد که طراحی و ساخت آغازگر به‌خوبی صورت گرفته و توالی‌های مورد استفاده می‌تواند برای بررسی‌های همسان استفاده شود. در یک بررسی نشان داده شد که ژن *Cupi4* در آلودگی برگ‌های خیار توسط عامل‌های مختلف قارچی و باکتریایی به میزان شایان توجهی افزایش بیان داشته است (Phuntumart *et al.* 2006). در این پژوهش الگوی بیان ژن *Cupi4* در آلودگی ریشه‌ای ناشی از عامل بیماری مرگ گیاهچه در بین همه تیمارهای کودی در زمان ۷۲ ساعت پس از آلودگی بررسی شد. افزایش شمار نسخه‌های این ژن در برابر بیمارگرهای مختلف قارچی و باکتریایی و همچنین القاگر غیر زیستی در گیاهچه‌های خیار می‌تواند نقش مؤثر و کلیدی این ژن را در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی و القای مقاومت به بیمارگر را روشن کند (Phuntumart *et al.* 2006). در این تحقیق مشاهده شد که میزان بیان آن در برابر ژن کیتیناز بسیار شایان توجه بوده و حتی در تیمارهای تک‌کودی این میزان نسبت به شاهد بیان شایان توجهی داشت. گیاه پس‌ازآنکه در معرض حمله بیمارگر (پاتوژن) قرار می‌گیرد، دامنه گسترده‌ای از واکنش‌های دفاعی را مانند تقویت ساختار دیواره یاخته‌ای، انفجار اکسایشی (اکسیداسیونی) و تولید ترکیب‌های دفاعی مانند PR پروتئین‌ها را فعال می‌کند که (Hong and Hwang 2005). ژن کیتیناز یکی از ژن‌های مسئول تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی است که پس از تنش‌های زیستی، در گیاه تولید می‌شود.

و مدیریت بیماری‌ها به‌عنوان عامل‌های مهم مطرح باشند. اگرچه در میزان بیان ژن پروتئین‌های مقاومت تفاوت وجود دارد که می‌تواند این تفاوت تغییرپذیری را به راهبرد دفاعی گیاه و میزان مقاوم بودن رقم گیاه نیز مرتبط دانست و با اندازه‌گیری اختلاف تغییرات این ژن‌ها و کمیت‌سنجی محصولات ژن می‌توان احتمال و درصد حساسیت به بیمارگرهای مختلف را برای هر رقم برآورد کرده و برای فرار گیاه از عامل‌های بیماری‌زایی که حساسیت شدید در گیاه ایجاد می‌کنند برنامه‌های مدیریتی کنترل مبارزه با بیماری‌ها را در نظر گرفت و درنهایت به پایداری سامانه کشاورزی کمک کرد و استفاده از مواد شیمیایی را به کمترین میزان رساند.

خاکزی، می‌تواند گامی مؤثر در کنترل بیماری مرگ گیاهچه خیار گلخانه‌ای باشد. پیش‌نیاز تولید رقم‌های مقاوم، شناسایی سازوکارهای گیاهی درگیر در واکنش به عامل‌های بیماری‌زاست که منجر به ظهور مقاومت در رقم‌های مقاوم و حساسیت در رقم‌های حساس گیاهی می‌شود (Baker 1968).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که کودهای زیستی افزون بر ایفای نقش به‌عنوان تأمین‌کنندگان نیاز غذایی گیاه می‌توانند در سازوکارهای دیگر گیاه از جمله سازوکار مقاومت به عامل‌های بیماری‌زا

REFERENCES

- Al - Sa'di A, Drenth A, Deadman M, De Cock A, Aitken E** (2007) Molecular characterization and pathogenicity of *Pythium* species associated with damping-off in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus*) in Oman. *Plant Pathology* 56: 140-149.
- Akhtar MS, Siddiqui ZA** (2010) Effect of AM fungi on the plant growth and root-rot disease of chickpea. *American Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 8: 544-549.
- Abkhoo J, Sabbagh SK** (2015) Control of *Phytophthora melonis* damping-off, induction of defense responses, and gene expression of cucumber treated with commercial extract from *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology* 1-10.
- Al-Karaki GN** (2006) Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Scientia Horticulturae* 109(1): 1-7.
- Aranco NQ, Edwards CA, Bierman P, Metzger JD, Lucht C** (2005) Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field. *Pedobiologia* 49(4): 297-306.
- Bi Y, Li X, Christie P** (2003) Influence of early stages of arbuscular mycorrhiza on uptake of zinc and phosphorus by red clover from a low-phosphorus soil amended with zinc and phosphorus. *Chemosphere* 50(6): 831-837.
- El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, Daayf F** (2010) Chitosan in plant protection. *Marine Drugs* 8: 968-987
- Fravel D, Deahl K, Stommel J** (2005) Compatibility of the biocontrol fungus *Fusarium oxysporum* strain CS-20 with selected fungicides. *Biological Control* 34(2): 165-169.
- Folman L, De Klein M, Postma J, Van Veen J** (2004) Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1 T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber. *Biological Control* 31(2): 145-154.
- Fritig B, Legrand M** (2012) Mechanisms of plant defense responses. Springer, Science & Business Media.
- Ghazimohseni V, Sabbagh SK, Esmaeilzadeh Bahabadi S, Ghorbani M** (2014) Application of silicon in induction of systemic resistance against *Fusarium* wheat head blight diseases. *Biological Control of Pest and Plant Disease* 2(3): 128-137.
- Grover A** (2012) Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31:57-73.
- Gunadi B, Edwards CA, Blount C** (2003) The influence of different moisture levels on the growth, fecundity and survival of *Eisenia fetida* (Savigny) in cattle and pig manure solids. *European Journal of Soil Biology* 39(1): 19-24.
- Heydari A, Pessaraki M** (2010) A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4): 273-290.
- Hong JK, Hwang BK** (2005) Functional characterization of PR-1 protein, β -1, 3-glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annuum*. *The Plant Pathology Journal* 21(3): 195-206.
- Hosseini H** (2012) Investigation of the interaction of salinity, *Bacillus subtilis* and *Glomus mosseae* on damping-off of cucumber. MSc. thesis. University of Zabol, Zabol, Iran: 150p.

- Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo MJ** (2012) Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology* 38(6): 651-664.
- Kermanizadeh B** (2013) Effect of biological fertilizers on quantity and quality yield rate of Wheat (*Triticum aestivum*) culture of Sistan area MSc thesis, University of Zabol:67p.
- Linderman RG** (2000) Effects of mycorrhizas on plant tolerance to diseases. *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer, USDA-ARS.
- Ozgonen H, Erkilic A** (2007) Growth enhancement and Phytophthora blight (*Phytophthora capsici*) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Crop Protection* 26(11): 1682-1688.
- Pavlou G, Vakalounakis D** (2005) Biological control of root and stem rot of greenhouse cucumber, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, by lettuce soil amendment. *Crop Protection* 24(2): 135-140.
- Phuntumart V, Marro P, Métraux P, Sticher L** (2006) A novel cucumber gene associated with systemic acquired resistance. *Plant Science* 171(5): 555-564.
- Saffari AR, Alidadi H, Najafpoor AA, Asadi B** (2013) Effects of compost, vermicompost and sulfur compost on *Scindapsus aureus* growth. *Archives of Hygiene Sciences* 2(2): 25-36.
- Sajadi NR, Yadavi A, Balouchi HR, Faragi H** (2011) Effect of Chemical (urea), organic (vermicompost) and biological (nitroxin) fertilizers on quantity and quality yield of Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Journal of Agriculture Science University of Tabriz* 21(2): 87-101.
- Saravanakumar D, Lavanya N, Muthumeena K, Raguchander TS, Amiyappan R** (2009) Fluorescent pseudomonad mixtures mediate disease resistance in rice plants against sheath rot (*Sarocladium oryzae*) disease. *Biocontrol* 54(2): 273-286.
- Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP** (2014) Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal* 2014: 1-19.
- Smith SE, Read DJ** (2010) *Mycorrhizal symbiosis* (Access Online via Elsevier).
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP** (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35(1): 235-270.
- Spann T, Schumann A** (2010) Mineral nutrition contributes to plant disease and pest resistance. One of a series of the Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida 2(27): 1-4.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux J** (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35(1): 235-270.
- Baker R** (1968) Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 6(1): 263-294.
- Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F** (2002) Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry* 303(1): 95-98.
- Hong JK, Hwang BK** (2005) Functional characterization of PR-1 protein, *b-1*, *3-glucanase* and *chitinase* genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annum*. *Plant Pathology Journal* 21: 195-206.
- van Loon L, 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(2): 85-97.
- Van Loon L, Rep M, Pieterse C** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Wu S, Cao Z, Li Z, Cheung K, Wong M** (2005) Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125(1): 155-166.
- Zhang P, Ao Y** (2010) Application of highly effective bio-fertilizer to head lettuce cultivation in spring. *Acta Agriculturae Shanghai* 4(26): 109-112.

Effect of bio-fertilizers on greenhouse cucumber resistant to damping-off disease caused by *Pythium aphanidermatum* and increase of yield component

Seyed Kazem Sabbagh^{1*} and Shahoo Valizadeh²

1. Associate Professor, Plant Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Iran
2. Former M.Sc. Student, Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran

(Received: Feb. 9, 2016 -Accepted: Apr. 20, 2016)

ABSTRACT

Damping-off disease of cucumber caused by soil-born fungi *Pythium aphanidermatum* is one of the most destructive diseases of cucumber. In this research, the effect of three bio-fertilizers including; nitroxin, mycorrhiza and vermicompost in single and combined form on induced resistance and yield components in greenhouse cucumber (ES-2862) infected with damping-off disease was investigated. These experiments were performed in a completely randomized design with four repetitions in greenhouse condition. The measurement of disease severity showed that V+N+M (37%) and vermicompost + nitroxin (73%) treatment have the highest and the lowest effects on disease severity reduction, respectively. The mixed treatment of three bio-fertilizers has the best effect on increase of yield components when compared to control. The application of mycorrhiza alone showed the lowest effect on majority of traits. Gene expression analysis of *Cupi4* and *Chitinase* genes by qRT-PCR showed that expression level of two genes has been affected by bio-fertilizers treatment. For *Cupi4* gene (23.65), combination of three bio-fertilizers and for *chitinase* gene (2.45), mycorrhizal treatment showed the highest effect of expression pattern. Regarding the results, it can be concluded that these bio-fertilizers could be use as bio-control agents to plant improving against pathogenic fungal agents.

Keywords: Bio-fertilizers, chitinas, cucumber damping-off, gene expression, induced resistant.