



Potential of biological control of cucumber powdery mildew through induction of phenolic compounds by microbial formulations of *Bacillus subtilis* B2 and *Trichoderma harzianum* K18

Lachin Mokhtarnejad¹ , Shahram Naeimi² , Mohsen Farzaneh³ 

1. Department of biological control, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. L.mokhtarnejad@gmail.com
2. Department of biological control, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. E-mail: shnaeimi@yahoo.com
3. Corresponding Author, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran, Iran. E-mail: m_ farzaneh60@yahoo.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	Cucumber powdery mildew (<i>Podosphaera xanthii</i>), as one of the most destructive threats to cucumber, has challenged chemical control due to the emergence of fungal resistance. Biological control agents serve as an environmentally friendly alternative and are effective in disease suppression through various mechanisms, including the enhancement of phenolic compound production. Two biocontrol formulations, <i>Bacillus subtilis</i> B2 and <i>Trichoderma harzianum</i> K18, and the fungicide Domark, reduced disease severity in the greenhouse to 30.84%, 39.16%, and 31.49%, respectively. The biochemical assessment of phenolic compounds through spectrophotometric techniques and high-performance liquid chromatography (HPLC) revealed notable variations among treatments: The total phenol content in healthy control plants ranged from 30.33 to 37.7 mg per 100 g of dry weight and increased by 103.7% after 48 hours post- infection, while reaching 159.12%, 129.18%, and 142.98% in the B2, K18, and Domark treatments, respectively. Additionally, total flavonoids exhibited increases of 373.5% and 389.2% due to the effects of B2 and K18, respectively. The HPLC analysis identified seven phenolic compounds. Caffeic acid, which had a baseline concentration of 23 mg/100g DW, demonstrated a significant increase of 154% under K18 treatment. Additionally, ferulic acid (205%), rutin (103%), and rosmarinic acid (145%) displayed the most substantial increases when K18 was present. Moreover, rutin exhibited a negative correlation with disease severity. It seems the deliberate induction of phenolic compounds, such as caffeic acid and rutin – likely accomplished through the activation of resistance pathways and the induction of defense gene expression – proves to be effective in suppressing disease.
Article history: Received: 7 July 2025 Revised: 25 July 2025 Accepted: 31 July 2025 Published online: Autumn and Winter 2024	
Keywords: <i>Cucumber powdery mildew</i> , <i>Microbial formulations</i> , <i>Phenolic compounds</i> , <i>Defense mechanism</i> .	

Cite this article: Mokhtarnejad, L., Naeimi, Sh. & Farzaneh, M. (2024). Potential of biological control of cucumber powdery mildew through induction of phenolic compounds by microbial formulations of *Bacillus subtilis* B2 and *Trichoderma harzianum* K18. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 55 (2), 275-281. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.396550.1007084>



© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.396550.1007084>

Extended Abstract

Introduction

Powdery mildew disease of cucumber caused by the fungus *Podosphaera xanthii* is one of the most important yield-limiting diseases of cucurbit crops all of the world, causing yield losses of 20-40%. Challenges with chemical control, particularly fungal resistance development, highlight the need for safe, sustainable alternatives like biological control agents (BCAs). *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* are key BCAs known to boost plant disease resistance by inducing phenolic compounds and activating plant defense pathways. The primary objective of this study was to investigate the changes in total phenol and flavonoid contents as well as specific phenolic compounds in *P. xanthii*-infected cucumber leaves treated with two BCAs (*B. subtilis* B2, *T. harzianum* K18) versus the chemical fungicide Domark. This research specifically aimed to evaluate the role of induced phenolic compound production as a key mechanism of these biological agents in controlling cucumber powdery mildew.

Materials and methods

This study examined changes in phenolic compounds in cucumber leaves infected with *P. xanthii* under the influence of two microbial formulations (*B. subtilis* B2 and *T. harzianum* K18) and the chemical fungicide Domark. Experiments were conducted in a factorial design in greenhouses in West Azerbaijan province. At the 3-4 leaf stage (fifth week), plants were treated by foliar spraying with microbial formulations at 2% concentration. Domark fungicide at 0.4% concentration and sterile distilled water were used as controls. Twenty-four hours post-treatment, pathogen inoculation was performed using a spore suspension. Each treatment had three replicates, with each replicate consisting of ten cucumber plants of the relatively susceptible cultivar "Nagin." At 24, 48, and 72 hours after infection, total phenol content was assayed using the Folin-Ciocalteu method, and total flavonoids were measured via the aluminum chloride method. Identification and quantification of seven specific phenolic compounds were performed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Disease symptoms were periodically assessed, and the disease severity index (DSI) was evaluated after 10 days using the Horsfall-Barratt 1-12 scale, with percent disease index (PDI) calculated. Data were analyzed using one-way ANOVA and LSD mean comparison test at 1% and 5% probability levels. Correlation between phenolic compound concentrations and disease severity was examined using Pearson's correlation coefficient and linear regression.

Results and Discussion

Phenolic compound dynamics revealed the peak defensive response at 48 hours post-infection. *B. subtilis* B2 induced a 159% increase in total phenols and a 373% increase in total flavonoids. *T. harzianum* K18 showed a 129% increase in total phenols and 389% in flavonoids, with effects persisting until 72 hours. Caffeic acid was identified as the predominant phenolic compound in cucumber leaves, increasing by 154% under *T. harzianum* treatment. Rutin and ferulic acid increased by 103% and 205%, respectively, in the presence of *T. harzianum*. A strong negative correlation was observed between rutin concentration and disease severity. Disease suppression results indicated that *B. subtilis* B2 reduced disease severity by 30.84% (comparable to Domark fungicide), while *T. harzianum* K18 achieved a 39.16% reduction. Findings demonstrate that the two biocontrol agents, *B. subtilis* strain B2 and *T. harzianum* strain K18, induce significant accumulation of phenolic compounds during the critical plant response period (48 hours post-infection). These compounds contribute to disease control through multiple mechanisms: Rutin plays a pivotal role by neutralizing oxidative stress-derived free radicals and reinforcing cell walls, evidenced by its strong negative correlation with disease severity. Caffeic acid acts as a lignin precursor and inhibits key pathogen enzymes like cellulase and pectinase. Ferulic acid, with a 205% under *Trichoderma*, enhances lignification and cell wall fortification. Rosmarinic acid contributes through potent antioxidant and antimicrobial properties.

Conclusion

The results confirm the effectiveness of both biocontrol formulations in controlling cucumber powdery mildew through induced systemic resistance and increased production of essential defensive phenolics (notably rutin and caffeic acid). To achieve synergistic advantages, it is advisable to combine *B. subtilis* B2 (which induces stable flavonoids) with *T. harzianum* K18 (which induces wall-strengthening phenolic acids) as an immediate strategy. Future research should concentrate on: 1) Investigating the synergy between these agents under field conditions, 2) Assessing the expression of critical defense pathway genes (such as PAL), 3) Implementing large-scale field trials, and 4) Refining formulations. This strategy signifies a crucial step towards the development of sustainable methods for managing greenhouse crop diseases in Iran.



پتانسیل کنترل بیولوژیک سفیدک پودری خیار به واسطه القای ترکیبات فنلی توسط *Trichoderma harzianum* K18 و *Bacillus subtilis* B2 فرمولاسیون های میکروبی

لاچین مختارنژاد^۱ | شهرام نعیمی^۲ | محسن فرزانه^۳ ✉

۱. بخش کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: abcdef@ut.ac.ir
۲. بخش کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: shnaeimi@yahoo.com
۳. نویسنده مسئول، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران. رایانامه: m_farzaneh60@sbu.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۶ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۵/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۹ تاریخ انتشار: پاییز و زمستان ۱۴۰۳ کلیدواژه ها: سفیدک پودری خیار، فرمولاسیون های میکروبی، ترکیبات فنلی، مکانیسم دفاعی.	سفیدک پودری خیار (<i>Podosphaera xanthii</i>) به عنوان یکی از مخرب ترین تهدیدات خسارتزای خیار، کنترل شیمیایی را به دلیل بروز مقاومت قارچ عامل بیماری، با چالش مواجه کرده است. عوامل کنترل بیولوژیک به عنوان جایگزینی سازگار با محیط زیست از طریق مکانیسم های مختلف، از جمله افزایش تولید ترکیبات فنلی، در مهار بیماری مؤثر هستند. در این پژوهش دو فرمولاسیون بیوکنترلی <i>Bacillus subtilis</i> B2 و <i>Trichoderma harzianum</i> K18 و قارچ کش دوماک به ترتیب شدت بیماری را به ۳۰/۸۴٪، ۳۹/۱۶٪ و ۳۱/۴۹٪ در گلخانه کاهش دادند. ارزیابی بیوشیمیایی ترکیبات فنلی با روش های اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اختلاف معنی دار بین تیمارها را تأیید کرد: محتوای فنل کل در گیاهان شاهد سالم ۳۰/۳۳ تا ۳۷/۷ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم وزن خشک بود که ۴۸ ساعت پس از آلودگی (اوج پاسخ) ۱۰۳/۷٪ افزایش یافت و در تیمارهای B2، K18 و دوماک، به ترتیب به ۱۵۹/۱۲٪، ۱۲۹/۱۸٪ و ۱۴۲/۹۸٪ رسید. فلاونوئید کل نیز تحت تأثیر B2 و K18 به ترتیب ۳۷۳/۵٪ و ۳۸۹/۲٪ افزایش نشان داد. آنالیز HPLC در زمان اوج پاسخ، شناسایی هفت ترکیب فنلی را ممکن ساخت که کافئیک اسید (غلظت پایه: ۲۳ میلی گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک) و افزایش ۱۵۴٪ تحت K18 برجسته بود. فرولیک اسید (۲۰۵٪)، روتین (۱۰۳٪) و رزمارینیک اسید (۱۴۵٪) بیشترین افزایش را در حضور K18 داشت، ضمن آنکه روتین همبستگی منفی با شدت بیماری نشان داد. به نظر می رسد القای هدفمند ترکیبات فنلی از جمله کافئیک اسید و روتین که به احتمال از مجرای فعال سازی مسیرهای مقاومت و القای بیان ژن های دفاعی محقق می شود در مهار بیماری مؤثر است.

استناد: مختارنژاد، لاچین؛ نعیمی، شهرام و فرزانه، محسن (۱۴۰۳). پتانسیل کنترل بیولوژیک سفیدک پودری خیار به واسطه القای ترکیبات فنلی توسط فرمولاسیون های میکروبی *Bacillus subtilis* B2 و *Trichoderma harzianum* K18. نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، ۵۵ (۲)، ۲۷۵-۲۸۹. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.396550.1007084>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.396550.1007084>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

سفیدک پودری با عامل قارچ *Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun یکی از مهم‌ترین بیماری‌های محدودکننده تولید محصولات سبزی و صیفی، به‌ویژه گیاهان خانواده کدوئیان مانند خیار، در سطح جهان و ایران محسوب می‌شود. حساسیت بالای ارقام رایج خیار به این بیماری، خسارت قابل توجهی را به‌بار می‌آورد. در صورت وقوع آلودگی شدید قبل از مرحله گلدهی، کاهش عملکرد تا ۲۰-۴۰ درصد در اثر اختلال در فتوسنتز، کمبود مواد مغذی، افزایش تنفس و تعریق و رشد ناقص گیاه گزارش شده است (Rur et al., 2018). مدیریت این بیماری همواره بر پایه سم‌پاشی‌های مکرر با قارچ‌کش‌ها استوار بوده که این امر به‌نوبه خود منجر به بروز و گسترش مقاومت در جمعیت‌های قارچ عامل بیماری، به‌طور خاص نسبت به قارچ‌کش‌های پرکاربردی مانند استرویلورین‌ها (مثل آزوکسی‌استروبین) شده است (McGrath & Shishkoff, 2003). این چالش، لزوم یافتن راهکارهای جایگزین، ایمن، پایدار و سازگار با محیط‌زیست مانند کنترل بیولوژیک را بیش از پیش ضروری ساخته است. عوامل کنترل بیولوژیک از طریق سازوکارهای مستقیم و غیرمستقیم به مهار بیمارگرها می‌پردازند. سازوکارهای مستقیم شامل رقابت (بر سر فضا و مواد غذایی)، پارازیتسم، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده (مانند کیتیناز، گلوکاناز، پروتئاز) و تولید متابولیت‌های ضد میکروبی (آنتی‌بیوزیس) می‌شود. سازوکارهای غیرمستقیم عمدتاً مبتنی بر القای مقاومت سیستمیک (Induced Systemic Resistance - ISR) در گیاه میزبان هستند (Sun et al., 2022; Manafi et al., 2014; Mirzaei et al., 2022; Jetiyanon et al., 2003).

القای مقاومت منجر به فعال‌سازی مسیرهای دفاعی گیاه و افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌گردد. افزایش سنتز و تجمع ترکیبات فنلی یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های دفاعی گیاهان در برابر بیمارگرهاست. این ترکیبات (شامل فنل‌های ساده، اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها و ...) نقش حیاتی در فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه از جمله مقاومت به تنش‌های زیستی (بیمارگرها) و غیرزیستی ایفا می‌کنند (Lattanzio et al., 2006). آن‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم از طریق خاصیت ضد میکروبی یا به‌طور غیرمستقیم با تقویت دیواره سلولی (مانند لیگنین‌سازی) و یا به‌عنوان سیگنال در مسیرهای دفاعی عمل کنند.

پیشینه پژوهش

کنترل بیولوژیک به‌عنوان یکی از روش‌های بهینه و سازگار با محیط‌زیست در مدیریت بیماری‌های گیاهی، خطرات ناشی از مصرف سموم شیمیایی را کاهش می‌دهد. در این زمینه، باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست پتانسیل بالایی از خود نشان داده‌اند. گزارش‌ها حاکی از بین رفتن هاگ‌های سفیدک پودری خیار در اثر کاربرد *Bacillus subtilis* می‌باشد (Wu et al., 2025). همچنین، کاربرد *Trichoderma harzianum* تأثیر قابل توجهی در کنترل *Podosphaera xanthii* داشته است (Hafez et al., 2018). گونه‌های *Trichoderma* به‌دلیل ایمنی، هزینه کم، کارایی و سازگاری با محیط‌زیست، گزینه‌های مناسبی برای کنترل بیماری‌ها محسوب می‌شوند (Yao et al., 2023).

میکروارگانیزم‌های مفید، از جمله باکتری‌های ریزوسفری مانند *Bacillus* spp. و *Pseudomonas fluorescens* و قارچ‌های اندوفیت و آنتاگونیست مانند *Trichoderma* spp. می‌توانند تولید ترکیبات فنلی را در گیاهان میزبان تحریک کنند. این تحریک عمدتاً از مجرای فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ دفاعی گیاه، به‌ویژه مسیرهای وابسته به اسید سالیسیلیک (SA) و اسید جاسمونیک (JA) صورت می‌گیرد (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Harman et al., 2004). مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) و پدیده پرایمینگ به‌عنوان مکانیسم‌های کلیدی دفاع گیاه در برابر بیمارگرها شناخته می‌شوند و پژوهش‌های نوین نشان می‌دهند عوامل بیوکنترلی مانند *Bacillus* و *Trichoderma* با القای وضعیت پرایم در گیاهان، پاسخ‌های دفاعی سیستمیک (از جمله فعال‌سازی مسیر-1 NPR SA) را تقویت کرده و مقاومت به بیماری‌هایی مانند سفیدک پودری را افزایش می‌دهند (Klessig et al., 2018).

ترکیبات فنلی به شدت در برهمکنش گیاه-بیمارگر نقش داشته و ممکن است گسترش بیمارگر را محدود نمایند (Vermeers & Nicholson, 2007). برای مثال، اسید کلروژنیک به عنوان یک ترکیب فنلی مهم، از بافت های گیاهی در برابر تنش اکسیداتیو و عوامل بیماری زا محافظت می کند (Telles et al., 2017).

با توجه به اهمیت بیماری سفیدک پودری خیار، چالش های ناشی از مصرف قارچ کش های شیمیایی و پتانسیل بالای کنترل بیولوژیک و نقش ترکیبات فنلی در مقاومت گیاه، هدف اصلی این پژوهش بررسی تغییرات کمی (فنل کل و فلاونوئید کل) و کیفی (ترکیبات فنلی خاص) در گیاهان خیار آلوده به *P. xanthii* تحت تأثیر تیمار با دو عامل بیوکنترل برتر *B. subtilis* B2 و *T. harzianum* K18 بود. این مطالعه به دنبال ارزیابی نقش القای تولید ترکیبات فنلی به عنوان یکی از سازوکارهای مهم این عوامل بیولوژیک در کنترل بیماری سفیدک پودری خیار می باشد.

روش شناسی پژوهش

تهیه فرمولاسیون های میکروبی

دو فرمولاسیون میکروبی که طبق آزمایشات قبلی برای کنترل سفیدک پودری خیار در شرایط گلخانه موثر بودند، از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور دریافت شد.

بررسی گلخانه ای

تهیه زادمایه بیمارگر

به طور خلاصه در این روش از بوته های خیار آلوده به قارچ *P. xanthii* واقع در گلخانه های تجاری، برگ هایی را که به تازگی آلوده شده و حامل اسپورهای قارچ بیمارگر بودند جدا گردید. قطعاتی از این برگ ها درون آب مقطرسترون حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ غوطه ور گردید و سپس با استفاده از لام هماسیتومتر (Haemocytometer) تعداد اسپور در واحد حجم سوسپانسیون شمارش و روی ۱۰^۵ اسپور در میلی لیتر تنظیم شد (Kamel, 2003).

بررسی کارایی فرمولاسیون ها در مهار سفیدک پودری خیار

آزمایش ارزیابی کارایی فرمولاسیون ها به صورت طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. هر تکرار شامل ده عدد گلدان سطلی شماره ۱۰ به ابعاد ۲۸ در ۲۲/۵ سانتی متر (ده واحد آزمایشی یا بوته) بود. تیمارهای آزمایشی در شش سطح شامل فرمولاسیون حاوی باکتری، فرمولاسیون حاوی قارچ، دو فرمولاسیون پایه بدون عامل کنترل بیولوژیک، قارچ کش دوماک و شاهد در نظر گرفته شد. اندازه گیری های مربوط به ارزیابی کارایی در سه زمان مختلف یعنی روز پنجم، روز دهم و روز بیستم پس از اعمال تیمارها انجام گرفت. به طور خلاصه، در هفته پنجم (سه تا چهار برگی) بوته ها با غلظت دو در هزار فرمولاسیون حاوی قارچ تریکودرما و فرمولاسیون حاوی باکتری *B. subtilis* تیمار شدند. سوسپانسیون های تهیه شده از فرمولاسیون ها، روی سطح بالا و زیر برگ ها محلول پاشی گردید. از قارچ کش دوماک شرکت ایزاگرو (حاوی تتراکونازول ۱۰٪ EC) به نسبت ۰/۴ در هزار و آب مقطرسترون به عنوان تیمارهای شاهد استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت، تلقیح بیمارگر در شرایط گلخانه به روش جمالی زواره و همکاران (۱۳۸۳) و با سوسپانسیون اسپورهای تازه *P. xanthii* (۱۰^۵ اسپور در میلی لیتر) انجام گردید (Kamel, 2003). بلافاصله پس از تهیه سوسپانسیون بیمارگر، با استفاده از یک محلول پاش روی برگ های مورد نظر پاشیده شد در حدی که سطح برگ خیس شود اما جاری نگردد. بوته های مایه زنی شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۲ درجه سلسیوس، در شرایط تاریکی در زیر پوشش پلاستیکی مشکی و رطوبت بالای ۹۰ درصد نگهداری و سپس به شرایط عادی گلخانه (دمای ۲۲-۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت ۵۰-۷۰ درصد) بازگردانده شدند (El-Sharkaway et al., 2014). در زمان های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه زنی، میزان محتوای فنل کل و فلاونوئید کل و پس از ۴۸ ساعت، میزان و نوع ترکیبات فنلی برگ

بوته‌های هر تیمار بررسی شد (به قسمت‌های بعدی مراجعه شود). گیاهان به‌صورت دوره‌ای از نظر علائم ظاهری مورد بررسی قرار گرفته و میانگین شدت بیماری براساس شاخص شدت بیماری با استفاده از مقیاس ۱-۱۲ به روش هورسفال و بارت (۱۹۵۴) پس از ۱۰ روز محاسبه شد.

شدت بیماری با استفاده از فرمول زیر تعیین شد:

$$PDI = \left(\frac{\sum SDI \times DI}{MDI \times N} \right) \times 100$$

که در آن PDI، شدت بیماری؛ SDI، تعداد نمونه‌های با درجه آلودگی مشابه؛ DI، درجه بیماری مربوط به هر نمونه؛ MDI، حداکثر درجه آلودگی و N، تعداد کل نمونه مربوط به هر تکرار می باشد.

استخراج ترکیبات فنلی گیاه

استخراج ترکیبات فنلی مطابق با روش استاندارد Sharma و همکاران (۲۰۱۹) با کمی تغییر انجام پذیرفت. در این روش، ابتدا ۰/۵ گرم از پودر برگ در حضور ۵ میلی‌لیتر متانول، در دستگاه سونیک به مدت ۴۰ دقیقه به‌طور کامل همگن‌سازی شد. حلال متانولی با استفاده از دستگاه اواپراتور روتاری (مدل Heidolph، آلمان) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تبخیر شد. عصاره خشک شده در دو میلی‌لیتر متانول خالص حل شد. محلول رویی شفاف به کمک فیلتر ممبران ۰/۴۵ میکرومتر (شرکت Millipore، آمریکا) صاف شد. محلول نهایی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام سنجش‌ها نگهداری گردید.

سنجش کمی فنل و فلاونوئید کل

اندازه‌گیری فنل کل به روش فولین-سیوکالتیو انجام شد (Waterman & Mole, 1994). در این پروتکل، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتیو رقیق شده (۱۰٪) و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷/۵ درصد مخلوط گردید. مخلوط واکنش پس از ۲ ساعت آنکوباسیون در تاریکی، در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر-UV Vis (مدل Shimadzu 1800، ژاپن) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. غلظت فنل کل بر اساس منحنی استاندارد اسید گالیک (۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) محاسبه و نتایج به صورت میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم وزن خشک نمونه (mg GAE/g DW) گزارش شد.

سنجش فلاونوئید کل با استفاده از روش کلرید آلومینیوم صورت پذیرفت (Zhishen et al., 1999). در این آزمون، ۵۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد کلرید آلومینیوم (AlCl₃) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱ مولار استات پتاسیم مخلوط گردید. پس از ۳۰ دقیقه آنکوباسیون در دمای اتاق، جذب نوری مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. غلظت فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین (۰ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) محاسبه و به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم وزن خشک نمونه (mg QE/g DW) بیان گردید.

آنالیز ترکیبات فنلی خاص با HPLC

شناسایی و کمی‌سازی ترکیبات فنلی خاص شامل اسیدهای فنلی (۳و۴-دی‌هیدروکسی‌بوتیریک اسید، کافئیک اسید، پارا-کوماریک اسید، فرولیک اسید، رزمارینیک اسید) و فلاونوئید روتین با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مدل Waters 2695، مجهز به دتکتور DAD (Waters 996) انجام شد. جداسازی بر روی ستون C18 (ابعاد ۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر، اندازه ذرات ۵ میکرومتر، شرکت Waters، آمریکا) صورت گرفت. فاز متحرک شامل حلال A (آب دیونیزه حاوی ۰/۲ درصد اسید استیک) و حلال B (متانول خالص) بود که با برنامه‌گردان خطی مطابق با روش توان و همکاران (Tavan et al. 2022) اجرا شد. دبی جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و طول موج‌های تشخیص بین ۲۱۸ نانومتر تا ۴۰۰ نانومتر تنظیم گردید. شناسایی ترکیبات بر اساس تطابق زمان بازداری و طیف‌های UV آن‌ها با استانداردهای خالص (تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich) انجام شد و غلظت هر ترکیب بر اساس منحنی کالیبراسیون استانداردهای

مربوطه (۵ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) محاسبه و به صورت میکروگرم در گرم وزن خشک نمونه ($\mu\text{g/g DW}$) گزارش شد (Telles et al., 2017).

بررسی همبستگی بین ترکیبات فنلی و کنترل بیماری

به منظور بررسی ارتباط بین غلظت ترکیبات فنلی القا شده و کاهش شدت بیماری سفیدک پودری، از تحلیل های آماری ضریب همبستگی پیرسون و رگرسیون خطی ساده استفاده شد. متغیر مستقل در این تحلیل ها، غلظت ترکیبات فنلی (شامل فنل کل، فلاونوئید کل و شش ترکیب فنلی خاص شامل روتین، کافئیک اسید، پارا-کوماریک اسید، فرولیک اسید، رزمارینیک اسید و ۳-۴ دی هیدروکسی بوتیریک اسید) بر حسب میکروگرم بر گرم وزن خشک ($\mu\text{g/g DW}$) و متغیر وابسته، شاخص شدت بیماری (PDI) بر مبنای مقیاس استاندارد ۱-۱۲ به روش هورسفال و بارت (۱۹۵۴) بود. محاسبه ضریب همبستگی پیرسون (r^2) به منظور سنجش قدرت و جهت رابطه خطی بین هر ترکیب فنلی و PDI انجام پذیرفت (Littell et al., 2006).

تحلیل آماری

داده های حاصل از تمامی سنجش ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹.۴ (SAS Institute, USA) مورد تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) قرار گرفتند. مقایسه میانگین های تیمارها در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد با آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) انجام شد (Steel et al., 1997).

یافته های پژوهشی

دینامیک تغییرات محتوای فنل کل گیاه خیار در پاسخ به عوامل بیوکنترلی و بیمارگر

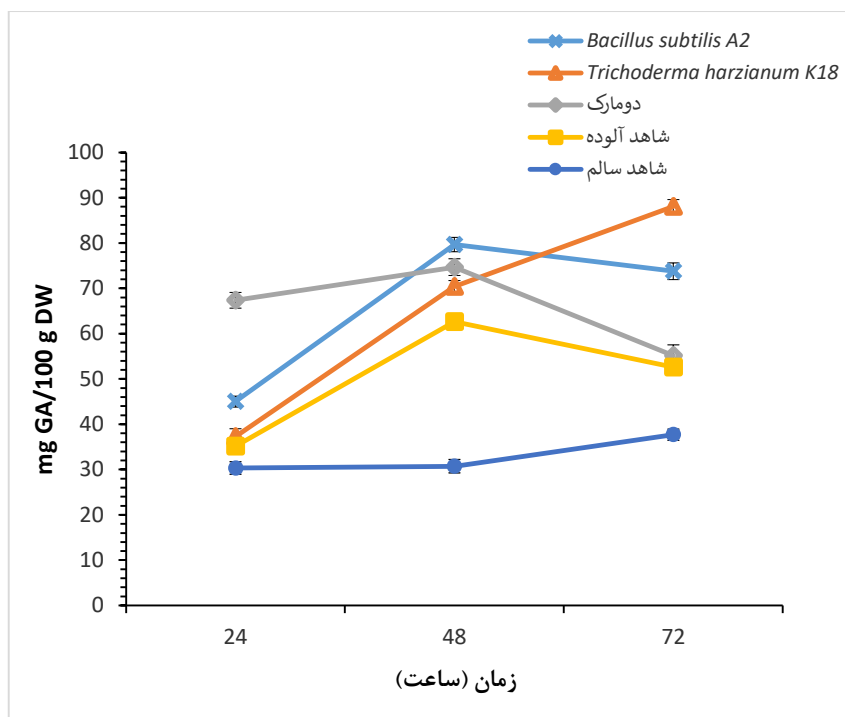
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها (جدول ۱) نشان دهنده تأثیر معنی دار تیمارها بر محتوای فنل کل برگ ها در سطح احتمال ۱٪ بود. براساس نتایج مقایسه میانگین (شکل ۱) میزان فنل کل تیمار شاهد سالم بین ۳۰/۳۳ تا ۳۷/۷ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک برگ می باشد. پس از ۲۴ ساعت مایه زنی با بیمارگر، افزایش ۱۵/۸ درصدی محتوای فنل کل نسبت به شاهد سالم ثبت شد و کاربرد عوامل بیوکنترلی و قارچ کش دومارک این روند را تشدید نمود، به طوری که تیمار *B. subtilis* B2 افزایش ۴۸/۴ درصدی، *T. harzianum* K18 افزایش ۲۲/۸۸ درصدی و قارچ کش دومارک افزایش چشمگیر ۱۲۲/۱۲ درصدی را نسبت به شاهد سالم نشان دادند. در نقطه اوج پاسخ گیاه (۴۸ ساعت پس از آلودگی)، غلظت فنل کل در شاهد آلوده ۱۰۳/۷ درصد نسبت به شاهد سالم افزایش یافت. در حضور باکتری *B. subtilis* B2، قارچ *T. harzianum* K18 و قارچ کش دومارک این افزایش به ترتیب برابر با ۱۵۹/۱۲، ۱۲۹/۱۸ و ۱۴۲/۹۸ درصد بود. ۷۲ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر، افزایش ۳۹/۵ درصدی محتوای فنل کل در مقایسه با تیمار شاهد سالم مشاهده شد و حضور باکتری *B. subtilis* B2، قارچ *T. harzianum* K18 و قارچ کش دومارک به ترتیب باعث افزایش ۹۵/۶۷، ۱۳۳/۵۸ و ۴۶/۲۳ درصدی فنل در بوته های مایه زنی شده با بیمارگر در مقایسه با شاهد سالم شد. به عبارت دیگر محتوای فنل کل در تیمارهای *B. Subtilis* B2 و دومارک به ترتیب ۲۸/۷ درصد و ۳۷/۳ درصد نسبت به زمان ۴۸ ساعت کاهش یافت، در حالی که در تیمار *T. harzianum* K18 کاهش معنی داری مشاهده نشد.

پس از ۴۸ ساعت از مایه زنی با بیمارگر، بیشترین محتوای فنل کل در برگ مشاهده شد و با افزایش زمان به ۷۲ ساعت، محتوای فنل کل بوته آلوده در تیمارهای *B. subtilis* B2 و قارچ کش دومارک روند کاهشی پیدا کرد در حالیکه در تیمار قارچ *T. harzianum* K18 کاهش معنی داری مشاهده نشد.

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر دو فرمولاسیون میکروبی باکتری *Bacillus subtilis* B2 و قارچ *Trichoderma harzianum* K18 و قارچ کش دوماک روی میزان فنل کل برگ گیاه خیار مایه‌زنی شده با بیمارگر *Podosphaera xanthii* طی نگهداری به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در گلخانه.

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)
تیمار	۱۴	۱۱۶۵/۳۱۷**
خطای آزمایشی	۳۰	۰/۴۱۸

** نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۱ درصد



شکل ۱. مقایسه میانگین دو فرمولاسیون میکروبی باکتری *Bacillus subtilis* B2 و قارچ *Trichoderma harzianum* K18 و قارچ کش دوماک روی میزان فنل کل برگ گیاه خیار مایه‌زنی شده با بیمارگر *Podosphaera xanthii* طی نگهداری به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در گلخانه. میله خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) می‌باشد.

تغییرات محتوای فلاونوئیدهای کل گیاه در پاسخ به عوامل بیوکنترلی و بیمارگر

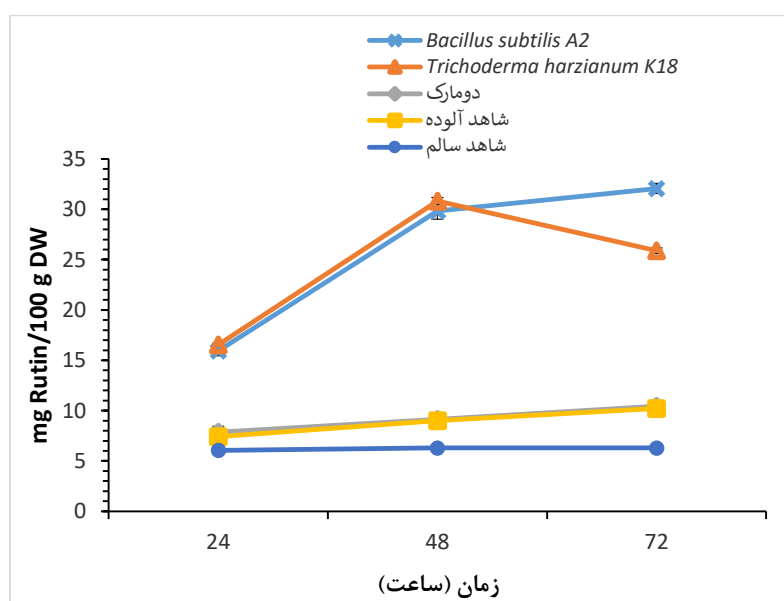
براساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، بین تیمارها از نظر محتوای فلاونوئید کل تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود. براساس نتایج مقایسه میانگین (شکل ۲) میزان فلاونوئید کل تیمار شاهد سالم بین ۶/۰۵ تا ۶/۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک برگ می‌باشد. غلظت فلاونوئیدها در شاهد آلوده ۲۲/۸ درصد نسبت به شاهد سالم افزایش یافت. تیمار *T. harzianum* K18 با افزایش ۱۷۳/۲ درصدی مؤثرترین عامل بود، در حالی که دوماک تنها ۳۰ درصد افزایش ایجاد نمود. پس از ۴۸ ساعت مایه‌زنی با بیمارگر، افزایش ۴۲/۸ درصدی محتوای فلاونوئید کل در مقایسه با تیمار شاهد سالم مشاهده شد و در حضور باکتری *B. subtilis* B2 و قارچ *T. harzianum* K18 این افزایش به ترتیب برابر با ۳۷۳/۵ و ۳۸۹/۲ درصد بود در حالیکه در تیمار قارچ کش دوماک افزایش معنی‌داری مشاهده نشد. پس از ۷۲ ساعت مایه‌زنی با بیمارگر، افزایش ۶۲/۲ درصدی محتوای فلاونوئید کل در مقایسه با تیمار شاهد سالم مشاهده شد و حضور باکتری *B. subtilis* B2 و قارچ *T. harzianum* K18 به ترتیب باعث افزایش ۴۰۹ و ۳۱۰/۸ درصدی فلاونوئید کل در بوته‌های مایه‌زنی شده با بیمارگر در

مقایسه با شاهد سالم شد اما بین قارچ کش دومارک و تیمار شاهد آلوده تفاوت معنی داری مشاهده نشد. بطور کلی ۴۸ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر، بیشترین محتوای فلاونوئید کل در برگ مشاهده شد و با افزایش زمان به ۷۲ ساعت، محتوای فلاونوئید کل بوته آلوده در تیمار قارچ *T. harzianum* K18 روند کاهشی پیدا کرد درحالیکه در تیمار باکتری *B. subtilis* B2 کاهش معنی داری مشاهده نشد.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر دو فرمولاسیون میکروبی باکتری *Bacillus subtilis* B2 و قارچ *Trichoderma harzianum* K18 و قارچ کش دومارک روی میزان فلاونوئید کل برگ گیاه خیار مایه زنی شده با بیمارگر *Podosphaera xanthii* طی نگهداری به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در گلخانه.

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)
تیمار	۱۴	۳۹۸۲/۲۵۵**
خطای آزمایشی	۳۰	۰/۱۹۸۳۱۳
کل تصحیح شده	۴۴	

** نشان دهنده معنی داری در سطح ۱ درصد



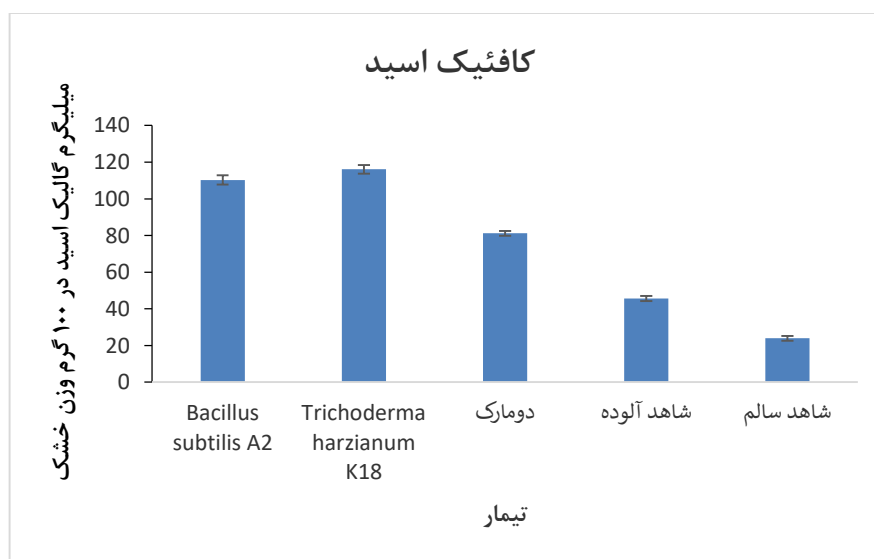
شکل ۲. مقایسه میانگین اثر باکتری *Bacillus subtilis* B2 و قارچ *Trichoderma harzianum* K18 و قارچ کش دومارک روی میزان فلاونوئید کل برگ گیاه خیار مایه زنی شده با بیمارگر *Podosphaera xanthii* طی نگهداری به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در گلخانه. میله خطا نشاندهنده خطای استاندارد (SE) می باشد.

پروفایل ترکیبات فنلی خاص برگ خیار در پاسخ به عوامل بیوکنترلی و بیمارگر

ردیابی ۱۸ ترکیب فنلی در برگ گیاهان تیمار شده با فرمولاسیون ترکیبات بیولوژیک و قارچ کش دومارک، ۴۸ ساعت بعد از مایه زنی با بیمارگر با کمک دستگاه HPLC انجام شد. هفت ترکیب ۴۳ دی هیدرو بوتیریک اسید، کافئیک اسید، پاراکوماریک اسید، فرولیک اسید، گالیک اسید، روتین و رزمارینیک اسید در برگ خیار قابل مشاهده بود. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که بین تیمارها از نظر میزان ترکیبات ۴۳ دی هیدرو بوتیریک اسید، کافئیک اسید، پاراکوماریک اسید، فرولیک اسید، روتین و رزمارینیک اسید در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی داری وجود دارد. تنها گالیک اسید تغییر معنی داری نشان نداد. بطور کلی ترکیب کافئیک اسید با ۲۳ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک برگ، عمده ترکیب فنلی برگ را شامل می شود. با توجه به نتایج مقایسه میانگین (شکل ۳)، ۴۸ ساعت بعد از مایه زنی با بیمارگر، افزایش ۹۰ درصدی در محتوای کافئیک اسید برگ مشاهده شد. قارچ *T. harzianum* K18 با افزایش ۱۵۴ درصدی مؤثرترین تیمار بود، در حالی که *B. Subtilis* B2 و دومارک به ترتیب ۱۴۱ درصد و ۷۷ درصد افزایش ایجاد کردند (شکل ۳).

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر دو فرمولاسیون میکروبی باکتری *Bacillus subtilis* B2 و قارچ *Trichoderma harzianum* K18 و قارچ کش دومارک روی محتویات ترکیبات فنلی برگ گیاه خیار رقم ناگین (نسبتاً حساس) مایه زنی شده با بیمارگر *Podosphaera xanthii* طی نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در گلخانه.

نام ترکیبات شناسایی شده	منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	ضریب تغییرات %
dihydroxy butyric acid 3,4	تیمار	۴	۰/۲۱۰۱۵**	
	خطای آزمایش	۱۰	۰/۳۳۷	۲/۷۷
	کل	۱۴	۲۱/۳۵۲	
Caffeic acid	تیمار	۴	۰/۱۹۳۲۴/۹۳**	
	خطای آزمایش	۱۰	۰/۹۶۴۱	۴/۶۰
	کل	۱۴	۱۹۴۲۱/۳۴	
ferulic acid	تیمار	۴	۰/۱۷/۱۷۱**	
	خطای آزمایش	۱۰	۰/۰۸۹	۷/۰۴
	کل	۱۴	۱۷/۲۶۰	
Gallic acid	تیمار	۴	۱۶۴۷/۷۴ ^{ns}	
	خطای آزمایش	۱۰	۲۴/۴۵	۳/۶۱
	کل	۱۴	۱۶۷۷/۴۵	
P-cumaric acid	تیمار	۴	۰/۹۰/۹۴**	
	خطای آزمایش	۱۰	۰/۴۸۸	۳/۴۹
	کل	۱۴	۹۱/۴۳۵	
Rozmarinic acid	تیمار	۴	۰/۶۰۰**	
	خطای آزمایش	۱۰	۰/۰۰۳	۳/۷۴
	کل	۱۴	۰/۶۰۳	
Rutin	تیمار	۴	۰/۲/۳۷**	
	خطای آزمایش	۱۰	۰/۰۱۴	۶/۸۱
	کل	۱۴	۲/۲۵۱	



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر دو فرمولاسیون میکروبی باکتری *Bacillus subtilis* B2 و قارچ *Trichoderma harzianum* K18 و قارچ کش دومارک روی مقدار کافئیک اسید برگ گیاه خیار مایه زنی شده با بیمارگر *Podosphaera xanthii* طی نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در گلخانه. میله خطا روی هر ستون نشاندهنده خطای استاندارد (SE) می‌باشد.

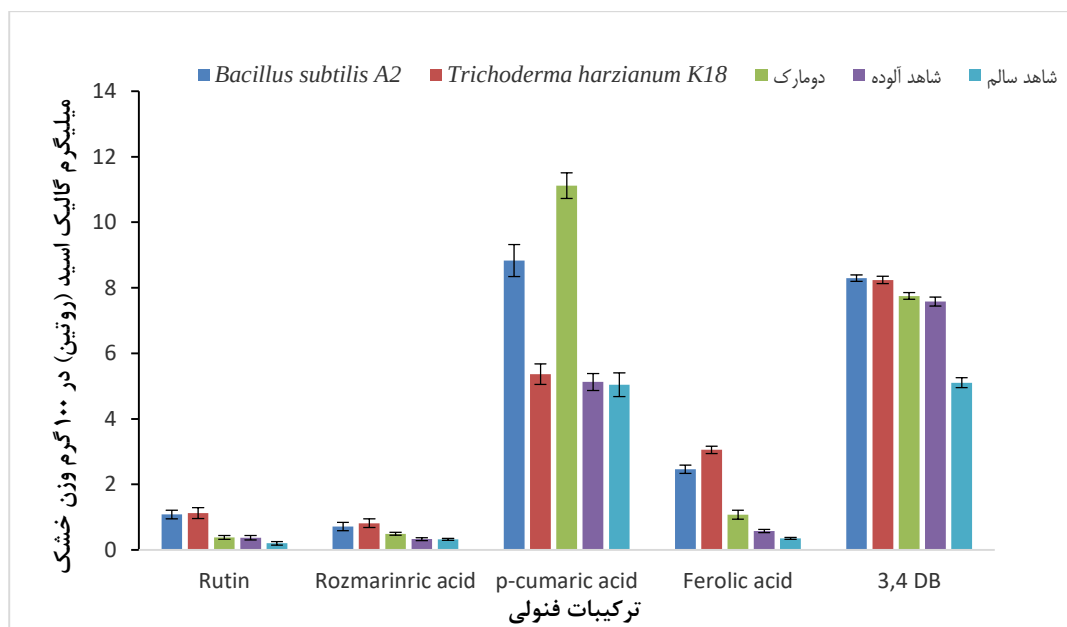
سایر ترکیبات فنلی قابل مشاهده در برگ شامل ترکیبات ۳ و ۴ دی هیدروکسی بوتیریک اسید (۵/۱ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک برگ)، پاراکوماریک اسید (۵/۰۳ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک برگ)، فرولیک اسید (۰/۳۵ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک برگ)، روتین (۰/۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک برگ) و رزمارینیک اسید (۰/۳۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک برگ) بود (شکل ۴).

بیشترین محتوای ۳ و ۴ دی هیدروکسی بوتیریک اسید (3,4 DB) در تیمارهای باکتری *B. subtilis* B2 و قارچ *T. harzianum* K18 مشاهده شد که به ترتیب باعث افزایش ۰/۰۹۳ و ۰/۰۸۶ برابری محتوای آن در مقایسه با شاهد آلوده شد. بین قارچ کش دوماک و شاهد آلوده تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

بالاترین محتوای پاراکوماریک اسید در تیمار با قارچ کش دوماک مشاهده شد که افزایش ۱/۱۷ برابری در مقایسه با شاهد آلوده نشان داد. تیمار با باکتری *B. subtilis* B2 نیز باعث افزایش قابل توجه پاراکوماریک اسید شد و افزایش ۰/۷۲ برابری در مقایسه با تیمار شاهد آلوده نشان داد. بین قارچ *T. harzianum* K18 با شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد. بیشترین محتوای فرولیک اسید در تیمار با قارچ تریکودرما دیده شد که از افزایش ۳/۰۵ برابری در مقایسه با تیمار شاهد آلوده برخوردار بود. تیمار با باکتری *B. subtilis* B2 نیز باعث افزایش ۲/۴۶ برابری فرولیک اسید برگ داشت و در مرتبه بعدی قرار گرفت. قارچ کش دوماک نیز باعث افزایش ۱/۰۷ برابری محتوای فرولیک اسید برگ شد.

از نظر محتوای روتین، در حضور قارچ *T. harzianum* K18 و باکتری *B. subtilis* B2 بالاترین محتوای روتین در برگ مشاهده شد که به ترتیب ۲/۰۳ و ۱/۹۱ برابر شاهد آلوده بود. بین قارچ کش دوماک و شاهد آلوده اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

بیشترین محتوای رزمارینیک اسید در تیمارهای با فرمولاسیون قارچ *T. harzianum* K18 و باکتری *B. subtilis* B2 مشاهده شد که به ترتیب باعث افزایش ۱/۴۵ و ۱/۱۷ برابری محتوای رزمارینیک اسید برگ در مقایسه با تیمار شاهد سالم شدند. تیمار با قارچ کش دوماک نیز باعث افزایش ۰/۴۸ برابری محتوای رزمارینیک اسید شد.



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر دو فرمولاسیون میکروبی باکتری *Bacillus subtilis* B2 و قارچ *Trichoderma harzianum* K18 و قارچ کش دوماک روی محتوای پنج ترکیب فنلی ۳ و ۴ دی هیدروکسی بوتیریک اسید (3,4 DB)، پاراکوماریک اسید، فرولیک اسید، روتین و رزمارینیک اسید برگ گیاه خیار مایه زنی شده با بیمارگر *Podosphaera xanthii* طی نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در گلخانه. میله خطا روی هر ستون نشاندهنده خطای استاندارد (SE) می باشد.

جدول ۳. وجود همبستگی (Pearson correlations) بین شدت بیماری و ترکیبات فنلی در میانکنش باکتری *Bacillus subtilis* B2 و قارچ *Trichoderma harzianum* K18 با گیاه خیار پس از مایه زنی با بیمارگر *Podosphaera xanthii* طی نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در گلخانه.

شاخص	روتین	رزمارینیک	پاراکوماریک	فرولیک اسید	۳ و ۴ دی-کافئیک اسید	فلاونوئید کل	فنل کل
	اسید	اسید	اسید	هیدروکسی بوتیریک اسید			
شدت	-۰/۸۷۷**	-۰/۷۹۸*	-۰/۸۴۲**	-۰/۷۸۰*	-۰/۷۵۸*	-۰/۸۶۷**	-۰/۹۹۰**
آلودگی							

**, همبستگی در سطح ۱ درصد

*, همبستگی در سطح ۵ درصد

بحث

سفیدک پودری خیار در محیط‌های گلخانه‌ای، تهدیدی جدی برای محصولات محسوب می‌شود و می‌تواند تا ۵۰٪ خسارت وارد کند (Martínez-Cruz et al., 2014). پژوهش حاضر نشان می‌دهد که فرمولاسیون‌های میکروبی *B. subtilis* B2 و *T. harzianum* K18 پس از آلودگی گیاهان، به‌طور معنی‌داری شدت بیماری را کاهش می‌دهند. در این میان، *B. subtilis* B2 با کاهش شدت بیماری به ۳۰/۸۴٪ مؤثرترین عامل کنترل بود و عملکردی مشابه قارچ کش شیمیایی دومارک (۳۱/۴۹٪) داشت. قارچ *T. harzianum* K18 نیز با کاهش بیماری به ۳۹/۱۶٪، گزینه‌ای امیدوارکننده برای جایگزینی سموم شیمیایی معرفی می‌شود.

پویایی ترکیبات فنلی نقش محوری در این مقاومت ایفا می‌کند (جدول ۳). افزایش قابل توجه فنل کل و فلاونوئید کل *B. subtilis* B2 و *T. harzianum* K18 در ۴۸ ساعت پس از آلودگی، نشان‌دهنده فعال‌سازی سریع مسیرهای دفاعی است. کافئیک اسید به‌عنوان غالب‌ترین ترکیب شناسایی‌شده، نقش مهمی ایفا می‌کند: به‌طور ویژه، افزایش ۱۵۴٪ کافئیک اسید تحت تأثیر *T. harzianum* K18 با مطالعات پیشین همسوست که این ترکیب را بازدارنده آنزیم‌های کلیدی بیمارگرها (مانند سلولاز و پکتیناز) می‌دانند (Mandal et al., 2010). همزمان، افزایش ۱۰۳٪ روتین و همبستگی منفی قوی آن با شدت بیماری، از کلیدی‌ترین ترکیبات دفاعی است که نقش آن را در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد به واسطه سیستم ردوکس فلاونولی و همچنین تقویت دیواره سلولی با اتصال به پروتئین‌های ساختاری برجسته می‌سازد (Agati et al., 2012).

از نظر مبانی ژنتیکی و بیوشیمیایی مقاومت، میکروارگانیسم‌های مفید با تنظیم مسیر فنیلپروپانوئید، بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌هایی مانند فنیل‌آلانیل آمونیا لایز (PAL) را القا می‌کنند (Li et al., 2025). این فرآیند منجر به تجمع ترکیبات فنلی می‌شود که از طریق چند سازوکار از گیاه محافظت می‌کنند. این سازوکارها شامل کاهش تنش اکسیداتیو از مجرای خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد توسط گروه‌های هیدروکسیل فنل‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در کاهش تنش اکسیداتیو است (Gill & Tuteja, 2010). فزون برای افزایش ترکیباتی مانند فرولیک اسید (با افزایش ۲۰۵٪ تحت تأثیر *T. harzianum* K18 پلیمریزاسیون لیگنین را تسهیل می‌کنند و دیواره سلولی را تقویت می‌نمایند).

از طرف دیگر پایداری پاسخ دفاعی عامل کلیدی برتری عوامل بیوکنترلی است. در تحقیق حاضر فرمولاسیون میکروبی *B. subtilis* B2 افزایش فلاونوئیدها را تا ۷۲ ساعت حفظ کرد، در حالی که اثر دومارک پس از ۴۸ ساعت کاهش یافت. این یافته‌ها راهکارهای جدیدی برای کاهش مصرف سموم شیمیایی در قالب برنامه‌های مدیریت تلفیقی بیماری (IPM) ارائه می‌دهد (Bonaterra et al., 2012).

نتیجه گیری و پیشنهادها

این پژوهش القای ترکیبات فنلی خاص (به ویژه روتین و کافئیک اسید) توسط *B. subtilis* B2 و *T. harzianum* K18 در خیار را ارایه می نماید که افق جدیدی در مدیریت پایدار بیماری ها می گشاید. هر دو فرمولاسیون میکروبی با افزایش و حفظ تجمع فنل ها و فلاونوئیدها تا ۷۲ ساعت، گزینه ایده آل برای دوره های بحرانی بیماری است و *T. harzianum* K18 با افزایش ۲۰۵٪ فرولیک اسید، به احتمال سازوکار بیوشیمیایی خاصی برای تقویت ساختار دفاعی گیاه ارائه می دهد. تلفیق *B. subtilis* B2 (برای القای فلاونوئیدها) و *T. harzianum* K18 (برای افزایش اسیدهای فنلی) یک راهکار مکمل پیشنهاد می شود. ترکیب این دو عامل میکروبی می تواند تا حد زیادی وابستگی به سموم شیمیایی را کاهش دهد. برای مطالعات آتی می توان تمرکز خود را بر بررسی هم افزایی B2 و K18، بیان ژن های کلیدی مسیرهای مقاومت تحت تأثیر این عوامل بیوکنترلی و آزمون های میدانی در مقیاس تجاری معطوف کرد.

قدردانی

این پژوهش مستخرج از نتایج پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب ۰۸۴۴-۰۰۰۳۴-۰۰۱-۰۸۱-۱۶۰۵-۳۶-۰۱۳ می باشد. نویسندگان از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی به دلیل در اختیار قراردادن برخی امکانات پژوهشی و همچنین از تمام دست اندرکاران به خاطر همکاری های ارزشمندشان تشکر و قدردانی می نمایند.

"هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

RERERENCES

- Agati, G. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196: 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>.
- Bonaterrea, A., Badosa, E., Cabrefiga, J., Francés, J. & Montesinos, E. 2012. Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases. *Trees*. 26, 215–226. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0626-y>.
- Klessig D.F., Choi H.W., Dempsey D.A. (2018). Systemic acquired resistance and salicylic acid: Past, present, and future. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 31:871–888. doi: 10.1094/MPMI-03-18-0067-CR.
- Gill, S. S., & Tuteja, N (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>.
- Hafez, Y.M., El-Nagar, A.S., Elzaawely, A.A., Kamel, S., Maswada, H. F. (2018) Biological control of *Podosphaera xanthii* the causal agent of squash powdery mildew disease by upregulation of defense-related enzymes. *Egypt J Biol Pest Control* 28(1):57. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0058-8>.
- Harman. G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004). Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>.
- Jetiyanon, K., Fowler, W. D., & Kloepper, J. W. (2003). Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand, *Plant Diseases*, 87, 1390–1394. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.11.1390>.
- Li Q, Liu Z, Jiang Z, Jia M, Hou Z, Dou D, Yu J. (2025). Phenylalanine metabolism-dependent lignification confers a rhizobacterium-induced plant resistance. *Plant Physiology*, 197, (2), <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaf016>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Phytochemistry: Advances in Research*, (pp. 23-67). Research Signpost.

- Monfil, V.O. & Casas-Flores, S. 2014. Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. *Biotechnology and Biology*. 8, 447. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00032-1>.
- McGrath, M. T., & Shishkoff, N. (2003). Resistance to QoI fungicides in *Podosphaera xanthii* populations causing powdery mildew of cucurbits. *Plant Disease*, 87(8), 894-902.
- Mandal, S., Kar, I., Mukherjee, A. K., Acharya, P. (2010). Elicitor-Induced Defense Responses in *Solanum lycopersicum* against *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Phytopathology*, 158(9), 609-615 <https://doi.org/10.1155/2013/561056>.
- Martínez-Cruz, J., Romero, D., Dávila, J. C. & Pérez-García, A. 2014. The *Podosphaera xanthii* haustorium, the fungal Trojan horse of cucurbit-powdery mildew interactions. *Fungal Genetics and Biology*. 71, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.006>.
- Manafi, M., Umakantha, B., Narayana Swamy, H. D. and Mohan, K. 2009b. Evaluation of high-grade sodium bentonite on performance and immune status of broilers, fed aflatoxin and ochratoxin. *World Mycotoxin J.*, 2(4): 435-440. <https://doi.org/10.3920/WMJ2009.1136>.
- Mirzaei, A., Panahi, P., Langarizadeh, M. & Sedghi, S. (2024). Identifying and validating the components for the development of an information system for health grey literature in Iran: A mixed method approach. *Journal of Education and Health Promotion*. 13 (8): 128-135. https://doi.org/10.4103/jehp.jehp_624_23.
- Rur M., Rämert B., Hökeberg M., Vetukuri R. R., Grenville-Briggs L., Liljeroth E. (2018). Screening of alternative products for integrated pest management of cucurbit powdery mildew in Sweden. *Eur J Plant Pathol* 150:127–138, <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1258-x>.
- Schabenberger, O. (2006). *SAS for Mixed Models* (2nd ed.). SAS Institute. <https://doi.org/10.1080/10543400601001600>.
- Sharma, N. Singh N. K. & Bhadwal M. S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 24, No. 3127, 544–555: 429 - 438 <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10233>.
- Sedaghati, M (2012) Biological control of cucumber powdery mildew using *Bacillus* isolates. [Master's thesis, University of Tehran]. (In Persian).
- Steel, R. G. D., Torrie, J. H., & Dickey, D. A. (1997). *Principles and Procedures of Statistics: a biometrical approach* (3rd ed.). McGraw-Hill.
- Sun, J., Mu, Q., Kimura, H., Murugadoss, V., He, M., Du, W., & Hou, C. (2022). Oxidative degradation of phenols and substituted phenols in the water and atmosphere: a review. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 5(2), 627–640. <https://doi.org/10.1007/s42114-022-00435-0>.
- Tavan, M., Azizi, A., Sarikhani, H., Mirjalili, M. H., Rigano M. M. (2022). Phenolics diversity among wild populations of *Salvia multicaulis*: as a precious source for antimicrobial and antioxidant applications *Natural Product Research*. 36 (5), 1332-1336 <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1864369>
- Telles, N. R., Sakuno, E., Cardoso, C. A. L., & Guimarães, R. C. A. (2017). Validation of an HPLC-DAD method for determination of phenolic acids and flavonoids in *Baccharis trimera* extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 74(3), 851-854. <https://doi.org/10.3390/plants12051057>.
- Vermeers, S., & Nicholson, R. L. (2007). Phenolic compounds and their role in disease resistance. In *Plant Biochemistry* (pp. 611-634). Academic Press. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.002101>.
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications.
- Wu, J., He, P., He, P. et al. (2025). *Bacillus subtilis* YN2014090 water-dispersible granular formulation for controlling powdery mildew on cucumber. *Journal of Crop Health* 77, 15. <https://doi.org/10.1007/s10343-024-01078-5>.
- Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J. & Chen, J. (2023). *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontier Microbiology*, 14, 1160551.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1160551>.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, 64(4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).