Archive of SID

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴ (ص ۳۷۱-۳۶۳)

اثر کیتوزان در بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های مؤثر در القای مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشهٔ گندم

وحید قاضی محسنی[۱] و سیدکاظم صباغ[۲*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زابل

۲. دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۱۲)

چکیده

در این تحقیق، نقش کیتوزان به‌عنوان یک محرک زیستی مکانیسم دفاعی در گندم آلوده به *Fusarium graminearum* عامل بلایت فوزاریومی خوشهٔ گندم بررسی شد. به منظور بررسی بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و فعالیت آنزیمی، آزمایش گلخانه‌ای به‌صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. در این مطالعه محلول کیتوزان با غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌صورت اسپری برگی استفاده شد. گیاهان تیمارشده پس از ۲۴ ساعت با سوسپانسیون اسپور قارچ (با غلظت 10^6 ماکروکنیدی در میلی‌لیتر) به روش تزریق خوشه، مایه‌زنی شده و تحت شرایط گلخانه نگهداری شدند. نمونه‌برداری در بازه‌های زمانی مختلف بعد از آلودگی انجام گرفت و سپس سطوح بیان برخی ژن‌های دخیل در مقاومت و فعالیت آنزیم‌های مرتبط بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها کاهش شدت بیماری را در گیاهان تیمارشده نسبت به گیاه شاهد نشان داد. همچنین افزایش معناداری در فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز مشاهده شد. نتایج آنالیز مولکولی به روش qRT-PCR نشان از افزایش شایان توجه سطوح بیان mRNA ژن‌های بتا- ۱ و ۳ گلوکانازو اگزالات اکسیداز داشت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که کیتوزان با القای مقاومت سیستمیک اکتسابی مقاومت گیاهان را علیه قارچ‌های بیماری‌زا تحت تأثیر قرار می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: **بلایت فوزاریومی خوشهٔ گندم، بیان ژن در زمان واقعی، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کیتوزان.**

مقدمه

بلایت فوزاریومی خوشهٔ گندم یکی از بیماری‌های مخرب گندم است که هر ساله میلیون‌ها دلار خسارت به این محصول در سراسر جهان وارد می‌کند (Wiese, 1978). این بیماری منجر به کاهش تولید محصول در مزرعه، کاهش کیفیت دانه و آلودگی دانه با زهرابه‌ای قارچی می‌گردد (Goswami & Kiystler, 2004). گونهٔ *Fusarium graminearum* مهم‌ترین عامل بلایت فوزاریومی خوشهٔ گندم در مناطق مختلف جهان به حساب می‌آید (Wiese, 1978; Ban *et al.*, 2008) و بیشتر در اقلیم‌های گرم و مرطوب همچون مرکز و جنوب اروپا، جنوب و شمال آمریکا، آسیا و استرالیا پراکنش دارد (Parry *et al.*, 1995). بررسی‌ها نشان می‌دهد که روش‌های زراعی و شیمیایی موفقیت

* تلفن: ۰۳۵۳۱۲۳۲۲۷۵
E-mail: sksabbagh@yazd.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

چندانی در کنترل بیماری‌های گیاهی نداشته است و بنابراین محققان به دنبال استفاده از موادی بیولوژیک و فاقد اثرات زیست‌محیطی زیان‌آورند که مکانیزم‌های دفاعی گیاه را قبل از مواجهه با عامل بیمارگر فعال کنند (Dordas, 2009). در سال‌های اخیر از کاربرد الیسیتورها به میزان زیادی استقبال شده و این موضوع سبب انجام تحقیقات گسترده‌ای در این زمینه شده است. در این بین کیتوزان به یک تمرکز اصلی پژوهش در کشاورزی تبدیل شده است که به عنوان یک ترکیب طبیعی زیستی تجزیه‌پذیر و مشتق از پوست خرچنگ‌ها و میگو است که پس از داستیله شدن از کیتین به‌دست می‌آید و ویژگی اصلی آن مربوط به طبیعت پلی کاتیونی آن است (Propagdee *et al*., 2006). شواهد حاکی از آن است که کیتوزان با غلظت‌های ۰/۷۵ تا ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش رشد میسیلیومی قارچ‌های *Alternaria alternata*، *Botrytis cinerea*، *Colletotricum gloeosporioides* و *Rhizopus stolonifer* در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (El Ghaouth *et al*., 1992). گزارش‌ها نشان داده است، زمانی که کیتوزان به حالت کاربرد ریشه‌ای، اسپری شاخ و برگ و پوشش دانه به‌کار می‌رود، باعث القای مقاومت به *F. oxysporum* در گیاه گوجه‌فرنگی حساس می‌گردد و همچنین باعث محدود کردن رشد بیمارگر در سطح غشای خارجی ریشه و تحریک تعدادی از واکنش‌های دفاعی، از جمله موانع ساختاری می‌شود (Benhamou *et al*., 1998). سطح فعالیت آنزیمی فنیل آلانین آمونیالیاز و پراکسیداز در گیاهچهٔ گندم تیمارشده با کیتوزان به دنبال تلقیح با *B. cinerea* افزایش شایان توجهی یافت (Mitchell *et al*., 1994). پاسخ مقاومت القایی علیه *B. cinerea* در برگ‌های انگور تیمارشده با کیتوزان با افزایش فعالیت آنزیم‌های لیپوکسی ژناز، فنیل آلانین آمونیالیاز و کیتیناز در غلظت‌های ۷۵ و ۱۵۰ میکروگرم بر لیتر محلول گزارش شده است (Trotel-Aziz *et al*., 2006). در تحقیق حاضر به منظور کاهش اثرات مخرب قارچ‌کش‌ها بر سلامت موجودات زنده و محیط زیست، از تأثیر کیتوزان به عنوان مادهٔ القاکنندهٔ مقاومت در گندم نسبت به بیماری بلایت فوزاریومی خوشهٔ گندم استفاده گردید. بدین منظور فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و همچنین میزان بیان برخی ژن‌های دخیل در مقاومت بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ سوسپانسیون اسپور قارچ

جدایهٔ استاندارد قارچ *F. graminearum* از مؤسسهٔ تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی ایران تهیه شد. در ابتدا یک دیسک از کلنی قدیمی قارچ به محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar, Sigma) منتقل و در گرم‌خانه در دمای ۲±۲۵ نگهداری شد. سپس مقداری از کلنی قارچ تازه رشدکرده برای اسپوردهی به محیط کشت مایع جوشاندهٔ ماش (Mange Been) و همچنین CLA (Carnation Leaf Agar) منتقل شد (Yoshizawa, 1997) و محیط‌های کشت در گرم‌خانه در دمای ۲±۲۵ به مدت دو هفته نگهداری شدند. تهیهٔ اسپور و شمارش آن‌ها با استفاده از لام هماسیتومتر انجام گرفت و سوسپانسیون حاوی ۵×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر تهیه و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمون تلقیح نگهداری گردید (Schweigkofler *et al*., 2004).

تلقیح عامل بیماری

به منظور آزمون بیماری‌زایی، همهٔ تیمارهای تحت آزمایش به همراه گیاه شاهد، با ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی اسپورهای قارچ عامل بیماری اسپورپاشی، یا با ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون با غلظت ۵×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر با تزریق در زیر محل تشکیل خوشه تلقیح شدند. عمل تلقیح در زمان گل‌دهی (آنتزیوز) گندم انجام گرفت (Yoshizawa, 1997). گلدان‌ها با استفاده از مه‌پاش مه‌پاشی شدند و با پلاستیک، برای حفظ رطوبت بالای گلدان‌ها حداقل به‌مدت ۷۲ ساعت پوشانده شدند (Nemati & Navabpour, 2012). نمونه‌برداری از برگ گیاه در مقاطع زمانی صفر، ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت بعد از تلقیح قارچ عامل بیماری انجام گرفت و در ادامه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای

آزمون گلخانه‌ای به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار به انجام رسید. در همهٔ آزمایش‌ها از بذر گندم رقم تجن استفاده شد. بذرهای گندم با هیپوکلریت سدیم نیم درصد به‌مدت ۲ دقیقه و ۳ بار شست‌وشو با آب مقطر، ضدعفونی سطحی شدند و در گلدان‌های پلاستیکی ۳ کیلوگرمی حاوی خاک استریل کشت گردیدند. با توجه به اینکه دورهٔ آسیب‌پذیری گندم به بیماری فوزاریومی سنبله در طول مرحله گل‌دهی است، در اوایل این مرحله، گندم به‌وسیلهٔ کیتوزان با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به روش اسپری برگی تیماردهی شد.

عصارهٔ آنزیمی و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

برای تهیهٔ عصارهٔ گیاهی، ابتدا ۰/۲ گرم از بافت برگ گیاه به هاون چینی سرد منتقل شد و به آن ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج (محلول شامل ۱۶۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات (۱۰ میلی‌مولار: PH=) و ۲۰ میکرولیتر EDTA) (۱ /۰ میلی‌مولار) اضافه گردید و سپس کاملاً ساییده شد تا به‌صورت همگن درآمد. پس از سانتریفیوژ، با سرعت ۱۰۰۰ rpm فاز بالایی به عنوان عصارهٔ پروتئین برای سنجش فعالیت آنزیمی به‌کار رفت (de Azevedo Neto *et al.*, 2006).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت پراکسیداز از محلول گایاکول استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول گایاکول به سوبسترای گایاکول شامل: ۰/۵ میلی‌لیتر عصارهٔ آنزیمی و ۰/۵ میلی‌لیتر هیدروژن پراکسیداز ۱ درصد اضافه شد. تغییرات جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Chen *et al.*, 2000).

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز محلول واکنش از عصارهٔ گیاهی در حجم سه میلی‌لیتر تهیه شد (۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر پیروگالل ۰/۳ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی). تغییرات جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید (Chen *et al.*, 2000).

سنجش مقدار پروتئین کل

محاسبهٔ فعالیت اختصاصی آنزیم‌های تحت آزمایش و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در نمونه‌ها به روش Bradford (1976)، با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد انجام گرفت.

بررسی تغییرات بیان ژن

برای ارزیابی میزان ژن‌های بیان‌شده در تیمارهای مختلف، از تیمار و زمانی که بیشترین میزان تغییرات آنزیمی را نشان داد، استفاده شد. بدین منظور، ۵۰ گرم از برگ‌های گیاه تحت نظر جدا شد و برای استخراج RNA در مراحل بعدی به‌کار گرفته شد. استخراج RNA با استفاده از کیت کیاژن (Qiagene, Germany) انجام گرفت. رشتهٔ اول DNA از ملکول‌های mRNA با استفاده از کیت تجاری 2-Steps RT-PCR kit (Vivantis, Cinngene) ساخته شد. کمیت و کیفیت مولکول‌های cDNA به‌ترتیب با استفاده از دستگاه اسکن دراپ (Analytika, Germany) و ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. ۵۰ نانو گرم از cDNA برای انجام آنالیز بیان ژن استفاده شد. آغازگرهای به‌کاررفته برای qRT-PCR توسط نرم‌افزار آنلاین (http://Fokker.wiPrimer3 mit.deu/primer3/input.htm.) طراحی و به همت شرکت سیناژن ساخته شد (جدول ۱). واکنش qRT-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA(50 ng/µl)، ۲ میکرولیتر از مخلوط دو آغازگر (20µM)، ۴ میکرولیتر از Mastermix (Hot Tag EvaGreen, Cinnagene, France) و با استفاده از دستگاه کوربت (RG3000, Curbet, Australia) با

www.SID.ir

Archive of SID

برنامهٔ دمایی ۹۵°C به‌مدت ۱۵ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه و به دنبال آن ۴۰ چرخهٔ حرارتی شامل ۹۵°C برای ۱۵ ثانیه، ۶۰°C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۲۰ ثانیه انجام گرفت. سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی برای هر تیمار انجام گرفت.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای به‌کاررفته در این مطالعه

Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Accession number
β-1,3-glucanase	AACGACCAGCTCTCCAACAT	GTATGGCCGGACATTGTTCT	DQ090946.1
Oxalat Oxidase	TGCAGTTCAACGTCGGTAAG	ATGGCACGAAGACGATACC	AJ556991
β-Tubulin	GGACAGGATTGACAGATTGATA	CTCGTTCGTTATCGGAATTAA	-

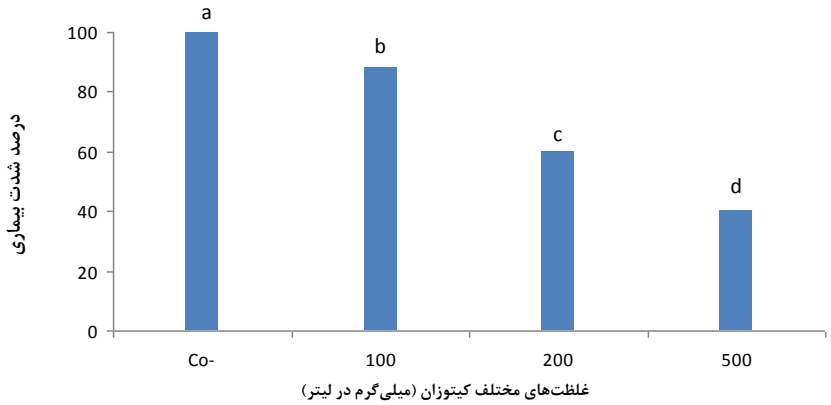
آنالیز داده‌ها

تجزیهٔ واریانس داده‌ها بر اساس طرح فاکتوریل بر پایهٔ کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 آنالیز واریانس یک‌طرفه شدند و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند ($P<۰/۰۵$). به عنوان اختلاف معنادار در نظر گرفته شد و نمودارها به‌وسیلهٔ نرم‌افزار Excell رسم شدند. آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده با نرم‌افزار REST 2009 که تخصصی داده‌های خروجی Real time PCR است، صورت گرفت (Pffafi, 2001).

نتایج

ارزیابی شدت بیماری‌زایی در شرایط گلخانه

در این آزمایش شدت بیماری پس از سخت شدن دانه‌ها و شمارش لکه‌های موجود روی دانه‌ها و برگ‌ها و بر مبنای رتبه‌بندی و شاخص بیماری هورسفال برای هر تیمار ارزیابی شد. در این روش بعد از پر شدن و کامل شدن سنبلچه‌ها، با توجه به وجود حدود ۱۳-۱۴ سنبلچه در هر خوشه، وجود یک سنبلچهٔ آلوده، شدت بیماری ۷ درصد و دو سنبلچهٔ ۱۴ درصد و به همین ترتیب، شدت بیماری در تیمارهای مختلف تعیین گردید (Stack & McMullen, 2010). طبق نتایج، کاربرد کیتوزان با غلظت ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نتایج مطلوبی در کاهش معنادار علائم بیماری در پی داشت، اما در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان، درجات کمی از کاهش علائم بیماری نسبت به شاهد آلوده مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسهٔ شدت بیماری بلایت خوشهٔ گندم ناشی از قارچ *Fusarium graminearum* در آزمون گلخانه‌ای با کاربرد غلظت‌های مختلف کیتوزان، (-Co): شاهد آلوده. ($P <۰/۰۵$)

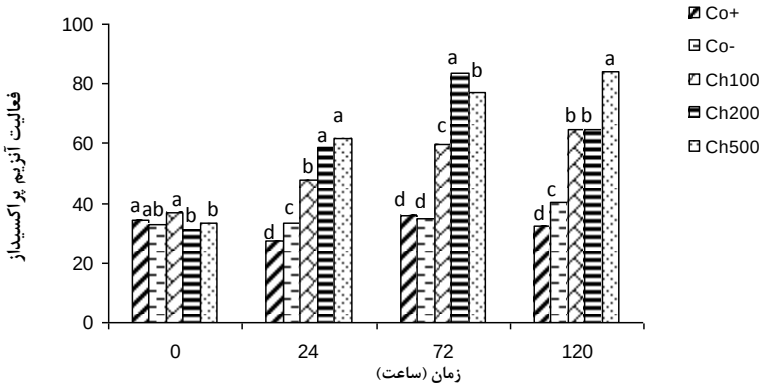
فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در گندم‌های آلودهٔ تیمارشده با غلظت‌های مختلف کیتوزان در شکل ۲ مشاهده می‌شود. نتایج کاربرد غلظت‌های مختلف کیتوزان نشان داد بین تیمارها و روزهای نمونه‌برداری در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنادار وجود دارد. بالاترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان (۸۳/۷۹) و در ۱۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

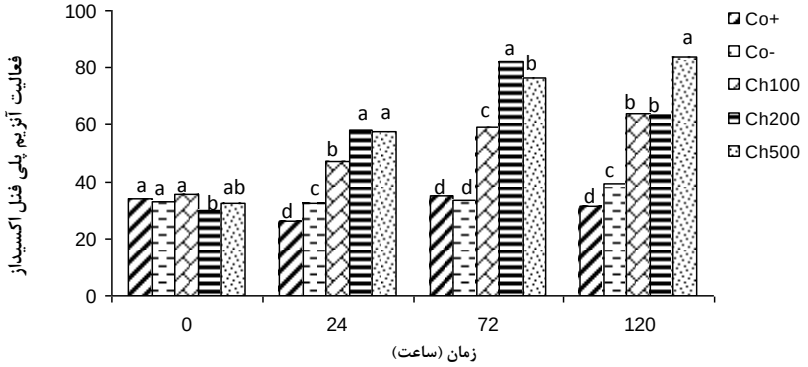
ساعت پس از تلقیح قارچ عامل بیماری مشاهده شد. در همهٔ تیمارها به جز شاهد سالم میزان آنزیم پراکسیداز از اولین روز دورهٔ تحت بررسی تا روز پنجم پس از تلقیح قارچ عامل بیماری، روند افزایشی داشت.



شکل ۲. بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (واحد آنزیمی/ دقیقه/ میلی‌گرم پروتئین) در فواصل زمانی مختلف پس از تلقیح بیمارگر در گیاهان تیمارشده با غلظت‌های مختلف کیتوزان، (+Co): شاهد سالم (-Co): شاهد آلوده. ($P <$ ۰/۰۵)

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

بررسی نتایج القای فعالیت این آنزیم، تفاوت‌های معناداری را در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها و روزهای مختلف نمونه‌برداری و اثر متقابل آن‌ها نشان داد. بالاترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان (۸۴/۳) و در ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح قارچ عامل بیماری مشاهده شد. در همهٔ تیمارها به‌جز شاهد سالم، میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز طی روزهای متوالی تحت بررسی، پس از تلقیح قارچ عامل بیماری افزایش یافت. همهٔ غلظت‌های کیتوزان به‌کاربرده‌شده ۲۴ ساعت پس از تلقیح قارچ عامل بیماری اختلاف معناداری با شاهد آلوده و سالم نسبت به افزایش میزان فعالیت این آنزیم از خود نشان دادند (شکل ۳).



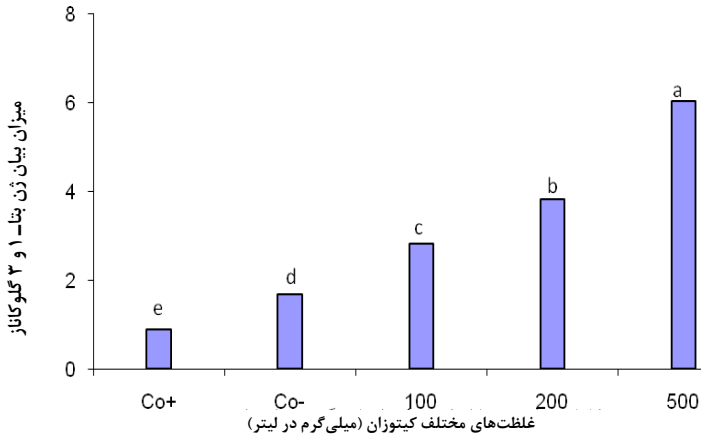
شکل ۳. بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (میلی‌گرم پروتئین) در فواصل زمانی مختلف پس از تلقیح بیمارگر در گیاهان تیمارشده با غلظت‌های مختلف کیتوزان، (+Co): شاهد سالم (-Co): شاهد آلوده. ($P <$ ۰/۰۵)

میزان تغییرات بیان ژن بتا- ۱ و ۳ گلوکاناز

نتایج بررسی میزان بیان ژن بتا- ۱ و ۳ گلوکاناز در گندم‌های آلودهٔ تیمارشده با غلظت‌های مختلف کیتوزان بعد از ۷۲ ساعت از آلودگی اولیه در شکل ۴ مشاهده می‌شود. بررسی نتایج میزان بیان این ژن، تفاوت‌های معناداری را در سطح ۰/۰۵ بین تیمارهای مختلف کیتوزان با شاهد سالم و آلوده نشان داد. بالاترین میزان بیان ژن بتا- ۱ و ۳ گلوکاناز در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان به میزان۶/۰۳ برابر مشاهده شد.

www.SID.ir

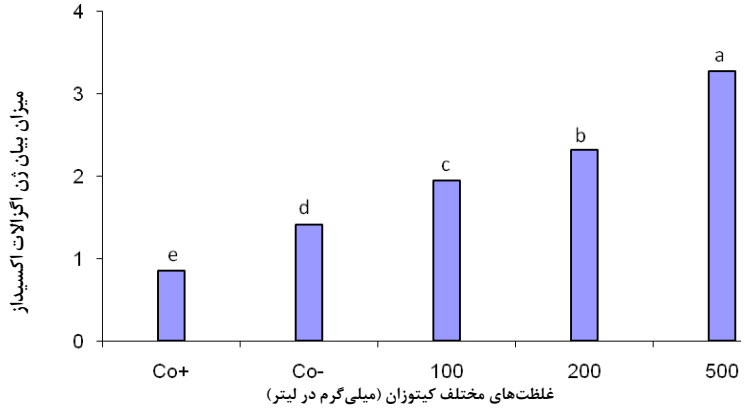
Archive of SID



شکل ۴. میزان بیان ژن اگزالات اکسیداز در گیاهان تیمارشده با غلظت‌های مختلف کیتوزان، ۷۲ ساعت بعد از آلودگی، (Co+): شاهد سالم (Co-): شاهد آلوده

میزان بیان ژن اگزالات اکسیداز

نتایج بررسی میزان بیان ژن اگزالات اکسیداز در گندم‌های آلودهٔ تیمارشده با غلظت‌های مختلف کیتوزان در شکل ۵ مشاهده می‌شود. بررسی نتایج میزان بیان این ژن، تفاوت‌های معناداری را در سطح ۰/۰۵ بین غلظت‌های مختلف کیتوزان با شاهد سالم و آلوده نشان داد. بالاترین میزان بیان این ژن در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان به مقدار ۳/۲۷ برابر، ۷۲ ساعت پس از تلقیح قارچ عامل بیماری مشاهده شد.



شکل ۵. میزان بیان ژن اگزالات اکسیداز در گیاهان تیمارشده با غلظت‌های مختلف کیتوزان، ۷۲ ساعت بعد از آلودگی، (Co+): شاهد سالم (Co-): شاهد آلوده

بحث

طبق نتایج، کاربرد کیتوزان با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نتایج مطلوبی در کاهش معنادار علائم بیماری در پی داشت. پیش تیمار گیاهان با الیسیتورهای مختلف باعث تحریک پاسخ‌های دفاعی و در نتیجه، کاهش علائم بیماری در سیستم‌های بیماری‌زای مختلف شده است. گزارش‌های متعددی از موفقیت در کنترل بیماری با کاهش علائم آن به‌وسیلهٔ تیمار گیاهان با کیتوزان ارائه شده است. اثر پیشگیرانهٔ کیتوزان در گیاهان بادام‌زمینی آلوده‌شده به کپک خاکستری ناشی از *Botrytis cineara* و خیار آلوده به زنگ برگی ناشی از *Puccinia arachidis* نشان داد که کاربرد کیتوزان (۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) ۲۴ ساعت قبل از آلوده‌سازی گیاه با عوامل فوق، باعث کاهش شدت توسعهٔ قارچ و بیماری در گیاهان تحت مطالعه شده است (Ben shalom *et al.*, 2003). اثر بازدارندگی و

www.SID.ir

Archive of SID

درمانی کیتوزان در برگ‌های بادام‌زمینی می‌تواند ناشی از اشغال شدن مکان‌های اتصال برای *B. cinerea* توسط مولکول‌های کیتوزان باشد. در یک مطالعهٔ دیگر نشان داده شده است که گندم تیمارشده با غلظت‌های مختلف کیتوزان تجاری در کاهش بیماری سفیدک کرکی بذور گندم، ایجادشده به‌وسیلهٔ *Sclerospora graminicola* تحت شرایط گلخانه و مزرعه مؤثر بوده است (Sharathchandra *et al*., 2004). اخیراً نقش بازدارندگی پراکسیداز در بیماری سپتوریوز گندم بررسی شده و نشان داده شده است که تجمع پراکسداز باعث جلوگیری از رشد قارچ *Septoria tritici* در گندم گردیده است (Collinge, 2009). با این حال، حذف همهٔ مولکول‌های پراکسیداز در یک رقم مقاوم به *S. tritici* موجب ایجاد حساسیت به بیماری نشده است (Shetty *et al*., 2007). بنابراین، نتیجه‌گیری می‌شود که پراکسیداز نقش مستقیمی در بازدارندگی رشد و توسعهٔ قارچ ندارد. پلی فنول اکسیدازها گروهی از آنزیم‌ها به شمار می‌روند که در اکسیداسیون فنول‌ها به کینون‌ها و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی نقش مهمی دارند. در ارتباط با امکان مؤثر بودن فعالیت آنزیم‌های پلی فنول اکسیداز در واکنش‌های دفاعی گیاه، تحقیقات نشان داده است که این آنزیم‌ها در فعالیت دفاعی و واکنش فوق حساسیت در مقابل ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها دخالت دارند (Mayer, 2006). نتایج این آزمایش در افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در گندم‌های تیمارشده با کیتوزان با نتایج گیاه هویج تیمارشده با کیتوزان در برابر قارچ *Alternaria radicina* (Jayaraj *et al*., 2009) و همچنین گیاه تنباکوی تیمارشده با کیتوزان علیه *Phytophthora nicotiana* (Falcon-Rodriguez *et al*., 2011) مطابقت داشت. نتایج این تحقیقات حاکی از آن است که فعالیت این آنزیم‌ها نشان‌دهندهٔ تغییرات بیوشیمیایی بوده و بخشی از واکنش مقاومت است. بنابراین، این آنزیم‌ها به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی مقاومت گیاهان در نظر گرفته شده‌اند و می‌توانند ملاک مناسبی از ایجاد انواع مقاومت در واکنش متقابل میزبان بیمارگر محسوب گردند. ژن‌های کنترل‌کنندهٔ مقاومت، گروهی از پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی را رمز می‌کنند که موجب تخریب دیوارهٔ سلولی قارچی، ایجاد اختلال در غشاهای سلولی آن، تقویت سیستم پاسخ دفاعی میزبان، دخالت در بیماری‌زایی و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می‌شوند. یک گروه از این ژن‌ها پروتئین‌هایی مانند بتا- ۱ و ۳ گلوکاناز و اگزالات اکسیداز را رمز می‌کنند (Mackintosh, 2007). بیان ژن‌های دفاعی مثل ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی به عنوان یکی از شاخص‌های استقرار مقاومت در گیاه محسوب می‌شود. آنزیم‌های بتاگلوگاناز و اگزالات اکسیداز از جمله آنزیم‌هایی‌اند که تجمع آنها در گیاهان بعد از آلودگی به بیماری افزایش می‌یابد (Arloria *et al*., 1992). حفاظت از گیاه حاصل تحریک پاسخ‌های مختلف دفاعی است. الیسیتورها طیف گسترده‌ای از ترکیبات‌اند که باعث القای پاسخ‌های دفاعی میزبان در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شوند (Koga *et al*., 2006). در پژوهش حاضر کاربرد کیتوزان باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی از جمله بتاگلوکاناز و اگزالات اکسیداز شده است که با مطالعات Jayaraj *et al*. (2009)، در افزایش بیان میزان ژن‌های دفاعی و سطح رونوشت پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در گیاه هویج آلوده به *Alternaria radicina* مطابقت دارد. استفاده از کیتوزان در گیاه آفتابگردان آلوده به *Plasmopara halstedi* نیز باعث افزایش بیان ژن بتاگلوکاناز و القای مقاومت به بیماری سفیدک کرکی آفتابگردان شد (Nandeeshkumar *et al*., 2008).

نتیجه‌گیری کلی

در پایان باید اشاره کرد که همهٔ عوامل کنترل‌کنندهٔ بیماری‌های گیاهان، جنبهٔ حفاظتی دارد و هیچ وسیله‌ای در دست نیست که بتوان با آن گیاهان آلوده و بیمار را به‌طور کامل درمان کرد. به همین دلیل، پس از سپری شدن سال‌ها از معرفی شدن روش‌های مختلف کنترل، جامعهٔ جهانی هنوز به دنبال روش‌های ایمن‌تر، مؤثرتر، آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر مبارزه با بیماری‌های گیاهان است. در این راستا،

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری‌شناسان گیاهی در سرتاسر دنیا، ضمن ارائهٔ سیستم‌های مدیریت مبارزهٔ تلفیقی بیماری‌های گیاهان، در این نظر متفق‌القول‌اند که هدف نهایی این روش‌ها، مهار کامل بیماری‌ها نیست و تنها کاهش اقتصادی خسارت ناشی از بیماری‌ها، با حداقل خسارت به محیط زیست مد نظر است. از این رو، به جرأت می‌توان گفت که القای مقاومت یک پدیدهٔ امیدبخش بوده و نیاز به آن یک ضرورت تمام است.

REFERENCES

1. Arloria, M., Ludwing, A., Boller, T. & Bonfante, P. (1992) Inhibition of fungal growth by plant chitinases and β-1, 3-glucanases. *Protoplasma*, 177, 34-43.
2. Ban, T., Kawad, N., Yanagisaway, A. & Takezaki, A. (2008) Progress and future prospects of resistance breeding to Fusarium head blight in Japan. *Cereal Research Communications*, 36, 23-29.
3. Bernardo, A., Bai, G., Guo, P., Xiao, K., Guenzi, A.C. & Ayoubi, P. (2007) *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between Fusarium head blight-resistant and susceptible wheat cultivars. *Functional & Integrative Genomics*, 7, 69-77.
4. Benhamou, N., Kloepper, J. W. & Tuzun, S. (1998). Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, 204, 153-168.
5. Ben- Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C. & Fallik, E. (2003). Controlling gray mould caused by *Botrytis Cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22, 285-290.
6. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
7. Chen, C., Belanger, R., Benhamon, N. & Paulitz, T. (2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56, 13- 23.
8. Collinge, D. & Lyngs Jrgensen, H. (2009). Effects of b-1, 3-glucan from *Septoria tritici* on structural defense responses in wheat. *Journl of Exprimental Botny*, 60(15), 4287-300.
9. De Azevedo Neto, A. D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., Abreu, C. E. & Gomes-Filho, E. (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 87-94.
10. Dordas, C. (2009). Role of Nutrients in Controlling Plant Diseases. In Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S., Alberola C. (Ed.), Sustainable Agriculture: A Review. (pp. 369-360). Springer Netherlands.
11. El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A. & Benhamou, N. (1992) Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research*, 96, 769-779.
12. Falcon-Rodriguez, A. B., Costales, D., Cabrera, J. C. & Martinez-Tellez, M. A. (2011) Chitosan physico–chemical properties modulate defense responses and resistance in tobacco plants against the Oomycete *Phytophthora nicotianae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100, 221-228.
13. Goswami, R. S. & Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
14. Jayaraj, J., Rahman, M., Wan, A. & Punja, Z. K. (2009). Enhanced resistance to foliar fungal pathogens in carrot by application of elicitors. *Annals of Applied Biology*, 155, 71-80.
15. Koga, J., Kubota, H., Gomi, S., Umemura, K., Ohnishi, M. & Kono, T. (2006). Cholic acid a bile acid elicitor of hypersensitive cell death, pathogenesis- related protein synthesis, and phytoalexin accumulation in rice. *Plant Physiology*, 140, 1475-1483.
16. Mackintosh, C. A., Lewis, J., Radmer, L. E., Sin, S., Heinen, S., J., Smith, L. A.,Wyckoff, M. & Muehlbauer, G. J. (2007). Over expression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium Head Blight. *Plant Cell Report*, 26, 479-488.
17. Mayer, A. M. **(**2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi. *Phytochemistry*, 67, 2318-2331.
18. Mitchell, H., Hall, J. & Barber, M. (1994) Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenasa activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiology*, 104, 551-556.
19. Nandeeshkumar, P., Sudisha, J., Ramachandra, K., Prakash, H. S., Niranjana, S. R. & Shekar. S. (2008). Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 188-194.
20. Nemati, M. & Navabpour, S. (2012) Study on quantitative expression pattern of oxalate oxidase and β-1, 3 glucanase genes under Fusarium graminearum treatment in wheat by quantitative Real time PCR. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4, 443-447.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Parry, D. W., Jenkinson, P. & Mcleod, L. (1995). Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathology*, 44, 207-238.
22. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29**,** e45.
23. Propagdee, B., Kotchdat, Kumsopa, A. & Visarathanonth, N. (2006). The role of chitosan in protection of soybean from suolden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. *Glycines. Bioresource Technology*, 98, 1353-1358.
24. Schweigkofler, W., O'Donnell, K. & Garbelotto, M. (2004). Detection and quantification of airborne conidia of Fusarium circinatum, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3512-3520.
25. Sharathchandra, R. G., Niranjan Raj, S., Shetty, N. P., Amruthesh, K.N. & ShekarShetty, H. (2004) A chitosan formulation Elexa induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection*, 23, 881-888.
26. Shetty, N.P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G.H., Collinge, D.B. & Jorgensen, H. (2007) Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist* 174, 637-647.
27. Stack, R. W. & McMullen, M. P. (2010). A visual scale to estimate severity of Fusarium head blight in wheat. *North Dakota State University.* Reviewed November, p. 1095.
28. Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G. & Aziz, A. (2006) Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *Europian Journal Plant Patho*logy, 114, 405-413.
29. Wiese, M. (1977). Compendium of wheat diseases: American Phytopathological Society.
30. Yoshizawa, T. (1997) Geographic difference in trichothecene occurrence in Japanese wheat and barley. *Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University*, 5, 23-30.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Plant Protection, Vol. 46, No. 2, Autumn & Winter 2015-2016

Effect of chitosan on gene expression and activity of enzymes involved in resistant induction to fusariuse of wheat

Vahid Ghazimohseni[1] and Seyed Kazem Sabbagh[2*]
1. M.Sc. Student of Plant Pathology, University of Zabol, Iran
2. Associate Professor of Plant Biotechnology, Department of Biology, University of Yaz, Iran
(Received: Jan. 4, 2015 - Accepted: Dec. 3, 2015)

ABSTRACT

In this research, the role of chitosan as a bio-inducer of defense mechanism in infected wheat by *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight was investigated. To investigate the expression of genes associated with pathogenicity and enzymatic activity, a factorial experiment in a completely randomized design with four replications was done under greenhouse condition. The adjusted solution containing different concentrations of chitosan (0, 100, 200 and 500 mg l^{-1}) were used via spray. Treated plants after 24 hours with a spore suspension (at a concentration of 10^6 Macro conidia ml^{-1}) were inoculated by spikelet injection and were kept under greenhouse conditions. Sampling was performed at various time points after inoculation and then the expression level of some genes involved in resistance and activity of relative enzyme was studied. Data analysis showed that disease severity was reduced in treated plants compared with control plants. Enzyme measurement showed the greatest variation for peroxidase and polyphenol oxidase enzymes. The results of molecular analysis by qRT-PCR showed significantly increased mRNA expression levels of beta-1, 3-glucanase and oxalate oxidase genes. The results of this research indicate that chitosan could influence plant resistance against pathogenic fungi through induction of systemic acquire resistance.

Keywords: chitosan, head blight, peroxidase, polyphenol oxidase, qRT-PCR.

* Corresponding author E-mail: sksabbagh@yazd.ac.ir Tel: +98 35 31232275

www.SID.ir