



## مقاله پژوهشی

## تأثیر کیتوزان بر القای مقاومت علیه بیماری سوختگی سپتوریویایی برگ گندم

صدیقه وردی‌پور<sup>۱</sup>، لیلا آهنگر<sup>۲\*</sup>، فاخک طلیعی<sup>۳</sup> و شهریار کیا<sup>۴</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۹)

## چکیده

بیماری سپتوریوز برگ‌گی ناشی از قارچ آسکومیست *Zymoseptoria tritici* از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در جهان می‌باشد که سالانه خسارت فراوانی به این محصول وارد می‌کند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر کیتوزان در دو غلظت صفر و ۲۰۰ پی پی ام، بر میزان بیان ژن‌های دفاعی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در رقم کوه‌دشت گندم (رقم حساس) در برهمکنش با عامل بیماری سپتوریوز برگ‌گی بود. بدین منظور گیاهچه‌های دو هفته‌ای بوسیله کیتوزان اسپری برگ‌گی شدند، سپس گیاهان تیمار شده به همراه گیاهان شاهد، توسط قارچ عامل بیماری مایه‌زنی شدند. در نهایت الگوی بیان ژن‌های *PR1*، *PR2* و *PR5* در بازه‌های زمانی ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶ و ۲۴۰ ساعت پس از آلودگی با استفاده از تکنیک *qRT-PCR* مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج به دست آمده، شدت آلودگی در برگ گیاهان تیمار شده با کیتوزان حدود ۵۵ درصد نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت. نتایج *qPCR* نشان‌دهنده افزایش میزان بیان ژن‌ها در گیاهان تیمار شده و شاهد بود. بیست و چهار ساعت پس از آلودگی، بیان ژن‌های *PR1*، *PR2* و *PR5* در گیاهان تیمار شده به ترتیب ۷/۵، ۴/۱۵ و ۳/۷۶ برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. تغییرات میزان فعالیت آنزیم‌ها بیانگر روند افزایشی آنزیم پراکسیداز و سیر کاهش آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با کیتوزان نسبت به گیاهان شاهد بود. بررسی الگوی تغییرات ژن‌ها و آنزیم‌ها حکایت از نقش موثر کیتوزان در القای مقاومت در گندم حساس به بیماری سپتوریوز برگ‌گی دارد.

کلیدواژه: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، القای مقاومت، القا کننده، بیان ژن و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: l.ahangar63@gmail.com

۱. کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی، گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبدکاووس

۲. استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبدکاووس

۳. استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبدکاووس

۴. اسنادیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش

و تحقیق کشاورزی، گنبدکاووس، ایران



## Research Article

# The effect of chitosan on induced resistance against *Septoria* leaf blotch of wheat

S. Vardipour<sup>1</sup>, L. Ahangar<sup>2\*</sup>, F. Taliei<sup>3</sup>, and S. Kia<sup>4</sup>

(Received: 20.6.2021; Accepted: 1.10.2021)

## Abstract

The septoria leaf spot caused by *Zymoseptoria tritici* is one of the most destructive wheat diseases in the world, which causes lots of damage to this crop annually. The aim of this study was to investigate the effect of 0 and 200 ppm of chitosan on the expression of defense genes and antioxidant enzymes (peroxidase, catalase and ascorbate peroxidase) activity, in Koohdasht wheat cultivar (susceptible cultivar) in interaction with the pathogen. Therefore, two-week plants were sprayed with chitosan, and then treated plants along with control plants were inoculated with *Z. tritici* pathogen. Finally, the expression rate of *PR1*, *PR2* and *PR5* genes were examined using qRT-PCR technique at 0, 12, 24, 48, 96, and 240 hours after inoculation (hai). According to the results, disease severity reduced by about 55% in chitosan pre-treated plants compared to control. The results of qPCR showed that expression of mentioned genes increased in treated and control plants, but the expression of *PR1*, *PR2* and *PR5* genes increased by 7.5, 4.15 and 3.76 times more in treated plants compared to control in 24 hai, respectively. Comparing enzyme activity in chitosan pre-treated plants and control, indicates an increasing trend of peroxidase enzyme and a decreasing trend of catalase and ascorbate peroxidase in the first group of plants. The examined gene expression and antioxidants pattern changed in both groups of plants indicates the effectiveness of chitosan in inducing resistance against septoria leaf blotch in wheat.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Induced Resistance, Elicitor, Gene expression and Pathogenesis related proteins

\* Corresponding author's E-mail: l.ahangar63@gmail.com

1. M.Sc. of Biotechnology, Department of Plant Production, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University
2. Assistant Professors of Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran.
3. Assistant Professors of Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran.
4. Assistant Professor of Department of Horticulture and Crop Research, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran.

## مقدمه

(Iriti & Faoro 2004). اما تفاوت اصلی گیاه حساس و مقاوم، شناسایی به موقع عامل بیماری‌زای مهاجم و فعال-سازی سریع سازو کارهای دفاعی در گیاه مقاوم است. بنابراین در سال‌های اخیر در کنار استفاده از ارقام مقاوم، به کاربرد ترکیبات طبیعی و مصنوعی که مکانیزم دفاعی گیاه را قبل از رویارویی با بیمارگر فعال می‌کنند و فاقد اثرات زیست محیطی مخرب می‌باشند، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Dordas et al. 2009). از این رو پدیده مقاومت القایی می‌تواند به عنوان یک پدیده جایگزین طبیعی و دوستدار طبیعت در کشاورزی پایدار و سالم مورد استفاده قرار گیرد.

کیتوزان یک پلیمر پلی کاتیونی از بتا-۱،۴ دی گلوکز آمین است که از دی‌استیله شدن کیتین تولید می‌شود. این ماده منشا طبیعی داشته و از پوست میگو و خرچنگ مشتق می‌گردد. کیتوزان با اثر مستقیم خود سبب ممانعت از رشد میسلیوم در برخی قارچ‌ها و شبه قارچ‌ها می‌گردد (Amborabe et al. 2008; El Hadrami et al. 2010) و از سویی به طور غیرمستقیم با القای مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR)، سبب فعال کردن پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، تشکیل پینه، تولید و تجمع فیتوآلکسین‌ها و لیگنین در گیاه میزبان شده و در نهایت موجب حفاظت از آن‌ها در مقابل میکروارگانیزم‌ها می‌گردد (Modina et al. 2009, 2018, Popova et al., 2018 و Abdel-Rahman et al., 2021). امروزه کیتوزان به عنوان یک ماده زیستی جدید، غیرسمی، خاصیت ضد قارچی و القاکننده مقاومت، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Joseph et al. 2021). گزارش‌های متعددی از فعالیت ضد قارچی کیتوزان در برابر گونه‌های مختلف قارچ نظیر *Fusarium graminearum* (Kheiri et al. 2016)، *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Rahneshan et al. 2020) در

بیماری سپتوریوز برگ‌گی یا (STB) *Septoria leaf blotch* or *Septoria tritici blotch* که به‌وسیله قارچ آسکومیست *Zymoseptoria tritici* ایجاد می‌گردد، یکی از بیماری‌های مخرب گندم بوده که سالیانه خسارات فراوانی را به محصول گندم وارد می‌سازد (Quaedvlieg et al. 2011). گزارش‌های متعددی از اپیدمی شدن بیماری در برخی استان‌های کشور از جمله گلستان و خوزستان وجود دارد به طوری که میزان کاهش محصول در این استان‌ها تا ۴۴٪ برآورد شده است (Kia & Torabi 2008). مدیریت این بیماری معمولاً با استفاده از روش‌های متداول زراعی، به کار بردن ارقام مقاوم و قارچ‌کش‌ها انجام می‌گردد (Adhikari et al. 2007). اما به دلیل ناکارآمد بودن روش‌های زراعی در مهار موثر بیماری، مقاومت جدایه‌های قارچ به سموم، هزینه بالا و آلودگی زیست محیطی ناشی از مصرف سموم، کاربرد ارقام مقاوم، می‌تواند اقتصادی‌ترین، بهترین و سالم‌ترین روش مقابله با بیماری باشد (Berraies et al. 2013)

دانش ژنتیک مقاومت، برای اصلاح گندم به بیماری‌ها از جمله سپتوریوز برگ‌گی بسیار مهم است. در گیاهان مقاوم به بیماری به توانایی گیاه در پیشگیری و محدود کردن رشد پاتوژن اطلاق می‌گردد (Orzali et al. 2014). همه گیاهان چه حساس و چه مقاوم، از طریق القا سیستم‌های سیگنالینگ هماهنگ شده، به حملات پاتوژن‌ها پاسخ می‌دهند (Pieterse et al. 2009). این پاسخ‌های دفاعی سیستمیک گیاهی شامل افزایش میزان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) و آنزیم‌های درگیر در مکانیسم دفاعی نظیر پراکسیداز (POX)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) می‌باشد

## مواد و روش‌ها

### تهیه و تکثیر قارچ عامل سپتوریوز برگی و تلقیح گیاه

از جدایه قارچ بیمارگر *Zymoseptoria tritici*، تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع گرگان، برای تهیه مایه تلقیح استفاده شد. در ابتدا پلاگ‌های قارچ روی تشتک پتری حاوی محیط کشت جامد (YGA Yeast Glucose Agar) کشت شده و در دمای ۲۲-۱۸ درجه سلیسیوس نگهداری شد. پس از ۱۰-۷ روز پلاگ‌های قارچی به محیط کشت مایع YGB منتقل شدند. فلاسک‌های حاوی محیط کشت مایع روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) به مدت ۵ روز نگهداری شده و سوسپانسیون به دست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس جمعیت اسپورها با استفاده از لام گلبول‌شمار تعیین گردید. غلظت نهایی سوسپانسیون اسپوری برای اسپورپاشی حدود  $10^7$  اسپور بر میلی‌لیتر تنظیم شد (Kia & Sughi 2012).

### کاشت گیاه و تیمار کیتوزان

در این پژوهش از بذور گندم رقم کوه‌دشت به عنوان رقم حساس به بیماری سپتوریوز برگی استفاده شد (Kia & Sughi 2012). بذور ابتدا با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۲ دقیقه ضد عفونی شده و پس از سه بار شستشو با آب مقطر در گلدان‌های ۲ کیلویی حاوی خاک سترون (شامل ترکیبی از خاک باغچه و پرلیت به نسبت ۱:۲) کشت شدند. سپس در شرایط گلخانه با دمای ۲۲ درجه سانتیگراد با ۸ ساعت تاریکی و رطوبت ۸۵ درصد نگهداری شدند. کیتوزان (Sigma-Aldrich/MMV) در غلظت ۲۰۰ پی پی ام (برای حل نمودن کیتوزان ابتدا آن را با اسید استیک یک درصد حل نموده و سپس به حجم

گندم و قارچ *F. fujikuroi* در برنج (Ebrahimi et al. 2020) ارائه شده است. بنابراین تیمار گیاهان با القاکننده مقاومت کیتوزان سبب افزایش و تقویت پاسخ‌های دفاعی در آن‌ها می‌گردد. نتایج حاصل از بذرمال کردن گندم با کیتوزان نشان‌دهنده کاهش شدت بیماری ناشی از *F. graminearum* در گندم تیمار شده و افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و فنل در این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد بود (Orzali et al. 2014). گزارش‌ها بیانگر آن است که محلول‌پاشی کیتوزان بر برگ‌های گندم سبب افزایش بیان ژن‌های کیتیناز، *PR2* و *PAL* گردید (Díaz-Martínez et al. 2018). پژوهش انجام شده در مورد برنج تیمار شده با نانوکیتوزان نشان داده است که تیمار نانو کیتوزان نه تنها سبب افزایش درصد جوانه زنی و رشد بهتر گیاهچه‌های برنج شده، بلکه از سویی دیگر تیمار آن با برنج آلوده به بیماری‌های *Xanthomonase oryzae* و *Pyricularia grisea* سبب کاهش معنی‌دار شدت بیماری در شرایط گلخانه‌ای شد (Sathiyabama & Muthukumar 2020).

مواد شیمیایی که قادرند مقاومت را علیه طیف وسیعی از بیماری‌ها القا کنند، ابزار و فرصت مناسبی برای کشاورزان ایجاد کرده و کامل‌کننده مقاومت ژنتیکی گیاهان به بیماری می‌باشند. از سویی افزایش آگاهی در مورد مکانیسم‌های بیوشیمیایی پاسخ‌های دفاعی گیاه مثل القاکننده‌ها، سینگال‌دهی مولکولی و آنزیم‌های دفاعی، اطلاعات مفیدی را جهت بهبود مقاومت به بیمارگر فراهم می‌کند. هدف این پژوهش، ارزیابی تأثیر محلول‌پاشی کیتوزان بر توسعه‌ی بیماری سپتوریوز برگی گندم در شرایط گلخانه‌ای و همچنین کسب اطلاع از نحوه‌ی تغییرات میزان بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد.

جدول ۱. لیست آغازگرهای مورد استفاده به همراه محصول نهایی

**Table 1. List of primers and their sequences**

Gene name	Primers	Product (bp)	GeneBank Accession No
<i>TaActin</i>	F: AGCCCAATCATAGGAAAAGTGC R: AGTGTCTGGATCGGTGGTTC	150	DN551593
<i>TaPR1-1</i>	F: ACTACGACTACGCTCCAACA R: TCGTAGTTGCAGGTGATGAAG	154	AJ007348
<i>TaPR2</i>	F: AGCAGAACTGGGGACTCTTCT R: CACATACGTACCGCATAACG	150	Z22874
<i>TaPR5</i>	F: CAGGACTTCTACGACATCTCG R: TCTGGTAGTTATTATTGCCACTGC	143	AF389883.1 and X58394.1

جهت زدودن DNA بوسیله آنزیم DNase 1 شرکت سیناکلون (cat. No: MO5401) تیمار شده و cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis شرکت سیناکلون (cat. No: RT5201) ساخته شد. تمامی این مراحل طبق دستورالعمل هر کیت انجام گرفت. بررسی بیان ژن (qRT-PCR) با استفاده از دستگاه C1000™ Thermal Cycler (AB) و کیت Sina SYBR Blue HS- qPCR Mix (2X) (Cat. No: MM2171) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۷ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس سپس ۴۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سلسیوس و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس) بود. پس از اتمام واکنش PCR، برای رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ۹۵-۶۰ درجه سلسیوس با اختلاف ۰/۵ درجه در هر چرخه انجام گرفت. به منظور استاندارد نمودن داده‌ها، نمونه‌ها بوسیله ژن خانه دار Actin نرمال گردیدند. لیست آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. این آغازگرها پس از هم ردیف نمودن توالی‌های بدست آمده از بانک ژنی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) بوسیله نرم افزارهای BioEdit 7.0.9.0 و OligoExplorer V1.4 طراحی شدند. این آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام گردید و نرخ بیان ژن به روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  اندازه‌گیری شد (livak &

مورد نظر رسانیده شد) جهت القاء مقاومت به صورت اسپری روی برگ‌های گیاهچه‌های دو هفته‌ای، دو مرتبه با فاصله ۲۴ ساعت استفاده شد. گیاهچه‌های تیمار شده پس از گذشت ۲۴ ساعت از محلول پاشی به همراه گیاهان شاهد (بدون تیمار کیتوزان) توسط قارچ بیمارگر *Z. tritici* اسپورپاشی شدند. گیاهچه‌های تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت در شرایط رطوبت اشباع قرار گرفته و در زیر پوشش پلی اتیلنی شفاف در دمای  $20 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه برداری در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶ و ۲۴۰ ساعت پس از آلودگی انجام شد. همچنین برای اندازه‌گیری واکنش گیاهچه‌های تیمار شده نسبت به بیماری، ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، از روش رتبه‌دهی ۰-۵ بر اساس تخمین درصد لکه‌های نکروتیک سطح برگ و پوشش پیکنیدیوم قارچ استفاده شد (Adhikari et al. 2003). تمامی مراحل پژوهش در سال زراعی ۱۳۹۷ در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه گنبدکاووس انجام شد. نتایج با استفاده از آزمون LSD واکاوی شد.

### استخراج RNA از نمونه‌ها و ساخت cDNA

برای استخراج RNA از نمونه‌های برگ‌گی، از کیت RNX-plus شرکت سیناژن (Cat, No: RN7713C) استفاده گردید. سپس کیفیت RNA استخراج شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد ارزیابی شد. آنگاه نمونه‌های RNA،

(Schmittgen 2001).

عصاره آنزیمی با ۹۸۰ میکرولیتر از بافر فسفات سرد حاوی آب اکسیژنه ۲ میلی مولار انجام شد و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از قانون بیر-لامبرت و ضریب خاموشی محصول کاتالیز گایاکول پراکسیداز ( $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد (Aebi 1984).

#### سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

برای سنجش فعالیت آنزیم APX از بافر فسفات مخلوط شده با EDTA ۰/۱ میلی مولار، اسید آسکوربیک ۵ میلی مولار و آب اکسیژنه ۰/۱ میلی مولار استفاده شد. با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (۲/۸) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه محاسبه شد (Nakano & Asada 1987).

واکاوی داده‌های حاصل از آزمایش با نرم افزار SAS انجام گرفت و با مشاهده تفاوت معنی دار در آنالیز واریانس، مقایسه میانگین در هر زمان با استفاده از آزمون t استیودنت انجام گرفت.

#### نتایج و بحث

##### ارزیابی توانایی کیتوزان در القای مقاومت به بیماری

بررسی علایم بیماری سپتوریوز برگی بر روی برگ گندم‌های تیمار شده با کیتوزان و شاهد نشان داد که اختلاف معنی داری ( $P < 0/01$ ) بین دو گروه از گیاهان از نظر درصد سطح برگی با لکه‌های بافت مرده حاوی پوشش پیکنیدیوم وجود دارد. به طوری که نتایج بیانگر

$$CT = (CT \text{ target gene} - CT \text{ actin})_{\text{sample}} - (CT \text{ target gene} - CT \text{ actin})_{\text{calibrator}} \Delta \Delta$$

پس از محاسبه بیان ژن‌های مورد مطالعه برای هر نمونه، انحراف معیار آن‌ها محاسبه و نتایج با استفاده از آزمون t استیودنت ارزیابی شد.

##### تهیه عصاره گیاهی و سنجش فعالیت آنزیمی

برای استخراج عصاره سلولی، ۰/۵ گرم از بافت گیاهی منجمد شده در نیتروژن مایع در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷) در دمای ۴ درجه سلسیوس ساییده و عصاره-گیری شد. سوسپانسیون حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

##### سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)

برای سنجش فعالیت آنزیم، ۴۹۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۲۲۵ مولار و ۴۹۰ میکرولیتر محلول گایاکول ۴۵ میلی مولار در دمای پایین با هم مخلوط گردید. پس از اضافه نمودن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از قانون بیر-لامبرت و ضریب خاموشی محصول کاتالیز گایاکول پراکسیداز ( $2676 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد (In et al. 2007).

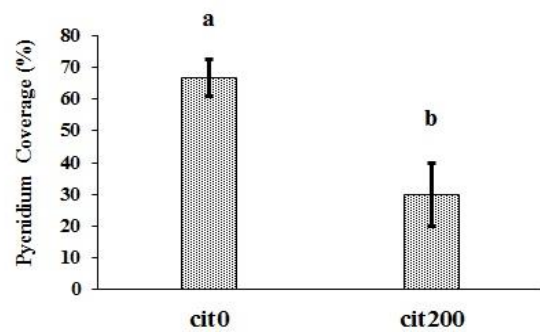
##### سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، با استفاده از ۲۰ میکرولیتر

سطح بیان خود رسیدند. گیاهان شاهد نیز روند افزایشی و کندی از بیان ژن را نشان داده و در ۴۸ ساعت پس از آلودگی با میزان بیان ۱۹/۱۵ برابری نسبت به زمان صفر به بیشینه بیان خود رسیدند. بررسی الگوی بیان ژن *PR1* نشان داد که اوج بیان ژن در گیاهان پیش تیمار شده بر خلاف گیاهان شاهد زودتر (۲۴ ساعت پس از آلودگی) رخ داد که میزان آن، ۷/۵ برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود ( $P < 0.01$ ) و پس از آن در دو گروه از گیاهان سیر نزولی نشان داد. اگرچه سطح بیان در ۹۶ و ۲۴۰ ساعت پس از آلودگی در گیاهان شاهد بیشتر از گیاهان پیش تیمار شده بود اما این اختلاف معنی دار نبود.

#### تغییرات الگوی بیان ژن *PR2* در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و شاهد پس از آلودگی

بررسی میزان بیان ژن *PR2* قبل از آلودگی با قارچ *Z. tritici* نشان داد که گیاهان پیش تیمار شده با کیتوزان بیان بیشتری را نسبت به گیاهان شاهد (۲/۶ برابری) نشان دادند ( $P < 0.05$ ). پس از آلودگی به بیمارگر، روند افزایشی بیان این ژن در هر دو گروه از گیاهان مشاهده شد اما میزان افزایش در گیاهان پیش تیمار شده به طور معنی داری بیشتر از گیاهان شاهد بود (شکل ۲). در بازه زمانی ۱۲ ساعت پس از آلودگی به بیماری در گیاهان تیمار شده، میزان بیان ۲/۵ برابر بیشتر از زمان صفر بود. این گیاهان سپس در ۲۴ ساعت بعد از اعمال آلودگی با ۱۱/۰۴ برابر افزایش بیان نسبت به زمان صفر به بیشترین میزان بیان خود رسید. در ۴۸ ساعت پس از آلودگی روند بیان ژن کاهش شد. گیاهان شاهد پس از کمی افزایش بیان در ساعات اولیه پس از آلودگی، نهایتاً با بیان نسبی ۹/۱۶ برابری نسبت به زمان صفر در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از آلودگی به بیشینه سطح بیان خود رسیدند و مجدداً در ۹۶ ساعت پس از



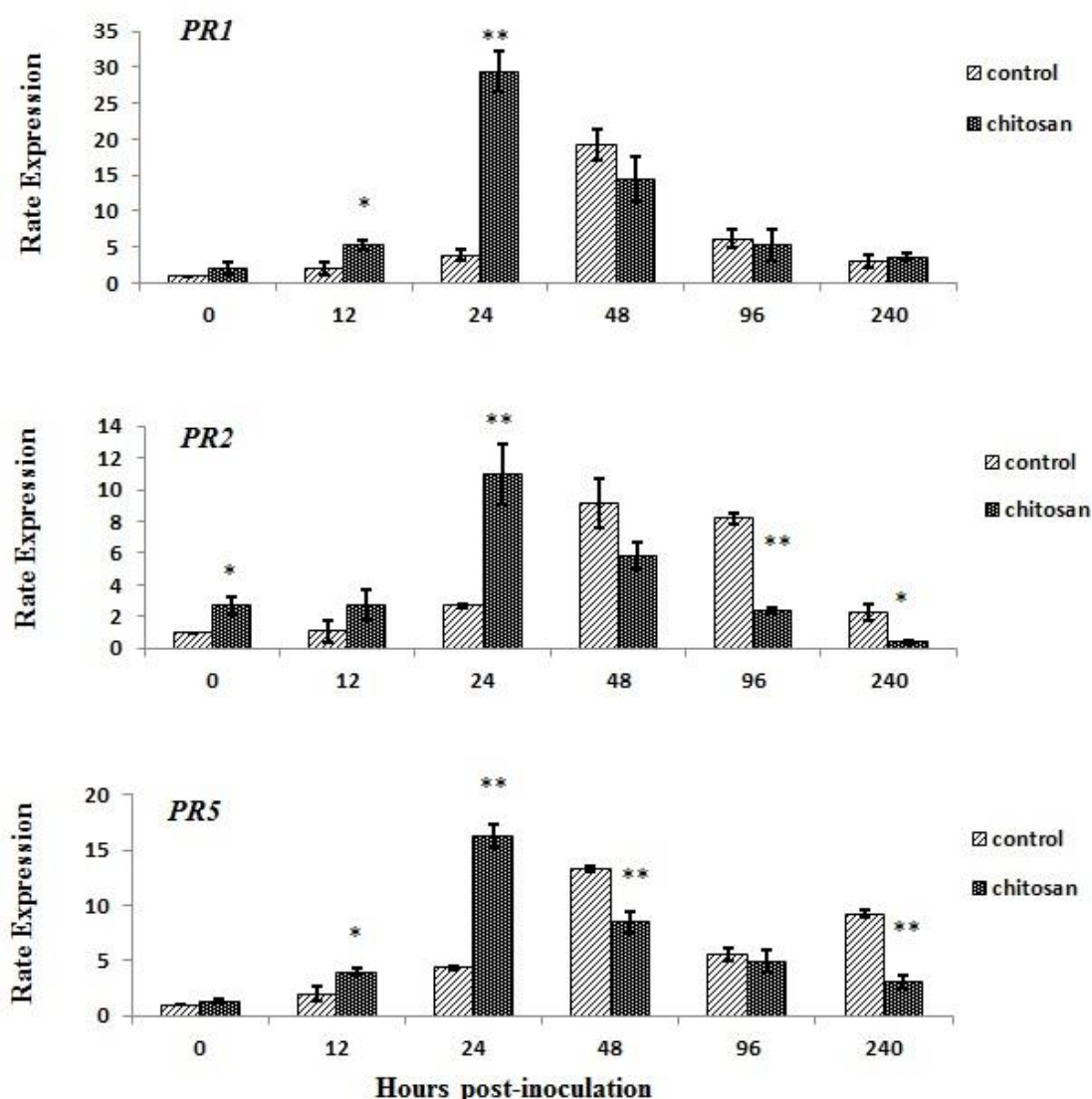
شکل ۱. درصد سطح برگ با لکه‌های بافت مرده حاوی پوشش پیکنیدیوم در غلظت‌های مختلف کیتوزان در گیاهان تیمار شده و شاهد. مقایسه میانگین به روش LSD ( $P < 0.05$ ) انجام شده است.

**Figure 1. Percentage of leaf area with necrotic lesions bearing pycnidia at different concentration of chitosan in plants treated with chitosan and control. Means Compared using LSD test ( $P < 0.05$ ).**

کاهش ۵۵ درصدی شدت آلودگی ناشی از قارچ *Z. tritici* در برگ گیاهان تیمار شده با کیتوزان نسبت به گیاهان شاهد بود (شکل ۱).

#### تغییرات الگوی بیان ژن *PR1* در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و شاهد پس از آلودگی

نتایج qPCR نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین گیاهان تیمار شده با کیتوزان و شاهد قبل از اعمال آلودگی از نظر بیان ژن *PR1* بود. در حالی که پس از اعمال بیماری توسط قارچ *Z. tritici*، بیان این ژن در هر دو گروه از گیاهان روند افزایشی نشان داد ولی میزان افزایش در گیاهان پیش تیمار شده به طور معنی داری بیشتر از گیاهان شاهد بوده است (شکل ۲). گیاهان پیش تیمار شده، ۱۲ ساعت پس از آلودگی با ۲/۵ برابر افزایش بیان، اختلاف معنی داری را ( $P < 0.05$ ) نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. سپس این گیاهان در ۲۴ ساعت پس از آلودگی با میزان بیان ۲۹/۴ برابری نسبت به زمان صفر به بیشترین



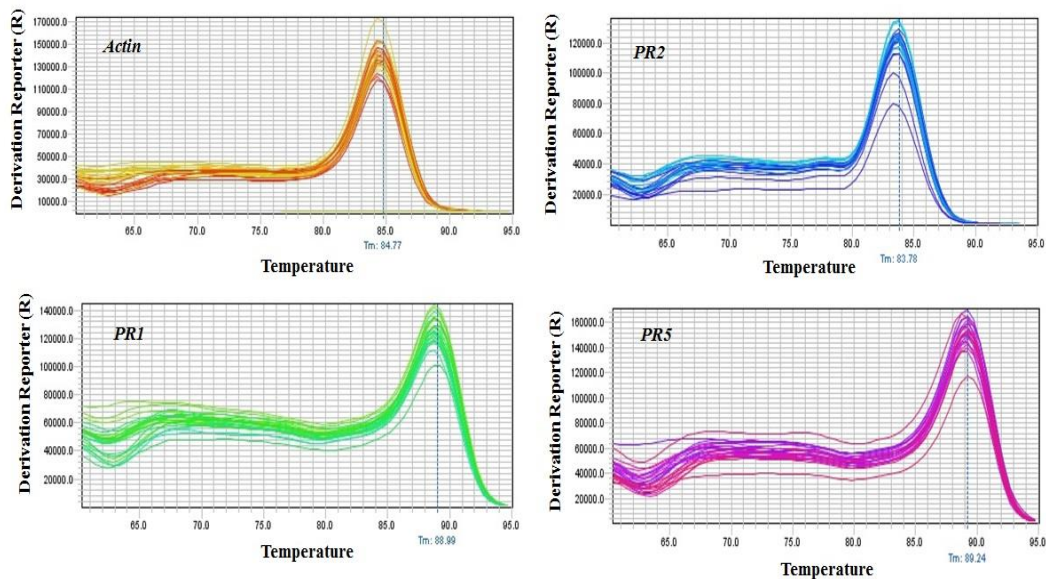
شکل ۲. سطح بیان ژن‌های *PR1*، *PR2* و *PR5* در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و گیاهان شاهد پس از آلودگی با بیمارگر *graminicola* *Mycosphaerella*. \* و \*\* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر بازه زمانی با استفاده از آزمون t استیودنت در سطوح ۰.۰۵ و ۰.۰۱ درصد می‌باشد.

Figure 2. Expression level of *PR1*, *PR2* and *PR5* genes in wheat plants treated with chitosan and control challenged by *Mycosphaerella graminicola*. \* and \*\* indicate significant differences at 0.05 and 0.01 level at time courses, respectively, using student's T- test.

گیاهان در بازه های بعدی زمانی روند کاهش بیان را نشان دادند اما میزان کاهش در گیاهان پیش تیمار شده به مراتب بیشتر از گیاهان شاهد بود به طوری که در زمان ۹۶ و ۲۴۰ ساعت پس از آلودگی گیاهان تیمار شده به ترتیب با کاهش ۳/۴ و ۵/۵ برابری بیان اختلاف معنی‌داری را با

آلودگی روند کاهش بیان را نشان دادند. نتایج الگوی تغییرات ژن *PR2* نشان داد که گیاهان پیش تیمار شده بر خلاف گیاهان شاهد زودتر (۲۴ ساعت پس از آلودگی) به بیشینه بیان رسیدند که این مقدار ۴/۱۵ برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود ( $P < 0.01$ ). در هر دو گروه از





شکل ۳. منحنی ذوب محصولات PCR ژن‌های *Actin*، *PR1*، *PR2* و *PR5* که نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی ژن مورد نظر می‌باشد.

Figure 3. Melting curve of PCR products for *PR1*، *PR2*، *PR5* and *Actin* genes, confirming their specific amplification.

بیشینه بیان خود رسیدند که این میزان بیان حدود ۱/۵ برابر بیشتر از گیاهان پیش تیمار شده بود. سپس هر دو گروه از گیاهان روند کاهش بیان را در پیش گرفتند اما در ۱۰ روز پس از آلودگی گیاهان شاهد با افزایش ۹/۱ برابری بیان نسبت به زمان صفر مجدداً روند افزایش بیان را نشان دادند که این افزایش بیان حدود ۲/۹ برابر بیشتر از گیاهان پیش تیمار شده بود.

در شکل ۳، منحنی ذوب ژن‌های مورد بررسی نشان داده شده است. عدم وجود پیک اضافه، نشان‌دهنده اختصاصی بودن آغازگرها و عدم وجود دایمر را تایید می‌کند.

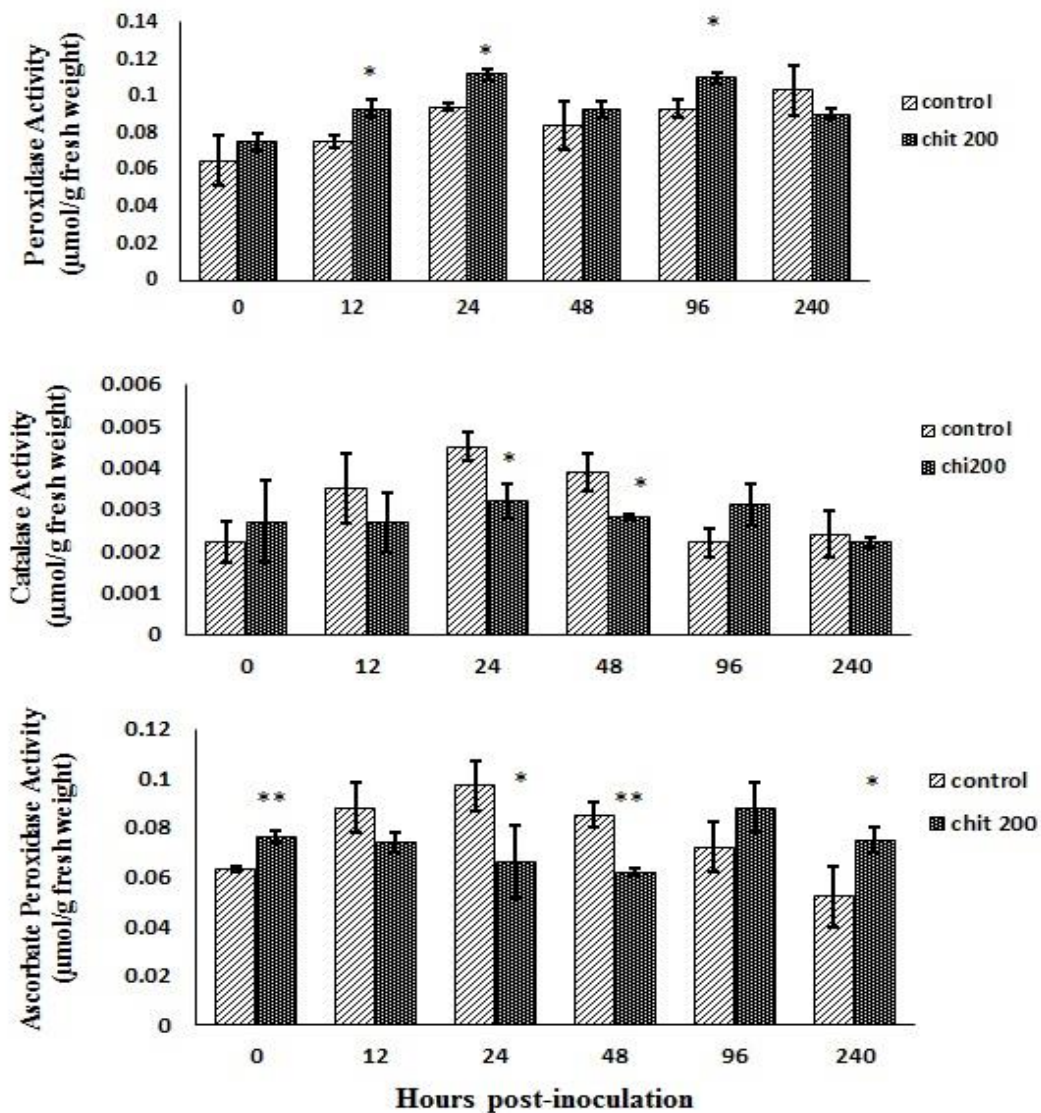
تغییرات الگوی آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و شاهد پس از آلودگی

بر اساس نتایج، فعالیت آنزیم POX پس از اعمال آلودگی با قارچ *Z. tritici* در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و گیاهان شاهد روند افزایشی داشت (شکل ۴). افزایش

گیاهان شاهد نشان دادند.

تغییرات الگوی بیان ژن *PR5* در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و شاهد پس از آلودگی

میزان رونوشت ژن *PR5* در گیاهان پیش تیمار شده با کیتوزان و شاهد پس از اعمال آلودگی با *Z. tritici* افزایش یافت، اما مقدار آن در گیاهان پیش تیمار شده در همان ساعات اولیه پس از آلودگی به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان شاهد بود (شکل ۲). میزان بیان این ژن در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی در گیاهان پیش تیمار شده با کیتوزان به ترتیب ۲ ( $P < 0/05$ ) و ۳/۷۶ ( $P < 0/01$ ) برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود. در ساعات بعدی آلودگی روند کاهش بیان در گیاهان پیش تیمار شده مشاهده گردید. در حالی که در گیاهان شاهد روند افزایشی آرامی از بیان ژن مشاهده شد به طوری که این گروه از گیاهان بر خلاف گیاهان پیش تیمار شده در زمان دیرتر (۴۸ ساعت پس از آلودگی) با میزان بیان ۱۳/۲ برابری نسبت به زمان صفر به



شکل ۴. میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و گیاهان شاهد پس از آلودگی با سپتوریا برگی. \* و \*\* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر بازه زمانی با استفاده از آزمون t استیودنت در سطوح ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

**Figure 4. Changes in the activity of Peroxidase, Catalase and Ascorbate peroxidase in chitosan treated plant and control after inoculation with *Mycosphaerella graminicola*. \* and \*\* indicate significant difference at 0.05 and 0.01 level at time course, respectively, using student's T- test.**

به گیاهان شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0.01$ ). سپس در ۴۸ ساعت پس از آلودگی، در هر دو گروه از گیاهان روند کاهشی از میزان فعالیت آنزیم دیده شد ولی مجدداً در ۹۶ ساعت پس از آلودگی سیر صعودی از فعالیت آنزیم مشاهده شد، اما میزان افزایش در گیاهان

فعالیت این آنزیم، ۱۲ ساعت پس از آلودگی در هر دو گروه از گیاهان آغاز گردید و سپس در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بیشینه میزان خود رسید. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که گیاهان تیمار شده در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی به ترتیب با میزان فعالیت ۱/۲ و ۱/۱ برابری نسبت

تیمار شده به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان شاهد (۱/۲ برابر) بود.

### تغییرات الگوی آنزیم کاتالاز در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و شاهد پس از آلودگی

بررسی نتایج فعالیت آنزیم کاتالاز در هر بازه زمانی پس از آلودگی با قارچ *Z. tritici* حاکی از افزایش معنی‌دار میزان فعالیت این آنزیم در گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان پیش تیمار شده بود (شکل ۴). گیاهان شاهد پس از آلودگی روند افزایشی از میزان فعالیت آنزیم را نشان دادند و ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بیشترین میزان فعالیت آنزیمی خود رسیدند. در حالیکه گیاهان پیش تیمار شده روند افزایشی ولی نسبتاً کندی از میزان فعالیت آنزیم را پس از آلودگی نشان داده و همانند گیاهان شاهد در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بیشینه فعالیت خود رسیدند. اگرچه هر دو گروه از گیاهان در یک بازه زمانی به بیشینه میزان فعالیت آنزیمی رسیدند اما مقایسه میزان تغییرات آنزیمی نشان داد که گیاهان شاهد با میزان فعالیت ۱/۴ برابری نسبت به گیاهان پیش تیمار شده تفاوت معنی‌داری را ( $P < 0/05$ ) نشان دادند. در ۴۸ ساعت پس از آلودگی رشد کاهشی از میزان فعالیت آنزیم CAT در هر دو گروه از گیاهان مشاهده شد. سپس در ۹۶ و ۲۴۰ ساعت پس از آلودگی روند افزایشی از فعالیت کاتالاز در گیاهان تیمار شده مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با گیاهان شاهد نشان نداد.

### تغییرات الگوی آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با کیتوزان و شاهد پس از آلودگی

نتایج مطالعات آنزیمی نشان داد که پس از تیمار کیتوزان میزان فعالیت آنزیم APX در گندم حساس به

قارچ *Z. tritici* به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت (شکل ۴).

اما پس از اعمال بیماری میزان فعالیت آنزیم در گیاهان پیش تیمار شده روند کاهشی را نشان داد، به طوری که در بازه‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی کمترین میزان فعالیت APX در این گیاهان دیده شد. اما میزان فعالیت آنزیم APX در گیاهان شاهد در ۱۲ ساعت پس از آلودگی القا گردید و سپس در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بالاترین حد خود رسید، که این میزان فعالیت حدود ۱/۴۷ برابر بیشتر از گیاهان پیش تیمار شده بود. گیاهان شاهد در ۴۸ ساعت پس از آلودگی روند نزولی از فعالیت آنزیم را نشان دادند به طوری که در ۲۴۰ ساعت پس از آلودگی کمترین میزان آنزیم در این گیاهان دیده شد. در مقابل گیاهان تیمار شده با کیتوزان، ۹۶ ساعت پس از آلودگی سیر صعودی از فعالیت آنزیم را نشان دادند و ۱۰ روز پس از آلودگی با افزایش ۱/۴ برابری نسبت به گیاهان شاهد تفاوت معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را نشان دادند.

### بحث

در پژوهش حاضر امکان القای مقاومت در گندم توسط کیتوزان در برابر عامل بیماری سپتوریوز برگگی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات نشان داد که میزان تاثیر کیتوزان بر تحریک پاسخ‌های گیاهی به نوع پاتوسیستم، غلظت کیتوزان و نحوه مصرف آن بستگی دارد (El Hadrami et al. 2010). در این پژوهش نشان داده شد که محلول پاشی کیتوزان با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام بر روی برگ گندم سبب کاهش ۵۵ درصدی شدت بیماری نسبت به گیاهان شاهد گردید که نشان‌دهنده توانایی کیتوزان در ممانعت از توسعه بیماری می‌باشد. فعالیت ضدقارچی کیتوزان علیه بیمارگرهایی مانند *Blumeria garminis*

پروتئین روی غشاء بیمارگر موثر باشد اما سازوکار دقیق نحوه عملکرد آن‌ها هنوز به درستی شناسایی نشده است (Van Loon et al. 2006). سلطانی و همکاران (Soltanloo et al. 2010) نیز طی پژوهش‌های خود به این نتیجه رسیدند که پروتئین‌های PR1 با اثر مستقیمی که روی بیمارگر *Fusarium graminearum* دارند، می‌توانند باعث کاهش رشد بیمارگر شوند. نتایج پژوهش‌های آهانگر و همکاران (Ahangar et al. 2016) روی بیماری سفیدک سطحی گندم نیز نشان داده است که بیان ژن *PR1b* در همان ساعات اولیه پس از آلودگی افزایش یافته و سپس در زمان اوج حمله قارچ (۲۴ ساعت پس از آلودگی) به حداکثر میزان رونوشت خود می‌رسد. کریمی فرساد و همکاران (Karimi Farsad et al. 2013) بیان بالایی از ژن *PR1* را در ۱۲ ساعت پس از آلودگی در گندم مقاوم به بیماری سپتوریا نسبت به رقم حساس مشاهده و اظهار نمودند این ژن در ایجاد مقاومت بسیار حایز اهمیت می‌باشد. این نتایج می‌تواند تایید کننده علت افزایش رونوشت ژن *PR1* در تمامی ساعات نمونه برداری در گیاهان تیمار شده و گیاه شاهد در پژوهش حاضر باشد. از سویی نتایج این بررسی حاکی از اختلاف زمان در بیشینه بیان در دو گروه از گیاهان می‌باشد که بیانگر موثر بودن کیتوزان در القای مقاومت گندم به بیماری سپتوریوز برگی می‌باشد که با نتایج افزایش بیان ژن *PR1* در گندم تیمار شده با کیتوزان تحت بیماری بلایت فوزاریومی خوشه مطابقت داشت (Ghazimohseni & Sabbagh 2015).

پروتئین‌های PR2 که به بتا ۱-۳ گلوکانازها شهرت دارند دومین گروه از PR پروتئین‌ها می‌باشند که توانایی هیدرولیز پلیمرهای گلوکوزیدی را که واحدهای آن با پیوند بتا-۱ و ۳ گلوکان به یکدیگر متصل شده‌اند، را دارد. هرناندز و همکاران (Hernández et al. 2005) نشان دادند

در *Cercospora beticola* و *Fusarium graminearum* بررسی‌های گذشته (Khatami et al. 2019; Orzali et al. 2014; Felipini & Di-Piero 2013) اثبات شده است. مکانیزم‌های مختلف عملکرد کیتوزان مورد مطالعه قرار گرفته است که شامل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، حذف گونه‌های اکسیژن فعال، فعال‌سازی مسیر اکتادکانوئید و همچنین بیان ژن‌های دفاعی مانند PR پروتئین می‌باشد (El-Hadrami et al., 2010). با وجود این مطالعات، تحقیقات اندکی به طور خاص به نقش آغازگری در تعامل کیتوزان و گیاه پرداخته‌اند. شواهد نشان می‌دهد سیگنال زخم به صورت سیستماتیک، از محل حمله بیمارگر به مناطق بدون آسیب که آماده‌سازی یا القای مستقیم واکنش‌های دفاعی در آن صورت می‌گیرد، منتقل می‌شود (Frost et al., 2008). در مکانیسم پیام‌رسانی، آسیب ناشی از عوامل بیماری‌زا در دیواره سلولی گیاه می‌تواند نقطه شروع باشد. لذا الیسیتورهای آزاد شده در گیاه طی حمله بیمارگر از طریق یک مسیر سیگنال‌دهی که توسط مولکول‌های مرتبط با بیمارگر فعال شدند به مقاومت پایه در برابر عوامل بیمارگر کمک می‌کند (Aranega-Bu et al. 2014).

نتایج بررسی بیان ژن نشان داد که محلول پاشی کیتوزان سبب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی شده است. پروتئین‌های PR1 از فراوانترین پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌باشند که به نوعی می‌توانند القاکننده فعالیت سیستم دفاعی گیاه باشند (Sels et al. 2008). افزایش فعالیت ژن *PR1* به عنوان یکی از نشانه‌های مقاومت غلات به بیماری‌های قارچی شناسایی شده است بطوریکه نقش ضدقارچی PR1 در سیستم دفاعی گندم و جو برای جلوگیری از نفوذ سفیدک سطحی توسط زین و همکاران (Xin et al. 2012) تایید شده است. به نظر می‌رسد این

به بیماری بلاست و بلایت فوزاریوم سنبله (Ha et al, 2016) نسبت به ارقام حساس به بیماری مشاهده شده است. در این پژوهش روند افزایش بیان در گیاهان تیمار شده به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان شاهد بود و ۲۴ ساعت پس از آلودگی، میزان بیان این ژن به بیشینه مقدار خود رسید که می‌تواند بیانگر موثر بودن نقش القاکنندگی کیتوزان در القا مقاومت از طریق بیان زودهنگام و بالای ژن‌های مقاومت باشد. نایاکا سیدایا و همکاران (Siddaiah et al. 2018) طی مطالعه بر روی ارزن آلوده به سفیدک پودی نشان دادند که میزان بیان ژن‌های *PR1* و *PR5* در این گیاهان پس از اعمال آلودگی افزایش می‌یابد اما تیمار با کیتوزان و نانوکیتوزان این روند افزایشی را تشدید می‌کند لذا کاربرد نانوکیتوزان را برای کنترل بیماری بسیار موثر دانستند.

تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) یکی از سریع‌ترین پاسخ‌های سلولی به دنبال شناسایی موفقیت آمیز بیمارگر می‌باشد (Zhao et al. 2005) که سبب آسیب‌های اکسیداتیو مثل پراکسیداسیون لیپیدی، تخریب غشای پلاسمایی و غیرفعال نمودن پروتئین‌ها می‌گردد (Torres et al. 2006). گیاهان برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مختلفی مانند POX، APX و CAT را تولید می‌نمایند که در متابولیسم ROS، در طی حمله بیمارگر دخیل می‌باشند (Gill & Tuteja 2010). هارچ و همکاران (Harrach et al. 2005) نشان دادند که تغییرات آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند در واکنش‌های حساسیت و مقاومت به آلودگی بیمارگر بسیار مهم باشد. در پژوهش حاضر تغییرات معنی‌داری از فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گندم‌های آلوده به سپتوریوز در حضور و غیاب کیتوزان مشاهده شد اما میزان افزایش پراکسیداز و کاهش کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز

که این پروتئین با تخریب دیواره سلولی قارچ سبب آزادسازی الیگوساکاریدها می‌شود که متعاقب آن پاسخ‌های دفاعی ثانویه گیاه در برابر بیمارگر را با تولید فیتوالکسین‌ها فعال می‌نماید. نتایج این تحقیق حاکی از بیان بالای ژن *PR2* در گیاهان تیمار شده با کیتوزان نسبت به گیاهان شاهد قبل و پس از آلودگی با بیمارگر بود که می‌تواند نشان دهنده موثر بودن این القاکننده در تقویت سیستم دفاعی گیاه باشد. بیان بالای ژن‌های *PR1* و *PR2* در گندم تیمار شده با کیتوزان و آلوده به سفیدک سطحی، نسبت به گیاهان شاهد تایید کننده اثر القاکنندگی کیتوزان می‌باشد (Rahnesan et al. 2020). همچنین تیمار کیتوزان و نانوکیتوزان به طور معنی‌داری از رشد میسیلیوم قارچ و تعداد کلونی‌های تشکیل شده توسط قارچ *F. graminearum* در گندم ممانعت می‌نماید که علت آن دهدراته و دفرمه شدن میسیلیوم قارچ تحت تیمار با کیتوزان و نانوکیتوزان است (Kheiri et al. 2016).

در این پژوهش، روند افزایشی بیان ژن *PR5* در گیاهان تیمار شده و شاهد پس از آلودگی، بیانگر فعالیت ضدقارچی این پروتئین در برابر بیمارگر می‌باشد. پروتئین *PR5* دارای ایزوفرم‌های مختلفی است که هر کدام از آن‌ها دارای نقش خاصی مانند خواص ضد قارچی، ضد میکروبی و حفاظت از گیاهان در مقابل تنش‌ها هستند (Gonzales et al. 2013). این پروتئین با روش‌های مختلفی مانند غیر فعال نمودن پروتئیناز، هضم دیواره سلولی و پروتئین‌ها، تداخل در تکثیر و کاهش نفوذ بیمارگر، جلوگیری از رشد و توسعه هیف‌های قارچ، هضم اسپور و یا کاهش جوانه‌زنی اسپور از رشد پاتوژن جلوگیری می‌کند (El-kereamy et al. 2011). بیان بالای ژن‌های *PR1* و *PR5* در ارقام جوی مقاوم به سفیدک پودی (Mohammadi et al. 2017) و ارقام گندم مقاوم

حمله بیمارگر می‌گردد (Mittler *et al.* 1999). لذا کاهش معنی‌دار این آنزیم در گیاهان پیش تیمار شده را می‌توان بوسیله افزایش سطح  $H_2O_2$  در القای مرگ سلول‌های مورد حمله بیمارگر در فاز بیوتروفی آن توجیه نمود. تیمار کیتوزان با تغییر ترکیبات فنولی و آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گندم آلوده شده با قارچ *F. graminearum* سبب کاهش شدت بیماری در گیاهان تیمار شده و بهبود پارامترهای عملکرد گردید (Orzali *et al.* 2014).

آنزیم کاتالاز (CAT) یکی دیگر از آنزیم‌های کلیدی جاروب‌کننده  $H_2O_2$  در گیاهان است که در فعالیت‌های دفاعی و واکنش‌های فوق حساسیت در برابر قارچ‌ها نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند (Popova *et al.* 2018). ماکسیمو و همکاران (Maksimov *et al.* 2009) طی بررسی دو نژاد بیماری‌زا ضعیف و قوی *M. graminicola* نشان دادند که نژاد بیماری‌زای قوی در همان مراحل اولیه رشد با افزایش سطح CAT، از طریق تزریق این آنزیم به داخل بافت گیاهی سبب کاهش سطح  $H_2O_2$  در گیاه شده تا شرایط مناسب را برای توسعه بیماری فراهم نماید که این پدیده بیانگر نقش بسیار مهم این آنزیم در کنترل رشد بیمارگر می‌باشد. بنابراین در این پژوهش فعالیت بالای آنزیم CAT در گیاهان شاهد را می‌توان به تزریق کاتالاز توسط قارچ به گیاه میزبان نسبت داد. نتایج این تحقیق همچنین وجود همبستگی مثبت بین میزان فعالیت آنزیم-های APX و CAT طی تیمار با کیتوزان را نشان می‌دهد. به طوری که همکاری این دو آنزیم در گندم‌های تیمار شده با کیتوزان توانست با حذف ROS ها سبب کاهش سطح  $H_2O_2$  در گیاهان شده و اثرات سوء تنش را کاهش دهند. بنابراین بر اساس تحقیقات ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی کیتوزان می‌تواند مقاومت در برابر تنش قارچی حاصله را در گیاهان تیمار شده افزایش دهد (Siddaiah *et al.*

در گیاهان تیمار شده با کیتوزان به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان شاهد بود که می‌تواند بیانگر موثر بودن نقش کیتوزان در القای مقاومت در گندم باشد. آنزیم پراکسیداز از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با ایزوزایم‌های مختلف است که در بسیاری از فرآیندهای سلولی از قبیل متابولیسم اکسین، اکسیداتیو متابولیت‌ها با واسطه پراکسید هیدروژن به عنوان پذیرنده الکترون، اتصالات عرضی در دیواره سلولی و لیگنینی شدن سلول‌های گیاهی به عنوان یک مکانیسم مهم مقاومتی به طیف وسیعی از قارچ‌ها از جمله سفیدک و زنگ شرکت می‌کند (Moldenhauer *et al.* 2006). طبق بررسی‌ها تجمع بالای پراکسیداز سبب ممانعت از رشد قارچ *S. tritici* شده است (Collinge & Lyngs Jrgensen 2009). همچنین فعالیت بالای آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری سفیدک سطحی نسبت به ژنوتیپ‌های حساس بیانگر همبستگی بین این آنزیم با کاهش شدت آلودگی بود (Kovács *et al.* 2011). آنزیم آسکوربات پراکسیداز، به کمک آسکوربات به عنوان دهنده الکترون نقش بسیار مهمی را در سرکوب کردن تجمع  $H_2O_2$  به خصوص در کلروپلاست ایفا می‌کند (Correa-Aragunde *et al.* 2013). مطالعات نشان داد که کیتوزان سبب افزایش فعالیت APX در گیاهچه‌های برنج شده است (Pongprayoon *et al.* 2013) که با نتایج این تحقیق مبنی بر فعالیت بالای این آنزیم در گندم تیمار شده با کیتوزان مطابقت دارد. اما پس از آلودگی، فعالیت APX در گیاهان تیمار شده سیر نزولی را نشان داد به طوری که در ۲۴ ساعت پس از آلودگی بیشترین اختلاف بین دو گروه از گیاهان دیده شد. در تعامل بین گیاه و بیمارگر، بیان آنزیم‌های سمیت‌زدا ROS مانند APX سرکوب می‌گردد. این ممانعت نقش مهمی در افزایش سطح ROS ایفا نموده و سبب القای مرگ سلولی و سایر پاسخ‌های دفاعی در طی

(2018).

میزبان در مقابل آنزیم‌های قارچ و مواد سمی محافظت می‌کند (Shetty et al. 2009). در مجموع نتیجه‌گیری می‌شود که پیش تیمار کردن کیتوزان بر روی برگ رقم حساس گندم سبب افزایش سرعت و زمان پاسخ‌های دفاعی در گیاهان پیش تیمار شده گردید. به طوری که میزان بیان ژن‌های دفاعی *PR1*، *PR2* و *PR5* در گیاهان تیمار شده در ۲۴ ساعت پس از آلودگی افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. به علاوه نتایج این پژوهش بیانگر تغییرات معنی‌دار آنزیم‌های CAT، POX و POX در گندم تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد پس از آلودگی به سپتوریوز برگی است که بخشی از واکنش مقاومت در گیاه محسوب می‌گردد. بنابراین کیتوزان را می‌توان به عنوان یک ماده ضد میکروبی علیه قارچ *Z. tritici* دانست و می‌توان مصرف آن را برای کاهش اقتصادی خسارت ناشی از بیماری با حداقل خسارت به محیط زیست مد نظر داشت.

پس از شناسایی القاکننده توسط گیاه، مسیرهای سیگنالینگ دفاعی و انتقال در گیاه فعال شده که منجر به افزایش واکنش‌های دفاعی مانند تولید گونه‌های اکسیژن فعال، سنتز فیتوآلکسین‌ها، تقویت دیواره سلول، سنتز آنزیم‌های دفاعی و تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری-زایی می‌گردد. مکانیسم مقاومت ناشی از کیتوزان در سیستم‌های مختلف میزبان-پاتوژن به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است و مشخص شده است که کیتوزان با تشکیل موانع شیمیایی و مکانیکی و همچنین با افزایش سنتز فیتوآلکسین‌ها، آنزیم‌های دفاعی و پروتئین‌های PR از توسعه عامل بیمارگر ممانعت می‌نماید (Iriti & Faoro 2009 و Falcon et al. 2012). نتایج پژوهش حاضر بر روی پروتئین‌های مرتبط با بیماری در گندم آلوده به سپتوریوز برگی نشان داد که مقاومت با تشخیص سریع و اولیه پاتوژن ارتباط دارد که منجر به تجمع بالای پروتئین‌های PR و واکنش‌های ساختاری دفاعی در گیاه می‌شود که به طور مستقیم از رشد بیمارگر جلوگیری نموده و از

## منابع

- Adhikari T.B. Balaji B. Breeden J. and Goodwin S.B. 2007. Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involve early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71: 55-68
- Adhikari T.B. Anderson J.M. and Goodwin, S.B. 2003. Identification and molecular mapping of a gene in wheat conferring resistance to *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*. 93: 1158-1164.
- Aebi H.E. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*. 105: 121-126.
- Ahangar L. Babaezad V. Ranjbar G.A. Najafi Zarrini H. 2016. Study of *PR* gene expression pattern related to in induced resistance to powdery mildew in susceptible wheat genotype after treating with salicylic acid. *Journal of crop Breeding*. 8: 208-218 (In Persian with English Summury)
- Amborabe B.E. Bonmort J. Fleural-Lessari P. and Roblin G. 2008. Early events induced by chitosan on plant cells. *Journal of Experimental Botany*. 59: 2317-2324
- Berraies S. Gharbi M.S. Belzile F. Yahyaoui A. Hajlaoui M.R. Trifi M. Jean M. and Rezgui S. 2013. High genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola* (*Zymoseptoria tritici*) from a single wheat field in Tunisia as revealed by SSR markers. *African Journal of Biotechnology*. 12: 1344-1349.
- Collinge D. and Lyngs Jrgensen H. 2009. Effects of b-1, 3-glucan from *Septoria tritici* on structural defense responses in wheat. *Journl of Exprimental Botny*. 60: 4287-300.
- Correa-Aragunde N. Foresi N. Delledonne M. Lamattina L. 2013. Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in

- Arabidopsis. Journal of Experimental Botany. 64: 3339–3349.
- Díaz-Martínez J.M. Aispuro-Hernández M. Vargas-Arispuro I. Falcón-Rodríguez A.B. and Martínez-Téllez M.A. 2018. Chitosan derivatives induce local and distal expression of defence-related genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. AGROSIENCIA. 52: 497-509.
- Dordas C. 2009. Role of nutrients in controlling plant diseases. In Lichtfouse, E. Navarrete M. Debaeke P. Véronique S. and Alberola C. (Ed.), Sustainable Agriculture: A Review. Springer Netherlands. 360-369
- Ebrahimi A. Taliei F. and Zolfaghari A. 2020. Effect of salicylic acid and chitosan on response of rice against *Fusarium fujikuroi* the causal agent of rice root and crown rot. Applied Entomology and Phytopathology. 88: 23-37. (In Persian with English Summary)
- El Hadrami A. Adam L. R. El Hadrami I. and Daayf F. 2010. Chitosan in plant protection. Marine Drugs 8: 968-987.
- El-kereamy A. El-sharkawy I. Ramamoorthy R. Taheri A. Errampalli D. Kumar P. and Jayasankar, S. 2011. Prunus domestica pathogenesis-related protein-5 activates the defense response pathway and enhances the resistance to fungal infection. PLoS One. 6: e17973. doi: 10.1371/journal.pone.0017973.
- Falcón-Rodríguez A.B. Wégria G. and Cabrera J.C. 2012. Exploiting plant innate immunity to protect crops against biotic stress: chitosaccharides as natural and suitable candidates for this purpose. In: Ali R. Bandani (Eds) New perspectives in plant protection. In Tech. Rikeka, Coratia. 7:139 –166
- Felipini R.B. and Di Piero R.M. 2013. PR-protein activities in table beet against *Cercospora beticola* after spraying chitosan or acibenzolar-S-methyl. Tropical Plant Pathology. 38: 534-538.
- Ghazimohseni V. and Sabbagh S.K. 2015. Effect of chitosan on gene expression and activity of enzymes involved in resistant induction to fusarium of wheat. Iranian journal of Plant Protection Science. 46: 363-371 (In Persian with English Summary)
- Gill S.S. and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiology Biochemical Journal. 48: 909-930.
- González G. Fuentes L. Moya-León M.A. Sandoval C. and Herrera R. 2013. Characterization of two PR genes from *Fragaria chiloensis* in response to *Botrytis cinerea* infection: A comparison with *Fragaria x ananassa*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 82: 73-80
- Ha X. Koopmann B. and Von Tiedemann A. 2016. Wheat blast and Fusarium head blight display contrasting interaction patterns on ears of wheat genotypes differing in resistance. Phytopathology. 106:270-281.
- Harrach B.D. Fodor J. and Barna B. 2005. Changes of antioxidants following powdery mildew infection of near-isogenic barley lines carrying different resistance genes. Proceedings of the 8<sup>th</sup> Hungarian Congress on Plant Physiology and the 6<sup>th</sup> Hungarian Conference on Photosynthesis. Acta Biologica Szegediensis. 49: 91-92.
- Hernández H. Figueredo M. Garrido N. Sánchez L. and Sarracent J. 2005. Intranasal immunisation with a 62 kDa proteinase combined with cholera toxin or CpG adjuvant protects against *Trichomonas vaginalis* genital tract infections in mice. International Journal for Parasitology. 35: 1333-1337
- In B.Ch. Motomura Sh., Inamoto K. Doi M. and Mori G. 2007. Multivariate analysis of relation between preharvest environmental factors, postharvest morphological and physiological factors and vase life of cut Asomi Red Roses. Japanese Society for Horticultural Science. 76: 66-72.
- Iriti M. and Faoro F. 2009. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. Plant Signal Behavior. 4: 66–68. <https://doi.org/10.4161/psb.4.1.7408>
- Iriti M. and Faoro F. 2004. Plant defense and human nutrition: Phenylpropanoids on the menu. Current Topics in Nutraceutical Research. 2: 47-65.
- Joseph Sh.M. Krishnamoorthy S. Paranthaman R. Moses J.A. and Anandharamakrishnan C. 2021. A review on source-specific chemistry, functionality and applications of chitin and chitosan. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. 2: 1-14.
- Karimi Farsad L. Mardi M. and Ali Ebrahimi M. 2013. Quantitative expression analysis of candidate genes for *Septoria tritici* blotch resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Biological Science. 3: 72-78
- Khatami M. Ahangar L. Taliei F. Sabouri H. and Babaezad V. 2019. Assay of *NPR1*, *MLO* and *BI-1* genes expression in susceptible wheat to powdery mildew after treatment with chitosan. Journal of Cellular and Molecular Researches. 31: 536-551 (In Persian with English Summary)
- Kheiri A. Moosawi Jorf S.A. Malihipour A. Saremi H. and Nikkhah M. 2016. Application of chitosan and



- chitosan nanoparticles for the control of Fusarium head blight of wheat (*Fusarium graminearum*) in vitro and greenhouse. International Journal of biological Macromolecular. 93: 1261-1272. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.072.
- Kia S. and Torabi M. 2008. Effects of infection with septoria leaf blotch (*Septoria tritici*) at different growth stages on yield and yield components of wheat cultivars in Gorgan. Seed and Plant. 24: 237-250 (In Persian with English Summary).
- Kia Sh. and Sughri H. 2012. Reaction of Bread Wheat Advanced Genotypes to *Mycosphaerella graminicola* the Causal Agent of *Septoria tritici* Leaf Blotch in Greenhouse and Field Conditions. Seed and plant Journal. 28: 133-147 (In Persian with English Summary)
- Kovács V. Pál M. Vida G. Szalai G. and Janda T. 2011. Effect of powdery mildew infection on the antioxidant enzyme activities in different lines of Thatcher-based wheat. Acta Biologica Szegediensis. 55: 99-100.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods. 25: 402-408.
- Maksimov I.V. Valeev A.Sh. Cherepanova E.A. and Yarullina L.G. 2009. Hydrogen Peroxide Production in Wheat Leaves Infected with the Fungus *Septoria nodorum* Berk Strains with Different Virulence. Applied Biochemistry and Microbiology. 45: 433-438
- Mittler R. Herr E.H. Orvar B.L. Van Camp W. Willekens H. Inzé D. and Ellis B.E. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyper responsive to pathogen infection. Proceeding Natural Academy Science USA. 96:14165-70.
- Mohammadi M.M. Babaeizad V. Rahimian H. and Ebrahim Nejad Sh. 2017. Screening of some barley lines against powdery mildew agent and considering of *NHI* and several *Pathogenesis Related* genes in disease resistance. Journal of Crop Breeding. 9: 117-124
- Moldenhauer J. Moerschbacher B.M. and Van der Westhuizen A.J. 2006. Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* sp. *tritici*) development in resistant and susceptible wheat cultivars. Plant Pathology. 55: 469-474
- Nakano Y. and Asada K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiology. 28: 131-140.
- Orzali L. Forin C. and Riccioni L. 2014. Effect of chitosan seed treatment as elicitor of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. Seed Science and Technology. 42: 132-149.
- Pieterse C.M.J. Leon-Reyes A. Van der Ent S. and Van Wees S.C.M. 2009. Networking by small-molecules hormones in plant immunity. Nature Chemical Biology. 5: 308-316.
- Pongprayoon W. Roytrakul S. Pichayangkura R. and Chadchawan S. 2013. The role of hydrogen peroxide in chitosan-induced resistance to osmotic stress in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Growth Regulation. DOI 10.1007/s10725-013-9789-4
- Popova E.V. Domnina N.S. Kovalenko N.M. Sokornova S.V. and tyuterev S.L. 2018. Influence of chitosan hybrid derivatives on induced wheat resistance to pathogens with different nutrition strategies. Applied Biochemistry and Microbiology. 54: 535- 539 .
- Quaedvlieg W. Kema G.H.J. Groenewald J.Z. Verkley G.J. M. Seifbarghi S. Razavi M. Gohari A.M. and Mehrabi R. 2011. *Zymoseptoria* gen. Nov: A new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts". Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi. 26: 57-69.
- Rahnesan M. Taliei F. Ahangar L. Sabouri H. and Kia Sh. 2020. Effect of chitosan on the expression pattern of some pathogenicity related genes in wheat infected with powdery mildew. 11: 124-132 (In Persian with English Summary)
- Sathiyabama M. and Muthukumar S. 2020. Chitosan guar nanoparticle preparation and its in vitro antimicrobial activity towards phytopathogens of rice. International Journal of Biological Macromolecules. 153: 297-304.
- Sels J. Mathys M. De Coninck B.M.A. and Cammue B.P.A. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry. 46: 941-950.
- Shetty N.P. Jensen J.D. Knudsen A., Finnie C. Geshi N. Blennow A. Collinge D.B. and Jorgensen H.J.L. 2009. Effects of beta-1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defense responses in wheat. Journal of Experimental Botany. 60: 4287-4300

- Siddaiah Ch.N. Harish Prasanth K.V. Raj Satyanarayana N. Mudili V. Gupta V.K. Kalagatur N.K. Satyavati T. Dai X.F. Chen J.Y. Mocan A. Pratap Singh B. and Srivastava R.K. 2018. Chitosan nanoparticles having higher degree of acetylation induce resistance against pearl millet downy mildew through nitric oxide generation. *Scientific Reports*. 8: 2485. DOI:10.1038/s41598-017-19016-z
- Soltanloo H. Ghadirzade Khorzoghi E. Ramezani S.S. Kalate Arabi M. and Pahlavani M.H. 2010. The expression profile of *Chi-1*, *Glu-2*, *Glu3* and *PR1* genes in scab-resistant and susceptible wheat cultivars during infection by *Fusarium graminearum*. *Plant Omics Journal* 5:162-166.
- Torres M.A. Jonathan D.G. and Dangi J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogen. *Plant Physiology*. 141: 373-378.
- Van Loon L.C. Rep M. and Pieterse C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Phytopathology*. 44: 135-162.
- Xin, T. Wang X. Peng H. Yao Y. Xie Ch. Han Y. Ni Zh. and Sun Q. 2012. Transcriptome comparison of susceptible and resistant wheat in response to powdery mildew infection. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 10: 94-106.
- Zhao J. Daves L.C. and Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23: 283-333.