اثر کیتوزان و سیلیکون بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و میزان فنول کل در گندم آلوده به بیماری فوزاریوز

وحید قاضی محسنی[۱]، سیدکاظم صباغ[۲*]، صدیقه اسمعیل زاده بهابادی[۳]، مرتضی قربانی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲- دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد

۳- استادیار فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل

۴- استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بیرجند

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۸/۱۱

چکیده

این تحقیق به‌منظور کاربرد کیتوزان و سیلیکون بر القای مقاومت در گیاه گندم علیه قارچ *Fusarium graminearum* عامل بلایت فوزاریومی خوشه، مورد بررسی قرار گرفت. اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان و سیلیکون بر رشد قارچ، میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و فنول کل در شرایط آزمایشگاه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شدند. بدین منظور گیاهان در مرحله گلدهی به وسیله کیتوزان با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام و سیلیکون با غلظت‌های صفر، ۲، ۴ و ۶ میلی‌مولار به ترتیب به روش اسپری برگی و محلول در خاک تیماردهی شدند. سپس گیاهان تیمار شده با سوسپانسیون اسپور قارچ (با غلظت ۱۰۶ ماکروکنیدی در میلی‌لیتر) به روش تزریق در زیر محل خوشه مایه زنی گردیدند و در بازه‌های زمانی صفر، ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح عامل بیماری برداشت نمونه‌ها صورت گرفت. نتایج نشان داد همه غلظت‌های مورد استفاده کیتوزان و سیلیکون بر رشد قارچ اثر بازدارنده داشتند و با افزایش غلظت تیمارها، کاهش معنی‌داری در رشد قارچ مشاهده شد. فعالیت آنزیم PAL و میزان فنول کل در گیاهان تیمار شده با محرک‌های شیمیایی کیتوزان و سیلیکون ۲۴ ساعت پس از تلقیح عامل بیماری نسبت به گیاهان شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش تا ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح عامل بیماری همچنان ادامه داشت. با توجه به نتایج بدست آمده، به نظر می‌رسد که کاربرد کیتوزان و سیلیکون به عنوان الیسیتورهای شیمیایی، می‌تواند یک اقدام مفید در القای مقاومت میزبان در جهت کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی باشد.

واژگان کلیدی: الیسیتورهای شیمیایی، بلایت خوشه، زهرابه، فوزاریوم، مقاومت اکتسابی

*نویسنده مسئول: (Email): sksabbagh@yazd.ac.ir

مقدمه

سیلیکون یکی از فراوان‌ترین عناصر تشکیل دهنده لیتوسفر و به عنوان یک فعال کننده زیستی، نقش مهمی در خواص مکانیکی و فیزیولوژی گیاهان داشته و باعث کاهش اثر زیانبار استرس‌های زیستی و غیر زیستی شده و مقاومت گیاه را برابر بیمارگرهای قارچی افزایش می‌دهد (Fauteux *et al.*, 2005). پاسخ‌های موضعی اغلب باعث شروع مقاومت غیر اختصاصی در گیاه شده که به عنوان مقاومت اکتسابی سیستمیک SAR شناخته می‌شود و باعث حفاظت طولانی مدت علیه آلودگی‌های ناشی از بیمارگرهای مختلف می‌گردد (Walters *et al.*, 2012). اخیراً کاربرد سیلیکون نیز به عنوان یک القاگر و فعال کننده بالقوه SAR در حال توسعه است، هرچند هنوز هم مکانیسم‌های آن برای کاهش بیماری کاملاً شناخته نشده است (Reignault and Walters, 2007). به طور کلی دو مکانیسم برای مقاومت ناشی از سیلیکون نسبت به عوامل مولد در بیماری مطرح است: یکی به دنبال جذب و انتقال سیلیکون، فرایند سیلیسی شدن شروع می‌شود و دیگری لیگنینی شدن بافتها که به موجب آن سیلیکون همراه با لیگنین باعث سخت شدن دیواره سلولی در برگ‌ها و آوندهای چوبی می‌شود (Fawe *et al.*, 2001). مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی نشان می‌دهد که سیلیکون، بیان ژن‌های مرتبط با سیستم دفاعی را فعال می‌کند و مانند اسیدسالیسیلیک، اسید جاسمونیک و اتیلن نقش مهمی در انتقال سیگنال دارد (Ghareeb *et al.*, 2011; Kumar and Klessig, 2000). در گیاهان تیمارشده با سیلیکون به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان و تولید ترکیبات ضدمیکروبی مانند تولید متابولیسم فنولیکی، فیتوآلکسین‌ها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی افزایش می‌یابد (Cai *et al.*, 2009). کیتوزان نیز به عنوان یکی از فراوان‌ترین پلیمرهای طبیعی به علت داشتن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاص خود همواره مورد توجه بشر بوده و سالیان متمادی توسط انسان استخراج و به‌صورت مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌است. این پلیمر در صنایع مختلف داروسازی، آرایشی، کشاورزی، صنایع غذایی، تولیدات گیاهی، بیوتکنولوژی، پزشکی، کاغذسازی، تغذیه حیوانات، نساجی و غیره کاربرد دارد (Ilium, 1998; Ravi Kumar, 2000; Rinaudo, 2006). نقش کیتوزان در کنترل بیماری‌های قبل و بعد از برداشت محصولات کشاورزی متعدد (Bautista-Baños *et al.*, 2006) است. همچنین کنترل پاتوژن‌های مختلف قارچی، باکتریایی و ویروسی گیاهان گزارش شده است (Allan and Hadwiger, 1979; Bautista-Baños *et al.*, 2004; Iriti and Faoro, 2008; Je and Kim, 2006). کیتوزان مقاومت اکتسابی را در گوجه فرنگی مبتلا به بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه افزایش داده است (Benhamou *et al.*, 1994) و در موارد دیگر یکسری از واکنش‌های دفاعی در ارتباط با فعالیت‌های آنزیمی، ترکیبات فنولی و سنتز فیتوآلکسین‌های خاص با فعالیت ضد قارچی را القاء کرده است (Nicholson and Hammerschmidt, 1992). آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز اولین آنزیم در شروع مسیر بیوسنتز بسیاری از ترکیبات دفاعی گیاه از جمله بسیاری از فیتوآلکسین‌ها به‌خصوص گروه بزرگ فنیل پروپانوئیدها، برخی از ترکیبات فنولی و لیگنین می‌باشد به همین دلیل در بررسی متقابل بیمارگر و میزبان مورد توجه قرار گرفته است (Solecka *et al.*, 1999). ترکیبات فنولی جزء متابولیت‌های ثانویه هستند و در ساخت دیواره سلولی

و مکانیسم دفاعی گیاه دخالت دارند و در فعالیت دفاعی گیاه، تجمع سریع ترکیبات فنولی در محل آلودگی است که باعث توقف و یا کند شدن رشد عامل بیماری‌زا می‌شود (Teichgraber *et al*., 1991). بیماری بلایت خوشه یا اسکب با عامل *Fusarium graminearum* یک بیماری ویرانگر در بسیاری از مناطق جهان و ایران به شمار می‌رود و بین ۳۰ تا ۷۰ درصد عملکرد گندم را کاهش می‌دهد (Windels, 2000). بلایت خوشه گندم نه تنها باعث کاهش چشمگیر کمیت در محصول می‌گردد، بلکه به دلیل تولید و تجمع فیتوتوکسین‌ها در دانه، موجب افت شدید کیفیت محصول نیز می‌شود (Bottalico and Perrone, 2002). این بیماری با رسیدن به سطح اپیدمی موجب کاهش شدید بازده و در نتیجه کاهش شدید قیمت می‌شود که زیان مستقیم و غیرمستقیم ناشی از این بیماری‌ها را میلیاردها دلار تخمین می‌زنند (Sutton, 1982). هزینه‌های زیاد آفت کشهای شیمیایی، خطرات و مشکلات مختلف زیست محیطی، کاربرد آنها را محدود یا ممنوع ساخته است. به همین علت، یافتن راه حل مدیریتی جایگزین برای کنترل بیماری و کاهش خسارت آن ضروری می‌باشد. در این تحقیق نقش کیتوزان و سیلیکون در القا مقاومت اکتسابی گندم به بیماری بلایت خوشه با بررسی میزان تغییرات چند آنزیم مهم در القاء مقاومت و همچنین میزان ترکیبات فنلی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جهت بررسی تأثیر مستقیم کیتوزان و سیلیکون بر رشد عامل بیماری، محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) به همراه این محلول‌ها با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان و غلظت‌های صفر، ۲، ۴ و ۶ میلی‌مولار سیلیکون به طور جداگانه تهیه شد. پتری‌های شاهد حاوی محیط کشت PDA بدون محرک بودند. روی تمام پتری‌ها دیسک‌هایی از محیط کشت حاوی قارچ بیمارگر قرار داده شد و به گرمخانه با دمای ۲±۲۵ سانتی‌گراد منتقل گردید. بعد از یک هفته، اندازه گیری قطر کلنی شروع شد. درصد بازدارندگی غلظت-های مختلف کیتوزان و سیلیکون با بهره‌گیری از فرمول ارایه شده توسط پندی و همکاران (Pandey *et al*., 1982) محاسبه شد.

۱۰۰ × رشد قارچ در تیمارشاهد / رشد قارچ درتیمار مورد نظر - رشد قارچ در تیمار شاهد = درصد بازدارندگی

تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ

جدایه استاندارد قارچ *F.graminearum* از موسسه تحقیقات گیاه پزشکی ایران تهیه گردید و برای تهیه سوسپانسیون اسپور استفاده شد. بدین منظور ابتدا، قارچ مورد نظر روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA, Merck) کشت داده شد و درون گرم خانه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از یک هفته از رشد کامل قارچ، در شرایط کاملاً استریل یک قطعه از بافت میسیلیومی قارچ به ارلن حاوی ۲/۵ گرم پودر کاه گندم، ۲/۵ گرم پودر کاه جو و ۱۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. درب ارلن‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شد و ارلن‌ها به مدت ۹۶ ساعت روی دستگاه تکان دهنده با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در داخل گرمخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از ۹۶ ساعت، محیط درون ارلن‌ها در زیر هود لامینار با استفاده از پارچه ململ سترون صاف شد. از محیط صاف شده که به صورت یک سوسپانسیون به رنگ

قهوه‌ای تیره بود نمونه‌گیری شد و با استفاده از لام گلبول شمار، غلظت سوسپانسیون بر حسب تعداد ماکرو کنیدی‌ها در هر میلی لیتر تعیین شد و از غلظت۱۰۶ ×۱ اسپور در میلی‌لیتر برای تلقیح استفاده شد (Bernardo *et al*., 2007).

انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای

آزمون گلخانه‌ای به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار به انجام رسید. در تمامی آزمایش‌ها از بذر گندم رقم تجن استفاده شد. بذرهای گندم با هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت ۲ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر ضدعفونی سطحی شد و در در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک استریل کشت شد. با توجه به این که دوره آسیب پذیری گندم به بیماری فوزاریومی سنبله در طول مرحله گلدهی است، در اوایل این مرحله، گندم به وسیله کیتوزان با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ به روش اسپری برگی و سیلیکون به فرم محلول سیلیکات سدیم (SiO_2, 28.5%; Merck) با غلظت‌های صفر، ۲، ۴ و ۶ میلی‌مولار همراه آب آبیاری (Benhamou *et al*., 1994) و اسپری تیماردهی شدند (Ma, 2004). ۲۴ ساعت بعد، تلقیح قارچ به گیاه با غلظت ۱۰۶×۱ اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از روش تزریق در زیر محل خوشه انجام شد (Bernardo *et al*., 2007). سنبله‌های مایه‌زنی شده با کیسه‌های پلاستیکی جهت حفظ رطوبت و رخنه قارچ به مدت یک روز پوشانده شد. نمونه برداری از گیاهان در فواصل زمانی صفر، ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت بعد از تلقیح قارچ عامل بیماری جهت اندازه‌گیری آنزیم PAL و محتوای فنول کل به عنوان شاخص‌های مقاومت انجام گرفت.

استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات فنول کل

جهت استخراج ترکیبات فنولی، در یک هاون چینی مقدار ۰/۵ گرم از برگ نمونه برداری شده به کمک ازت مایع، پودر شد. به پودر حاصله مقدار ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد افزوده شد. نهایتاً این ترکیب در سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی که حاوی ترکیبات فنولی است، جهت آزمایشات بعدی در شیشه‌های مناسب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنولی از معرف فولین سیوکالتیو استفاده شد (Malik and Singh, 1980). بدین منظور، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر از عصاره گیاهی بدست آمده را در یک لوله آزمایش درب دار ریخته و پس از مخلوط کردن کامل، مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از معرف فولین به محتویات لوله آزمایش افزوده شد. مجدداً محتویات لوله را با هم مخلوط کرده پس از سه دقیقه یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع و یک میلی‌لیتر آب مقطر به لوله آزمایش اضافه شد. پس از یک ساعت نگهداری در دمای اتاق مقدار جذب نوری در طول موج ۷۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف سنج قرائت شد (Seevers *et al*., 1971).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز

جهت استخراج آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)[۱]، در یک هاون چینی به کمک ازت مایع، مقدار ۰/۵ گرم از برگ نمونه برداری شده پودر شد. به پودر حاصله مقدار ۱/۵ میلی لیتر بافر تریس-اسیدکلریدریک ۵۰ میلی‌مولار افزوده شد، سپس با سرعت ۱۳۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه

[۱] Phenylalanine Ammonia Lyase

سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و بخش رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم بر اساس واکنش تبدیل فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید اندازه‌گیری شد (Chen *et al.*, 2000). در هر لوله آزمایش ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی، ۲ میلی‌لیتر بافر تریس- اسیدکلریدریک ۵۰ میلی‌مولار (pH=8.8) و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل آلانین ۲۰ میلی‌مولار به عنوان سوبسترا به آن‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از خارج شدن نمونه‌ها از حمام آب گرم به همه نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر اسیدکلریدریک ۶ مولار اضافه شد و تکان داده شدند. میزان جذب نور با استفاده از دستگاه طیف سنج در طول موج ۲۷۰ نانومتر قرائت شد، فعالیت آنزیم بر اساس سرعت واکنش تبدیل فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید در طول موج ۲۷۰ نانومتر بیان می‌شود. یک واحد آنزیم PAL معادل یک میکرومول سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین درنظر گرفته می‌شود. برای بررسی منحنی استاندارد این آنزیم از ماده خالص ترانس سینامیک اسید استفاده شد. غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۷، ۱، ۲، ۷ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این ماده در بافر تریس فاقد فنیل آلانین تهیه و میزان جذب نور آن با دستگاه طیف سنج اندازه‌گیری شد. حجم محلول هر لوله با افزودن تریس اسیدی به دو میلی لیتر رسانده شد. میزان جذب نور در هر لوله در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت شد (Amrhein *et al.*, 1976).

داده‌ها براساس فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 تحت آنالیز واریانس یک طرفه قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شدند و نمودارها توسط نرم افزار Excel رسم گردیدند.

نتایج و بحث

تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ بیمارگر

تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر بازدارندگی رشد پرگنه‌های قارچ بیمارگر بررسی شد (شکل۱). نتایج نشان داد بین اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان در بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ بیمارگر در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد و میانگین قطر رشد پرگنه‌ها با افزایش غلظت کیتوزان کاهش نشان داد و هر سه غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۱).

طبق نتایج حاصل، کیتوزان و سیلیکون تأثیر مستقیم بر کاهش رشد قارچ داشت که با افزایش غلظت آنها افزایش معنی‌دار اثرات ضد قارچی مشاهده شد (جدول ۱ و ۲).

طبق گزارش، کیتوزان در غلظت‌های خاصی دارای خاصیت ضد قارچی بوده و فعالیت بازدارندگی آن از رشد میسیلیومی تعدادی از قارچ‌های بیماریزا مثل *F. oxysporum*، *Pythium aphanidermatum* و *Botrytis cinerea* گزارش شده است (Ben-Shalom *et al.*, 2003).

کیتوزان باعث تخریب ساختمان سلولی و تراوش الکترولیت‌ها و پروتئین‌ها می‌شود که این به دلیل ماهیت پلی‌کاتیونی آن است. این ماده دارای اثر بازدارندگی برجوانه زنی اسپور است (Amborabé *et al.*, 2008).

جدول۱- نتایج آزمون اثر کیتوزان در بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ *Fusarium graminearum*

Table 1- Effect of Chitosan on inhibition of mycelia growth of *Fusarium graminearum* fungi

درصد بازدارندگی Percent of inhibition	میانگین رشد Growth median	غلظت کیتوزان Chitosan concentration
0[d]	6[a]	0ppm
2/55[c]	4/46[b]	100 ppm
48/33[b]	3/1[c]	200 ppm
75[a]	1/5[d]	500 ppm

شکل ۱- مقایسه رشد میسیلیومی قارچ *F. graminearum* در محیط کشت جامد حاوی کیتوزان با غلظت‌های مختلف: صفر(Co)، (A) ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، (B) ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و (C) ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر

Figure 1- Mycelia growth comparison of *F. graminearum* fungi in solid medium contain Chitosan with different concentration: zero (Co), 100mg/L (A), 200mg/L(B) and 500mg/L (C).

اثرات ضد قارچی کیتوزان بر *F. solani f.sp. glycines* مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده است که کیتوزان اثر مستقیم بر وظایف غشا داشته و با مولکول DNA و mRNA قارچ، دارای تعامل متقابل می باشد (Propagdee *et al*., 2006).

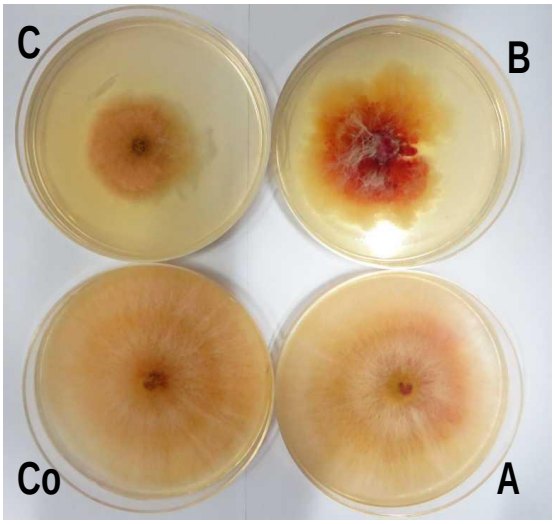
تأثیر غلظت‌های مختلف سیلیکون بر بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ بیمارگر

تأثیر غلظت‌های مختلف سیلیکون (۰، ۲، ۴ و ۶ میلی‌مولار) بر بازدارندگی رشد پرگنه‌های قارچ بیمارگر بررسی شد. نتایج نشان داد بین اثر غلظت‌های مختلف سیلیکون در بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ بیمارگر در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار وجود دارد و میانگین قطر رشد پرگنه‌ها با افزایش غلظت سیلیکون کاهش نشان داد و هر سه غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ میلی‌مولار با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۲ و شکل۲).

جدول ۲- اثر سیلیکون در بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ *Fusarium graminearum*

Table 2- Effect of Silicon on inhibition of mycelia growth of *Fusarium graminearum* fungi.

درصد بازدارندگی Percent of inhibition	میانگین رشد Growth median	غلظت سیلیکون Silicon concentration
0[d]	6[a]	0 ppm
16/66[c]	5[b]	2mM
33/33[b]	4[c]	4mM
49/44[a]	3/03 [c]	6mM



شکل ۲- مقایسه رشد میسیلیومی قارچ *F. graminearum* در محیط کشت جامد حاوی سیلیکون با غلظت‌های مختلف: صفر (Co)، ۲ میلی‌مولار (A)، ۴ میلی‌مولار، (B) و ۶ میلی‌مولار (C).

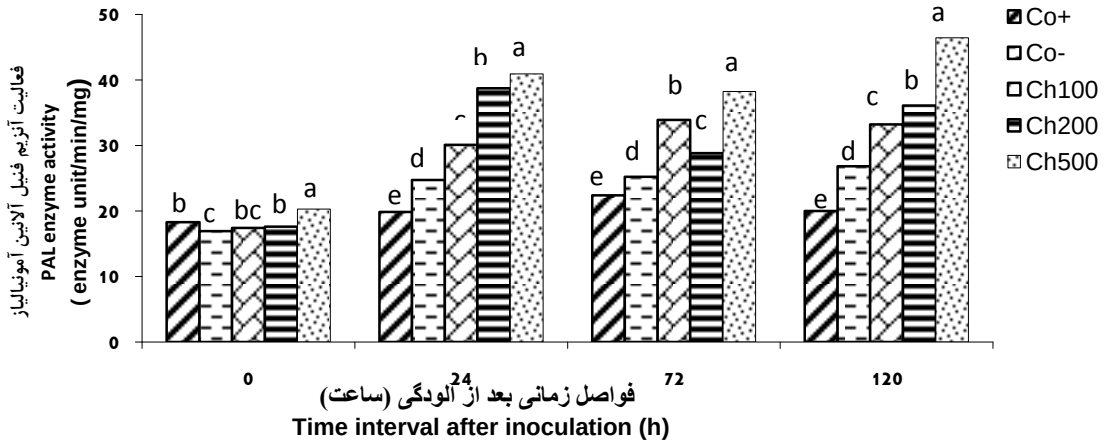
Figure 2- Mycelia growth comparison of *F. graminearum* fungi in solid medium contains Silicon with different concentration: zero (Co), 2 mM (A), 4 mM (B) and 6 mM (C).

سیلیکون دارای خاصیت ضد قارچی بوده و فعالیت بازدارندگی آن از رشد میسیلیومی تعدادی از قارچ‌های بیماریزا مثل *F. oxysporum f.sp. fragariae*، *R. solani* و *F. sulphureum* گزارش شده است (Pospieszny *et al*., 1991). یکی از روش‌های جایگزین جهت کنترل بیماری‌های مختلف، کاربرد ترکیبات طبیعی یا شیمیایی است که اثرات ضد قارچی یا القاء مقاومت داشته باشند. القاء مقاومت به صورت ارتقاء پتانسیل دفاعی گیاه علیه طیف وسیعی از بیمارگرها و آفات تعریف می‌شود، که تحریک مناسب باعث اعطای آن به گیاه می‌شود. این نوع مقاومت اکتسابی اثر طولانی مدت داشته و گاهی در تمام طول عمر گیاه پایدار باقی می‌ماند.

فعالیت آنزیم PAL در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان

نتایج بررسی فعالیت آنزیم PAL در گندم‌های آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان در شکل ۳ نشان داده شده است. بررسی نتایج القاء فعالیت این آنزیم، تفاوت‌های معنی‌داری را در سطح یک درصد بین تیمارها و روزهای مختلف نمونه‌برداری و اثر متقابل آنها نشان داد. فعالیت آنزیم PAL در زمان تلقیح قارچ عامل بیماری در تمام گیاهان سالم، آلوده و تیمار شده با کیتوزان در سطح پایینی قرار داشت، ولی ۲۴ ساعت پس از تلقیح در گیاهان تیمار شده با کیتوزان افزایش معنی‌داری در سطح فعالیت این آنزیم مشاهده شد. در بین تیمارها بیشترین تأثیر

را در افـزایش میـزان فعالیـت آنـزیم غلظـت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و به فاصله زمانی ۱۲۰ ساعت بعد از تلقیح عامل بیماری نشـان داد. در ۲۴ سـاعت پـس از تلقیح قارچ عامل بیماری همه تیمارها به غیر از شاهد سالم در فعالیـت آنزیمـی افـزایش نشـان دادنـد و در فاصله زمانی ۲۴ ساعت پس از تلقیح، میـزان فعالیـت آنزیم PAL در گیاهان تیمار شـده بـا کیتـوزان دارای اختلاف معنی‌دار با تیمـار شـاهد سـالم و آلـوده بـود. شاهد سالم در تمام زمان‌ها مقدار تقریباً ثابتی داشت. فعالیـت آنـزیم PAL در گیاهـان شـاهد آلـوده در زمانهای۲۴ و ۷۲ و ۱۲۰ نسبت به زمان صفر افـزایش معنی‌داری یافـت کـه البتـه در ایـن زمـان‌هـا تفـاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در فاصله زمانی ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح، فعالیـت آنـزیم PAL در تمـام تیمارهـا همچنـان نسـبت بـه شـاهد بـالا بـود.



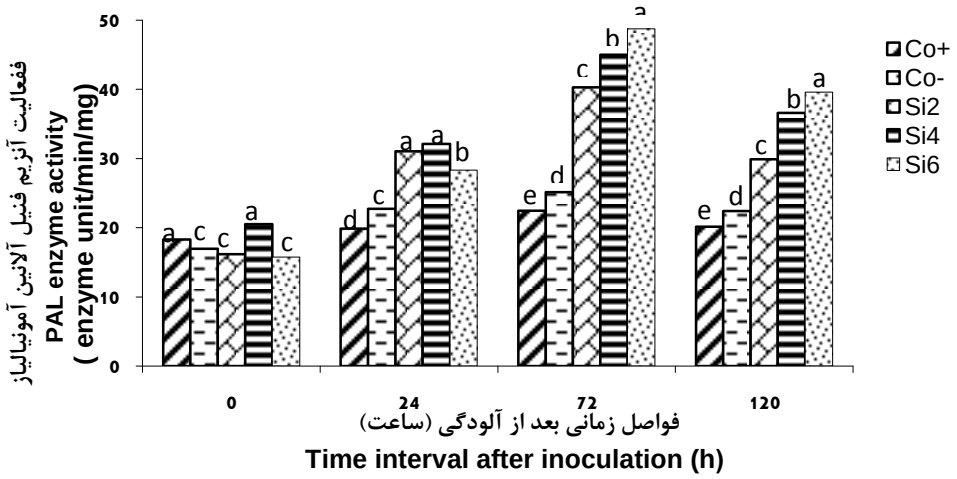
شکل ۳- فعالیت آنزیم PAL (واحد آنزیمی / دقیقه / میلی گرم پروتئین) در فواصل زمانی مختلف پس از تلقیح در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان(۵۰۰،۲۰۰ و ۱۰۰ میلی گرم/لیتر)، (+Co): شاهد سالم (-Co): شاهد آلوده، تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در آزمون LSD در سطح ۰/۰۱ با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 3- Activity of PAL enzyme (enzyme unit/min/mg) in different time interval after inoculation in treated plants with different concentration of Chitosan (100,200 and 500 mg/L): non-infected control (Co^+), infected control (Co^-). All treatment with similar letter(s), are not significantly different at 0.01 probability level using LSD test.

فعالیـت آنـزیم PAl در گیاهـان تیمـار شـده بـا غلظت‌های مختلف سیلیکون

نتایج بررسی فعالیـت آنـزیم PAL در گنـدم‌هـای آلوده تیمار شده با غلظت‌هـای مختلـف سـیلیکون در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج القاء فعالیت آنزیم PAL در گندم‌های آلوده تیمار شـده بـا غلظـت‌هـای مختلف سیلیکون تفاوت‌های معنـی‌داری را در سـطح یک درصد بین تیمارها و روزهای مختلف نمونه‌برداری و اثر متقابل آنها نشان داد (شکل ۴). بـالاترین میـزان فعالیت آنزیم PAL در تیمار ۶ میلی‌مولار و ۷۲ ساعت پس از تلقیح عامل بیماری مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم PAL از ۲۴ ساعت پـس از تلقـیح قـارچ عامـل بیماری در گیاهان تیمار شـده بـا سـیلیکون بـه طـور معنی‌داری بیشتر از میـزان آن در شـاهد آلـوده بـود. میزان فعالیت این آنزیم در شاهد سالم تقریباً ثابـت و کمتر از تیمارهای همراه با قارچ عامل بیماری بود.

یکی از جنبه های مهم دفاع گیاه میزبان در برابر عوامل بیماریزا، دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده آن است. بررسی میزان فعالیت آنزیم PAL یکی از شاخص‌های قابل توجه در ارزیابی واکنش‌های دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرها می‌باشد (Yedidia *et al*., 2003). آنزیم PAL اولین آنزیم در شروع مسیر بیوسنتزی بسیاری از ترکیبات دفاعی از جمله بسیاری از فیتوآلکسین‌ها، بسیاری از ترکیبات فنولی و لیگنین می‌باشد که هر کدام از این‌ها از جمله ترکیبات مؤثر در سیستم دفاعی گیاه می‌باشند (Dixon and Sumner, 2003).



شکل ۴- فعالیت آنزیم PAL (واحد آنزیمی / دقیقه / میلی‌گرم پروتئین) در فواصل زمانی مختلف پس از تلقیح در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکون (۲، ۴و ۶ میلی مولار)، (+Co): شاهد سالم (-Co): شاهد آلوده، تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در آزمون LSD در سطح ۰/۰۱ با هم اختلاف معنی دار ندارند.

Figure 4- Activity of PALenzyme (enzyme unit/min/mg) in different time interval after inoculation in treated plants with different concentration of Silicon (2,4 and 6 mM): non-infected control (Co^+), Infected control (Co^-). All treatment with similar letter(s), are not significantly different at 0.01 probability level using LSD test.

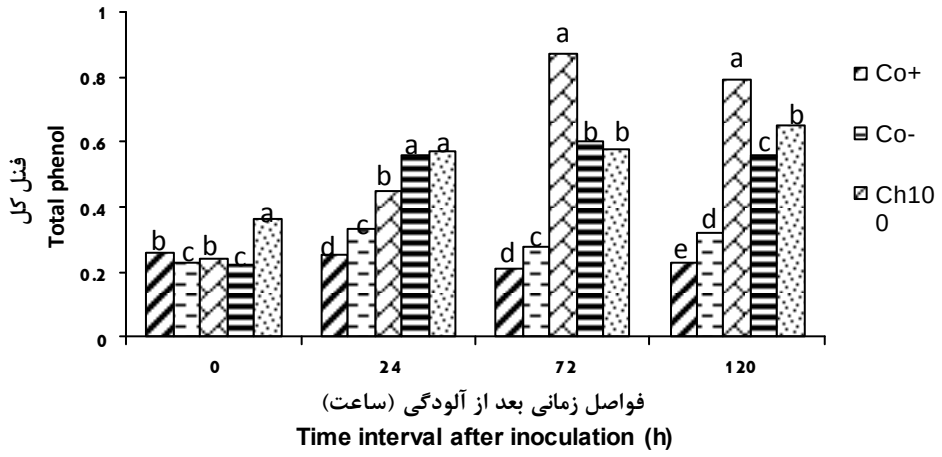
بنابراین ارزیابی میزان فعالیت این آنزیم‌ها به نحوی ارزیابی روند ساخت این ترکیبات بوده و به عبارتی میزان و سرعت فعالیت این آنزیم‌ها، نشان دهنده میزان و سرعت ساخت ترکیبات مذکور می‌باشد. در این پژوهش کاربرد کیتوزان و سیلیکون باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم PAL در مقایسه با شاهد سالم و آلوده شد، به طوری‌که فعالیت آنزیم PAL در فاصله زمانی ۷۲ و ۱۲۰ ساعت به حداکثر رسید و نسبت به شاهد افزایشی در حدود سه برابر را نشان داد. همراه با افزایش میزان این آنزیم، میزان ترکیبات فنلی نیز در گیاه افزایش پیدا کرد. در این تحقیق تیمار گیاهان با کیتوزان و سیلیکون میزان تجمع ترکیبات فنولی را در طی ۲۴ ساعت افزایش داده و تا ۱۲۰ ساعت پس از تیمار این افزایش ادامه یافت. بنابراین فعالیت آنزیم PAL همزمان و یا قبل از تجمع ترکیبات فنولی در گیاهان تیمار شده القاء می‌شود.

این نتایج پیشنهاد می‌کند که این آنزیم برای تجمع این ترکیبات ضروری می‌باشد. القای مقاومت میزبانی با استفاده از کیتوزان و سیلیکون فعالیت

آنزیم PAL را افزایش داده است، که روند افزایش آن کم و بیش موازی با الگوی تجمع ترکیبات فنولی می‌باشد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که این دو الیسیتور، القاء کننده تجمع ترکیبات فنولی، به واسطه افزایش فعالیت آنزیم PAL می‌باشد. نتایج بدست آمده با بررسی‌های انجام شده در برنج آلوده به قارچ *Pyricularia grisea* در حضور کیتوزان که افزایش فعالیت آنزیم PAL را در بر داشت، مطابقت دارد (Rodríguez *et al.*, 2007). همچنین فعالیت این آنزیم در گیاه تنباکوی تیمارشده با کیتوزان علیه *Phytophthora nicotiana* به طور معنی‌داری افزایش یافت (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2011) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

محتوای ترکیبات فنولی کل در گیاهان گندم تیمار شده با کیتوزان

نتایج کاربرد غلظت‌های مختلف کیتوزان نشان داد، بین تیمارهای مختلف و میزان ترکیبات فنولی در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (شکل ۵). ۲۴ ساعت پس از تلقیح قارچ عامل بیماری مقدار ترکیبات فنولی در گیاهان شاهد آلوده و تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان، افزایش یافت و ۷۲ ساعت پس از تلقیح به بالاترین میزان خود رسید، به‌طوری‌که بیشترین میزان ترکیبات فنولی در غلظت ۱۰۰ پی پی ام کیتوزان مشاهده شد. سنتز و ترشح ترکیبات فنلی از شاخص‌های مهم دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده آن محسوب می‌شود. تجمع سریع ترکیبات فنولی در محل آلودگی است که باعث توقف و یا کند شدن رشد عامل بیماریزا می‌شود.



شکل ۵- میزان ترکیبات فنلی (میلی‌گرم اسید کافئیک / گرم بافت برگ) کل در فواصل زمانی مختلف پس از تلقیح در گیاهان تیمار شده با غلظت-های مختلف کیتوزان (۲۰۰،۵۰۰ و ۱۰۰ میلی گرم/لیتر)، (+Co): شاهد سالم (-Co): شاهد آلوده، تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در آزمون LSD در سطح ۰/۰۱ با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

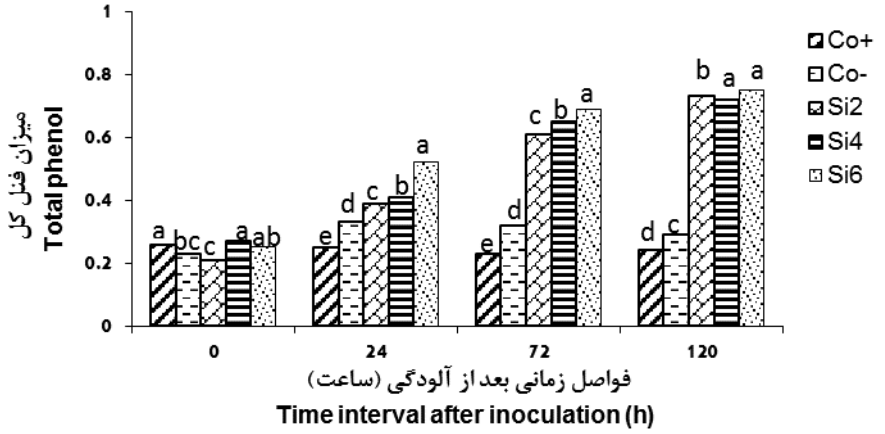
Figure 5- The rate of total phenol [cafeic acid (mg) / leaf tissue (gr)] in different time interval after inoculation in treated plants with different concentration of Chitosan (100,200 and500 mg/L): non-infected control (Co^+), Infected control (Co^-). All treatment with similar letter(s), are not significantly different at 0.01 probability level using LSD test.

بسیاری از ترکیبات فیتوآلکسینی شناخته شده متعلق به گروه فنول‌ها می‌باشند. از اکسید شدن این ترکیبات، ترکیباب دیگری مثل کینون‌ها تولید می‌شوند که اغلب سمی‌تر از مواد فنولی اولیه برای پاتوژن‌ها هستند (Peng and Kuc, 1992).

محتوای ترکیبات فنولی کل در گیاهان گندم تیمار شده با سیلیکون

نتایج کاربرد غلظت‌های مختلف سیلیکون نشان داد بین تیمارها و نیز ۲۴ ساعت پس از تلقیح قارچ، عامل بیماری افزایش یافت و در زمان ۱۲۰ ساعت به بالاترین حد خود رسید و به طور معنی‌داری بیشتر از میزان آن در گیاهان شاهد آلوده و سالم بود. بالاترین میزان ترکیبات فنولی در تیمار سیلیکون ۶ میلی‌مولار و در ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح قارچ عامل بیماری مشاهده شد (شکل ۶).

در نهایت باید اشاره کرد که کلیه عوامل کنترل کننده بیماری‌های گیاهان، جنبه حفاظتی داشته و هیچ وسیله‌ای در دست نیست که بتوان با آن گیاهان آلوده و بیمار را به طور کامل درمان بخشید. با توجه به اینکه کنترل شیمیایی بیماری‌های گیاهی با آفت‌کشهای شیمیایی علی‌رغم کاربرد زیاد آن در کنترل بیماری‌ها، دارای اثرات زیست محیطی است و بقایای آن در محیط و مواد غذایی مورد مصرف، نگران کننده بوده و لزوم تغییر روش‌های کنترل بیماری‌ها به کمک ترکیبات جایگزین و تلفیقی از روش‌ها برای مدیریت بیماری احساس می‌شود، هر چند که کاربرد بالاترین غلظت از کیتوزان و سیلیکون نمی‌تواند با کمترین غلظت یک آفت‌کش شیمیایی قابل مقایسه باشد در نتیجه چنین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از الیسیتورهای شیمیایی نظیر کیتوزان و سیلیکون می‌تواند به عنوان روش مؤثری در القاء مقاومت میزبان در کنترل خسارت بیماری‌های گیاهی در سیستم مدیریت تلفیقی بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۶ – میزان ترکیبات فنلی کل (میلی‌گرم اسید کافئیک / گرم بافت برگ) در فواصل زمانی مختلف پس از تلقیح در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکون (۲، ۴و ۶ میلی مولار)، (+Co): شاهد سالم (-Co): شاهد آلوده، تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در آزمون LSD در سطح ۰/۰۱ با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 6- The rate of total phenol [cafeic acid (mg) / leaf tissue (gr)] in different time interval after inoculation in treated plants with different concentration of Silicon (2, 4 and 6mM): non-infected control (Co^+), Infected control (Co^-). All treatment with similar letter(s), are not significantly different at 0.01 probability level using LSD test.

References : **فهرست منابع:**

Allan, C.R. and Hadwiger, L.A. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*, 3:285-287.

Amborabé, B.E., Bonmort, J., Fleurat-Lessard, P. and Roblin, G. 2008. Early events induced by chitosan on plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 59:2317-2324.

Amrhein, N., Gödeke, K.H. and Gerhardt, J. 1976. The estimation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL)-activity in intact cells of higher plant tissue. *Planta*, 131:33-40.

Bautista-Baños, S., Hernández-López, M. and Bosquez-Molina, E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22:178-186.

Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A., Velázquez-del Valle, M., Hernández-López M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E. and Wilson, C.. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25:108-118.

Benhamou, N., Lafontaine, P. and Nicole, M. 1994. Induction of systemic resistance to Fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*, 84:1432-1444

Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C. and Fallik, E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means. *Crop Protection*, 22:285- of chitosan 290.

Benhamou, N., Lafontaine, P. and Nicole, M. 1994. Induction of systemic resistance to Fusarium crown and root in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* ,84:1432-1444.

Bernardo, A., Bai, G., Guo, P., Xiao, K., Guenzi, A.C. and 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.

Bottalico, A. and Perrone, G. 2002. Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108:611-624.

Cai, K., Gao, D., Chen, J. and Luo, S. 2009. Probing the mechanisms of silicon-mediated pathogen resistance. *Plant Signal Behavior*, 4:1-3.

Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N. and Paulitz, T.C. 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.

Dixon, R.A. and Sumner, L.W. 2003. Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology*, 131:878-885.

Falcón-Rodríguez, A.B., Costales, D., Cabrera, J.C. and Martínez-Téllez, M.Á. 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.

Fauteux, F., Rémus-Borel, W., Menzies, J.G. and Bélanger, R.R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 249:1-6.

Fawe, A., Menzies, J.G., Chérif, M. and Bélanger, R.R. 2001. Silicon and disease resistance Studies in Plant. Science in Dicotyledons, 8:159-169.

Ghareeb, H., Bozsó, Z., Ott, P.G., Repenning, C., Stahl, F. and Wydra, K. 2011. Transcriptome of silicon-induced resistance against Ralstonia solanacearum in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75:83-89.

Ilium, L. 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, 15:1326-1331.

Iriti, M. and Faoro, F. 2008. Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiology and Biochemistry*, 46:1106-1111.

Je, J.Y. and Kim, S.K. 2006. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:6629-6633.

Kumar, D. and Klessig, D.F. 2000. Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13:347-351.

Ma, J.F. 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50:11-18

Malik, C. and Singh, M. 1980. Plant enzymology and histo enzymology Plant Enzyme Assays– Some Examples. *Kalyani Publishers*, 24:280-287.

Nicholson, R.L. and Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30:369-389.

Pandey, D., Tripathi, N., Tripathi, R. and Dixit, S. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of Hyptis suaveolens. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 79:63-68.

Peng, M. and Kuc, J.A. 1992. Peroxidase – generated hydrogen Peroxide as asource of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, 82:696- 699.

Pospieszny, H., Chirkov, S. and Atabekov, J. 1991. Induction of antiviral resistance in plants by chitosan. *Plant Science*, 79:63-68.

Propagdee, B., Kotchdat, Kumsopa, A. and 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.

Ravi-Kumar, M.N. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46:1-27.

Reignault, P. and Walters, D. 2007. Topical application of inducers for disease control. Induced resistance for plant defence. A *sustainable Approach to Crop Protection*,179-200.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer science*, 31:603-632.

Rodríguez, A., Ramírez, M., Cárdenas, R., Hernández, A., Velázquez, M. and Bautista, S. .2007. Induction of defense response of *Oryza sativa L.* against *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. by treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89:206-215.

Seevers, P., Daly, J. and Catedral, F. 1971. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physiology*, 48:353-360.

Solecka, D., Boudet, A.M. and Kacperska, A. 1999. Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low temperature treated winter oilseed rape leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37:491-496.

Sutton, J. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum. Canadian Journal of Plant Pathology*, 4:195-209.

Teichgraber, P., Popper, L. and Knorr, D. 1991. Chitosan as an elicitor for the production of chitinase, an antifungal enzyme from soybean seeds. *Agrofoodindustry hi-tech*, 2:11-14.

Walters, D.R., Avrova, A., Bingham, I.J., Burnett, F.J., Fountaine, J., Havis, N.D., Hoad, S.P., Hughes, G., Looseley, M. and Oxley, S.J. 2012. Control of foliar diseases in barley: towards an integrated approach. *European Journal of Plant Pathology*, 133:33-73.

Windels, C.E. 2000. Economic and social impacts of Fusarium head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 90:17-21.

Yedidia, I., Shoresh, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. and Chet, I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae pv. lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:7343-7353.

Effect of chitosan and silicon on phenylalanine ammonialyase enzyme activity and total phenols in infected wheat with fusariosis disease

Vahid Ghazimohseni[1], Seyed Kazem Sabbagh[2*], Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi[4], Morteza Ghorbani[5]

1- MSc student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol

2- Associate Professor of Plant Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Yazd

3- Assistant Professor of Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zabol

4- Assistant Professor of Plant Pathology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Birjand

Recived: 2015/02/10 Accepted: 2015/11/02

Abstract

In this study, the use of chitosan and silicon on resistance induction in wheat against *Fusarium graminearum* , the causal agent of Fusarium head blight, was investigated. The effect of different concentrations of chitosan and silicon on the fungal growth, phenylalanine ammonia lyase enzyme activity and total phenol content was investigated in vitro condition and in a completely randomized factorial design. The plants were induced at flowering stage by different concentrations of chitosan (0, 100, 200 and 500 ppm) and silicon (0, 2, 4 and 6 mM) by foliar spray and soil solution. Then the plants treated with spore suspension were inoculated by injection under the cluster and plants harvested at 0, 24, 72 and 120 h after inoculation of pathogen. The results showed that all concentrations of chitosan and silicon had an inhibition effect on fungal growth, and with increasing concentrations, fungal growth decreased significantly. Results indicated that PAL enzyme activity and total phenol content in plants treated with chitosan and silicon significantly increased 24h after inoculation with the pathogen compared to the control plants and continued during 120 h after inoculation of pathogen. According to these results, it seems that the use of chitosan and silicon as chemical elicitors can be a useful action on the induction of host resistance to control plant pathogens.

Key words: Acquired resistance, Chemical elicitors, Fusarium, Head Blight, Toxin

*Correspending Author Email: sksabbagh@yazd.ac.ir