

تأثیر کیتوزان بر القای مقاومت در خیار علیه عامل بیماری ویروس موزائیک خیار

محسن عطار فردی^{۱*}، محمد سالاری^۲، منصور صلاتی^۳، سید کاظم صباغ^۲ و شاهو ولی زاده^۱

۱- دانشجویان سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل.

۲- دانشیاران گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل.

۳- استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی.

*مسئول مکاتبات: Mohsen.attar86120@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۹

چیکده

خیار از مهم‌ترین محصولات جالیزی در ایران است. ویروس موزائیک خیار (CMV) (*Cucumber mosaic virus*) یکی از ویروس‌های مهم در بین ویروس‌های گیاهی شناخته شده می‌باشد. ایجاد مقاومت در گیاهان یکی از موثرترین روش‌ها در مبارزه با بیماری‌های ویروسی می‌باشد. بر همین اساس امکان القای مقاومت میزبانی در خیار علیه ویروس CMV با محلول‌های (صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ پی پی ام) کیتوزان به صورت اسپری برگی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اثرات محلول‌پاشی تیمارهای غلظتی کیتوزان روی تغییرات مولکولی، بیوشیمیایی، شدت بیماری و غلظت ویروس در خیار آلوده به CMV در شرایط گلخانه، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام گردید. نتایج حاصل از Indirect-ELISA و RT-PCR وجود ویروس در گیاه خیار را اثبات کرد. کمترین میزان غلظت ویروس و شدت بیماری، در تیمار کیتوزان (۱۵۰۰ پی پی ام) به ترتیب ۰/۴۶ و ۴۰/۷ اندازه‌گیری شد. آنالیز بیان ژن کیتیناز در اثر محلول‌پاشی با کیتوزان نشان داد که در تیمارهای ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی پی ام نسبت به شاهد سالم این میزان به ترتیب ۶/۲۲۹، ۱۱/۷۰۳ و ۱۴/۱۹۰ برابر افزایش یافت. پیش تیمارهای کیتوزان همراه با مایه زنی ویروس باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد سالم شدند. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تیمار کیتوزان باعث القا مقاومت، کاهش غلظت ویروس و شدت بیماری از طریق افزایش بیان آنزیم کیتیناز و پراکسیداز که از خانواده پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی هستند می‌شود، و تیمار ۱۵۰۰ پی پی ام کیتوزان بهترین تأثیر در القا مقاومت گیاهان خیار را دارد. این پژوهش می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده از کیتوزان برای افزایش بیان (Over expression) این ژن‌ها و ایجاد القا مقاومت در گیاه خیار به عامل بیماری CMV باشد.

واژه‌های کلیدی: الایزا، پراکسیداز، RT-PCR، کیتوزان، کیتیناز، مقاومت القایی.

مقدمه

جهان دارا می‌باشد. ویروس موزائیک خیار (CMV) از بیماری‌های مهم کدوئیان و گوجه‌فرنگی است که از نظر اقتصادی حائز اهمیت بسیار بوده و بزرگترین دامنه‌ی میزبانی را در بین ویروس‌های گیاهی داراست (پالوکیتیس و همکاران ۱۹۹۲؛ پالوکیتیس و گارسیا

بر اساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی جهانی (فائو ۲۰۰۶)، ایران با سطح زیر کشت ۲۶۰ هزار هکتار و عملکردی معادل چهار میلیون و هفتصد و هشتاد هزار تن، رتبه‌ی سوم تولید کدوئیان را در

در گیاهان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. القای این پروتئین‌ها در برابر قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا در زمان آلوده شدن گیاهان مختلف گزارش شده است که با انباشت آنها از رشد و توسعه بیمارگر و تخریب بافت‌های گیاهی جلوگیری می‌گردد (هاموند کاساک و جونس ۱۹۹۷). تحقیق حاضر به منظور تعیین اثر کاربرد سه غلظت مختلف از کیتوزان بر کاهش شدت بیماری و بر غلظت ویروس موزائیک خیار، ناشی از القای مقاومت در خیار انجام گردید.

مواد و روش‌ها

ردیابی و شناسایی ویروس موزائیک خیار

ابتدا از برگ‌های بوته‌های خیار مشکوک به ویروس CMV در طی فصل زراعی ۹۲-۱۳۹۱، از مزارع و گلخانه‌های مشهد و تربت حیدریه نمونه برداری انجام شد. آلودگی نمونه‌های برگی به CMV با ELISA بررسی و در مرحله بعد خالص‌سازی بیولوژیکی ویروس روی گیاه محک سلمه قرمز (*Chenopodium amaranticolor*) که ویروس در آن ایجاد لکه‌های موضعی می‌کند، انجام گردید. تکثیر ویروس روی گیاهان خیار (*Cucumis sativus*) و توتون (*Nicotiana tabacum* var. Samson) صورت گرفت. آلودگی این گیاهان به CMV با تست الایزا و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) بررسی شد.

آزمون سرولوژیکی (الایزا)

آنتی سرم مورد استفاده برای شناسایی و تعیین غلظت ویروس موزائیک خیار شامل آنتی بادی و آنتی ریبیت از مرکز تحقیقات ویروس شناسی شیراز تهیه گردید. در مورد ویروس CMV، الایزا به صورت غیرمستقیم (Indirect-ELISA) و براساس روش کوینگ (۱۹۸۱) صورت گرفت. با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (ELISA reader, Elx800) میزان جذب نور ماوراء بنفش (UV) در طول موج

(۲۰۰۳). گیاهان آلوده به این ویروس ممکن است بسیار ضعیف شده و به کلی نابود شوند در این گیاهان نه تنها میزان تولید کاهش می‌یابد بلکه از کیفیت محصول نیز کاسته می‌شود. این ویروس دارای دامنه میزبانی وسیعی در بین گیاهان مختلف است به نحوی که تاکنون آلودگی آن روی یک هزار گونه متعلق به یکصد تیره‌ی گیاهی دو لپه‌ای و تک لپه‌ای گزارش گردیده است. ویروس CMV گونه تیپ جنس Cucumovirus است که دارای پیکره چند وجهی و به قطر ۲۸ تا ۳۰ نانومتر است و ژنوم آن شامل سه قطعه RNA تک رشته‌ای مثبت می‌باشد (گالیتلی ۲۰۰۰). کیتوزان یک آنتی میکروب طبیعی با منشأ حیوانی و کاملاً غیرسمی است که از واحدهای گلوکز آمین و N - استیل گلوکز آمین با اتصالات بتا ۱ و ۴ تشکیل شده است. کیتوزان از استیل زدایی کیتین، یکی از فراوان‌ترین پلیمرهای طبیعی، به دست می‌آید (کما و همکاران ۲۰۰۲). الیسیتورهای قارچی و ترکیبات اصلی دیواره‌ی سلول مانند کیتین و کیتوزان در بسیاری از گونه‌های قارچی باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانوی، بویژه آن‌هایی که در سازوکارهای دفاعی گیاه نقش دارند، می‌شوند (پو و همکاران ۲۰۰۹؛ کانگ و همکاران ۲۰۰۴). گزارش‌های متعددی از موفقیت در کنترل بیماری و یا کاهش علائم آن به وسیله‌ی تیمار گیاهان با کیتوزان توسط ناندیش کومار و همکاران (۲۰۰۸)، بن-شالوم و فالیک (۲۰۰۳) ارائه شده است. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR پروتئین‌ها) در بسیاری از گونه‌های گیاهی در اثر حمله‌ی پاتوژن‌ها به عنوان مولکول‌های القا پذیر، بیان و انباشت می‌شوند (ادروا ۲۰۰۵؛ باراد و سریرام ۲۰۰۸). آنزیم‌های کیتیناز و گلوکاناز، اندو پروتئیناز، پراکسیداز و پروتئین‌های انتقال دهنده چربی از خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی هستند که

حجم ۲۰ میکرولیتر در میکروتیوپ‌های مخصوص تهیه گردید. این محلول شامل دو میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) cDNA، یک میکرو لیتر از هر آغازگر ۲۰ (پیکومولار)، ۱۰ میکرولیتر Hot Tag EvaGreen qPCR master mix (ROX) (ساخت شرکت سینا ژن) و حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر عاری از آنزیم RNase به ۲۰ میکرولیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. چرخه‌های حرارتی واکنش شامل ۹۴ درجه به مدت پنج دقیقه و ۴۰ چرخه ۹۴ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه تنظیم گردید.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

جهت تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز به میلی گرم پروتئین موجود در بافت (دیسک برگگی ۰/۲ گرم)، میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌ها با روش برادفورد (۱۹۷۶) و اندازه گیری میزان جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد. از رقت‌های مختلف سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin) BSA برای ترسیم منحنی استاندارد استفاده گردید. مقدار پروتئین کل محلول نمونه‌ها با استفاده از مقادیر جذب نور مربوط به هر نمونه و معادله خط نمونه استاندارد آلبومین محاسبه گردید.

برای صفر کردن (Base Line) دستگاه از لوله‌های شاهد که شامل سه میلی لیتر معرف بود، استفاده گردید. برای هر تیمار سه تکرار (سه بوته) در نظر گرفته شد.

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز، مقدار ۰/۲ گرم بافت برگ گیاه به طور جداگانه در هاون چینی سرد (داخل ظرف محتوی یخ) حاوی سه میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۲ مولار و pH= ۶/۸ سائیده شد و سپس در ۱۲۰۰۰ دور و در دمای ۴-۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

۴۰۵ nm میزان جذب نوری چاهک‌های پلیت اندازه‌گیری شدند.

تشخیص مولکولی ویروس

جهت تشخیص مولکولی ویروس در گیاهان آلوده ابتدا از برگ‌های دارای علائم زردی که آلودگی آن‌ها قبلاً توسط روش الیزا تایید شده بود استفاده شد. استخراج RNA کل با استفاده از روش ارایه شده توسط چانگ و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد. ساخت cDNA از الگوی تک لای RNA با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit (شرکت technologies, Vivantis Malaysia) انجام گردید. از جفت آغـازگرهـای نوکلئوتیـدی CMVCP-F: TAGACAT/ACTGTGACGCGA و CMVCP-R: GTAAGCTGGATGGACAAC جهت تکثیر قطعه مورد نظر و تشخیص دقیق مولکولی استفاده شد (مازیدا و همکاران ۲۰۱۲).

به منظور بررسی نتایج حاصل از واکنش RT-PCR، پنج میکرولیتر فرآورده حاصل از هر واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، حاوی اتیدیوم بروماید در بافر 0.5 x TBE، الکتروفورز گردید. الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت و شدت جریان ۲۴ میلی آمپر به مدت حدود یک و نیم ساعت انجام و نتیجه توسط دوربین عکس برداری و نور ماورابنفش بررسی شد.

آنالیز بیان ژن کیتیناز

آنالیز بیان ژن کیتیناز در حالت القا مقاومت در گیاه تحت تنش غیر زیستی کیتوزان با استفاده از روش کمیـت سنجی (QRT-PCR) و استفاده از دستگاه لایت سایکلر ساخت شرکت کوربت (Curbet3000, Australia) انجام شد. از جفت آغازگر اختصاصی ژن پکتیناز برای بررسی تغییرات کیتیناز در بافت‌های تحریک شده استفاده گردید از ژن اکتین بعنوان ژن مرجع جهت یکسان سازی داده‌ها استفاده گردید (جدول ۱). محلول واکنش زنجیره‌ای پلی مران با

جدول ۱- مشخصات آغازگرها.

	آغازگر رفت	آغازگر برگشت	طول آغازگر PCR (bp)	دمای اتصال (c)
<i>Chitinase</i>	CCGCAGTGTCCAATACCAGA	GCCGTCCACTGATTCCATGA	149	60.5
<i>Actin</i>	GAAGGAATAACCACGCTCAG	ACACAGTTCATCTACGAG	117	60

(۲ بوته خیار) برای هر تیمار انجام گردید. از برگهای گیاه مایه‌زنی شده توسط ویروس (مرحله چهار برگی) برای اندازه‌گیری آنزیم‌های بیوشیمیایی، نمونه برداری بعمل آمد (رادوان، ۲۰۰۷). شدت بیماری براساس نسبت فراوانی، نوع علائم در هر تیمار طبق فرمول ذیل محاسبه می‌شود.

$$\text{شدت بیماری} = \frac{\sum (\text{تعداد گیاه} \times \text{درجه‌ی بیماری})}{\text{بالاترین درجه بیماری} \times \text{تعداد کل}} \times 100$$

صفر= بدون علائم = ۱ موزائیک خفیف = ۲ موزائیک شدید = ۳ موزائیک شدید، نکروز و بدشکلی میوه‌ها

نتایج

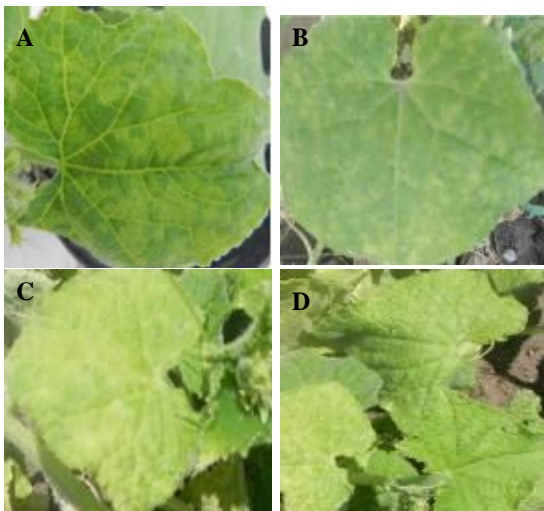
ردیابی و شناسایی ویروس موزائیک خیار

نمونه‌های آلوده علائمی نظیر موزائیک، زردی، بدشکلی، نخ‌شدن برگ و تاوولی شدن میوه‌ها را در مزرعه و گلخانه نشان دادند. همچنین آلودگی این نمونه‌ها به CMV توسط آزمون الیزا و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (RT-PCR) اثبات گردید. در مرحله بعد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی CMV قطعه‌ای در حدود ۱۰۰۰ جفت باز مربوط به ژن پروتئین پوششی با روش RT-PCR ویروس تکثیر شد (شکل ۱).

استفاده شد. مقدار یک میلی‌لیتر از این محلول را با ۲۰ میکرولیتر گوئیکول و مقدار کافی بافر در یک لوله آزمایش با هم مخلوط و حجم نهایی به پنج میلی‌لیتر رسانده شد و اسپکتروفتومتر با استفاده از این محلول صفر گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (سه درصد) به محلول فوق اضافه و تغییرات جذب نور در ۴۷۵ نانومتر به مدت یک دقیقه به فواصل زمانی ۱۰ ثانیه قرائت گردید. میزان فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب نور در ۴۷۵ نانومتر بصورت دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (جاندا و همکاران ۲۰۰۳).

بررسی‌های گلخانه‌ای

آزمایش‌های گلخانه‌ای در اتاقک رشد با شرایط دمایی میانگین ۲۰-۱۵ درجه‌ی سلسیوس با رطوبت ۸۰٪ انجام گرفت. در تمامی آزمایش‌های گلخانه‌ای از بذور خیار رقم نگین استفاده شد. از محرک کیتوزان در غلظت‌های مختلف (صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ پی پی ام) برای بررسی شدت بیماری و تعیین غلظت ویروس ناشی از القای مقاومت استفاده گردید. بدین منظور در مرحله چهار برگی گیاه خیار غلظت‌های مورد نظر بر روی سطح برگ‌ها اسپری شدند. مایه زنی مکانیکی ویروس پس از گذشت شش روز از اسپری برگی تیمارها با استفاده از پودر کربوراندوم (۶۰۰ مش) انجام گردید (جعفرپور ۱۳۸۲). شدت بیماری (Disease severity) براساس روش رایج شده توسط یانگ و همکاران (۱۹۹۶) نمره‌دهی شد. این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار



شکل ۲- تأثیر تیمارهای کیتوزان بر شدت بیماری و کاهش علائم. (A) برگ خیار آلوده به CMV. تیمار کیتوزان و تلقیح ویروس (B) ۵۰۰ ppm، (C) ۱۰۰۰ ppm و (D) ۱۵۰۰

میزان بیان ژن کیتیناز

ارزیابی میزان بیان ژن کیتیناز در حالت تحریک با کیتوزان نشان داد که بیان این ژن در تیمار مایه زنی ویروس افزایش یافته و نسبت به شاهد سالم مقدار ۳/۰۹ افزایش یافته است. در اثر محلول پاشی با کیتوزان بیان این ژن نیز تحت تأثیر قرار گرفته که در تیمارهای ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی پی ام به ترتیب این میزان نسبت به شاهد سالم برابر ۶/۲۲، ۱۱/۷۰ و ۱۴/۱۹ به دست آمد. مقایسه داده‌های حاصل نشان می‌دهد که کیتوزان در القا مقاومت خیار به ویروس نقش دارد و باعث افزایش بیان ژن کیتیناز نسبت به شاهد بدون بیماری و همچنین گیاه بیمار می‌شود.

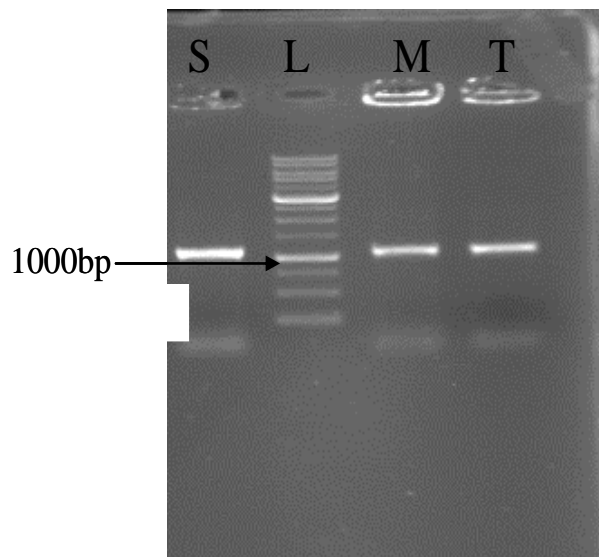
جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر تیمار کیتوزان بر شدت بیماری و غلظت ویروس در بوته‌های خیار، ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی (LSD, $\alpha = 0.05$)

تیمار	شدت بیماری (%)	غلظت ویروس (OD ₄₀₅)
شاهد سالم	۱۱ ^e	۰/۱۸۲ ^e
شاهد آلوده به ویروس	۹۲/۵۳ ^a	۱/۰۸۶ ^a
کیتوزان ۵۰۰ ppm + ویروس	۶۶/۶ ^b	۰/۷۶۹ ^b
کیتوزان ۱۰۰۰ ppm + ویروس	۵۱/۸ ^c	۰/۶۱۲ ^c
کیتوزان ۱۵۰۰ ppm + ویروس	۴۰/۷ ^d	۰/۴۶ ^d

cv: ۱۳/۷۱%

cv: ۲/۴۱%

هر عدد میانگین ۹ داده می‌باشد.



شکل ۱- محصول تکثیر شده با RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی پوشش پروتئینی L = سایز مارکر ۲۵۰ bp = S، نمونه استاندارد CMV، M = مشهد و T = تربت حیدریه نمونه آلوده به ویروس CMV.

تعیین شدت بیماری در گیاهان تحریک شده آلوده به ویروس

علائم بیماری موزائیک خیار سه هفته بعد از مایه‌زنی روی برگ‌های تلقیح شده به ویروس موزائیک خیار مشاهده شد. این علائم شامل موزائیک شدید برگ، میوه، کاهش اندازه برگ و توقف رشد بوته خیار بود. بررسی شدت بیماری بر روی گیاهان آلوده به ویروس تحت تیمارهای مختلف کیتوزان نشان داد که غلظت‌های مختلف کیتوزان تأثیر متفاوتی بر روی شدت بیماری و توسعه ویروس دارد بطور کلی میزان شدت بیماری در تیمار با کیتوزان کاهش یافت. در تیمار ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام کیتوزان گیاهان علائم خفیف بیماری را نشان دادند اما در غلظت ۱۵۰۰ هیچ علائمی در برگ‌ها ظاهر نگردید. شدت بیماری با افزایش غلظت کیتوزان کاهش یافت (شکل ۲). غلظت ویروس در بافت‌های برگ آلوده نیز با افزایش غلظت کیتوزان کاهش یافت که نشان دهنده تأثیر این ماده در جلوگیری از تکثیر ویروس در گیاهان خیار می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۳- تاثیر آلودگی ویروس و تیمار با کیتوزان بدون مایه زنی ویروس و با مایه زنی ویروس بر میزان آنزیم پراکسیداز (min/mg protein) در برگ‌های خیار.

فعالیت آنزیم	تیمار پراکسیداز
۰/۰۵۴۶ ^e	شاهد سالم
۰/۳۸۲ ^a	شاهد آلوده به ویروس
۰/۰۷ ^e	کیتوزان ۵۰۰ ppm
۰/۱۵ ^d	کیتوزان ۱۰۰۰ ppm
۰/۲ ^{bcd}	کیتوزان ۱۵۰۰ ppm
۰/۲۴۵ ^b	کیتوزان ۵۰۰ ppm + ویروس
۰/۱۹ ^{cd}	کیتوزان ۱۰۰۰ ppm + ویروس
۰/۲۳ ^{bc}	کیتوزان ۱۵۰۰ ppm + ویروس

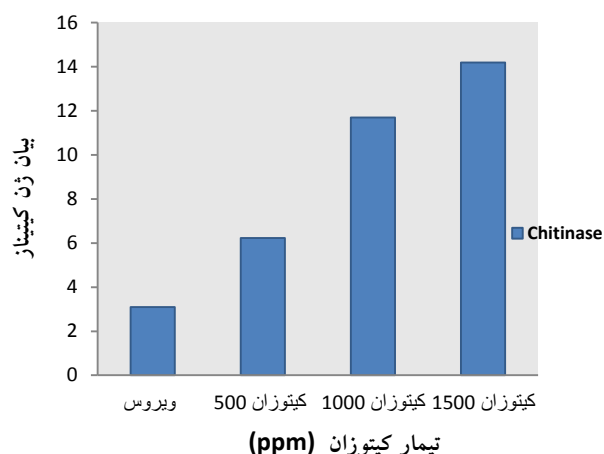
CV: ۱۴/۰۶ %

- هر عدد میانگین ۹ داده می‌باشد

- میانگین‌های که دارای یک حرف مشترک می‌باشند، تفاوتشان در سطح ۵ درصد در آزمون LSD معنی دار نیست.

بحث

در آلودگی گیاهان به ویروس‌ها تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و متابولیکی ایجاد می‌شود (فرایسر ۱۹۸۷). این تغییرات در طول تکثیر ویروس باعث بروز علائم می‌شود (تکسی و همکاران ۱۹۹۶). در این پژوهش تغییرات متابولیکی و فیزیولوژیکی در برگ آلوده به CMV و تیمارهای کیتوزان بررسی شد. در بوته‌های آلوده خیار به CMV علائمی شامل موزائیک شدید برگ، میوه، کاهش اندازه برگ و توقف رشد گیاه که با علائم این ویروس در منابع تطابق کامل دارد، مشاهده گردید (جعفرپور ۱۳۸۲). کاهش میزان رنگدانه‌های کلروفیل a و b، و کاروتینوئید در نتیجه کاهش فتوسنتز در آلودگی‌های ویروسی گزارش شده است (تکسی و همکاران ۱۹۹۶؛ رادوان و همکاران ۲۰۰۷). مطابق نتایج به دست آمده، هر سه غلظت به کار رفته کیتوزان در مقایسه با شاهد آلوده به طور معنی داری باعث کاهش شدت علائم موزائیک،



شکل ۳- میزان بیان ژن کیتیناز (QRT-PCR) در گیاهان خیار در واکنش به ویروس CMV و تیمارهای مختلف کیتوزان.

تغییرات میزان آنزیم پراکسیداز

در پاسخ به مایه زنی مکانیکی ویروس، فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش قابل توجهی در مقایسه با شاهد سالم دارد. در تیمار کیتوزان همراه با مایه زنی مکانیکی ویروس، فعالیت آنزیم پراکسیداز بدلیل تکثیر بیشتر ویروس در تیمار کیتوزان ۵۰۰ پی پی ام افزایش معنی داری نسبت به تیمارهای ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی پی ام کیتوزان داشت. محلول پاشی کیتوزان روی گیاه خیار قبل از مایه زنی ویروس باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد بدون محلول پاشی می‌شود ولی نسبت به حالت وجود ویروس، فعالیت آنزیم پراکسیداز به میزان کمتری تغییر کرد، در واقع در تیمار کیتوزان ۵۰۰ پی پی ام بدلیل ناکافی بودن این غلظت در القای مقاومت در گیاهان خیار، میزان غلظت ویروس افزایش می‌یابد و با افزایش میزان غلظت ویروس فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش می‌یابد (جدول ۳).

پیشنهاد شده است که ROS همچنین باعث تخریب کلروفیل شده و پراکسیداز در دوران پیری گیاه افزایش می‌یابد (میلاوک و همکاران ۲۰۰۱). با توجه به این که ساخت آنزیم پراکسیداز در این آزمایش در برگ‌های جوان صورت گرفته، و لذا بین فعالیت آنزیم پراکسیداز و غلظت ویروس در برگ‌های سبز رابطه مستقیم وجود دارد. همچنین پراکسیداز باعث تسریع پلیمریزاسیون مرحله نهایی ساخت لیگنین و به طور مستقیم در فعال شدن سیستمیک برای فرایند لیگنینی شدن^۲ شناخته شده است (چیتور و همکاران ۱۹۹۹). بنابراین این تفسیر که افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در طی آلودگی به ویروس و روند لیگنینی شدن به عنوان یک مکانیزم مقاومت در برابر ویروس در نظر گرفته شد (رادوان و همکاران ۲۰۰۷). در پاتوسیستم‌های گونه‌های مختلف گیاهی با پاتوژن‌های قارچی (زنجبیل با *Colletotrichum* و *Fusarium*) باکتریایی (زنجبیل با *Ralstonia solanacearum* لوبیا با *Pseudomonase syringae* pv *phaseolicola*) بیان ژن کیتیناز افزایش نشان داده است (هانگ و همکاران ۲۰۰۰؛ ماجو و همکاران ۱۹۹۰؛ گادیارد و همکاران ۱۹۹۰؛ جاکوبک و همکاران ۱۹۹۳؛ ناصر و همکاران ۱۹۹۰). القاء کیتینازها اغلب همراه با القاء بتا ۱ و ۳ گلوکانازها و PR پروتئین‌ها می‌باشد (کالینگ و همکاران ۱۹۹۳). نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که افزایش بیان ژن کیتیناز و برخی از ژن‌های PR در گیاهان توتون و لوبیا باعث افزایش مقاومت به آلودگی در برابر ویروس موزائیک توتون (*Tabacco mosaic virus*) و ویروس موزائیک یونجه (*Alfalfa mosaic virus*) شده است (مارگیس و همکاران ۱۹۹۳). ژن‌های چندگانه (Multiple) وقتی تحت تنش‌های غیر زنده قرار گرفتند، نشان دادند که نمی‌توانند به عنوان یک مارکر مجزا برای مقاومت به تنش مطرح شوند. در این راستا بیوشیمیست‌ها و

زردی ویروس CMV شدند. این نتایج با یافته‌های بسیاری از محققین مطابقت دارد (نی لور و همکاران ۱۹۹۸؛ هو و همکاران ۲۰۰۸). پراکسیداز از اولین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهان است که در پاسخ به پاتوژن‌های گیاهی فعال می‌شود (میلاوک و همکاران ۲۰۰۱). در این پژوهش مشخص شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با شاهد در همه تیمارها افزایش می‌یابد. برای مثال برگ‌های آلوده شده به ویروس تا پنج برابر باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شدند (جدول ۳). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ‌های آلوده به ویروس Y سیب زمینی و ویروس موزائیک زرد کدو گزارش شده است، همچنین با افزایش شدت بیماری میزان تجمع آنزیم پراکسیداز در این گیاهان افزایش می‌یابد (میلاوک و همکاران ۲۰۰۱؛ رادوان و همکاران ۲۰۰۷؛ وود ۱۹۹۰). در این بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش شدت بیماری افزایش یافت. در تیمار گیاهان خیار با کیتوزان میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به صورت معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش می‌یابد، اما در تیمار کیتوزان همراه با مایه زنی ویروس میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز تا ۵ برابر شاهد می‌باشد (جدول ۳). همچنین با افزایش غلظت این تیمارها فعالیت این آنزیم در تیمارهای غلظتی آلوده به ویروس کاهش می‌یابد. این نتایج نشان دهنده این است که تیمار ۵۰۰ پی پی ام کیتوزان بر القا مکانیسم سیستم آنتی اکسیدانی موثر است. بر این اساس می‌توان فعالیت آنزیم پراکسیداز را به عنوان یک القا کننده مقاومت توسعه داد. در عین حال، هیچ ارتباطی بین فعالیت آنزیم پراکسیداز و کلروفیل وجود ندارد. زیرا محل فعالیت پراکسیداز داخل آپوپلاست می‌باشد. پراکسیداز باعث فعال شدن انواع اکسیژن ROS^۱ می‌شود. ROS باعث آسیب اکسیداتیو از طریق پراکسیداسیون لیپیدی و تخریب غشاء می‌شود.

^۲lignifications^۱Reactive Oxygen Species

نشان داد. با توجه به اطلاعات فوق می‌توان نتیجه گیری کرد که تیمار کیتوزان باعث القا مقاومت، کاهش غلظت ویروس و شدت بیماری از طریق افزایش بیان آنزیم کیتیناز و پراکسیداز که از خانواده پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی هستند، می‌شود و تیمار کیتوزان (۱۵۰۰ پی پی ام) بهترین تاثیر را در القا مقاومت گیاهان خیار دارد.

زیست‌شناسان مولکولی باید به دنبال مجموعه‌ای از مارکرها و ژن‌ها برای پیش بینی مقاومت به انواع خاصی از تنش‌ها با اطمینان بالا باشند (کاور و گوپتا ۲۰۰۵).

در این پژوهش، پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در برگ خیار آلوده به CMV و تیمارهای غلظتی کیتوزان تفاوت معنی‌داری با شاهد

منابع

- جعفرپور ب و جعفرپور ب، ۱۳۸۲. ویروس‌شناسی کاربردی. دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۶۰ ص.
- Ben-Shlom N and Fallik E, 2003. Further suppression of *Botrytis cinerea* disease in cucumber seedlings by chitosan-copper complex as compared with chitosan alone. *Phytoparasitica* 31: 99–102.
- Borad V and Sriram S, 2008. Pathogenesis-related proteins for the plant protection. *Asian Journal of Experimental Sciences* 22:189–196.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Review of Biochemistry* 72: 248–254.
- Chang S, Puryera J and Cairney J, 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Journal of Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116.
- Chittoor JM, Leach JE and White FF, 1999. Induction of peroxidase during defense against pathogens. Pp. 171-193. In, SK Datta, S Muthukrishnan (Eds.). *Pathogenesis Related Proteins in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U and Vad K, 1993. Plant chitinases. *Plant Journal*, 3: 31-40.
- Coma V, Martial-Gros A, Garreau S, Copinet A, Salin F and Deschamps A, 2002. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal Food Science* 67(3): 1162-1169.
- Edreva A, 2005. Pathogenesis related proteins: Research progress in the last 15 years. *Gen. Applied Plant Physiology* 31: 105-124.
- FAO 2006. The FAO STATE, Core production data. Available at <http://faostat.fao.org/site>.
- Fraser RSS, 1987. *Biochemistry of Virus Infected Plants*, Research Studies Press, Letchworth/John Wiley and Sons, New York, USA. from pine trees. *Journal of Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116.
- Gallitelli D, 2000. The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Journal Virus Research* 71: 9-21.
- Godiard L, Raguch F, Froissard D, Leguay JJ, Grooset J, Chartier Y, Meyer Y and Macro Y, 1990. Analysis of the synthesis of several pathogenesis-related proteins leaves in filtrated with water and with compatible and incompatible isolates of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 207-213.
- Hammond-Kosack KE and Jones JDG. 1997. Disease resistance gene-dependent plant defense mechanisms. *Plant Cell* 8: 1773–91.

- Hong JK, Jung HW, Kim YJ and Hwang BK, 2000. Peppergene encoding a basic class II chitinase is inducible by pathogen and ethephon. *Plant Science* 159: 39-49.
- Hu Y, Cai J, Yumin DU, Jianguo L, Changgao W and Xiong K. 2009. Preparation and Anti-TMV activity of guanidinylated chitosan hydrochloride. *Wiley Inter Science* DOI 10.1002/app.29959.
- Jakobek JL and Lindgren PB, 1993. Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. *The Plant Cell* 5: 49-56.
- Janda TS, Szalai G, Rioz- Gonzales K, Veises O and Paldi E, 2003. Comparative study of forast tolerance and antioxidant activity in cereals. *Journal Plant Science* 164: 301-306.
- Kang SM, Jung HY, Kang YM, Yun DJ, Bahk JD, Yang JK and Choi MS, 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science* 166: 745-751.
- Kaur N and Gupta AK. 2005. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Current Science* 88, 1771-1780.
- Koenig R, 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 55: 53-62.
- Majeau N, Trudel J and Asselin A, 1990. Diversity of cucumber chitinase isoforms and characterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. *Plant Science* 68:9-16.
- Margis-Pinheiro M, Martin C, Didierjean L and Burkard G, 1993. Differential expression bean chitinase genes by virus infection, chemical treatment and UV irradiation. *Plant Molecular Biology* 22: 659-668.
- Mazidah M, Yusoff K, Habibuddin H, Tan YH and Lau WH, 2012. Characterization of Cucumber Mosaic Virus (CMV) causing mosaic symptom on *Catharanthus roseus* (L.) G. Don in Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 35 (1): 41-53.
- Milavec M, Ravnikar M and Kovac M, 2001. Peroxidases and photosynthetic pigments in susceptible potato infected with potato virus YNTN. *Jornal Plant Biochemical* 39: 891-898.
- Nandeeshkumar P, Sudisha J, Ramachandra KK, Prakash HS, Niranjana SR and Shekar SH, 2008. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Journal Physiology Molecular Plant Pathology* 72: 188-94.
- Nasser WM, De Tapia G and Burkard N, 1990. Maize pathogenesis related proteins: characterization and cellular distribution of b-1,3- glucanases and chitinases induced by brome mosaic virus infection or mercuric chloride treatment. *Physiology Molecular Plant Pathology* 36: 1-14.
- Naylor M, Alex M, Murphy J, Beryy O and John PC, 1998. Salicylic Acid can induce resistance to plant virus movement. *Journal American Phytopathology Society* 11(9): 860-868.
- Palukaitis P and Garcia-Arenal F, 2003. Cucumber mosaic virus. CMI/AAB descriptions of plant viruses, No 400, <http://www.dpvweb.net>.
- Palukaitis P, Rossinck MJ, Dietzgen RG and Francki RIB, 1992. Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research* 41: 281-348.
- Pu GB, Dong-Ming M, Chen JL, Ma, LQ Wang and HLI GF, 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Journal Plant Cell Reports* 28: 1127-1135.

- Radwan DEM, Khalaf FA, Sabry MY, Hamad A and Guoquan LU, 2007. Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. *Journal Plant Physiology Biochemistry*, 45, 480-489.
- Tecsi L, Smith AM, Maule AJ and Richard C, 1996. Spatial analysis of physiological changes associated with infection of cotyledons of marrow plants with cucumber mosaic virus. *Journal Plant Physiology* 111: 975-985.
- Wood KR, 1990. Pathophysiological alternations. Pp. 30-52, In: C.L. Mandahar (Eds.). *Plant. Viruses. Path*, 2, CRC Press, Boca Raton, viruses. *Journal Plant Diseases* 87: 960-964.
- Yang X, Liangyi K and Tien P, 1996. Resistance of tomato infected with cucumber mosaic virus satellite RNA to potato spindle tuber viroid. *Journal Plant Biochemistry*, 129: 543-51.

Effect of Chitosan on Induction of Resistance in Cucumber Against Cucumber Mosaic Virus

M Attar Fdrdy^{1*}, M Salari², M Salati³, SK Sabbagh² and Sh Valizadeh¹

¹Former MSc Students, Plant Pathology, Department Plant Protection, Faculty of Agriculture University of Zabol.

²Associate Professors, Department Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol.

³Assistant Professor, Agriculture and Natural Resources Research Center of Khorasan Razavi Province.

*Corresponding author: Mohsen.attar86120@gmail.com

Received: 15 Oct 2014

Accepted: 9 May 2015

Abstract

Cucumber is one of the most important cucurbits in Iran. *Cucumber mosaic virus* (CMV) is one of the plant pathogen viruses with widest host range. Resistance induction in plants is one of the most effective methods in combating viral diseases. The effects of foliar spraying of chitosan (0, 500, 1000 and 1500 ppm) on molecular, biochemical, disease severity and virus concentration was investigated in greenhouse conditions through spraying of chitosan on cucurbit seedlings at two foliage stages, in a completely randomized design with three replicates. The results of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) proved systemic infection status of plants. The lowest amounts of virus concentration and disease severity were estimated as 0.46 and 40.7, respectively. Chitinase gene expression levels in chitosan foliar treatments with 500, 1000 and 1500 ppm, increased as 6.229, 11.703 and 14.19 times more than healthy control, respectively. The results of present study showed that chitosan treatment causes induced resistance, reduction of the concentration of virus and disease severity through increasing the expression of chitinase and peroxidase enzymes belonging to the families of pathogenesis-related protein, This study can be an introduction of chitosan usage for increasing expression (over expression) of these gens and providing induced resistance of cucumber to CMV.

Keywords: Chitosan, Chitinase, ELISA, Induced resistance, Peroxidase, Reverse transcription.