

## تأثیر کیتوزان بر القاء مقاومت سیستمیک در خیار به بوتهمیری ناشی از *Pythium aphanidermatum*

سید کاظم صباغ<sup>۱\*</sup> - ابراهیم صباغ<sup>۲</sup> - جواد ابخو<sup>۲</sup> - فروه السادات مصطفوی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۲۵

### چکیده

در این تحقیق اثر کیتوزان در بیان ژن‌های *lipoxygenase* و *Cupi4*، تغییرات آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و فنل کل در بیماری بوتهمیری خیار آلوده به قارچ *Pythium aphanidermatum* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام به روش کاربرد برگی در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، گیاهان تیمار شده با سوسپانسیون قارچ مایه‌زنی و تحت شرایط گلخانه‌ای نگهداری شدند. بررسی پیشرفت بیماری نشان داد که شدت بیماری‌زایی در گیاهان تیمار شده با کیتوزان نسبت به شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در گیاهان تحت تنش نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان به طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی می‌شود. بررسی تغییرات بیان ژن با روش qRT-PCR نشان داد که هر دو غلظت کیتوزان استفاده شده در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آلودگی باعث افزایش سطح بیان ژن‌های *lipoxygenase* و *Cupi4* می‌شود. نتایج این تحقیق به وضوح نشان می‌دهد که استفاده از کیتوزان می‌تواند به عنوان یک راهکار مدیریتی کارآمد، سالم و بی‌خطر برای محیط زیست برای کنترل بیماری بوتهمیری خیار در گلخانه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: کیتوزان، مقاومت سیستمیک اکتسابی، *Pythium aphanidermatum*, *lipoxygenase*, *Cupi4*

### مقدمه

مبارزه با عوامل بیماری‌زا را دشوارتر کرده است. بنابراین، تلاش‌های قابل توجهی برای یافتن برنامه‌های راهبردی زیست محیطی سالم در زمینه کنترل بیماری‌های گیاهی انجام شده است که سبب حفظ سلامتی بشر می‌شود (۹). مقاومت سیستمیک اکتسابی<sup>۵</sup> و مقاومت سیستمیک القایی<sup>۶</sup> دو شکل مقاومت در گیاهان هستند که سبب مقاومت و یا تحمل گیاه در مقابل بیمارگرها می‌شوند. ترکیبات و یا عواملی که سبب القاء مقاومت در گیاه می‌شوند الیستور نامیده می‌شوند. یکی از الیستورهای غیرزنده کیتوزان است که فعالیت‌های ضد میکروبی متنوعی دارد (۱۸، ۳۱ و ۳۳). فعالیت کشندگی کیتوزان در برابر گونه‌های مختلف قارچ‌ها نظیر *Colletotrichum lindemuthianum* در لوبیا و *C. acutatum* در سیب و همچنین اوومیسیت‌ها مستند است (۶، ۱۲ و ۲۶). علی‌رغم نقش ضد قارچی، کیتوزان می‌تواند مکانیسم‌های دفاعی را در گیاهان میزبان القاء کند. تیمار بذرها گندم با کیتوزان، مسیرهای فنیل پروپانئیدی را فعال می‌کند و منجر به تجمع بالای اسیدهای فنولیتیک و لیگنین در برگ‌های اولیه می‌شود (۳۸). برخی محققین گزارش کرده‌اند که

بیماری مرگ گیاهچه ایجاد شده توسط قارچ *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp یکی از بیماری‌های مهاجم و مخرب خیار در تمام جهان به شمار می‌رود. تنش‌های زنده ایجاد شده توسط قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر و یا عفونت‌های ویروسی همواره تولید محصولات کشاورزی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. گزینه‌های مختلفی برای حفاظت محصولات کشاورزی در برابر عوامل بیمارگر وجود دارد. این گزینه‌ها شامل استفاده از ارقام مقاوم، کنترل بیولوژیک، تناوب زراعی، خاکورزی و بهبود شرایط‌های شیمیایی می‌باشد. تقریباً تمام مواد شیمیایی آفت‌کش یا قارچ‌کش یک عملکرد آنتی-بیوتیکی مستقیم دارند اما استفاده از آنها در سطح تجاری غیراقتصادی است و سرطان‌زایی برخی از آنها به اثبات رسیده است. استفاده بیش از حد آنها سبب ایجاد نژادهای مقاوم بیمارگرها شده و این موضوع

۱- دانشیار گروه زیست‌شناسی، مجتمع علوم، دانشگاه یزد

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

۲- استادیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زاهدان

۳- مربی پژوهشی پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل

۴- دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۵- Systemic Acquired Resistance (SAR)

۶- Induced Systemic Resistance

در گلخانه، جهت کشت و آماده‌سازی گیاه استفاده شد. مخلوط خاک شامل خاک بکر و ماسه شسته شده به نسبت ۱:۱، قبل از استفاده، با اتوکلاو در دمای  $121^{\circ}\text{C}$  و فشار یک اتمسفر به مدت یک ساعت سترون شد. غلظت‌های ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان جهت تحریک گیاه و القاء مقاومت در حضور عامل بیمارگر به صورت اسپری روی برگ‌های گیاهچه‌های دو هفته‌ای استفاده شد (۲۳). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار انجام شد.

### تهیه مایه تلقیح و بیماری‌زایی

از جدایه استاندارد قارچ *Pythium aphanidermatum* Fitzp (Edson) تهیه شده از موسسه آفات و بیماری‌های گیاهی ایران جهت تهیه مایه تلقیح استفاده شد. به منظور تهیه مایه تلقیح جهت آزمون بیماری‌زایی، قطعاتی از محیط کشت حاوی پرگنه قارچ به تشتک پتری حاوی محیط کشت جامد CMA<sup>۳</sup> منتقل و جهت تحریک قارچ به رشد سریع، تعداد ۲۰ عدد بذر ضدعفونی شده شاهده به محیط اضافه گردید. سپس تشتک‌های پتری به داخل گرم خانه در دمای  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  منتقل شدند. پس از بازبینی‌های مرتب با مشاهده کلنیزه شدن بذرهای شاهده توسط میسلیوم‌های قارچ، از آنها جهت تلقیح در هر گلدان مورد استفاده قرار گرفت. بدین وسیله جهت تلقیح گیاهچه‌ها، ابتدا اطراف طوقه هر گیاهچه در مرحله ۲-۳ برگی در عمق یک سانتی‌متری از خاک، سه عدد بذر شاهده قرار داده شد و سپس به وسیله ماسه استریل پوشانده شد (۳۷). پس از مایه‌زنی، به منظور افزایش رطوبت محیط، روی گیاهان و سطح گلدان با آب مقطر مه پاشی صورت گرفت و پوشش پلاستیکی سلفان روی آنها کشیده شد. رطوبت نسبی در زیر پوشش پلاستیکی ۹۵ درصد حفظ شد. پس از ۷۲ ساعت پوشش پلاستیکی برداشته شده و گیاهچه‌ها در دما و رطوبت طبیعی نگهداری شدند. یادداشت‌برداری از نمونه‌ها دو هفته بعد از تلقیح به مدت ۳۰ روز انجام شد.

### تست‌های بیوشیمیایی

#### ارزیابی تغییرات فنل کل گیاه

جهت استخراج ترکیبات فنلی، از یک گرم بافت ریشه درون هاون چینی و در درون نیتروژن مایع عصاره‌گیری شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصله از دو لایه پارچه لمل عبور داده شده و در شیشه‌های مک‌کارتی نگهداری شدند. عصاره حاصل در ۴۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. بخش رویی داخل لوله‌ها حاوی ترکیبات فنلی است که از رسوب بافتی جدا شده و جهت آزمایشات بعدی در لوله‌های درب دار ۱۰

کیتوزان سبب افزایش فنیل آلانین آمونیاک (PAL) در گندم (۸)، اسید جاسمونیک در برنج (۳۴) و همچنین سبب القاء کیتیناز و  $\beta$ -۱-۳ گلوکوناز در پرتقال و توت فرنگی می‌شود (۴۰). در جریان فرایند آلودگی گیاه، سنتز پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی رخ می‌دهد. به عنوان مثال پراکسیدازها که محرک‌های اکسیداتیو گونه‌های اکسیژن فعال هستند در فرایند تنفس سلولی و حمله پاتوژن‌ها تولید می‌شوند. افزایش فعالیت آنزیمی پراکسیداز در کاهش شدت بیماری‌هایی مانند پژمردگی فوزاریومی هندوانه *oxyxporum f. sp. melonis* (*Fusarium*) و پوسیدگی قهوه‌ای نخود (*Monilinia fructicola*) گزارش شده است (۲۱ و ۲۲). فنیل آلانین آمونیاک در واقع یک آنزیم کلیدی در متابولیسم فنیل پروپانویید است (۱۵). در میان این روش‌های متابولیتی، گیاهان پلی‌فنل‌ها را سنتز می‌کنند که در فرایند چوبی شدن و ترکیباتی با وزن مولکولی پائین که فیتوالکسین‌ها نامیده می‌شوند به کار می‌روند (۱). میزان سنتز و تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌تواند به وسیله محرک‌های زنده و غیرزنده تغییر کند، بطور کلی پس از شناسایی بیمارگر (یا عوامل غیربیمارگر) توسط میزبان، مکانیزم‌های دفاعی آن به صورت موضعی یا سیستمیک، فعال شود. تاکنون عوامل متعددی در گیاهان به عنوان مکانیزم‌های دفاعی شناخته شده‌اند. از جمله سنتز و ترشح ترکیبات فنلی داخل و خارج سلول، سنتز فیتوالکسین‌ها، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، سنتز گلیکوپروتئین‌های غنی از اسیدهای آمینه غیرمعمول مانند هیدروکسی پرولین گلیکوپروتئین<sup>۱</sup> را نام برد (۱۵). بیان ژن‌های دفاعی مثل ژن‌های کد کننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی بعنوان یکی از شاخص‌های مقاومت به کار می‌رود. ژن *Lipoxygenase*، یکی از این ژن‌ها می‌باشد که نقش آن در مقاومت به عوامل میکروبی در گیاهان مختلف از جمله خیار به *Didymella applanata* *Alternaria cucumerinum* و *Fusarium oxysporum* اثبات شده است (۱۷). اخیراً شناسایی و افزایش بیان ژن *Cupi4* به عنوان ژن دخیل در مقاومت اکتسابی سیستمیک در خیار گزارش شده است (۳۰). در این تحقیق، اثر کیتوزان در القاء مقاومت اکتسابی خیار در برابر *Pythium aphanidermatum*، آنالیز تجمع پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی و همچنین بیان چند ژن مرتبط با مقاومت در گیاه خیار مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### کاشت گیاه و تیمارهای کیتوزان

از رقم خیار حساس S-2862 (بذر F1) به بیماری مرگ گیاهچه

۱- Hydroxyproline Glycoprotein (HPRG)

۲- Cucumber pathogen-induced 4

۳- Corn Meal Agar, Merck, Germany

آلانین که با دستگاه طیف‌سنج اندازه‌گیری می‌شود تعیین می‌گردد. محلول واکنش شامل ۰/۴ میلی‌لیتر عصاره آنزیم، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر برات ۰/۱ مولار با pH ۸/۸ و ۰/۵ میلی‌لیتر ال-فنیل آلانین (۱۲ میلی مولار) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. فعالیت آنزیمی در ۲۹۰ nm با استفاده از دستگاه طیف‌سنج اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی به صورت مول‌های ترانس سینامیک اسید/میلی‌گرم وزن تر/ ساعت بیان شد (۷). جذب همه نمونه‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (Unico, USA) خوانده شدند و داده‌ها بر اساس آزمایش فاکتوریل با فاکتور زمان (۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت) و غلظت (۱۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار با استفاده از نرم‌افزار SPSS تحت آنالیز قرار گرفتند و میانگین‌ها در سطح یک درصد با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) مقایسه شدند.

### استخراج RNA و اندازه‌گیری کمی بیان ژن

استخراج RNA در مرحله پیش از اعمال پرایمینگ، ۲۴ ساعت بعد از پرایمینگ و دوره‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی قارچ در مرحله ۳-۴ برگی گیاه انجام شد. بدین منظور ۵۰ گرم از برگ‌های مربوط به هر تیمار با استفاده از ازت مایع در داخل هاون چینی پودر و استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری Cinnapure RNA (شرکت سیناژن) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت مولکول‌های mRNA به ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و روش طیف‌سنجی با دستگاه اسکن دراپ (Scandrop, Analytika, Germany) انجام شد. سنتز رشته اول از مولکول‌های تک رشته‌ای mRNA با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit (Vivantis Inc.) انجام گردید.

### بررسی میزان بیان ژن

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در حالت القاء مقاومت در گیاه تحت تنش بیماری با استفاده از روش کمی‌سنجی با استفاده از دستگاه لایت سایکلر ساخت شرکت کوربت (Curbet3000, Australia) انجام شد. محلول واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر در تیوب‌های مخصوص تهیه گردید. این محلول شامل ۲ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) cDNA، یک میکرولیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکومولار) (جدول ۱)، ۱۰ میکرولیتر (Biotium, Inc., Hayward CA, USA) Hot Tag EvaGreen qPCR premix 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°C به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه ۹۴°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه

میلی‌لیتری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد برای تهیه منحنی استاندارد جهت ارزیابی میزان فنل کل از اسید کافئیک استفاده شد (۴۲).

### عصاره‌گیری جهت سنجش فعالیت آنزیمی

جهت سنجش فعالیت آنزیمی، نیم گرم بافت گیاهی ریشه در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع پودر شد. سپس یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مولار به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل به میکروتیوب دو میلی‌لیتری منتقل و در ۱۳۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایع رویی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳۹).

### سنجش پروتئین کل محلول

محتوای پروتئین کل با روش برادفورد و استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (۲). بدین منظور یک میلی-لیتر از محلول برادفورد به همراه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی پس از مخلوط شدن کامل، در دستگاه طیف‌سنج قرار داده شد و جذب محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت شد. غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

### سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت پراکسیداز از سوبسترای پیروگال استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر پیروگال تهیه شده به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۰/۵ میلی‌لیتر هیدروژن پراکسیداز ۱ درصد مخلوط شد. تغییرات جذب نور با طول موج ۴۲۰ نانومتر در محلول‌های تهیه شده به مدت یک دقیقه توسط دستگاه طیف سنج ثبت گردید (۲۵).

### ارزیابی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز محلول واکنش از عصاره گیاهی در حجم سه میلی‌لیتر تهیه شد (۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر پیروگال ۰/۳ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی). تغییرات جذب نور توسط دستگاه طیف‌سنج در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید (۵).

### ارزیابی فعالیت پلی فنیل آلانین<sup>۱</sup>

فعالیت آنزیمی از طریق تولید ترانس اسید سینامیک از ال-فنیل

۱- Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

زنجره‌های پلیمرز (E) برای ژن هدف (GOI) و مرجع (GHK) و تفاوت (Δ) نقطه تقاطع (CP) یا محل برخورد نمودار خطی تکثیر با خط مربوط به سطح آستانه تکثیر (Ct) یک نمونه در مقابل کنترل ( $\Delta C_{P\text{control-sample}}$ ) محاسبه می‌شود (۲۰ و ۲۹). آنالیز داده‌های بدست آمده با نرم افزار REST 2009 که تخصصی داده‌های خروجی Real time PCR می‌باشد انجام گرفت.

تنظیم گردید. هر آزمایش در چهار تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی انجام شد، داده‌های حاصل از سطح آستانه چرخه‌های هر واکنش با استفاده از روش Pfaffl و معادله زیر تجزیه و آنالیز شدند (۲۹).

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Efficiency}_{GOI} \Delta C_{P(\text{control-sample})}}{\text{Efficiency}_{GHK} \Delta C_{P(\text{control sample})}}$$

در این معادله نسبت سطح بیان ژن هدف براساس راندمان واکنش

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در واکنش Real Time PCR جهت تکثیر ژن‌های *Actin* و *Cupi4 Lipoxigenase*

نام ژن (Name of gene)	توالی آغازگر (Primer sequence)	طول قطعه تکثیری (Fragment length)	شماره دسترسی (Accession no.)
<i>Lipoxigenase</i>	Forward 5'-GAGAGCGTAAGGAATGGGATAGAA-3'	66	U36339
	Reverse 5'-CACCGGGTTCGGAAGG-3'		
<i>Cupi4</i>	Forward 5'-TCACTGTGGTGTGTCTCTC-3'	180	DQ482461
	Reverse 5'-ACTCAAGCCATTGCCTTC-3'		
<i>Actin</i>	Forward 5'-GAAGGAATAACCACGCTCAG-3'	117	DQ115882
	Reverse 5'-ACACAGTCCCATCTACGAG-3'		

## نتیجه‌گیری

### تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان روی شدت بیماری

شدت بیماری‌زایی در گیاهان تیمار شده با کیتوزان در هر دو غلظت به کار برده شده به طور معنی‌داری کاهش یافت. غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام این ماده بیشترین تأثیر را در کنترل این بیماری نشان داد. گیاهانی که در حضور کیتوزان و پاتوژن رشد کردند به طور معنی‌داری سالم باقی ماندند و علائم بیماری را در طول دوره آزمایش نشان ندادند. سیستم ریشه‌ای به خوبی رشد کرده بود و هیچ گونه علائمی را نشان ندادند بود در حالی که گیاهانی که تنها با بیمارگر تلقیح شده بودند علائم بیماری را پس از ۲۴ ساعت از تلقیح نشان دادند. از روز سوم گیاهان از بین رفتند و یا سطح بالایی از پوسیدگی ریشه را نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر کاربرد کیتوزان با غلظت‌های متفاوت روی شدت بیماری‌زایی

Table 2- The effect of Chitosan application with different concentration on disease severity

تیمارها Treatments	شدت بیماری‌زایی (Disease severity)
0	4 <sup>a*</sup>
100	67.2 <sup>b</sup>
400	1.567 <sup>b</sup>

\* تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون LSD در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند

\*The treatment that has been showed with different letter in LSD test has significantly different at the 1% level

### میزان محتوای فنل کل

نتایج ارزیابی مقدار ترکیبات فنلی در ریشه‌های بوته‌های تیمار شده با کیتوزان در جدول ۳ مشاهده می‌شود. بوته‌های تیمار شده با کیتوزان منجر به تجمع فنل در عصاره گیاهی شد. حداکثر تجمع فنل در تیمار ۴۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان در ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد و پس از گذشت این زمان فعالیت آن کمی کاهش یافت ولی در سطوح بالاتر در طول دوره آزمایش باقی ماند. اما در گیاهان شاهد آلوده مقدار ترکیبات فنولی تا ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری افزایش یافته ولی بعد از آن تغییر معنی‌داری در میزان فنل کل آنها مشاهده نشد. میزان این ترکیبات در گیاهان تیمار شده با کیتوزان بطور معنی‌داری بیشتر از میزان آن در شاهد آلوده بود در این تیمار میزان ترکیبات فنولی از اولین ساعات دوره مورد بررسی تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری روند افزایشی داشت. روند افزایشی در تیمار ۲۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان نیز تا ۷۲ ساعت پس از تلقیح مشاهده شد.

### ارزیابی مقدار پروتئین کل

محتوای پروتئین در گیاهانی که تنها با پاتوژن تلقیح شده بودند به طور معنی‌داری در مقایسه با گیاهانی که کیتوزان نیز تلقیح شده بودند کاهش داشت. بیشترین مقدار پروتئین کل در گیاهانی که با کیتوزان تلقیح شده بودند در غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام و در ۹۶ ساعت پس از کاربرد کیتوزان بود (جدول ۴).

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان روی فعالیت فنل کل در بوته‌های خیار

Table 3- The effect of different concentration of Chitosan on phenol activity in cucumber seedlings

غلظت (پی پی ام) Concentration (ppm)	ساعت پس از مایه‌زنی (Hours post inoculation)			
	0	48	72	96
0	0.4733 <sup>d</sup>	0.4133 <sup>d</sup>	0.2033 <sup>fa</sup>	0.44 <sup>d</sup>
100	0.6 <sup>b</sup>	0.5167 <sup>c</sup>	0.31 <sup>e</sup>	0.58 <sup>b</sup>
400	0.67 <sup>a</sup>	0.61 <sup>ab</sup>	0.41 <sup>d</sup>	0.59 <sup>b</sup>

\* تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون LSD در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند  
\*The treatment that has been showed with different letter in LSD test has significantly different at the 1% level

جدول ۴- اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان روی پروتئین کل در بوته‌های خیار

Table 4- The effect of different concentration of Chitosan on total protein in cucumber seedlings

غلظت (پی پی ام) Concentration (ppm)	ساعت پس از مایه‌زنی (Hours post inoculation)			
	0	48	72	96
0	0.21 <sup>g</sup>	0.22 <sup>g</sup>	0.23 <sup>g*</sup>	0.24 <sup>g</sup>
100	0.4067 <sup>fb</sup>	0.47 <sup>e</sup>	0.56 <sup>d</sup>	0.69 <sup>c</sup>
400	0.53 <sup>d</sup>	0.681 <sup>c</sup>	1.1 <sup>b</sup>	2.37 <sup>a</sup>

\* تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند  
\*The treatment that has been showed with different letter in LSD test has significantly different at the 1% level

#### فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

تیمار با کیتوزان در نهال‌های خیار سبب افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز شد. فعالیت پلی فنل اکسیداز در نهال‌های تلقیح شده با کیتوزان به همراه پاتوژن در ۹۶ ساعت پس از تلقیح در غلظت ۴۰۰ پی پی ام به حداکثر رسید. نهال‌های تیمار شده با کیتوزان به همراه پاتوژن افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز را نشان دادند در حالی که در گیاهانی که فقط با عامل بیماری‌زا مایه‌کوبی شده بودند به طور معنی‌داری کاهش مقدار پلی فنل اکسیداز مشاهده شد (جدول ۶).

#### فعالیت آنزیم پراکسیداز

در این مطالعه، فعالیت پراکسیداز پس از تلقیح با کیتوزان در هر دو غلظت افزایش یافته است و در ۹۶ ساعت پس از تیمار گیاهان با کیتوزان در غلظت ۴۰۰ پی پی ام به حداکثر مقدار خود رسید. در حالی که فعالیت پراکسیداز در نهال‌های خیار که فقط با عامل بیماری‌زا مایه‌کوبی شده بودند پایین‌تر بود. فعالیت پراکسیداز در تیمارهایی که کیتوزان دریافت کرده بودند به تدریج افزایش یافت و به بالاترین سطح خود نسبت به شاهد در ۹۶ ساعت پس از تلقیح رسید (جدول ۵).

جدول ۵- اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در بوته‌های خیار

Table 5- The effect of different concentration of Chitosan on peroxidase enzyme activity of cucumber seedlings

غلظت (پی پی ام) Concentration (ppm)	ساعت پس از مایه‌زنی (Hours post inoculation)			
	0	48	72	96
0	38 <sup>e</sup>	40 <sup>e</sup>	41 <sup>e</sup>	43 <sup>e</sup>
100	40 <sup>e</sup>	64 <sup>d</sup>	88 <sup>bc</sup>	82 <sup>c</sup>
400	87 <sup>bc</sup>	90 <sup>bc</sup>	94 <sup>b</sup>	116 <sup>a</sup>

\* تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون LSD در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند  
\*The treatment that has been showed with different letter in LSD test has significantly different at the 1% level

جدول ۶- اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان روی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در بوته‌های خیار

Table 6- The effect of different concentration of Chitosan on polyphenoloxidase enzyme activity of cucumber seedlings

غلظت (پی پی ام) Concentration (ppm)	ساعت پس از مایه‌زنی (Hours post inoculation)			
	0	48	72	96
0	۱۸ <sup>gh*</sup>	21 <sup>g</sup>	21 <sup>g</sup>	18 <sup>h</sup>
100	19 <sup>gh</sup>	37 <sup>f</sup>	44 <sup>e</sup>	42 <sup>ef</sup>
400	143 <sup>d</sup>	158 <sup>c</sup>	197 <sup>a</sup>	235 <sup>b</sup>

\* تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند در ازمون دانکن در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی دار هستند

\*The treatment that has been showed with different letter in LSD test has significantly different at the 1% level

Actin و Cupi4 Lipoxygenase به ترتیب ۹۵/۳، ۹۵/۵ و ۹۵/۱

بود. بنابراین استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه از اعتبار لازم برخوردار می‌باشد. نتایج حاصل از این واکنش نشان داد که بر اساس آزمون LSD میزان بیان نسبی ژن‌های Cupi4 و Lipoxygenase در گیاهان تیمار شده با کیتوزان نسبت به گیاهان کنترل افزایش معنی‌داری در سطح ۱ درصد داشته است (شکل‌های ۲ و ۳). به‌عنوان شاهد بیان این ژن‌ها در گیاهان کنترل در تمام زمان‌های نمونه-برداری مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که میزان بیان ژن-های Cupi4 و Lipoxygenase در گیاهان شاهد برای تمامی زمان-های نمونه‌برداری یکنواخت است در حالی که افزایش معنی‌داری در میزان بیان این ژن‌ها در گیاهان تیمار شده با کیتوزان اتفاق افتاد. این افزایش بیان از ۲۴ ساعت بعد از اسپری کردن شروع گردید و در ۴۸ ساعت بعد از اسپری کردن به حداکثر خود رسید و در ۷۲ ساعت بعد از تلقیح کاهش نسبی داشت. کیتوزان در دو غلظت ۱۰۰ و ۴۰۰ پی-پی‌ام تاثیر معنی‌داری در افزایش بیان هر دو ژن مورد بررسی داشت و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت از بعد از اسپری کردن، غلظت ۴۰۰ پی-پی‌ام افزایش بیان بیشتری را نسبت به غلظت ۱۰۰ پی-پی‌ام در پی داشت.

تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر فعالیت آنزیم PAL

نتایج بررسی فعالیت آنزیم PAL در بوته‌های تیمار شده با کیتوزان در جدول ۶ مشاهده می‌شود. میزان فعالیت این آنزیم در ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری به بالاترین میزان خود رسید. هر دو غلظت به کار رفته کیتوزان تأثیر قابل ملاحظه‌ای در افزایش میزان فعالیت این آنزیم داشتند در حالی که در نهال‌های شاهد آلوده فعالیت PAL روند کاهشی داشت (جدول ۷).

#### واکنش Real-time PCR

مقدار آغازگر و دمای مرحله اتصال آغازگر از فاکتورهای اساسی در بهینه کردن واکنش Real-time PCR محسوب می‌شوند. شرایط بهینه طوری فراهم شد که بازدهی واکنش در بهترین حالت ممکن و هیچ محصول غیراختصاصی در طول واکنش تولید نشود که این امر با استفاده از منحنی ذوب (مشاهده یک پیک ذوب منفرد) تأیید شد (شکل ۱).

روش مقایسه‌ای چرخه آستانه در Real Time PCR مبتنی بر تغییرات چرخه آستانه نمونه آزمایش در مقایسه با نمونه کنترل است که با کمک آن نسبت تعداد نسخه نمونه اولیه قابل اندازه‌گیری می-باشد. در این آزمایش راندمان واکنش پی-سی-آر برای ژن‌های

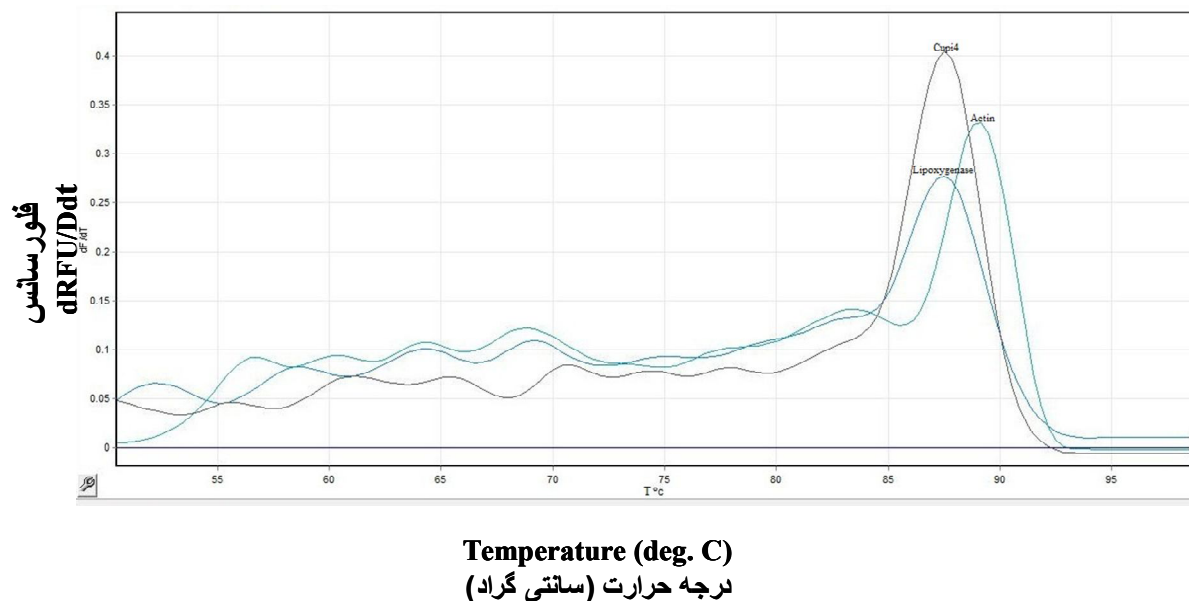
جدول ۷- اثر کیتوزان در فعالیت آنزیم آمونیاک فنیل آلانین لیا (PAL) در بوته‌های خیار

Table 7- The effect of different concentration of Chitosan on phenylalanine ammonia (PAL) enzyme activity of cucumber seedlings

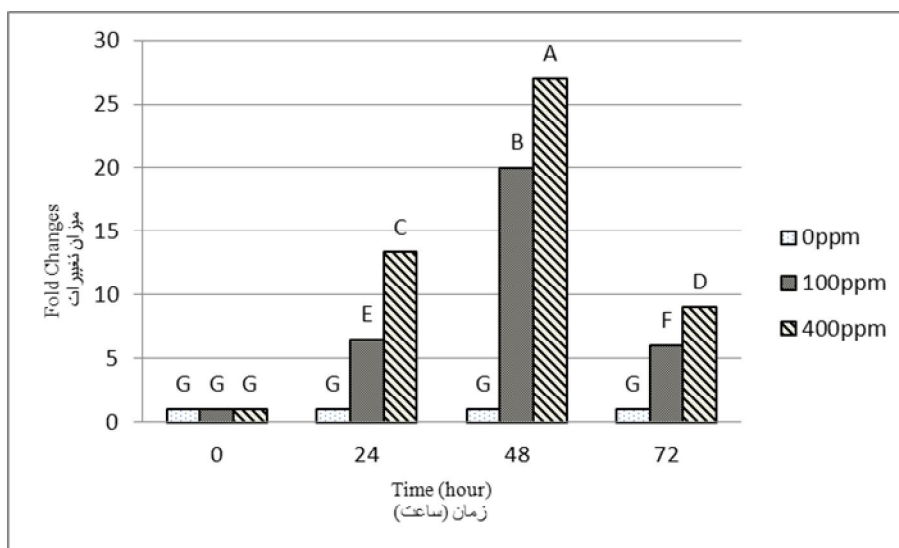
غلظت (پی پی ام) Concentration (ppm)	ساعت پس از مایه‌زنی (Hours post inoculation)			
	0	48	72	96
0	0.46 <sup>c*</sup>	0.5483 <sup>bc</sup>	0.481 <sup>bc</sup>	0.3133 <sup>d</sup>
100	0.5 <sup>bc</sup>	0.56434 <sup>a</sup>	0.64 <sup>a</sup>	0.62 <sup>a</sup>
400	0.53 <sup>b</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>

\* تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در ازمون LSD در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند

\*The treatment that has been showed with different letter in LSD test has significantly different at the 1% level



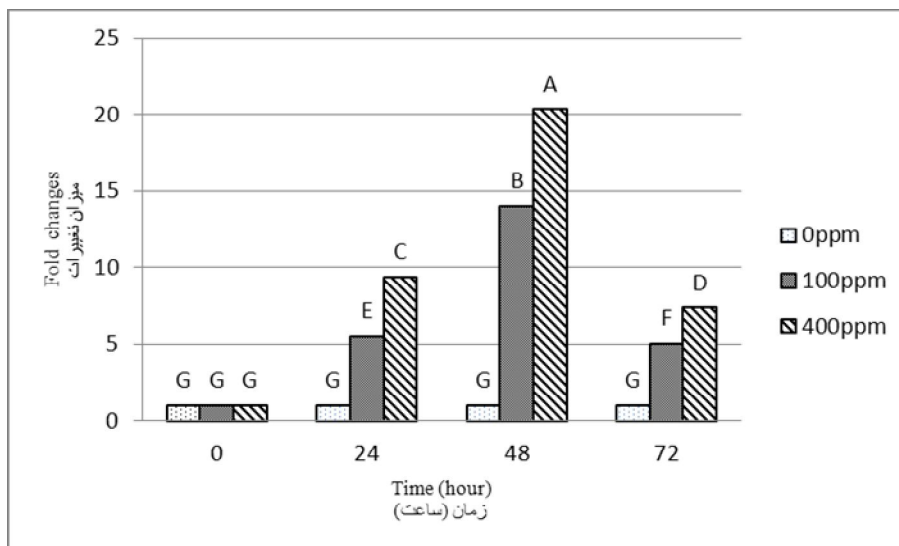
شکل ۱- آنالیز منحنی ذوب ژن‌های *Lipoxxygenase*، *Cupi4* و *Actin*  
 Figure 1- Thermal melting curve analysis of *Lipoxxygenase*, *Cupi4* and *Actin* genes



شکل ۲- تغییرات بیان ژن *Lipoxxygenase* در فواصل زمانی قبل از آلودگی: زمان صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اسپری کردن کیتوزان با غلظت‌های مختلف (صفر، ۱۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام). تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون LSD در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند

Figure 2- The fold change of *Cupi4* gene expression at time interval before infection: Zero time, 24, 48 and 72 hours after Chitosan spraying with different concentration (0, 100 and 400 ppm).

\*The treatment that has been showed with different letter in LSD test has significantly different at the 1% level



شکل ۳- تغییرات بیان ژن *Cupi4* در فواصل زمانی قبل از آلودگی: زمان صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اسپری کردن کیتوزان با غلظت‌های مختلف (صفر، ۱۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام). تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون LSD در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند

Figure 3- The fold change of *Cupi4* gene expression at time intervals before infection: Zero time, 24, 48 and 72 hours after chitosan spraying with different concentration (0, 100 and 400 ppm). \*The treatment that has been showed with different letter in LSD test has significantly different at the 1% level

شد. فعالیت آنزیم PAL منجر به سنتز انواع متابولیت‌های ثانویه مربوط به دفاع گیاه می‌شود که سبب القاء فیتوالکسین‌ها و یا القاء فیتوآنتی‌سپین‌ها در بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌شود (۳). مطالعات متعدد نشان داده است که شروع مقاومت القایی، همزمان با بیان هماهنگ آنزیم‌های مربوط به دفاع مانند PAL، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز است (۳۵). همچنین گزارشات متعددی از القاء مقاومت در گیاهان به وسیله کیتوزان گزارش شده است (۱۰ و ۲۸). بسیاری از ترکیبات فنلی گیاهی عملکرد ضد میکروبی دارند و به عنوان پیش‌ماده برای پلی‌مرهای ساختاری و یا مولکول‌های علامت دهنده، شناخته شده است (۱۴ و ۱۶). مطالعات تفصیلی، نقش PAL، پراکسیداز و ترکیبات فنلی را به عنوان مولفه‌های کلیدی در القاء مقاومت سیستمیک در برخی گیاهان در برابر پاتوژن‌های مختلف به وضوح نشان داده است (۲۷ و ۳۶). در این تحقیق، آنالیز داده‌های پروتئینی نشان داد که کیتوزان سبب افزایش پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی شده که با نتایج کارهای مشابه با القاء‌کنندگان مختلف مطابقت دارد. کاهش علائم بیماری‌زایی می‌تواند به دلیل خاصیت ضد میکروبی روی بیمارگر و یا فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی وابسته به پروتئین‌های بیماری‌زایی در گیاه باشد. اثر قارچ‌کشی کیتوزان روی برخی از بیمارگرها مانند *P. Colletotricum acutatum* و *Botrytis cinera aphanidermathum* نیز گزارش شده است (۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۹). در این مطالعه قارچ

نتایج نشان می‌دهد که کیتوزان با غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام در ۴۸ ساعت بعد از اسپری کردن آن روی گیاهان خیار آلوده به *P. aphanidermatum* سبب بیشترین میزان بیان در ژن‌های *Lipoxygenase* و *Cupi4* می‌شود.

## بحث

در این تحقیق نقش کیتوزان به عنوان یک محرک خارجی در القاء مقاومت در خیار آلوده به بیماری مرگ گیاهچه مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های مربوط به دفاع در بیماری بوته‌میری خیار و همچنین دو ژن مسئول مقاومت در خیار، برابر عوامل بیمارگر مورد بررسی قرار گرفت. آلودگی گیاه با عوامل بیماری‌زا، یکی از محرک‌های عمده استرس‌زا است که گیاهان غالباً با آن روبه‌رو می‌شوند. در پاسخ به تنش‌های زیستی، میزان آنزیم‌های دفاعی گیاه علیه بیمارگر افزایش قابل ملاحظه‌ای خواهد یافت. سطح اولیه و افزایش بیان آنزیم‌های دفاعی مختلف یک ویژگی مهم از مقاومت گیاه به عوامل بیماری‌زا است. منابع آنزیمی از جمله PAL، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در طول فعل و انفعالات میزبانی-پاتوژن دستخوش تغییرات شده و مقاومت سیستمیک گیاه را بدنبال خواهند داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار گیاهچه‌های خیار با کیتوزان و تلقیح با *P. aphanidermatum* سبب افزایش میزان تجمع سطح PAL، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و ترکیبات فنلی نسبت به گیاهان کنترل



*Didymella applanata*, *Alternaria cucumerinum*، *Fusarium oxysporum* و *Botrytis cinerea* شده است (۱۷). فونتومات و همکاران نشان دادند که میزان بیان ژن *Cupi4* در تلقیح خیار با محرک های شیمیایی اسید سالیسیلیک و بنزوتیادیازل و با بیمارگرهای *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* و *Colletotrichum lagenarium* Tobacco necrosis virus موجب ایجاد مقاومت سیستمیک اکتسابی در برابر این بیمارگرها می گردد (۳۰). نتایج ما در این تحقیق با مطالعات قبلی مطابقت دارد و حاکی از افزایش قابل توجه نسخه های این ژن در گیاه خیار تیمار شده داشت. بیشترین تجمع این ژن در برگ ها بود و موجب تولید ترکیباتی شد که خاصیت باکتری کشی و قارچ کشی داشتند. بیشترین میزان این ژن در برگ ها نشان دهنده حساسیت بالای برگ ها به بیمارگر می باشد. مطالعه حاضر نشان می دهد که القاء مقاومت سیستمیک توسط کیتوزان در برابر *P. aphanidermatum* در گیاهان خیار مربوط به آنزیم های دفاعی می شود. با توجه به نتایج این تحقیق، استفاده از کیتوزان می تواند به عنوان یک راهکار مدیریتی کارآمد، سالم و بی خطر برای محیط زیست برای کنترل بیماری بوتهمیری خیار در گلخانه مورد استفاده قرار گیرد.

### سپاسگزاری

این تحقیق با مساعدت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان انجام گردید که در اینجا از معاون پژوهشی آن دانشگاه و کارشناسان آن حوزه تقدیر و تشکر بعمل می آید. همچنین از سرکار خانم نجمه غزلباش و آقای محمود شهبابی به خاطر همکاری در اجرای بخشی از این تحقیق تشکر می شود.

*aphanidermatum* باعث کاهش پروتئین کل در گیاه خیار شد، که با نتایج مطالعات قبلی که شاهد کاهش میزان فنل کل در کاربرد اسید سالیسیلیک در گیاه لوبیا بوده است مطابقت دارد (۴). کاهش قابل توجه در محتوای پروتئینی در نتیجه عفونت گیاه توسط بیمارگر قارچی ممکن است به علت برخی از فعالیت های مربوط به پاسخ فوق حساسیت در برابر پاتوژن باشد که منجر به سنتز ترکیبات فنلی گیاه در جهت مقاومت به بیمارگر عمل می کند. کیتوزان به عنوان یک ماده ضد میکروبی شناخته شده است که می تواند مانع از رشد برخی از بیمارگرهای گیاهی شود. به عنوان مثال گزارش شده است که تا ۵۸ درصد مانع از رشد میسلیومی *Pythium irregular* می شود (۲۸). اختلال در رشد *P. aphanidermatum* همراه با افزایش پاسخ دفاعی در خیار گزارش شده است (۱۰). کیتوزان با تحریک و تولید آنزیم های وابسته به بیماری زایی در گیاه خیار سبب حفاظت از بیماری پوسیدگی ریشه ناشی از *P. aphanidermatum* (۱۳) و همچنین باعث افزایش مقاومت گیاه سویا در برابر *Fusarium solani* f. sp. *glycines* شده است (۳۲). کاهش شدت بیماری زایی بوسیله کیتوزان برای برخی از بیمارگرهای گیاهی گزارش شده است. سادیاباما و بالاسوبرامانیان گزارش دادند که شدت بیماری زایی زنگ نخود با تلقیح کیتوزان کاهش یافته است (۴۱). همچنین ما و همکاران دریافتند که فرو بردن میوه های هلو در محلول کیتوزان باعث کاهش القاء بیماری *Monilinia fruticola* می شود (۲۱). نتایج حاصل از آزمایش بررسی کمی ژن های دخیل در مقاومت گیاهان به عوامل بیمارگر نشان داد که میزان بیان نسبی ژن های *Lipoxygenase* و *Cupi4* در گیاهان بیمار القاء شده توسط کیتوزان نسبت به گیاهان کنترل، افزایش قابل توجهی داشت. نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که افزایش بیان ژن *Lipoxygenase* و برخی از ژن های PR در گیاه خیار باعث افزایش مقاومت به آلودگی در برابر قارچ های

### منابع

- Alonso-Villaverde V., Voinesco F., Viret O., Spring J., and Gindro K. 2011. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 265-274.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Campos A.D., Ferreira A.G., and Vozari Hampe M.M. 2003. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Brazilian journal of plant physiology*, 15: 129-134.
- Chandra A., and Bhatt R.K. 1998. Biochemical and physiological response to salicylic acid in relation to the systemic acquired resistance. *Photosynthetica*, 35: 255-25.
- 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.
- Di Piero R.M., and Garda M.V. 2008. Quitosana reduz a severidade da antracnose eaumenta a atividade de glucanase em feijoeirocomum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 1121-1128.

- 7- Dickerson D.P., Pascholati S.F., Hagerman A.E., Butler L.G., and Nicholson R.L. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxy cinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. *Physiol Mol Plant Pathology*, 25: 111-123.
- 8- Dornenburg H., and Knorr D. 1997. Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. *Food Technology*, 51: 47- 54.
- 9- El-Gamal N.G.F., and Abd-El-Kareem Y.O. 2007. Induction of systemic resistance in potato plants against late and early blight diseases using chemical inducers under greenhouse and field conditions. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3: 73–81.
- 10- El Ghaouth A., Arul J., Grenier J., Benhamou N., Asselin A., and Belanger R. 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. *Phytopathology*, 84: 313–320.
- 11- Felipini R.B., and Di Piero R.M. 2009. Redução da severidade da podridão-amarga de maca em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44: 1591-1597.
- 12- 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(6): 534-538.
- 13- Grenier J., and Asselin A. 1990. Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3: 401–417.
- 14- Hammerschmidt R., and Nicholson R.L. 1977. Resistance of maize anthracnose: Changes in host phenols and pigments. *Phytopathology*, 67: 251-258.
- 15- Hammerschmidt R., and Kagan I.A. 2001. Phytoalexins into the 21<sup>st</sup> century. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59: 59-61.
- 16- Hammerschmidt R. 2005. Phenols and plant pathogen interactions: The saga continues. *Physiol. Molecular Plant Pathology*, 66: 77-78.
- 17- Jayaraj J., Jeff N., and Zamir K.P. 2011. Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. *Journal of Applied Physiology*, 23: 353–361.
- 18- Kulikov S.N., Chirkov S.N., Iina A.V., Lopatin S.A., and Varlamov V.P. 2006. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Prikl. Biokhim. Microbiology*, 42 (2): 224–228.
- 19- Liu L., Tian S., Meng X., and Xu Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 44: 300-306.
- 20- Livak K.J., and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods*, 25: 402–408.
- 21- Ma Z., Yang L., Yan H., Kennedy J.F., and Meng X. 2013. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. *Carbohydrate Polymers*, 94: 272-277.
- 22- Madakhah E., Lotfi M., Nabipour A., Rahmampour S., Banihashemi Z., and Shoorooei M. 2012. Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race1. *Scientia Horticulturae*, 135: 171-176.
- 23- Mandal S., Mallick N., and Mitra A. 2009. Salicylic Acid-induced Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Tomato. *Plant physiology and biochemistry*, 47: 642-649.
- 24- Mauch F., Hadwiger L.A., and Boller T. 1984. Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β-1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitor. *Plant Physiology*, 76: 607–611.
- 25- Mohammadi M., and Kazemi H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Journal of Plant Science*, 162: 491-498.
- 26- Muzzarelli R.A.A., Tarsi R., Filippini O., Giovanetti E., Biagini G., and Varaldo P.E. 1990. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob. Agents Chemother*, 34, 2019–2023.
- 27- Nyochembeng L.M., Beyl C.A., and Pacumbaba R.P. 2007. Peroxidase Activity, isozyme patterns and electrolyte leakage in roots of cocoyam infected with *Pythium myriotylum*. *Journal of Phytopathology*, 155: 454–461.
- 28- Par J.H., Kim R., Aslam Z., Jeon C.O., and Chung Y.R. 2008. *Lysobacter capsici* sp. Nov., with antimicrobial activity, isolated from the rhizosphere of pepper and emended description of the genus *Lysobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 387–392.
- 29- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*, 29: 2002-2007.
- 30- Phuntumart V., Marro P., Sticher L., and Metraux J.P. 2006. A novel cucumber gene associated with systemic acquired resistance. *Plant Science*, 171: 555-564.
- 31- Pospieszny H., Chirkov S., and Atabekov J. 1991. Induction of antiviral resistance in plants by chitosan. *Plant Science*, 79: 63–68.

- 32- Prapagdee B., Kotchadat K., Kumsopa A., and Visarathanonth N. 2007. The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. *Glycines*. Bioresource Technology, 98(7): 353–1358.
- 33- Rabea EI., El Badawy M.T., Stevens C.V., Smaghe G., and Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. Biomacromolecules, 4: 1457–1465.
- 34- Rakwal R., Tamogani S., Agrawal G.K., and Iwahashi H. 2002. Octadecanoid singallin component ‘burst’ in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. Biochemical and Biophysical Research Communications, 295: 1041–1045.
- 35- Ramesh Sundar A., Viswanathan R., Malathi P., and Padmanaban P. 2006. Mechanism of resistance induced by plant activators against *Colletotrichum falcatum* in sugarcane. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 39: 259 – 272.
- 36- Ramesh Sundar R., Viswanathan A., and Nagarathinam S. 2009. Induction of systemic acquired resistance (SAR) using synthetic signal molecules against *Colletotrichum falcatum* in sugarcane Sugar. Technology, 11(3): 274-281.
- 37- Ramoorthy V., raguchander T., and Samiyappan R. 2002. Enhancing Resistance of tomato and hot peper to Pythium disease by seed treatment with fluorescent Pseudomonas. European Journal of Plant Pathology, 108: 429-441.
- 38- Reddy M.V., Arul J., Angers P., and Couture L. 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 47: 1208–1216.
- 39- Reuveni R. 1995. Biochemical markers as tools for screening resistance against plant pathogens, In: Reuveni, R. (Eds.), Novel Approaches to Integrated Pest Management, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 21-45.
- 40- Romanazzi G., Nigro F., Ippolito A., Venere D.D., and Salerno M. 2002. Effects of pre-and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. Journal of Food Science, 67: 1862–1867.
- 41- Sathyabama M., and Balasubramanian R. 1998. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. Crop Protection, 17: 307–313.
- 42- Seevers D.M., Daly J.M., and Catedral F.F. 1971. The role of peroxidase isozyme in resistance to wheat stem rust disease. Journal of Plant Physiology, 48: 353-360.