

بیان ژن‌های دفاعی لوبیا محلی گیلان (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت

آلودگی با قارچ *Sclerotium rolfisii*

Expression of the defense-related genes in Guilan local bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under the *Sclerotium rolfisii* fungus infection

مهران غلامی^۱، آسا ابراهیمی^{۱*}، جواد مظفری^۲، محمدرضا بی‌همتا^۳، مهدی رهای^۴

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی،

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- استاد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴- دانشیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Gholami M¹, Ebrahimi A^{*1}, Mozafari J², Bihamta MR³, Rahaie M⁴

1- PhD Student, Associate Professor, Department of plant breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Professor, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4- Associate Professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: dr.asaebrahimi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۲)

چکیده

لوبیا، یکی از حبوبات غنی از پروتئین است که در اثر بیماری با قارچ خاک‌زاد *Sclerotium rolfisii* دچار پوسیدگی طوقه و کاهش شدید عملکرد می‌شود. زراعت لوبیا در گیلان، عمدتاً به کشت بهاره و تابستانه نوعی لوبیای محلی پاکوتاه با رنگ‌های قرمز و سرمه‌ای بر روی دانه، اختصاص دارد. ۳۰ لاین انتخابی لوبیا محلی گیلان، با بیماری‌زاترین جدایه *S. rolfisii* تحت آلوده-سازي مصنوعی در گلخانه قرار گرفتند. شاخص شدت بیماری (DSI) و صفات مورفولوژیک مرتبط با واکنش به قارچ اندازه‌گیری شدند. از ۸ نشانگر اختصاصی SCAR پیوسته با مقاومت به بیماری قارچی لوبیا نیز برای ارزیابی تکمیلی استفاده شد. تغییرات بیان سه ژن دفاعی کیتیناز (Chiti)، چالکون ایزومراز (ChI) و فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) با کمک RT-PCR در لاین‌های منتخب از هر یک از گروه‌های مقاوم، متحمل و حساس، با فواصل ۲، ۴ و ۶ روز پس از آلوده‌سازی مصنوعی با قارچ *S. rolfisii* مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی‌های آماری و غربالگری ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های گلخانه و نشانگرهای SCAR، منجر به تفکیک ژنوتیپ‌ها و شناسایی ۱ مقاوم، ۲۱ متحمل و نیمه حساس و ۸ ژنوتیپ کاملاً حساس شد. نتایج نشان داد، ژن Chiti با افزایش تدریجی بیان در طی زمان در لاین‌های مقاوم و متحمل، روند مشابهی داشت، هرچند که میزان بیان در مقاوم‌ها بیش از متحمل‌ها بود. اگرچه بیان ژن‌های ChI و PAL نیز در ژنوتیپ‌های مقاوم روند افزایشی داشت، ولی تغییرات بیان با گذشت زمان مانند روند ژن Chiti نبود. لذا ژن Chiti می‌تواند عامل اصلی مقاومت به قارچ *S. rolfisii* در لوبیا محلی گیلان باشد.

واژه‌های کلیدی

لوبیای گیلان

اسکلروتیوم رولفسی

کیتیناز

چالکون ایزومراز

فنیل آلانین آمونیا لیاز

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) منبع اصلی پروتئین، کربوهیدرات و آهن است و به‌همین دلیل یکی از مهم‌ترین حبوبات برای مصرف انسان در سراسر جهان است. هم‌چنین لوبیا به‌عنوان یک تثبیت‌کننده نیتروژن به کمک باکتری‌های سازگار با نیتروژن، نقش مهمی در کشاورزی پایدار دارد (Gepts et al. 2008, Schmutz et al. 2014). بخش اعظم سطح زیر کشت لوبیا در استان گیلان، عمدتاً به کشت بهاره (حدود ۱۱ هزار هکتار) و تابستانه (حدود ۷ هزار هکتار) نوعی لوبیای محلی، معروف به "لوبیا پاکوتاه" با نام محلی "پاج باقلا" اختصاص دارد که اهمیت اقتصادی کشت آن به هزینه‌های اندک تولید، میزان تولید و عملکرد قابل قبول و قیمت مناسب فروش است (Ghanbari et al. 2011). دو ژرم پلاسما محلی (landrace) غالب از این لوبیا با رگه‌های قرمز و سرمه‌ای (مشکی) وجود دارد که اکوتیپ‌های زراعی آنها از غرب تا شرق گیلان پراکنده‌اند.

تعدد عوامل بیماری‌زای لوبیا، یکی از علل اصلی کاهش عملکرد در بسیاری از مناطق کشت حبوبات است (Pastor-Corrales and Schwartz 1994). قارچ بیماری‌زای خاک‌زی *Sclerotium Sac. rolfsii* با پراکنش گسترده در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان، عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه در دامنه وسیعی از محصولات کشاورزی می‌شود (Eslami et al. 2013). پوسیدگی طوقه (Collar Rot) یا سوختگی جنوبی (Southern Blight) یک بیماری جدی در لوبیا است که دما و رطوبت بالا در مناطق آلوده به نفع توسعه بیماری است. در این وضعیت، خسارت یک مزرعه لوبیا به‌طور متوسط ۳۰ درصد یا حتی بیشتر خواهد بود و حتی در دوره‌های بارانی که اقدامات پیشگیرانه انجام نمی‌شود، مزارع لوبیا تا ۱۰۰ درصد زیان می‌بینند (Kator et al., Oliveira et al. 2005). استفاده از ارقام مقاوم، مؤثرترین روش برای کنترل و محدود کردن تلفات بیماری پوسیدگی طوقه و کاهش خسارات ناشی از همه‌گیری است (Castaño et al. 2005). متأسفانه، واریته‌های تجاری لوبیا که در بسیاری از مناطق تولید کشت می‌شوند، سطح بالایی از تحمل در برابر عوامل غالب بیماری‌زا ریشه نشان نداده‌اند (Abawi et al. 2011). با توجه به محدودیت‌های ارزیابی مقاومت به بیماری و غربالگری فنوتیپی در گلخانه،

استفاده از نشانگرهای اختصاصی DNA، ابزار مفیدی برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم هستند که سبب کاهش زمان ارزیابی و افزایش دقت انتخاب می‌شوند. در لوبیا، چندین SCARs مرتبط با ژن‌های مقاومت در برابر بیماری آنتراکنوز (Vallejo and Kelly, 2008)، بیماری ویروسی موزاییک (Naderpour et al. 2010)، بیماری قارچی کپک سفید (Soule et al. 2011) و زنگ لوبیا (Melmaiee et al. 2013) با موفقیت شناسایی و معرفی شده‌اند. از سوی دیگر، بسیاری از مطالعات مربوط به مکانیسم‌های دفاعی و تنش‌ها، بر سنجش میزان بیان ژن‌ها استوار است. مطالعات مربوط به ترانسکریپتوم به ارائه درک بهتری از پاسخ به تنش در گیاهان کمک نموده است. (Collinge and Slusarenko 1987) گیاهان کم‌کم نموده است. نمودند که فعالیت هماهنگ آنزیم‌های فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز (*PAL*) و چالکون سینتاز (*ChS*) در لوبیا، سبب القای مقاومت در برابر حمله قارچ‌های گیاهی می‌شود. *PAL* یک آنزیم کلیدی در واکنش گیاهان به زخمی شدن است که سنتز آن توسط محرک‌های هماهنگ با *ChS* القا می‌شود، در حالی که فعالیت آنزیم چالکون ایزومراز (*Chi*)، به شرط فعالیت حداکثری *PAL* و *ChS*، ممکن است به اوج خود برسد. البته بسته به تفاوت ارقام لوبیا، ممکن است تفاوت‌هایی نیز در فعالیت آنزیم‌های مذکور وجود داشته باشد. به نظر می‌رسد که *Chi* توسط یک ژن ساختاری رمزگذاری می‌شود، در حالی که *PAL* (حداقل ۳ ژن) و *ChS* (حداقل ۶ ژن)، اعضای خانواده‌های چند ژنی هستند و به نظر می‌رسد مقاومت القایی ناشی از عملکرد این آنزیم‌ها در برابر حمله قارچ‌های گیاهی متفاوت است. مطالعات Dixon et al. (2002) نشان داده است که فرآورده‌های مسیر فنیل پروپانویید ممکن است به‌عنوان مولکول‌های سیگنالینگ، نقش مهمی را در رشد و سیستم‌های دفاعی گیاهان ایفا کنند. هم‌چنین این نقش‌ها می‌توانند همپوشانی داشته باشند، به گونه‌ای که ممکن است بر فرآیندهای اصلاح ژنتیکی برای بهبود مقاومت در برابر بیماری گیاهی تأثیر بگذارند. بسیاری از فنیل پروپانوییدها طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی دارند و بنابراین اعتقاد بر این است که به گیاه در مبارزه با بیماری میکروبی کمک می‌کنند. چالکون ایزومراز و فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز، دو آنزیم مؤثر در بیوسنتز فنیل پروپانوییدها هستند. طبق یافته‌های Whitehead et al. (1982) فیتوالکسین‌ها نیز

مرحله ظهور کامل سه برگچه اول استفاده شد. ارزیابی بیماری به روش معرفی شده CIAT انجام شد (Castellanos et al. 2015). ژنوتیپ‌های حساس، متحمل و مقاوم نسبت به قارچ مذکور بر اساس روش درجه‌بندی شدت بیماری و ارزیابی کمی صفات مورفولوژیک شامل: نسبت تعداد گیاهان سالم باقیمانده به کل گیاهان کشت شده در گلدان، کل خسارت وارده به گیاهان هر گلدان بر مبنای روش (Fery and Dukes 2011)، طول زخم در ناحیه طوقه، ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک اندام هوایی، تفکیک شدند. به این ترتیب که ۱۴ روز پس از آلوده‌سازی طوقه گیاهچه-ها با قارچ خاکزاد *S. rolfisii* و توسعه بیماری در ساقه، طی ۳ مرحله با فاصله یک هفته با اندازه‌گیری طول زخم، شمارش تعداد گیاهان بیمار و تعیین نسبت گیاهان سالم به کل و نیز محاسبه مجموع درصد خسارت وارده به هر گلدان به روش (Fery and Dukes 2011) انجام شد و ۲۸ روز پس از آلوده‌سازی (مرحله سوم)، ارتفاع گیاه، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی گیاه، اندازه‌گیری شدند (Eslami 2013). مقیاس‌بندی شدت بیماری و تعیین درصد خسارت با ثبت علائم بیماری روی گیاه با مقیاس ۱ تا ۵، به روش (Fery and Dukes 2011) انجام شد. همچنین شاخص شدت بیماری (DSI) برای هر ژنوتیپ از طریق فرمول $DSI = \frac{N}{NW/T}$ محاسبه شد (Erikilic et al. 2006) که اجزای آن عبارتند از: N = تعداد گیاه دارای شاخص W ، W = درجه شدت بیماری گیاه (۱ تا ۵ از ساقه سالم بدون علائم زخم تا پژمردگی کامل و مرگ گیاه)، T = تعداد کل گیاهان هر ژنوتیپ. پس از تعیین مقدار شاخص شدت بیماری برای هر ژنوتیپ، مقاومت ژنوتیپ‌های انتخابی لوبیا بر اساس مقادیر شاخص شدت بیماری به (Farooq et al. 2011) عبارتند از گیاه مقاوم ۰-۲، گیاه متحمل (مقاومت متوسط) ۲-۳، گیاه حساس ۳-۵ و گیاه فوق حساس ۵ می‌باشد، تعیین شد.

برای مطالعات تکمیلی، از ارزیابی مولکولی مقاومت در برابر بیماری پوسیدگی طوقه و غربالگری ۳۰ لاین انتخابی لوبیا پاکوتاه محلی گیلان به کمک ۸ نشانگر اختصاصی SCAR شامل *Phs*، *SAU5*، *SS18*، *SF13R10*، *SMe1Em5*، *SF12R9*، *SF6Em3* و *SF18R7* که پیوستگی آن‌ها با بیماری کپک قارچی لوبیا گزارش شده بود، استفاده شد (Gholami et al. 2020).

ایزوفلاوونوئیدها تولیدی از مسیر فنیل پروپانوییدی در لوبیا هستند که مانع گسترش میسلیوم‌های قارچ در گیاه می‌شوند. علاوه بر این، طبق تحقیقات (Fontenelle et al. 2016)، شواهد زیادی از نقش کیتینازها در دفاع گیاهان برابر امراض قارچی وجود دارد که بر پایه افزایش چشمگیر و سریع سطح فعالیت آنزیم در واکنش‌های فوق‌حساسیت در طول مقاومت القایی گیاه میزبان است. کیتینازها دارای فعالیت ضد قارچی هستند و اجزای دیواره سلولی قارچ‌ها را تخریب می‌کنند.

در مطالعه حاضر، تغییرات الگوی بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیلایز (*PAL*)، چالکون ایزومراز (*CHI*) و کیتیناز (*Chiti*) و در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با قارچ بیماری پوسیدگی طوقه در شش ژنوتیپ (شامل دو ژنوتیپ از سه گروه حساس، متحمل و مقاوم به بیماری در لوبیا به روش Real-Time PCR بررسی شد تا واکنش گیاه به آلودگی قارچی در سطح نسخه برداری، مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این تحقیق عبارتند از ۳۰ ژنوتیپ برتر لوبیا پاکوتاه محلی گیلان که قبلاً غربال و انتخاب شده‌اند (Gholami et al. 2020). آزمایش گلخانه‌ای با ۳۰ لاین انتخابی در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و یک شاهد به ازای هر لاین انجام شد. بذور هر لاین پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد، در گلدان‌های حاوی خاک ضدعفونی شده با گاز متیل بروماید کشت شدند (Oever et al. 1982) و در گلخانه تحقیقاتی با تنظیم دمای شبانه روزی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی روی ۷۰ درصد، استقرار یافتند (Sennoi et al. 2012).

آلوده‌سازی مصنوعی و یکنواخت لاین‌های انتخابی با بیماری‌زاترین جدایه قارچ خاکزاد *Sclerotium rolfisii* که قبلاً از بین ۲۲ جدایه قارچ به روش (Erikilic et al. 2006) شناسایی و معرفی شده بود (Eslami 2013)، انجام شد. پس از کشت قارچ *S. rolfisii* روی محیط PDA و خالص‌سازی آن با ساب‌کالچر، از قارچ تکثیر شده بر روی بستر ارزن برای آلوده‌سازی مصنوعی در

ژنوم لوبیا مورد بررسی قرار گرفت. سنتز آغازگرها توسط شرکت سیناژن-ایران انجام شد. بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از واکنش کمی PCR انجام شد. در واکنش PCR از یک مخلوط پایه (Master Mix) شامل کلرید منیزیم، dNTP و آنزیم Tag استفاده شد. واکنش Real-Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر (۱ میکرولیتر پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۴ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر cDNA و ۱۳ میکرولیتر آب DEPC)، ۱۰ میکرولیتر مخلوط Sybr Green-دو برابر، ۳۰۰ نانومول آغازگر و ۱ میکرولیتر محصول RT (Reverse Transcription) رقیق شده انجام شد. پس از تهیه حجم، واکنش RT-PCR طبق برنامه دمایی و با توجه به تعیین مناسب‌ترین دمای بازچسبی انجام شد. تعداد چرخه حرارتی و مدت زمان هر چرخه حرارتی عبارت بود از: (۱) آغاز واسرشته‌سازی با ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۴ دقیقه، (۲) واسرشته‌سازی با ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، (۳) اتصال با ۵۹ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه و طولی شدن با ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۴۵ ثانیه انجام شد. در ارزیابی بیان ژن‌ها فوق به کمک واکنش RT-PCR کمی، از دستگاه Bio-Rad iQ5 استفاده شد. سه تکرار زیستی برای هر ژن از هر گیاه (گلدان) انجام شد. این آزمایش در سه تکرار زیستی و دو تکرار آزمایشگاهی انجام گرفت. برای تصحیح و تعیین میزان نسبی بیان ژن‌های هدف، از ژن اکتین (Actin) به‌عنوان ژن خانه‌دار (House-keeping) استفاده شد.

بلافاصله قبل از آلوده‌سازی مصنوعی گیاهچه‌های ۶ لاین لوبیا محلی گیلان (۲ ژنوتیپ منتخب از هر گروه حساس، متحمل و مقاوم) با مقدار مشخص از قارچ *S. rolfisii*، ۲، ۴ و ۶ روز پس از آلودگی؛ RNA کل از نزدیک‌ترین محل به موضع درگیر با بیماری در گیاهان آلوده از هر ژنوتیپ و نیز محل مشابه در گیاهان شاهد (بدون آلودگی) با استفاده از Trizol استخراج شد. کمیت‌سنجی RNA و تعیین غلظت آن با دستگاه نانودراپ و کیفیت‌سنجی RNA با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد. پس از رقیق‌سازی و یکسان کردن غلظت کلیه نمونه‌های RNA، ساخت cDNA تک رشته‌ای طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز انجام شد. در این تحقیق از سه آغازگر مرتبط با واکنش دفاعی گیاه لوبیا در مقابل قارچ عامل بیماری (*S. rolfisii*) استفاده شد. ژن‌هایی که میزان بیان آن‌ها در ژنوتیپ‌های مورد نظر مورد مقایسه قرار گرفتند، شامل ژنهای کدکننده پروتئین‌های دفاعی مرتبط با مقاومت به بیماری عبارتند از کیتیناز (*Chiti*)، چالکون ایزومراز (*Chl*) و فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز (*PAL-3*) بودند. آغازگرهای الیگونوکلوئیدی برای انجام واکنش Real-Time PCR بر اساس توالی‌های موجود ژن‌های لوبیا از مقالات استخراج و در سایت NCBI شناسایی و انتخاب شدند (جدول ۱). صحت عملکرد آغازگرهای انتخابی از لحاظ عدم اتصال غیر اختصاصی، با استفاده از Primer Blast در سایت NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) بر روی

جدول ۱- کد شناسایی و توالی آغازگرهای ژن‌های درگیر در دفاع در برابر بیماری قارچی پوسیدگی طوقه

نام ژن	توالی‌های رفت (F) و برگشت (R)	کد بانک ژن
<i>Chitinase</i>	(F) 5'-ATTGTTGTGCCAATCCCTTT-3' ® 5'-CACCGCCATACAGTTCAAAA-3'	X57187.1
<i>Chl</i>	(F) 5'-TCATTTTCAGGACCCCTTTGAA-3' ® 5'-CAACTTATAGTGAGAAGAAAGAGAGAAA-3'	X16470.1
<i>PAL-3</i>	(F) 5'-GACACACAAGTTGAAGCACCA-3' ® 5'-TGCAGCTTCTTAGCATCCTTC-3'	M11939.1
<i>Actin</i>	(F) 5'-TGCATACGTTGGTGATGAGG-3' ® 5'-AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG-3'	P53496.1

منبع: Oliveira et al. 2015

مرحله بود. مقایسه میانگین‌های ۲۱ روز پس از آلوده‌سازی نیز نشان داد که لاین ۸ با کمترین طول زخم (۶/۳۱۳ میلی‌متر)، از ژنوتیپ‌های مقاوم و لاین ۲ با بیشترین طول زخم (۵۳/۹۹۰ میلی‌متر) در مرحله دوم، از جمله لاین‌های حساس به بیماری بودند. از نظر نسبت گیاهان سالم به کل نیز مقایسه میانگین‌های ۱۴ روز پس از آلوده‌سازی نشان داد لاین ۲ (۰/۵۳)، از حساس-ترین لاین‌ها بود. مقایسه میانگین‌ها در ۲۱ روز پس از آلوده‌سازی نیز نشان داد که لاین ۲ با کمترین نسبت گیاهان سالم به کل (۰/۲۶۷) همچنان به عنوان حساس‌ترین لاین ارزیابی می‌شود. مقایسه میانگین‌های درصد خسارت گلدان ۱۴ روز پس از آلوده-سازی نشانگر آن بود که لاین ۲ با بیشترین درصد خسارت گلدان (۲۰۰) حساس‌ترین ژنوتیپ بود. البته هشت ژنوتیپ (از جمله لاین شماره ۸) با خسارت ۲۵ درصد، در گروه لاین‌های مقاوم یا متحمل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها در ۲۱ روز پس از آلوده‌سازی هم نشان داد که لاین ۸ با ۲۵ درصد خسارت جزو ژنوتیپ‌های مقاوم محسوب می‌شود. بیشترین میانگین کل درصد خسارات وارده به گیاهچه‌های هر گلدان، به ترتیب برای لاین‌های حساس ۱۱ (۲۲۵/۰۰ درصد)، ۲ (۲۰۰/۳۳ درصد) و ۲۳ (۲۰۰/۰۰ درصد) به دست آمد. لاین‌های متحمل به بیماری از نظر این خصوصیت عبارت بودند از لاین‌های ۱۵ و ۲۱ که میانگین کل درصد خسارت هر گلدان در آنها، ۵۸/۳۳ درصد برآورد شد. مقایسه میانگین‌های تفاوت ارتفاع گیاهان آلوده نسبت به شاهد، ۲۸ روز پس از آلوده‌سازی نشان داد که لاین ۲ (۲۹/۰۰ سانتی‌متر) از جمله لاین‌های حساس ارزیابی می‌شود. از نظر تفاوت وزن خشک اندام هوایی گیاهان آلوده از شاهد، مقایسه میانگین‌ها نشان داد که لاین ۸ با کمترین مقدار تفاوت ماده خشک اندام هوایی (۰/۱۴۳ گرم) و به دنبال آن لاین ۲۶ جزو ژنوتیپ‌های مقاوم و لاین‌های ۲۴ (۰/۹۲۹ گرم) و ۲ (۰/۸۶۵ گرم) از جمله لاین‌های حساس در این ارزیابی محسوب می‌شوند (نتایج ارائه نشده است). به‌منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌های تحت بررسی از نظر واکنش به آلوده‌سازی مصنوعی، ابتدا به کمک تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، ۱۰ خصوصیت مورد بررسی در گلخانه به دو مولفه که ۹۷/۴۴ درصد از تغییرات را توجیه نمودند، خلاصه شدند. نتایج

برای تجزیه واریانس داده‌های کمی گلخانه به کمک نرم‌افزار آماری SAS 9.4 و برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (Principal Components)، تعیین رابطه نشانگرهای مولکولی و صفات کمی گلخانه به روش رگرسیون گام به گام، و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، از نرم‌افزار SPSS Ver:17 استفاده شد. برای بررسی بیان هر یک از ژن‌های مورد مطالعه، از سری‌های غلظت به‌منظور کنترل راندمان واکنش زنجیره‌های پلیمرز استفاده شد و تجزیه داده‌های بیان ژن و محاسبه نرخ بیان هر ژن (Ratio) به کمک نرم‌افزار REST انجام شد. پس از محاسبه نرخ بیان ژن‌های مورد مطالعه برای هر نمونه به کمک فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، انحراف معیار داده‌ها محاسبه گردید و در نهایت از نتایج به دست آمده برای مقایسه بین روزهای پس از آلودگی (۲، ۴ و ۶ روز) به کمک آزمون t در گیاه تیمار شده با گیاه شاهد استفاده شد. برای محاسبه STDEV و t-Test از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ - (تیمار) - (شاهد)

ΔCt (ژن خانه‌دار / شاهد) - Ct (ژن هدف / شاهد) = ΔCt (شاهد)

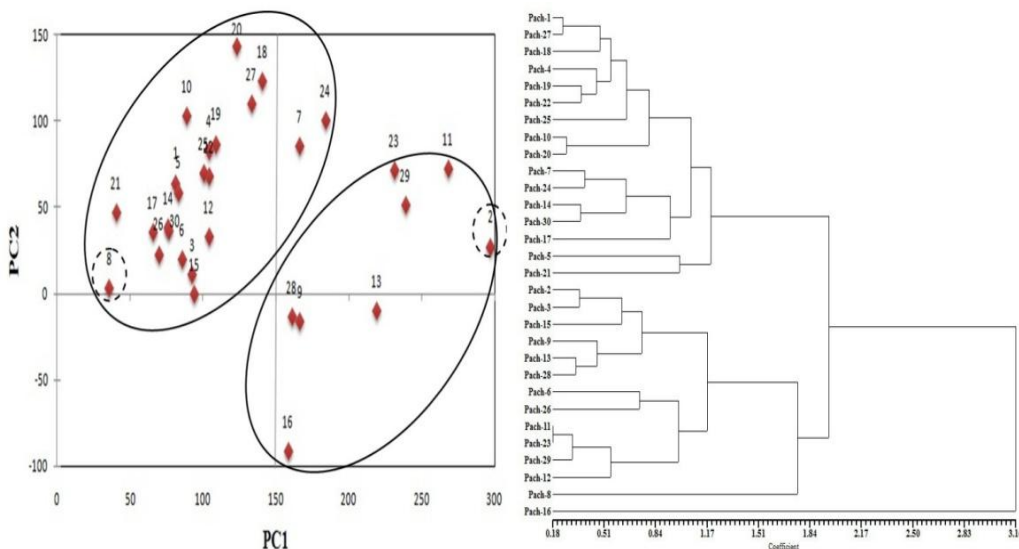
ΔCt (ژن خانه‌دار / تیمار) - Ct (ژن هدف / تیمار) = ΔCt (تیمار)

نتایج و بحث

واکنش فنوتیپی مواد گیاهی به آلوده‌سازی مصنوعی و تحلیل پیوستگی نشانگرهای SCAR با مقاومت به بیماری: تجزیه واریانس داده‌های موفولوژیک نشان داد بین لاین‌های انتخابی از نظر طول زخم و نیز مجموع درصد آلودگی هر گلدان، در دو یادداشت‌برداری اول و دوم، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. نسبت گیاهان سالم به کل گیاهان هر گلدان فقط در یادداشت‌برداری اول، با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. با توجه به صفات اندازه‌گیری شده در مرحله سوم یادداشت‌برداری (شامل ارتفاع گیاه و وزن تر و خشک اندام هوایی)، نتایج نشان داد که بین لاین‌های انتخابی لوبیا از نظر هر سه صفت، اختلاف معنی‌داری (با احتمال یک درصد) وجود داشتند (نتایج ارائه نشده است). مقایسه میانگین‌های طول زخم، ۱۴ روز پس از آلوده‌سازی به روش LSD (با احتمال پنج درصد) نشان داد، لاین ۲ با بیشترین طول زخم (۵۴/۱۷ میلی‌متر)، حساس‌ترین لاین در این

۴ و ۲۳ (۳/۶۶) بود که برحسب جدول تعیین سطوح مقاومت به روش Farooq et al. (2011) به ترتیب به عنوان گیاه مقاوم و گیاهان حساس شناخته شدند. بر اساس این شاخص، ژنوتیپ‌های ۱، ۶، ۱۰، ۱۲، ۱۷، ۲۶ و ۳۰ از جمله گیاهان متحمل با شاخص شدت بیماری بیشتر از ۲ و کمتر از ۲/۲۶ هستند که می‌توان آن‌ها را در یک تقسیم‌بندی جدید "نیمه مقاوم" و سایر ژنوتیپ‌های گروه متحمل مانند ۷، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۱۹ و ۲۷ با شاخص بیماری بیشتر از ۲/۷ و کمتر از ۳ را "نیمه حساس" نامید. در مجموع، بر اساس نتایج مقایسه‌ای رتبه‌بندی میانگین‌های سه مرحله یادداشت‌برداری صفات مورفو-فیزیولوژیک و درخت‌واره حاصل از تجزیه خوشه‌ای خصوصیات مذکور، و با لحاظ نمودن نتایج حاصل از مقایسات آماری شاخص DSI، لاین‌های شماره ۲ و ۴ از گروه حساس‌ها به عنوان شاخص‌های حساسیت و لاین‌های شماره ۸ و ۲۶ به عنوان شاخص مقاومت شناسایی شدند. ۱۹ لاین با مقادیر متفاوت خسارت و شاخص DSI در گروه گیاهان متحمل‌ها قرار گرفتند که البته ژنوتیپ‌های ۷ و ۱۵ به عنوان لاین‌های شاخص تحمل شناسایی شدند.

نشان داد برش درخت‌واره حاصل از ناحیه بیشترین فاصله دو گروه متوالی، ژنوتیپ‌ها را در دو گروه حساس و متحمل-مقاوم تقسیم‌بندی می‌نماید. به نحوی که در نمودار پراکنش بای پلات دو مولفه اول نیز حضور لاین‌های ناحیه سه و چهار (بجز ژنوتیپ‌های ۷ و ۲۴) موید این موضوع است. بیشترین فاصله مربوط به دو ژنوتیپ ۸ (مقاوم) و ۲ (حساس) است (شکل ۱). نتایج تحقیق Miklas et al. (2001) نشان داد که مقاومت فیزیولوژیکی در آزمایش‌های آلوده‌سازی مصنوعی در گلخانه، جزء جدایی ناپذیری از مقاومت مزرعه‌ای است و هر دو مکانیسم فیزیولوژیکی و اجتناب از بیماری، در ایجاد مقاومت به بیماری قارچی لوبیا مشارکت دارند. محاسبه مقادیر شاخص شدت بیماری (DSI) نیز به روش Erikilic et al. (2006) برای سه تکرار تحت آلوده‌سازی مصنوعی بر حسب مجموع درصد‌های میزان خسارت در دو یادداشت‌برداری اول و دوم انجام شد. نتایج تجزیه واریانس حاکی از اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال پنج درصد (جدول ۶۶۶) حاکی از محاسبه کمترین مقدار DSI برای لاین ۸ (۱/۹۳) و بیشترین مقدار شاخص مذکور برای سه لاین ۲،



شکل ۱- درخت‌واره حاصل از تجزیه خوشه‌ای دو مؤلفه اصلی داده‌های مورفولوژیک و نمودار بای پلات دو مولفه مذکور

نتایج ارزیابی مولکولی مقاومت ژنوتیپ‌های برتر لوبیا محلی گیلان نسبت به بیماری قارچی پوسیدگی طوقه (*S. rolfsii*)، به‌کمک ۸ آغازگر نشانگرهای اختصاصی SCAR پیوسته با مقاومت به بیماری نیز نشان داد که اگرچه تمام نشانگرهای SCAR قادر به شناسایی ژنوتیپ مقاوم (Pach-08) بودند، اما کارایی نشانگرهای اختصاصی *Phs* و *SAU5* بیشتر از بقیه نشانگرها بود و فقط نشانگر *Sme1Em5* توانست ژنوتیپ‌های حساس و متحمل را از هم جدا کند. از آنجا که بین صفت "حسارت کل گلدان در روز ۲۱م" و سه نشانگر SCAR شامل *Phs*، *SAU5*، *SF6EM3* رابطه رگرسیونی معنی‌داری وجود داشت، پیش‌بینی می‌شود که انتخاب غیرمستقیم برای مقاومت در برابر بیماری پوسیدگی طوقه در لوبیای پاکوتاه گیلان می‌تواند از طریق سه نشانگر مذکور به‌دست آید (Gholami et al. 2020).

با توجه به نتایج به‌دست آمده از آلوده‌سازی مصنوعی ژنوتیپ‌ها در گلخانه و محاسبه شاخص شدت بیماری (DSI) و نیز اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک مرتبط با واکنش گیاهان در برابر عامل بیماری‌زای قارچی (مانند طول زخم و غیره)، و نیز حسب تطابق نسبی (بیش از ۵۰ درصد) گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از درخت‌واره‌های حاصل از تجزیه‌های خوشه‌ای داده‌ها؛ ژنوتیپ‌ها به سه گروه اصلی مقاوم، متحمل و حساس تقسیم‌بندی شدند و سپس از درون هر گروه، ۲ فرد به‌عنوان شاخص انتخاب شدند. ژنوتیپ‌های ۸ و ۲۶ به‌عنوان شاخص مقاومت، ژنوتیپ‌های ۷ و ۱۵ به‌عنوان شاخص تحمل و ژنوتیپ‌های ۲ و ۴ به‌عنوان افراد شاخص در گروه حساس‌ها برای بررسی میزان بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دفاعی مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی‌های نشان داده است که کیتینازها مهارکننده‌های قوی برای رشد قارچ‌ها در گیاهان هستند، اما کلاس‌های مختلفی دارند. با توجه به مقایسه هلال مهار رشد میسلیوم، فعالیت مهارکنندگی کیتیناز لوبیا مانگ (*mung bean*) بر رشد قارچ، بسیار قوی‌تر از لوبیا معمولی، ولی مشابه با پروتئین شبه‌تاماتین در لوبیا فرانسوی، و ضعیف‌تر از پروتئین شبه کیتیناز در لوبیای رایس (*rice bean*) بود. فعالیت ضد قارچی کیتیناز جدا شده از دانه‌های لوبیا مانگ بر روی چندین گونه قارچ از جمله *F.oxysporum*، *F.solani* و *P. aphanidermatum* و *S. rolfsii* نشان داده است که اثر ضد قارچی کیتیناز لوبیا به‌واسطه تخریب کیتین موجود در دیواره سلولی قارچ‌ها صورت گرفته است (Yang and Luo 1998; Wanga et al. 2005). بررسی‌های میکروسکوپ نوری، تورم ناشی از تاثیر کیتیناز در نوک هیف‌های قارچ و اعوجاج هیف‌ها را نشان می‌دهد. اختلالات ناشی از انتشار الیگوساکاریدهای کیتین از دیواره‌های سلولی و نشت سیتوپلاسمی آن‌ها در مطالعات فراساختاری و سیتوشیمیایی نیز مشاهده شده است (Wang et al. 2005). به‌نظر می‌رسد مکانیسم‌های مختلفی برای کنترل القای کیتیناز در گونه‌های مختلف گیاهی وجود دارد. در لوبیا، کیتیناز توسط یک خانواده چند ژنی رمزگذاری می‌شود و حداقل دو مورد از این ژن‌ها در پاسخ به اتیلن بیان می‌شوند. از این رو، اتیلن ممکن است به‌عنوان پیام‌رسان دوم برای کیتیناز عمل کند. کیتینازهای گیاهی مهارکننده‌های قدرتمند در برابر رشد قارچ‌ها هستند و عامل اصلی واکنش‌های دفاعی گیاه در برابر قارچ‌های مهاجم هستند (Boller et al. 1983). در تحقیق حاضر، بررسی بیان ژن کیتیناز در ژنوتیپ‌های حساس نشان داد که بیان این ژن در روزهای دوم و چهارم پس از آلوده‌سازی با قارچ *S. rolfsii* در لاین‌های ۲ (شاخص حساسیت) و ۴ با کاهش بیان همراه بود. اگر چه در روز ششم پس از آلوده‌سازی، لاین ۴ همچنان روند کاهش بیان را نشان داد، ولی در لاین شماره ۲ افزایش بیان قابل توجهی رخ داد که البته با توجه به اثرات شدید قارچ بیماری‌زا طی ۴ روز اول پس از آلودگی، امکان بازیابی و رشد مجدد برای ژنوتیپ حساس PACH-02 فراهم نشد و این لاین از آزمایش خارج شد. بررسی بیان ژن در ژنوتیپ‌های متحمل، نشان داد که روند افزایش بیان در هر دو ژنوتیپ ۷ و ۱۵، از روز دوم به روز چهارم و از روز چهارم به روز ششم پس از آلوده‌سازی مصنوعی به‌صورت پلکانی بود. در واقع با پیشرفت زمان، میزان بیان ژن کیتیناز در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت و به‌نظر می‌رسد گیاهان متحمل، سعی داشتند که با افزایش تعداد نسخه‌های آنزیم کیتیناز به مقابله با قارچ بپردازند. بیان ژن کیتیناز در ژنوتیپ‌های انتخابی شاخص مقاومت نیز نشان داد که مشابه گروه متحمل‌ها، روند افزایش بیان

نتایج ارزیابی مولکولی مقاومت ژنوتیپ‌های برتر لوبیا محلی گیلان نسبت به بیماری قارچی پوسیدگی طوقه (*S. rolfsii*)، به‌کمک ۸ آغازگر نشانگرهای اختصاصی SCAR پیوسته با مقاومت به بیماری نیز نشان داد که اگرچه تمام نشانگرهای SCAR قادر به شناسایی ژنوتیپ مقاوم (Pach-08) بودند، اما کارایی نشانگرهای اختصاصی *Phs* و *SAU5* بیشتر از بقیه نشانگرها بود و فقط نشانگر *Sme1Em5* توانست ژنوتیپ‌های حساس و متحمل را از هم جدا کند. از آنجا که بین صفت "حسارت کل گلدان در روز ۲۱م" و سه نشانگر SCAR شامل *Phs*، *SAU5*، *SF6EM3* رابطه رگرسیونی معنی‌داری وجود داشت، پیش‌بینی می‌شود که انتخاب غیرمستقیم برای مقاومت در برابر بیماری پوسیدگی طوقه در لوبیای پاکوتاه گیلان می‌تواند از طریق سه نشانگر مذکور به‌دست آید (Gholami et al. 2020).

با توجه به نتایج به‌دست آمده از آلوده‌سازی مصنوعی ژنوتیپ‌ها در گلخانه و محاسبه شاخص شدت بیماری (DSI) و نیز اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک مرتبط با واکنش گیاهان در برابر عامل بیماری‌زای قارچی (مانند طول زخم و غیره)، و نیز حسب تطابق نسبی (بیش از ۵۰ درصد) گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از درخت‌واره‌های حاصل از تجزیه‌های خوشه‌ای داده‌ها؛ ژنوتیپ‌ها به سه گروه اصلی مقاوم، متحمل و حساس تقسیم‌بندی شدند و سپس از درون هر گروه، ۲ فرد به‌عنوان شاخص انتخاب شدند. ژنوتیپ‌های ۸ و ۲۶ به‌عنوان شاخص مقاومت، ژنوتیپ‌های ۷ و ۱۵ به‌عنوان شاخص تحمل و ژنوتیپ‌های ۲ و ۴ به‌عنوان افراد شاخص در گروه حساس‌ها برای بررسی میزان بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دفاعی مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی‌های نشان داده است که کیتینازها مهارکننده‌های قوی برای رشد قارچ‌ها در گیاهان هستند، اما کلاس‌های مختلفی دارند. با توجه به مقایسه هلال مهار رشد میسلیوم، فعالیت مهارکنندگی کیتیناز لوبیا مانگ (*mung bean*) بر رشد قارچ، بسیار قوی‌تر از لوبیا معمولی، ولی مشابه با پروتئین شبه‌تاماتین در لوبیا فرانسوی، و ضعیف‌تر از پروتئین شبه کیتیناز در لوبیای رایس (*rice bean*) بود. فعالیت ضد قارچی کیتیناز جدا شده از دانه‌های لوبیا مانگ بر روی چندین گونه قارچ از جمله *F.oxysporum*، *F.solani* و *P. aphanidermatum* و *S. rolfsii* نشان داده است که اثر ضد قارچی کیتیناز لوبیا به‌واسطه تخریب کیتین موجود در دیواره سلولی قارچ‌ها صورت گرفته است (Yang and Luo 1998; Wanga et al. 2005). بررسی‌های میکروسکوپ نوری، تورم ناشی از تاثیر کیتیناز در نوک هیف‌های قارچ و اعوجاج هیف‌ها را نشان می‌دهد. اختلالات ناشی از انتشار الیگوساکاریدهای کیتین از دیواره‌های سلولی و نشت سیتوپلاسمی آن‌ها در مطالعات فراساختاری و سیتوشیمیایی نیز مشاهده شده است (Wang et al. 2005). به‌نظر می‌رسد مکانیسم‌های مختلفی برای کنترل القای کیتیناز در گونه‌های مختلف گیاهی وجود دارد. در لوبیا، کیتیناز توسط یک خانواده چند ژنی رمزگذاری می‌شود و حداقل دو مورد از این ژن‌ها در پاسخ به اتیلن بیان می‌شوند. از این رو، اتیلن ممکن است به‌عنوان پیام‌رسان دوم برای کیتیناز عمل کند. کیتینازهای گیاهی مهارکننده‌های قدرتمند در برابر رشد قارچ‌ها هستند و عامل اصلی واکنش‌های دفاعی گیاه در برابر قارچ‌های مهاجم هستند (Boller et al. 1983). در تحقیق حاضر، بررسی بیان ژن کیتیناز در ژنوتیپ‌های حساس نشان داد که بیان این ژن در روزهای دوم و چهارم پس از آلوده‌سازی با قارچ *S. rolfsii* در لاین‌های ۲ (شاخص حساسیت) و ۴ با کاهش بیان همراه بود. اگر چه در روز ششم پس از آلوده‌سازی، لاین ۴ همچنان روند کاهش بیان را نشان داد، ولی در لاین شماره ۲ افزایش بیان قابل توجهی رخ داد که البته با توجه به اثرات شدید قارچ بیماری‌زا طی ۴ روز اول پس از آلودگی، امکان بازیابی و رشد مجدد برای ژنوتیپ حساس PACH-02 فراهم نشد و این لاین از آزمایش خارج شد. بررسی بیان ژن در ژنوتیپ‌های متحمل، نشان داد که روند افزایش بیان در هر دو ژنوتیپ ۷ و ۱۵، از روز دوم به روز چهارم و از روز چهارم به روز ششم پس از آلوده‌سازی مصنوعی به‌صورت پلکانی بود. در واقع با پیشرفت زمان، میزان بیان ژن کیتیناز در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت و به‌نظر می‌رسد گیاهان متحمل، سعی داشتند که با افزایش تعداد نسخه‌های آنزیم کیتیناز به مقابله با قارچ بپردازند. بیان ژن کیتیناز در ژنوتیپ‌های انتخابی شاخص مقاومت نیز نشان داد که مشابه گروه متحمل‌ها، روند افزایش بیان

می‌شود. بر اساس نتایج، چنین استنباط شده که گیاهان به محض تماس بیمارگر و دریافت سیگنال‌های مربوطه، به وسیله القای بالا و سریع ژن‌های دفاعی در مراحل اولیه رشد لوله تندشی و میخ‌رخنه، از نفوذ قارچ جلوگیری نموده و با القای مرگ سلولی در ۱۶ تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی (زمان اوج حمله قارچ)، از رشد و توسعه هاستوریوم جلوگیری می‌نمایند (Ahangar 2014). مطالعات Liang et al. (1989) نشان داد، در حالی که نسخه‌های ژن *PAL3* به‌جز ریشه در اندام دیگری از گیاه تظاهر نیافته‌اند، نسخه‌هایی از ژن‌های *PAL1* و *PAL*، علاوه بر ریشه، در برگ‌ها، گل‌ها و ساقه‌های نیز یافت می‌شوند. تحقیقات (et al. 1992) Cahill و McComb نشان داد که فعالیت *PAL* در ریشه *Eucalyptus calophylla* که گونه‌ای مقاوم به قارچ *phytophthora cinnamomi* است، پس از عفونت با پاتوژن مذکور به سرعت و در سطح بسیار بالایی افزایش یافته است. با این حال، در *Eucalyptus marginata* (گونه حساس به قارچ)، فعالیت *PAL* در ۲۴ ساعت اول بعد از تلقیح با قارچ، فقط کمی افزایش یافته است و پس از آن، یک کاهش سریع در فعالیت *PAL* مشاهده شد و در ۹۶ ساعت پس از تلقیح فعالیت *PAL* حتی تا ۷۷ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داده است. این محققان، دریافتند که کاهش سنتز فنل عامل کاهش فعالیت *PAL* و حساسیت به قارچ است. تیمار کردن گونه مقاوم به قارچ با آمینوآکسی استیک اسید (مهارکننده فعالیت *PAL*)، نشان داد که سرکوب سنتز فنل منجر به حساسیت می‌شود. (Oliveira et al. 2015) اگر چه افزایش بیان حداقل دو برابری ژن *PAL* در ۱۲ ساعت پس از آلودگی به قارچ *S. sclerotiorum* و نیز افزایش ۱۰ برابری آن در ۴۸ ساعت پس از آلودگی را گزارش نموده‌اند. ولی ۷۲ ساعت پس از آلودگی، بیان ژن *PAL-3* با روند کاهشی گزارش شده است. بررسی روند تغییرات بیان ژن *PAL-3* در ژنوتیپ‌های شاخص حساسیت در این تحقیق نشان داد که به‌جز افزایش بیان جزئی در روز دوم پس از آلوده‌سازی در *PACH-02*، در هر دو ژنوتیپ ۲ و ۴ و در زمان‌های نمونه‌برداری دیگر، کاهش بیان ژن رخ داده است. بررسی روند بیان ژن *PAL-3* در متحمل‌ها (ژنوتیپ‌های ۷ و ۱۵) از روز دوم به چهارم پس از آلوده‌سازی که در ژنوتیپ ۷ با کاهش شدید و در ژنوتیپ ۱۵ با کاهش نسبتاً ملایم همراه بود،

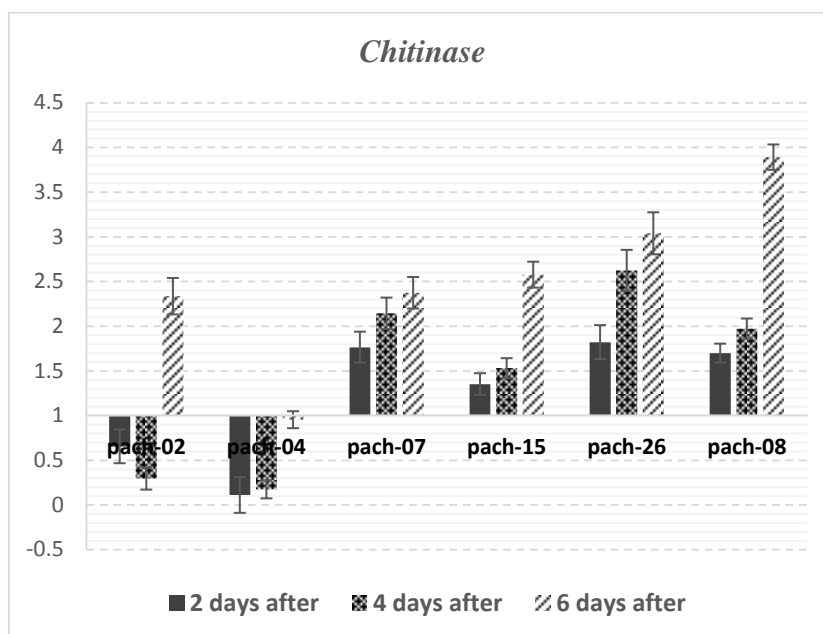
پلکانی سبب شده است که در روز ششم پس از آلوده‌سازی مصنوعی، بیشترین مقدار بیان ژن کیتیناز نسبت به ژن خانه‌دار حادث شود. نکته حائز اهمیت اینکه بیان ژن کیتیناز در ژنوتیپ مقاوم *PACH-08* در سومین مرحله به‌طور معنی‌داری بیشتر از بقیه ژنوتیپ‌ها بود و به‌نظر می‌رسد که افزایش نسخه‌های آنزیم کیتیناز و تخریب دیواره کیتینی قارچ *S.rolfsii* سبب بروز مقاومت در *PACH-08* شده است (نمودار ۱).

بیان ژن کدکننده فنیل آلانین آمونیا لیاز-۳ (*PAL-3*)

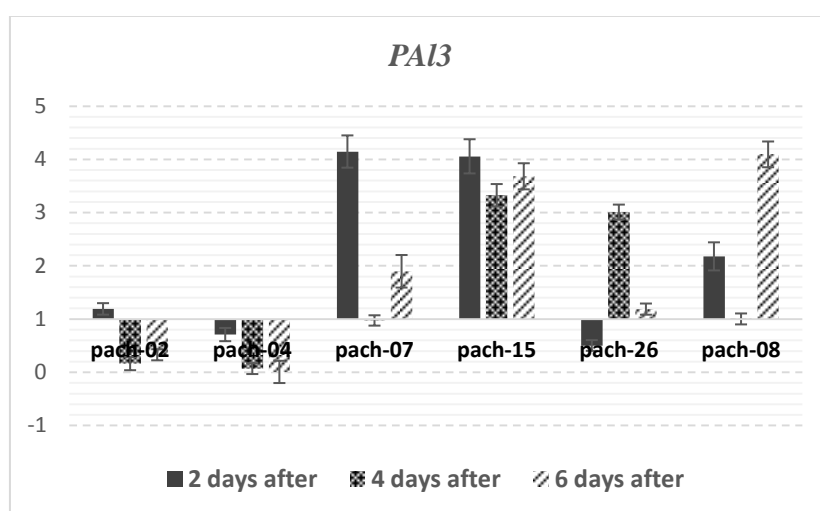
مطالعات نشان داده است که تاثیر الیستورهای دیواره سلولی قارچ‌ها در کشت‌های سوسپانسیون سلولی لوبیا منجر به فعال‌سازی دست کم ۵ آنزیم از مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویید منجمله فنیل آلانین آمونیا لیاز (*PAL*)، شده که با شروع انباشت فیتوالکسین همراه است (Bolwell et al. 1986). هم‌چنین آلودگی لوبیا با نژادهای مختلف قارچ عامل بیماری آنتراکنوز (*Colletotrichum lindemuthianum*) منجر به القای آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوییدی، از جمله ژن *PAL* و تجمع فیتوالکسین شده است (Bell et al. 1986). بررسی ژنتیکی پاسخ گیاه گندم به بیماری سفیدک پودری به کمک مطالعه بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و همچنین آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز نشان داد که قارچ میکوریزا با القای مقاومت از طریق افزایش بیان ژن‌های دفاعی، سبب القای مقاومت در گندم می‌شود. مطالعه بیان ژن‌های دفاعی در واکنش ارقام گندم فلات و تجن در برابر سفیدک سطحی نشان داد میزان بیان ژن‌های مورد نظر در ارقام مذکور، پس از آلودگی روندی افزایشی داشت. به‌طوری که در هر دو رقم حساس و مقاوم، بیشترین میزان بیان ژن‌ها ۲۴ ساعت پس از آلودگی بود و از این طریق از نفوذ و استقرار هاستوریوم قارچ در میزبان ممانعت نمود. هر چند که بیان چنین ژن‌هایی با افزایش زمان بعد از آلودگی کاهش یافته، ولی در برهمکنش عامل بیماری و گیاه نقش اساسی دارند. بررسی الگوی بیان پروتئین دفاعی *PR1* نشان داد که ۶ ساعت پس از آلودگی به قارچ، میزان بیان به ۲ برابر و ۱۲ ساعت پس از آلودگی، افزایش بیان تا ۲۱/۶ برابر نسبت به زمان صفر و ۲۴ ساعت پس از آلودگی به حداکثر میزان بیان خود در گندم می‌رسد. اما ۴۸ ساعت پس از آلوده‌سازی مصنوعی، میزان بیان ژن مذکور در هر دو گروه حساس و مقاوم دچار روند کاهشی

مقاوم‌ها، روند تغییرات بیان *PAL-3* از روز دوم به چهارم و از چهارم به ششم، در *PACH-26* با روند بیان این ژن در *PACH-08* متفاوت بود، به نحوی که بیشترین بیان ژن *PAL-3* در ژنوتیپ ۲۶، در روز چهارم و در ژنوتیپ مقاوم ۸، در روز ششم پس از آلوده‌سازی بود (نمودار ۲).

حاکای از آن است که گیاه پس از مواجهه با تنش قارچ ابتدا کلیه سیگنال‌ها را برای افزایش بیان به سمت چرخه پروپانوییدی هدایت نموده، اما در روز چهارم پس از آلوده‌سازی این سیگنال‌ها و تبعاً بیان ژن *PAL-3* دچار نقصان می‌شود. بررسی بیان ژن در روز ششم پس از آلوده‌سازی نیز نشان داد روند افزایش نسبی بیان در هر دو ژنوتیپ شاخص تحمل مشهود است. اما در گروه



نمودار ۱ - تغییرات میزان بیان ژن کیتیناز در ژنوتیپ‌های حساس، متحمل و مقاوم، ۲، ۴ و ۶ روز پس از آلوده‌سازی مصنوعی

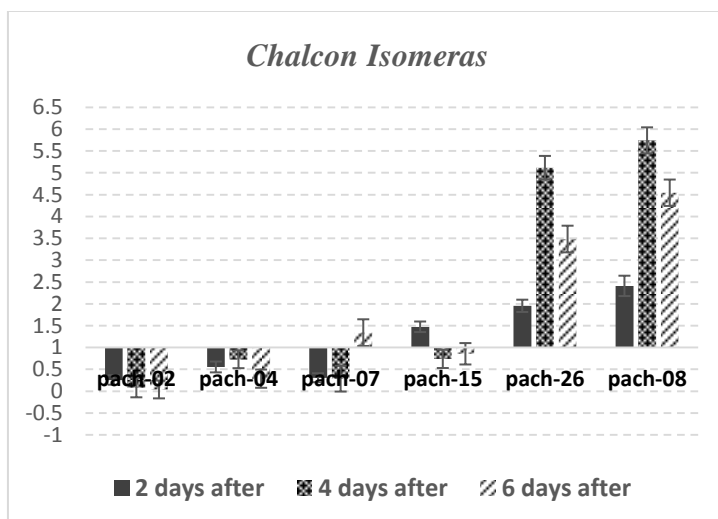


نمودار ۲ - میزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز-۳ در ژنوتیپ‌های حساس، متحمل و مقاوم، ۲، ۴ و ۶ روز پس از آلوده‌سازی

بیان ژن کدکننده چالکون ایزومراز (*Chi*)

چالکون ایزومراز یک آنزیم مونومر است که چرخه چالکون‌ها به فلاونون‌ها را در سیتوپلاسم کاتالیز می‌کند. فعالیت چالکون ایزومراز (*Chi*) از آن جهت بسیار مهم است که مسئولیت تولید فلاونون‌های فعال بیولوژیکی را بر عهده دارد (Jez et al. 2002). در اکثر گیاهان، *Chi* توسط یک ژن منفرد رمز می‌شود، ولی در *petunia* دو ژن آن را رمز می‌کند، هر چند که به نظر نمی‌رسد که محصول (*Chi*) در مسیر تولید فلاونوئیدها دخیل باشد. در گیاهان دولپه‌ای، ژن‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها به صورت متفاوتی تنظیم شده‌اند؛ دسته اول که برای *ChI*، *ChS*، و فلاونون-۳-هیدروکسیلاز (*F3H*) برنامه‌ریزی می‌کنند، زودتر بیان می‌شوند و آن‌هایی که برای *DFR*، آنتوسیانیدین سنتاز (*ANS*) و فلاونوئیدهای گلیکوزیل‌ت ترانسفراز (*FGT*) برنامه‌ریزی می‌کنند دیرتر بیان می‌شوند (Quattrocchio et al. 2006). به نظر می‌رسد همه این فرایندها تنظیم کننده‌ی تولید مجموعه‌ای از ترکیبات فنیل پروپانوئید است که نقش محافظتی را در شرایط تنش‌های مختلف بر عهده دارند (Chutipajit et al. 2009). گزارش شده است که چالکون ایزومراز (*Chi*) و ایزوفلاون سنتاز ۱، که هر دو مربوط به بیوسنتز ایزوفلاون‌ها هستند، ویژگی‌های ضد قارچی از خود نشان داده‌اند. مطالعات نشان داده است همان‌طور که فیتوالکسین‌ها

پس از بروز زخم‌های مکانیکی در بافت‌ها انباشته می‌شوند، *Chi* نیز به شدت در طول عفونت و در پاسخ به زخم تولید می‌شود (Bolwell et al. 1986). بررسی روند تغییرات بیان ژن چالکون ایزومراز در گروه حساس‌ها در هر سه زمان نمونه‌برداری، کاهش بیان را نشان داد. در گروه متحمل‌ها نیز در دو زمان از ۳ مرحله بررسی، کاهش بیان ژن چالکون ایزومراز کاملاً مشهود و در یک زمان باقی‌مانده نیز افزایش بیان به صورت بطئی به دست آمد. در مقابل، دو ژنوتیپ شاخص از گروه مقاوم‌ها (۸ و ۲۶) با ارایه روند تغییرات تقریباً مشابه، افزایش بیان کاملاً معنی‌داری را نسبت به ۴ ژنوتیپ دیگر نشان داد (نمودار ۳). در جمع‌بندی نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد که روند افزایش بیان تدریجی و مشابه ژن *chiti* با گذشت زمان در لاین‌های مقاوم و متحمل، می‌تواند عامل اصلی مقاومت به قارچ *S. rolfisii* در لوبیا محلی گیلان باشد. این فرضیه می‌تواند با افزایش بیان ژن *chiti* در مقاوم‌ها بیش از متحمل‌ها تقویت شود. بیان ژن‌های *Chi* و *PAL-3* نیز در لوبیاهای مقاوم روند افزایشی داشت، ولی نوسانات بیان با گذشت زمان، مشابه روند بیان ژن *chiti* نبود و افت و خیزهای متوالی بیان این دو ژن، حاکی از نقش پیچیده‌تر این ژن‌ها در مسیر فنیل پروپانوئید و تاثیرات غیر مستقیم آن‌ها بر مقاومت به قارچ *S. rolfisii* در لوبیا محلی گیلان باشد.



نمودار ۳ - تغییرات میزان بیان ژن چالکون ایزومراز در ژنوتیپ‌های حساس، متحمل و مقاوم، ۲، ۴ و ۶ روز پس از آلوده‌سازی

منابع

- Ahangar L, Babaezad V, Ranjbar GA, Najafi Zarriani H, Biabani A (2014) Expression profile of defense-related genes in susceptible and resistant wheat cultivars in response to powdery mildew infection. *Modern Genetics Journal* 10: 33-46. (In Farsi).
- Eslami A, Khodaparast S A, Padasht Dahkaii F, and Moosanezhad S (2013) Study on relationship between vegetative compatibility groups and pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* isolates, causal agent of bean southern blight disease in Guilan province (MS.c Thesis), Agriculture Faculty, Guilan University (In Farsi).
- Abawi G S, Porch T G, and Kelly J D (2011) Field and greenhouse evaluation of bean germplasm for root rot and other diseases in New York, Annual Report. *Bean Improvement Cooperative (BIC)* 54:142-143.
- Bell J N B, Ryder T B, Wingate V P M, Balley, J A, and Lamb C J (1986) Differential Accumulation of Plant Defense Gene Transcripts in a Compatible and an Incompatible Plant-Pathogen Interaction. *Molecular and Cellular Biology* 6: 1615-1623.
- Bolwell G P, Cramer C L, Lamb C J, Schuch W, and Dixon R A (1986) L-phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris* Modulation of the levels of active enzyme by trans-cinnamic acid. *Planta* 169 :97-107.
- Boller T, Gehri A, Mauch F, Vogeli U (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function, *Planta*, 157: 22-31.
- Cahill D M, and McComb J A (1992) A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40: 315-332.
- Carneiro FF, Santos JB, and Leite ME (2010) Marker-assisted backcrossing using microsatellites and validation of SCAR *Phs* marker for resistance to white mold in common bean. *Electronic Journal of Biotechnology* 13: <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue6-fulltext-13>.
- Castaño S, María J, and Debouck D G (2005) Comparison of stigma areas wild and cultivated forms (landraces and modern cultivars) of *Phaseolus vulgaris* L. Annual Report. *Bean Improvement Cooperative. (USA)* 48:34-35.
- Castellanos G, Jara C, Mosquera G (2015) *Bean Pathogens: Practical Guide for Lab and Greenhouse Work.* (CIAT Publication No.394), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 238p.
- Chutipajit S, Cha-um S, Sompornpailin K (2009) Differential accumulations of proline and flavonoids in Indica rice varieties against salinity. *Pakistan Journal of Botany* 41:2497-2506.
- Collinge D B, and Slusarenko A J (1987) Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Molecular Biology* 9:389-410.
- Dixon R A, Achnine L, Kota A P, Liu CH, Reddy M S S, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371-390.
- Erikilic A, Guven B, Akgul D S (2006) Effects of some plant activators and plant materials on stem rot disease of peanut and pepper caused by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Turkey phytopathology* 34: 15-28.
- Farooq M A, Iqbal U, Rasool A, Zubair M, Iqbal SM, Ahmad S (2011) Evaluation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes for resistance against root rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *Mycopath* 9: 13-15.
- Fery RL, Dukes P D (2011) Southern Blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of Cowpea: Genetic Characterization of Two Sources of Resistance. *International Journal of Agronomy*, Volume 2011. 6 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2011/652404>.
- Fontenelle M R, Santana M F, Cnossen A, Bazzolli D M S, Bromonschenkel S H, De Araújo E F, De Queiroz M V (2016) Differential expression of genes during the interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. *European Journal of Plant Pathology* 1-18 (online published).
- Gepts P, Aragão F, De Barros E G, and Blair M W (2008) Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: *Genomics of Tropical Crop Plants (Book)* pp.113-143.
- Gholami M, Ebrahimi A, Mozafari J, Bihamta M R, and Rahaie M (2020) Phenotypic and genotypic screening of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces for resistance to collar rot fungus (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) in North of Iran. *Journal of Plant Pathology* 102 (67-78).
- Jez J M, Noel J P (2002) Reaction mechanism of chalcone isomerase. pH dependence, diffusion control, and product binding differences. *J Biol Chem* 277:1361-1369.
- Kator L, Hosea Z Y, and Oche O D (2015) White mold and sclerotia rot disease. *Annals of Biological Research*, 6:78-89.
- Liang X, Dron M, Cramer C L, A. Dixon R A, and Lamb C J (1989) Differential Regulation of Phenylalanine Ammonia-lyase Genes during Plant Development and by Environmental Cues. *The Journal of Biological Chemistry*, 264:14486-14492.
- Mahuku G S (2004) A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 71-81.
- Melmaiee K, Todd A, McClean Ph, Lee R, Schlueter J, Jackson S, Kalavacharla V (2013) Identification of molecular markers associated with the deleted region in common bean (*Phaseolus vulgaris*) ur-3 mutants. *Australian Journal of Crop Science* 7: 354-360.
- Miklas P N, Johnson W C, Delorme R, Gepts P (2001) QTL Conditioning Physiological Resistance and Avoidance to White Mold in Dry Bean. *Crop Science* 41: 309-315.
- Miklas P N, and Delorme R (2003) Identification of QTL Conditioning resistance to white mold in snap bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 128: 564-570.

- Miklas P N (2007) Marker-assisted backcrossing QTL for partial resistance to *Sclerotinia* white mold in dry bean. *Crop Science* 47:935-942.
- Naderpour M, Lund OS, Larsen R, Johansen E (2010) Pot viral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. carrying bc-3 is associated with the homozygotic presence of a mutated eIF4E allele. *Molecular Plant Pathology* 11:255-263.
- Oever R V D, Roosels D, Lahaye D (1982) Actual hazard of methyl bromide fumigation in soil disinfection. *British Journal of Industrial Medicine* 39: 140-144.
- Oliveira M B, De Andrade R V, Grossi-de-Sá, M F, and Silvana Petrofeza S (2015) Analysis of genes that are differentially expressed during the *Sclerotinia sclerotiorum*-*Phaseolus vulgaris* interaction. *Front Microbiol* 6: Article 1162: 1-14.
- Pastor Corrales M A, and Schwartz H F (eds.) (1994) Problemas de producción del frijol en los trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. pp. 474-494. (Publicación CIAT no. 230.
- Quattrocchio F, Baudry A, Lepiniec L, and Grotewold E (2006) The regulation of flavonoid biosynthesis (chapter four). *The Science of Flavonoids* (book), pp. 97-122.
- Sennoi R, Jogloy S, Saksirirat W, and Kesmala, T (2012) Levels of *Sclerotium rolfsii* inoculum influence identification of resistant genotypes in Jerusalem artichoke. *African journal of microbiology research* 6: 6755-6760.
- Schmutz J, McClean Ph E, Jackson S A (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* 46: 707-713.
- Soule M, Porter L, Medina J, Santana GP, Blair MW, Miklas PN (2011) Comparative QTL Map for White Mold Resistance in Common Bean, and Characterization of Partial. Resistance in Dry Bean Lines VA19 and I9365-31. *Crop Science* 51:123-139.
- Vallejo V A, and Kelly J D (2008) Molecular tagging and genetic characterization of alleles at the Co-1 anthracnose resistance locus in common bean. *ICFAI Univ. Infection, Genetics and Evolution* 1:7-20.
- Xingbo W, Junjie H, Xiaoyan Z, Shuwei W, Hongwei L, Yang SH, Jilu S (2013) Identification of Powdery Mildew Resistant Genes based on SCAR Markers in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Current Biotechnology* 3: 357-362.
- Yang H Q, and Luo Z M (1998). Study of the purification and properties of chitinase from bean seeds (*Phaseolus vulgaris*), *Journal of Hunan Agricultural University* 24:194-198.
- Wanga S, Wua J, Raoa P, Bun Ngb T, and Ye X (2005) A chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Protein Expression and Purification* 40: 230-236.
- Whitehead I M, Dey P M, and Dixon R A (1982) Differential patterns of phytoalexin accumulation and enzyme induction in wounded and elicitor-treated tissues of *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 154:156-164.