



## "مقاله پژوهشی"

# بررسی بیان برخی از ژن‌های مقاومت به بیماری برق‌زدگی در گیاه نخود زراعی

سمیرا حسینیان<sup>۱</sup>، امید سفالیان<sup>۲</sup>، ناصر زارع<sup>۳</sup>، علیرضا تازی نژاد<sup>۴</sup> و مهدی داوری<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران، (نویسنده مسؤل: sofalian@gmail.com)

۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۵- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲

صفحه: ۱۶۹ تا ۱۷۸

### چکیده

بیماری برق‌زدگی که به وسیله قارچ *Ascochyta rabiei* ایجاد می‌شود، یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده کشت و تولید نخود در بیشتر مناطق دنیا و از جمله ایران است. القای مقاومت نسبت به پاتوژن‌ها از راهکارهایی است که گیاهان برای مقابله با تنش‌های زیستی به کار می‌برند. این تحقیق در سال ۱۳۹۷ به صورت آزمایش فاکتوریل دو عاملی (زمان-ژنوتیپ) در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار برای هر کدام از زمان‌های انتخاب شده و گیاه شاهد در آزمایشگاه گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. به منظور درک بهتر سیستم‌های دفاعی گیاه نخود در سطح مولکولی، دو ژنوتیپ حساس (FLIP 03-135C) و مقاوم نخود (FLIP 00-40C) در گلخانه کشت شد و میزان بیان ژن‌های درگیر در مقاومت به بیماری برق‌زدگی نخود (Protein with leucine zipper, Snakin2, AFP-ca و PGIP) در این ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور بعد از این که گیاهان به مرحله‌ی پنج تا هفت برگ‌ری رسیدند، با سوسپانسیون اسپور با غلظت  $10^6 \times 1/2$  آلوده شدند و در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی گیاه با قارچ *A. rabiei* RNA کل از برگ‌های گیاهان مورد آزمایش استخراج و رشته اول cDNA سنتز شد. سطح تظاهر ژن‌های مذکور در نمونه‌های تیمار شده و شاهد، در ژنوتیپ نخود حساس و مقاوم به برق‌زدگی با استفاده از روش ارزیابی Real-Time PCR بررسی شد. سطح بیان هر چهار ژن مورد بررسی در این تحقیق در گیاه مقاوم نسبت به بیماری *A. rabiei* افزایش یافت. نتایج نشان داد که ژن‌های انتخاب شده Snakin2 و protein with leucine zipper در ارقام مقاوم در زمان ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی، ژن AFP-ca از خانواده پپتیدهای ضد میکروبی در زمان‌های اولیه ۲۴-۶ ساعت پس از مایه‌زنی و همچنین ژن PGIP از خانواده پروتئین‌های مهارکننده گالاکتوروناز در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی حداکثر بیان را دارند. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که تمام ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق در ارتباط با برهمکنش گیاه و بیمارگر بوده و ممکن است باعث کمک به القاء مقاومت در گیاه شوند.

واژه‌های کلیدی: بلایت باکتریایی نخود، تنش زیستی، ژن‌های دفاعی، سنجش کمی، Real Time PCR

### مقدمه

Lab می‌باشد. این بیماری اولین بار در ابتدای قرن بیستم، با شناسایی عامل بیماری‌زای آن در پاکستان، مشاهده شد، و پس از آن از اغلب کشورهای جهان گزارش شد (۲۶). این بیماری، باعث خسارت شدید به قسمت‌های هوایی گیاه می‌شود که با آلودگی اندام‌های هوایی باعث از بین رفتن کامل گیاه و مانع گسترش و رشد گیاه شده و در نهایت باعث خشکیدگی گیاه می‌گردد (۳۳). در برهمکنش بین گیاه و پاتوژن، فعالیت پاتوژن روی تسخیر میزبان و مصرف منابع آن متمرکز می‌شود، در حالی که گیاه تلاش می‌کند تا پاتوژن را تشخیص داده و مکانیسم‌های دفاعی خود را برای مقابله با آن متوقف کردن حمله میکروبی، فعال نماید. یکی از فاکتورهای مهم در گیاهان بعد از آلودگی سرعت پاسخ‌دهی گیاه می‌باشد. بنابراین تشخیص به موقع یک موجود مهاجم و القاء سریع و موثر پاسخ‌های دفاعی، گیاه مقاوم را از انواع حساس متمایز می‌کند (۹). مکانیسم‌های دفاعی گیاه شامل ترکیبی از پاسخ‌های دفاعی دایمی و القایی است. پاسخ‌های دایمی شامل موانع فیزیکی و شیمیایی موجود در گیاه از قبیل

نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از منابع مهم تغذیه انسان به شمار می‌رود. سطح زیر کشت این محصول در ایران حدود ۵۶۶ هزار هکتار بوده و با متوسط عملکرد ۴۷۸ کیلوگرم در هکتار، تولید کل آن در کشور معادل ۲۷۱ میلیون کیلوگرم می‌باشد. در سطح جهانی، نخود با سطح زیرکشت بیش از ۱۴/۶ میلیون هکتار و متوسط تولید ۱۰۱۹ کیلوگرم در هکتار به عنوان سومین گیاه مهم از گروه حبوبات می‌باشد (۱۲). کشت نخود به دلیل هزینه کم تولید، سازگاری وسیع آب و هوایی، استفاده در تناوب گیاهی و توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفری، یکی از مهم‌ترین گیاهان لگوم در سیستم کشاورزی پایدار به شمار می‌رود (۲۲). اهداف اصلاحی نخود، به‌دست آوردن ژنوتیپ‌هایی است که دارای عملکرد بالا باشند و در مقابل بیماری‌ها مقاومت پایدار داشته و تنش‌های زیستی و غیرزیستی را به خوبی تحمل کنند (۲۹). از بین تنش‌های زیستی که محصول نخود را تحت تأثیر قرار می‌دهند، بیماری برق‌زدگی است که مخرب‌ترین بیماری نخود در سطح جهان است (۲۷) که عامل آن *Ascochyta rabiei* (pass.)

بافت‌های گیاهی، سیگنال‌هایی تولید می‌شوند که توسط گیاه قابل شناسایی هستند. این سیگنال‌ها تحت عنوان الیسیتور (Elicitor) نامیده می‌شود (۱۹). الیسیتورهای حاصل از پاتوژن‌ها و دیواره سلول‌های گیاهی، جهت فعال‌سازی بیان ژن‌های دفاعی در داخل سلول منتشر می‌شوند و به صورت اختصاصی به گیرنده‌های غشای پلاسمایی متصل شده و فرآیندهای سیگنالی لازم در جهت واکنش‌های دفاعی را آغاز می‌کنند (۲۵).

مطالعات نشان داده که تنش‌های زنده مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها، رشد و توسعه گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. واکنش‌های گیاه در برابر آن‌ها با تغییرات زیادی در شبکه‌های پیچیده ژن همراه است و بر این اساس بررسی الگوی بیان ژن‌هایی که در انطباق یا تحمل به این تنش‌ها نقش دارند، ضروری است. در مطالعه حاضر تغییرات الگوی بیان برخی از ژن‌های مقاومت به بیماری برق‌زدگی در گیاه نخود زراعی در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با قارچ بیماری برق‌زدگی، در دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به بیماری برق‌زدگی بررسی شده است تا واکنش گیاه به آلودگی قارچی مورد ارزیابی قرار گرفته و نقش هر کدام از این ژن‌ها در ایجاد مقاومت به بیماری، مشخص شود.

### مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی و شرایط رشد:** این تحقیق در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. در این تحقیق، از دو ژنوتیپ نخود حساس (FLIP 03-135C) و مقاوم (FLIP 00-40C) گزینش شده از آزمایش‌های پیشرفته مقایسه عملکرد و مقاومت به بیماری برق‌زدگی، استفاده شد (۱۵). بذرها از مرکز تحقیقات کشاورزی گچساران تهیه گردید. سطح بذور، قبل از کشت توسط هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شد. بذور پس از شستشو با آب مقطر، برای رشد به پتری دیش انتقال داده شدند. بعد از ۳۶ ساعت رشد در دمای ۲۴-۲۲ و روشنایی ۱۲ ساعت، بذور جوانه زده، در گلدان‌هایی به قطر ۲۰ سانتی‌متر حاوی مخلوط خاک، ماسه و کود دامی (به ترتیب با غلظت‌های ۱:۱:۳) در عمق ۲/۵ سانتی‌متری کاشته شدند. در هر گلدان، پنج بذر کشت گردید. این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل دو عاملی (زمان-ژنوتیپ) در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار برای هر کدام از زمان‌های انتخاب شده و گیاه شاهد انجام شد.

**آماده سازی نمونه قارچ و تهیه سوسپانسیون اسپور:** جدایه شماره ۱۳ پاتوتیپ III (۳۸) قارچ *A. rabiei* به عنوان بیمارگر پرآزار از بانک ملی ژن گیاهی (ایران) تهیه شد. این جدایه روی محیط کشت جامد عصاره نخود (Chickpea Dextrose Agar) کشت گردید و در شرایط دمایی ۱۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۴ ساعت روشنایی نگهداری و پس از ۷ تا ۱۰ روز، ۰/۵ سانتی‌مترمربع از نمونه قارچ برای تولید اسپور به داخل ویال حاوی محیط کشت مایع (Chickpea CDB Dextrose Broth) منتقل شد. ظروف در شرایط دمایی ۲۲/۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۴

لایه ضخیم کوتیکولی یا ترکیبات ضد میکروبی موجود در گیاه می‌باشد (۱۴). مکانیسم‌های دفاعی القایی شامل موانع مکانیکی با تجمع موادی که به منظور ممانعت از ورود بیمارگر تولید می‌گردد. موانع شیمیایی از جمله تولید ترکیبات فنلی، فیتوالکسین‌ها و افزایش غلظت یا فعالیت مواد پروتئینی است در برابر ورود بیمارگر به گیاه تولید می‌شوند (۱۳). در رابطه متقابل گیاه و بیمارگر، پس از شناخت میکروارگانیسم توسط مولکول‌های گیرنده الیسیتور، مجموعه‌ای از پاسخ‌های دفاعی در میزبان گیاهی صورت می‌گیرد. طی این فرآیند پس از دریافت پیام توسط مولکول گیرنده، از طریق مسیر سیگنالینگ تولید رادیکال‌های سمی اکسیژن، فیتوالکسین و تعدادی از ترکیبات ضد میکروبی، تجمع ترکیبات پروپانوتید فنلی در دیواره سلولی گیاهی، رسوب کالوس، سنتز آنزیم‌های دفاعی و همچنین سنتز و تولید یک سری زنجیره‌های کوچک پروتئینی صورت می‌گیرد (۱۸). پاسخ‌های دفاعی القایی موضعی یا سیستمیک بوده و دارای پیچیدگی می‌باشند، زیرا مستلزم مراحل مختلفی از جمله شناسایی پاتوژن به وسیله گیاه میزبان، انتقال پیام و بیان تعداد زیادی ژن می‌باشد تا بعد از حمله پاتوژن، این پاسخ‌های دفاعی سریع و به طور هماهنگ القاء شده و گیاه را در برابر حمله پاتوژن مقاوم سازند (۳۵). کانونی و همکاران (۱۳۸۹)، به منظور تعیین تعداد ژن‌های کنترل کننده مقاومت به برق‌زدگی و اندازه برگ در نخود و نوع عمل این ژن‌ها، مطالعه‌ای انجام دادند و روش انتخاب دوره‌ای که به نحو مطلوب از واریانس افزایشی استفاده می‌کند را به عنوان بهترین روش اصلاحی جهت انتخاب ژنوتیپ‌های والدینی و ایجاد مقاومت به برق‌زدگی در نخود پیشنهاد کردند (۱۶). سینگ و ردی (۱۹۸۳) ژنتیک مقاومت به *D. rabiei* را در یک مجموعه از لاین‌های مقاوم بررسی کرده و نتیجه‌گیری کردند که مقاومت از یک مدل ژنتیکی ساده تبعیت نموده و دو عبارت rar1 و rar2 را برای مشخص کردن مقاومت به ترتیب در دو لاین ICC191 و ILC200 پیشنهاد کردند (۳۴). محققان مرکز بین‌المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ایکاردا)، در بررسی ژنوتیپ‌های ذخیره ژنتیکی این مرکز پی‌بردند که مقاومت به صورت تک‌ژنی کنترل می‌شود (۱۱). در مطالعه دیگری تکه‌اوغلو و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که سه ژن اصلی تکمیلی و مغلوب با تعداد زیادی تغییردهنده، مقاومت به برق‌زدگی را کنترل می‌کنند. آن‌ها در ادامه افزودند که عدم حضور یک یا دو ژن اصلی باعث بروز حساسیت شده، در حالی که وجود تغییردهنده‌ها، درجه مقاومت را تعیین می‌کند (۳۶). افضل و همکاران (۱) در تحقیقی، بیان ژن ایزوفرم‌های اسیدی و بازی این دو آنزیم را در سطح مولکولی در گیاه نخود زراعی مورد مطالعه قرار دادند. به این ترتیب که سطح تظاهر ژن‌های مذکور در نمونه‌های تیمار شده و شاهد، در ژنوتیپ نخود حساس MCC403 و ژنوتیپ مقاوم MCC496 نسبت به آلودگی با قارچ برق‌زدگی (*A. rabiei*) با استفاده از روش ارزیابی نیمه کمی RT-PCR بررسی شد و نتایج، حاکی از افزایش بیان ایزوفرم اسیدی هر دو ژن کیتیناز و بتا-۱ و گلوکاناز پس از آلودگی بود. در زمان حمله پاتوژن‌ها به

مشاهده باند قوی RNA ریوزومی 18S و 28S نشاندهنده کیفیت خوب RNAهای استخراج شده بود). با استفاده از نانودراپ غلظت نمونه های RNA با یکدیگر یکسان شدند و سپس RNAهای با غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میکرولیتر برای ساخت cDNA با استفاده از کیت cDNA سنتتاز (Fermentas, USA) مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده، مورد استفاده قرار گرفت. cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

**طراحی آغازگرها:** ژنهایی که میزان بیان آنها در ژنوتیپهای مورد نظر بعد از آلودگی به بیماری برق زدگی، مورد مقایسه قرار گرفت، شامل ژنهای *Cicer arietinum*، protein with leucine zipper، actin (ACT1)، SNAKIN2، AFP-ca، و PGIP بودند (۶). ژن خانه دار ACT1 با آغازگرهای اختصاصی در این تحقیق به عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب شد که mRNA این ژن ها در سلول های گیاهی تقریباً در تمام سلول ها، بافت ها و اندام های مختلف، به یک اندازه نسخه برداری می شوند و از طرفی غلظت cDNA ساخته شده برابر با غلظت mRNA وارد شده به واکنش نسخه برداری معکوس است (۸). به منظور طراحی آغازگر ژن های مورد بررسی، توالی محافظت شده آنها از پایگاه داده NCBI گرفته شد و سپس آغازگرهای الیگونوکلیوتیدی جهت انجام واکنش Real Time Pcr براساس توالی های موجود با استفاده از نرم افزار Primer3 طراحی شدند.

ساعت روشنایی - ۱۰ ساعت تاریکی، روی شیکر با دور ۱۵۰ RPM قرار گرفتند. بعد از سه روز، اسپورها آماده تکثیر بودند و تا شش روز بعد نیز اسپورها توانایی بیماری زایی داشتند. در این مرحله، سوسپانسیون محیط کشت از پارچه ملام دولایه عبور داده شد و غلظت محلول عبوری با استفاده از لام گلبول شمار به غلظت  $10^6 \times 1/2$  اسپور در هر میلی لیتر رسانده شد (۳۲).

**تلقیح گیاهان نخود:** سوسپانسیون اسپور با آب پاش های پلاستیکی به طور یکنواخت بر روی گیاهچه های ۱۴ روزه نخود اسپری شد. عمل اسپری تا مرحله ریزش اولین قطره از سطح برگ ادامه یافت و گلدان ها به مدت ۵ روز در زیر پلاستیک به منظور حفظ رطوبت تا ۹۰ درصد نگهداری شدند و روزانه سه تا پنج بار آب پاشی در زیر پلاستیک انجام شد و پس از آن پوشش پلاستیکی به تدریج برداشته شد و رطوبت گلخانه در سطح ۷۰ درصد تنظیم گردید.

**استخراج RNA و ساخت cDNA:** RNA کل از برگ های گیاهان در بازه های زمانی ۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از آلودگی قارچی با استفاده از کیت RNXT<sup>TM</sup> plus (شرکت سیناژن، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده استخراج شد. قبل از استخراج RNA، نمونه های برگ و ساقه گیاهان هر تیمار باهم مخلوط شدند. RNA کل استخراج شده (۳۰ میکروگرم برای هر واکنش) با استفاده از آنزیم DNaseI (Fermentas, USA) تیمار شد تا DNAی ژنومی حذف شود. کمیت و کیفیت RNA استخراجی، با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل مخصوص RNA تعیین گردید

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. List of primer sequences used for RT-PCR in this study

نام ژن	توالی آغازگرها	شماره دسترسی در NCBI	دمای اتصال (°C)	طول قطعه (bp)
Act1-F	AGA CGA GCG TTT CAG ATG TC	EU529707.1	۶۰	۱۶۰
Act1-R	TAT CAG CAA TGC CTG GGA AC			
Protein with leucine zipper-F	CCT AGT GCG CAA AGT GAA GG	CV793599.1	۵۸	۱۴۰
Protein with leucine zipper-R	CAA GGC TTT GCT CCA AGA GG			
Snakin2-F	CTA GTT GCT TCC CTT CTC GC	CV793608.1	۵۹	۱۵۰
Snakin2-R	TAC GCT GAA GAA GAG AGC CC			
PGIP-F	GCT TCA GAA ACC GAC TCT C	Loc101504619	۵۸	۳۱۷
PGIP-R	CGA TGG AAT CTG ACC ACA C			
AFP-Ca-F	TGG CTT GTG CTT CCT CTT C	DQ288897.2	۵۷	۱۸۴
AFP-Ca-R	ACA ACG AAA GTC ATC CCT GC			

میزان بیان داده های Real Time Pcr با میزان رونویسی هر ژن خانه دار از طریق روش مقایسه کمی و روش دلتا دلتا سی تی انجام گرفت (۲۱). تجزیه واریانس و تحلیل داده های به دست آمده به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار صورت گرفت و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد با استفاده از نرم افزار SAS8.2 انجام گرفت. نمودارهای مربوط به بیان نسبی ژن ها در سطح رونوشت نیز با استفاده از نرم افزار Excel Office Microsoft 2010 رسم شد.

**بررسی بیان ژن:** برای بررسی بیان ژن های دفاعی نخود در برابر بیماری برق زدگی از روش سنجش کمی Real Time PCR استفاده شد. انجام PCR در زمان واقعی با استفاده از دستگاه Rotor gene-Q از شرکت Qiagen صورت گرفت. واکنش PCR با حجم نهایی ۱۴ میکرولیتر انجام شد. برنامه واکنش شامل: ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه و سپس طی ۴۰ سیکل با ۹۵ درجه برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۲۰ ثانیه، بود. الگویابی منحنی ذوب از ۶۰ تا ۹۵ درجه در پایان واکنش برای هر PCR جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش انجام گردید.

## نتایج و بحث

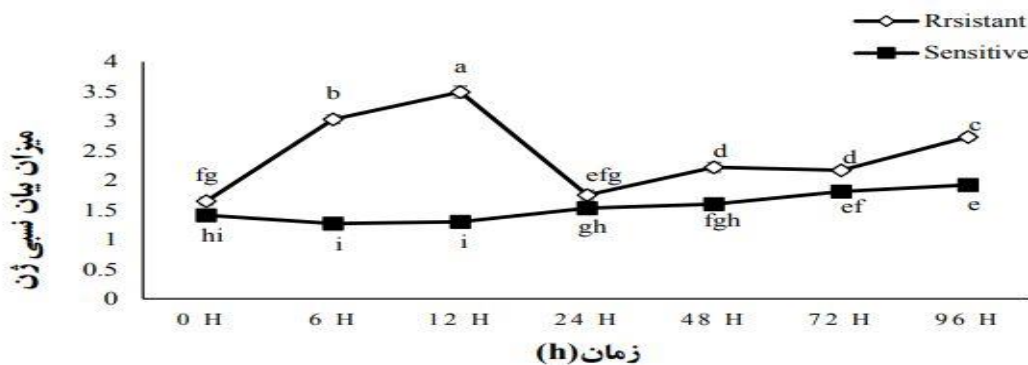
### مقایسه میزان بیان ژن‌ها:

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بیان ژن Snakin2 در اثر تلقیح سوسپانسیون قارچی در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس به صورت معنی‌داری (سطح احتمال  $P < 0.01$ ) افزایش نشان داد. میزان بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ در ساعات بعد از آلودگی روند متفاوت داشت. در ژنوتیپ FLIP 00-40C (مقاوم)، ۱۲ ساعت بعد از تلقیح سوسپانسیون قارچ، بیشترین میزان بیان مشاهده شد و در این ژنوتیپ بیان این ژن تشکیل دو فاز داد که در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت بعد از آلودگی، میزان بیان افزایش یافت و در زمان ۲۴ ساعت، به کمترین حالت خود رسید و پس از آن، بیان این ژن در زمان‌های ۴۸ ساعت به بعد، افزایش یافت (شکل ۱). در ژنوتیپ FLIP03-135C (حساس) بعد از تلقیح سوسپانسیون به گیاه، بیان ژن تا زمان ۱۲ ساعت بعد از آلودگی، نسبتاً ثابت بود و بعد از زمان ۲۴ ساعت، بیان به صورت خطی افزایش یافت و همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، نوع افزایش بیان در زمان‌های مختلف در دو ژنوتیپ به صورت معنی‌داری متفاوت بود.

Snakinها، پپتیدهای ضد میکروبی گیاه از خانواده Snakin/Gasa هستند که از سه منطقه جدا از هم شامل سیگنال ترمینال -N، یک سایت متغیر و منطقه گاسا در ناحیه ترمینال -C که توسط ۱۲ سیستمین حفاظت شده که باعث پایداری بیوشیمیایی مولکول‌ها می‌شود، تشکیل شده

است. این پپتیدها نقش‌های مختلفی در پاسخ به تنش‌های زیستی (باکتری‌ها، قارچ‌ها و نماتد) و تنش‌های غیرزیستی (شوری و خشکی) و همچنین پیام‌های انتقال یافته توسط هورمون‌های گیاهی، با تأکید بر آبسزیک اسید و سالیسیلیک اسید دارند. افزایش بیان این ژن در نخود باعث افزایش مقاومت نخود در برابر بیماری برق‌زدگی می‌شود (۲۸).

افزایش بیان ژن Snakin2 در گوجه فرنگی باعث افزایش تحمل گیاهان تراریخته گوجه فرنگی در برابر بیماری شانکر باکتریایی (*Clavibacter michiganensis*) می‌شود (۳). با خاموش شدن ژن Snakin2 در گیاه توتون (*Nicotiana Benthiana*) حساسیت به بیماری شانکر باکتریایی (*Clavibacter michiganensis*) بیشتر می‌شود (۲). در این آزمایش نیز میزان بیان ژن SNAKIN2 در شرایط بیماری افزایش یافت. همچنین مشخص شد که بیان ژن ضد میکروبی SNAKIN2 در واکنش به آلودگی *A. rabiei* افزایش یافت. مطالعات ریزآرایه هم نشان داد که این ژن در رقم مقاوم به طور واضحی افزایش بیان داشت و این افزایش بیان در ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی صورت گرفت (۷). پروتئین SNAKIN2 ترکیب ضد میکروبی به شکل سه بعدی کروی و غنی از سیستمین و دارای باندهای پایدار دیسولفیدی بود. گزارش شد که بیان SNAKIN2 در واکنش به مایه‌زنی القاء شد و با SNAKIN1 به حالت سینرژیستی تجمع پیدا کرد (۵).



شکل ۱- الگوی بیان ژن Snakin2 نسبت به ژن خانه‌دار به عنوان کنترل داخلی در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس بعد از مایه‌زنی قارچ (حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ می‌باشد)

Figure 1. Gene expression of Snakin2 in comparison with the housekeeping gene as an internal control for resistant and susceptible genotypes over the time course of infection with *A. rabiei* isolate. Different letters indicate significant differences based on Duncan's test ( $P < 0.01$ ) ( $n=3$ )

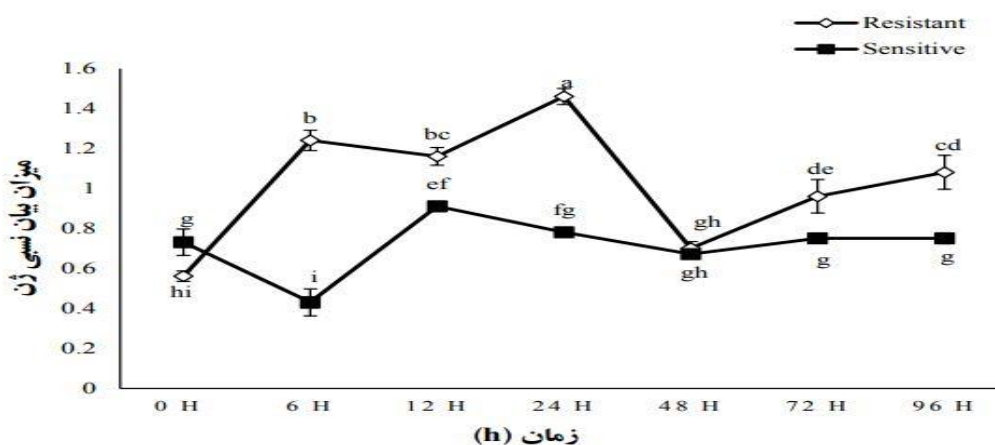
بیان این ژن به حداقل میزان خود رسید و بعد از زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از مایه‌زنی دوباره میزان بیان افزایش نسبی یافت. در ژنوتیپ حساس میزان بیان در زمان ۶ ساعت بعد از مایه‌زنی، به حداقل رسید و پس از آن، میزان بیان نسبت به زمان صفر به صورت خطی افزایش یافت.

در بررسی حاضر بیان ژن AFP-ca در رقم مقاوم و حساس عکس هم بود و در زمانی که بیان این ژن در رقم مقاوم بیشترین (۱/۵) شد در رقم حساس کمترین میزان

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بیان ژن AFP-ca (ژن کاندید از خانواده زنجیره‌های پروتئینی ضد میکروبی) در اثر تلقیح سوسپانسیون قارچی در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس به صورت معنی‌داری (سطح احتمال  $P < 0.01$ ) افزایش نشان داد. میزان بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ در ساعات بعد از آلودگی روند متفاوت دارد. در ژنوتیپ مقاوم، از زمان صفر تا زمان ۲۴ ساعت بعد از تلقیح قارچ، بیان ژن افزایش یافت اما در زمان ۲۴ ساعت بعد از تلقیح قارچ

شروع بیماری و حساسیت داشته باشد. همچنین باتوجه به اینکه این پروتئین در دیگر گیاهان ترکیب ضد قارچی است، افزایش بیان در ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی می‌تواند باعث مرگ میسلیوم تازه نفوذ کرده قارچ شود (۱۷). در بررسی‌های انجام گرفته در استرالیا مشخص شد که تنوع ژنتیکی رقم‌های نخود کم بوده و این نشان‌دهنده پتانسیل تنوع کم مکانیسم‌های دفاعی رقم‌ها است (۲۰). طی بررسی ژن‌های دفاعی همولوگ نخود و مقایسه آنها با دیگر لگوم‌ها، تنوع کم مکانیسم دفاعی ثابت شده است (۳۹). بنابراین اختلاف بالای سطحی بیان ۱۵ ژن دفاعی در میان ۱۰ ژنوتیپ نخود و در زمان‌های ابتدایی آلوده‌سازی ۲ تا ۶ ساعت پس از مایه‌زنی نشان می‌دهد که میان ارقام در زمان تشخیص پاتوژن تفاوت وجود داشته و به طبع آن سرعت سیگنالینگ مکانیسم دفاعی پایین دستی تحت تاثیر قرار گرفت (۲۰).

(۰/۸) مشاهده شد. به طور کلی در رقم مقاوم در تمام زمان‌های مورد مطالعه، بیان این ژن به طور معنی‌دار و با اختلاف زیاد بیشتر از رقم حساس بود. بیان در رقم مقاوم دارای دو الگوی افزایش در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی بود و در همین زمان‌ها بیان در رقم حساس کمترین مقدار مشاهده شد (شکل ۲). با توجه به زیست‌شناسی بیماری‌زایی قارچ *A. rabiei*، مشخص شد که این ژن یکی از ژن‌های بسیار مهم دخیل در مقاومت بوده و احتمالاً در تشخیص میزبان و نفوذ به گیاه نقش دارد. اما با توجه به این‌که در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی بیان در رقم مقاوم کاهش پیدا کرد، ممکن است در رشد پاتوژن در گیاه و حمله به سلول‌های مجاور تاثیر کمتری داشته باشد. رقم حساس تنها در زمان ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش بیان داشت و این زمان همان زمان جوانه زنی اسپور است و به نظر می‌رسد تاخیر بیان AFP-ca در رقم حساس نقش بسیار مهمی در

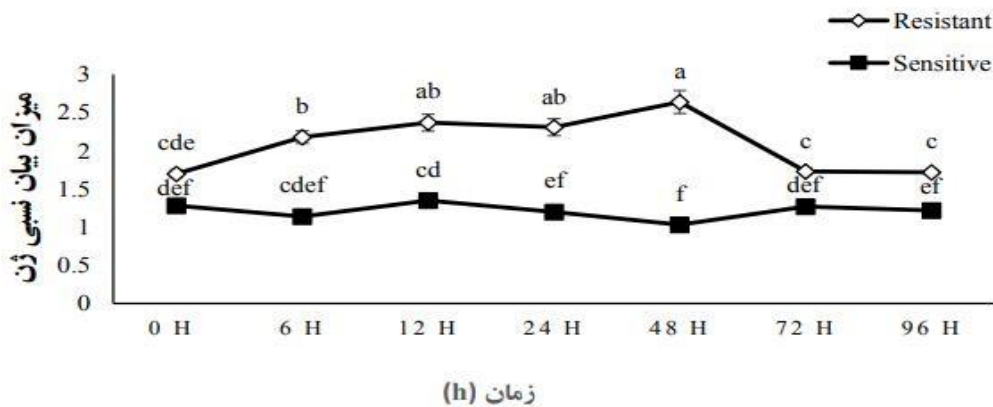


شکل ۲- الگوی بیان ژن AFP-ca نسبت به ژن خانه‌دار به عنوان کنترل داخلی در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس بعد از مایه‌زنی قارچ (حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ می‌باشد)

Figure 2. Gene expression of AFP-ca in comparison with the housekeeping gene as an internal control for resistant and susceptible genotypes over the time course of infection with *A. rabiei* isolate. Different letters indicate significant differences based on Duncan's test ( $P < 0.01$ ) ( $n=3$ )

پس از مایه‌زنی، روند ثابتی داشت. ژن‌های PGIP دارای منشاء تکاملی مشترکی در گیاهان مختلف می‌باشند. در این مطالعه مشخص شد که بیان ژن PGIP در رقم حساس ثابت بود اما در رقم مقاوم بیان در تمام زمان‌ها بالا بود و در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی در رقم مقاوم به بیشترین میزان خود رسید در این زمان اوج اختلاف بیان ژن در ژنوتیپ حساس و مقاوم مشاهده گردید و پس از ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی، کاهش ناگهانی بیان داشت و میزان بیان این ژن در رقم حساس و مقاوم معکوس هم بود (شکل ۴). ژن PGIP دارای تشابه ۷۳٪ نوکلئوتیدی با ژن PGIP گیاه سویا با شماره دسترسی (NP001304551) است که باعث مقاومت علیه قارچ‌ها می‌شود (۱۰). PGIP نخود در این تحقیق با PGIP گیاه لوبیا ۷۳٪ تشابه نوکلئوتیدی دارد و مشخص شده که این ژن PvPGIP2 در ارقام لوبیا دارای توالی حفاظت شده غنی از لوسین می‌باشد (۱۰).

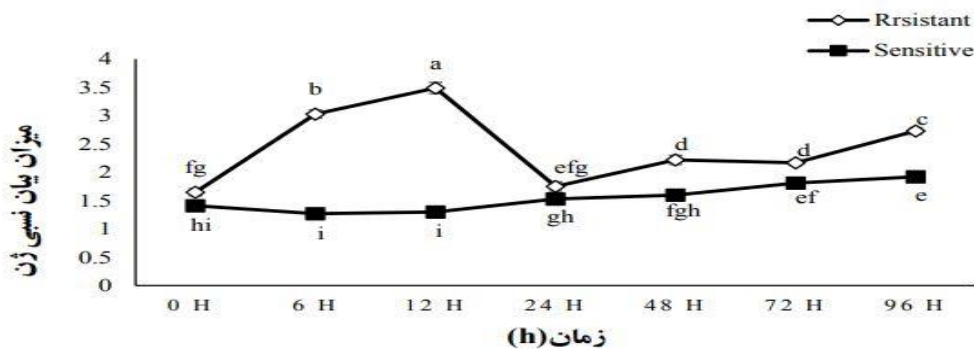
بیان نسبی ژن PGIP از خانواده پروتئین‌های مهارکننده پلی‌گالاکتوروناز در ۷ زمان تعیین شده بعد از تلقیح سوسپانسیون قارچ و ایجاد علائم بیماری روی برگ و ساقه نخود مورد بررسی قرار گرفت که نتایج مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن نشان داد که الگوی بیان این ژن در بازه‌های زمانی مختلف با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشته است. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است در ژنوتیپ مقاوم، در ساعت اولیه میزان بیان افزایش یافت که این افزایش بیان در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی به اوج خود رسید و پس از آن میزان بیان در ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی کاهش یافت (شکل ۳). نتیجه مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیان ژن PGIP بعد از تلقیح سوسپانسیون قارچ در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی، بیشترین میزان را داشت. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است در رقم حساس میزان بیان به صورت نسبتاً ثابتی بود و در زمان‌های مختلف



شکل ۳- الگوی بیان ژن PGIP نسبت به ژن خانه‌دار به عنوان کنترل داخلی در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس بعد از مایه‌زنی قارچ (حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ می‌باشد)  
 Figure 3. Gene expression of PGIP in comparison with the housekeeping gene as an internal control for resistant and susceptible genotypes over the time course of infection with *A. rabiei* isolate. Different letters indicate significant differences based on Duncan's test ( $P < 0.01$ ) ( $n=3$ )

گیاه نخود در مقابل بیماری سوختگی در دو رقم مقاوم و حساس نشان داد که میزان بیان ژن Protein with leucine zipper در برابر بیماری سوختگی *Ascochyta blight* قرار می‌گیرد افزایش می‌یابد که نشان دهنده مشارکت بالقوه این EST در دفاع از نخود در برابر بیماری *Ascochyta blight* می‌باشد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد (۳۷).

مقایسه میزان بیان ژن Protein with leucine zipper در شرایطی که گیاه تحت بیماری برق‌زدگی قرار داشت نسبت به شرایط نرمال در دو ژنوتیپ حساس (FLIP 03-135C) و مقاوم نخود (FLIP 00-40C) نشان داد که میزان بیان این ژن در این دو ژنوتیپ افزایش یافت. آزمایشات تریستن و همکاران (۲۰۰۵) در تجزیه و تحلیل سه EST مرتبط با دفاع



شکل ۴- الگوی بیان ژن Protein with leucine zipper نسبت به ژن خانه‌دار به عنوان کنترل داخلی در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس بعد از مایه‌زنی قارچ (حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ می‌باشد)  
 Figure 4. Gene expression of Protein with leucine zipper in comparison with the housekeeping gene as an internal control for resistant and susceptible genotypes over the time course of infection with *A. rabiei* isolate. Different letters show significant differences based on Duncan's test ( $P < 0.01$ ) ( $n=3$ )

تغییرات بیانی در زمان ۲۴ تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی اتفاق می‌افتد. ممکن است این روند تغییرات نشان دهنده‌ی زمان تشخیص پاتوژن و سپس تغییرات رونویسی ژن‌های واکنش دفاعی به *A. rabiei* در هر ژنوتیپ باشد. در تحقیقی بیشترین بیان افتراقی در رقم مقاوم ICC3996 در زمان ۶ تا ۱۲ ساعت بعد از مایه‌زنی مشاهده شده است، که نشان دهنده تشخیص سریع‌تر پاتوژن نسبت به رقم حساس FLIP94-508C و Lasseter می‌باشد (۸). مشخص شده است که میزان بیان ژن‌های مرتبط با دفاع در ارقام مقاوم در مقایسه با

گزارشات زیادی در مورد مطالعه مولکولی ژن‌های دفاعی نخود در واکنش به *A. rabiei*، هم به صورت تک ژنی (۶) و هم چند ژنی توسط ریزآرایه cDNA در مقیاس کوچک (۷) و یا qRT-PCR (۲۰) و همچنین ریز آرایه در سطح وسیع (۳۱) وجود دارد که نشان‌دهنده سطوح مختلف بیان ژن در زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی بوده و همچنین نشان می‌دهد که بین ارقام مقاوم و حساس اختلاف در میزان بیان وجود دارد. در تحقیقی مشاهده کردند که cDNA مربوط به ۹۷ ژن گرفته شده از کتابخانه cDNA نخود و خلر زراعی در زمان‌های مختلف به طور متفاوتی بیان می‌شوند. اکثر این

ارقام حساس بیشتر بوده و بنابراین به نظر می‌رسد که این ژن‌ها در ارتباط با مقاومت به قارچ *A. rabiei* می‌باشند (۳۰). تعداد زیادی ژن احتمالی مقاومت به *A. rabiei* در ژنوتیپ‌های مختلف شناخته شده‌اند که در کل نشان می‌دهند مقاومت توسط چندین ژن کنترل می‌شود. در ژنوتیپ‌های حساس ممکن است بیان این ژن‌ها نسبت به ژنوتیپ‌های مقاوم کمتر باشد و یا این که ممکن است دارای آلل‌های مختلفی باشند که بعضی از آنها کم‌تاثیر بوده و یا رقم مقاوم ممکن است دارای یک ژن تنظیمی باشد که این ژن تعداد زیادی از ژن‌های مقاومت را کنترل کند (۸). همچنین ممکن است ژن‌های دفاعی توسط تنظیم‌کننده‌هایی کنترل شوند که با ممانعت از فعالیت ژن‌های بازدارنده دفاع، باعث مقاومت بشوند و یا توسط SiRNA که نقش تنظیمی بیان دارند در سطح خاموشی بعد از رونویسی عمل کنند (۴). مثلاً در رقم حساس نخود افزایش بیان ژن‌های SNKIN2 و PRP ممکن است در غیاب نسخه‌های SiRNA کد شونده توسط آلل‌های حساس صورت گیرد (۸). از دلایل تفاوت بیان ژن‌ها در ژنوتیپ حساس و مقاوم در زمان‌های مختلف، تولید، حذف و یا انتخاب افکتورهای قارچ در جدایه بیماریزا می‌باشد که می‌تواند روی تشخیص پاتوژن اثر بگذارد و این خود می‌تواند مکانیسم‌های دفاعی مختلف گیاه را القاء کند. شناسایی اختلاف بیان آلی میان رقم حساس و مقاوم و نسبتاً مقاوم، می‌تواند در انتخاب ژرم‌پلاسما مقاوم مفید واقع گردد (۲۰). آنالیز الگوی بیانی و مطالعات کمی بیان ژن‌ها می‌تواند در سطح مولکولی به درک واکنش‌های دفاعی کمک کند. مطالعات الگوی بیان دسته‌های تک ژنی نخود می‌تواند به صورت دقیق و کارا، در مورد شناسایی ژن‌هایی که بیان آن‌ها تحت تاثیر پاتوژن تغییر می‌کند و همچنین احتمالاً در مورد نقش آن‌ها در اختیار ما قرار می‌دهد. همچنین نقشه بیانی بعضی از ژن‌ها می‌تواند به عنوان معرف حساسیت یا مقاومت سلول‌ها و بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد (۸). بررسی‌های انجام گرفته نشان می‌دهد که سطوح مختلف بیان ژن در زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی بوده و همچنین نشان داد که بین ارقام مقاوم و حساس اختلاف در میزان بیان وجود داشت. بیشتر تغییرات بیان ژن‌ها در زمان ۱۲ تا ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی صورت گرفت که منعکس کننده زمان نفوذ پاتوژن و فعال شدن آبنش‌های سیگنالی است که باعث واکنش‌های اکسیداتیو، القای HR و سنتز پروتئین‌های ضد قارچی می‌شود (۸). مطالعات دیگر مربوط به بیان ژن‌های القایی پس از آلوده سازی نیز تغییرات سریع بیان ژن در ۴۸ ساعت اول پس از آلوده سازی را نشان داد (۲۳). مطالعات ثابت کرده که سطح بیان ژن‌های مرتبط با دفاع گیاهان در برابر پاتوژن در ارقام مقاوم در مقایسه با ارقام حساس بیشتر می‌باشد و واکنش‌های دفاعی در ارقام حساس نسبت به ارقام مقاوم به کندی عمل می‌کنند (۲۹). به طور کلی نتایج نشان داد که واکنش‌های نخود به *A. rabiei* توسط بیان ژن‌ها در زمان‌های مختلفی بعد از آلودگی، به صورت شبکه پیچیده‌ای صورت می‌گیرد. این تحقیق اطلاعاتی در مورد واکنش دفاعی نخود در مقابل *A. rabiei* به ما داده و این اطلاعات می‌تواند

به درک ما از کنترل مولکولی این بیماری کمک کند. بطور کلی تحقیقات نشان داده است که نخود دارای تعدادی مکانیسم دفاعی بوده که می‌توانند هر زمان در واکنش با آلودگی *A. rabiei* فعال شده و این مکانیسم‌ها باعث مقاومت غیر اختصاصی نژاد شده و تاثیر آنها به صورت تجمعی است (۲۰). در واقع مجموعه‌ای از مکانیسم‌های دفاعی القائی و موجود در مقاومت نخود در برابر قارچ عامل بیماری برق‌زدگی درگیر هستند. مکانیسم‌های مقاومت در هر دو نوع گیاه حساس و مقاوم وجود دارد، ولی سرعت تجمع یا تجزیه ترکیبات دفاعی در انواع مقاوم و حساس با یکدیگر متفاوت است. ممکن است که تجزیه این ترکیبات از طریق مکانیسم سمیت‌زدائی قارچ، بویژه در وارپته‌های حساس و به وسیله نژادهای با شدت بیماریزائی بالا، سریع باشد و کاملاً مشخص شده است که نژادهای *A. rabiei* که دارای شدت مختلف بیماریزائی هستند با وارپته‌های میزبان که سطوح متفاوتی از مقاومت را نشان می‌دهند، رفتار متفاوتی دارند.

**نتیجه گیری کلی:** بیماری برق‌زدگی که به وسیله قارچ *Ascochyta rabiei* [pass] labar ایجاد می‌شود، یکی از محدود کننده‌های کشت و تولید نخود در بیشتر مناطق دنیا و از جمله ایران بشمار می‌رود. برای این که مطالعات بیان ژن دقیق باشد، تهیه آغازگر اختصاصی، طول قطعه مناسب، شرایط بهینه واکنش PCR و انتخاب کنترل داخلی مناسب لازم است. بسیاری از مطالعات مربوط به سازوکارهای دفاعی و تنش در گیاهان بر بیان ژن استوار می‌باشد. در این زمینه مطالعات رونوشت (ترانسکرپتوم) به ارائه درک بهتری از پاسخ‌های تنش گیاه کمک کرده‌اند (۲۴). بیان ژن، نیاز به سنجش همزمان ژن یا ژن‌های مرجع دارد تا اطمینان حاصل شود که هر نوع تغییر در سیستم انتقال پیام ژن هدف، بیانگر تغییر در میزان الگوی بیانی می‌باشد و به تغییرات غلظت RNA نمونه‌ها مربوط نمی‌شود. بررسی نمونه‌های آزمایشی RNA و کنترل خطا بین نمونه‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد، چرا که تنوع بین نمونه‌ها ممکن است در مقدار و کیفیت مواد آغازین، آماده‌سازی RNA، سنتز cDNA و رقیق سازی آن‌ها تفاوت ایجاد کند.

آنالیز کمی QRT-PCR نشان داد که بیماری برق‌زدگی در الگوی بیان ژن‌های درگیر در مقاومت ژنوتیپ‌ها به بیماری برق‌زدگی دخیل بوده و بیان آن‌ها در فرایند پاسخ، به صورت افزایش یا کاهش تغییر یافته است. نتایج این آزمایش نشان داد که میان ژنوتیپ‌های نخود از نظر بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت به بیماری برق‌زدگی در شرایط آلودگی به بیماری برق‌زدگی نسبت به شرایط نرمال تفاوت‌هایی وجود دارد. حساسیت یا مقاومت گیاهان به بیماری‌ها توسط ژنتیک گیاه میزبان و بیمارگر تعیین شده و باعث بروز یک سری دفاع‌های فیزیکی و شیمیایی علیه آلودگی می‌شوند، که این دفاع به صورت فعال و غیر فعال می‌باشد. واکنش‌های دفاعی فعال پس از تشخیص پاتوژن توسط میزبان شروع می‌شود. نخود دارای هر دو نوع دفاع فعال و غیر فعال می‌باشد که باعث جلوگیری از آلودگی اولیه توسط پاتوژن‌ها و حمله موفق به سلول‌های اطراف ناحیه آلوده می‌شود (۸).

## منابع

1. Afzal, R., S.H. Marashi, N. Moshtaghi and H. Kavousi. 2014. Gene expression profiling of chitinase and  $\beta$ -1, 3 glucanase in chickpea infected by *Ascochyta* blight. *Iranian Journal of Pulses Research*, 1: 151-158 (In Persian).
2. Balaji, V., G. Sessa and C.D. Smart. 2011. Silencing of host basal defense response-related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 101: 349-357.
3. Balaji, V. and C.D. Smart. 2012. Over-expression of snakin-2 and extensin-like protein genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *Transgenic Research*, 21: 23-37.
4. Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116: 281-297.
5. Berrocal-Lobo, M., A. Segura, M. Moreno, G. Lopez, F. Garcia-Olmedo and A. Molina. 2002. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiology*, 128: 951-961.
6. Coram, T.E. and E.C. Pang. 2005. Isolation and analysis of candidate ascochyta blight defence genes in chickpea. Part I. Generation and analysis of an expressed sequence tag (EST) library. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(5): 192-200.
7. Coram, T. E. and E.C. Pang. 2005. Isolation and analysis of candidate ascochyta blight defence genes in chickpea. Part II. Microarray expression analysis of putative defence-related ESTs. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(5): 201-210.
8. Coram, T.E. and E.C. Pang. 2006. Expression profiling of chickpea genes differentially regulated during a resistance response to *Ascochyta rabiei*. *Plant Biotechnology Journal*, 4(6): 647-666.
9. Davar, R., R. Darvishzadeh and A. Majd 2013. Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biologia*, 68(5): 821-829.
10. D'Ovidio, R., S. Roberti, M.D. Giovanni, C. Capodicasa, M. Melaragni and L. Sella. 2006. The characterization of the soybean polygalacturonaseinhibiting proteins (Pgip) gene family reveals that a single member is responsible for the activity detected in soybean tissues. *Planta*, 224: 633-645.
11. ICARDA. 2000. Gene-pyramiding to control *Ascochyta* blight of chickpea. in: ICARDA Annual Report. Aleppo, Syria, pp: 45-47.
12. FAO. 2017. FAOSTAT database results from FAO website. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
13. Garcia-Brugger, A., O. Lamotte, E. Vandelle, S. Bourque, D. Lecourieux, B. Poinssot and A. Pugin. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7): 711-724.
14. Graham, J.H. and M.E. Myers. 2011. Soil application of SAR inducers imidacloprid, thiamethoxam, and acibenzolar-S-methyl for citrus canker control in young grapefruit trees. *Plant Disease*, 95(6): 725-728.
15. Hasanian, S., O. Sofalian, N. Zare, A. Tarinejad, M. Davari and A. Pirzad. 2020. Evaluating resistance to *Ascochyta* blight in some chickpea genotypes and its impact on antioxidant enzymes activities, containing of Proline and carbohydrate. *Plant Protection*, 43(2): 19-33 (In Persian).
16. Kanouni, H., A.R. Taleei, R.S. Malhotra, S.A. Peyghambari, S.M. Okhovat and H.G. Khaligh. 2010. Genetics of ascochyta blight resistance in chickpea. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 41 (2): 365-374 (In Persian).
17. Karri, V. and K.P. Bharadwaja. 2013. Tandem combination of *Trigonella foenumgraecum* defensin (Tfgd2) and *Raphanus sativus* antifungal protein (RsAFP2) generates a more potent antifungal protein. *Functional and Integrative Genomics*, 13(4): 435-443.
18. Kaur, J., M. Thokala, A. Robert-Seilaniantz, P. Zhao, H. Peyret, H. Berg and D. Shah. 2012. Subcellular targeting of an evolutionarily conserved plant defensin MtDef4. 2 determines the outcome of plant-pathogen interaction in transgenic *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 13(9): 1032-1046.
19. Kim, J., E. Bortz, H. Zhong, T. Leeuw, E. Leberer, A.K. Vershon and J.P. Hirsch. 2000. Localization and signaling of G(beta) subunit Ste4p are controlled by a factor receptor and the a-specific protein Asg7p. *Molecular Cell Biology*, 20(23): 8826-35
20. Leo, A.E., R. Ford and C.C. Linde. 2016. Genetic homogeneity of a recently introduced pathogen of chickpea, *Ascochyta rabiei*, to Australia. *Biological Invasions*, 17: 609-623.
21. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4): 402-408.
22. Mahdavi Mashaki, K., A.A. Nasrollahnezhad Ghomi, M. Thudi, K. Zaynali Nezhad, A. Yamchi and H. Soltanloo. 2019. Transcription Factors Evaluation in a Transcriptome Analysis on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Under Drought Stress. *Journal of Crop Breeding*, 11(30): 133-141 (In Persian).
23. Moy, P., D. Qutob, B. Chapman, I. Atkinson and M. Gijzen. 2004. Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17: 1051-1062.

24. Nicot, N., J. Hausman, L. Hoffmann and D. Evers. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56 (421): 2907-2914
25. Nürnberg, D., D. Fütterer, F. Niessen, N. Norgaard-Pedersen, C.J. Schubert, R.F. Spielhagen and M. Wahsner. 1995. The depositional environment of the Laptev Sea continental margin: preliminary results from the R/V Polarstern ARK IX-4 cruise. *Polar Research*, 14(1): 43-53.
26. Pande, S., K.H.M. Siddique, G.K. Kishore, B. Bayaa, P.M. Gaur, C.L.L. Gowda, T.W. Bretage and J.H. Crouch. 2005. Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity and disease management. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56: 317-332.
27. Pandey, P., V. Irulappan, M. Bagavathiannan and M. Kumar. 2017. Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physiological traits. *Frontiers in Plant Science*, 8(537): 1-15.
28. Porto, W.F. and O.L. Franco. 2013. Theoretical structural insights into the snakina/gasa family. *Peptides*, 44: 163-167.
29. Rao, L.S., U.P. Ran, P.S. Deshmukh, P.A. Kumar and S.K. Panguluri. 2007. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 1235-1244.
30. Rea, G., O. Metoui, A. Infantino, R. Federico and R. Angelini. 2002. Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiology*, 128: 865-875.
31. Sabokbari Abarghan, M., K. Zaynali Nezhad, E. Ebrahimie and H. Soltanloo. 2020. Identification of Pathways and Candidate Genes Associated with Resistance to Ascochyta Blight in a Mutant Chickpea Variety using RNA-Seq Analysis. *Journal of Crop Breeding*, 12(33): 69-75 (In Persian).
32. Santra, D.K., M. Tekeoglu, M. Ratnaparkhe, W.J. Kaiser and F.J. Muehlbauer. 2000. Identification and mapping of QTLs conferring resistance to *Ascochyta* blight in chickpea. *Crop Science*, 40: 1606-1612.
33. Santra, S., P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç and W. Tan. 2001. Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. *Analytical Chemistry*, 73(20): 4988-4993.
34. Singh, K.B. and M.V. Reddy. 1983. Inheritance of resistance to *Ascochyta* blight in chickpea. *Crop Science*, 23: 9-10.
35. Thakur, M. and B.S. Sohal. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN Biochemistry*, 2013: 1-10.
36. Tekeoglu, M., D.K. Santra, W.J. Kaiser and F.J. Muehlbauer. 2000. Ascochyta blight resistance inheritance in three chickpea recombinant inbred line populations. *Crop Science*, 40: 1251-1256.
37. Tristan, E., T.E. Coram and E.C. Pang. 2005. Isolation and analysis of candidate ascochyta blight defence genes in chickpea. Part II. Microarray expression analysis of putative defence-related ESTs. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66: 201-210.
38. Udupa, S.M., F. Weigand, M.C. Saxena and G. Kahl. 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 299-307.
39. Varshney, R.K., C. Song, R.K. Saxena, S. Azam, S. Yu, A.G. Sharpe and T. Millan. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnology*, 31(3): 240-246.

## Gene Expression Analysis of some Resistance Genes in *Ascochyta* Blight Infected Chickpea (*Cicer arietinum*)

Samira Hasanian<sup>1</sup>, Omid Sofalian<sup>2</sup>, Naser Zare<sup>3</sup>, Alireza Tarinejad<sup>4</sup> and Mahdi Davari<sup>5</sup>

1- PhD Student of Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili

2- Associate professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili (Corresponding author: sofalian@gmail.com)

3- Associate professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili

4- Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Azarbaijan Shahid Madani

5- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili

Received: April 4, 2021

Accepted: May 23, 2021

### Abstract

The fungal disease, ascochyta blight, caused by *Ascochyta rabiei* is a major yield-limiting factor of chickpea (*Cicer arietinum* L.) around the world. A clear understanding of the chickpea defense mechanism against *A. rabiei* is very important for breeding resistant cultivars and better management of this fungal disease. Induced resistance to a pathogen is one of the ways which plants use against biotic stresses. This study was conducted in 2018 as a two-factor factorial experiment (time-genotype) in a completely randomized design with three replications for each of the selected times and the control plant in the laboratory of the Plant Breeding Department of the Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili. In this study, AFP-ca, Protein with leucine zipper, Snakin2, and PGIP genes were selected and plant responses to pathogen were studied in two susceptible and resistant genotypes. The experimental system was conducted in a greenhouse, for both inoculated and mock-inoculated plants a control plant with three technical replicates. RNA extractions from FLIP00-40C (resistant) and FLIP03-135C (sensitive) genotypes were performed using RNX-plus kit at 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours post inoculation (hpi) and also for mock-inoculated plants. The expression of these genes after inoculation by *Ascochyta rabiei* was measured in susceptible and resistant plants via Real-Time PCR. The results showed an increase in the expression level of all genes studied in this research in resistant cultivar compared with susceptible cultivar. Results showed that the candidate gene from the antimicrobial family (AFP-ca) was upregulated in resistant cultivar at early hours after inoculation (6-24 hpi), and also for PGIP from galacturonase-inhibit protein family, the gene was maximally expressed to early hours of inoculation to 48 hpi. In general, it can be concluded that all genes studied in this research contribute to plant-pathogen interactions and all of them may increase the resistance response to *Ascochyta* blight disease.

**Keywords:** Antimicrobial Peptides proteins, Biotic stresses, Chickpea bacterial blight, Defense gene, Quantitative PCR, Real Time PCR