Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Journal of Crop Breeding Vol. 17, Issue 3, 2025 p: 88-99

OPEN ACCESS

Research Paper

Identification and Evaluation of Various Soybean Cultivars, along with an Examination of Biochemical Changes in both their Resistant and Sensitive Cultivars when Interacting with the Fungus *Macrophomina phaseolina*

Seyedeh Fatemeh Jafari Petroudi[1], Mohammad Ali Tajick Ghanbary [2], Valiollah Babaeizad[3], and Valiollah Ghasemi Omran[4]

1- M.Sc., Department of Plant Pathology, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, (Corresponding author: m.tajick@gmail.com)
3- Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
4- Assistant Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Received: 25 January, 2025 Revised: 17 April, 2025 Accepted: 12 May, 2025

Extended Abstract

Background: Soybean (*Glycine max* L.) holds a crucial position as one of the most significant and strategic agricultural products globally. This plant serves a vital purpose in fulfilling human nutritional demands by providing vegetable proteins and edible oils, while also finding extensive use across multiple industries. However, soybean production consistently faces considerable challenges. One of the most serious threats to soybean yields is charcoal rot disease, caused by the fungus *Macrophomina phaseolina*. Losses attributed to this disease can be substantial; in certain instances, the disease has been known to reduce soybean yields by as much as 50%. Managing this disease has involved various strategies, including the implementation of optimal cultivation techniques, seed treatment with fungicides, and the application of biological control methods. However, the results obtained have usually been limited or short-term and have failed to permanently solve the problem. Therefore, one of the essential and key strategies for effectively managing charcoal rot disease is to focus on strengthening the genetic resistance of the host. This strategy not only provides an opportunity to reduce economic losses but also ensures the sustainability of soybean production. This research has been designed and implemented with the overall objective of identifying resistant soybean cultivars, analyzing the key mechanisms of plant resistance, and evaluating the enzymatic activity associated with this resistance.

Methods: Initially, soybean plants showing symptoms of charcoal rot were collected from different fields in Mazandaran Province. The fungal pathogen was then isolated, purified, and identified using both molecular and morphological methods. In the subsequent phase of the study, six commercial soybean cultivars were selected, cultivated, and evaluated to identify resistant and susceptible varieties. Once the seedlings reached the six-leaf stage, they were inoculated with the fungus, and the severity of pathogenicity was assessed 2 weeks later. The selected resistant and susceptible cultivars were re-planted and treated with a suspension of *M. phaseolina* fungal spores at the six-leaf stage. Samples were collected at various time points post-inoculation (0, 24, 48, 72, 96, and 144 hours)., Then, the activities of the enzymes catalase (CAT), peroxidase (POX), and ascorbate peroxidase (APX) were evaluated in prepared plant extracts.

Results: Based on the characteristics of fungal and molecular clones (ITS4/5), the causative isolate was identified as *M. phaseolina*. Screening results among six soybean cultivars revealed that cultivars JK and Sahar exhibited the lowest and the highest levels of contamination, respectively. Consequently, these cultivars were identified as the most resistant and the most sensitive, respectively. The analysis of variance revealed significant differences in the activity levels of the CAT, POX, and APX enzymes across all sources. The analysis of CAT activity showed that the activity level of this enzyme increased gradually in JK and Sahar cultivars, in intervals of 24, 48, and 72 hours after fungal contamination. However, the amount of CAT activity at the peak time in the resistant cultivar JK was about 1.63 times higher than that of the sensitive cultivar Sahar at the same time. The activity of POX also increased in response to fungal contamination in both studied cultivars, namely JK and Sahar. The peak activity of POX was observed in the resistant cultivar JK at 96 hours after infection, which was 5.47 times the activity compared to zero time. On the other hand, the sensitive cultivar Sahar showed its highest activity

Copyright ©2025 Jafari Petroudi et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]

level at 144 hours after contamination, which is 2.85 times the initial level recorded at zero time. The activity of the APX enzyme increased continuously in the resistant cultivar JK 72 hours after being infected with the fungus and then underwent a decrease. The highest level of APX activity in cultivar JK was measured at 72 hours, which was approximately 2.38 times the control level. In the sensitive cultivar Sahar, the activity of this enzyme increased gradually after infection and reached its maximum level at 144 hours after infection, showing an increase of 1.47 times the initial amount recorded at zero time.

Conclusion: The results indicate differences in the performance of antioxidant enzymes between resistant and susceptible cultivars, reflecting varying plant responses to stress caused by the pathogenic fungus. Based on the analyses and findings, the JK cultivar, which exhibits higher activities of CAT, APX, and POX enzymes, has demonstrated superior performance to other soybean genotypes under the conditions of charcoal rot disease; this suggests a greater tolerance of the JK cultivar to the disease. Since no cultivars have been identified as completely resistant to this disease so far, it is possible to identify genotypes that excel in this area by evaluating the activity levels of their enzyme systems and defense mechanisms against the disease. These genotypes can then be recommended as tolerant cultivars for cultivation in infected areas.

Keywords: Charcoal rot, Disease severity, Resistant cultivar

How to Cite This Article: Jafari Petroudi, S. F., Tajick Ghanbary, M. A., Babaeizad, V., & Ghasemi Omran, V. (2025). Identification and Evaluation of Various Soybean Cultivars, along with an Examination of Biochemical Changes in both their Resistant and Sensitive Cultivars when Interacting with the Fungus *Macrophomina phaseolina*. *J Crop Breed,* 17(3), 88-99. DOI: 10.61882/jcb.2024.1599

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

شناسایی و ارزیابی ارقام مختلف سویا و بررسی تغییرات بیوشیمیایی رقم مقاوم و حساس آن‌ها در تعامل با قارچ *Macrophomina phaseolina*

سیده فاطمه جعفری پطرودی[۱]، محمدعلی تاجیک قنبری[۲]، ولی‌اله بابایی‌زاد[۳] و ولی‌اله قاسمی عمران[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، (نویسنده مسوول: m.tajick@gmail.com)
۳- استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۴- استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری تبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۶ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۲
صفحه: ۸۸ تا ۹۹

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: سویا (*Glycine max* L.) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و راهبردی‌ترین محصولات کشاورزی در سطح جهان جایگاه ویژه‌ای دارد. این گیاه نه‌تنها نقش اساسی در تأمین نیازهای غذایی انسان مانند پروتئین‌های گیاهی و روغن‌های خوراکی دارد بلکه در صنایع مختلف نیز کاربردهای گسترده‌ای دارد. با این‌حال، تولید این محصول همواره با محدودیت‌هایی مواجه بوده است. یکی از چالش‌های جدی که تولید سویا را به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد، بیماری پوسیدگی ذغالی است که توسط قارچ *Macrophomina phaseolina* ایجاد می‌شود. خسارات ناشی از این بیماری می‌توانند بسیار قابل‌توجه باشند. در برخی از موارد گزارش شده است که این بیماری باعث کاهش عملکرد تا ۵۰ درصد در مزارع سویا شده است. برای مدیریت این بیماری، تاکنون تلاش‌های گوناگونی از جمله بهره‌گیری از روش‌های بهینه کشت، تیمار بذرها با قارچ‌کش‌ها و کنترل بیولوژیکی مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. با این‌حال، نتایج حاصله معمولاً کوتاه‌مدت بوده‌اند و نتوانسته‌اند به‌طور پایدار مشکل را حل کنند. بنابراین، یکی از راهبردهای ضروری و کلیدی برای مدیریت مؤثر بیماری پوسیدگی ذغالی، تمرکز بر تقویت مقاومت ژنتیکی میزبان است. این استراتژی نه‌تنها امکان کاهش خسارات اقتصادی را فراهم می‌آورد، بلکه پایداری تولید سویا را نیز تضمین می‌کند. این پژوهش با هدف جامع شناسایی ارقام مقاوم سویا، تحلیل دقیق سازوکارهای کلیدی مقاومت گیاه و ارزیابی فعالیت آنزیمی مرتبط با این مقاومت طراحی و اجرا شده است.

مواد و روش‌ها: ابتدا، نمونه‌برداری از گیاهان دارای علائم پوسیدگی ذغالی از مزارع مختلف سویا در استان مازندران انجام شد. سپس قارچ عامل بیماری جداسازی و خالص‌سازی گردید و از طریق روش‌های مولکولی و مورفولوژیکی شناسایی شد. در مرحله بعدی پژوهش، شش رقم تجاری سویا برای پیدا کردن رقم مقاوم و حساس تهیه و کشت شدند و پس از رسیدن به مرحله شش‌برگی، گیاهچه‌ها به قارچ آلوده شدند و میزان شدت بیماری‌زایی پس از دو هفته بررسی شد. در نتیجه، ارقام مقاوم و حساس شناسایی و برای مراحل بعدی انتخاب گردیدند. ارقام منتخب مقاوم و حساس دوباره کشت شدند و پس از تیمار با در مرحله شش‌برگی با سوسپانسیون اسپور قارچ *M. phaseolina*، نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف پس از آلودگی (۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت) انجام گردید. عصاره‌های گیاهی استخراج و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس ویژگی‌های پرگنه‌های قارچی و مولکولی (ITS4/5)، جدایه عامل بیماری به‌عنوان قارچ *M. phaseolina* شناسایی شد. بر اساس نتایج غربالگری انجام شده میان شش رقم سویا، رقم JK کمترین میزان آلودگی و رقم Sahar بیشترین میزان آلودگی را نشان دادند؛ بنابراین، این ارقام به‌ترتیب به‌عنوان مقاوم‌ترین و حساس‌ترین ارقام شناخته شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های CAT، POX و APX در تمامی منابع تغییرات معنی‌داری داشت. بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که در ارقام JK و Sahar، پس از آلودگی قارچی، میزان فعالیت این آنزیم به‌طور تدریجی در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از بروز آلودگی افزایش یافت. با این‌حال، میزان فعالیت کاتالاز در زمان اوج در رقم مقاوم JK حدود ۱/۶۳ برابر بیشتر از رقم حساس Sahar در زمان مشابه بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز در واکنش به آلودگی ناشی از قارچ در هر دو رقم مورد بررسی، یعنی JK و Sahar، افزایش یافت. اوج فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم مقاوم JK در ۹۶ ساعت پس از آلودگی مشاهده گردید که این میزان، ۵/۴۷ برابر فعالیت نسبت به زمان صفر بود. در مقابل، رقم حساس Sahar بیشترین سطح فعالیت خود را در ۱۴۴ ساعت پس از آلودگی نشان داد که این سطح، ۲/۸۵ برابر میزان اولیه در زمان صفر ثبت شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم مقاوم JK پس از آلودگی به قارچ تا ۷۲ ساعت به‌طور مستمر افزایش یافت و سپس روندی کاهشی را طی کرد. بالاترین سطح فعالیت آنزیم در رقم JK مربوط به ۷۲ ساعت بود که تقریباً ۲/۳۸ برابر میزان شاهد اندازه‌گیری شد اما در رقم حساس Sahar، فعالیت این آنزیم به‌صورت تدریجی پس از آلودگی افزایش یافت و حداکثر سطح خود را در ۱۴۴ ساعت پس از آلودگی نشان داد که معادل ۱/۴۷ برابر میزان اولیه در زمان صفر ثبت گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از تفاوت‌های عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی میان ارقام مقاوم و حساس هستند که واکنش‌های متفاوت گیاه را در برابر تنش ناشی از قارچ عامل بیماری نشان می‌دهند. بر اساس تحلیل‌های انجام‌شده و یافته‌های به‌دست‌آمده، رقم JK با فعالیت بالاتر آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز، در شرایط بیماری پوسیدگی ذغالی عملکرد بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌های سویا نشان داد، که نشانه‌ای از تحمل بیشتر این رقم در برابر بیماری مذکور است. با توجه به این که تاکنون هیچ رقم کاملاً مقاومی نسبت به این بیماری شناسایی نشده است، می‌توان با ارزیابی سطح فعالیت سیستم آنزیمی و سازوکارهای دفاعی در برابر این بیماری، ژنوتیپ‌هایی را که در این زمینه برتری دارند شناسایی کرد و به‌عنوان ارقام متحمل برای کشت در مناطق آلوده توصیه نمود.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی ذغالی، شدت بیماری، فعالیت آنزیمی

مقدمه

سویا (*Glycine max* L.) از دیرباز جزء مهمی از رژیم غذایی بسیاری از کشورها بوده است و امروزه به‌عنوان یک محصول استراتژیک، علاوه بر تأمین نیازهای غذایی متنوع، کاربردهای صنعتی زیادی نیز دارد. حدود ۹۸ درصد از کنجاله سویا به‌دلیل پروتئین بالا برای تغذیه آبزیان و دام استفاده می‌شود و با محتویاتی بین ۳۸ تا ۴۴ درصد روغن سویا در صنعت برای تولید محصولاتی مانند جوهر چاپ، صابون، حشره‌کش‌ها، رنگ‌ها، لینولئوم و مواد ضدعفونی کننده استفاده می‌شود (Zeffa *et*

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]

al., 2020). یکی از عوامل مهم کاهش تولید سویا، بیماری‌های قارچی هستند که سالانه به بیش از ۱۲۵ میلیون تن محصولات اساسی آسیب می‌زنند (Castaño-Miquel *et al*., 2017). قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid نکروتروف و از نظر اقتصادی مهم است که باعث بروز بیماری خاکزاد و بذرزاد به‌نام پوسیدگی ذغالی یا پوسیدگی خشک ریشه در سویا می‌شود. این بیماری می‌تواند عملکرد سالانه را تا ۵۰ درصد کاهش دهد (Coser *et al*., 2017). گیاهان دارای آلودگی شدید به‌دلیل تولید سموم زیاد دچار مرگ زودرس می‌شوند. قارچ عامل بیماری در خاک و روی بقایای سویا به‌صورت سختینه‌های (اسکلروت) سیاه رنگ باقی می‌ماند. این سختینه‌ها در طول فصل زمستان بر اثر پوسیده شدن بقایای سویا و شخم بهاره، در داخل خاک مزارع پخش می‌شوند و منبع آلودگی اولیه به‌شمار می‌آیند. آلودگی اولیه بیماری در مرحله گیاهچه اتفاق می‌افتد و معمولاً به‌صورت پنهان باقی مانده، علائم آن در اواسط تابستان در شرایط دمایی بالای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت پایین خاک ظاهر می‌شوند (Bhattacharya *et al*., 1994). همچنین این قارچ بر حدود ۵۰۰ گونه گیاهی، به‌ویژه در مناطق خشک اثر می‌گذارد (Venugopala *et al*., 2013). گیاهان آلوده باقیمانده در خاک محیطی را برای پاتوژن *M. phaseolina* فراهم می‌کنند که در ادامه دانه‌ها و ریشه‌های محصولات بعدی را آلوده می‌کند (Mufti & Bano, 2019). میسلیوم قارچ از لایه اپیدرم وارد گیاه سویا می‌شود و با گذر زمان قارچ در بافت‌های آلوده، میکرواسکلروت‌های سیاه‌رنگی تولید می‌کند که باعث ایجاد ظاهری تیره در این بخش‌ها می‌شود. به‌همین دلیل، این بیماری به‌نام پوسیدگی ذغالی شناخته شده است. افزایش دمای خاک و رطوبت کم خاک باعث افزایش رشد*M. phaseolina* می‌شود (Coser *et al*., 2017). نشانه‌های این بیماری در گیاهان جوان شامل لکه‌های سیاه و نامنظمی است که از پایه لپه‌ها آغاز و به ساقه‌ها گسترده می‌شوند. گیاهان بالغ دچار پژمردگی می‌شوند و سیستم آوندی به‌دلیل تولید میکرواسکلروت تیره یا خاکستری می‌گردد. همچنین، لکه‌های تیره و کشیده بر روی برگ‌های بالغ پدیدار می‌شوند. این قارچ باعث آلودگی و سیاهی ساقه می‌شود و تعداد زیادی اسکلروت‌های ریز درون ساقه ایجاد می‌کند که به سیاه و پوک شدن ساقه منجر می‌شود (Jardine & Pearson, 1987).

استفاده از روش‌های مختلف برای مقابله با پوسیدگی ذغالی در سویا، از جمله روش‌های کشت، تیمار بذر با قارچ‌کش و کنترل بیولوژیکی، تاکنون نتایج محدودی به‌همراه داشته است (Hartman *et al*., 2015). اگرچه قارچ‌کش‌ها می‌توانند تا حدی مؤثر باشند، اما هزینه بالا، اثرات زیست‌محیطی منفی و احتمال مقاومت قارچ‌ها، استفاده از آنها را محدود کرده است؛ همچنین این مواد می‌توانند به زنجیره غذایی وارد شوند و برای سلامت انسان و محیط زیست مضر باشند (Kannojia *et al*., 2019). در این میان، کنترل بیولوژیکی و استفاده از عصاره‌های گیاهی به‌عنوان جایگزین‌های بالقوه مورد توجه قرار گرفته‌اند. ترکیب این عوامل با قارچ‌کش‌های شیمیایی در شرایط آزمایشگاهی توانسته است کنترل بهتری بر بیماری فراهم کند. با این‌حال، محصولات کنترل زیستی هنوز به‌صورت تجاری در دسترس نیستند و نیاز به تحقیقات بیشتر و ارزیابی در شرایط واقعی دارند (Kumari *et al*., 2012; Fuhlbohm *et al*., 2013). استفاده از مقاومت میزبان به‌عنوان یکی از راهکارهای اساسی مدیریت بیماری *M. phaseolina* در گیاهان، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Mengistu *et al*., 2007). اگرچه تاکنون مقاومت کامل به این بیماری شناسایی نشده است، اما برخی گیاهان مانند سویا مقاومت نسبی از خود نشان داده‌اند که می‌تواند در کاهش خسارات مؤثر باشد (Pawlowski *et al*., 2015). انتخاب و کشت ارقام متحمل یکی از روش‌های کارآمد در این زمینه است (Romero-Luna *et al*., 2017). در سال‌های اخیر، مطالعه مکانیزم‌های دفاعی گیاهان و واکنش‌های بیوشیمیایی آن‌ها به عوامل بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته است. گیاهان با شناسایی و واکنش به این عوامل، از گسترش آن‌ها جلوگیری می‌کنند. بررسی تغییرات آنزیمی و شاخص‌های بیوشیمیایی مرتبط با پاسخ گیاه به تنش‌ها، ابزار ارزشمندی برای شناسایی ارقام متحمل فراهم می‌آورد (Kumari *et al*., 2015). استفاده از ارقام مقاوم نه‌تنها مصرف سموم کشاورزی را کاهش می‌دهد، بلکه به‌دلیل کاهش هزینه‌ها و اثرات زیست‌محیطی، به‌عنوان روشی اقتصادی و پایدار در مدیریت بیماری‌های گیاهی شناخته می‌شود. این رویکرد می‌تواند گامی مؤثر در جهت کشاورزی پایدار و حفاظت از محیط زیست باشد.

این پژوهش با هدف شناسایی ارقام مقاوم و بررسی مکانیسم‌های مقاومتی و تحلیل فعالیت‌های آنزیمی ارقام سویا و کاهش خسارات ناشی از بیماری پوسیدگی ذغالی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۴ و در آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی انجام گرفت.

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌برداری از مناطق کشت سویا در استان مازندران، شامل شهرستان‌های آمل، بابلسر، جویبار، قائمشهر، ساری و بهشهر صورت گرفت. در این فرآیند، از گیاهانی که علائم پوسیدگی ذغالی در ناحیه طوقه داشتند، نمونه‌گیری شد. سپس، این نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفتند و برای جداسازی و خالص‌سازی قارچ به آزمایشگاه قارچ‌شناسی منتقل شدند.

جداسازی و خالص‌سازی قارچ

از حاشیه‌های آلوده، قطعاتی به ابعاد یک تا دو سانتی‌متر جدا شدند. این قطعات ابتدا با محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی و پس از دو بار شستشو با آب مقطر استریل با کاغذ صافی خشک شدند. این قطعات درون پتری‌دیش‌های حاوی آب آگار قرار گرفتند و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. پس از رشد، خالص‌سازی بیمارگر به‌روش نوک هیف انجام گرفت و کشت‌های جدید نیز در همان دما در انکوباتور حفظ شدند. برای نگهداری طولانی‌مدت جدایه‌های قارچ، آن‌ها به لوله‌های

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]
[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]

آزمایش حاوی سیب‌زمینی دکستروز و آگار منتقل و پس از رشد قارچ‌ها، لوله‌ها در یخچال ذخیره شدند

شناسایی قارچ

برای شناسایی بیمارگر، از ویژگی‌های ریخت‌شناسی میسلیوم و اسپور و همچنین از روش‌های مولکولی استفاده شد.

شناسایی مولکولی

استخراج DNA

به‌منظور استخراج DNA به‌روش راپلی (Rapley, 2000)، ابتدا یک قرص پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های سه تا چهار روزه در محیط PDA برداشت و در محیط کشت مایع PDB (Potato Dextrose Broth) قرار داده شد که به‌مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با سرعت۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. توده میسلیوم قارچ در هاون توسط ازت مایع پودر گردید. پودر حاصله در CTAB (W/V) ۲٪، NaCl ۱/۴ M، ۱۰۰ mM Tris-HCl با pH=8 و ۲۰ mM EDTA) در دمای ۶۵ درجه سلسیوس مخلوط شد. یک میکرولیتر 2-Mercaptoethanol افزوده شد و پس از ورتکس به مدت ۴۵ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. قبل از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه هم حجم با مخلوط، کلروفرم–ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴:۱ اضافه گردید. سپس فاز رویی محتوی DNA برداشته شد که بعد از اضافه کردن هم‌حجم ایزوپروپانول خنک (۲۰- درجه سلسیوس) به‌مدت ۱۵دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و در نهایت، پس از رسوب DNA فاز مایع تخلیه و رسوب حاصله با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد. بعد از خشک کردن رسوب DNA در دمای محیط به هر ویال۷۰ میکرولیتر بافر TE استریل اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در یخچال به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شد. برای تعیین درجه خلوص DNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

تکثیر با PCR و توالی‌یابی

تکثیر کامل نواحی *ITS4*، 5.8s، *ITS5* از ژن‌های rDNA با استفاده از پرایمر *ITS5* (5· *GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3)* و *ITS4* (5· *TCCTCCGCTTATTGATATGC3*) (White *et al*., 1990) انجام شد. واکنش PCR در مخلوط ۲۵ µl آماده شد و تکثیر در دستگاه در دستگاه ترموسایکلر (Bio RAD) با واسرشتگی اولیه به‌مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ °C، واسرشتگی به‌مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ °C، اتصال، یک دقیقه در دمای ۶۰ °C، گسترش یک دقیقه در دمای ۷۲ °C، و گسترش نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C به تعداد ۳۵ سیکل صورت گرفت. ارزیابی محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE1X صورت گرفت و الکتروفورز در ولتاژ ۶۰ ولت انجام گردید. از نشانگر با وزن مولکولی ۱kb(-DNA SM0311 Ladder) استفاده شد. ژل در اتیدیوم بروماید (۵۰µg/ml) به‌مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از شستشو با آب مقطر با UV دستگاه ژل‌خوان کداک (GEL LOGIC 200) از آن عکسبرداری شد. محصولات در جهت فوروارد توسط شرکت BIONEER کره توالی‌یابی شدند. توالی‌های به‌دست آمده ابتدا با استفاده از نرم‌افزار BioEdit اصلاح و سپس با استفاده از نرم‌افزار Blastn(NCBI) با توالی‌های موجود در بانک ژن همردیف شدند.

تیمار آزمایشی

مطالعه حاضر بر اساس آزمایش فاکتوریل (فاکتور اول رقم در دو سطح و فاکتور دوم زمان در هفت سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. نتایج مقایسه میانگین آنزیم‌ها و ضریب آلودگی بر اساس آزمون LSD در سطح ۰/۰۱ درصد توسط نرم‌افزار آماری SAS 9.1 انجام گرفتند. نمودارهای میزان فعالیت آنزیم‌ها و ضریب آلودگی با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم گردیدند.

تهیه بذر

برای انجام این تحقیق، شش رقم تجاری سویا شامل Sahar، Hill، 032، Jk، Wayne و Dorman از شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی تکاتو تهیه شدند.

تولید گیاهچه

ابتدا بذور با اتانول ۷۶ درصد به‌مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به‌مدت ۳ دقیقه شستشو داده شدند. سپس برای جوانه‌زنی، بذور بر روی کاغذ صافی مرطوب در پتری‌دیش‌های استریل قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت، بذور جوانه‌زده به گلدان‌هایی با خاک استریل منتقل و گلدان‌ها به اتاقک رشد با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰ درصد به‌مدت دو هفته منتقل شدند.

بررسی شدت بیماری‌زایی *M. phaseolina*

برای تهیه زادمایه قارچ، چوب‌های خلال دندان قطعه قطعه و اتوکلاو شدند و سپس این قطعات به درون پتری حاوی کشت تازه بیمارگر انتقال داده شدند. پتری‌ها تا زمان ظهور کلنیزه و میکرواسکلروت‌های قارچ در سطح آن‌ها در دمای۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس، شکاف کوچک و ظریفی در ساقه گیاه با استفاده از اسکالپل ایجاد گردید. به‌کمک پنس یک قطعه کلنیزه شده، حامل میکرواسکلروت‌های بیمارگر به داخل ساقه هدایت گردید و دور محل مایه‌زنی کاملاً با پارافیلم پوشانده شد. تیمار شاهد با قطعه غیر آلوده مایه‌زنی گردید. طول زخم ایجاد شده در ساقه هریک از ارقام ۲ هفته بعد از مایه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت.

مایه‌زنی بیمارگر و نمونه‌گیری از گیاهچه‌های سویا

جهت مایه‌زنی عامل بیماری بر روی گیاهچه‌های سویا، قارچ *M. phaseolina* کشت داده شد. بعد از رشد کافی، به پتری‌های مذکور آب مقطر استریل همراه با توئین۲۰ (یک در هزار) اضافه گردید و سوسپانسیون با غلظت $۱/۲×۱۰^{۴}$ اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد و بر روی گیاهچه‌های ۱۴روزه سویا (رقم‌های JK و Sahar) تزریق گردید. نمونه‌گیری در فواصل زمانی صفر پیش از مایه‌زنی و ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت پس از تلقیح انجام گرفت. به این‌منظور، نمونه‌های برگی با استفاده از تیغ استریل در فواصل زمانی مذکور از گیاهچه‌ها بریده شدند و پس از انتقال به لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری فالکون، به‌سرعت در ازت مایع فرو برده، سپس به فریزر با دمای۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]
[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]

استخراج عصاره برگ

ابتدا نمونه‌ها در ازت مایع پودر شدند، و سپس ۰/۱ گرم بافت پودر شده با ۱/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH ۶/۸) با استفاده از دستگاه ورتکس به خوبی مخلوط گردید. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ، فازهای بالایی به‌عنوان عصاره جدا و به ویال جدیدی انتقال، و سپس برای نگهداری به فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

اندازه‌گیری پروتئین کل

۲۰ میکرولیتر عصاره برگی در ۸۰ میکرولیتر بافر استخراج رقیق گردید، ۵ میلی‌لیتر معرف کوماکسی بلو تازه به آن افزوده شد و ۲ دقیقه به‌هم زده شد. پس از ۵ دقیقه، میزان جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CA)

به ۲۵ میکرولیتر عصاره برگی، ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار) حاوی H_2O_2 (۵ میلی‌مولار) اضافه شد. سپس چند بار محلول به آرامی invert گردید و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد (Aebi, 1984).

سنجش فعالیت پراکسیداز (POX)

۳۳ میکرولیتر از عصاره برگی با یک میلی‌لیتر از محلول پراکسیداز که شامل ۱۳ میلی‌مولار گایاکول، ۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH= ۷) بود مخلوط گردید و جذب آن به‌مدت یک دقیقه با فواصل ۱۰ ثانیه در طول موج ۴۷۰ nm توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد (Tang & Newton, 2005).

سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX)

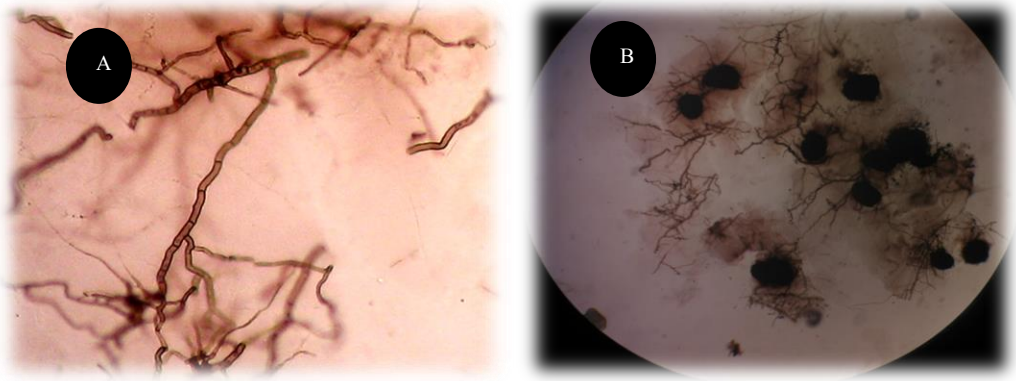
۵۰ میکرولیتر از عصاره برگی با یک میلی‌لیتر محلول اسکوربیک پراکسیداز که شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH= ۷)، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۵ میلی‌مولار اسید اسکوربیک (ASA) و ۰/۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) بود مخلوط گردید. سپس، جذب آن در طول موج ۲۹۰nm بعد از مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Yoshimura *et al*., 2000).

نتایج و بحث

مشخصات قارچ عامل بیماری

روش مورفولوژیکی

جدایه‌های به‌دست آمده از گیاهان آلوده سویا در مناطق مختلف استان مازندران پرگنه‌هایی را به‌رنگ سفید شیری تا خاکستری کم‌رنگ تولید نمودند. پس از مدتی، زمینه قهوه‌ای کم‌رنگ پرگنه‌ها از پشت پتری قابل رویت گردید و سپس اسکلروت‌های سیاه‌رنگ در سطح پرگنه‌ها تشکیل شدند. هیف‌ها برحسب اندازه سلول‌های تشکیل‌دهنده دارای اندازه‌های متفاوتی بودند. ریسه جوان دارای سیتوپلاسم دانه‌دار بود که با افزایش سن ریسه حفره‌دار می‌گردید. هیف‌های بزرگ‌تر در محل دیواره عرضی باریک شدند و ریسه حالت بندبند پیدا کرد (شکل ۱). متوسط رشد روزانه در محیط غذایی سیب‌زمینی – دکستروز – آگار و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، ۱/۵ سانتی‌متر بود که در ۷۲ ساعت کل سطح پتری را پوشاند (شکل ۱). بر اساس مشخصات به‌دست آمده از پرگنه‌های قارچی جدایه‌ها، همگی قارچ *M. phaseolina* شناسایی شدند (Sinclair & Backman, 1989).



شکل ۱- a) ریسه، b) میکرواسکلروت‌های قارچ *M. phaseolina*
Figure 1. a) Hyphae, b) Microsclerotia of the fungus *M. phaseolina*

روش مولکولی

جدایه مورد نظر با استفاده از ITS ارزیابی شد. محصول PCR حاصل از پرایمرهای ITS4 و ITS5 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حضور یک بانـد DNA در محدوده ۶۰۰ تا ۸۰۰ جفت‌بازی را برای جدایه‌نشان داد. توالی نوکلئوتیدی به‌دست آمده برای شناسایی مولکولی در بانک ژن تطبیق داده شد و شباهت ۹۸ تا ۱۰۰ درصدی با گونه *M. phaseolina* را نشان داد که شناسایی مورفولوژیک را تأیید کرد. در پژوهش آلمومانی و همکاران (Almomani *et al.,* 2013) نشان داده شد که ناحیه ITS توانایی خوبی در شناسایی قارچ *M. phaseolina* داشت.

غربالگری ارقام سویا

بر اساس نمودارهای موجود، در میان ارقام تجاری سویا، رقم Jk کمترین میزان آلودگی و رقم Sahar بیشترین میزان آلودگی را نشان دادند؛ به‌همین دلیل، به‌ترتیب به‌عنوان ارقام مقاوم و حساس شناخته شدند (شکل ۲). در مطالعات انجام‌شده توسط

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]
[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]

رعیت‌پناه و همکاران (Rayatpanah *et al*., 2002)، لاین‌های JK-695، B.P-692 و KS-69035 نیز کمترین آلودگی را نشان دادند.

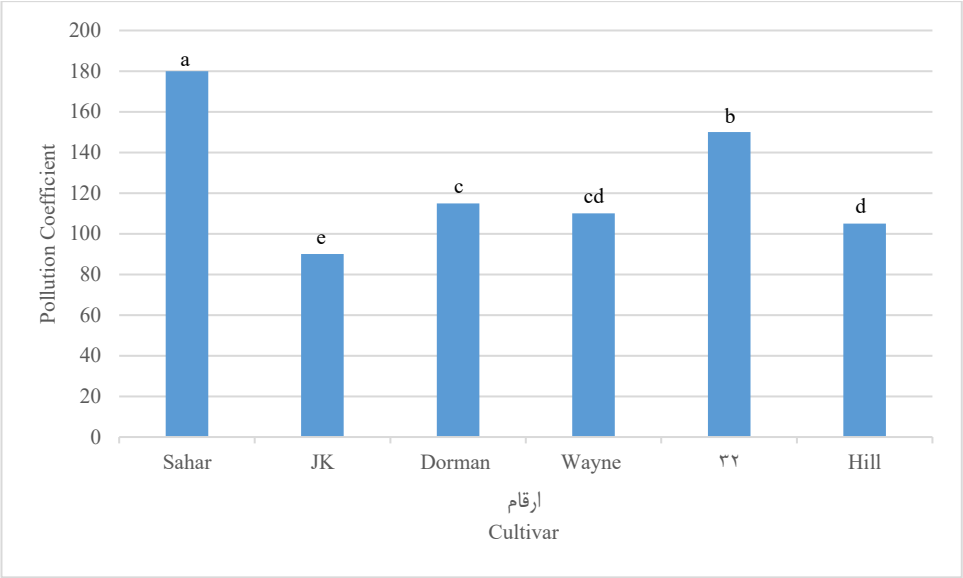
جدول ۱- تجزیه واریانس شدت بیماری گیاه سویا در پاسخ به قارچ *M. phaseolina*

Table 1. Analysis of variance for the disease severity of soybean seedlings in response to *M. phaseolina*

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square شدت بیماری Severity of disease
تیمار Treatment	5	3360.00**
خطای آزمایش Experimental error	16	11.66
ضریب تغییرات CV		2.73

**: معنی‌داری در سطح یک درصد

**Significance at the 1% level



شکل ۲- مقایسه میانگین ارقام مورد استفاده و ضریب آلودگی آن‌ها

Figure 2. Comparisons of the mean cultivars used and their corresponding contamination coefficients

بررسی فعالیت آنزیمی

گیاهان در مواجهه با میکروارگانیسم‌ها و عوامل تنش‌زا، آنزیم‌ها و ترکیبات دفاعی خود را فعال می‌کنند. القائ مقاومت با افزایش و سنتز برخی از مواد شیمیایی است که طی یکسری از واکنش‌های پیچیده در گیاه میزبان صورت می‌گیرد. برای مثال غلظت بالا و سمی رادیکال‌های فعال اکسیژن باعث آسیب به ساختارهای پروتئینی متعدد شده و تداوم این وقایع ممکن است منجر به مرگ سلولی شود (Kar, 2011). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم دفاعی با کارایی بالایی هستند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین ببرد و یا خنثی کنند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن در غلظت‌های بالا موجب تخریب مولکول‌های حیاتی سلول مانند DNA، پروتئین و غشای لیپیدی می‌شوند (Kanazawa *et al*., 2000). برای خنثی نمودن اثرات سمی و مخرب ROS، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی که در سلول‌های گیاه وجود دارد، بالا می‌رود و میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌وسیله سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی تنظیم می‌شود (Gechev *et al*., 2002). این سیستم دفاعی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پراکسیداز (POX) است و سیستم غیرآنزیمی شامل آسکوربات، توکوفرول، کاروتنوئیدها و ترکیبات متفرقه (از جمله فلاونوئیدها، مانیتول‌ها و پلی‌فن‌ها) هستند (Blokhina *et al*., 2003).

تجزیه واریانس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی صورت گرفت. نتایج (جدول ۲) نشان می‌دهند که در تمامی منابع تغییرات، میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، POX و APX معنی‌دار بوده است.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]
[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]

جدول ۲- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های اندازه‌گیری‌شده در آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی

Table 2. Analysis of variance for enzyme activities measured in the factorial experiment in the form of a completely randomized design

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square		
		CAT	POX	APX
رقم Cultivar	1	3235.78**	10948.73**	2446.63**
زمان Time	6	538.27**	11740.59**	359.09**
رقم × زمان Time × Cultivar	6	103.46**	1590.54**	139.72**
خطای آزمایش Error	28	1.09	0.45	0.12
ضریب تغییرات Coefficient of variation		2.42	0.71	0.92

**: معنی‌داری در سطح یک درصد

**Significance at the 1% level

بررسی الگوی تغییرات فعالیت آنزیم CAT در ارقام Sahar و JK در تعامل با قارچ *M. phaseolina*

کاتالاز یک آنزیم تترامریک حاوی آهن است که تبدیل H_2O_2 به H_2O و O_2 را کاتالیز می‌کند. بنابراین، گیاه را در برابر پراکسیداسیون غشا و آسیب‌های اکسیداتیو در هنگام حمله بیمارگرها محافظت می‌کند و نه‌تنها در متابولیسم و دفاع گیاه بلکه در درک سیگنال نیز نقش دارد (Liu *et al*., 2015). کاتالاز موضعی است و به‌طور عمده در پراکسی زوم‌ها وجود دارد (Su *et al*., 2014).

آنزیم کاتالاز در رقم JK در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی به‌ترتیب ۱/۶۸، ۱/۶۵ و ۲/۳۹ برابر زمان صفر (عنوان شاهد) و در رقم حساس Sahar، نیز فعالیت این آنزیم در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی به‌ترتیب ۱/۰۷، ۱/۱۶ و ۱/۶۰ برابر زمان صفر این رقم بود. اما فعالیت کاتالاز در زمان اوج در رقم JK ۱/۶۳ برابر آن در زمان مشابه در رقم حساس Sahar بود (شکل ۳). یافته‌های ما با مطالعات پیشین همخوانی دارند. افزایش فعالیت کاتالاز در گونه مقاوم *Capsicum annuum* نسبت به گونه حساس آن در برابر پاتوژن *Phytophthora capsici* مشاهده شد (Koc & Üstün, 2012). همچنین، فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام مختلف بعد از آلودگی به *M. phaseolina* بررسی گردید و نشان داده شد که در رقم مقاوم (PJ-1430) میزان فعالیت نسبت به رقم حساس (SU-1080) بیشتر بود (Kumari *et al*., 2015). در پژوهشی، دو رقم برنج شامل رقم مقاوم (خزر) و رقم حساس (طارم محلی) به باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* آلوده شدند. نتایج نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم خزر نسبت به رقم حساس بیشتر بود (Drakhshan *et al*., 2020). نتایج این تحقیق نشان می‌دهندکه آنزیم آنتی‌اکسیدان CAT نقش مؤثری در افزایش مقاومت سویا به بیماری پوسیدگی ذغالی دارد. پس از تلقیح، فعالیت CAT در واریته JK در مقایسه با واریته Sahar بیشتر بود. این افزایش باعث جلوگیری از نفوذ پاتوژن و محدودکردن رشد آن می‌شود و در نهایت مقاومت سویا در برابر *M. phaseolina* را تقویت می‌کند.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) در رقم مقاوم و حساس در تعامل با قارچ *M. phaseolina*

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در پاسخ به آلودگی به قارچ عامل پوسیدگی ذغالی سویا در هر دو رقم Sahar و JK افزایش یافت. در رقم JK، فعالیت آنزیم پراکسیداز در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی به‌ترتیب ۱/۲۱، ۲/۴۱، ۴/۰۰ و ۵/۴۷ برابر زمان صفر به عنوان شاهد بود. اوج فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم JK، ۹۶ ساعت پس از آلودگی بود که میزان آن ۵/۴۷ برابر زمان صفر بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم حساس Sahar نیز پس از آلودگی با قارچ به‌تدریج افزایش یافت و در ۱۴۴ ساعت پس از آلودگی به حداکثر سطح خود رسید که ۲/۸۵ برابر زمان صفر این رقم بود (شکل ۳).

پراکسیدازها از جمله شناخته شده‌ترین پروتئین‌های PR در بافت گیاهان به‌شمار می‌آیند که در پاسخ به آلودگی توسط پاتوژن‌ها فعال می‌شوند. این پروتئین‌ها به دسته PR-protein 9 تعلق دارند (Van Loon, 1997) و با ایجاد موانع ساختاری یا ایجاد محیط‌های سمی از طریق تولید گسترده ROS و RNS، در مهار گسترش عفونت سلولی نقشی اساسی ایفا می‌کنند (Passardi *et al*., 2005). بیان یا فعالیت ژن‌های پراکسیداز در گیاهان پیشرفته، تحت تأثیر عوامل بیماری‌زا همچون قارچ‌ها (Sasaki *et al*. 2004)، باکتری‌ها (Lavania *et al*., 2006)، ویروس‌ها (Díaz-Vivancos *et al*., 2006) و ویروئیدها (Vera *et al*., 1993) قرار می‌گیرد. در فرآیندی اکسیداتیو که با کمک پراکسیداز و مصرف H_2O_2 به‌عنوان اکسیدان صورت می‌پذیرد، پیوند میان مونومرهای فنلی و زیرواحدهای لیگنین شکل می‌گیرد. یکی از واکنش‌های دفاعی کلیدی گیاهان هنگام حمله پاتوژن‌ها، انفجار اکسیداتیو است که به عنوان پاسخی اولیه در سلول‌های گیاهی شناخته شده است (Thakker *et al*., 2013). نتایج تحقیق ما نشان دادند که فعالیت پراکسیداز (POX) در رقم‌های مقاوم بیشتر از رقم‌های حساس بود. این امر حاکی از آن است که این آنزیم با تقویت دیواره سلولی و همچنین سم‌زدایی H_2O_2، موجب افزایش مقاومت گیاه می‌شود. نتایج مشابهی در تحقیقی که بر روی پوسیدگی خاکستری انگور انجام شده بود، گزارش شدند. در این تحقیق، رقم Pingli-5 و رقم Red Globe به ترتیب ارقام مقاوم و حساس مشخص شدند. مطالعات میکروسکوپی نشان دادند که رشد قارچ *Botrytis cinerea* در رقم Pingli-5، ۲۴ ساعت پس از تلقیح متوقف شد، اما چنین کنترلی در Red Globe مشاهده نگردید. در واکنش به آلودگی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در رقم Red Globe تغییر قابل‌توجهی نداشت، در حالی‌که این فعالیت در رقم مقاوم Pingli-5 به‌طور چشمگیری افزایش یافت (Wan *et al*., 2015).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]
[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]

تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) پس از تلقیح قارچ *M. phaseolina* بین دو رقم مقاوم و حساس

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم JK پس از آلودگی به قارچ تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی افزایش سپس کاهش یافت و حداکثر فعالیت در این رقم در ساعت ۷۲ و به‌میزان ۲/۳۸ برابر شاهد بود. اما فعالیت این آنزیم در رقم حساس Sahar، نیز پس از آلودگی به‌تدریج افزایش یافت و در ۱۴۴ ساعت پس از آلودگی به حداکثر سطح خود رسید که ۱/۴۷ برابر زمان صفر این رقم بود (شکل ۳).

آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان عوامل محافظتی در سلول‌ها، نقش حیاتی در پیشگیری از آسیب‌های اکسیداتیو دارند (Dat *et al*., 2000; Halliwell 2006). آنزیم‌های SOD، APX و CAT به‌عنوان عوامل کلیدی در سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شناخته می‌شوند. این آنزیم‌ها با کاهش استرس اکسیداتیو، به تعادل سلولی کمک و از آسیب به ساختارهای داخلی سلول جلوگیری می‌کنند (Apel & Hirt, 2004). در میان این آنزیم‌ها، APX در گیاهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این آنزیم با مهار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) نقش مهمی را در کاهش استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند (Willekens *et al*., 1997). APX دارای ایزوفرم‌های متعددی است که عمدتاً در سیتوزول و کلروپلاست‌ها یافت می‌شوند و برای فعالیت خود نیازمند آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون هستند (Kangasjärvi *et al*., 2008). آنزیم آنتی‌اکسیدانی APX نقش کلیدی در حذف H_2O_2 از سلول‌های گیاهی ایفا می‌کند (Caverzan *et al*., 2012). مطالعه‌ای برای تعیین نقش دفاعی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (POX، CAT، APX و SOD) و ایزوفرم‌های آن‌ها در گونه‌های مختلف فلفل دلمه‌ای شامل هیبرید، دسی، سرانو، پادرون و شهزادی در مقابل بیماری لکه‌ای باکتریایی ناشی از *Xanthomonas* sp. انجام شد و نتایج نشان دادند که بیشترین فعالیت آنزیم‌ها در ارقام مقاوم بود (Ramzan *et al*., 2021). نتایج ما نیز نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم APX در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بود. این افزایش فعالیت به گیاه کمک می‌کند تا با کارایی بیشتری ROSها را خنثی کند و از آسیب‌های سلولی جلوگیری نماید؛ در نتیجه، مانع پیشرفت بیماری گردد.

جدول ۳- مقایسه میانگین بین زمان‌ها در میزان فعالیت‌های آنزیم‌های CAT، POX و APX

Table 3. Comparisons of the average activity levels of CAT, POX, and APX enzymes over time

APX	POX	CAT	زمان Time
23.70^{f}	34.45^{g}	30.80^{f}	0
29.41^{e}	41.28^{f}	42.89^{bc}	24
39.61^{d}	74.31^{e}	43.69^{b}	48
4.23^{a}	110.75^{d}	62.30^{a}	72
42.75^{b}	136.56^{a}	39.69^{e}	96
42.45^{b}	134.79^{b}	40.93^{de}	120
41.20^{c}	129.77^{c}	41.75^{dc}	144

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

The means with the same letters in each column are not significantly different.

جدول ۴- مقایسه میانگین بین رقم‌ها در میزان میزان فعالیت‌های آنزیم‌های CAT، POX و APX

Table 4. Comparisons of the average activity levels of CAT, POX, and APX enzymes among different cultivars

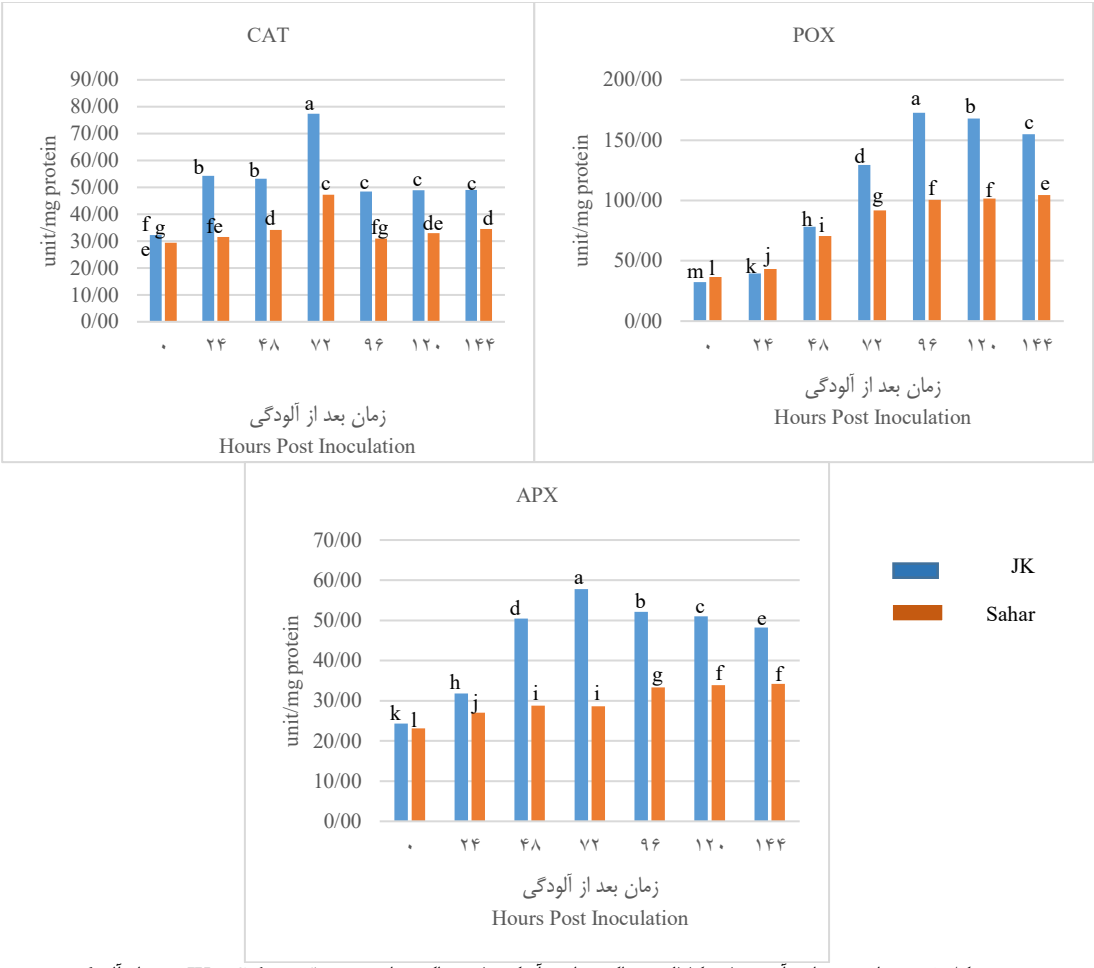
APX	POX	CAT	رقم Cultivar
45.11^{a}	110.68^{a}	51.93^{a}	JK
29.85^{b}	78.39^{b}	34.37^{b}	Sahar

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

The means with the same letters in each column are not significantly different.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]



شکل ۳- میزان تغییرات آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در دو رقم Sahar و JK پس از آلودگی
Figure 3. Changes in catalase, peroxidase, and ascorbate peroxidase enzymes in two cultivars Sahar and JK after inoculation

نتیجه‌گیری کلی

M. phaseolina با تولید آنزیم و توکسین باعث مرگ سلولی در گیاه می‌شود ولی گیاه با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز از مرگ سلولی جلوگیری می‌کند در نتیجه مانع پیشروی قارچ می‌شود. با توجه به بررسی‌های انجام شده و نتایج به‌دست آمده، رقم JK، با داشتن خصوصیات مطلوب‌تر از لحاظ میزان فعالیت آنزیم‌هایی چون کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز، تحت تاثیر بیماری پوسیدگی ذغالی، وضعیت بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌های گیاهی سویا داشت که بیانگر تحمل بیشتر آن نسبت به این بیماری بود. از آنجایی‌که تاکنون رقم کاملاً مقاوم نسبت به این بیماری شناخته نشده است، می‌توان با ارزیابی میزان فعالیت سیستم آنزیمی و همچنین سازوکارهای دفاعی در برابر این بیماری، ژنوتیپ‌هایی را که از این حیث نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتری دارند، شناسایی و به‌عنوان رقم متحمل نسبت به بیماری پوسیدگی ذغالی جهت کشت در مناطق آلوده توصیه نمود.

References

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.

Almomani, F., Alhawatema, M., & Hameed, K. (2013). Detection, identification and morphological characteristic of Macrophomina phaseolina: the charcoal rot disease pathogens isolated from infected plants in Northern Jordan. *Archives of Phytopathology and Plant Protection,* 46(9), 1005-1014. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03055.x

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology,* 55(1), 373-399. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

Bhattacharya, D., Dhar, T. K., Siddiqui, K. A. I., & Ali, E. (1994). Inhibition of seed germination by Macrophomina phaseolina is related to phaseolinone production. *Journal of Applied Microbiology,* 77(2), 129-133. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany,* 91(2), 179-194. DOI: 10.1093/aob/mcf118

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry,* 72(1-2), 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Castaño-Miquel, L., Mas, A., Teixeira, I., Seguí, J., Perearnau, A., Thampi, B. N., ... & Lois, L. M. (2017). SUMOylation inhibition mediated by disruption of SUMO E1-E2 interactions confers plant susceptibility to necrotrophic fungal pathogens. *Molecular Plant,* 10(5), 709-720. DOI: 10.1016/j.molp.2017.01.007

Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology,* 35, 1011-1019. DOI: 10.1590/S1415-47572012000600016

Coser, S. M., Chowda Reddy, R. V., Zhang, J., Mueller, D. S., Mengistu, A., Wise, K. A., ... & Singh, A. K. (2017). Genetic architecture of charcoal rot (Macrophomina phaseolina) resistance in soybean revealed using a diverse panel. *Frontiers in Plant Science,* 8, 1626. DOI: 10.3389/fpls.2017.01626

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E. V. M. M., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS,* 57, 779-795. DOI: 10.1007/s000180050041

Derakhshan, A., Babaeizad, V., Panjekeh, N., & Taheri, A. (2020). Study of biochemical and molecular changes of iranian rice cultivars in interaction with bacterial pathogen Xanthomonas oryzae pv. oryzae causes leaf blight disease. *Journal of Crop Breeding,* 12(36), 77-89. DOI: 10.52547/jcb.12.36.77 [In Persian]

Díaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P. M., Ros Barceló, A., Martínez-Gómez, P., & Hernández, J. A. (2006). The apoplastic antioxidant system in Prunus: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany,* 57(14), 3813-3824. DOI: 10.1093/jxb/erl138

Fuhlbohm, M. J., Ryley, M. J., & Aitken, E. A. B. (2013). Infection of mungbean seed by Macrophomina phaseolina is more likely to result from localized pod infection than from systemic plant infection. *Plant Pathology,* 62(6), 1271-1284. DOI: 10.1111/ppa.12047

Gechev, T. S., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., & Minkov, I. (2002). Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS,* 59, 708-714. DOI: 10.1007/s00018-002-8459-x

Ghorbanipour, A., Rabiei, B., Rahmanpour, S., & Khodaparast, S. A. (2023). Evaluation of Soybean Genotypes Yield and Yield Stability Under Charcoal Rot Disease Conditions using GGE Biplot Method. *Journal of Crop Breeding.* 15(45), 234-242. DOI:10.61186/jcb.15.45.234 [In Persian]

Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology,* 141(2), 312-322. DOI: 10.1104/pp.106.077073

Hartman, G. L., Rupe, J. C., Sikora, E. J., Domier, L. L., Davis, J. A., & Steffey, K. L. (Eds.). (2015). Compendium of soybean diseases and pests (pp. 56-59). St. Paul, MN: American Phytopathological Society. DOI: 10.1104/pp.106.077073

Jardine, D. J., & Pearson, C. A. (1987). Charcoal rot of soybeans. Cooperative Extension Service, Kansas State University.

Kanazawa, S., Sano, S., Koshiba, T., & Ushimaru, T. (2000). Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence. *Physiologia Plantarum,* 109(2), 211-216. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2000.100214.x

Kangasjärvi, S., Lepistö, A., Hännikäinen, K., Piippo, M., Luomala, E. M., Aro, E. M., & Rintamäki, E. (2008). Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochemical Journal,* 412(2), 275-285. DOI: 10.1042/BJ20080030

Kannojia, P., Choudhary, K. K., Srivastava, A. K., & Singh, A. K. (2019). PGPR bioelicitors: induced systemic resistance (ISR) and proteomic perspective on biocontrol. In PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture (pp. 67-84). *Woodhead Publishing.* DOI: 10.1016/B978-0-12-815879-1.00004-5

Kar, R. K. (2011). Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior,* 6(11), 1741-1745. DOI: 10.4161/psb.6.11.17729

Koc, E., & Üstün, A. S. (2012). Influence of *Phytophthora capsici* L. inoculation on disease severity, necrosis length, peroxidase and catalase activity, and phenolic content of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Turkish Journal of Biology,* 36(3), 357-371. DOI: 10.3906/biy-1109-12

Kumari, N., Sharma, I., Alam, A., & Sharma, V. (2015). Oxidative stress and role of antioxidant machinery in two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) to combat the damage induced by Macrophomina phaseolina. *European Journal of Biotechnology and Bioscience,* 3(4), 5-13.

Kumari, R., Shekhawat, K. S., Gupta, R., & Khokhar, M. K. (2012). Integrated management against root-rot of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] incited by Macrophomina phaseolina. *Journal of Plant Pathology and Microbiology,* 3(5), 136. DOI: 10.4172/2157-7471.1000136

Lavania, M., Chauhan, P. S., Chauhan, S. V. S., Singh, H. B., & Nautiyal, C. S. (2006). Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth–promoting rhizobacteria Serratia marcescens NBRI1213. *Current Microbiology,* 52, 363-368. DOI: 10.1007/s00284-005-5578-2

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]

Mengistu, A., Ray, J. D., Smith, J. R., & Paris, R. L. (2007). Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony-forming unit index. *Crop Science,* 47(6), 2453-2461. DOI: 10.2135/cropsci2007.04.0186

Mufti, R., & Bano, A. (2019). PGPR-induced defense responses in the soybean plant against charcoal rot disease. *European Journal of Plant Pathology,* 155, 983-1000. DOI: 10.1007/s10658-019-01828-6

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports,* 24, 255-265. DOI: 10.1007/s00299-005-0972-6

Pawlowski, M. L., Hill, C. B., & Hartman, G. L. (2015). Resistance to charcoal rot identified in ancestral soybean germplasm. *Crop Science,* 55(3), 1230-1235. DOI: 10.2135/cropsci2014.10.0687

Ramzan, M., Sana, S., Javaid, N., Shah, A. A., Ejaz, S., Malik, W. N., ... & Danish, S. (2021). Mitigation of bacterial spot disease induced biotic stress in Capsicum annuum L. cultivars via antioxidant enzymes and isoforms. *Scientific Reports,* 11(1), 9445. DOI: 10.1038/s41598-021-88797-1

Rayatpanah, S., Forotan, A. and oladi, M. (2002). Assessment of the Susceptibility of Common Soybean Cultivars to Charcoal Rot Disease in Mazandaran Province. the Proceeding of the 15th Iranian Plant Protection Congress, Kermanshah, Iran. [In Persian]

Romero Luna, M. P., Mueller, D., Mengistu, A., Singh, A. K., Hartman, G. L., & Wise, K. A. (2017). Advancing our understanding of charcoal rot in soybeans. *Journal of Integrated Pest Management,* 8(1), 8. DOI: 10.1093/jipm/pmw020

Sasaki, K., Iwai, T., Hiraga, S., Kuroda, K., Seo, S., Mitsuhara, I., ... & Ohashi, Y. (2004). Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. *Plant and Cell Physiology,* 45(10), 1442-1452. DOI: 10.1093/pcp/pch165

Sinclair, J. B., & Backman, P. A. (1989). Compendium of soybean diseases. *The American Phytopathological Society,* 30-33.

Su, Y., Guo, J., Ling, H., Chen, S., Wang, S., Xu, L., ... & Que, Y. (2014). Isolation of a novel peroxisomal catalase gene from sugarcane, which is responsive to biotic and abiotic stresses. *PLoS One,* 9(1), e84426. DOI: 10.1371/journal.pone.0084426

Tang, W., & Newton, R. J. (2005). Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry,* 43(8), 760-769. DOI: 10.1016/j.plaphy.2005.05.008

Thakker, J. N., Patel, S., & Dhandhukia, P. C. (2013). Induction of defense-related enzymes in banana plants: effect of live and dead pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense. *International Scholarly Research Notices,* 2013(1), 601303. DOI: 10.5402/2013/601303

Van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology,* 103, 753-765. DOI: 10.1023/A:1008638109140

Venugopala, K. N., Rashmi, V., & Odhav, B. (2013). Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Research International,* 2013(1), 963248. DOI: 10.1155/2013/963248

Vera, P., Tornero, P., & Conejero, V. (1993). Cloning and expression analysis of a viroid-induced peroxidase from tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI,* 6(6), 790-794.

Wan, R., Hou, X., Wang, X., Qu, J., Singer, S. D., Wang, Y., & Wang, X. (2015). Resistance evaluation of Chinese wild Vitis genotypes against Botrytis cinerea and different responses of resistant and susceptible hosts to the infection. *Frontiers in Plant Science,* 6, 854. DOI: 10.3389/fpls.2015.00854

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., ... & Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H2O2 and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal,* 16(16), 4806-4816. DOI: 10.1093/emboj/16.16.4806

Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology,* 123(1), 223-234. DOI: 10.1104/pp.123.1.223

Zeffa, D. M., Fantin, L. H., Koltun, A., de Oliveira, A. L., Nunes, M. P., Canteri, M. G., & Gonçalves, L. S. (2020). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with Bradyrhizobium in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. *PeerJ Journals,* 8, e7905. DOI: 110.7717/peerj.7905

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-06]

[DOI: 10.61882/jcb.2024.1599]