دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی بیان ژن‌های مسوول در دفاع مستقیم و غیرمستقیم علیه کنه تارتن دولکه‌ای *Tetranychus urticae*، در لوبیای سیاه

احمد بوچانی[۱]، زهرا طهماسبی[۲] و مهدی رهایی جهرمی [۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام
۲- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام (نویسنده مسوول: z.tahmasebi@mail.ilam.ac.ir)
۳- استادیار، دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۹

چکیده

ژنوتیپ‌های لوبیا سیاه مقاومت بالائی به آفات و بیماری‌های عمده لوبیا دارند. به‌منظور بررسی نقش چهار تا از ژن‌های موثر در دفاع مستقیم (اثر مستقیم گیاه بر بیولوژی و باروری آفت از طریق سدهای فیزیکی و شیمیایی خود) و یا غیرمستقیم (از طریق جلب دشمنان طبیعی گیاه‌خوار) در لوبیا سیاه در برابر کنه تارتن دولکه‌ای، میزان بیان این ژن‌ها (*os*) β-Ocimen Synthase و (*lox*) Lipoxygenase، Pathogenesis-Related Protein4(*pr4*) (*pr3*)،Pathogenesis-Related Protein3) در دو ژنوتیپ مقاوم لوبیا سیاه (KS۱۱۷۹ و KS ۱۱۱۵ و یک ژنوتیپ حساس شاهد (خمین) قبل و بعد از آلودگی به کنه دولکه‌ای بوسیله تکنیک QRT -PCR مطالعه شد. بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق در همه ژنوتیپ‌های مورد بررسی بیان ژن‌های *pr3* و *pr4* که در دفاع مستقیم نقش دارند، افزایش یافت. هر چند افزایش بیان ژن‌های فوق در ژنوتیپ‌های لوبیای سیاه نسبت به ژنوتیپ خمین با شدت بیشتری بود. بیان ژن *os* که در دفاع غیرمستقیم نقش دارد در یکی از ژنوتیپ‌های لوبیا سیاه (KS۱۱۷۹) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، این در حالی است که بیان این ژن در دیگر ژنوتیپ لوبیای سیاه و لوبیای خمین بعد از آلودگی به کنه تارتن دولکه‌ای تغییری مشاهده نشد. ژن *lox* که هم در دفاع مستقیم و هم در دفاع غیرمستقیم نقش دارد، در هر دو ژنوتیپ لوبیای سیاه بعد از آلودگی افزایش و در لوبیای خمین کاهش بیان معنی‌داری نشان داد. با توجه به اینکه بازدارندگی ژن *lox* اثرات منفی بر دفاع مستقیم و همچنین دفاع غیرمستقیم لوبیا دارد، لذا بر اهمیت مطالعه بیشتر این ژن برای افزایش مقاومت به کنه تارتن دولکه‌ای در لوبیا سیاه تاکید می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: دفاع غیرمستقیم، دفاع مستقیم، لوبیای سیاه، QRT-PCR

مقدمه

یکی از جدی‌ترین آفات لوبیا آفت کنه تارتن دولکه‌ای (*Tetranychus urticae*) است که در بسیاری از مزارع ایران موجب خسارت‌های معنی‌داری به محصولات زراعی می‌گردد. خسارت کمی و کیفی این کنه تا صد در صد بر روی محصول لوبیا مشاهده شده است (۲۶). لوبیا، همچون دیگر گیاهان، روش‌های دفاعی مختلفی برای مقابله با آفات به کار می‌بندد. در یک تقسیم‌بندی روش‌های دفاعی گیاهان به دو گروه دفاع مستقیم و غیرمستقیم تقسیم می‌شوند که در دفاع مستقیم، گیاه خود با استفاده از سدهای فیزیکی و شیمیایی مستقیما اثر منفی بر بیولوژی و باروری آفت می‌گذارد و در نوع دیگر از دفاع، گیاه به‌طور غیرمستقیم و از طریق جلب دشمنان طبیعی آفت موجب کاهش جمعیت آن می‌شود، به این دلیل دفاع غیرمستقیم نامیده است (۲). حدود ۲۰ سال پیش کشف شد (۹،۳۲) که وقتی گیاه‌خواران از گیاه تغذیه می‌کنند، گیاهان ترکیبات فراری تولید می‌کنند که دشمنان طبیعی آن گیاه‌خوار را جلب می‌کنند، بنابراین گیاهان به‌طور غیرمستقیم با افزایش دشمنان طبیعی آن گیاه‌خوار از مدت‌ها است که مورد استفاده قرار گرفته است. ولی با این وجود اصلاح‌گران و متخصصان زراعت تا کنون توجه کمی به بهینه کردن کنترل بیولوژیک داشته‌اند. علت این امر شاید روابط پیچیده حاکم بر دفاع غیرمستقیم باشد. محققان به دنبال درک این اثرات متقابل پیچیده از طریق تولید گیاهان تغییر یافته‌ی ژنتیکی و کاربرد اطلاعات بدست آمده در بهبود کنترل بیولوژیک محصولات کشاورزی می‌باشند. بنابراین ضروری است همچنان که ژرپلاسم‌های گیاهی از لحاظ میزان مقاومت به آفات مورد ارزیابی قرار می‌گیرند از لحاظ میزان جلب دشمنان طبیعی آفات نیز بررسی شوند تا ارقام گیاهی سازگار با کنترل بیولوژیک برای کاربرد در یک برنامه مدیریت تلفیقی آفت انتخاب گردند تا به‌طور موثرتری آفات را کنترل نمود. خود دفاع می‌کنند. لگوم های دانه ای از عمده ترین منابع پروتئینی در مناطق خشک و نیمه خشک جهان محسوب شده و نقش عمده‌ای در اقتصاد این مناطق دارد (۲۸). لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) از مهم‌ترین حبوبات جهان محسوب می‌شود. دانه لوبیا دارای طیف وسیعی از ترکیبات شامل مواد معدنی، ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و ترکیبات شیمیایی دیگر می‌باشد (۱۲). لوبیا سیاه در واقع واریته‌ای از لوبیای معمولی و متعلق به خانواده بقولات است. لوبیا سیاه حاوی طیف گسترده‌ای از فلاونوئیدها، از جمله فلاونول‌ها، گلیکوزیدهای فنولی، آنتوسیانین‌ها، پروآنتوسیانیدین‌ها و ایزوفلاون و همچنین برخی از اسیدهای فنولیک می‌باشد (۱۳). طبق اطلاعات موجود، ژنوتیپ‌های لوبیا سیاه مقاومت بالائی به آفات و بیماری‌های عمده لوبیا دارند (۷،۱۷، ۲۹،۲۴،۲۳،۲۲). لوبیا سیاه حاوی طیف گسترده‌ای از فلاونوئیدها، از جمله فلاونول‌ها، گلیکوزیدهای فنولی، آنتوسیانین‌ها، پروآنتوسیانیدین‌ها و ایزوفلاون و همچنین برخی از اسیدهای فنولیک می‌باشد. یکی از اجزای مهم ژنوتیپ‌های لوبیا سیاه که موجب مقاومت آن‌ها به آفات و

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.35]

بیماری‌ها می‌گردد، تانن است. تانن‌ها جزء متابولیت‌های ثانویه ساخته شده توسط گیاه هستند که ٪ ۱۰–۵ وزن خشک برگ را تشکیل داده و مقدار و کیفیت آن‌ها روی فعالیت‌های بیوشیمیائی گیاه اثر دارد. تانن‌ها می‌توانند از برگ‌ها در مقابل حشرات گیاه‌خوار با ممانعت از آنها یا مسموم کردن آنها دفاع کنند (۱۳). به‌طور متوسط عصاره استخراج شده از پوسته لوبیاه سیاه و قرمز بترتیب با g/g ۰/۱۲۹ و g/g ۰/۱۲۴ بالاترین مقدار را در بین سایر انواع لوبیا دارد (۱۶). مشخص شده که مقاومت بالای لوبیا سیاه به برخی از عوامل بیماری‌زا و آفات به دلیل حضور آلرسین (نوعی تانن) است، که به‌طور انحصاری در حبوبات یافت می‌شود (۲۷). در واقع گیاهان در مواجهه با آفات و بیماری‌ها محتوای تانن و آنتوسیانین خود را افزایش می‌دهند و بدین صورت از خودشان در برابر این عوامل محافظت می‌کنند. تحقیقات نشان داده که دانه‌های غنی از ترکیبات تاننی (پلی فنولیک) یکسری از خصوصیات فیزیولوژیکی همانند آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد جهش‌زایی، فعالیت ضد التهابی و غیره را دارا می‌باشند (۲۵). ایسلم و همکاران (۱۶) در بررسی وابستگی بین تانن‌ها و مقاومت به بیماری در لوبیای معمولی به این نتیجه رسیدند که مقدار تانن در عصاره‌ی پوسته‌ی لوبیا از منبع ژنی آمریکای مرکزی با حساسیت به بیماری آنتراکنوز و بادزدگی (پژمردگی) باکتریایی لوبیا همبستگی مثبت و با میزان خسارت زنجره‌های خانواده‌ی Cicadidae همبستگی منفی دارد. همچنین مقدار تانن در عصاره‌ی پوسته‌ی لوبیا از منبع ژنی آمریکای جنوبی با حساسیت به بیماری لکه‌برگی گوشه‌دار و میزان خسارت این حشرات همبستگی منفی دارد. پس با توجه به اهمیت غذایی بالای این واریته‌ها می‌توان به طور مستقیم آنها را در اختیار زارعین قرار داد و یا اینکه واریته‌های مقاوم لوبیا سیاه می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی مورد استفاده قرار بگیرند. به منظور شناسایی اساس ژنتیکی مقاومت به کنه دولکه‌ای مطالعاتی در زمینه شناسایی ژن‌ها و مسیرهای انتقال پیام درگیر در دفاع مستقیم و غیرمستقیم صورت گرفته است. در لوبیا، تعدادی از ژن‌هایی که در پاسخ به آلودگی کنه دولکه‌ای در گیاه القاء می‌شوند از جمله: ژن‌های Pathogenesis-related Protein2 (*pr2*) (β -1,3-glucanase)، Pathogenesis-Related Protein3 (*pr3*) (کیتیناز)، یک نوع Pathogenesis-Related Protein4 (*pr4*) (کیتیناز)، فنیل آلانین آمینونیالیاز Phenylalanine Ammonia Lyase (*pal*) و فرنزیل پیروفسفات سنتتاز Farnesyl pyrophosphate synthase (*fsp*)، *S*-adenosylmethionine decarboxylase (*samdc*) (۴)، یک مونو ترپن سنتتاز (LjEβos) (۳) و ژن β-Ocimen Synthase در گونه *phaseolus lunatus* (*plos*) (۱)، شناسایی و توالی‌یابی شده‌اند. ولی تاکنون بیان این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های مقاوم لوبیا سیاه مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. بدین منظور در این پژوهش، میزان بیان تعدادی از ژن‌ها که در دفاع مستقیم و یا غیرمستقیم نقش دارند، قبل و بعد از آلودگی به کنه تارتن دولکه‌ای در ژنوتیپ‌های لوبیا سیاه که به‌عنوان مقاوم به کنه شناسایی شده‌اند، مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

دو ژنوتیپ لوبیا سیاه (KS۱۱۱۵ و KS۱۱۷۹) که قبلا به‌عنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌های لوبیا به کنه تارتن دولکه‌ای انتخاب شده بودند (۲۹) به همراه یک ژنوتیپ لوبیای قرمز (شاهد حساس به کنه تارتن دولکه‌ای) (محلی خمین) که بذور آنها از بانک ژن دانشگاه تهران دریافت شده بود، در تابستان ۱۳۹۰ درگلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه ایلام در دمای ۳۴–۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰–۴۰ درصد، کشت و سپس دو تا سه هفته بعد از سبز شدن، نیمی از گلدان‌های هر ژنوتیپ (۳ گلدان) با ۵۰ کنه ماده بالغ در هر برگ آلوده شدند و بقیه گلدان‌ها (۳ گلدان) در شرایط ایزوله و عاری از آفت قرار داده شدند، سه روز بعد از آلودگی RNA کل از برگ‌های گیاهان سالم و آلوده هر ژنوتیپ با استفاده از کیت استخراج RNA با نام پی بایوزول (P-biozol) و بر اساس دستورالعمل ارائه شده در کاتالوگ کیت استخراج شد. پس از استخراج، کمیت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. کیفیت آن نیز با کمک ژل الکتروفورز تایید گردید. سپس نمونه‌های استخراج شده RNA برای زدودن آلودگی‌های احتمالی DNA موجود در آنها با آنزیم DnaseI ((۱u/ µl): ۲ µl) بر اساس دستورالعمل ارائه شده در کاتالوگ آنزیم تیمار گردیدند. سپس µg ۵–۰/۱ از RNA کل (بسته به غلظت مشاهده شده از دستگاه اسپکتروفتومتری حجم مناسب از هر نمونه برداشته شد و پس از رقیق‌سازی و یکسان نمودن غلظت کلیه نمونه از هر نمونه ۱۱µl برداشته شد و سپس با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس Revert Aid M-MULV و Oligo (dt) (مکمل دم پلی A در mRNA) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، cDNA سنتز شد. پس از ساختن DNA مکمل (cDNA)، کمیت آن با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و کیفیت آن با کمک ژل الکتروفورز تایید گردید. ژن‌هایی که میزان بیان آن‌ها در ژنوتیپ‌های مورد نظر مورد مقایسه قرار گرفتند، شامل ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری شامل *pr3* (کیتیناز) و نوع اسیدی *pr4* (کیتیناز)، لیپوکسیژناز (*lox*) (۴) و ژن *os* که کدکننده آنزیم سنتزکننده یکی از مهم‌ترین ترکیبات فرار جلب کننده کنه شکارگر است (E)-β-Ocimene (۳) بود. همچنین جهت تصحیح و تعیین میزان نسبی بیان ژن‌های هدف مورد نظر از ژن مرجع *cons7* که کدکننده متالو پروتئاز می‌باشد استفاده گردید (۲۱). به‌منظور طراحی پرایمر ژن‌های مورد بررسی، توالی محافظت شده آن‌ها از سایت ان سی بی آی http://www.ncbi.nlm.nih.gov گرفته شد (کد شناسایی هر ژن در جدول ۱ آورده شده است) و سپس آغازگرهای مرتبط با این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار پرایمر تری http://frodo.wi.mit.edu/primer3 طراحی شدند. شرایط تعیین شده برای نرم‌افزار پرایمر تری برای طراحی پرایمر به صورت، دمای ذوب آغازگرها ۶۰ درجه سلسیوس، طول قطعه تکثیر شونده bp ۱۶۰–۱۴۰، طول آغازگر bp ۲۳–۱۹ و محتوای گوانین/سیتوزین آنها ٪۶۰–۴۰ بود (۳۱). از آنجائی که اختصاصی عمل نمودن آغازگرها در روش QRT-PCR از

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.35]

اهمیت بالایی برخوردار است، پس از طراحی و سنتز آغازگرها، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استاندارد روی چند نمونه از cDNAهای سنتز شده، استفاده شد و محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز ۱٪ مورد بازبینی قرار گرفت و به دلیل اختصاصی بودن آغازگر، تنها یک باند اختصاصی برای هر ژن در محدوده ۱۶۰-۱۴۰ بازی بر روی ژل دیده شد. برای انجام واکنش QRT-PCR از دستگاه Rotor Gene Q (Rotary) وکیت HOT FIREPOL EvaGreen QPCR Mix Plus (no ROX) خریداری شده از شرکت BioDyne Solis برای ارزیابی کمی استفاده گردید. در ارزیابی بیان ژن‌های مورد مطالعه با QRT PCR سه تکرار تکنیکی برای هر ژن از هر گیاه (گلدان) وجود داشت. اجزای تشکیل دهنده واکنش Real time-PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به صورت ۱ میکرولیتر پرایمر پیشرو، ۱ میکرولیتر پرایمر پسرو، ۴ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر cDNA و ۱۳ میکرولیتر آب بود. موادی که با نسبت‌های بالا برای هر تیوپ با هم ترکیب شده بودند، روی یخ برای انجام PCR به درون دستگاه منتقل شدند. دمای بهینه مراحل مختلف PCR، مطابق با دستورالعمل موجود در کیت (با اندکی تغییر در زمان‌ها) به صورت زیربود:

۱- مرحله واسرشته سازی اولیه: ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سیلسیوس (یک سیکل جهت انکوباسیون اولیه در شروع سیکل QRT PCR)

۲- مرحله واسرشته سازی: ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه سیلسیوس

۳- مرحله اتصال آغازگر: ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سیلسیوس

۴- مرحله تکثیر: ۲۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس (۴۰ مرتبه چرخش بین مراحل ۲ الی ۴)

۵- ۴ درجه سانتی‌گراد (تا زمان خروج از پلیت)

لازم به ذکر است که از سری‌های غلظت نیز به منظور کنترل راندمان واکنش زنجیره‌های پلی‌مراز استفاده گردید. برای تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار REST استفاده شد. نرخ بیان هر ژن (Ratio) در این نرم‌افزار با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{نرخ بیان هر ژن} = \frac{(E_{\text{هدف}})^{\Delta cp_{(\text{آزمایش نمونه}-\text{کنترل نمونه})}}}{(E_{\text{خانه دار}})^{\Delta cp_{(\text{آزمایش نمونه}-\text{کنترل نمونه})\text{خانه دار}}}}$$

در این معادله نسبت سطح بیان یک ژن هدف بر اساس راندمان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (E) برای ژن هدف و مرجع و تفاوت دلتا نقطه تقاطع (Δcp) یک نمونه ناشناخته در مقابل کنترل محاسبه می‌شود. همچنین جهت محاسبه STDEV و TTEST از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

جدول ۱- کد شناسایی و توالی آغازگرهای ژن‌های درگیر در دفاع مستقیم و/ یا غیرمستقیم در برابر کنه دو لکه‌ای

Table 1. Accession number and primer sequences of some genes that is involved in direct and/or indirect defense against two spotted spider mite

کد شناسایی	نام ژن	توالی آغازگر پیشرو	توالی آغازگر پسرو
AW310136	*cons7*	GGCATTAAGGCAGCTCACTCT	ATGAATGACGGTTCCCATGTA
X57187	*pr4*	CTTGCTTGCACCATCTATCTCTT	CACTGACTTCGGTAGAGTTGGTT
M13968	*pr3*	ACTGAGAGGTGACAAGGTCAGAG	TCGGATTCTTCAAGAGATACTGTG
X63521	*Lox*	ATCTGTATCCCAAGATGTGTTGC	TTGTAGGCAATGTAACTCCACCT
EU194553.1	*os*	ATCGAGGGAAGATTATTCTACGG	TAAGCTAGCCTTTCTTGTCAACG

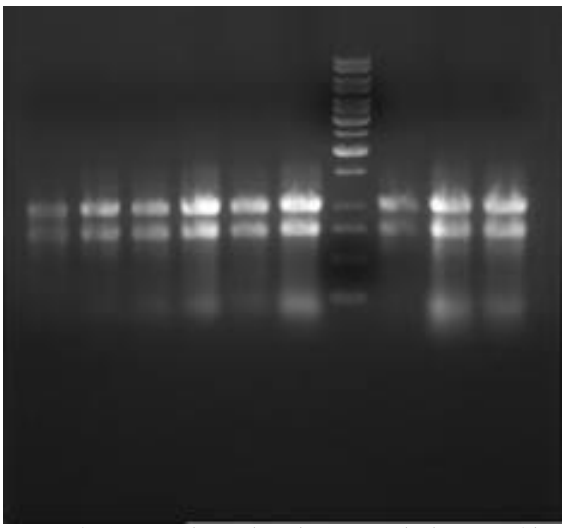
نتایج و بحث

غلظت RNA در نمونه‌های مختلف بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکروگرم در میکرولیتر بود. کیفیت RNA استخراجی با کمک ژل الکتروفورز تایید گردید (شکل ۱). غلظت DNA مکمل (cDNA)، در نمونه‌های مورد بررسی بین ۲۱۰۰ تا ۲۵۰۰ میکروگرم در میکرولیتر بود. باندهای اختصاصی (در ناحیه ۱۶۰-۱۴۰ بازی) حاصل از واکنش PCR معمولی ژن‌های مورد بررسی که میزان بیان آن‌ها از طریق واکنش QRT-PCR مورد نظر بود، در شکل ۲ مشاهده می‌گردد. نتایج مقایسه بیان ژن‌ها در گیاهان آلوده و سالم در ژنوتیپ‌های لوبیا نشان داد که میزان بیان ژن‌های *pr3* و *pr4* هم در ژنوتیپ‌های لوبیای سیاه و هم در ژنوتیپ حساس خمین به طور معنی‌داری در گیاهان آلوده نسبت به گیاهان سالم افزایش یافت (شکل‌های ۳ تا ۵). هر چند این افزایش در ژنوتیپ‌های لوبیای سیاه با شدت بیشتری بود. ژانگ و همکاران (۳۲) نشان دادند که خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زائی (*pr3* و *pr4*)، در سیب در اثر آلودگی به بیماری‌های قارچی *Botryosphaeria dothidea, Valsa ceratosperma, Glomerella cingulate* به میزان بالائی بیان شدند. وانگ و همکاران (۳۳) نشان دادند در برنج پس از آلودگی به *Magnaporthe grisea* بیان مجموعه‌ای از ژن‌های *pr4* که به صورت یک توالی روی کروموزوم ۱۱ قرار دارند، افزایش یافت. گزینا و همکاران (۳۴) نشان دادند که ژن *pr3* در لوبیای آزوکی (*Vigna angularis*) پس از آلودگی به ویروس موزائیک سویا و قارچ *Colletotrichum Lindemuthianum* به شدت در ساقه، برگ، گل و غلاف، اما به میزان کمتری در ریشه بیان شد. با توجه به حساسیت ژنوتیپ خمین و نیز مقاوم بودن ژنوتیپ‌های KS۱۱۱۵ و KS۱۱۷۹ و همچنین با توجه به اینکه ژن‌های *pr3* و *pr4* مسوول دفاع مستقیم هستند، می‌توان نتیجه گرفت که دو ژن *pr3* و *pr4* به تنهائی مسئول مقاومت متفاوت این ژنوتیپ‌ها نبوده و دیگر ژن‌های درگیر در مقاومت لوبیا به کنه تارتن دولکه‌ای، در ایجاد واکنش مقاومت متفاوت در این سه ژنوتیپ به کنه تارتن دولکه‌ای نقش دارند. بیان ژن *os* در ژنوتیپ شاهد و همچنین یکی از ژنوتیپ‌های لوبیا سیاه (KS۱۱۱۵) پس از آلودگی به کنه تارتن دولکه‌ای به‌طور غیرمعنی‌داری کاهش یافت، در حالی‌که میزان بیان این ژن در ژنوتیپ لوبیای سیاه دیگر یعنی KS۱۱۷۹ به صورت

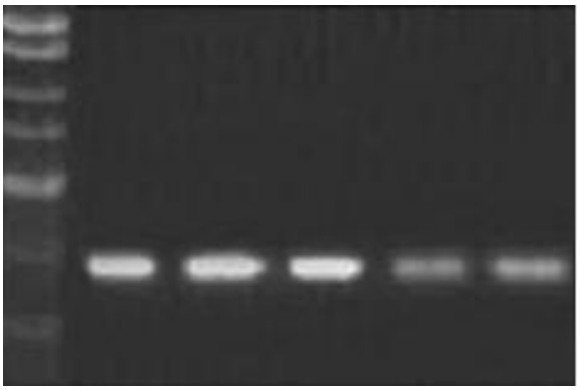
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.35]

معنی‌داری افزایش پیدا کرد. تحقیقات نشان می‌دهد این ژن در تولید (E)-β-Ocimene نقش دارد که این ترکیب جلب کننده کنه شکارگر است (۳). طبق بررسی منابع صورت گرفته، اطلاعاتی راجع به ژن *os* در مورد لوبیا وجود ندارد و در خانواده لگومینوزه نتایج مطالعات آریمورا و همکاران (۳) نشان داد که این ژن از طریق شرکت در سنتز (E)-β-Ocimene، در القاء پاسخ‌های دفاعی غیرمستقیم *Lotus japonicus* علیه کنه تارتن دولکه‌ای نقش دارد. در سایر خانواده‌های گیاهی، نتایج هالیتسچک و همکاران (۱۵) نشان داد که با حمله لارو *M.sexta* به *Nicotiana attenuata*، میزان بیان ژن *os* در محل زخم در گیاه افزایش یافت و باعث جلب زنبورهای شکارگر *Cotesia margiventris* به گیاهان آلوده گردید.



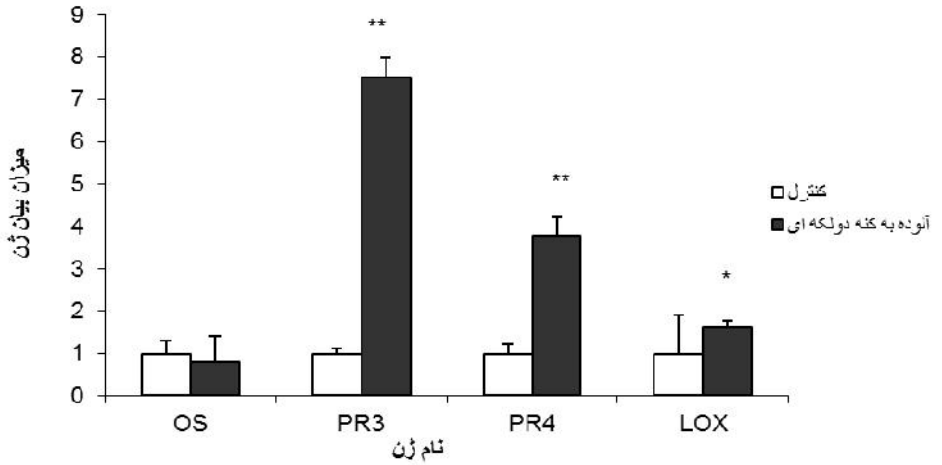
شکل ۱- نمونه‌ای از RNAهای استخراج شده از ژنوتیپ‌های لوبیا سیاه
Figure1. A sample of black bean genotypes extracted RNA



شکل ۲- باندهای اختصاصی (در ناحیه ۱۶۰-۱۴۰ بازی) حاصل از واکنش PCR ژن‌های مورد بررسی (در این شکل به ترتیب از چپ به راست لدر، ژن مرجع (*cons7*)، *pr3*، *lox*، pr4، *os* می‌باشند.)
Figure 2. Specific bands (120-140 bp region) of studied genes that produced by PCR reaction (in this figure bands in *os* respectively)*lox*،pr4،left to right are DNA ladder, reference gene (*cons7*), *pr3*

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.35]



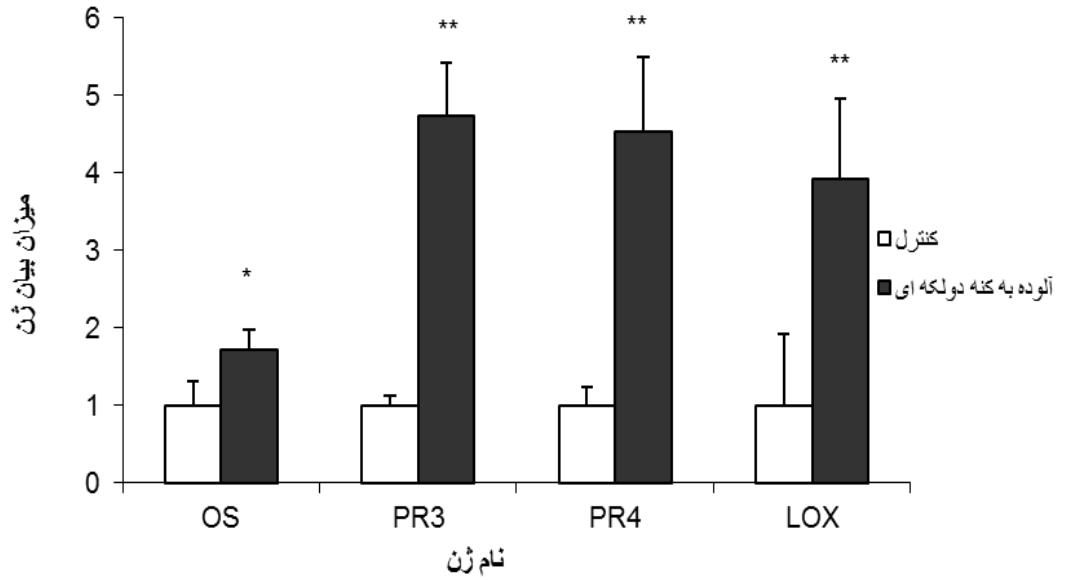
شکل ۳- نسبت بیان چهار ژن موثر در دفاع مستقیم و یا غیرمستقیم (*os*، *pr3*، *pr4* و*lox*) در گیاهان کنترل و آلوده به کنه تارتن دولکه‌ای در ژنوتیپ سیاه KS۱۱۱۵ (* و **: به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ و یک درصد در آزمون t استیودنت)

Figure 3. Expression ratio of four genes that is involved in direct and/or indirect defense (*os, pr3، pr4 and lox*) against spider mite in the clean and spider mite infested plants of KS1115 black genotype. (*and **: a significant difference at P\0.05 and P\0.01 respectively in a Student's t test).

با توجه به نقش کلیدی این ژن در دفاع غیرمستقیم و جلب شکارگر، به نظر می‌رسد مقاوم یا حساس بودن ارقام لوبیا ارتباط مستقیمی با جلب شکارگر ندارد و ممکن است بعضی از ارقام مقاوم توانایی بالاتری برای جلب شکارگر نسبت به ارقام حساس نداشته باشند. بالدوین و پترسون (۵) نشان دادند که القاء دفاع غیرمستقیم در گیاه ممکن است با بعضی از سیستم‌های دفاعی مستقیم سازگار و با بعضی سیستم‌های دفاعی مستقیم ناسازگار باشد. مطالعات دیکه (۱۱،۱۰) نشان داد که گیاهانی که انرژی بیشتری را برای دفاع مستقیم (سدهای فیزیکی و شیمیایی گیاه که مستقیما اثر منفی بر بیولوژی و باروری گیاه‌خوار می‌گذارد) صرف می‌کنند، احتمالا انرژی کمتری را برای دفاع غیرمستقیم (که در آن گیاه با جلب دشمنان طبیعی موجب کاهش جمعیت آفت می‌شود) همچنین مطالعات کال و همکاران (۱۹) نشان می‌دهد که گیاهان زمانی که نتوانند در مقابل یک گیاه‌خوار مقاومت کنند از سیستم دفاعی غیرمستقیم خود کمک می‌گیرند. بنابراین برای شروع دفاع غیرمستقیم گیاهان دفاع مستقیم خود را کاهش می‌دهند. طهماسبی و همکاران (۳۰) نشان دادند توانایی یا عدم توانایی گیاه لوبیا برای جلب کنه شکارگر رابطه‌ای با درجه مقاومت آن گیاه به کنه تارتن دولکه‌ای ندارد و رابطه‌ای بین دفاع مستقیم و غیرمستقیم گیاه وجود ندارد تغییرات بیان ژن‌های درگیر در دفاع مستقیم و غیرمستقیم لوبیای سیاه که یک نوعی از لوبیا است که به لحاظ ترکیبات ثانویه خود مقاومت زیادی به بسیاری از آفات دارد (۲۹،۲۴،۲۳،۲۲،۷،۱۷) تاکنون مطالعه نشده است. در ارتباط با رابطه بین دفاع مستقیم و غیرمستقیم، این که چطور گیاهان سیستم‌های دفاعی مستقیم و غیرمستقیم خود را با هم تلفیق می‌کنند دارای پیچیدگی‌های اکولوژیکی می‌باشد. به نظر می‌رسد مطالعات بیشتری برای تعریف یک رابطه مشخص بین درجه مقاومت گیاه میزبان و میزان جلب دشمنان طبیعی آفات لازم می‌باشد (۲۰).

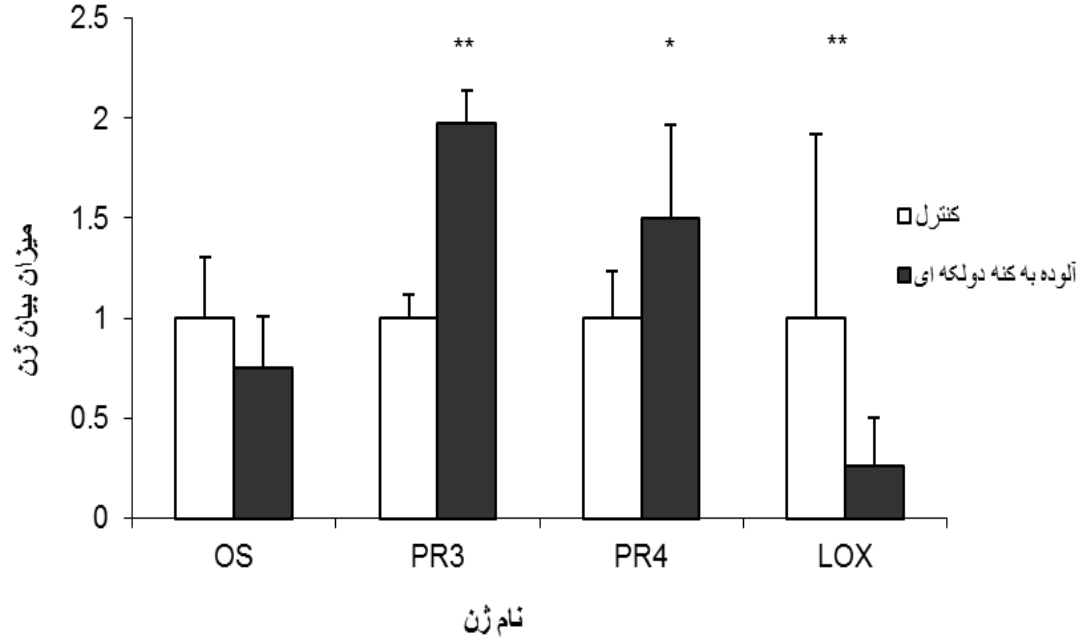
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.35]



شکل ۴- نسبت بیان چهار ژن موثر در دفاع مستقیم و یا غیرمستقیم (*os*، *pr3*، *pr4* و*lox*) در گیاهان کنترل و آلوده به کنه تارتن دولکه‌ای در ژنوتیپ سیاه KS۱۱۷۹ (* و **: به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ و یک درصد در آزمون t استیودنت)

Figure 4. Expression ratio of four genes that is involved in direct and/or indirect defense (*os, pr3، pr4 and lox*) against spider mite in the clean and spider mite infested plants of KS1179 black genotype. (*and **: a significant difference at P\0.05 and P\0.01 respectively in a Student's t test).



شکل ۵- نسبت بیان چهار ژن موثر در دفاع مستقیم و یا غیرمستقیم (*os*، *pr3*، *pr4* و*lox*) در گیاهان کنترل و آلوده به کنه تارتن دولکه‌ای در ژنوتیپ خمین (* و **: به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ و یک درصد در آزمون t استیودنت)

Figure 5. Expression ratio of four genes that is involved in direct and/or indirect defense (*os, pr3، pr4 and lox*) against spider mite in the clean and spider mite infested plants of Khomein genotype. (*and **: a significant difference at P\0.05 and P\0.01 respectively in a Student's t test).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.35]

میزان بیان ژن *lox* در ژنوتیپ‌های لوبیای سیاه بعد از آلودگی به کنه تارتن دولکه‌ای به طور معنی‌داری در مقایسه با گیاهان سالم افزایش یافت (شکل‌های ۳ و ۴). این در حالی است که بیان این ژن در ژنوتیپ شاهد حساس (شکل ۵) نه تنها افزایش نداشت، بلکه به صورت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد کاهش نشان داد. نتایج آزمایش‌های هالیتسچک و بالدوین (۱۳) و کسلر و همکاران (۱۸) نشان دادند که که ژن *lox* آنزیم کلیدی در مسیر اکتادکانوئید است که نقش مهمی را در پاسخ دفاعی گیاه بر علیه گیاه‌خواران دارد. ژن *lox* از جمله ژن‌های کلیدی در دفاع مستقیم و همچنین مسیر تولید ترکیبات فرار و دفاع غیرمستقیم گیاه می‌باشد (۸). مطالعه بروینسما و همکاران (۶) نشان داد که بازدارندگی ژن *lox* در گیاه هم دفاع مستقیم و هم دفاع غیرمستقیم را کاهش می‌دهد. بنابراین نتایج ما با نقش شناسایی شده این ژن در تحقیقات قبلی در افزایش مقاومت گیاه علیه گیاه‌خواران هم‌خوانی دارد و بر اهمیت مطالعات بیشتر روی این ژن برای افزایش مقاومت ژنوتیپ‌ها و همچنین جلب شکارگر در ژنوتیپ‌های گیاهی تاکید دارد. به نظر می‌رسد ارقام لوبیای سیاه پتانسیل لازم را برای استفاده در یک برنامه تلفیقی مبارزه با آفات را دارند. هر چند نیازمند مطالعات بیشتر و گسترده‌تری در زمینه می‌باشیم.

تشکر و قدردانی

از قطب علمی حبوبات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران که بخشی از هزینه‌های این تحقیق را فراهم نمودند، کمال تشکر و سپاس را داریم.

منابع

1. Arimura, G., S. Köpke, M. Kunert, V. Volpe, A. David, P. Brand, P. Dabrowska, M. Maffei and W. Boland. 2008. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean Leaves IV: diurnal and nocturnal damage differentially initiate plant volatile emission. Plant Physiology, 146: 965-973.
2. Arimura, G., C. Kost and W. Boland. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defenses. Biochimica et Biophysica Acta, pp: 91-111.
3. Arimura G., R. Ozawa, R. Kugimiya, J. Takabayashi and J. Bohlman. 2004. Herbivore-induced defense response in model legume.two-spotted spider mites induced emission of (E)-β-Ocimene and transcript accumation of (E)-β-Ocimene synthase in Lotus japonicus. Plant physiology, 135: 1976-1983.
4. Arimura, G., R. Ozawa, T. Shimoda, T. Nishioka, W. Boland and J. Takabayashi. 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves, Nature, 406: 512-514.
5. Baldwin, I.T. and C.A. Preston.1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. Planta, 208: 137-145.
6. Bruinsma, M., S. Broekhoven, E.H. Poelman, M.A. Posthumus, M.J. Müller, J.J.A. Loon and M. Dicke. 2010. Inhibition of lipoxygenase affects induction of both direct and indirect plant defences against herbivorous insects. Oecologia, 162: 393-404.
7. Correa, V. 1988. Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in Phaeoisariopsis griseola (Sacc). Ferr. PhD. disseration Michigan State University, East Lansing, MI, 154 pp.
8. Dicke, M., R.M.P. Poecke and J.G. Boer. 2003. Inducible indirect defense of plants: from mechanisms to ecological functions. Basic Applied Ecology, 4: 27-42.
9. Dicke, M., M.W. Sabelis, J. Takabayashi, J. Bruin and M.A. Posthumus. 1990. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. Journal of Chemical Ecology, 16: 3901-3118.
10. Dicke, M. and L.E.M. Vet. 1999. Plant-carnivore interactions: evolutionary and ecological consequences for plant, herbivore and carnivore In herbivores: between plants and predators: Journal of Chemical Ecology, 16: 381-396.
11. Dicke, M. 1994. Local and systemic production of volatile herbivore induced terpenoids: Their role in plant–carnivore mutualism. Journal of Plant Physiology, 143: 465-472.
12. Ebrahimi, M., M.R. Bihamta, A.H. Hoseinzade, M. Golbashy and F. Khialparast. 2009. A Study of Agronomy and Morphologic Traits of White Bean Genotypes Using Multivariate Analysis. Journal of Crop Breeding, 1(3): 1-13 (In Persian).
13. Fernandes, A.C., W. Nishida and R.P. Costa Proenc. 2010. Influence of soaking on the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cooked with or without the soaking water: a review. International Journal of Food Science and Technology, 45: 2209-2218.
14. Halitschke, R. and I.T. Baldwin. 2003. Antisense lox expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. Plant Journal, 36: 794-807.
15. Halitschke, R., A. Kessler, J. Kahli, A. Lorenz and I.T. Baldwin. 2000. Ecophysiological comparison of direct and indirect defenses in Nicotiana attenuata. Oecologia, 124: 408-417.
16. Isla, F.M.A., J. Rengifo, R.J. Redden, K.E. Basford and S.E. Beebe. 2003. Association between Seed Coat Polyphenolics (Tannins) and Disease Resistance in Common Bean. Plant Foods for Human Nutrition, 58: 285-297.
17. Jara, B., A. Acosta and C. Cardona. 1991. Efecto de cinco variedades de frijol sobre la biologia y la fecondidad de la aranita roja, *Tetranychus desertorum* Banks (Acari, Tetranychidae). Rev. Colomb. Entomol, 7: 33-39.
18. Kessler, A., R. Halitschke and I.T. Baldwin. 2004. Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. Science, 305: 665-668.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.35]

19. Kahl, J., D.H. Siemens, R.J. Aerts, R. Gabler, F. Kuhnemann, C.A. Preston and I.T. Baldwin. 2000. Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not a putative indirect defense against an adapted herbivore. Planta, 210: 336-342.
20. Krips, O.E., P.E.L. Willems, R. Gols, M.A. Posthumus, G. Gort and M. Dicke. 2001. Comparison of cultivars of ornamental crop Gerbera jamesonii on production of spider mite-induced volatiles, and their attractiveness to the predator *Phytoseiulus persimilis*. Journal of Chemical Ecology, 27: 1355-1372.
21. Libault, M., S. Thibivilliers, O. Radwan, S.J. Clough and G. Stacey. 2008. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. The plant Genome, 1: 44-54.
22. Menezes, J.R. and J.C. Dianese. 1988. Race characterization of Brazilian isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* and detection of resistance to anthracnose in *Phaseolus vulgaris*. Phytopathology, 78: 650-655.
23. McFarlane, J.S. and G.M. Rieman. 1983. Leaf hooper resistance among the bean varieties. J. Econ. Entomol, 36: 639 pp.
24. Miklas, P.N., J.R. Smith, A. Hang, K.F. Grafton, J.D. Kelly. 2000. Release of navy and black bean germplasm lines with resistance to common bacterial blight. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 44: 181-182.
25. Pereira J.A., I. Oliveira, A. Sousa, P. Valento, P.B. Andrade, I.C.F.R. Ferreira, F. Ferreres, A. Bento, R. Seabra and L. Estevinho. 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45: 2287-2295.
26. Saedi, Z. and S. Arbabi. 2007. Effectiveness of 12 pesticides against two infestation levels of bean fields by *Tetranychus urticae* Koch in Lordegan, Chaharmahal & Bakhtiari province. Pajouhesh and Sazandegi, 76: 25-31 (In Persian).
27. Salinas-Moreno, Y., L. Rojas-Herrera, E. Sosa-Montes, P. Pe´rez-Herrera. 2005. Anthocyanin composition in black bean varieties grown in Mexico. Agrociencia, 39: 385-394.
28. Shafiee Khorshidi, M., M.R. Bihamta, F. Khialparast and M.R. Naghavi.2012. Assessment of Genetic Variation in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes under Drought Condition Using Cluster and Canonical Discriminant Analysis (CDA). Journal of Crop Breeding, 10: 1-17 (In Persian).
29. Tahmasebi, Z., A.H. Hosein Zadeh, M.R. Bihamta, M.R. Naghavi, A. Saboori, H.R. Dorri and M.S. Koshki. 2011. An investigation on resistance of 19 common bean genotypes to two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), in three regions of Iran. Journal of Entomolology Society of Iran, 30: 69-78 (In Persian).
30. Tahmasebi, Z., H. Mohammadi, G. Arimura, A. Muroi and M. Kant. 2014. Herbivore-induced indirect defence across beans cultivars is independent of their degree of direct resistance. Experimental and Applied Acarology, 63: 217-39.
31. Thibivilliers, S., T. Joshi, K.B. Campbell, B. Scheffler, D. Xu, B. Cooper, H.T. Nguyen and G. Stacey. 2008. Generation of *Phaseolus vulgaris* ESTs and investigation of their regulation upon Uromyces appendiculatus infection. BMC Plant Biology, 9: 46-59.
32. Turlings T.C.J., J.H. Tumlinson and W.J. Lewis. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. Science, 250: 1251-1253.
33. Wang, S., KA. Meckling and MF. Marcone. 2011. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacity. J Agric Food Chem, 59: 960-8.
34. Xina, C., H. Volkaert, P. Chatwachirawong and P. Srinives. 2010. Molecular cloning and expression analysis of the pathogenesis-related gene VaPR2 in azuki bean (*Vigna angularis*). Science Asia, 36: 72-75.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.35]

Expression of Defensive Genes Responsible for Direct and Indirect Defense Against Spider Mite *Tetranychus urticae* in Black Bean

Ahmad Bouchani[1], Zahra Tahmasebi[2] and Mehdi Rahaie Jahromi[3]

1- Graduated M.Sc. Student, Agricultural College, Ilam University
2 -Assistant Professor, Agricultural College, Ilam University (Corresponding author: z.tahmasebi@mail.ilam.ac.ir)
3- Assistant professor, Faculty of New Science and Technology, University of Tehran
Received: August 27, 2015 Accepted: August 9, 2016

Abstract

Black bean genotypes have high resistance to the important pests and diseases of common bean. To evaluate the effectiveness of four genes in the direct (plant negatively effects on biology and reproduction of herbivore by its physical and biochemical barriers) and or indirect(by attracting natural enemies of herbivores)in black beans against two spotted spider mite, expression levels of these genes (Pathogenesis-Related Protein3 (*pr3*)(Pathogenesis-Related Protein4 ،Lipoxygenase(*pr4*), Lipoxygenase (*lox*) and β-Ocimen Synthase(*os*)) in two resistant black bean genotypes (KS1179 and KS 1115)) and susceptible control (Khomeini) before and after infection were determined by QRT-PCR technique. Based on the results of the study in all genotypes the gene expression of *pr3* and PR4 involved in the direct defense, unregulated, although this increase in black bean genotypes was intensive than genotype Khomeini. Expression of *os* gene involved in indirect defense significantly increased in one of black bean genotypes (KS1179) however, the expression of this gene in another genotype of black beans and Khomeini did not change after the mite infestation. *lox* gene, which is involved in the direct and indirect defenses in both black bean genotypes after infection were significantly increased and decreased in Khomeini. Given that inhibition of *lox* genes in plant defense, can effect negatively on both direct and indirect defense. Thus, our results demonstrate on the importance of further study of this gene to increase resistance to spider mite in black bean.

Keywords: Black bean, Direct defense, Indirect defense, QRT-PCR

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.35]