

## اثر کودهای زیستی قارچی و باکتریایی بر تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی گیاه نخود آلوده شده به بیماری پژمردگی فوزاریومی

سید کاظم صباغ<sup>۱\*</sup>، اسدالله کریمی<sup>۲</sup> و مرتضی قربانی<sup>۳</sup>

۱- **\*نویسنده مسوول:** دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران (sksabbagh@yazd.ac.ir)

۲- دانشجوی سابق ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳- استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۰۸

### چکیده

پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های نخود در ایران می‌باشد. در این تحقیق اثر کودهای زیستی نیتروکسین و قارچ-ریشه در القا مقاومت نخود ایرانی (رقم ILC482) تحت تنش با بیمارگر ایجادکننده پژمردگی بررسی شد. تغییرات در میزان تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های کیتیناز و سوپراکسیددیسموتاز به ترتیب با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و بیان ژن در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میزان فنل (۳/۹۱ میلی‌گرم بر وزن تر) و پروتئین کل (۵۰/۲۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب در تیمارهای نیتروکسین و قارچ ریشه مشاهده گردید. بیشترین میزان تغییرات هر سه آنزیم مربوط به تیمار قارچ-ریشه در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی بود. همچنین، مقایسه میانگین داده‌های بیان ژن، افزایش حداکثری نسخه‌برداری هر دو ژن را در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی نشان داد. با توجه به نتایج حاصل، نتیجه‌گیری می‌شود که کودهای زیستی، مقاومت گیاه به بیماری را از طریق تغییر در میزان فعالیت‌های بیوشیمیایی و تغییر در سطح بیان ژن‌های درگیر مقاومت، افزایش می‌دهد.

**کلیدواژه‌ها:** قارچ-ریشه، نیتروکسین، کیتیناز، سوپراکسید ديسموتاز، بیان ژن، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

### مقدمه

کشاورزی مناطق خشک و نیمه خشک کشت می‌شود. توانایی تثبیت ازت، ریشه‌دهی عمیق و استفاده موثر از نزولات جوی سبب شده که این گیاه نقش مهمی در ثبات توسعه نظام‌های زراعی ایفا کند (Varshney et al., 2013). کشت این محصول به ویژه در مناطق معتدل و مرطوب همواره با محدودیت‌های ناشی از عوامل

حبوبات پس از غلات دومین منبع غذایی بشر به حساب می‌آید و در بین حبوبات، نخود سومین رتبه سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است (Joshi et al., 2010). این محصول زراعی یکی از مهم‌ترین منابع تولید پروتئین گیاهی در رژیم غذایی بسیاری از کشورهای در حال توسعه است و عمدتاً در نظام‌های دیر تخصصی: دکتر مهدی مهربانی کوشکی

آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) آنزیم کلیدی است که به عنوان اولین خط دفاعی گیاهان در برابر مسمومیت اکسیژن به شمار می رود و وظیفه آن تجزیه آنیون‌های سوپراکسید (-O<sub>2</sub>) به مولکول اکسیژن و پراکسید هیدروژن است (Gill et al., 2005). گزارش‌های مختلف مؤید آن است که فرآیند تجزیه رادیکال‌های آزاد توسط آنزیم SOD در این سطح متوقف نشده بلکه توسط سایر آنزیم‌های موجود از جمله کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز ادامه می‌یابد، تا طی آن پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن تبدیل گردد (Blokhina et al., 2003). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به همراه ژن‌های مسئول سنتز آنها در شرایط تنش‌های مختلف باعث ایجاد مقاومت اکتسابی در گیاهان می‌شوند.

در این تحقیق نقش دو کود زیستی در القا مقاومت نخود ایرانی تحت تنش با بیمارگر پژمردگی فوزاریومی بررسی و تأثیر آنها بر فعال شدن مکانیسم‌های بیوشیمیایی و مولکولی درگیر در مقاومت گیاه با سنجش تغییرات آنزیمی و همچنین بیان ژن در زمان واقعی، ارزیابی شد.

### مواد و روش‌ها

#### کاشت گلخانه‌ای و کودهای زیستی

در این تحقیق از نخود رقم ILC482 (حساس به بیماری) که از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان تهیه شده بود، استفاده گردید. کود زیستی حاوی مایه قارچ-ریشه *Glomus intraradisis* از شرکت زیست فناوری توران و کود بیولوژیک نیتروکسن حاوی زادمایه‌های باکتریایی از جنس‌های *Azospirillum* و *Azotobacter* از فروشگاه گلبرگ مشهد تهیه گردید. با توجه به محتوای باکتریایی کود نیتروکسن و پیشنهاد شرکت سازنده، از ۵۰۰ سی سی کود مایع (۱۰۷ cfu) به ازای یک کیلوگرم بذر نخود به صورت بذر مال استفاده گردید. از مایه تلقیح قارچ-ریشه به فرم ماسه حاوی اسپور به میزان ۷۵ گرم (۵٪) به

بیماری‌زا همراه بوده است که در این میان عوامل بیماری‌زای خاکزاد سهم بسزایی را در کاهش محصول به خود اختصاص می‌دهند. در ایران پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* fsp. *ciceris* یکی از عوامل محدود کننده رشد نخود زراعی است. این قارچ دارای شش نژاد فیزیولوژیکی است که همواره مبارزه با آن به ویژه استفاده از سموم شیمیایی را دچار مشکل نموده است. در این راستا افزایش مقاومت القایی گیاه با استفاده از القاگرهای زنده و غیرزنده یکی از راه‌های کاهش میزان بیماری در ارقام حساس است. تیمار گیاهان با محرک‌های زنده و غیرزنده باعث مقاومت القایی می‌شود که به طور سیستمیک در سایر بخش‌های سالم گسترش می‌یابد (Hammerschmidt et al., 2000). استفاده از باکتری‌های ازتوباکتر و آزوسپریلیوم (نیتروکسن) و توانایی آنها در کنترل بیماری‌های قارچی در محصولات مختلف باعث کاهش بیماری و افزایش میزان عملکرد گیاه شده است (Chen, 2006; Tilak et al., 2005; Bahrani et al., 2010). قارچ-ریشه‌ها به ویژه از نوع داخلی (وزیکولار آریسکولار)، قادر به همزیستی با بیش از ۸۰ درصد گیاهان خاکزی، از جمله اغلب گیاهان زراعی و درختان میوه هستند. این میکروارگانیسم‌ها همزیست‌های اجباری‌اند که برای تکمیل چرخه زندگی‌شان نیاز به گیاه میزبان دارند (Smith et al., 2009). پراکسیداز (PR9)، کیتیناز (PR3) و بتا-۱-گلوکاناز (PR2) از جمله پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی هستند. پراکسیدازها اثر مستقیم در مقاومت داشته و از طریق تولید رادیکال آزاد و پراکسید هیدروژن، که برای بعضی بیمارگرها سمی هستند، منجر به دفاع در برابر بیمارگرها می‌شوند (Liu and Ekramoddollah, 2006; Yedidia et al., 1999). افزایش سطح آنزیم‌هایی همچون کیتیناز، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و فنل آمونیاک‌لیاز و میزان فیتوالکسین‌ها در گیاهان مختلف تحت تنش گزارش شده است (Karimzadeh et al., 2019).

عصاره حاصل از پارچه ملامل دو لایه با متانول ۸۰ درصد عبور و صاف گردید. عصاره صاف شده به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس رسوب حاصل حذف و از محلول رویی برای اندازه‌گیری فنل با استفاده از معرف کربنات سدیم و فولین استفاده گردید (Chérif et al., 2007).

### سنجش پروتئین کل

از محلول بیوره برای اندازه‌گیری میزان پروتئین کل استفاده شد. بدین ترتیب مقدار ۱/۵ گرم سولفات مس ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) و ۰/۶ گرم سدیم پتاسیم تارتارات در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون ترکیب و حل شد. مقدار ۳۰۰ میلی لیتر سدیم هیدروکسید (۱۰٪) به محلول اضافه و حجم آن به یک لیتر رسانده شد. از یک گرم یدید پتاسیم برای ممانعت از احیای مس استفاده گردید.

### سنجش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

مقدار ۰/۲ گرم بافت گیاه تازه برای تهیه عصاره گیاهی و سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور بافت برگ در هاون چینی محتوی ازت مایع سائیده شده و با محلول عصاره‌گیری [۱۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم با اسیدیته ۶/۸، ۲۰ میکرولیتر EDTA (۰/۱ مولار) و ۳۸۰ میکرولیتر آب مقطر] بصورت یک مخلوط یکنواخت شد. سپس به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، از فاز رویی (بعنوان عصاره) برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد (Elavarthi and Martin, 2010).

### تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز

محلول واکنش (به حجم ۳ میلی لیتر) حاوی ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷)، ۷۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۵۰ میلی مولار) و ۱۵۰۰ میکرو لیتر آب مقطر تهیه شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه و بر حسب میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیمی

صورت مخلوط با خاک گلدان استفاده شد. تعداد سه عدد بذر ضد عفونی شده با محلول کلرآمین ۳٪ در گلدان‌های ۱/۵ کیلویی حاوی مخلوط خاک بکر و ماسه شسته شده (۱:۱) دوبار سترون کشت شدند.

### تهیه زاد مایه بیمارگر و مایه‌زنی گیاهان

جدایه قارچ *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه کردستان تهیه شدند. جهت اثبات قدرت قارچ در بیماری‌زایی، در ابتدا بوته‌های حساس با جدایه فوق، آلوده شده و پس از ظهور علائم و جداسازی مجدد قارچ، جهت تهیه زادمایه مورد استفاده قرار گرفت. تشتک‌های حاوی محیط سیب‌زمینی- دکستروز-آگار (PDA) مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر جهت تولید پرگنه به داخل انکوباتور با دمای  $25 \pm 2$  قرار داده شد و بعد از گذشت هفت روز از پرگنه تازه رشد کرده سوسپانسیون اسپور تهیه شد. از گیاهچه‌های تازه رشد کرده تحت تیمار کودهای بیولوژیک استفاده گردید. با استفاده از یک تیغ جراحی سترون تعدادی زخم در ناحیه طوقه به طرف ریشه ایجاد و یک میلی لیتر اسپور (با غلظت ۱۰۶ اسپور در میلی لیتر) به پای بوته در محل زخم ریخته شد (Bao and Lazarovits, 2001).

### طرح آزمایشی

این آزمایش در قالب یک طرح بلوک کاملاً تصادفی و در شرایط گلخانه تحقیقاتی با استفاده از تیمارهای زیر شامل: قارچ-ریشه و گیاه سالم (Gi)؛ نیتروکسین و گیاه سالم (N)؛ قارچ-ریشه، نیتروکسین و گیاه سالم (Gi-N)، قارچ-ریشه و گیاه بیمار (Gi-Foc)؛ نیتروکسین و گیاه بیمار (N-Foc)؛ قارچ-ریشه، نیتروکسین و گیاه بیمار (Gi-N-Foc)؛ گیاه بیمار بدون تیمار کودی (Foc) و گیاه نخود سالم بدون هیچ تیماری (Sh) انجام گردید. برای هر تیمار سه تکرار مستقل از هم در نظر گرفته شد.

### ارزیابی میزان فنل کل

برای استخراج مواد فنلی از برگ تازه تیمارهای مختلف استفاده شد. پس از ساییدن و له کردن برگ‌ها،

بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه (در واحد گرم وزن تر گیاه) محاسبه گردید.

**تعیین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز**

جهت سنجش فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز به ترتیب از معرف پیروگالول (Taranto et al., 2017)، و گایاکول (Gonçalves-Soares et al., 2012) استفاده شد. فعالیت این آنزیم ها به ترتیب بر اساس میزان جذب در طول موج ۴۲۰ و ۴۷۰ نانومتر اندازه گیری شد.

**استخراج RNA و تجزیه و تحلیل بیان چند ژن**

تغییرات سطح نسخه برداری ژن های کیتیناز و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با استفاده از روش کمیت سنجی نسبی (qRT-PCR) سنجش شد. استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری (Qiagen, Germany) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. مولکول های آر آن آ استخراج شده تحت تیمار آنزیم دی ان آز (Fermentas, France) قرار داده و جهت سنتز cDNA از کیت تجاری (Step ۲ RT-PCR kit, Vivantis, Cinngene) استفاده شد. مخلوط واکنش qRT-PCR شامل دو میکرولیتر

بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه (در واحد گرم وزن تر گیاه) محاسبه گردید.

### تعیین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز

جهت سنجش فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز به ترتیب از معرف پیروگالول (Taranto et al., 2017)، و گایاکول (Gonçalves-Soares et al., 2012) استفاده شد. فعالیت این آنزیم ها به ترتیب بر اساس میزان جذب در طول موج ۴۲۰ و ۴۷۰ نانومتر اندازه گیری شد.

### استخراج RNA و تجزیه و تحلیل بیان چند ژن

تغییرات سطح نسخه برداری ژن های کیتیناز و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با استفاده از روش کمیت سنجی نسبی (qRT-PCR) سنجش شد. استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری (Qiagen, Germany) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. مولکول های آر آن آ استخراج شده تحت تیمار آنزیم دی ان آز (Fermentas, France) قرار داده و جهت سنتز cDNA از کیت تجاری (Step ۲ RT-PCR kit, Vivantis, Cinngene) استفاده شد. مخلوط واکنش qRT-PCR شامل دو میکرولیتر

### پردازش اطلاعات و تجزیه و تحلیل آماری

داده های حاصل از این آزمون با استفاده از نرم افزار SAS ver9 (SAS institute 1999) واکاوی شد. مقایسه میانگین داده ها با روش آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطوح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد انجام گردید. از روش  $\Delta\Delta Ct$  برای تجزیه و تحلیل داده های نسخه برداری ژن ها استفاده گردید (Pfaffl, 2001).

### جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در qRT-PCR

Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
Cu/zn sod	GGGAGACGGTCCAACCAC	TGCAGCCATTTGTGGTGTCC
Chitinase	GGCCATTGTGATCCATCCAC	TCTTGAAGTTGACGTGCCAC
Actin	CTACGAATTGCCTGATGGAC	CCTCCTGAAAGGACGATGTT

### نتایج

#### اثر کودهای زیستی بر مقادیر فنل کل

نتایج تجزیه واریانس نشان می دهد که اثر تیمار ( $p \leq 0.01$ ) و بازه زمانی ( $p \leq 0.01$ ) و اثر متقابل تیمار و بازه زمانی ( $p \leq 0.05$ ) تأثیر معنی داری بر فنل کل گیاه داشته است (جدول ۲). مقایسه بازه های زمانی نشان داد

که بیشترین تغییرات برای آنزیم های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز مربوط به بازه زمانی ۱۲۰ ساعت بعد از آلودگی بوده درحالی که برای آنزیم کاتالاز و پروتئین کل بیشترین میزان مربوط به بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی است (جدول ۳).

که بیشترین تغییرات برای آنزیم های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز مربوط به بازه زمانی ۱۲۰ ساعت بعد از آلودگی بوده درحالی که برای آنزیم کاتالاز و پروتئین کل بیشترین میزان مربوط به بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی است (جدول ۳).

بیشترین میزان فنل کل در گیاه ( ۳/۹ میلی گرم بر گرم وزن تر) مربوط به تیمار نیتروکسین در بازه زمانی ۱۶۸ ساعت بعد از آلودگی و کمترین میزان تغییرات فنل کل ( ۱/۸۷ میلی گرم بر گرم وزن تر) مربوط به تیمار قارچ-ریشه و گیاه بیمار در بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از بیماری ثبت گردید. میزان تغییرات فنل کل با گذشت زمان در تیمار بیماری تنها تغییرات کمی را نشان می دهد که نشان از واکنش گیاه به تنش می باشد (جدول ۴).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر کودهای زیستی بر مقادیر فنل و پروتئین کل و آنزیم های کاتالاز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در گیاه نخود ایرانی سالم غیر آلوده و آلوده به قارچ *F. oxysporum* fsp. *ciceris* در بازه های زمانی مختلف.

Table 2. Analysis of variance of bio-fertilizers effect on total phenol and protein, catalase, polyphenoloxidase, and peroxidase in chickpea plants infected with *F. oxysporum* fsp. *ciceris* and healthy plants at different time periods.

Sources of variance	Df	Mean of Square				
		Total phenol	Total protein	Catalase	Polyphenol oxidase	Proxidase
period	3	3.444880**	203.602871**	0.0029*	0.000000091 <sup>ns</sup>	0.01000542**
Treatment	7	1.028667349**	213.154845**	0.0113616**	0.00000474**	0.05035391**
Treatment×period	21	0.15887164*	30.940597*	30.940597*	0.00000036 <sup>ns</sup>	0.0021488 <sup>ns</sup>
Error	-	0.07489918	14.461440	0.00054543	0.00000067	0.001636
CV	-	10.79	10.41	6.80	8.98	11.03

\*, \*\*, n.s. و به ترتیب در سطح ۱ و ۵ درصد معنی دار و غیر معنی دار می باشند.

\* and \*\* showing data that are significant at 5% and 1% levels, respectively. ns showing data that are not significant.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر کودهای زیستی و زمان بر مقادیر فنل و پروتئین کل، آنزیم های کاتالاز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در گیاه نخود ایرانی سالم و آلوده به قارچ *F. oxysporum* fsp. *ciceris*

Table 3. Mean of variance of bio-fertilizers and time period effect on total phenol and protein, catalase, polyphenoloxidase, and peroxidase in chickpea plants infected with *F. oxysporum* fsp. *ciceris* and healthy plants

Time periods	Peroxidase (Unit/Fw.min)	Polyphenoloxidase (Unit/ Fw.min)	Catalase (Unit/ Fw.min)	Total protein (mg/Fw)	Total phenol Phenol(mg/Fw)
24	0.34 <sup>c</sup>	0.88 <sup>a</sup>	0.32 <sup>b</sup>	34.4 <sup>c</sup>	2.21 <sup>c</sup>
72	0.37 <sup>ab</sup>	0.99 <sup>a</sup>	0.35 <sup>a</sup>	34.8 <sup>c</sup>	2.25 <sup>c</sup>
120	0.38 <sup>a</sup>	0.93 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	36.2 <sup>b</sup>	2.65 <sup>b</sup>
168	0.36 <sup>bc</sup>	0.91 <sup>a</sup>	0.34 <sup>ab</sup>	35.19 <sup>b</sup>	3.02 <sup>a</sup>
Treatments					
sh	0.27 <sup>e</sup>	0.80 <sup>d</sup>	0.31 <sup>c</sup>	31.31 <sup>c</sup>	2.17 <sup>c</sup>
F	0.35 <sup>c</sup>	0.90 <sup>cd</sup>	0.35 <sup>b</sup>	35.25 <sup>b</sup>	2.51 <sup>b</sup>
Gi	0.33 <sup>cd</sup>	0.88 <sup>c</sup>	0.32 <sup>c</sup>	34.32 <sup>bc</sup>	2.37 <sup>bc</sup>
Gi-Foc	0.46 <sup>a</sup>	0.99 <sup>a</sup>	0.38 <sup>a</sup>	42.78 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a</sup>
N	0.33 <sup>cd</sup>	0.86 <sup>cd</sup>	0.31 <sup>c</sup>	34.26 <sup>bc</sup>	2.50 <sup>b</sup>
N-Foc	0.41 <sup>b</sup>	0.96 <sup>ab</sup>	0.37 <sup>ab</sup>	39.73 <sup>a</sup>	2.99 <sup>a</sup>
Gi-N	0.32 <sup>d</sup>	0.88 <sup>c</sup>	0.31 <sup>c</sup>	33.12 <sup>c</sup>	2.18 <sup>c</sup>
Gi-N-F	0.41 <sup>b</sup>	0.97 <sup>a</sup>	0.37 <sup>ab</sup>	41.38 <sup>a</sup>	2.77 <sup>a</sup>

In each column, means followed by same letters are not significantly different at the level of 0.05.

جدول ۴- مقایسه اثر تیمارهای کودهای بیولوژیک بر مقادیر فنل کل، پروتئین کل، تغییرات آنزیم‌های کاتالاز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در گیاه نخود ایرانی سالم و آلوده به قارچ *Fusarium oxysporum fsp ciceris* در بازه‌های مختلف زمانی مختلف

**Table 4- Mean comparison of bio-fertilizers effect on total phenol, total protein and catalase, polyphenoloxidase and peroxidase in chickpea plants infected with *F. oxysporum fsp. ciceris* and healthy plants at different time periods**

Treatments	Sampling time periods (hours)																			
	24	72	120	168	24	72	120	168	24	72	120	168	24	72	120	168	24	72	120	168
Sh	2.7 <sup>hj</sup>	2.1 <sup>hij</sup>	1.9 <sup>j</sup>	2.5 <sup>de</sup>	23 <sup>j</sup>	24 <sup>bc</sup>	34 <sup>ef</sup>	35 <sup>ij</sup>	0.31 <sup>ijk</sup>	0.31 <sup>gh</sup>	0.32 <sup>ijk</sup>	0.2 <sup>k</sup>	0.80 <sup>ef</sup>	0.80 <sup>de</sup>	0.81 <sup>f</sup>	0.78 <sup>ef</sup>	0.23 <sup>de</sup>	0.27 <sup>d</sup>	0.30 <sup>bc</sup>	0.25 <sup>d</sup>
Foc	2.1 <sup>hij</sup>	2.2 <sup>ghij</sup>	2.8 <sup>bc</sup>	2.9 <sup>bc</sup>	30 <sup>hi</sup>	41 <sup>bc</sup>	36 <sup>cd</sup>	31 <sup>gh</sup>	0.33 <sup>de</sup>	0.35 <sup>bc</sup>	0.35 <sup>ab</sup>	0.37 <sup>ab</sup>	0.86 <sup>bc</sup>	0.08 <sup>bc</sup>	0.92 <sup>ab</sup>	0.93 <sup>bc</sup>	0.33 <sup>cd</sup>	0.36 <sup>c</sup>	0.30 <sup>b</sup>	0.37 <sup>b</sup>
Gi	2.1 <sup>hij</sup>	2.1 <sup>hij</sup>	2.3 <sup>ghij</sup>	2.6 <sup>bc</sup>	31 <sup>ghi</sup>	35 <sup>bc</sup>	38 <sup>ef</sup>	38 <sup>ghi</sup>	0.29 <sup>k</sup>	0.31 <sup>efg</sup>	0.33 <sup>ij</sup>	0.34 <sup>cd</sup>	0.87 <sup>bc</sup>	0.08 <sup>bc</sup>	0.91 <sup>bc</sup>	0.87 <sup>bc</sup>	0.31 <sup>c</sup>	0.33 <sup>c</sup>	0.30 <sup>b</sup>	0.34 <sup>bc</sup>
Gi-Foc	2.3 <sup>ghij</sup>	2.4 <sup>ghij</sup>	2.8 <sup>bc</sup>	3.6 <sup>a</sup>	38 <sup>bf</sup>	50 <sup>a</sup>	44 <sup>ab</sup>	38 <sup>bc</sup>	0.36 <sup>ab</sup>	0.40 <sup>a</sup>	0.38 <sup>ab</sup>	0.38 <sup>abc</sup>	0.92 <sup>ab</sup>	0.97 <sup>ab</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.98 <sup>ab</sup>	0.41 <sup>bc</sup>	0.51 <sup>a</sup>	0.40 <sup>b</sup>	0.45 <sup>b</sup>
N	2.1 <sup>hhij</sup>	2.3 <sup>ghij</sup>	2.5 <sup>cd</sup>	2.8 <sup>bc</sup>	32 <sup>ghi</sup>	33 <sup>de</sup>	34 <sup>ef</sup>	36 <sup>gh</sup>	0.29 <sup>k</sup>	0.41 <sup>hi</sup>	0.33 <sup>ef</sup>	0.29 <sup>k</sup>	0.84 <sup>cd</sup>	0.88 <sup>b</sup>	0.89 <sup>bc</sup>	0.86 <sup>bcd</sup>	0.31 <sup>c</sup>	0.32 <sup>cd</sup>	0.30 <sup>c</sup>	0.34 <sup>b</sup>
N-Foc	2.4 <sup>befgh</sup>	2.2 <sup>efghi</sup>	3.06 <sup>bc</sup>	3.9 <sup>a</sup>	37 <sup>dc</sup>	42 <sup>bcd</sup>	36 <sup>de</sup>	42 <sup>bc</sup>	0.34 <sup>bc</sup>	0.49 <sup>ab</sup>	0.37 <sup>ab</sup>	0.36 <sup>abc</sup>	0.92 <sup>ab</sup>	0.95 <sup>bc</sup>	0.01 <sup>ab</sup>	0.96 <sup>abc</sup>	0.41 <sup>bc</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.40 <sup>b</sup>	0.38 <sup>b</sup>
Gi-N	1.8 <sup>j</sup>	1.8 <sup>j</sup>	2.4 <sup>bf</sup>	2.5 <sup>cde</sup>	31 <sup>ghi</sup>	32 <sup>ghi</sup>	36 <sup>cd</sup>	31 <sup>f</sup>	0.31 <sup>hi</sup>	0.41 <sup>jk</sup>	0.31 <sup>ijk</sup>	0.32 <sup>fg</sup>	0.87 <sup>bc</sup>	0.88 <sup>bc</sup>	0.89 <sup>bc</sup>	0.89 <sup>bc</sup>	0.30 <sup>c</sup>	0.31 <sup>c</sup>	0.37 <sup>bc</sup>	0.38 <sup>bc</sup>
Gi-N-foc	2.3 <sup>ghi</sup>	2.6 <sup>cdefgt</sup>	3.1 <sup>b</sup>	3.03 <sup>bc</sup>	23 <sup>j</sup>	40 <sup>bf</sup>	42 <sup>bc</sup>	44 <sup>ab</sup>	0.37 <sup>ab</sup>	0.47 <sup>ab</sup>	0.38 <sup>abc</sup>	0.37 <sup>ab</sup>	0.89 <sup>bc</sup>	0.99 <sup>ab</sup>	0.01 <sup>ab</sup>	0.99 <sup>ab</sup>	0.38 <sup>bc</sup>	0.43 <sup>bc</sup>	0.4 <sup>b</sup>	0.37 <sup>b</sup>

In each column, means followed by same letters are not significantly different at the level of 0.05.

### آنزیم پراکسیداز

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در بازه‌های زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت بعد از آلودگی در اغلب تیمارها افزایش تولید آنزیم مشاهده می‌شود ولی با افزایش زمان، مقدار آنزیم کاهش یافته است (جدول ۴). بیشترین میزان فعالیت این آنزیم مربوط به بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی و در تیمار قارچ-ریشه در گیاه بیمار است.

### تغییرات سطح نسخه‌برداری ژن‌های کیتیناز و سوپراکسید دیسموتاز

نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمار ( $p \leq 0.01$ ) و بازه زمانی ( $p \leq 0.01$ ) تأثیر معنی‌داری بر میزان نسخه‌برداری ژن‌های کیتیناز و سوپراکسید دیسموتاز داشته است اما اثر متقابل تیمار و بازه زمانی بر میزان نسخه‌برداری ژن کیتیناز معنی‌دار نبوده است (جدول ۵).

بررسی محصولات واکنش qRT-PCR نشان داد که آغازگرهای مورد استفاده به صورت تخصصی قادر به سنتز قطعات مورد نظر بوده و هیچ‌گونه محصول غیر اختصاصی تولید نشده است و یا پدیده اتصال آغازگره (دایمر) اتفاق نیافتاده است (شکل‌های ۱ و ۲).

نتایج مقایسه میانگین داده‌های نسخه‌برداری در بازه‌های زمانی نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن کیتیناز (۸/۷۵۹۶) و همچنین ژن سوپراکسید دیسموتاز (۸/۴۳) مربوط به بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی بوده و از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با بازه زمانی ۲۴ و ۱۲۰ ساعت بعد از نمونه‌برداری دارد (جدول ۶).

نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین بیان ژن کیتیناز (۱۰/۱۵۵) مربوط به تیمار قارچ-ریشه در گیاه بیمار بوده و کمترین میزان بیان ژن کیتیناز (۷/۲۶۵۶) مربوط به تیمار شاهد سالم می‌باشد (جدول ۶).

نتایج به دست آمده از بررسی تغییرات پروتئینی در تیمارهای اعمال شده نشان می‌دهد که بیشترین میزان پروتئین کل در گیاه (۵۰/۲۹۲ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) مربوط به تیمار قارچ-ریشه در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی است. کمترین میزان تغییرات پروتئین در تیمارها بدون در نظر گرفتن شاهد مربوط به تیمار فوزاریوم تنها و بدون کود مشاهده گردید (۳۰/۸۲۷ میلی‌گرم / گرم وزن تر). میزان پروتئین کل ۷۲ ساعت بعد از بیماری جهش بالایی داشته که نشان از عکس‌العمل ذاتی گیاه در ساعات اولیه مواجهه با بیماری است (جدول ۴).

### آنزیم کاتالاز

نتایج مقایسه میانگین اثر کودهای زیستی بر مقادیر کاتالاز نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۴۰) مربوط به بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی و کمترین میزان فعالیت آنزیمی در بین تیمارهای کودی (۰/۲۹) مربوط به بازه زمانی ۱۶۸ ساعت بعد از نمونه‌برداری است (جدول ۴). با گذشت زمان نمونه‌برداری بعد از بیماری میزان آنزیم کاهش یافته و بیشترین کاهش مربوط به مراحل اولیه بیماری است. به طور کلی در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از آلودگی در اغلب تیمارها میزان آنزیم با افزایش روبرو بوده است که باز هم در تیمار قارچ-ریشه این افزایش آنزیم با زمان مشهودتر است.

### آنزیم پلی فنل اکسیداز

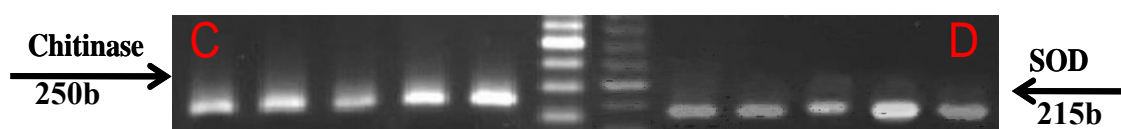
نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (۰/۹۹) مربوط به تیمار قارچ-ریشه و در بازه زمانی ۱۲۰ ساعت بعد از بیماری است. کمترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تیمارهای کودی (۰/۸۴) مربوط به تیمار نیتروکسین تنها است (جدول ۴). افزایش نسبی میزان آنزیم در بازه زمانی ۱۶۸ ساعت بعد از آلودگی، نشان از فاز تأخیری این آنزیم در ایجاد و القاء مقاومت گیاه به تنش بیماری است.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر کودهای زیستی بر بیان ژنهای کیتیناز و سوپراکسید دسموتاز در گیاه نخود ایرانی سالم و آلوده به قارچ *F. oxysporum fsp ciceris* در بازه‌های مختلف زمانی مختلف

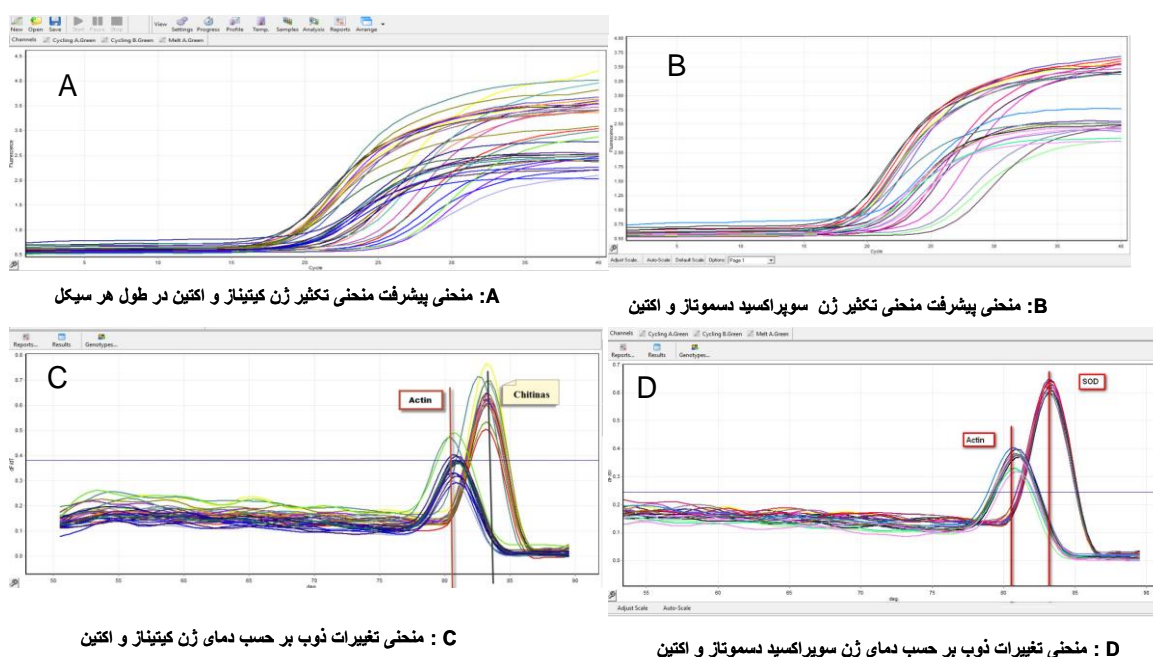
**Table 5. Analysis of variance of bio-fertilizers effect on expression level of the superoxidase dismutase and chitinase genes in chickpea plants infected with *F. oxysporum fsp. ciceris* and healthy plants at different time periods**

Sources of variance	DF	Mean of square	
		Superoxide dismutase	Chitinase
Time period	2	2.80291*	3.7594**
Treatment	7	5.49617**	9.0834**
Treatment× Time periods	14	0.37259 <sup>ns</sup>	1.0852 <sup>ns</sup>
Error	-	0.80694	0.7625
CV	-	10.96	48.10

\* and \*\* showing data that are significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively. ns showing data that are not significant.



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژنهای کیتیناز (C) و ژن سوپراکسید دسموتاز (D)  
Figure 1. Electrophoresis results of PCR products of Chitinase (C) and Superoxidismutase genes (D)



شکل ۲- منحنی‌های ذوب قطعات تکثیری تولیدشده در واکنش qRT-PCR  
Figure 2. Thermal melting curve of amplified fragments produced in Real time-PCR reaction



جدول ۶- مقایسه میانگین اثر کودهای زیستی و زمان بر میزان بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کیتیناز در گیاه نخود ایرانی سالم غیر آلوده و آلوده به قارچ *Fusarium oxysporum* fsp. *ciceris*

**Table 6. Mean of variance of bio-fertilizers and time period effect on expression level of superoxidase dismutase and chitinase genes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* fsp. *Ciceris* and healthy plants.**

	Superoxide dismutase	Chitinase
Sampling time periods (hours)		
24	7.80 <sup>b</sup>	7.95 <sup>b</sup>
72	8.43 <sup>a</sup>	8.75 <sup>a</sup>
120	8.35 <sup>a</sup>	8.22 <sup>b</sup>
Treatments		
Sh	7.18 <sup>d</sup>	7.26 <sup>c</sup>
FO	8.40 <sup>bc</sup>	8.55 <sup>b</sup>
Gi	7.77 <sup>bcd</sup>	7.58 <sup>c</sup>
Gi-Fo	9.67 <sup>a</sup>	10.15 <sup>a</sup>
N	7.78 <sup>bcd</sup>	7.55 <sup>c</sup>
N-Fo	5.11 <sup>dc</sup>	8.77 <sup>b</sup>
Gi-N	5.57 <sup>cb</sup>	7.62 <sup>c</sup>
N-Gi-Fo	8.64 <sup>b</sup>	9.15 <sup>b</sup>

In each column, means followed by same letters are not significantly different at the level of 0.05.

آنزیم‌های پلی فنول اکسیداز به طور هماهنگ در مقاومت بسیاری از گیاهان مشاهده شده است (Mayer, 2006). فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ارقام مختلف خیار بعد از مایه‌زنی با قارچ *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شد که در همه ارقام ابتدا فعالیت آنزیم افزایش سپس کاهش و در پایان مجدداً افزایش یافته که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (Shouwei et al., 2009) افزایش میزان ترکیبات فنله و پروتئین کل در گیاه خیار آلوده به بیماری مرگ گیاهچه پستیومی (Sabbagh and Valizadeh, 2016)، گندم آلوده به بیماری اسکب گندم (Sabbagh et al., 2016; Sabbagh et al., 2017a) و گوجه فرنگی آلوده به بیماری پژمردگی فوزاریومی (Naing et al., 2015; Lamia et al., 2017) به اثبات رسیده که همگی نشان‌دهنده اثر مثبت کودهای زیستی در القاء مقاومت گیاهان به بیماری‌های ایجاد شده می‌باشد. با کاربرد چنین القاگرهایی، امکان غربالگری ارقام گیاهی سازگار و

## بحث

استفاده از عوامل زیستی کنترل‌کننده بیماری‌های گیاهی اگرچه نسبت به کاربرد سموم شیمیایی اثرات سریع ندارند ولی علاوه بر تولید گیاهان سالم و عاری از باقی‌مانده سموم، در دراز مدت در حفظ محیط زیست و بسترهای آبی و خاکی موثر می‌باشند. استفاده از باکتری *Mesorhizobium ciceris* در گیاه نخود آلوده به بیماری پژمردگی فوزاریومی باعث افزایش مقاومت گیاه به بیماری و افزایش شاخص‌های رشدی و همچنین افزایش تعداد گره‌های حاوی باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن شده است (Jahan et al., 2020). در یکی از جدیدترین مطالعات، نشان داده شده است که باکتری‌های تقویت‌کننده رشد علاوه بر افزایش آنزیم‌های دفاعی در گیاه نخود، توانسته‌اند باعث بازدارندگی از رشد و توسعه قارچ فوزاریوم در داخل گیاه نخود شوند (Nagpal et al., 2020) که این نتایج در ابعاد آنزیمی می‌تواند نتایج تحقیق حاضر را تأیید نماید. افزایش قابل توجه ترکیبات فنلی و

بعد از نمونه برداری به بیشترین میزان خود رسید. مطالعات گذشته نشان داده که با بیان ژن کیتیناز افزایش یافته است. مطالعات اخیر نشان داده است که افزایش میزان آنزیم های آنتی اکسیدانی و همچنین تعدادی از یونها، نظیر آهن در حضور قارچ ریشه‌ها علاوه بر مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی باعث افزایش قدرت کلونیزه شدن ریشه بوسیله گونه های قارچ-ریشه شده است و با حضور قارچ ریشه‌ها مکانیسم های سازش پذیری گیاه در تقابل با تنش زیستی افزایش یافته است (Diagne et al., 2020). کیتیناز باعث تخریب دیواره سلولی قارچ بیمارگر می شود و این بیان ژن نوعی مقاومت القایی در گیاه ایجاد کرده که باعث کاهش خسارت بیمارگر می گردد (El-Katatny et al., 2001; Shih et al., 2000). در مطالعه‌ای که روی ارقام مختلف سویای مقاوم به *Meloidogyne incognita* انجام شد مشخص گردید که بیان ژن کیتیناز به میزان سه تا چهار برابر افزایش نشان داده است (Cao et al., 1997). فعالیت ضد قارچی کیتیناز به وسیله محققان اثبات شده است، به طوری که آنها پس از خالص سازی و قرار دادن این پروتئین در محیط کشت حاوی بیمارگرهای قارچی مشاهده کردند که رشد این قارچ‌ها در نواحی که این پروتئین حضور دارد، محدود می شود که این می تواند دلیل خوبی برای تأثیر مستقیم پروتئین های مرتبط با بیماریزایی (PR) روی بیمارگرها باشد (Saikia et al., 2005). گیاهان برای مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) دارای سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی هستند و در شرایط طبیعی بین میزان تولید ROS و فعالیت مکانیسم‌های از بین برنده ROS تعادل وجود دارد، اما در تنش‌های محیطی و زنده این تعادل به هم می خورد و موجب تنش اکسایشی در گیاهان می گردد (Baxter et al., 2014; Singh, 2019). نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی مانند آنزیم های آنتی اکسیدانی می تواند در تعیین نقش و کارایی الفاکتندگان

تأثیرپذیر از عوامل زنده زیستی امکان پذیر می شود. نتایج حاصله حاکی از آن است که وقتی گیاه نخود در تنش با بیماری قرار گرفت میزان فعالیت آنزیمی کاتالاز به بالاترین سطح خود رسید و این افزایش آنزیمی می تواند دلیلی بر عدم تخریب دیواره سلولی باشد. بسیاری از آنتاگونیست‌ها سبب القاء مقاومت در گیاه و تغییر در میزان آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، و پلی فنل اکسیداز و ترکیبات دیگری نظیر فنل در گیاه می شوند (Salehpour et al., 2005). نقش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهان تحت تنش برای ترمیم و مقاومت در برابر تجمع گونه‌های اکسیژن فعال به اثبات رسیده است (Kapoor et al., 2019; Gupta et al., 2018). در حالت تنش، گیاهان با افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی باعث کاهش میزان پراکسید هیدروژن از طریق تجزیه آن به یون هیدرواکسید می شوند. این فعل و انفعالات مانع تخریب غشاء سلولی و توقف چرخه انتقال الکترون در کلروپلاست و میتوکندری شده و از تخریب مولکول های دی ان آ و پروتئین‌ها جلوگیری می نماید (Kong et al., 2018; Ziv et al., 2018). کاهش میزان کاتالاز در سلول تحت تنش منجر به افزایش یون های پراکسید هیدروژن شده و می تواند با سمی کردن محیط سلولی منجر به مرگ سلول شده و واکنش فوق حساسیت گیاه را فعال نماید. این فعل و انفعالات در گیاهان مقاوم صورت می گیرد و در گیاهان حساس یا نیمه مقاوم واکنش‌های مقاومتی با افزایش رادیکال‌های آزاد همراه با مهار بیمارگر بوده است که این افزایش فعالیت آنزیمی شاخصی برای افزایش مقاومت گیاه در نظر گرفته می شود. با توجه به نوسانات فعالیت آنزیمی در بازه‌های زمانی، چنین برمی آید که تیمارهای کودی قادر به تغییر فعالیت‌های بیوشیمیایی گیاه در جهت ایجاد و القاء مقاومت شده‌اند. نتایج مقایسه میانگین تیمارها حاکی از این است که وقتی گیاه با بیمارگر مایه زنی شد بیان ژن کیتیناز در ساعاتی

### نتیجه گیری کلی

استفاده از تجزیه و تحلیل بیان ژن می تواند علاوه بر درک بهتر تغییرات مولکولی در گیاهان تحت تنش، نتایج حاصل از تغییرات بیوشیمیایی را به اثبات برساند. افزایش میزان آنزیم های آنتی اکسیدانی و همچنین ژن های مسئول مقاومت در گیاه می تواند نقش تعیین کننده کودهای زیستی را برجسته تر نماید. با توجه به روش های اعمال شده در این آزمایش و نتایج مثبت به دست آمده چنین نتیجه گیری می شود که آماده سازی و تقویت بستر کشت گیاه و یا محافظت ابتدایی از طریق بذر مال کردن بذرها می تواند مقاومت اکسیدانی گیاه را علیه بیمارگرها در اوایل مرحله رشدی فراهم نماید. چنین مطالعاتی می تواند در انتخاب ارقام گیاهی مقاوم و یا ارقام پر محصول حساس به تنش بیماری که تأثیر پذیری بالایی از القاء کنندگان مقاومت دارند مورد توجه و بهره برداری قرار گیرد.

### سپاس گذاری

این تحقیق در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل انجام گردید که در اینجا از تمام کارشناسان و همکاران این واحد تحقیقاتی که ما را در اجرای این پژوهش یاری نمودند تقدیر و تشکر به عمل می آید.

مقاومت گیاهی مفید واقع شوند. بررسی بیان ژن های مربوط به آنزیم های آنتی اکسیدانی یکی از شاخصه های القاء مقاومت در حالت تنش و تیمار با محرک ها می باشد. تأثیر ماده کیتوزان در القاء مقاومت گندم به بیماری بلاست نشان داد که ۲۴ ساعت بعد از بیماری میزان آنزیم ها و ژن های مورد مطالعه افزایش نشان داده است (Gazimohseni and Sabbagh, 2016). در خیار آلوده به بیماری مرگ گیاهچه این بازه زمانی برای افزایش شاخصه های مقاومتی ۴۸ ساعت بعد از بیماری ثبت شده است (Sabbagh et al., 2018). تفاوت در بازه های زمانی در القاء مقاومت می تواند به عامل بیماری، رقم گیاه و عامل القاء کننده مقاومت وابسته باشد. استفاده از عوامل زیستی قارچی در القاء مقاومت خیار به بیماری مرگ گیاهچه و افزایش آنزیم ها و ژن های مرتبط با مقاومت گزارش شده است (Sabbagh et al., 2017b) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. دستیابی به نتایج بهتر مستلزم همکاری گروهی دانشمندان در حوزه های مختلف زیستی نظیر میکروبیولوژی، ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهی می باشد. این همکاری های مشترک می تواند منجر به شناسایی گونه های مفید و موثر باکتریایی و قارچی در سیستم های کشاورزی مختلف گردد.

### REFERENCE

- Bahrani, A., Pourreza, J., and Joo, M.H. 2010. Response of winter wheat to co-inoculation with *Azotobacter* and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under different sources of nitrogen fertilizer. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 9(4): 376–84.
- Bao, J.R., and Lazarovits, G. 2001. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence *Fusarium* wilt control. *Phytopathology*, 91(5): 449–456.
- Baxter, A., Mittler, R., and Suzuki, N. 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5): 1229–1240.
- Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2): 94–100.

- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X. 1997. The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88(1): 57–63.
- Chen, J.H. 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. Proceedings of the International workshop on sustained management of the soil-rhizosphere system for efficient crop production and fertilizer use, Krom Phatthanā Thādin, Thailand, P.169.
- Chérif, M., Arfaoui, A., and Rhaiem, A. 2007. Phenolic compounds and their role in bio-control and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 2(1): 7–21.
- El-Katatny, M., Somitsch, W., Robra, K.-H., El-Katatny, M., and Gübitz, G. 2000. Production of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology and Biotechnology*, 38(3): 173–180.
- Diagne, N., Ngom, M., Djighaly, P. I., Fall, D., Hoher, V., and Svistoonoff, S. 2020. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: Importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Diversity*, 12(10): 370–379.
- Elavarthi, S., and Martin, B. 2010. Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. *Methods in Molecular Biology*, 639: 273–281.
- Jahan, M., Shazad, U., Naqvi, S., Tahir, I., Abbas, T., and Iqbal, M. 2020. Effects of Mesorhizobium ciceri and Biochar on the growth, nodulation and antifungal activity against root pathogenic fungi in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 11(2): 520–532.
- Gazimohseni, V., and Sabbagh, S.K. 2016. Effect of chitosan on gene expression and activity of enzymes involved in resistant induction to fusarium of wheat. *Iranian Journal of Plant Protection*, 46(3): 363–39 (In Farsi with English summary).
- Gill, S.S., Anjum, N.A., and Gill, R. 2015. Superoxide dismutase mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14): 10375–10394.
- Gonçalves-Soares, D., Zanette, J., Yunes, J.S., Yepiz-Plascencia, G.M., and Bainy, A.C. 2012. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain. *Marine Environmental Research*, 75: 54–61.
- Gupta, D.K., Palma, J.M., and Corpas, F.J. 2018. Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants. Springer international publishing. Switzerland.
- Hammerschmidt, R., Métraux, J.P., and Van Loon, L. 2000. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 1–6.
- Joshi, k., Parthasarathy Rao, P., Gowda, R.B., Jones, S.N., Silim, K.B., and Jagdish, K. 2010. The World chickpea and pigeonpea economies facts, trends, and outlook. ICRISAT International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics Patancheru, Andhra Pradesh, India: PP. 51.
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R., and Singh, J. 2019. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene*, 19: 100–120.

- Kong, X., Wei, B., and Gao, Z. 2018. Changes in membrane lipid composition and function accompanying chilling injury in bell peppers. *Plant and Cell Physiology*, 59(1): 167–178.
- Karimzadeh Asl, K., and Hatami, M. 2019. Application of zeolite and bacterial fertilizers modulates physiological performance and essential oil production in dragonhead under different irrigation regimes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(1): 17–29.
- Lamia, B., Messaoud, B., Ahmed, C., and Lakhdar, K. 2017. Activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in the biocontrol of tomato Fusarium wilt. *Plant Protection Science*, 53(2): 78–84.
- Liu, J.J., and Ekramoddoullah, A.K. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(1–3): 3–13.
- Mayer, A.M. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21): 2318–23131.
- Nagpal, S., Sharma, P., Sirari, A., and Gupta, R. 2020. Coordination of *Mesorhizobium sp.* and endophytic bacteria as elicitor of biocontrol against Fusarium wilt in chickpea. *European Journal of Plant Pathology*, 158(1): 143–161.
- Naing, K.W., Nguyen, X.H., and Anees, M. 2015. Biocontrol of Fusarium wilt disease in tomato by *Paenibacillus ehimensis* KWN38. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(1): 165–174.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 45–52.
- Sabbagh, E., Sabbagh, S.K., Panjehkeh, N., and Bolok-Yazdi, H.R. 2018. Jasmonic acid induced systemic resistance in infected cucumber by *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Agricultural Sciences*, 24(1): 143–152 (In Farsi with English summary).
- Sabbagh, S., Kermanizadeh, B., Gholamalizadeh, A., and Sirousmehr, A. 2016. Effects of fertilizer treatments on components, performance components and induce resistance to wheat scab disease. *Iranian Journal of Filed Crop Science*, 47(1): 77–85 (In Farsi with English summary).
- Sabbagh, S., Poorabdollah, A., Sirousmehr, A., and Gholamalizadeh, A.A. 2017a. Bio-fertilizers and systemic acquired resistance in Fusarium infected wheat. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19(2): 453–464.
- Sabbagh, S., Roudini, M., and Panjehkeh, N. 2017b. Systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* and *Glomus mossea* on cucumber damping-off disease caused by *Phytophthora melonis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50(7–8): 375–388.
- Sabbagh, S., and Valizadeh, S. 2016. Effect of bio-fertilizers on greenhouse cucumber resistant to damping-off disease caused by *Pythium aphanidermatum* and increase of yield component. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 5(1): 111–122 (In Farsi with English summary).
- Saikia, R., Singh, B., Kumar, R., and Arora, D. 2005. Detection of pathogenesis-related proteins—chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase in induced chickpea. *Current Science*, 4(2): 659–663.
- Salehpour, M., Etebarian, H., Roustaei, A., Khodakaramian, G., and Aminian, H. 2005. Biological control of common root rot of wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by Trichoderma Isolates. *Plant Pathology Journal*, 4(1): 85–90.

- Shih, C.-Y.T., Khan, A.A., Jia, S., Wu, J., and Shih, D.S. 2001. Purification, characterization, and molecular cloning of a chitinase from the seeds of *Benincasa hispida*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(3): 501–509.
- Shouwei, L., Fengzhi, W., and Yanling, M. 2009. Effects of *Fusarium* wilt pathogen on the enzyme activity of cucumber cultivars of different resistance. *Plant Protection*, 15(2): 55–65.
- Singh, D. 2019. Allelochemical Stress, ROS and Plant Defence System. *International Journal of Biological Innovations*, 1(1): 31–35.
- Smith, J.L., De Moraes, C.M., and Mescher, M.C. 2009. Jasmonate-and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science*, 65(5): 497–503.
- Taranto, F., Pasqualone, A., and Mangini, G. 2017. Polyphenol oxidases in crops: biochemical, physiological and genetic aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2): 373–384.
- Tilak, K., Ranganayaki, N., and Pal, K. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 89(1): 136–150.
- Tarafdar, A., Rani, T.S., Chandran, U., Ghosh, R., Chobe, D.R., and Sharma, M. 2018. Exploring combined effect of abiotic (soil moisture) and biotic (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) stress on collar rot development in chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 9(1): 1154–1165.
- Varshney, R.K., Song, C., and Saxena, R.K. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnology*, 31(3): 240–246.
- Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3): 1061–1070.
- Ziv, C., Zhao, Z., Gao, Y.G., and Xia, Y. 2018. Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1088–1100.



© 2021 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

## Impact of fungi and bacterial-based bio-fertilizers on biochemical and molecular changes and induced resistance of chickpea under *Fusarium* wilting disease

S. K. Sabbagh<sup>1\*</sup>, A. Karimi<sup>2</sup> and M. Ghorbani<sup>3</sup>

1. \*Corresponding Author: Associate Professor of Plant biotechnology, Campus of Science, Department of Biology, Yazd University, Yazd, Iran (sksabbagh@yazd.ac.ir)

2. M.Sc. Graduate, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural, University of Zabol, Zabol, Iran

3. Assistance Professor of Plant Pathology, Department of Biology, Faculty of Biology, University of Birjand, Birjand, Iran

(DOI): 10.22055/PPR.2020.16516

Received: 12 October 2020

Accepted: 27 January 2021

### Abstract

#### Background and Objectives

Chickpea is an important grain legume in Asia, and makes a significant contribution to the food and nutrition security of the people. *Fusarium* wilt is an important disease of chickpea, causing significant yield loss. This malady is the most important and destructive soil-borne disease of chickpea in Iran. Excessive use of chemical fungicides to control this soil-born pathogen can have adverse effects on human health and environment, and can lead to fungal resistance to fungicides. Increasing induced resistance using resistance inducers as bio-fertilizers can be considered as an alternative method to plant disease control. The use of nitroxine a bio-fertilizer containing *Azospirillum* and *Azotobacter* species as well as mycorrhizal fungi to induce systemic resistance mechanisms has been demonstrated in different plants under biotic stress. The aim of this study was to investigate the effect of bio-fertilizers to induce acquired resistance in chickpea plant under pathogen stress as compared to non-infected plants.

#### Materials and Methods

The change of some antioxidant enzymes and gene expression analysis was examined to evaluate the effect of biofertilizers on increasing resistance in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* fsp. ciceri. A factorial experiment based on complete randomized block design with three replications was conducted under greenhouse conditions in 2014. The eight treatments included :1) Plant control without infection (sh), 2) *Fusarium oxysporum* (Foc), 3) Mycorrhiza (Gi), 4) Nitroxin (N), 5) Mycorrhiza+Nitroxin+Infection (GI+N+F), 6) Mycorrhiza+Nitroxin (GI+N), 6) Mycorrhiza + *Fusarium oxysporum* (Gi+F) and 8) Nitroxin+Fusarium (N+F). Mycorrhiza, *Fusarium oxysporum* and Nitroxin+Fusarium (M+F+N) were used in this study. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase activity was assessed by spectrophotometer with corresponding wavelengths. Total RNA was isolated using an extraction kit, according to the manufacturer's protocol. Real-time RT-PCR was performed in a thermocycler using the following program: 5 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 30sec at 95°C, 30 min at 59°C and 30 min at 72 °C, with final extension for 10min at 72°C. All acquired data were analyzed using SAS software version 9 and mean values were compared using Duncan's multiple range test. The

changes of transcript level were measured via a comparative technique. Actin genes were used as internal reference.

### Results

Data analysis revealed that the highest rate of total phenol and protein (50/292 mg/mL) in treated plants was related to nitroxin and mycorrhiza treatments, respectively. The greatest change in all three enzymes was observed in mycorrhiza treatment 72h after plant infection. Mean comparison of gene expression data at different time intervals showed a high expression level 72h after plant infection in mycorrhizal application. Our results indicated that the maximum effect of bio-fertilizer application occurred 72h following plant infection with the pathogen. Application of both biofertilizers without *Fusarium* infection did not show any significant change in the expression level of the two tested gene.

### Discussion

Biofertilizer agents can improve plant growth through several different mechanisms such as protecting the plant under stressful conditions and defense against plant pathogen which can lead to reduced disease and death. The increase of total phenol and protein as the precursor of plant defense mechanism through apply biofertilizers in infected plants indicated the efficiency of these compounds to reduce disease. Antioxidant enzymes as a biomarker were used to evaluate the effect of exogenic compounds on increasing plant resistance against biotic stress. As with a similar work, we found a correlation between biofertilizer application and enzyme activity. Other parameters such as phenotypic characters and yield components can be used as a marker to investigate the effect of biofertilizers in these domains. Analysis of variance of the data related to gene expression confirmed the efficiency of biofertilizers on inducing resistance. Based on our results, we recommended use of biofertilizers in a single or mixture form to improve growth conditions in stressed plants especially under biotic stress. To make the bio-fertilizer more efficient in the field, a coordinated work by different science domains as bacteriology, chemistry, genetics, and agronomy as well as farmers as bio-fertilizer consumers seems necessary. This coordination could facilitate the adaptation of fungi and bacterium-based bio-fertilizers to different agriculture systems.

**Keywords:** *Mycorrhizae, Nitroxin, Chitinase, Superoxide dismutase, Gene expression, Antioxidant enzymes*