

## بررسی میزان بیان تعدادی از ژن‌های مؤثر در دفاع بر علیه کنه دولک‌های *Tetranychus urticae*, در چند ژنوتیپ لوبیا

### Expression of Some Defensive Genes Responsible for Direct and Indirect Defense Against Spider Mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari Tetranychidae), in Some Common Bean cultivars

زهرا طهماسبی<sup>۱\*</sup>، عبدالهادی حسین‌زاده<sup>۲</sup>، هوشنگ علیزاده<sup>۳</sup> و حسن سلطانیلو<sup>۳</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۵

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۱

#### چکیده

تغذیه گیاهخواران موجب فعال شدن سیستم دفاع مستقیم و غیرمستقیم در گیاه می‌شود. به منظور بررسی نقش تعدادی از ژن‌های مؤثر در دفاع مستقیم و یا غیرمستقیم لوبیا در برابر کنه تارتن دولک‌های، میزان بیان این ژن‌ها در تعدادی از ژنوتیپ‌های حساس (ژنوتیپ اختر) و مقاوم (ناز و Ks41128) لوبیا به کنه دولک‌های، قبل و بعد از آلودگی به کنه دولک‌های بوسیله QRT-PCR مقایسه شد. سپس به منظور تأیید نتایج آزمایش QRT-PCR، میزان جلب کنه شکارگر، *Phytoseiulus persimilis*، با کمک دستگاه بوسنج در کلیه ژنوتیپ‌های لوبیا بررسی گردید. نتایج QRT-PCR نشان داد که در بین ژن‌های مورد مطالعه فقط بیان ژن LOX که هم در دفاع مستقیم و هم غیرمستقیم نقش دارد، در ژنوتیپ‌ها به‌طور معنی‌داری متفاوت بود، بدین صورت که تنها ژنوتیپ مقاوم ناز افزایش معنی‌دار بیان این ژن را بعد از آلودگی به کنه دولک‌های نشان داد و بیان این ژن در ژنوتیپ حساس اختر کاهش هم نشان داد. نتایج آزمون بوسنجی نیز نشان داد که تنها ژنوتیپ مقاوم ناز بعد از آلودگی به کنه دولک‌های قادر به جلب معنی‌دار کنه شکارگر می‌باشد. بنابراین افزایش جلب کنه شکارگر و افزایش بیان معنی‌دار ژن LOX در ژنوتیپ مقاوم ناز بعد از آلودگی به کنه تارتن می‌تواند نقش این ژن را در دفاع مستقیم و غیرمستقیم لوبیا در برابر کنه دو لکه‌ای تأیید نماید.

واژه‌های کلیدی: *Phytoseiulus persimilis*، QRT-PCR، ژن LOX

۱. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام  
۲. دانشیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج  
۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

\* نویسنده مسوول Email: z.tahmasebi@mail.ilam.ac.ir

یکی از جدی‌ترین آفات لوبیا آفت کنه دولکه‌ای است که در بسیاری از مزارع ایران موجب خسارت‌های معنی‌داری به محصولات زراعی می‌گردد. خسارت کمی و کیفی این کنه تا صد درصد بر روی محصول لوبیا مشاهده شده است (سعیدی و /ربایی، ۱۳۸۴). لوبیا، همچون دیگر گیاهان، روش‌های دفاعی مختلفی برای مقابله با آفات به کار می‌بندد. این روش‌های دفاعی به دو گروه اصلی دفاع مستقیم و غیرمستقیم تقسیم می‌شوند که در دفاع مستقیم، گیاه با استفاده از سدهای فیزیکی و شیمیایی مستقیماً اثر منفی بر بیولوژی و باروری آفت می‌گذارد و در دفاع غیرمستقیم، گیاه با جلب دشمنان طبیعی موجب کاهش جمعیت آفت می‌شود. یکی از مقوله‌های جدید و جالب توجه در زمینه‌ی مقاومت گیاهان به آفات تعیین رابطه‌ی بین دفاع مستقیم و غیرمستقیم می‌باشد (Dicke et al. 2003, Arimura et al. 2005). حدود ۲۰ سال پیش کشف شد 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 خود دفاع می‌کنند. استفاده از شکارگرها و پارازیت‌ها برای کنترل بیولوژیک در سطح گلخانه و مزرعه 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. جالب است که بینیم آیا این روش‌ها می‌تواند منجر به تولید گیاهانی شود که برای جلب شکارگران و کنترل بیولوژیک تغییر یا بهبود یافته اند؟ (Arimura et al. 2005, Baldwin and Preston 1999, Turlings et al. 1990) تنوع در جلب دشمنان طبیعی آفات، در بین گونه‌های گیاهی، بین ارقام مختلف گیاهی و حتی بین افراد مختلف یک ژنوتیپ مشاهده شده است (Dicke and Takabayashi 1996). برای نمونه، برگ‌های جوان کدو پس از آلودگی به کنه دولکه‌ای، مواد فراری را تولید می‌کنند که موجب جلب کنه شکارگر می‌شود، در حالی که برگ‌های مسن‌تر این قابلیت را ندارند (Takabayashi et al. 1994). در پژوهشی، میزان جلب‌شدگی کنه شکارگر به گیاهان ذرت، سیب، لوبیای چشم بلبلی و کدوی آلوده به کنه دولکه‌ای مقایسه شد و گرایش شکارگر به

سمت لوبیای چشم بلبلی و کدو به طور معنی‌داری بیشتر بود (Takabayashi و همکاران، 2004). Degen et al. (2004) تنوع ژنتیکی را در بین ۳۱ اینبرد لاین ذرت از لحاظ میزان و نوع ترکیبات فرار جلب‌کننده شکارگر اختصاصی آفت *Spodoptera littoralis* مشاهده نمودند.

کنه شکارگر، *P. persimilis*، یکی از دشمنان اختصاصی کنه دولکه‌ای بوده و هم اکنون در سطح جهانی برای کنترل کنه دولکه‌ای از آن استفاده می‌شود (Garcia-mari and Gonzalez-zamora, 1999). با وجود پیشینه به نسبت طولانی واردسازی این شکارگر از هلند به ایران (سال ۱۳۶۷) (دانشور و ابائی، ۱۳۷۲) که مطالعات صورت گرفته در زمینه استفاده از شکارگر غیربومی *P. persimilis* در کنترل کنه تارتن در ایران اندک است و هنوز جای زیادی برای مطالعه وجود دارد. از جمله مطالعات صورت گرفته در ایران می‌توان به لک و /ربایی (۱۳۷۷) توانایی این شکارگر را در مزارع آزمایشی لوبیای شهرستان اراک بررسی کردند. سعیدی (۱۳۸۱) که عملکرد سه ساله کنه شکارگر را در کنترل کنه تارتن روی میزبان مشابه مطالعه کردند و دانشور (۱۳۷۲) کارایی این شکارگر را در مزارع پنبه، سویا و لوبیای شرق استان مازندران ارزیابی نمودند) اشاره کرد که همگی به نتایج مثبتی در به کارگیری از این شکارگر در کنترل کنه تارتن دولکه‌ای دست یافتند.

به‌منظور شناسایی اساس ژنتیکی مقاومت به کنه دولکه‌ای و شناسایی ژن‌ها و مسیرهای انتقال پیام درگیر در دفاع مستقیم و غیرمستقیم نیز مطالعاتی صورت گرفته است. در لوبیا، تعدادی از ژن‌هایی که در پاسخ به آلودگی کنه دولکه‌ای در گیاه القاء می‌شوند از جمله: ژن‌های PR2 (1,3-β-glucanase)، PR3 (کتیناز)، یک نوع PR4 اسیدی (کتیناز)، فیل آلانین آمینونیلایز (PAL) و فرنزیل پیروفسفات سنتتاز (FPS) (آریمورا و همکاران، 2000)، ژن‌های درگیر در بیوسنتز اتیلن (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase) و (s-adenosylmethionine) (SAMS) و یک ژن درگیر در بیوسنتز پلی‌آمین‌ها (آریمورا و همکاران، 2002) SAM decarboxylase (SAMDC) (آریمورا و همکاران، 2000)، یک مونوترپن سنتتاز (LjEβos) (آریمورا و همکاران، 2004) و یک ژن *β-ocimene synthase* (*phaseolus lunatus*) (PLOS) (آریمورا و همکاران، 2008)، شناسایی و توالی‌یابی شده‌اند.

تاکنون مطالعات اندکی برای شناسایی رابطه‌ی بین مکانیسم‌های دفاع مستقیم و غیرمستقیم صورت گرفته است. این که چطور گیاهان سیستم‌های دفاعی مستقیم و

دو لکه‌ای آلوده شدند. سه روز پس از آلودگی، RNA کل از برگ های گیاهان سالم و آلوده هر ژنوتیپ با استفاده از Rnaeasy Plant Mini kit (شرکت کیاژن) و بر اساس دستور العمل موجود در کیت استخراج شد. پس از استخراج، کمیت RNA با استفاده از نانودراپ و کیفیت آن با کمک ژل الکتروفورز تایید گردید. سپس رشته اول cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم، RNA کل با استفاده از آنزیم ترنس کریپتاز معکوس RevertAid M-MULV (شرکت فرمنتاز) و Oligo (dt)<sub>18</sub> در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، سنتز شد. پس از ساختن DNA مکمل، کمیت و کیفیت آن با کمک نانودراپ و ژل الکتروفورز تایید گردید.

در این تحقیق میزان بیان شش ژن درگیر در دفاع مستقیم و/ یا غیرمستقیم، شامل دو ژن کدکننده پروتئین های مرتبط با بیماریزایی (PR-3 و PR-4)، لیپوکسیژناز (LOX)، فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) (آریمورا و همکاران، 2000)، ژن SAMS (کدکننده آنزیم بیوسنتز اتیلن) (آریمورا و همکاران، 2002) و ژن OS (کدکننده آنزیم سنتز یکی از ترکیبات فرار جلب کننده کنه شکارگر (E)-β-Ocimene) (آریمورا و همکاران، 2004) در سه ژنوتیپ لوبیا ی مورد نظر در دو شرایط نرمال و آلوده به آفت کنه تارتن دولکه ای تعیین و با یکدیگر مقایسه شد. همچنین جهت تصحیح و تعیین میزان نسبی بیان ژن های هدف از ژن مرجع cons7 که کد کننده متیلو پروتئیناز می باشد استفاده گردید (Libault et al. 2008) به منظور طراحی پرایمر ژن های مورد بررسی، توالی محافظت شده آنها از سایت ان سی بی آی (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) گرفته شد. کد مربوط به هر توالی در جدول یک آورده شده است. سپس آغازگرهای مرتبط با این توالی ها با استفاده از نرم افزار پرایمر تری (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) طراحی شدند (جدول ۱).

از آنجائی که اختصاصی عمل نمودن آغازگرها در روش QRT-PCR از اهمیت بالایی برخوردار است، پس از طراحی و سنتز آغازگرها (توسط شرکت سیناژن)، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استاندارد روی چند نمونه از cDNAهای سنتز شده، استفاده شد و محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگاروز یک درصد مورد بازبینی قرار گرفت.

برای انجام واکنش QRT-PCR نمونه‌های سنتز شده cDNA به همراه میزان کافی یخ در یک ظرف عایق بسته‌بندی گردید و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل

غیرمستقیم خود را با هم تلفیق می‌کنند تا کنون به خوبی شناسایی نشده است (Kant et al. 2004). با کمک ترکیب دو شیوه‌ی اندازه‌گیری ترکیبات فرار و تکنیک ریزآرایه وقایعی را که در طول ۵ روز بعد از آلودگی گوجه فرنگی به کنه دولکه‌ای رخ می‌دهد را بررسی کردند و نشان دادند گیاه پاسخ‌های دفاعی غیر مستقیم را دیرتر از پاسخ‌های دفاعی مستقیم آغاز می‌کند و گیاه در صورت شکست دفاع مستقیم از دفاع غیرمستقیم استفاده می‌کند. Krips et al. (2001) نشان دادند رابطه دقیقی بین دفاع مستقیم و غیرمستقیم در ارقام شمعدانی وجود ندارد و مطالعات بیشتری برای تعریف یک رابطه مشخص بین درجه مقاومت گیاه میزبان و میزان جلب دشمنان طبیعی آفات لازم می‌باشد. با توجه به اینکه تحقیقات مشابه تا کنون بر روی لوبیا صورت نگرفته و در ضمن تحقیقات انجام شده در سایر گونه‌های گیاهی هم محدود می‌باشد (کانست و همکاران، 2004)، بنابراین ضروری است همچنان که ژرپلاس‌های 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 به طور مؤثرتری آفات را کنترل نمود. بدین منظور در این پژوهش، مقدار بیان تعدادی از ژن‌ها که در دفاع مستقیم و یا غیرمستقیم نقش دارند، و همچنین میزان جلب کنه شکارگر قبل و بعد از آلودگی به کنه دولکه‌ای در سه ژنوتیپ لوبیای ایران، که در مطالعات قبلی (دری و همکاران، ۱۳۸۳ و طهماسبی و همکاران، ۱۳۸۹) به‌عنوان حساس (ژنوتیپ اختر) و یا مقاوم (ناز و Ks41128) به کنه دولکه‌ای معرفی شده‌اند، مقایسه شد.

## مواد و روش‌ها

### واکنش QRT-PCR

بذرهای سه ژنوتیپ لوبیای ایران، که در مطالعات قبلی (دری و همکاران، ۱۳۸۳ و طهماسبی و همکاران، ۱۳۸۹) به‌عنوان حساس (ژنوتیپ اختر) و یا مقاوم (ناز و Ks41128) به کنه دولکه‌ای معرفی شده‌اند از بانک ژن لوبیا در ایستگاه ملی تحقیقات لوبیای خمین تهیه شدند و در گلخانه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در دمای ۲۸-۳۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰-۵۰ درصد کشت گردیدند. دو تا سه هفته بعد از کاشت و در مرحله دو برگی ۵۰ کنه ماده بالغ بر روی هر برگ گیاه در نیمی از گلدان ها قرار داده شد و به این شکل به کنه

سایبر گرین (کیت سایبرباپوپارس شرکت کیاژن)، یک میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ده میکرومول، سه میکرولیتر آب و پنج میکرولیتر cDNA ی نمونه‌ی مورد نظر بود. پس از آماده نمودن مخلوط‌های واکنش، پلیت مورد نظر به دستگاه آی‌سایکلر منتقل گردید. از سری‌های غلظت نیز به منظور کنترل راندمان واکنش زنجیره‌های پلی‌مراز استفاده گردید.

شد. برای انجام واکنش QRT-PCR از دستگاه آی‌سایکلر شرکت بیورد و رنگ سایبر گرین (شرکت کیاژن) به عنوان رنگ فلورسنس برای ارزیابی کمی استفاده گردید. قبل از شروع کار برای هر پلیت یک نقشه طراحی گردید و در آن ترتیب قرار گرفتن تیوپ‌های نمونه‌ها در داخل رک‌های ۹۶ تایی دستگاه تعیین گردید. هر تیوپ حاوی ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش QRT-PCR شامل ده میکرولیتر از مخلوط

جدول ۱: کد شناسایی و توالی آغازگر های ژن های درگیر در دفاع مستقیم و/ یا غیرمستقیم در برابر کنه دو لکه‌ای که میزان بیان آنها در سه ژنوتیپ لوبیا (ناز، اختر و Ks41128) از طریق واکنش QRT-PCR تعیین گردیده است

Table 1: accession number and primer sequences of some genes that is involved in direct and/or indirect defense to determine their expression ratio in three common bean genotypes (Naz, Akhtar and Ks41128) by QRT PCR

توالی آغازگر پسرو Primer reverse sequence	توالی آغازگر پیشرو Primer forward sequence	نام آغازگر Primer name	کد شناسایی accession number
ATGAATGACGGTTCCCATGTA	GGCATTAAAGGCAGCTCACTCT	Cons7	AW310136
CACTGACTTCGGTAGAGTTGGTT	CTTGCTTGCACCATCTATCTCTT	PR-4	X57187
TCGGATTCTTCAAGAGATACTGTG	ACTGAGAGGTGACAAGGTCAGAG	PR-3	M13968
TTGTAGGCAATGTAACCTCCACCT	ATCTGTATCCCAAGATGTGTTGC	LOX	X63521
TGTGGTAAGAGTCTCTTGGAAA	CTTAAGCTCATGTCTTCCACGTT	PAL	M11939
TACCAAGGTTGATAGGAGTGGTG	GGCACACCAATAGCATAAGACAC	SAMS	AB062358

بودند و در دمای  $1^{\circ}\text{C} \pm 23$  و رطوبت نسبی ۷۰-۵۰٪ در انکوباتور نگهداری می‌شدند. در روی آن گذاشته شد. ۲۴ ساعت پس از انتقال، ماده‌ها حذف و تخم‌ها حفظ شدند. یک هفته پس از تخم‌گذاری، ماده‌های بالغ حاصل از تخم‌ها جدا و برای آزمون بوسنجی مورد استفاده قرار گرفتند. در طول این مدت شکارگرها با یک برگ لوبیای آلوده به کنه دولک‌ای که هر روز بر روی کلونی جدید آنها گذاشته می‌شد تغذیه شدند. لازم به ذکر است که قبل از انجام هر آزمایش به مدت  $2 \pm 24$  ساعت به ماده‌های بالغ شکارگر گرسنگی داده شد (De Boer *et al.* 2004).

برای مقایسه‌ی میزان جلب‌شدگی، از دستگاه بوسنج واقع در آزمایشگاه کنه‌شناسی دانشگاه تهران استفاده گردید. این دستگاه از یک لوله Y شکل تشکیل شده بود که طول بازوهای

برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار REST استفاده شد. لازم به ذکر است که آزمایش QRT-PCR شامل دو تکرار بیولوژیک (دو گیاه) و سه تکرار تکنیکی (سه تیوپ) از هر نمونه (هر ژنوتیپ در حالت آلوده یا سالم) بود.

### آزمون بوسنجی

ابتدا بذرهای ژنوتیپ‌های لوبیا مورد نظر مطابق روش ذکر شده در آزمایش QRT-PCR کاشته و به کنه تارتن دولک‌ای آلوده شد. در این آزمایش از کنه‌های ماده‌های بالغ همسن کنه شکارگر (*P. persimilis*) استفاده گردید. به منظور همسن-سازی از دو ظرف جا تخم‌مرغی ده‌خانه‌ای استفاده شد. در هر خانه یک قطعه سه در سه برگ لوبیای آلوده به کنه تارتن قرار داده شد و پنج کنه ماده بالغ شکارگر (که از هلند تهیه شده

بازوی بوسنج (گیاه سالم و آلوده هر ژنوتیپ) تمایزی نشان نداده است.

### نتایج و بحث

تجزیه داده‌های آزمایش‌های بوسنجی با استفاده از آزمون نکوئی برآزش (جدول ۲) نشان داد که در آزمایش‌های مربوط به ژنوتیپ‌های Ks41128 و اختر، غیریکنواختی بین پنج تکرار آزمایش وجود دارد (در آزمون نکوئی برآزش غیر معنی‌دار شدن  $G_H$  نشان دهنده یکنواخت بودن تکرارهای مختلف یک آزمایش می‌باشد) ولیکن پنج تکرار مربوط به ژنوتیپ ناز یکنواخت بود. به طور مشابه Wijk et al. (2008) غیریکنواختی را در بین تکرارها مشاهده کردند و دلیل آن را وجود تفاوت‌های ژنتیکی بین افراد مختلف جمعیت کنه شکارگر ذکر کردند. بنابراین داده‌های تکرارهای هر آزمایش را با هم جمع و وجود و یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار در جلب کنه شکارگر بین دو بازوی دستگاه را با آزمون نکوئی برآزش تعیین نمودیم.

همانطور که قبلاً نیز به آن اشاره شد در هر آزمایش معنی‌دار شدن  $G_p$  نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین دو منبع بو در آن آزمایش می‌باشد. نتایج (جدول ۳ و نمودار ۲) نشان داد که در ژنوتیپ مقاوم ناز، گیاهان آلوده به کنه دولکه-ای در مقایسه با گیاهان سالم توانستند به طور معنی‌داری تعداد بیشتری کنه شکارگر را جلب کنند اما در بقیه ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری بین میزان جلب کنه شکارگر بین دو بازوی (گیاه آلوده و کنترل) دستگاه بوسنج مشاهده نگردید. به طور مشابه Krips et al. (2001). تفاوت در جلب کنه شکارگر ( $P. persimilis$ ) را در بین ارقام شمعدانی، دیک (1990) در بین ارقام لوبیای معمولی و Boumeester et al. (2003) در بین ارقام کدوی آلوده به کنه تارتن دولکه‌ای (*T. urticae*) مشاهده نمودند.

از آنجائی که اختصاصی عمل نمودن آغازگرها در روش QRT-PCR از اهمیت بالایی برخوردار است محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز مورد بازبینی قرار گرفت و به دلیل اختصاصی بودن آغازگر، تنها یک باند اختصاصی برای هر ژن در محدوده ۱۶۰-۱۴۰ باز در روی ژل دیده شد.

آن (بازو قاعده‌ای و بازوهای جانبی) ۱۳ سانتی‌متر و قطر آن چهار سانتی‌متر بود. هر یک از دو بازوی جانبی توسط یک لوله خرطومی به جعبه شیشه‌ای حاوی منبع تولید ماده فرار (در این‌جا ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای آلوده و پس از آن به طور مشترک به جعبه شیشه‌ای حاوی مجهز به فن (منبع دریافت‌کننده و فرستنده‌ی هوای پاک) ختم می‌شدند.

برای مقایسه‌ی میزان جلب‌شدگی، از دستگاه بوسنج واقع در آزمایشگاه کنه‌شناسی دانشگاه تهران استفاده گردید. این دستگاه از یک به‌منظور یکسان‌سازی سرعت جریان باد ( $\Delta m/s$ ) در هر دو بازو از سرعت سنج استفاده می‌شد. به منظور حذف تأثیر بوهای احتمالی موجود در محیط، ذغال فعال در لوله خرطومی و پیش از ورودی جعبه‌های حاوی گیاهان مورد آزمایش تعبیه گردید. میله استیل Y شکل میانه بازوها، حرکت کنه شکارگر را تسهیل می‌کرد. برای انجام این آزمایش در محفظه موجود در یکی از بازوهای لوله Y شکل دستگاه بوسنج، برگ‌های آلوده به کنه دولکه‌ای از یکی از ژنوتیپ‌ها و در محفظه متصل به بازوی دوم برگ‌های سالم همان ژنوتیپ قرار داده شد. سپس بر روی بازوی سوم لوله Y شکل یک کنه شکارگر قرار داده و به آن اجازه داده شد که بر روی سیم عبور داده شده از وسط لوله حرکت کند و پس از رسیدن به دو راهی لوله مشاهده گردد که کدام سمت لوله را انتخاب می‌کند. پس از آنکه شکارگر یکی از دو شاخه لوله را انتخاب می‌کرد، برای اطمینان، به آن اجازه داده می‌شد دو سوم راه انتخاب شده را طی کند سپس از دستگاه خارج می‌شد و در صورتی که پس از سه دقیقه کنه شکارگر مورد آزمایش هیچ‌کدام از دو راه را انتخاب نمی‌کرد آن را از لوله خارج می‌نمودیم (دیک و همکاران، 1990b). آزمایش برای هر ژنوتیپ پنج بار تکرار گردید و در هر تکرار ده شکارگر آزمون شدند. یعنی در مجموع ۵۰ شکارگر برای هر ژنوتیپ آزمون شد. کلیه‌ی آزمایشات در دمای  $23 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در نهایت نتایج به دست آمده از آزمایش با استفاده از آزمون نکوئی برآزش (Sokal and Rohlf, 1994) تجزیه شد. این آزمون بر مبنای آزمون کای اسکور می‌باشد. برای تجزیه داده‌های آزمایشات بوسنجی بایستی دو  $G$  محاسبه شود:  $G_H$  و  $G_p$ . در مورد  $G_H$  فرض صفر این است که بین تکرارهای آزمایش تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و تکرارها همگن می‌باشند. در مورد  $G_p$  فرض صفر این است که شکارگر بین دو

جدول ۲: نتایج آزمون نکوئی برازش برای آزمایش بررسی پاسخ کنه ماده بالغ (*P. persimilis*) به ترکیبات ترشح شده از برگ‌های گیاهان کنترل و آلوده به کنه دولکهای در ژنوتیپ‌های لوبیا (ناز، اختر و Ks41128)

Table 2: The results of Goodness-of-fit test for the olfactory choice-assays of predatory mites to emitted volatiles of control and mite infested leaves of common bean genotypes (Naz, Akhtar, Ks41128)

	ناز Naz	اختر Akhtar	Ks4128
G <sub>p</sub>	17.41**	0.53 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>
G <sub>h</sub>	9.39 <sup>ns</sup>	17.13*	11.08*

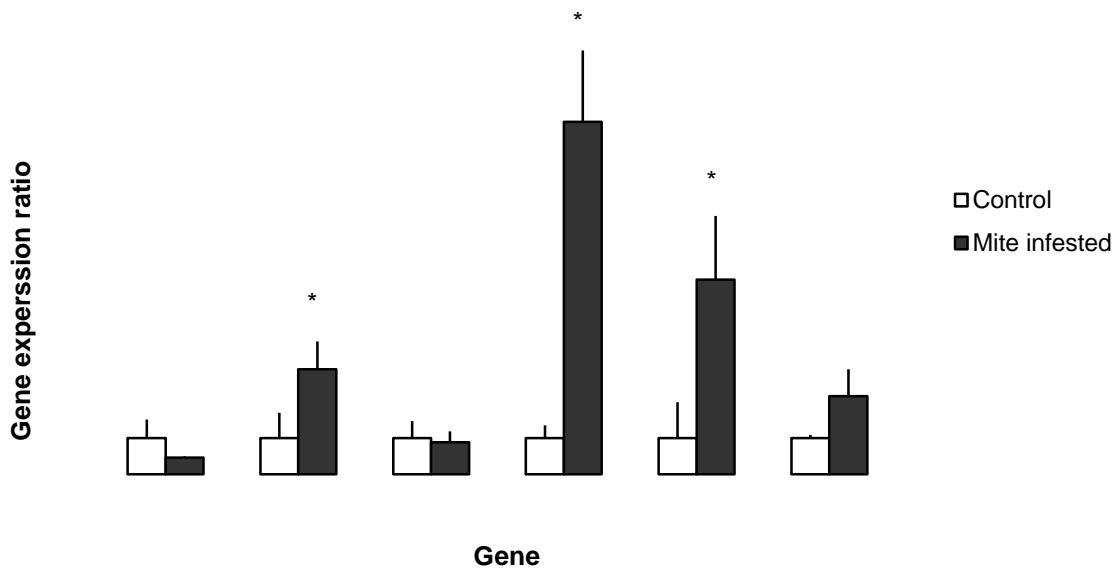
در مورد G<sub>p</sub>، \* و \*\* به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد و یک درصد از فرض صفر (کنه شکارگر گیاهان آلوده و کنترل از یک ژنوتیپ مشابه را با یک نسبت ۱:۱ ترجیح می‌دهد) و در مورد G<sub>h</sub>، \* و \*\* به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد و یک درصد بین تکرارهای مختلف آزمایش است

In G<sub>p</sub> \* and \*\* denote a significant difference at P\0.05 and P\0.01 respectively from H<sub>0</sub> (predatory mites chose infested and uninfested plants of a similar genotype in a ratio of 1:1) and in G<sub>h</sub> an asterisk \* and \*\* denote a significant difference at P\0.05 and P\0.01 respectively between different replicates of each olfactory test

هیچ یک از ژنوتیپ‌ها نشان نداد. بیان این ژن در ژنوتیپ Ks41128 به‌طور غیرمعنی‌داری پس از آلودگی به کنه دولکهای افزایش یافت. آریمورا و همکاران (2004) با مطالعه بر روی گیاهان لوبیایی فرنگی آلوده به کنه دولکهای دریافتند که بیان این ژن که از جمله ژن‌های درگیر در تولید اتیلن است پس از آلودگی به کنه دولکهای افزایش می‌یابد و افزایش بیان این ژن و در نتیجه افزایش میزان تولید اتیلن یک اثر مثبت بر بیان برخی ژن‌های دفاعی گیاه دارد. برخلاف آنچه انتظار می‌رفت بیان این ژن در دو ژنوتیپ دیگر پس از آلودگی به کنه کاهش غیرمعنی‌داری نشان داد. به نظر می‌رسد مطالعات بیشتر بر روی تغییرات بیان این ژن در ژنوتیپ‌های یک گونه‌ی خاص به منظور تعیین نقش این ژن بر پاسخ‌های دفاعی گیاه ضروری است.

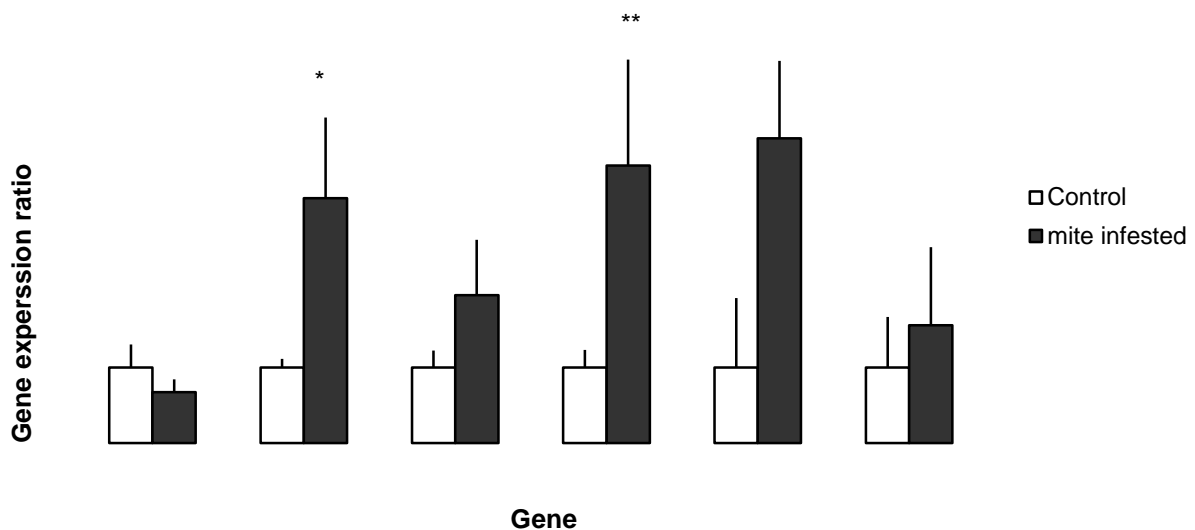
بیان ژن OS در هر سه ژنوتیپ پس از آلودگی به کنه دولکهای به‌طور غیرمعنی‌داری کاهش یافت. نتایج مطالعات آریمورا و همکاران (2004) نشان داد که این ژن از طریق شرکت در سنتز (E)-β-Ocimene در القاء پاسخ‌های دفاعی غیرمستقیم *Lotus japonicus* بر علیه کنه دولکهای نقش دارد. بیان ژن LOX در ژنوتیپ ناز بعد از آلودگی به کنه دولکهای به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گیاهان کنترل افزایش یافت. بیان این ژن در ژنوتیپ اختر و ژنوتیپ Ks41128 نه تنها افزایش معنی‌داری نشان نداد بلکه در ژنوتیپ اختر کاهش نیز نشان داد.

نتایج مقایسه بیان ژن‌ها در حالت آلوده و سالم ژنوتیپ‌های لوبیا نشان داد که بیان ژن PR3 و PR4 در ژنوتیپ‌های ناز، Ks41128 و اختر به‌طور معنی‌داری در گیاهان آلوده نسبت به گیاهان سالم افزایش نشان داد و ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس از این نظر تفاوتی نشان ندادند (شکل‌های ۲، ۳، ۴). مشابه با این تحقیق، نتایج تحقیق آریمورا و همکاران (2000) نشان داد که در برگ‌های لوبیایی فرنگی پس از آلودگی به کنه دولکهای بیان شش ژن دفاعی از جمله ژن‌های PR3 و PR4 افزایش یافت. با توجه به نتایج تحقیقات (دروی و همکاران، ۱۳۸۳ و طهماسبی و همکاران، ۱۳۸۹) که بیانگر حساسیت ژنوتیپ اختر و نیز مقاوم بودن ژنوتیپ‌های ناز و Ks41128 در سطح مزرعه و گلخانه می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که دو ژن PR3 و PR4 مسئول مقاومت متفاوت این ژنوتیپ‌ها نبوده و ژن‌های دیگری در واکنش مقاومت متفاوت در این سه ژنوتیپ به کنه دولکهای نقش دارند. بیان ژن PAL در هر سه ژنوتیپ، پس از آلودگی به کنه دولکهای افزایش نشان داد ولی افزایش معنی‌دار نبود. به‌طور مشابه آریمورا و همکاران (2000) دریافتند که بیان این ژن در برگ‌های لوبیا چشم‌بلبلی پس از آلودگی به کنه دولکهای افزایش می‌یابد. ژن PAL از جمله ژن‌های کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید است که در تولید سالیسیک اسید و ترکیبات فرار نقش دارد (kim and Shin, 2002). همچنین این مسیر مسئول سنتز یک طیف وسیع از ترکیبات متابولیک ثانویه مثل لیگنین، سالیسیلات، کومارین‌ها و فلاونوئید فیتوالکسین‌ها می‌باشد (Dixon and Paiva, 1995). بیان ژن SAMS تفاوت معنی‌داری را در بین گیاهان آلوده و غیرآلوده



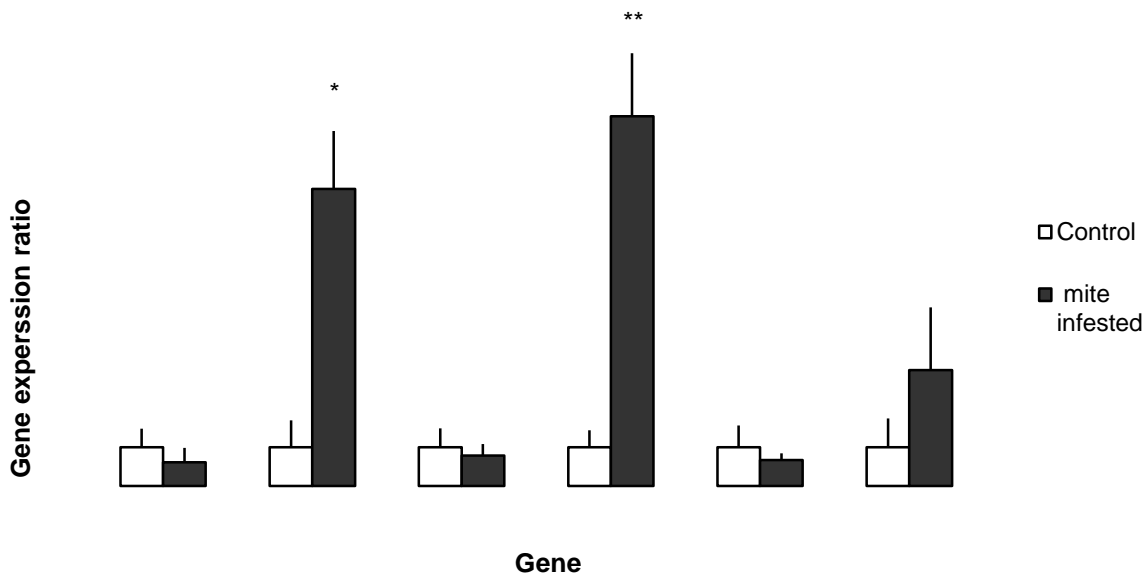
شکل ۲: نسبت بیان تعدادی از ژن‌های مؤثر در دفاع مستقیم و یا غیرمستقیم (PR-3، PR-4، LOX، PAL، SAMS و OS) بر علیه کنه دولکهای در گیاهان کنترل و آلوده به کنه دولکهای در ژنوتیپ ناز (در این شکل \* و \*\*، به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد و یک درصد بین گیاهان آلوده و کنترل با آزمون t استیودنت می‌باشد).

Fig 2: Expression ratio of some genes that is involved in direct and/or indirect defense (PR-3، PR-4، LOX، PAL، SAMS و OS) against spider mite in the clean and spider mite infested plants of Naz genotype (In this figure \*and \*\* denote a significant difference at P<0.05 and P<0.01 respectively in a Student's t test)



شکل ۳: نسبت بیان تعدادی از ژن‌های مؤثر در دفاع مستقیم و یا غیرمستقیم (PR-3، PR-4، LOX، PAL، SAMS و OS) بر علیه کنه دو لکهای در گیاهان کنترل و آلوده به کنه دو لکهای در ژنوتیپ Ks41128 (در این شکل \* و \*\*، به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد و یک درصد بین گیاهان آلوده و کنترل با آزمون t استیودنت می‌باشد).

Fig 3: Expression ratio of some genes that is involved in direct and/or indirect defense (PR-3، PR-4، LOX، PAL، SAMS و OS) against spider mite in the clean and spider mite infested plants of Ks41128 genotype (In this figure \*and \*\* denote a significant difference at P<0.05 and P<0.01 respectively in a Student's t test)



شکل ۴: نسبت بیان تعدادی از ژن‌های مؤثر در دفاع مستقیم و یا غیرمستقیم (PR-3، PR-4، LOX، PAL، SAMS و OS) بر علیه کنه دولکهای در گیاهان کنترل و آلوده به کنه دولکهای در ژنوتیپ اختر (در این شکل \* و \*\*، به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد و یک درصد بین گیاهان آلوده و کنترل با آزمون t استیودنت می‌باشد).

Figure 4: Expression ratio of some genes that is involved in direct and/or indirect defense (PR-3, PR-4, LOX, PAL, SAMS و OS) against spider mite in the clean and spider mite infested plants of Akhtar genotype. (In this figure \*and \*\* denote a significant difference at P(0.05 and P(0.01 respectively in a Student's t test)

و همچنین پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی اعم از خشکی، آفات و بیماری‌ها دارد (Portra and Rocha-Sosa, 2000). بنابراین واکنش مقاومت ژنوتیپ ناز در ارزیابی‌های مزرعه‌ای و جلب معنی‌دار کنه شکارگر توسط آن بعد از آلودگی به کنه تارتن، افزایش بیان معنی‌دار ژن LOX بعد از آلودگی به کنه تارتن در این ژنوتیپ را توجیه می‌کند. به علاوه نتایج این آزمایش نقش این ژن در دفاع مستقیم و غیرمستقیم را تأیید می‌نماید. همچنین این نتایج بر اهمیت مطالعات بیشتر بر روی ژنوتیپ ناز به منظور به کارگیری آن در برنامه‌های مبارزه تلفیقی در برابر آفت کنه دولکهای تأکید دارد.

لازم به ذکر است که در مورد سایر ژن‌ها تفاوت معنی‌داری در هیچ یک از ژنوتیپ‌ها دیده نشد. نتایج آزمایشات (Halitschke and Baldwin 2003) و (Kessler *et al.* 2004) نشان داد که ژن LOX یک 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 مسیر تولید ترکیبات فرار و دفاع غیرمستقیم گیاه می‌باشد (دیک و همکاران، 2003). به علاوه مطالعه (Bruinsma *et al.* 2010) نشان داد که بازدارندگی ژن LOX در گیاه هم دفاع مستقیم و هم دفاع غیرمستقیم را کاهش می‌دهد. بر اساس مطالعات صورت گرفته این ژن نقش مهمی را در تکامل

#### منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۳-۵ متن انگلیسی مراجعه شود.



## Expression of Some Defensive Genes Responsible for Direct and Indirect Defense Against Spider Mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), in Some Common Bean Cultivars

Tahmasebi<sup>1\*</sup>, Z., Hoseinzadeh<sup>2</sup>, A. H., Alizadeh<sup>3</sup>, H. and Soltanloo<sup>2</sup>, H.

### Abstract

Herbivore feeding induces two main defensive systems in plant, direct and indirect defenses. To know role of some genes which involve in direct and/or indirect defenses their expression pattern were compared in clean and mite infested leaves of some common bean susceptible (Akhtar) and resistant (Naz, Ks41128) genotypes with QRT-PCR. Then to proof the QRT PCR results, preference of predatory mite, *Phytoseiulus persimilis*. were compared in all cultivars with olfactometer. The QRT-PCR results indicated that among genes only expression of LOX gene that is important in both direct and indirect defenses was significantly difference among genotypes. After spider mite infestation expression of LOX gene was significantly up-regulated only in the resistant genotype (Naz) and in the susceptible genotype (Akhtar) expression of LOX was even significantly down-regulated. The result of olfactory tests showed that only Naz genotype could significantly attract more predatory mites after the spider mite infestation. Therefore significantly more attraction of predatory mite to resistance genotype (Naz) than other genotypes and up regulation of LOX gene in this genotype upon mite infestation can demonstrate role of this gene in direct and indirect defense of common bean against spider mite.

**Keywords:** *Phytoseiulus persimilis*, QRT-PCR, LOX gene

### References

- Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W. and Takabayashi, J. 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, 406: 512-514.
- Arimura, G., Ozawa, R., Nishioka, T., Boland, W., Koch, T., Kuhnemann, F. and Takabayashi, J. 2002. Herbivore-induced volatiles induced the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *The Plant Journal*, 29(1): 87-98.
- Arimura, G., Ozawa, R., Kugimiya, R., Takabayashi, J. and Bohlman, J. 2004. Herbivore-induced defense response in model legume: Two-spotted spider mites induced emission of (E)- $\beta$ -Ocimene and transcript accumulation of (E)- $\beta$ -Ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 135:1976-1983.
- Arimura, G., Kost, C. and Boland, W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defenses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 91-111.
- Arimura, G., Köpke, S., Kunert, M., Volpe, V., David, A., Brand, P., Dabrowska, P., Maffei, M. and Boland, W. 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.

---

1. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam

2. Associate Professors, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj

3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan

\*: Corresponding Author

**Email:** z.tahmasebi@mail.ilam.ac.ir

- Baldwin, I. T. and Preston, C. A. 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta*, 208: 137-145.
- Bouwmeester, H. J., Verstappen, F. W. A., Aharoni, A., Lücker, J., Jongsma, M. A. I. F., Kappers, Luckerhoff, L. L. P. and Dicke, M. 2003. Exploring multi-trophic plant herbivore interactions for new crop protection methods. *Proceedings of the BCPC International Congress Crop Science & Technology*, 2: 1123-1134.
- Bruinsma, M., Broekhoven, S., Poelman, E. H., Posthumus, M. A., Müller, M. J., Loon J. J. A. and Dicke, M. 2010. Inhibition of lipoxygenase a Vects induction of both direct and indirect plant defences against herbivorous insects. *Oecologia*, 162:393-404.
- Daneshvar, H. and Abaii, M. G. 1994. Efficient control of *Tetranychus turkestani* on cotton, soybean and common bean by *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) in pest foci. *Applied Entomology and Phytopathology*, 61 (1, 2): 61-71.
- De Boer, J. G., Posthumus, G. D. and Dicke, M. 2004. Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite. *Journal of Chemical Ecology*, 30(11): 2215-2230.
- Degen, T., Dillmann, C., Frédéric, M. and Turlings, T. 2004. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. *Plant Physiology*, 135:1928-1938.
- Dicke, M., Poecke, R. M. P. and Boer, J. G. 2003. Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic Applied Ecology*, 4:27-42.
- Dicke, M., Sabelis, M. W., Takabayashi, J., Bruin, J. and Posthumus, M. A. 1990a. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology*, 16(11): 3901-3118.
- Dicke, M., Van Beek, T. A., Posthumus, M. A., Been Dom, N., VAN Bokhoven, H. and Groot, A. D. E. 1990b. Isolation and identification of volatiles kairomone that affects acarine predator-prey interaction. *Journal of Chemical Ecology*, 16 (2):381-396.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7:1085-1097.
- Dori, H. R., Lak M. R. and Bani Jamali, M. 2004. Common bean (from planting to harvesting), Promotional and Educational Bolton of Markazi province Jihad-e- Agriculture Organization, 305: 27-28.
- Garcia-mari, F. and Gonzaleaz-zamora, J. 1999. Biological control of *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae) with naturally occurring predators in strawberry plantings in Valencia, Spain. *Experimental and Applied Acarology*, 23: 487-495.
- Halitschke, R. and Baldwin, I. T. 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.
- Kant, M., Ament K., Sabelis, M., Haring, M. and Schuurink, R. 2004. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology*, 135: 1-13.
- Kessler, A., Halitschke, R. and Baldwin, I. T. 2004. Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science*, 305: 665-668.
- Kim, K. U. and Shin, D. H. 2002. The importance of allelopathy in breeding new cultivars. In: weed management for developing countries. (ed. by Labrada R.). *FAO Plant Production and Protection*, : 195-210.
- Krips, O. E., Willems, P. E. L., Gols, R., Posthumus, M. A., Gort, G. and Dicke, M. 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.
- Lak, M. and Arbabi, M. 1998. Application of predatory mite, *Phytoseiulus persimilis*, against bean two-spotted spider mite in dry region of Arak. Final version, working paper, Agricultural Research Center, Province of Markazi, Iran, 23pp.
- Libault, M., Thibivilliers, S., Radwan, O., Clough, S. J. and Stacey, G. 2008. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. *The plant Genome*, 1: 44-54.
- Porta, H. and Rocha-Sosa, M. 2000. A Phaseolus vulgaris lipoxygenase gene expressed in nodules and in Rhizobium tropici inoculated roots. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1517: 139-142.
- Saedi, Z. and Arbabi, S. 2007. Effectiveness of 12 pesticides against two infestation levels of bean fields by *Tetranychus urticae* Koch in Lordegan, Chaharmahal & Bakhtiari province. *Pajouhesh & Sazandegi*, 76:25-31.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1994. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 3<sup>rd</sup> edition. *New York: Freeman*.
- Tahmasebi, A., Hosseinzadeh, A. H., Bihamta, M. R., Saboori, A. R., Naghavi, M. R., Dori, M. and Koshki, H. 2011. An investigation on resistance of 19 common bean genotypes to Two-Spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*) In three regions of Iran. *Journal of Entomological Society of Iran* 3(2): 69-78.

- Takabayashi, J. and Dicke, M. 1996. Plant-carnivores mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in plant science*, (2, 4):109-113.
- Takabayashi, J., Dicke, M. and Posthumus, M. 1994. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interaction: variation caused by biotic and abiotic factors. *Journal of Chemical Ecology*, 20: 329-1354.
- Turlings, T. C. J. and Benrey, B. 1998. Effects of plant metabolites on the behavior and development of parasitic wasps, *Ecociense*, 5(3): 321-333.
- Wijk, M., Bruijn, P. J. A. D. and Sabelis, M. W. 2008. Predatory mite attraction to herbivore-induced plant odors is not a consequence of attraction to individual herbivore induced plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 34:791-803.