بررسی واکنش مقاومتی برخی ژنوتیپ‌های نخود به بیمارگر برق‌زدگی و تأثیر بیماری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، محتوای پرولین و کربوهیدرات

سمیرا حسنیان[۱]، امید سفالیان[۲*]، ناصر زارع[۳]، علیرضا تاری نژاد[۴]، مهدی داوری[۵] و علیرضا پیرزاد[۶]

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

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

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

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

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

۶ - استاد، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۰۱

چکیده

بیماری برق‌زدگی نخود ناشی از *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده کشت و تولید نخود در بیشتر مناطق دنیا از جمله ایران است. در مطالعه حاضر به منظور شناسایی منابع ژنتیکی مقاومت، واکنش ۲۰ ژنوتیپ نخود به بیمارگر فوق در سه مرحله رشدی گیاهچه‌ای، گلدهی و غلاف‌دهی در شرایط گلخانه ارزیابی شد. نتایج نشان داد که در مرحله غلاف‌دهی ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس با دقت و اطمینان بیشتری از یکدیگر متمایز می‌شوند. در این مرحله، نُه ژنوتیپ در مقابل بیمارگر برق‌زدگی مقاومت بالائی نشان دادند. صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی احتمالی درگیر در مقاومت، شامل میزان کلروفیل، پرولین، پروتئین، قند محلول، کاتالاز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه نشان داد که ژنوتیپ‌های نخود از نظر صفات کلروفیل a و کلروفیل کل اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند. صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مانند میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز، پروتئین، پرولین و قند محلول تحت تأثیر تنش بیماری قرار گرفت، اما اثر متقابل تنش و ژنوتیپ فقط برای سطح کاتالاز معنی‌دار شد.

کلیدواژه‌ها: برق‌زدگی، ژنوتیپ مقاوم و حساس، شدت بیماری، صفات بیوشیمیایی

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از منابع مهم تغذیه انسان به شمار می‌رود. سطح زیر کشت این محصول در ایران حدود ۵۵۰ هزار هکتار بوده و با متوسط عملکرد ۵۳۶ کیلوگرم در هکتار، تولید کل آن در کشور معادل ۲۹۵ هزار کیلو می‌باشد. در سطح جهانی، نخود با سطح زیرکشت بیش از ۱۲ میلیون هکتار و متوسط تولید ۹۳۰ کیلوگرم در هکتار به عنوان سومین گیاه مهم از گروه

دبیر تخصصی: دکتر مهدی مهرابی کوشکی

حبوبات می‌باشد (FAO, 2014). کشت نخود به دلیل هزینه کم تولید، سازگاری وسیع آب و هوایی، استفاده در تناوب گیاهی و توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفری، یکی از مهم‌ترین گیاهان لگوم در سیستم کشاورزی پایدار به‌شمار می‌رود (Anonymous, 2000). عملکردهای پائین نخود عموماً ناشی از از تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند. سالیانه حدود ۶/۴ میلیون تن بر اثر تنش‌های غیرزیستی و حدود ۴/۸ میلیون تن در اثر تنش‌های زیستی از تولید جهانی نخود کاسته می‌شود (Singh and Saxena, 1993). اهداف اصلاحی نخود، به‌دست آوردن ژنوتیپ‌هایی است که دارای عملکرد بالا باشند و در مقابل بیماری‌ها مقاومت پایدار داشته و تنش‌های زیستی و غیرزیستی را به خوبی تحمل کنند (Rao et al., 2007). از بین تنش‌های زیستی که محصول نخود را تحت تأثیر قرار می‌دهند، برق‌زدگی مخرب‌ترین بیماری نخود در سطح جهان است (Pande et al., 2013). بیماری برق‌زدگی نخود یکی از مهم‌ترین بیماری‌های نخود است که عامل آن *Ascochyta rabiei* (pass.) Lab. می‌باشد. این بیماری اولین بار در ابتدای قرن بیستم، با شناسائی عامل بیماری‌زا در پاکستان، مشاهده شد، ولی بعداً از اغلب کشورهای جهان گزارش شده است (Batler, 1918). تلاش جهت شناسایی منابع ژنتیکی مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا یکی از اساسی‌ترین مراحل اجرای برنامه‌های اصلاحی نخود به شمار می‌رود. وجود ژرم پلاسم غنی و متنوع نخود به عنوان مخزن ژن‌های مفید در مقابل عوامل بیماری‌زای مهم همواره مورد توجه بوده است (Bagheri et al., 1997). گیاهان در پاسخ به حمله عوامل بیماری‌زا سازوکارهای دفاعی پیچیده‌ای را فعال می‌کنند که باعث مقاومت گیاه نسبت به عامل بیماری‌زا می‌شود (Yasuda et al., 2008). واکنش فوق حساسیت، تجمع موضعی فیتوالکسین‌ها، ساخت دیواره سلولی ضخیم از سلولز، پکتین و لیگنین و فعال‌سازی مسیر فنیل‌پروپانوئید از جمله این سازوکارها می‌باشند (Kavousi et al., 2009). برنامه‌های اصلاحی برای مقاومت نخود به این بیماری به‌واسطه عدم وجود مقاومت بالا در خزانه ژنی اولیه و تنوع ژنتیکی بیمارگر، از پیشرفت لازم برخوردار نبوده است (Dey and Singh, 1993). با این وجود، به نژادگران با استفاده از مقاومت نسبی قابل دسترس در مجموعه‌های ذخایر توارثی، ارقام متعددی را با مقاومت متوسط معرفی کرده‌اند (Warkentin et al., 2005; Malhotra et al., 2003). در بسیاری از این ارقام، با بروز پاتوتیپ جدید بیمارگر و یا افزایش قدرت تهاجم پاتوتیپ‌های موجود، مقاومت شکسته شده است (Jayakumar et al., 2005). برای متنوع ساختن پایه ژنتیکی مقاومت به برق‌زدگی و ارتقاء ماندگاری مقاومت از طریق هرمی کردن ژن در برنامه‌های اصلاحی به منابع بیشتری از مقاومت در ذخایر توارثی نخود نیاز است. بنابراین هدف از اجرای این مطالعه، ارزیابی مقاومت ارقام تحت کشت نخود نسبت به بیماری برق‌زدگی و استفاده از منابع مقاومت به بیماری در برنامه‌های به‌نژادی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذرهای ۲۰ ژنوتیپ نخود از مرکز تحقیقات کشاورزی گچساران تهیه گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول ۲۰ ژنوتیپ نخود و فاکتور دوم سه مرحله رشدی گیاه (گیاهچه‌ای، گلدهی و غلاف‌دهی) بود. از ژنوتیپ Kc-217854 (رقم بومی بیونیج)، به عنوان رقم استاندارد حساس به برق‌زدگی جهت اطمینان از بروز آلودگی استفاده گردید.

تهیه سوسپانسیون اسپور بیمارگر: جدایه شماره ۱۳ پاتوتیپ III (Udupa et al., 1998) قارچ *Ascochyta rabiei* به عنوان بیمارگر پرآزار از بانک ملی ژن گیاهی (ایران) تهیه شد. این جدایه روی محیط کشت جامد عصاره‌نخود – دکستروز – آگار (CDA[1])

1- Chickpea Dextrose Agar

مایه‌زنی و در شرایط دمایی ۱۸ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۴ ساعت روشنایی- ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شد. پس از ۷ تا ۱۰ روز رشد، یک قطعه ۰/۵ سانتی‌مترمربعی از حاشیه‌ی در حال رشد کشت قارچ روی CDA به داخل ظروف حاوی محیط کشت مایع عصاره نخود–دکستروز–بروث (CDB[1]) مایه‌زنی شد. ظروف در شرایط دمایی ۲۲/۵ درجه‌سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۴ ساعت روشنایی- ۱۰ ساعت تاریکی، روی شیکر با دور RPM ۱۵۰ قرار گرفتند. بعد از سه روز، محیط CDB حاوی اسپور با عبور از پارچه ململ دولایه فیلتر و سوسپانسیون حاصله با استفاده از لام گلبول‌شمار (تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر) غلظت سنجی شد (Santra et al., 2000).

مایه‌زنی گیاهان نخود: بذرهای ۲۰ ژنوتیپ نخود زراعی پس از شستشو و ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم برای جوانه‌زنی به ظروف پتری منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. از هر ژنوتیپ، تعداد پنج بذر جوانه زده در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک سترون، ماسه و پیت به نسبت ۲:۱:۱ در عمق ۲/۵ سانتی‌متری کشت شدند و در شرایط گلخانه با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سوسپانسیون اسپور (با غلظت ۲×۱۰^{۵} اسپور درمیلی‌لیتر) با آبپاش‌های پلاستیکی به طور یکنواخت بر روی گیاهچه‌های ۱۴روزه نخود اسپری شدند. عمل اسپری تا مرحله ریزش اولین قطره از سطح برگ ادامه داشت. گلدان‌ها به مدت پنج روز در زیر پلاستیک به منظور حفظ رطوبت تا ۹۰ درصد و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و روزانه سه تا پنج بار آب‌پاشی در زیر پلاستیک انجام گرفت و پس از آن پوشش پلاستیکی برداشته شده و رطوبت گلخانه در سطح ۷۰ درصد تنظیم شد. پس از گذشت یک هفته، علایم اختصاصی بیماری آشکار شد و دو هفته پس از مایه‌زنی، گیاهان رقم شاهد حساس کاملا از بین رفت.

1- Chickpea Dextrose Broth

پس از مشاهده آلودگی در رقم شاهد حساس، علایم بیماری روی ژنوتیپ‌ها در سه مرحله گیاهچگی، گلدهی و غلاف‌دهی بررسی شد. شدت بیماری براساس درجه بندی ۱ تا ۹ به شرح ذیل تعیین شد (Singh and Reddy, 1993): ۱: عدم مشاهده لکه، ۲: نقاط رنگ پریده کوچک و محدود روی برگ، ۳: لکه‌های محدود و بیضی شکل روی ساقه، ۴: لکه‌های طویل شده و محاط در دور ساقه، ۵: ترد شدن ساقه در محل سوختگی، ۶: شکستگی ساقه در محل سوختگی، ۷: گسترش لکه‌ها به پائین ساقه، ۸: مرگ نسبی گیاه و ۹: مرگ کامل گیاه.

براساس شاخص شدت بیماری در مرحله غلافدهی، ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مقاوم (۱ تا ۴)، متحمل (۵) و حساس (۶ تا ۹) تقسیم‌بندی شدند (Udupa and Weigand, 1997).

اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: دو هفته پس از مایه‌زنی، به منظور ارزیابی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، نمونه‌برداری از برگ گیاهان شاهد و بیمار انجام گردید و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و به فریزر ۸۰- درجه منتقل گردید.

استخراج و اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی، شامل کلروفیل a و b و کارتنوئیدها، از برگ‌های تازه گیاه استفاده شد. بدین منظور ۰/۱ گرم از بافت تر گیاهی در داخل هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ ٪ ساییده و محلول حاصل به‌طور کامل به لوله‌های سانتریفوژ منتقل گردید. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و مقدار کلروفیل در محلول رویی صاف شده با کاغذ صافی براساس روش Lichtenthaler (1987) اندازه‌گیری شد. طبق این روش با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مقدار جذب نوری محلول‌ها در طول موج ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر قرائت و مقدار کلروفیل a و b براساس روابط زیر محاسبه گردید:

$$Chlorophyll\ a = (19.3 * A663 - 0.86 * A645)\ V/100W$$
$$Chlorophyll\ b = (19.3 * A645 - 3.6 * A663)\ V/100W$$
$$Carotenoides = 100(A470) - 3.27(mg\ chl.\ a) - 104(mg\ chl.\ b)/227$$

که در آن A663، A645 و A470 به ترتیب مقدار جذب خوانده شده در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر است.

استخراج و سنجش پرولین: استخراج پرولین از جوان‌ترین برگ‌ها و ریشه با استفاده از روش Bates et al. (1973)، صورت گرفت. به این صورت که مقدار ۰/۱ گرم بافت برگی و ریشه‌ای در پنج میلی‌لیترسولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ سائیده و همگنای حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و با سرعت rpm ۴۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در لوله جداگانه دیگری، به دو میلی‌لیتر از عصاره حاصل، دو میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید اسیتیک گلاسیال خالص اضافه گردید. لوله‌ها به مدت یک ساعت در بن ماری قرار گرفته و پس از اضافه کردن چهار میلی‌لیتر تولوئن به هر کدام از لوله‌ها، به مدت ۱۵ تا۲۰ ثانیه ورتکس گردیدند. پس از تشکیل دو فاز جداگانه، فاز بالایی رنگی، با دقت جدا و در دستگاه اسپکتروفتومتری، میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش قند محلول: برای اندازه‌گیری قندهای محلول از روش Irigoyen et al. (1992) استفاده شد. مقدار ۰/۲ گرم از بافت سبز گیاه را به همراه ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ در لوله‌های آزمایش درب‌دار قرار داده و به مدت یک ساعت در حمام بن‌ماری در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از سرد شدن، یک میلی‌لیتر از نمونه‌ها به همراه یک میلی‌لیتر فنل ۰/۵ درصد و پنج میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد ترکیب شد. در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-160 در طول موج ۴۸۳ نانومتر، مقدار جذب خوانده و میزان قند محلول نمونه‌ها بر اساس میلی‌گرم در هر گرم وزن تر برگ محاسبه گردید.

استخراج و سنجش پروتئین: استخراج پروتئین کل از جوان‌ترین برگ‌ها و با استفاده از روش Bradford (1976) انجام گرفت. مقدار ۰/۱ گرم از نمونه برگی با یک میلی‌لیتر بافر فسفات درون هاون چینی ساییده و پس از انتقال به میکروتیوب با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. از محلول شفاف رویی ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به لوله‌های آزمایشی که قبلا به هر کدام مقدار پنج میلی‌لیتر معرف برادفورد ریخته شده بود، اضافه گردید. پس از گذشت پنج دقیقه از تثبیت رنگ محلول، میزان جذب در دمای آزمایشگاه و در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

سنجش آنزیم کاتالاز: فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Chance and Maehly (1955) همراه با تغییراتی سنجش شد. به این منظور ۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس به همراه ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه با ۶۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حمام یخ مخلوط شدند. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

سنجش آنزیم پراکسیداز: برای اندازه‌گیری فعالیت کمی پراکسیداز از روش Kar and Mishra (1976)، با اندکی تغییرات استفاده گردید. به این منظور ابتدا محلول‌های بافر تریس یک مولار، آب اکسیژنه ۵۰ میلی‌مولار و پیروگالل ۱۰۰ میلی مولار تهیه شد. از هر یک از محلول‌های فوق، ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و محلول حاصل به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق با ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسکتروفتومتر قرائت گردید.

سنجش آنزیم پلی‌فنول اکسیداز: فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز با روش Kar and Mishra (1976)، با اندکی تغییرات بررسی شد. برای این منظور ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با ۰/۴ میلی‌لیتر پیروگالل و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی خوب مخلوط و به مدت پنج دقیقه در بن‌ماری ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد.

فعالیت هر یک از آنزیم‌ها بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه واریانس داده‌های آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. قبل از انجام تجزیه واریانس، آزمون نرمال بودن داده‌ها برای کلیه صفات آزمون نرمال بودن به روش کولموگروف و اسمیرنوف (Kolmogrov-Sminov test) انجام گرفت. کلیه صفات مورفوفیزیولوژیک از توزیع نرمال برخوردار بودند. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای محاسبات آماری نرم‌افزارهای SPSS v.19 و SAS مورد استفاده قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

واکنش ژنوتیپ‌ها به عامل بیماری برق‌زدگی: یک هفته پس از مایه‌زنی، علایم اولیه بیماری به صورت زردی در انتهای برگ‌ها و نقاط تیره کوچک روی برگ‌ها و ساقه‌ها به خوبی روی ژنوتیپ حساس (رقم بیونیج) قابل رویت بود. دو هفته پس از مایه‌زنی، بیماری در دمبرگ و ساقه ژنوتیپ‌های حساس توسعه یافت و به مرگ کامل ژنوتیپ‌های حساس منتهی شد (جدول ۱). در این زمان به منظور ارزیابی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نمونه‌برداری از برگ گیاهان شاهد و بیمار انجام گردید.

روند توسعه بیماری: از ۲۰ ژنوتیپ، نه ژنوتیپ با شاخص شدت بیماری کمتر از چهار در برابر کلیهٔ پاتوتیپ‌ها تا حد زیادی مقاوم بودند. سه ژنوتیپ با شاخص شدت پنج علایم محدودی نشان دادند. اکثر ژنوتیپ‌های مقاوم، متحمل و تعداد محدودی از ژنوتیپ‌های حساس به بیماری، به مرحله غلاف‌دهی وارد شدند و در پایان دوره بذور آن‌ها جمع آوری شد. اگرچه ژنوتیپ‌های ۵، ۱۱، ۱۹ در مراحل اولیه رشد مقاومت خوبی نشان دادند ولی در مراحل گلدهی و غلاف‌دهی به بیماری حساس بودند.

در مرحله گیاهچه‌ای، شاخص شدت بیماری برای اکثر ژنوتیپ‌ها یک ماه پس از اولین مرحله مایه‌زنی بین ۱ تا ۴ متغیر بود (جدول ۱). در این مرحله اکثر ژنوتیپ‌ها با شاخص شدت ۱ و ۲ در مقابل بیماری مقاوم هستند و خسارت بیماری در رقم شاهد حساس با بروز زخم و شکستگی و در نهایت مرگ کامل، به خوبی بروز کرد. هرچند در این مرحله ژنوتیپ‌های حساس قابل تشخیص بودند، ولی علایم بیماری بحدی نبود تا سطوح دیگر مقاومت از یکدیگر تفکیک شوند. در مرحله گلدهی، یک ماه پس از مایه‌زنی عامل بیماری، علایم بیماری تا حدی توسعه یافت و میانگین شاخص شدت بیماری افزایش یافت، ولی بر اساس نتایج تجزیه واریانس این اختلاف معنی‌داری نبود. در این مرحله نیز اکثریت نمونه‌ها با نشان دادن شاخص شدت کمتر از چهار در برابر بیماری مقاومت بالایی نشان دادند. در مرحله غلاف دهی، شدت بیماری افزایش یافت و تعداد ژنوتیپ‌های با شاخص شدت کمتر از ۴، کاهش یافت. تجزیه واریانس، تأثیر مرحله رشدی گیاه را در سطح یک درصد، معنی‌دار نشان داد (جدول ۲). مقایسه میانگین سه تاریخ بررسی نشان داد که تنها مرحله غلاف دهی در مقایسه با مرحله اول و دوم اختلاف معنی داری در خسارت وارد شده به نمونه ها دارد. بنابراین به نظر می‌رسد اختلاف واکنش مقاومتی بین ژنوتیپ‌ها در مرحله گیاهچه‌ای یا گلدهی قابل اطمینان نیست و بهتر

است ارزیابی ژنوتیپ‌ها براساس اطلاعات به دست آمده از خسارت بیماری در مرحله غلاف‌دهی انجام شود. در گزارشات زیادی مرحله غلاف‌دهی به عنوان حساس‌ترین مرحله ذکر شده است (Singh and Reddy, 1993). ژنوتیپ‌های مقاوم شناسائی شده در این مطالعه بومی ایران است. این منابع مقاومت می‌تواند در اصلاح ارقام نخود مقاوم به این بیمارگر در ایران به کار گرفته شود.

Reddy and Singh (1984) از میان بیش از ۱۳۰۰۰ نمونه ژرم پلاسم از دو تیپ کابلی و دسی، تنها ۱۲ نمونه کابلی و شش نمونه دسی را مقاوم گزارش نمودند. Shokohifar et al. (2006) با ارزیابی بیش از ۵۰۰ توده بومی و خارجی، فقط ۵۶ نمونه را مقاوم گزارش کردند. Pande et al. (2011) از میان ۱۵۰ نمونه نخود، ۲۹ رقم را دارای مقاومت بالا و پایدار معرفی کردند. Ahmad et al. (2013) نیز در پاکستان از میان ۴۸ ژنوتیپ، فقط ۱۰ نمونه را مقاوم گزارش نمودند در حالی که اکثر ژنوتیپ‌ها حساس تا خیلی حساس بودند.

جدول ۱- میانگین شاخص شدت بیماری برق زدگی روی ژنوتیپ‌های مختلف نخود براساس درجه‌بندی ارایه شده توسط Singh and Reddy (1993)

Table 1. Mean disease severity index of *Ascochyta blight* on different chickpea genotypes based on disease rating proposed by Singh and Reddy (1993)

Genotype code	Genotypes	Mean disease severity index			Reaction
		Podding	Flowering	Seedling	
G1	FLIP 03-71C	1	2	3	R
G2	FLIP 03-64C	1	1	2	R
G3	FLIP 98-106C	1	2	3	R
G4	FLIP 00-40C	1	1	1	R
G5	FLIP 99-66C	1	3	5	M
G6	FLIP 00-21C	1	1	2	R
G7	FLIP 99-34C	1	1	1	R
G8	FLIP 01-32C	6	7	8	S
G9	FLIP 01-50C	1	1	2	R
G10	FLIP 01-52C	1	3	5	M
G11	Flip 97-120C	3	5	6	S
G12	FLIP 03-71C	5	6	7	S
G13	FLIP 03-135C	8	8	9	S
G14	FLIP 03-152C	1	1	2	R
G15	FLIP 04-18C	7	8	9	S
G16	FLIP 82-150C	2	4	6	S
G17	FLIP 88-85C	4	5	7	S
G18	FLIP 93-93C	1	1	2	R
G19	ARMAN	1	5	6	S
G20	AZAD	2	4	5	M

R: Resistant; MR: Moderately Resistant; S: Susceptible.

جدول ۲- تجزیه واریانس شاخص‌های شدت بیماری روی ژنوتیپ‌های نخود در مراحل مختلف رشدی گیاه

Table 2. Variance analysis of the disease severity index on chickpea genotypes in different stages of plant growth

S.O.V	Df	MS (dead plants)
Growth stages (A)	2	1355.21**
Genotype (B)	19	206.22**
A*B	38	175.79**
Error	120	2.18
CV (%)		7.02

**: Significant at 1% of probability levels

در کنیا از میان ۳۶ ژنوتیپ ارزیابی شده در شرایط مزرعه فقط ۱۰ نمونه مقاوم بودند و بیشتر آن‌ها حساس تا خیلی حساس گزارش شدند (Kimurto et al., 2013). در این تحقیق، همزمان با افزایش سن گیاه، حساسیت نیز افزایش یافت. در مطالعات متعددی، گزارش شده است که مقاومت با افزایش سن گیاه کاهش می‌یابد (Chongo and Gossen, 2001; Basandrai et al., 2007; Sharma et al., 2010). از طرفی مطالعات متعددی نشان دادند که مقاومت به صورت کمی کنترل می‌شود (Peever et al., 2012) و احتمال دارد بیان این ژن‌ها بوسیله محرک‌های خارجی (بیمارگر/ محیط) و داخلی (بیمارگر/ سن گیاه) تحریک شوند و بیان هر کدام از آن‌ها در زمان‌های مختلف متفاوت باشد (Trapero-Casas and Kaiser, 1992; Chongo and Gossen, 2001). به همین دلیل ژنوتیپ‌هایی که مقاومت گیاهچه‌ای خوبی نشان می‌دهند ممکن است همان سطح مقاومت را در مرحله گلدهی و غلاف‌دهی در مقایسه با مراحل گیاهچه‌ای و رشد اولیه نداشته باشند. Sharma et al. (2010) نیز گزارش نمودند که شدت بیماری روی کولتیوارهای مقاوم در مرحله گلدهی و غلاف‌دهی بیشتر از مرحله رویشی است. ژن‌های درگیر در مقاومت در مرحله گیاهچه‌ای و رشد رویشی نسبت به مرحله بلوغ بیان بیشتری دارند و باعث افزایش ترشح ترکیباتی مثل اسید مالیک، آنزیم‌های کیتیناز و اگزوکیتیناز، فتیوالکسین‌های ماکیان و مدیکارپین، آنزیم‌های لیزکننده پروتئین می‌شوند که باعث تأخیر در ظهور علایم و شدت پایین بیماری در مرحله گیاهچه‌ای و رشد رویشی باشد (Elliott et al., 2013). Shokohifar et al. (2006) در مطالعه‌ای نشان دادند که مرحله غلاف‌دهی در مقایسه با مرحله گلدهی و گیاهچه‌ای در تفکیک ژنوتیپ‌های مقاوم، نیمه مقاوم و حساس مناسب‌تر است.

بررسی صفات فیزیولوژیکی: تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه ژنوتیپ‌های نخود که به صورت فاکتوریل با دو سطح برای فاکتور A (شرایط بدون بیماری و شرایط آلودگی به بیماری) و ۱۸ سطح (ژنوتیپ) برای فاکتور B انجام شد (با توجه به اینکه دو ژنوتیپ ۱۳ و ۱۵ به دلیل حساسیت زیاد به بیماری در مرحله اول رشد از بین رفته بود، نمونه برداری از ۱۸ ژنوتیپ صورت گرفت)، نشان داد که تمامی صفات مورد بررسی به غیر از میزان کلروفیل a، کلروفیل b و پلی فنل اکسیداز، از نظر تنش بیماری در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. صفات کلروفیل a، کلروفیل b و پلی فنل اکسیداز در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر صفات کلروفیل a و کلروفیل کل دارای تفاوت معنی‌دار بودند. در اثر متقابل تنش بیماری × ژنوتیپ نیز از میان کلیه صفات مورد بررسی فقط سطح کاتالاز تفاوت معنی‌دار داشت (جدول ۳). بیش‌ترین میزان ضریب تغییرات مربوط به صفت پروتئین یعنی ۷۴/۱ و کم‌ترین مقدار آن مربوط به میزان صفت قند محلول، ۱۶/۵ می‌باشد.

مقایسه میانگین اثر تنش بیماری بر صفات فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد در جدول چهار آورده شده است.

صفت کارتنوئید نیز تحت تأثیر شرایط تنش قرار گرفته و میزان آن کاهش یافت. کارتنوئیدها می‌توانند سیستم دریافت نور دستگاه فتوسنتزی را از گزند مولکول‌های اکسیژن رادیکال حفاظت نمایند. آن‌ها همچنین می‌توانند مستقیماً اکسیژن یکتایی را خاموش و غیرفعال کنند و یا به وسیله اکسیژن یکتایی اکسید شوند. همچنین کارتنوئیدها باعث مصرف NADPH و حفاظت از کلروفیل در مقابل فتواکسیداسیون می‌شوند (Koyro, 2006).

جدول ۳- تجزیه واریانس شاخص‌های فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های نخود

Table 3. Variance analysis of the physiological indicators in chickpea genotypes

S.O.V	df	MS									
		Content soluble protein	Carbohydrate	Carotenoid	Chlorophyll *a*	Chlorophyll *b*	Chlorophyll t (*a*+*b*)	Proline	POX activity	CAT activity	PPO activity
Disease (A)	1	0.007^{**}	1206.32^{**}	0.185^{**}	1.034^{*}	0.131^{*}	1.90^{**}	10.92^{**}	17.07^{**}	4.80^{**}	0.427^{*}
Genotype(B)	17	0.001^{ns}	76.37^{ns}	0.027^{ns}	0.38^{**}	0.002^{ns}	0.53^{*}	0.67^{ns}	1.41^{ns}	0.48^{ns}	0.077^{ns}
A*B	17	0.001^{ns}	58.13^{ns}	0.018^{ns}	0.18^{ns}	0.023^{ns}	0.28^{ns}	0.46^{ns}	2.35^{ns}	0.86^{**}	0.116^{ns}
Error	72	0.001^{ns}	50.59^{ns}	0.017^{ns}	0.16^{ns}	0.026^{ns}	0.25^{ns}	1.07^{ns}	2.32^{ns}	0.29^{ns}	0.111^{ns}
CV(%)		74.1	16.5	18.9	32	20.9	34.2	49.7	66.2	42.3	30.9

ns, *, **: are no significant and significant at 0.05 and 0.01 percentage, respectively.
POX, peroxidase enzyme; CAT, catalase enzyme; PPO, poly-phenol oxidase.

جدول ۴- مقایسه اثر تنش بیماری بر صفات فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد

Table 4. Comparison of the disease effects on physiological indicators measured in chickpea genotypes by Duncan test at 5% probability level

Stress	PPO activity	POX activity	Content soluble protein	Carbohydrate	Proline	Carotenoid	Chlorophyll *b*
Non-inoculated (control) plants	$1/0887^{b}$	$4/8742^{b}$	$96/32^{a}$	$15/1265^{b}$	$3/9850^{b}$	$0/5077^{a}$	$0/6192^{a}$
Disease plants	$1/2144^{a}$	$5/6695^{a}$	$11/26^{b}$	$21/8107^{a}$	$4/6211^{a}$	$0/4249^{b}$	$0/5496^{b}$

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد در جدول پنج آورده شده است. افزایش ناچیز آنزیم کاتالاز در شرایط بیماری احتمالا به این علت است که کاتالاز آنتی‌اکسیدانتی است که با تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن موجب حذف و غیرفعال شدن گونه‌های اکسیژن می‌شود. افزایش کاتالاز در ژنوتیپ نه در شرایط تنش بیماری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بیش‌تر بود که نشان‌دهنده مقاومت این رقم نسبت به بیمارگر است. Magbanua et al. (2007) نشان دادند که فعالیت کاتالاز تحت تأثیر بیمارگر *Aspergillus flavus* بیشتر است. از آن‌جایی که کاتالاز به حفظ هموستازی اکسیژن فعال در زمان ایجاد تنش کمک می‌کند، فعالیت آن در گیاه به هنگام تنش افزایش یافته و سنتز آن نوعی پاسخ سازگاری در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشد (Magbanua et al., 2007).

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های میزان کاتالاز در ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد

Table 5. Comparison of means of catalase in chickpea genotypes by Duncan test at 5% probability level

	Catalase	
Genotypes	**control plants**	**Disease plants**
G1	1/4188^{cdef}	1/1029^{ef}
G2	1/7412^{abcdef}	1/7253^{abcdef}
G3	1/4330^{cdef}	1/4714^{cdef}
G4	0/8342^{f}	1/8341^{abcdef}
G5	0/8339^{f}	1/7827^{abcdef}
G6	1/5891^{cdef}	1/6513^{bcdef}
G7	0/8080^{f}	1/9810^{abcde}
G8	2/2931^{abcd}	1/5156^{cdef}
G9	0/7702^{f}	2/7663^{a}
G10	1/4851^{cdef}	1/0813^{ef}
G11	1/4519^{cdef}	1/7736^{abcdef}
G12	1/5769^{cdef}	1/2839^{def}
G14	1/0072^{ef}	1/8357^{abcdef}
G16	2/0578^{abcde}	2/2445^{abcd}
G17	1/4707^{cdef}	1/4572^{cdef}
G18	1/0117^{ef}	2/6578^{ab}
G19	2/0850^{abcde}	2/2055^{abcd}
G20	1/2807^{def}	2/3739^{abc}

میزان کلروفیل a و b در شرایط تنش کمتر بود. ژنوتیپ‌های ۱۱ و ۱۶ بیش‌ترین میزان کلروفیل a و کلروفیل کل و ژنوتیپ ۱۲ کم‌ترین میزان را داشت (جدول ۶). کاهش کلروفیل در برخی ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش، می‌تواند ناشی از افزایش تولید انواع اکسیژن فعال در کلروپلاست در حضور نور باشد. زیرا، انواع اکسیژن فعال به رنگیزه‌های کلروفیل حمله کرده و سبب تجزیه آن‌ها می‌گردند (Schutz and Fangmier, 2001). به علاوه در اثر بیماری شدت بارگیری ساکارز از سیتوسول به آوند آبکش کاهش یافته و تجمع می‌یابد. تجمع ساکارز، توقف چرخه کالوین را در پی دارد. در نتیجه این عمل، بیان ژن *Cab*، که مکد کننده پروتئین‌های a و b است، متوقف می‌شود (Cakmac and Kirkby, 2008). لذا، عدم کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش بیانگر تحمل گیاه به آسیب‌های نوری وارده به کلروپلاست می‌باشد (Yang et al., 2006). در واقع کاهش مقدار کلروفیل برگی و راندمان کوانتومی فتوسیستم II در ارقام حساس در نتیجه‌ی خسارت به غشا کلروپلاست طی تنش می‌باشد (Yang et al., 2003).

جدول ۶- مقایسه میانگین‌های میزان کلروفیل a و کل در ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد

Table 6. Comparison of means of Chlorophyll a and total Chlorophyll in chickpea genotypes by Duncan test at 5% probability level

Genotypes	**Chlorophyll a**	**Chlorophyll total**
G1	1/4271^{bcd}	2/0211^{bcd}
G2	1/4756^{bcd}	2/0707^{bcd}
G3	1/4537^{bcd}	2/0269^{bcd}
G4	1/4877^{bcd}	2/0660^{bcd}
G5	1/4274^{cd}	1/9986^{bcd}
G6	1/3189^{cd}	1/8360^{abc}
G7	1/8779^{abc}	2/5188^{abc}
G8	1/5775^{bc}	2/2052^{abc}
G9	1/7977^{abc}	2/3989^{abc}
G10	1/4631^{bcd}	2/0219^{bcd}
G11	1/9101^{ab}	2/5721^{ab}
G12	0/9720^{d}	1/4792^{d}
G14	1/3180^{cd}	1/8361^{cd}
G16	2/0786^{a}	2/7543^{a}
G17	1/5277^{bc}	2/0379^{bcd}
G18	1/4314^{bcd}	1/9825^{bcd}
G19	1/5664^{abc}	2/1594^{abcd}
G20	1/6035^{abc}	2/2479^{abc}

مقدار پرولین تحت شرایط تنش بیماری افزایش یافت. تجمع پرولین در سلول باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، حفاظت آنزیم‌ها از تجزیه شدن، تنظیم اسمزی سلول و حفظ حالت طبیعی غشا می‌شود. در بیشتر گیاهان، تجمع پرولین آزاد در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی رخ می‌دهد. در تعدادی از گیاهان تحت شرایط تنش تا ۱۰۰ برابر شرایط نرمال غلظت پرولین افزایش می‌یابد (Matysik, 2002). ممکن است افزایش پرولین در اثر بیماری به علت اثر محافظتی آن برای پروتئین‌ها و آنزیم‌ها باشد. زیرا پرولین اسیدآمینه‌ای است که به دلیل داشتن قسمت‌های آب‌دوست و آب‌گریز می‌تواند حلالیت پروتئین‌های مختلف را تحت تأثیر قرار دهد. باید به این نکته توجه کرد که مقدار اکسیداسیون پرولین در گیاهان سالم به قدری کم است که مقادیر بالای پرولین در شرایط تنش را نمی‌تواند توجیه کند، بنابراین افزایش غلظت پرولین در شرایط تنش در گیاهان غالبا به دلیل سنتز خودبخودی آن می‌باشد (Staden et al., 1999).

میزان قند محلول در گیاه تحت تأثیر تنش قرار گرفته و افزایش یافت. افزایش کربوهیدرات‌ها در شرایط تنش به عنوان یک پیام متابولیکی عمل کرده و موجب افزایش بیان ژن‌های مربوط به دفاع و کاهش فتوسنتز می‌شود. همچنین، قندها نقش‌های اکولوژیکی دیگری در محافظت گیاه علیه زخم‌ها، عفونت‌ها و نیز سم‌زدایی ترکیبات خارجی ایفا می‌کنند (Smeekens, 2000). در بسیاری از گیاهان تحمل به تنش با تجمع قندهای محلول به ویژه ساکارز در سیتوزول همراه است. قندهای محلول در سیتوپلاسم، ساختار غشاء را در طی تنش محافظت می‌کند (Xue et al., 2008).

میزان پروتئین در شرایط بیماری کاهش یافت. افزایش سرعت تجزیه پروتئین‌ها ممکن است از نتایج بروز تنش باشد (Bolen and Baskakov, 2001). تغییر در بیان، تجمع و سنتز پروتئین‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی از مکانیسم‌های مهم گیاهان در جهت حفاظت از متابولیسم سلولی و ایجاد خوگیری تلقی می‌شود. به نظر می‌رسد که فرآیند سازگاری گیاه به شرایط نامطلوب که از طریق مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک متفاوتی حاصل می‌شود، خسارت ناشی از تنش را به حداقل می‌رساند. پروتئین‌ها جزو متابولیت‌هایی هستند که به طور متفاوت در پاسخ به تنش بیان می‌شوند. پروتئین‌ها در فرآیندهایی همچون ترارسانی علامتی، فرآیندهای مربوط به RNA، ترجمه، فتوسنتز، تنفس نوری، متابولیسم کربن، نیتروژن، سولفور و انرژی نقش دارند (Heidarvand and Maali amiri, 2010).

هنگامی که گیاه مورد حمله بیمارگر قرار گیرد برای مقابله با آن از مکانیسم‌های دفاعی استفاده می‌کند. پاسخ دفاعی گیاه نیاز به سنتز پروتئین جدید دارد و از طریق شبکه‌های پیچیده و پیوسته‌ای از مسیرهای علامت‌دهی تنظیم می‌شود. مسیرهای انتقال سیگنال منجر به تقویت و چوبی شدن دیواره‌های سلول، تولید متابولیت‌های ضد میکروبی و گونه‌های اکسیژن و نیتروژن فعال می‌شود. از جمله پروتئین‌های القاشده در طول دفاع گیاه میزبان در برابر بیمارگر تولید پراکسیدازها است. پراکسیدازها در تشکیل لیگنین و سوبرین، سنتز فیتوالکسین‌ها و متابولیسم گونه‌های اکسیژن فعال دخالت می‌کنند. همچنین پراکسیدازها در پاسخ فوق حساسیت (HR) گیاه و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (PCD) میزبان در محل عفونت، در ارتباط با توسعه بیمارگر، نقش دارند (Almagro et al., 2009). افزایش فعالیت این آنزیم یکی از پاسخ‌های دفاعی در برابر تنش اکسایشی بوده و ایزوآنزیم‌های پراکسیداز نقش کلیدی در ایجاد تحمل به تنش ایفا می‌کنند (Tale Ahmad and Haddad, 2010).

میزان پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز نیز تحت تأثیر تنش بیماری قرار گرفته و میزان آن افزایش یافت. این

آنزیم‌ها از مهم‌ترین ضداکسایش‌ها هستند که موجب شکسته شدن H_2O_2 به آب و مولکول اکسیژن می‌گردند (Janda, 2005; Yong, 2008). آنزیم‌های ضداکسایش نظیر کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسمیوتاز (SOD) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) موجب حذف و غیر فعال شدن گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (McDonald, 1999). آنتی‌اکسیدانت‌ها ترکیباتی هستند که به طور مؤثری از اکسیداسیون چربی‌ها جلوگیری می‌کنند (Abdalla, 1999). در گیاهان، رابطه‌ی مثبتی بین سطح آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و مقاومت در برابر بیمارگر مشاهده شده است.

سپاس‌گزاری

بدینوسیله از همکاری و مساعدت موسسه تحقیقات کشاورزی گچساران به خاطر در اختیار قرار دادن ژنوتیپ‌های نخود مربوطه، تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از کمک‌های بی‌شائبه مسولین آزمایشگاه و گلخانه‌های دانشگاه محقق اردبیلی سپاسگزاری می‌شود.

References

Abdalla, A.E., and Roozen, J.P. 1999. Effect of plant extracts on the oxidative stability ofsunflower oil and emulsion. Food Chemistry, 64: 323-329.

Ahmad, S., Khan, M.A., Sahi, S.T., and Ahmad, R. 2013. Evaluation of chickpea germ plasm against *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab. Journal of Animal and Plant Sciences, 23 (2): 440-443.

Almagro, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., and Pedreño, M.A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. Journal of Experimental Botany, 60: 377-390.

Anonymous, 2000. Germplasm program. Annual Report for 1999. ICARDA, Aleppo, Syria.

Bagheri, A., Ganjali, A., and Parsa, M. 1997. Chickpea planting and improvement. press of Mashhad Academic Jihad. Iran. First edition. p. 444.

Basandrai, A.K., Basandrai, D., Pande, S., Sharma, M., Thakur, S.K., and Thakur, H.L. 2007. Development of *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea as affected by host resistance and plant age. European Journal of Plant Pathology, 119: 77-86.

Bates, L., Waldren, R., and Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and soil, 39 (1): 205-207.

Balakina, M.A., Smolyakova, O.B., and Tokman, M.D. 2003. Geometro-optical code for ray tracing in warm plasmas. In Litvak, A.G. (Eds.). Strong Microwaves in Plasmas, Nizhny Novgorod. Vol. 1. p. 417.

Bolen, D.W., and Baskakov, I.V. 2001. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. Journal of Molecular Biology, 310 (5): 955-963.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual of Biochemistry, 72: 248-254.

Butler, E.J. 1918. Fungi and Disease in Plants. Thaker, Sprink and Co., Calcutta, India.

Cakmac, I., and Kirikby, E. 2008. Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photo oxidative damage. Physiologia Plantarum, 133: 692-704.

Chance, B., and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology, 11: 764-755.

Chongo, G., and Gossen, B.D. 2001. Effect of plant age on resistance to *Ascochyta rabiei* in chickpea. Canadian Journal of Plant Pathology, 23: 358-363.

Dey, S.K., and Singh, G. 1993. Resistance to *Ascochyta* blight in chickpea- Genetic basis. Euphytica, 68: 147-153.

Elliott, V., Taylor, P., and Ford, R. 2013. Changes in foliar host reaction to *Ascochyta Rabiei* with plant maturity. Journal of Agricultural Science, 5 (7): 29-35.

FAO. 2014. FAOSTAT database results from FAO website. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Heidarvand, L., and Maali amiri, R. 2010. What happens in plant molecular responses to cold stress? Acta Physiologiae Plantarum, 32: 419-431.

Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., and Sanchez-Diaz, M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in alfalfa (*Medicago sativa L.*) Plants. Plant Physiology, 84: 55-60.

Janda, T., Kosa, EL., Szalai, G., and Paldi, E. 2005. Investion of antioxidant activity of maizeduring low temperature stress. Journal of Plant Physiology, 49: 53-54.

Jayakumar, P.. Gossen, B.D., Gan, Y.T., Warkentin, T.D., and Banniza, S. 2005. *Ascochyta* blight of chickpea: infection and host resistance mechanisms. Canadian Journal of Plant Pathology, 27: 499-509.

Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315-319.

Kavousi, H.R., Marashi, H., Mozafari, J., and Bagheri, A.R. 2009. Expression of phenylpropanoid pathway genes in chickpea defense against race 3 of *Ascochyta rabiei*. Plant Pathology Journal, 8: 127-132.

Koyro, H.W. 2006. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus (*L.*).* Environmental and Experimental Botany, 56: 136-146.

Kimurto, P.K., Towetti, B.K., Mulwa, R.S., Njogui, N., Jeptanui, L., Gangarao, N.V.P.R.R., Silim, S., Kaloki, P., Korir, P., and Macharia, J.K. 2013. Evaluation of chickpea genotypes for resistance to *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) disease in the dry highlands of Kenya. Phytopathologia Mediterranea, 52 (1): 212-221.

Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In Colowick, S.P., & Kaplan, N.O. (Eds). Methods in enzymology. Elsevier. Vol. 148, pp: 350-382.

Magbanua, Z.V., Moraes, C.M.D., Brooks, T.D., Williams, W.P., and Luthe, D.S. 2007. Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? Molecular Plant-Microbe Interactions, 20 (6): 697-706.

Malhotra, R.S., Baum, M., Udupa, S.M., Bayaa, B., Kabbabe, S., and Khalaf. G. 2003. *Ascochyta* blight resistance in chickpea: present status and future prospects. Proceeding of International Chickpea Congress: Chickpea Research for Millenium. Raipur, India.

Matysik, J., Bhalu, A.B., and Mohnty, P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science, 82: 525-532.

McDonald. M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. Seed Science and Technology, 27 (11): 177-237.

Miri, H.R. 2009. Physiology of Plant Stresses. Islamic Azad University of Kermanshah Branch. P. 472.

Pande, S., Sharma, M., Gaur, P.M., Tripathi, S., Kaur, L., Basandrai, A., Khan, T., Gowda, C.L.L., and Siddique, K.H.M. 2011. Development of screening techniques and identification of new sources of resistance to *Ascochyta* blight disease of chickpea. Australasian Plant Pathology, 40: 149-156.

Pande, S., Sharma, M., Gaur, P.M., Basandrai, A.K., Kaur, L., Hooda, K.S., Basandrai, D., Kiran, B.T., Jain, S.K., and Rathore, A. 2013. Biplot analysis of genotype×environment interactions and identification of stable sources of resistance to *Ascochyta* blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Australasian Plant Pathology, 42: 561-571.

Peever, T.L., Chen, W., Abdo, Z., and Kaiser, W.J. 2012. Genetics of virulence in *Ascochyta rabiei.* Plant Pathology, 61: 754-760.

Rao, L.S., Ran, U.P., Deshmukh, P.S., Kumar, P.A., and Panguluri, S.K. 2007. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genetic Resources and Crop Evolution, 54.

Reddy, M.V., and Singh, K.B. 1984. Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to *Ascochyta* blight. Plant Disease, 68: 900-901.

Santra, D.K., Tekeoglu, M., Ratnaparkhe, M., Kaiser, W.J, and Muehlbauer, F.J. 2000. Identification and mapping of QTLs conferring resistance to *Ascochyta* blight in chickpea. Crop Science, 40: 1606-1612.

Saxena, M.C. 1993. The challenge of developing biotic and abiotic stress resistance in cool-season food legumes. P. 3-14. In Singh, K.B., & Saxena, M.C. (Eds.). Breeding for Stress Tolerance in Cool-Season Food Legumes. John Wiley and Sons, Chichester, UK.

Schutz, H., and Fangmier, E. 2001. Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to elevated CO2 and water limitation. Environmental Pollution, 114: 187-194.

Sharma, M., Pande, S., and Rathore, A. 2010. Effect of growth stages of chickpea on the genetic resistance of *Ascochyta* blight. European Journal of Plant Pathology, 128: 325-331.

Shokohifar, F., Bagheri, A.R., and Fallahati Rastegar, M. 2006. Identification of resistant chickpea lines against pathotypes causing *Ascochyta* blight disease in Iran. Iranian Journal of Biology, 19: 29-42.

Singh, K.B., and Saxena, N.P. 1993. Breeding for stress tolerance in cool-season food legumes. Wiley, Chichester, UK.

Singh, K.B., and Reddy, M.V. 1993. Resistance to six races of *Ascochyta rabiei* in the world germplasm collection of chickpea. Crop Science, 33: 186-189.

Smeekens. S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51: 49-81.

Staden, J., Hare, P.D., and Cress, W.A. 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. Journal of Experimental Botany, 50 (333): 413-434.

Tale Ahmad, S., and Haddad, R. 2010. Effect of silicone on antioxidant activity and content of osmotic regulators in two bread wheat genotypes under drought stress conditions. Seed and Plant Improvement Journal, 2 (2-26): 207-225.

Toker, C. 2005. Preliminary screening and selection for cold tolerance in annual wild *Cicer* species. Genetic Resources and Crop Evolution, 52: 1-5.

Trapero-Casas, A., and Kaiser, W.J. 1992. Influence of temperature, wetness period, plant age and inoculum concentration on infection and development of *Ascochyta* blight. Phytopathology, 82: 589-596.

Udupa, S.M., and Weigand, F. 1997. Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates of Syria. p. 39-48. In: Udupa. S.M.. and Wigand. F. (ed.). DNA markers and breeding for resistance to *Ascochyta* blight in chickpea. Proceedings of the symposium on application of DNA fingerprinting for crop improvement: marker assisted selection of chickpea for sustainable agriculture in the dry areas. 11-12 April 1994, Aleppo, Syria, ICARDA.

Udupa, S.M., Weigand, F., Saxena, M.C., and Kahl, G. 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the Ascochyta blight pathogen of chickpea. Theoretical and Applied Genetics, 97: 299-307.

Warkentin, T.D., Banniza, S., and Vandenberg, A. 2005. CDC Frontier kabuli chickpea. Canadian Journal of Plant Science, 85: 909-910.

Xue, G., Lynne McIntyre, C., Glassop, D., and Shorter, R. 2008. Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. Plant Molecular Biology, 67: 197-214.

Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T.m., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., and Yoshida, S. 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. Plant Cell, 20: 1678-1692.

Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Liu, L., and Zhu, Q. 2003. Post anthesis water deficits enhance grain fillling in tuo-line hybrid rice. Crop Science, 43: 2099-2108.

Yang, X., Chen, X., Ge, Q., Li, Tong, Y., Zhang, A., Li, Z., Kuang, T., and Lu, C. 2006. Tolerance of photosynthesis to photoinhibition, high temperature and drought stress in flag leaves of wheat: a comparison between a hybridization line and its parents grown under field conditions. Plant Science, 171: 389-397.

Yong, Z., Hao-Ru, T., and Ya, L. 2008. Variation in antioxidant enzyme activites of two strawbreey cultivars with short-term low temperature stress. Journal of Agricultural Science, 4: 456-462.

© 2020 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/).

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 43(2), Summer, 2020

Evaluating resistance to *Ascochyta* blight in some chickpea genotypes and its impact on antioxidant enzymes activities, containing of Proline and carbohydrate

S. Hasanian[1], O. Sofalian[2]*, N. Zare[3], A. Tarinejad[4], M. Davari[5] and A. Pirzad[6]

1. PhD Student, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. ***Corresponding Author:** Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran (sofalian@gmail.com)
3. Associate professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
4. Associate Professor, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
5. Associate Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Department of Plant Protection, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
6. Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Department of Agronomy, Urmia university, Urmia, Iran

(DOI): 10.22055/PPR.2020.15937

Received: 8 May 2020 Accepted: 22 September 2020

Abstract

Background and Objectives

The Fungus causing *Ascochyta* blight is one of the most important biological factors limiting chickpea cultivation and production in most parts of the world, including Iran.

Materials and Methods

The present study was conducted to evaluating genetic sources of resistance of 20 chickpea genotypes in three seedling, Flowering, and podding stages in greenhouse conditions at University of Mohaghegh Ardabili. Disease damage was recorded using a 9-degree scale after observing complete death in the sensitive control genotype. Analysis of variance of the studied traits of chickpea genotypes was conducted via factorial experiment in a completely randomized design at two levels for factor A (disease-free and disease-contaminated conditions) and 18 levels (genotypes) for factor B (Given that the 13 and 15 genotypes were lost due to high susceptibility to disease in the first stage of growth, Samples were taken from 18 genotypes). Kolmogorov-Smirnov test used to evaluate the normality of data distribution.

Results

The results showed that the resistant and susceptible genotypes were more accurately distinguished from each other in the podding stage. At this stage, 9 genotypes with a degree of damage 1, 2, and 3 (less than five) showed high resistance to the causative agent of *Ascochyta* blight. Physiological and biochemical traits involved in disease resistance were measured. The results showed that all traits except chlorophyll a, chlorophyll b and polyphenol oxidase had significant differences at 1% probability level in terms of disease stress. Chlorophyll a, chlorophyll b and polyphenol oxidase traits were significantly different at 5% probability level. Genotypes were significantly different in terms of chlorophyll a and total chlorophyll traits. In interaction of disease × genotype, only catalase was significantly different among all studied traits. The amounts

of peroxidase and polyphenol oxidase have been affected by the disease and their rates increased. The highest coefficient of variation for Content soluble protein was 74.1 and the lowest for soluble sugar was 16.5. Significant interaction of genotype in stress showed that the trend of genotypes for traits under normal and stress conditions was not the same and superior genotypes under normal conditions were not necessarily recommended for disease stress conditions.

Discussion

A positive relationship between polyphenol oxidase level and pathogen resistance was observed in the plants. The amount of damage that stress inflicts on crops leads to further efforts to understand the effects of disease on different plant mechanisms and requires understanding of appropriate adaptive responses to this environmental factor.

Keywords: Ascochyta blight, Biochemical traits, Chickpea (Cicer arietinum), Disease Intensity, Resistant and sensitive genotype