فصلنامه تحقیقات نوین در گیاه‌پزشکی
دانشگاه آزاد اسلامی شیراز
۱۴۰۰ - ۱۰ (۲) : ۶۳-۷۴

ارزیابی گلخانه‌ای و مولکولی مقاومت ارقام ایرانی لوبیا به قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* عامل پژمردگی (زردی) فوزاریومی

احسان حسنوند، صدیقه محمدی*

گروه گیاه‌پزشکی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

(*)Mohammadi.pp@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۱۱/۰۴

چکیده

پژمردگی فوزاریومی لوبیا با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* یک بیماری مهم است و می‌تواند خسارت شدیدی را به محصول لوبیا در سراسر جهان وارد نماید و باعث کاهش عملکرد شود. از آنجا که روش‌های زراعی برای کنترل بیماری به طور کامل مؤ ثر نیست، ارقام با مقاومت ژنتیکی برای مبارزه با این بیماری توصیه می گردد. به منظور شناسایی ارقام مقاوم آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و ۱۲ تیمار (شامل ارقام مختلف لوبیا) با روش تلقیح، ریختن سوسپانسیون اسپور بیمارگر پای بوته انجام شد. در روش ریختن سوسپانسیون اسپور بیمارگر پای بوته به دلیل سالم بودن ریشه‌ها درصد کمتری از اسپورها توانایی نفوذ به ریشه را دارند بنابراین شدت علائم مشاهده شده کمتر بود و واکنش ارقام به صورت مقاوم و متحمل مشاهده گردید. با توجه به این‌که این بیماری باعث زردی و پژمردگی گیاه می‌شود فاکتورهای غلظت کلروفیل a، غلظت کلروفیل b، غلظت کارتنوئید و غلظت کل کلروفیل اندازه‌گیری شد که با ارزیابی صفات اندازه‌گیری شده ارقام مقاوم و متحمل شناسایی شدند. براین اساس به ترتیب ارقام صیاد، ناز و E9نسبت به ارقام دیگر مقاومت بیشتری به این بیماری نشان دادند. سپس واکنش ارقام مختلف لوبیا به قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* با استفاده از نشانگر اختصاصیSCAR ارزیابی گردید. براین اساس ارقام اختر، ناز، صدری، صیاد، E9 و WA با جفت آغازگر SU20 ایجاد باند ۷۵۰ bp نمودند و دارای ژن مقاوم A55 بودند اما ارقام تلاش، شکوفا، جگری، ایج، خمین و کپسولی با جفت آغازگر اختصاصی SU20 تولید باند نکردند.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی فوزاریومی، لوبیا، صفات فنوتیپی، SU20 ، نشانگر مولکولی.

مقدمه

یکی از بیماری‌های قارچی لوبیا پژمردگی فوزاریومی(زردی) می‌باشد که عامل آن قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* می‌باشد (Kendrick, 1942). این بیماری اولین بار توسط Harter *et al.* (1929) در آمریکا شناسایی شد. بیماری پژمردگی فوزاریومی لوبیا در خیلی از نواحی کشت لوبیا در سراسر دنیا از جمله برزیل، کلمبیا، پرو، کاستاریکا، ایتالیا، اسپانیا، یونان، نیوزلند، آفریقای جنوبی و آمریکا خسارت وارد می‌کند(Alves-Santos, 1999; Buruchara & Camacho, 2000; Schwartz, 2005). بنا به گزارش

Salgado *et al*. (1995) در مناطق کشت لوبیا در دنیا ۱۰ درصد خسارت به‌دلیل قارچ *Fusarium oxysporum* می‌باشد که به بافت آوندی نفوذ و باعث زردی و پژمردگی بوته می‌شود. همچنین گزارشاتی مبنی بر وجود این بیمارگر در مزارع لوبیای ایران وجود دارد (Heidarian & Ershad, 2002; Faraji *et al*., 2004). این بیماری باعث مشکل اقتصادی در بیشتر مناطق رشد لوبیا می‌گردد به طوری که در برخی از مناطق در شمال غربی ایران خسارت به بیش از ۷۰ درصد هم می رسد (Naseri, 2008; Saremi *et al*., 2011). در ارقام حساس به خصوص اگر در اوایل مرحله گیاهچه‌ای شرایط گرما بر مزرعه مسلط شود خسارت قابل توجه می‌باشد (Naseri, 2008). فشردگی خاک و زهکشی ضعیف باعث تشدید بیماری می‌شود(Schwartz, 1996). این بیماری معمولاً در گیاهانی که تحت تنش محیطی هستند خسارت شدیدی بر جای می‌گذارد زیرا ریشه اصلی آسیب می‌بیند و باعث افزایش ریشه‌های فرعی شده که تنها می‌توانند آب سطحی که ناکافی می‌باشد را از خاک جذب کنند. این قارچ از قارچ‌های خسارت‌زا روی لوبیا به‌ویژه در مناطقی می‌باشد که دما بالا بوده و خشکسالی در طول فصل رشد لوبیا رخ می‌دهد. در خاک‌هایی که در اثر کمبود رطوبت و اکسیژن ریشه رشد مطلوبی ندارد، پژمردگی فوزاریومی ریشه تقریباً تمام محصول لوبیا را با خسارت جدی روبرو می‌کند. حتی در ارقامی از میزبان که دارای بالاترین سطح مقاومت نسبت به این بیماری هستند در صورتی که ریشه‌ها در خاک غرقاب و فاقد اکسیژن کافی به مدت ۲٤ ساعت قرار گیرند، بیماری بر میزبان غلبه خواهد کرد(Bruton & Miller, 1997). استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل در کنار روش‌های کنترل رطوبت و مواد غذایی خاک، اثرات چشم‌گیری در مدیریت تلفیقی پژمردگی فوزاریومی ریشه لوبیا ایجاد می‌شود(Jansen *et al*., 2004). در تحقیقی که Saremi *et al*. (2007) روی مقاومت ارقام مختلف لوبیا به قارچ زردی فوزاریومی در استان‌های شمال‌غربی انجام دادند از لحاظ مقاومت و عملکرد محصول، رقم ناز بیشترین مقدار و رقم سهیر حساس و عملکرد پایینی را نشان داد. از سال ۱۹۸۰ با کشف نشانگرهای مولکولی نقشه‌یابی ژنتیکی ژن‌های مقاومت به بیماری کارایی اصلاح گیاهان را بهبود بخشید. SCAR یکی از نشانگرهای مهم می‌باشد که از آن در تولید لاین‌های مقاوم به بیمارگرهای قارچی در لوبیا استفاده می‌شود (Brick, 2006; Fall, 2001). Fall *et al*. (2001) یک نشانگر SCAR لینک شده به مکان کنترل صفات کمی را توسعه دادند و آن را در طیف گسترده‌ای از ژرم پلاسم‌های لوبیا آزمایش کردند. Brick *et al*. (2006) در تحقیقی، واکنش لاین‌های حاصل از خودباروری یک گیاه دگرباور لوبیا به قارچ زردی فوزاریومی را بررسی کردند و در ابتدا براساس فاکتور غلظت رنگدانه ارقام مقاوم و حساس در شرایط گلخانه شناسایی شدند. سپس از نشانگر SU20 برای شناسایی ارقام مقاوم لوبیا به زردی فوزاریومی استفاده شد. در این تحقیق ابتدا صفات فنوتیپی اندازگیری شد سپس تأثیر نشانگر مولکولی SCAR در پیش‌بینی واکنش لاین‌های منتخبی از گیاه لوبیا که در پژوهش‌های قبلی پیوستگی و ارتباط این نشانگر با ژن‌های مقاومت به فوزاریوم در لوبیا به اثبات رسیده است (Brick, 2006; Fall, 2001) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی، خالص سازی و شناسایی بیمارگر

در بازدید از مزارع لوبیا در شهرستان خرم‌آباد در تابستان سال ۱۳۹۱ از گیاهان لوبیای مشکوک به پژمردگی فوزاریومی نمونه‌برداری به‌عمل آمد، نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه و اعمال ضدعفونی سطحی با هیپوکلریدسدیم یک درصد، با کشت ناحیه بین قسمت سالم و آلوده گیاه از حدود ۲۰ سانتی‌متری ساقه، روی محیط کشت PDA، عامل بیماری‌زا جدا شد. خالص‌سازی جدایه‌ها با روش تک‌اسپور انجام گرفت. تشخیص و شناسایی گونه *Fusarium oxysporum* با استفاده از کلید، شناسایی انجام گرفت (Leslie and Summerell., 2006).

آزمون بیماری‌زایی و تعیین فرم تخصصی

به منظور اثبات بیماری‌زا بودن جدایه‌های جمع‌آوری شده وتعیین فرم تخصصی، آزمون بیماری‌زایی در گلخانه بر روی گیاه میزبان (لوبیا) و سایر گیاهان خانواده کدوئیان براساس اصول کخ انجام گرفت.

بررسی فنوتیپی مقاومت لوبیا

در این تحقیق ۱۲رقم مختلف از لوبیای معمولی شامل ۳ تیپ قرمز (کپسولی، جگری، ناز، صیاد و اختر)، چیتی (تلاش، ایج، خمین، صدری و E9) و سفید (شکوفا و WA) از مراکز تحقیقات کشاورزی زرقان، کرمانشاه، لرستان و مشهد استفاده شد. ارقام لوبیا در گلدان‌هایی حاوی خاک رس و ماسه بادی به نسبت ۱:۱ استریل شده با اتوکلاو در شرایط گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد شیراز کشت گردیدند. طرح آماری در قالب کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و هر گلدان حاوی ۳ بذر در نظر گرفته شد. برای این تحقیق ۷۲ گلدان کشت شد که نیمی از گلدان‌های کشت شده برای آزمایش تلقیح و نیمی دیگر برای آزمایش شاهد استفاده شدند. وقتی گیاهچه‌ها به مرحله دو برگچه‌ای رسیدند تلقیح انجام گرفت. برای انجام تلقیح سوسپانسیون اسپور با غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر استریل پای بوته ریخته شد. ۱۰ روز بعد از تلقیح به مدت ۲ روز برای رشد بهتر بوته‌های لوبیا با ۱/۰ گرم کود N.P.K. (16-28-8) در یک لیتر آب کوددهی شد. پس از گذشت سه الی چهار هفته علایم بیماری ظاهر شد. با توجه به این‌که این بیماری باعث زردی و پژمردگی گیاه و تغییر رنگ آوند می‌شود فاکتورهای فنوتیپی زیر اندازه‌گیری شد:

۱) تعیین میزان رنگدانه‌ها

برای اندازه‌گیری کلروفیل ۰/۰۵ گرم از برگ را وزن کرده و به ۵ میلی لیتر DMSO اضافه گردید. به مدت ۳ ساعت در آون با دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفت سپس در ٤٧٠ نانومتر (کارتنوئید)، ٦٤٥ نانومتر (کلروفیل a) ، ٦٦٥ نانومتر (کلروفیل b) اسپکتروفتومتر کرده و با استفاده از فرمول‌های زیر صفات مورد نظر به دست آورده شد (Arnon, 1959):

$$\textbf{Carotonoid (mg/ml)} \;:\; (1000\,A_{470} - 3.27\,[\text{Chl a}] - 104\,[\text{chl b}])/227$$

$$[\text{Chl b}] : 22.90\,E^{a\,645} - 4.68\,E^{b\,663}$$

$$[\text{Chl a}] : 12.70\,E^{663} - 2.69\,E^{645}$$

$$8.02\,E^{663} + 20.21\,E^{645} : \text{Total chl [Chl a + b]}$$

۲) ارزیابی ارقام با استفاده از نشانگر مولکولی SCAR

استخراج دی.ان.ای کل از گیاهان شاهد به روش Hot CTAB براساس روش (Zhang *et al.*, 2000)با اندکی تغییرات جزئی انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگاروز اندازه‌گیری شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از دستگاه BioRad با ۱ میکرولیتر DNA، ۲ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۷ میکرولیتر ($MgCl_2$ (50μM، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10μM)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/μl) و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر SU20 (10μM) ساخت شرکت سیناژن (ایران) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با برنامه مطابق (جدول۱) صورت گرفت. سپس محصول PCR به منظور ایجاد باند اختصاصی بر روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد الکتروفورز گردید و بعد به کمك دستگاه عکس‌برداری ژل UVidoc مدل GAS9000 از آن‌ها عکس‌برداری شد (جدول۲).

جدول ۱- برنامه زمانی و چرخه های دمایی آغازگرها

Table1. Time sheet and temperature cycling primer SU20 (for 30 cycles)

	Primary temperature.	Denaturing	Annealing	Extention	Final Extention.
Temperature (Celsius)	94	94	53	72	72
Time (min)	5	1	1	1	5

جدول ۲- نشانگر مولکولی SCAR در رابطه با ژن‌های مقاوم به قارچ Fusarium wilt در لوبیا

Table 2. Molecular markers SCAR in relation to the resistance genes to *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in beans.

SCAR Name	Marker of Origin	Size(bp)/ orention	Sequences of SCARS	Tagged Locus	LG	Reference
SU20	U20	750	F: ACA GCC CCC ATT GTG AAT TGT AT R: ACA GCC CCC ACA CTT ATG GCA	A55	10	Brick, 2006 Fall, 2001

نتایج

الف) ارزیابی میزان خسارت قارچ Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli در شرایط گلخانه

۱) ارزیابی واکنش ارقام مختلف لوبیا به زردی فوزاریومی در تیمارهای آلوده

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ساده صفات اندازه‌گیری شده در جدول ۳ آمده است. براساس این جدول ارقام در سطح احتمال یک درصد از نظر غلظت کلروفیل a و غلظت کارتنوئید تفاوت معنی‌داری دارند و در سطح احتمال پنج درصد از نظر غلظت کلروفیل b، غلظت کل کلروفیل اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهند. این موضوع بیان کننده تنوع زیاد ارقام از نظر صفات مورد بررسی می‌باشد. از آنجایی که ۱۲ رقم مورد مطالعه از سه نوع لوبیا چیتی، قرمز و سفید می‌باشند این امر (معنی‌دار شدن اختلاف بین ارقام) منطقی به نظر می‌رسد. مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد در جدول ٤ آمده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود بالاترین غلظت کلروفیل a مربوط به ارقام ناز، صیاد، صدری، اختر و E9 و پایین‌ترین آن به ارقام جگری، خمین، کپسولی، ایج، شکوفا، تلاش و WA تعلق داشت. از نظر شاخص غلظت کلروفیل b ارقام صیاد، WA و ناز دارای بیشترین و مابقی ارقام دارای کمترین مقدار بودند. ارقام ناز، صیاد، WA، صدری، جگری، اختر، E9 و تلاش دارای بیشترین غلظت کارتنوئید بودند و ارقام خمین، کپسولی، ایج و شکوفا دارای کمترین غلظت بودند. بیشترین غلظت کلروفیل کل مربوط به ارقام E9 و صیاد و کمترین آن به ارقام صدری، خمین، جگری، کپسولی، ایج و شکوفا اختصاص داشت. براساس نتایج به‌دست آمده از میزان رنگدانه‌ها، بیشترین رنگدانه‌ها در ارقام تحت تنش صیاد، ناز و E9 و کمترین میزان آن‌ها در ارقام خمین، کپسولی و ایج مشاهده گردید.

جدول ۳- تجزیه واریانس ساده صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش تیمارهای آلوده

Table 3. Variance analysis of simple characters measured in infected treatments

Sources changes	Degrees of freedom	Chlorophyll b concentration	Chlorophyll a concentration	carotenoid Concentration	Total chlorophyll Concentration
Cultivar	11	1.77**	8.26**	2.08**	3.50*
Block	2	5.18**	4.23^{ns}	0.02^{ns}	0.67^{ns}
Error	22	0.64	2.30	0.32	1.24
%C.V	*****	29.27	25.86	14.21	27.02

ns, * and **: Not-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively

جدول ۴- مقایسه میانگین ارقام در خصوص صفات اندازه‌گیری شده با آزمون دانکن

Table 4. Compare average the cultivars for the characters measured by Duncan test

Cultivar	Carotenoid Concentration	Chlorophyll b concentration	Chlorophyll a concentration	Total chlorophyll Concentration
Talash	4.45^{ab}	2.83^{bc}	5.96 ^{bcde}	4.45^{abc}
Shekofa	3.46 ^{bc}	1.92 ^{c}	5.00 ^{cde}	3.46 ^{bc}
Jegari	4.01^{ab}	2.19^{c}	5.21^{cde}	4.01^{bc}
Akhtar	4.44^{ab}	2.73^{bc}	8.26^{ab}	4.44^{abc}
Naz	4.78a	3.16^{abc}	6.63^{abc}	4.78abc
Aej	2.77^{c}	2.79^{bc}	5.31^{cde}	2.77c
Khomein	2.86^{c}	1.83^{c}	3.45^{de}	2.86^{c}
E9	4.58^{a}	2.79^{bc}	6.23^{abcd}	6.41^{a}
Kapsoli	2.67^{c}	1.98^{c}	3.19^{e}	2.67^{c}
Sadri	4.07^{ab}	2.53bc	6.47^{abc}	4.07^{bc}
Sayad	5.09^{a}	4.36^{a}	8.87^{a}	5.09^{ab}
WA	4.53^{ab}	3.85^{ab}	5.81^{bcde}	4.39^{abc}

-Means followed by the same letters in each column are not significantly different by the Duncan's test at 5% probability level

۲) ارزیابی ارقام مختلف لوبیا در خصوص صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای شاهد

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ساده صفات اندازه‌گیری شده در جدول ۵ آمده است. براساس این جدول ارقام در سطح احتمال پنج درصد از نظر غلظت کلروفیل a و غلظت کل کلروفیل اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهند. مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد که نتایج مربوطه در جدول ٤ آمده است. با توجه به جدول ٦ بالاترین غلظت کلروفیل a مربوط به ارقام ناز، جگری، تلاش، اختر و E9 و پایین‌ترین آن به ارقام WA، صدری، کپسولی و شکوفا تعلق داشت. از نظر غلظت کلروفیل b ارقام با هم اختلاف معنی‌دار نداشته و در یک گروه آماری قرار گرفتند. رقم اختر دارای بیشترین غلظت کارتنوئید بود و ارقام صیاد، جگری، ایج و شکوفا دارای کمترین غلظت بودند. بیشترین غلظت کلروفیل کل مربوط به رقم اختر و کمترین آن به ارقام خمین، کپسولی، ایج، صدری، صیاد، E9، WA و شکوفا اختصاص داشت.

جدول ۵- تجزیه واریانس ساده صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای شاهد روش تلقیح پای بوته

Table 5- Variance analysis of simple characters measured in control treatments by method inoculation of root drench.

Mean squares

Sources changes	Degrees of freedom	Chlorophyll b concentration	Chlorophyll a concentration	Carotenoid Concentration	Total chlorophyll Concentration
Cultivar	11	1.48^{ns}	7.83*	1.13^{ns}	21.89*
Block	2	0.47^{ns}	6.68^{ns}	0.27^{ns}	83.56**
Error	22	2.00	3.59	0.68	9.99
%C.V	******	36.80	18.03	15.77	25.74

ns, * and **: Not-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively

جدول۶- مقایسه میانگین ارقام در خصوص صفات اندازه‌گیری شده با آزمون دانکن

Table 7- Compare average the ccultivars for the characters measured by Duncan test

Cultivar	Carotenoid Concentration	Chlorophyll b concentration	Chlorophyll a concentration	Total chlorophyll Concentration
Talash	5.28^{ab}	4.33^{a}	12.21^{ab}	15.13ab
Shekofa	4.04^{b}	2.57^{a}	7.25^{c}	10.13^{b}
Jegari	4.78^{b}	3.03^{a}	10.97^{ab}	14.01^{ab}
Akhtar	6.54^{a}	5.04^{a}	13.31^{a}	18.36^{a}
Naz	5.37^{ab}	3.56^{a}	11.48^{ab}	15.04^{ab}
Aej	4.92^{b}	3.29^{a}	10.61^{abc}	10.64^{b}
Khomein	5.62^{ab}	3.72^{a}	10.34^{abc}	11.65^{b}
E9	5.53^{ab}	4.39^{a}	11.63^{ab}	11.15^{b}
Kapsoli	5.36^{ab}	4.60^{a}	9.47^{bc}	10.45^{b}
Sadri	5.41^{ab}	3.19^{a}	8.79^{bc}	10.21^{b}
Sayad	4.61^{b}	3.85^{a}	10.49^{abc}	10.24^{b}
WA	5.37^{ab}	4.49^{a}	9.57^{bc}	10.33^{b}

-Means followed by the same letters in each column are not significantly different by the Duncan's test at 5% probability level

۳) تجزیه واریانس مرکب صفات اندازه‌گیری شده ارقام لوبیا در دو آزمایش تیمارهای شاهد و آلوده

با در نظر گرفتن شـرایط دو آزمایش جداگانه و با فرض مدل آماری ثابت برای تیمارها و آزمایش‌ها، تجزیه مرکب داده‌ها بر روی صفات مورد بررسی انجام و نتایج در جدول ۷ درج گردید. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود ارقام و آزمایش در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شدند و اثر متقابل آزمایش در ارقام مختلف از لحاظ صفات غلظت کلروفیل a و غلظت کلروفیل b معنی‌دار نشده که نشان دهنده‌ی این است که در صفات قید شده ارقام در دو آزمایش در شرایط یکسانی ظاهر شده‌اند اما در دیگر صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده اثر متقابل آزمایش در ارقام مختلف در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردیده است و مفهوم آن این است که آلودگی بر روی این صفات تأثیر داشته یا به عبارت دیگر آزمایش بدون آلودگی شاهد آزمایش آلودگی است.

جدول ۷- تجزیه واریانس مرکب صفات اندازه‌گیری شده ارقام لوبیا در تیمارهای شاهد و آلوده

Table7. Variance analysis compound of measured characteristics bean cultivars in control and infected treatments.

Sources changes	Degrees of freedom	Carotenoid Concentration	Chlorophyll b concentration	Chlorophyll a concentration	Total chlorophyll Concentration
test	1	31.88**	27.27**	332.19**	34.88**
block	2	0.38	2.61	2.24	0.69
cultivar	11	4.14**	2.83*	13.08**	3.11**
test×cultivar	11	1.37**	1.25ns	2.59ns	2.27**
test error	46	0.37	1.28	1.96	0.29
% C.V.	******	14.80	30.18	24.83	14.47

ns, * and **: Not-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively

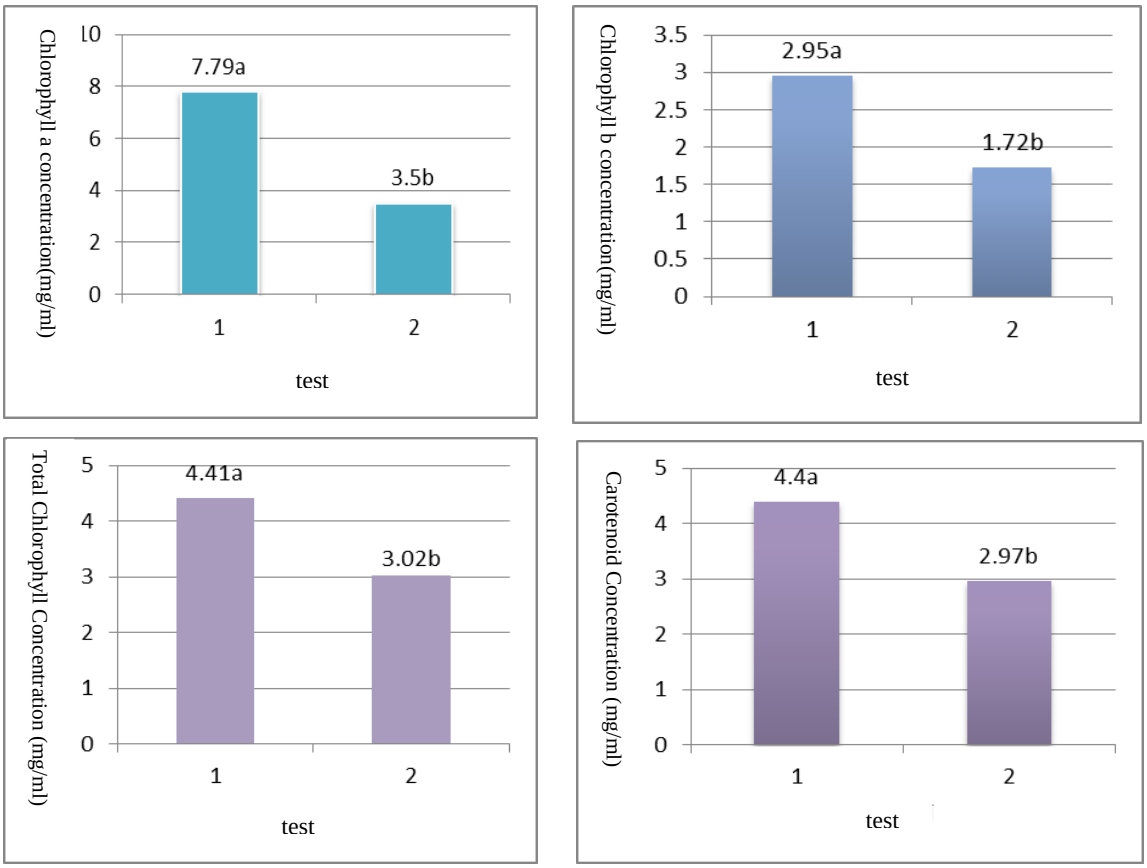
٤) مقایسه صفات اندازه‌گیری شده ارقام مختلف لوبیا در تیمارهای شاهد و آلوده

در این تحقیق صفات اندازه‌گیری شده در شاهد و آلوده با هم مقایسه شدند. همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود بین ارقام مختلف در شاهد و آلوده از لحاظ صفات غلظت کلروفیل a، غلظت کلروفیل b، غلظت کارتنوئید و غلظت کل کلروفیل اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در واقع بیمارگر روی صفات قید شده تأثیر محسوسی داشته است. با مقایسه‌ی شکل صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای شاهد و آلوده به خوبی مشخص شد که در تیمارهای آلوده نسبت به تیمارهای شاهد غلظت کلروفیل a، غلظت کلروفیل b، غلظت کارتنوئید و غلظت کل کلروفیل کاهش یافته است.

بحث

پژمردگی فوزاریومی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ریشه و آوندی لوبیای کشت شده در سراسر جهان می‌باشد که همراه با کاهش محصول و خسارت اقتصادی است (Bruton et al., 1997; Saremi et al., 2011). این بیماری باعث مشکل اقتصادی در بیشتر مناطق رشد لوبیا می‌باشد به طوری‌که گزارشاتی مبنی بر وجود این بیمارگر در کشت لوبیای استان‌های مختلفی از ایران نیز وجود دارد (Fall et al., 2001; Harter et al., 1929). کنترل پژمردگی فوزاریومی به دلیل تشکیل کلامیدوسپور[1] که در خاک برای مدت زمان طولانی زنده می‌ماند دشوار است. استفاده از مواد شیمیایی، کنترل زراعی و درمان‌های بیوکنترلی نمی‌تواند این بیماری را به طور موثر محدود کند بلکه مقاومت ژنتیکی مقرون به صرفه ترین معیار کنترل می‌باشد (Pastor-Corrales et al., 1987). در این تحقیق ۱۲ رقم لوبیا در شرایط گلخانه کشت داده شد که از لحاظ رنگدانه‌ها واکنش آن‌ها به قارچ زردی فوزاریومی مورد ارزیابی قرار گرفت که در نتیجه ارقام صیاد، ناز وE9 به عنوان ارقام مقاوم به این بیماری معرفی شدند. مقاوم بودن ارقام ناز و صیاد با نتایج تحقیقی که Saremi et al. (2011) انجام داده‌اند هم‌خوانی دارد.

[1] chlamydospores



شکل ۱- اندازه گیری صفات مختلف در تیمار شاهد و آلوده لوبیا (۱ شاهد و ۲ آلوده به عامل پژمردگی فوزاریومی) (در هر شکل ستون‌های با حرف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند)

Figure 1. Different characteristics in control and treatment bean (1 is control and 2 is treatment test) (columns with same letter in each figure are not significantly different at the 5% level)

۱) ارزیابی مقاومت ارقام مختلف لوبیا به زردی فوزاریومی با استفاده از صفات اندازه‌گیری شده

بین ارقام مختلف در ارتباط با صفت غلظت کارتنوئید در آزمایش تیمارهای شاهد تفاوت‌هایی دیده می‌شود، در صورتی‌که F تیمار مربوط به این صفت معنی‌دار نگردیده است. نکته‌ای که در این زمینه لازم به ذکر می‌باشد این است که براساس گزارش Brick *et al.* (2004)، در بسیاری از آزمایش‌ها میانگین‌های تیمارها در اطراف میانگین کل آزمایش به‌طور قرینه‌ای قرار می‌گیرند که موجب کوچک شدن واریانس تیمار و در نتیجه معنی‌دار نبودن آن می‌گردد. در حالی‌که بین چند جفت میانگین از جمله کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین آن‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد. براساس نتایج آماری در آزمایش تیمارهای شاهد رقم اختر از لحاظ صفات غلظت رنگدانه‌های مختلف نسبت به ارقام دیگر بالاتر می‌باشد اما این رقم پس از ایجاد آلودگی دچار تنش شده و از لحاظ صفات قید شده دچار کاهش محسوسی شده است و تأثیر بیمارگر بر این رقم کاملاً مشهود می‌باشد اما ارقام صیاد و E9 با این‌که در تیمارهای شاهد از لحاظ غلظت رنگدانه‌های اندازه‌گیری شده در مقدار پائینی قرار دارند اما در تیمارهای آلوده از نظر صفات ذکر شده ارقام صیاد و E بالاترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند. با توجه به این‌که یکی از علائم فوزاریومی لوبیا، زردی می‌باشد پس مقایسه میانگین این صفات منطقی می‌باشد. در این صفات اندازه‌گیری شده به خوبی تأثیر قارچ بر رنگدانه‌ها مشاهده می‌شود.

گزارش‌های متعددی وجود دارد که انواع تنش‌ها باعث کاهش مراحل رویشی زندگی گیاه می‌گردند (Schwartz *et al.*, 2005).

معنی‌دار شدن اثر متقابل نوع آزمایش × ارقام مختلف در مورد جدول ۵ در ارتباط با برخی صفات نشان دهنده این است که بعضی از ارقام در آزمایش بدون تلقیح (شاهد) و بعضی در آزمایش با تلقیح (آلودگی) بروز بهتری داشته‌اند به عبارت دیگر آلودگی تأثیر یکسانی بر روی همه ارقام نداشته است (مقاومت یا تحمل‌های متفاوت ارقام).

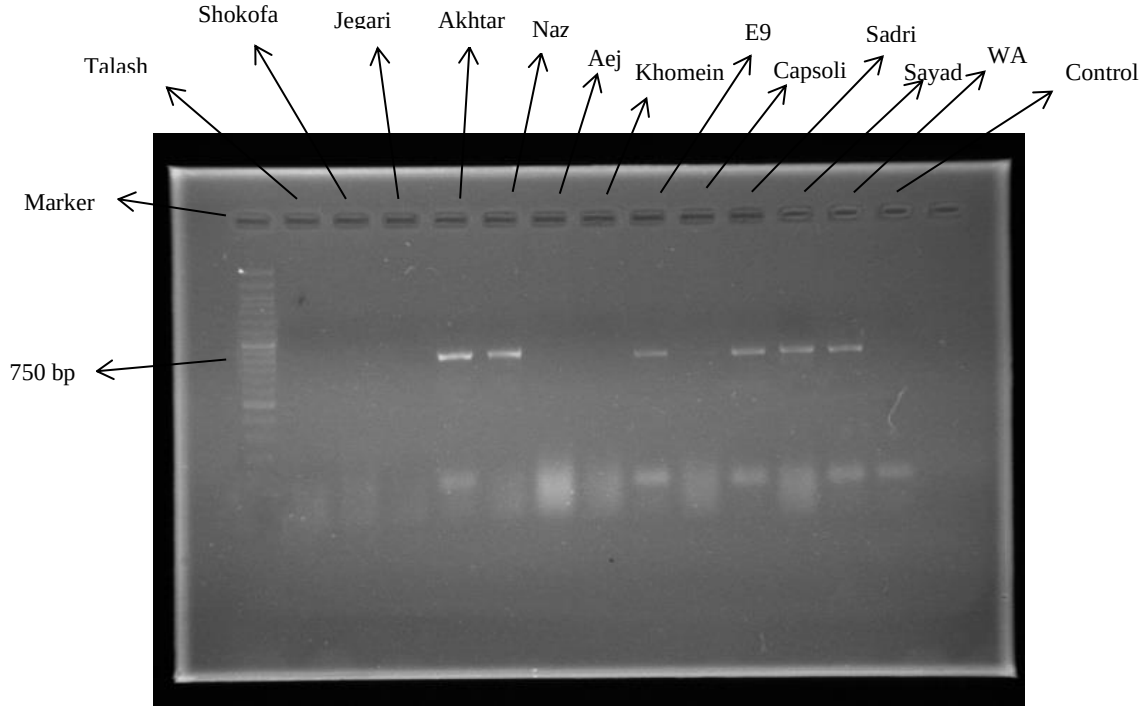
۲) ارزیابی واکنش ارقام مختلف لوبیا به قارچ F. oxysporum f.sp. phaseoli با استفاده از نشانگر اختصاصی SCAR

جدول۸ و شکل۲ نتایج حاصل از ارزیابی واکنش ارقام مختلف لوبیا به جفت آغازگر اختصاصی SU20 (مشخص‌کننده ژن A55) را نشان می‌دهد. همان طور که دیده می‌شود ارقام اختر، ناز، صدری، صیاد، E9 و WA با جفت آغازگر SU20 یک قطعه دی ان ای به اندازه 750 bp را تکثیر کرده‌اند و دارای ژن مقاوم A55 می‌باشند. اما ارقام تلاش، شکوفا، جگری، ایج، خمین و کپسولی با جفت آغازگر اختصاصی SU20 تولید هیچ محصولی نکردند.

جدول ۸ – وجود یا فقدان ژن مقاوم در ارقام مختلف براساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگر SU20

Table 8. Existence or lack genes resistant in varieties by polymerase chain reaction with primer SU20

Cultivar	Sayad	Sadri	Kapsoli	E9	Khomein	Aej	Naz	Akhtar	Jegari	Shekofa	Talash	WA
Gene A55	+	+	–	+	–	–	+	+	–	–	–	+



شکل۲- باند اختصاصی مربوط به نشانگر SU20 (750bp SCAR marker for A55 gene) در ارقام مختلف لوبیا.

Figure2. Specific band the marker SU20 (750bp SCAR marker for A55 gene) in different bean cultivars

با توجه به این‌که غلظت رنگدانه‌ها در ارقام صیاد، ناز و E9 بالاتر از سایر ارقام بودند بنابراین به نظر می‌رسد در بین ارقام مورد

استفاده سه رقم صیاد، ناز و E9 مقاومت بالاتری را نشان دادند. مقاومت این ارقام نیز با بررسی مولکولی ارقام فوق با استفاده از نشانگر مولکولی SCAR با دو آغازگر F: ACA GCC CCC ATT GTG AAT TGT AT و R: ACA GCC CCC ACA CTT ATG GCA نیز به اثبات رسیده است.

در این تحقیق شش رقمی که با جفت آغازگر SU20 ایجاد باند کرده‌اند از لحاظ صفات اندازه‌گیری شده هم مقاوم یا متحمل بوده‌اند در واقع دارای ژن مقاوم A55 می‌باشند. در این تحقیق نتایج کاربرد نشانگر مولکولی SCAR در پیش بینی واکنش ژرم‌پلاسم‌های لوبیا به بیماری زردی فوزاریومی با مطالعات Brick *et al.* (2004) و Fall *et al.* (2001) مطابقت داشت.

رقم اختر با وجود این‌که براساس غلظت رنگدانه‌ها مقاومت نداشت اما با جفت آغازگر SU20 باندی را ایجاد کردند در واقع دارای ژن مقاوم A55 می‌باشند اما احتمالاً این ژن در کنار یک ژن دیگر مقاومت خود را بروز می‌دهد. رقم جگری با وجود این‌که براساس ارزیابی صفات اندازه‌گیری شده متحمل بود با جفت آغازگر فوق باندی را ایجاد نکرد به عبارت دیگر فاقد ژن مقاوم A55 می‌باشد احتمال وجود ژن دیگری غیر از این ژن در این رقم وجود دارد که روشن شدن این موضوع نیاز به مطالعات تکمیلی بیشتری دارد. نتایج مطالعات قبلی نیز نشان می‌دهد که ژرم پلاسم‌های لوبیا مکانیسم‌های ژنتیکی متفاوتی را جهت مقاومت به پژمردگی فوزاریومی می‌گذرانند و برخی ژرم پلاسم‌ها با یک ژن و برخی با چند ژن مقاومت را کنترل می کنند (Salgado *et al.*, 1995; Cross *et al.*, 2000). بنابراین عدم تطابق بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در مورد برخی لاین‌ها به همین دلیل می‌تواند باشد..

منابع

Alves-Santos, F.M., Benito, E.P., Eslava, A.P. & Diaz-Minguez, J.M. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied Environment Microbiology*, 65: 3335-3340.

Brick, M.A., Ogg, J.B., Schwartz, H.F., Byrne, P.F. & Kelly, J.D. 2004. Resistance tomultiple races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* in common bean. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 47:131-132.

Brick, M.A., Byrne, P.F., Schwartz, H.F., Ogg, J.B., Otto, K., Fall, A.L. & Gilbert, J. 2006. Reaction to Three Races of Fusarium Wilt in the *Phaseolus vulgaris* Core Collection. *Crop Science*, 46:1245–1252.

Bruton, B.D. & Miller, M.E. 1997. *Occurrence of Vine Decline Diseases of Muskmelon in Guatemala Phytopathology*, 81(6): 589- 69.

Buruchara, R.A. & Camacho, L. 2000. Common Bean Reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in central Africa. *Phytopathology*, 148:39–45.

Cross, H., Brick, M.A., Schwartz, H.F., Panella, L.W. & Byrne, P.F. 2000. Inheritance of Resistance to Fusarium Wilt in Two Common Bean Races. *Crop Science*, 40:954–958.

Fall, A.L., Byrne, P.F., Jung, G., Coyne, D.P., Brick, M.A. & Schwartz, H.F. 2001. Detection and mapping of a major locus for Fusarium wilt resistance in common bean. *Crop Science*, 41:1494-1498.

Faraji, M., Okhovat, M., Kheiri, A. & Niknam, G. 2004. Study of pathogenicity of different isolates of *Fusarium* spp. on six cultivars of bean. *Paper Presented at: 16 th Iranian Plant Protection Congress; 28 August-11 September; Tabriz, Iran.*

Harter, L.L. & Weimer, J.L. 1929. A monographic study of sweetpotato diseases and their control. *U.S.A Department of Agriculture, Technology Science Service, Bulletin*, 99,118 pp.

Heidarian, A. & Ershad, J. 2002. Identification and study of the fungi causing foot and root rot on French bean in Chaharmahal and Bakhtiari Province. *Paper Presented at: 15 th Iranian Plant Protection Congress; 7-11 September; Kermanshah, Iran.*

Jensen, C., Kurle, J.E. & Percich, J.A. 2004. Integrated management of edaphic and biotic factors limiting yield of irrigated soybean and dry bean in Minnesota. *Field Crops Research*, 86: 211-224.

Kendrick, S. 1942. Fusarium yellows of beans. *Phytopathology* 32: 1010-1014.

Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2006. Fusarium laboratory manual. Black Well Publishing. 387 pp.

Naseri B. 2008. Root rot of common bean in Zanjan, Iran: major pathogens and yield loss estimates. *Australasian Plant Pathology*, 37 (6): 546 - 551.

Pastor-Corrales, M.A. & Abawi, G.S. 1987. Reactions of selected bean germplasm to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease*, 71:990-993.

Salgado, M.O., Schwartz, H.F. & Brick, M.A. 1995. Inheritance of resistance to a Colorado Race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Disease*, 79:279–281.

Saremi, H., Mohammadi, J. & Okhovvat, S.M. 2007. Naz, a resistant cultivar on bean root rot disease in Zanjan Province, northwest Iran. *Communication in Agricultural and Applied Biological Science*, 72 (4): 757-64.

Saremi, H., Amiri, M.E. & Ashrafi, J. 2011. Epidemiological aspects of bean decline disease caused by Fusarium species and evaluation of the bean resistant cultivars to disease in Northwest Iran. *Biotechnology*, 10(66): 14954-14961.

Schwartz, H.F., Franc, G.D. & Kerr, E.D. 1996. Fungal diseases. Dry bean production and pest management regional bulletin. *Colorado State University*, 67–77.

Schwartz, H.F., Steadman, J.R., Hall, R. & Forster, R.F. 2005. Compendium of bean diseases. *American Phytopathology Society Press*, 109 pp.

Zhang, J. & McStewart, J.D. 2000. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. *Journal of Cotton Science*, 4: 193-201.

Journal of Novel Researches on Plant Protection
(Islamic Azad University, Shiraz Branch)
2021 – **10** (**2**): 63-74

Greenhouse and molecular evaluation of resistance of Iranian bean cultivars to *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, the causal agent of Fusarium wilt

Ehsan Hasanvand, Sedighe Mohammadi[2*]

Department of Plant Protection, Shiraz Branch, Islamic Azad University Shiraz, Fars-Iran
(*)mohammadi.pp@gmail.com

Abstract

Fusarium wilt (yellow) that caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, is an important disease and can cause severe damage to bean products world wide and cause reduced functional. Since farming techniques to control the disease is not completely effective, cultivars with genetic resistance to the disease are recommended. In order to identify resistant cultivars experiment in that randomized complete block design with three replications and 12 trkeatments, including different cultivars of beans. By method at a concentration suspension inoculation of root drench were inoculated. In root drench method suspension spores of pathogen because of healthy roots a lower percentage of spores could penetrating in roots. So it was far less severe symptoms and can say all cultivars has same statistical group and were resistant and infected cultivars tolerant. Considering the fact that the disease causes yellowing and wilting the factors concentration of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoid concentrations and chlorophyll total concentrations were measured with evaluating resistant and tolerant cultivars were identified. Accordingly, cultivars Sayad and E9 respectively than other cultivars showed more resistant to the disease. Then the reaction is different bean cultivars to fungal *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* were evaluated using specific marker SCAR. According to cultivars Akhtar, Naz, Sadri, Sayad, E9 and WA with primer pairs SU20 have a band of 750 bp and A55 are resistant gene but cultivars Talash, Shekofa, Jegari, Aje, Khomeyn and capsules with specific primer pairs SU20 did not produce band.

Keywords: Fusarium wilt, bean, Phenotypic traits, SU20, molecular markers.