بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۷ / شماره ۳ / سال ۱۴۰۰: ۱۸۹-۲۰۱ DOI: 10.22034/ijpp.2021.526701.349

CC BY

مقاله پژوهشی

شناسایی ملکولی ارقام لوبیا برای مقاومت جزئی در برابر *Colletotrichum lindemuthianum* بر اساس نشانگرهای SCAR

فواد حسینی[۱]، آقافخر میرلوحی[۱] و بهرام شریف نبی[۲*]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷)

چکیده

بیماری آنتراکنوز لوبیا ناشی از قارچ *Colletotrichum lindemuthianum* یکی از بیماری‌های مهم لوبیا در ایران است. در این پژوهش وجود یا عدم وجود ژن‌های مقاومت به بیماری با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر *SCAR* پیوسته به ژن‌های مقاومت در ۱۲ رقم لوبیای ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ارزیابی فنوتیپی بیماری در شرایط گلخانه براساس شدت شاخص بیماری بررسی شد. حضور ژن‌های مقاومت *Co-4²*، *Co-4*، *Co-6* و *Co-9* به ترتیب با نشانگرهای *SAS13*، *SY20*، *SZ04* و *SB12* در تمام ارقام ردیابی گردید. ژن *Co-4²* پیوسته به نشانگر *SBB14*، ژن *Co-4* پیوسته به نشانگر *SC08*، و ژن مقاومت *Co-6* با نشانگر *SZ20* در ارقام اختر، درخشان، الماس، تلاش و کوشا ردیابی گردید. در ارقام گلی و ناز، ژن *Co-4²* ردیابی و در ارقام پاک، صدری و خمین دو ژن *Co-4* و *Co-4²* ردیابی گردید. ژن *Co-4²* پیوسته با نشانگر *SH18*، در دو رقم درسا و شکوفا ردیابی گردید. حضور ژن مقاومت *Co-2*، تنها در رقم الماس مشاهده شد. ژن *Co-5* پیوسته با نشانگر *SAB3* تنها در رقم افتراقی مربوطه مشاهده شد. ارزیابی فنوتیپی بیماری در شرایط گلخانه براساس شدت شاخص بیماری نشان داد که از بین ۱۲ رقم مورد بررسی چهار رقم (ناز، الماس،درسا و شکوفا) واکنش مقاومت نشان دادند در حالی که دو رقم اختر و گلی در گروه نیمه مقاوم قرار گرفتند. براساس شدت شاخص بیماری ارقام مذکور از یک مقاومت نسبی برخوردار بودند زیرا شاخص شدت بیماری در هیچ یک از ارقام برابر یک نشد. بررسی همزمان نتایج ملکولی و فنوتیپی نشان داد که تنها دو نشانگر *SQ4* و*SH18* در ارقام مقاوم (الماس، شکوفا و درسا) در طی واکنش زنجیره ای پلیمراز موفق به تکثیر باند *DNA* شدند. نتایج بدست آمده از این پژوهش کمک شایانی در تولید ارقام مقاوم لوبیا به بیماری آنتراکنوز از طریق هرمی سازی ژن‌های مقاومت با استفاده از نشانگرهای ملکولی خواهد بود.

کلیدواژه: ارزیابی مقاومت، نشانگرهای پیوسته به ژن، مقاومت نسبی، آنتراکنوز

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sharifna@iut.ac.ir

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد و استاد گروه ژنتیک و بهنژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران.

۲. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران.

DOI: 10.22034/ijpp.2021.526701.349

Research Article

Molecular identification of bean cultivars for partial resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* based on SCAR markers

F. Hosseini[1], A. Mirlohi[1], and B. Sharifnabi[2*]

(Received: 6.1.2021; Accepted: 8.5.2021)

Abstract

Anthracnose caused by *Colletotrichum lindemuthianum* is one of the most important bean diseases in Iran. In this study, the presence of disease resistance genes was investigated using 10 pairs of SCAR primers in 12 Iranian bean cultivars. Also, disease symptoms were evaluated based on the intensity index in the greenhouse condition. Amplification of SCAR markers SAS13, SY20, SZ04 and SB12 indicated the presence of *Co-4^2*, *Co-4*, *Co-6* and *Co-9* resistant genes respectively. Cultivars Akhtar, Derakhshan, Almas, Talash and Koosha contained *Co-4^2*, *Co-4* and *Co-6* resistance gene revealed by amplification of SBB14, SC08 and SZ20 markers accordingly. *Co-4^2* gene was detected in Goli and Naz cultivars and *Co-4* and *Co-4^2* genes were present in Pak, Sadri and Khomein cultivars. *Co-4^2* gene that is linked to SH18 marker was observed in Dorsa and Shokofa cultivars. The presence of *Co-2* resistance gene was observed only in Almas cultivar. *Co-5* gene linked to SAB3 marker was only observed in the related differential cultivars. Phenotypic evaluation for disease symptoms showed that out of 12 cultivars studied, four (Naz, Almas, Dorsa and Shokofa) showed resistance reaction and two (Akhtar and Goli) were moderately resistant. Based on the intensity of the disease index, these cultivars were considered relatively resistance. Simultaneous analysis of molecular and phenotypic data showed that only the two markers of SQ4 and SH18 yielded in amplifying the expected band in the resistant cultivars Diamond, Shokofa and Dorsa. The results of this study will be beneficial for producing resistant bean cultivars against anthracnose disease by pyramiding of the resistance genes.

Keywords: Resistance evaluation, Gene linked markers, Relative resistance, Bean anthracnose

* Corresponding author's E-mail: sharifna@iut.ac.ir

1. Graduate student and Prof. Department of Plant Production and Genetics, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran.
2. Prof. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran.

مقدمه

در بسیاری از کشورهایی که با کمبود مواد غذایی روبرو هستند، کمیت و کیفیت پروتئین مسئله اساسی تغذیه است. لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) به عنوان یکی از مهم ترین منابع پروتئین گیاهی در کشورهای در حال رشد و کشورهای پیشرفته می‌باشد. میزان تولید لوبیا خشک درجهان در سال ۲۰۱۸ حدود ۳۰ میلیون تن و در ایران، طی همین سال (۱۳۹۷) حدود ۲۲۰ هزار تن بوده است (FAOSTAT 2018). یکی از عوامل محدود کننده تولید این محصول، قارچ *C.lindemuthianum* (Sacc& Magnus) Briosi & Cavara است که یکی از مخرب‌ترین و متداول ترین بیماری لوبیا درجهان می‌باشد. رطوبت نسبی بالا و درجه حرارت بین ۲۶-۱۳ درجه سلسیوس شرایط لازم را برای این بیمارگر فراهم می‌کند. در مناطقی که از ارقام حساس و بذور آلوده استفاده می‌شود تلفات می‌تواند تا ۱۰۰٪ هم برسد (Singh & Schwartz 2010). از اینرو شناسایی منابع مقاومت به بیماری آنتراکنوز و تعیین ژن‌های مقاومت موجود در آنها یکی از ضروریات دستیابی به ارقام مقاوم و ایجاد مقاومت پایدار به این بیماری می‌باشد. غربال گری ملکولی ارقام لوبیا توسط نشانگرها رویکرد برای انتخاب غیر مستقیم منابع بالقوه ژن‌های مقاومت است. شناسایی ارقام مقاوم این امکان را فراهم می‌کند که از آنها درتلاقیها به عنوان والد استفاده شود. مقاومت ژنتیکی در برابر بیمارگرهای گیاهی، از جمله *C. lindemuthianum* لوبیای معمولی، به عنوان یک روش مؤثر، ایمن از لحاظ زیست محیطی و قابل قبول از لحاظ اجتماعی برای کنترل بیماری شناخته شده است (Mahuku & Riascos 2004. Kelly & Vallejo. 2004). تغییرپذیری زیاد در بیمارگرها و احتمال شکست مقاومت در پاتوسیستم لوبیا-آنتراکنوز از مشکلات عمده این روش می‌باشد. هیچ ژن مقاومی وجود ندارد که در برابر تمام نژادهای شناخته شده آنتراکنوز مقاومت داشته باشد. انتظار می‌رود هرمی شکل کردن ژنهای مقاوم به نژادهای خاص آنتراکنوز منجر به افزایش مقاومت پایدار در لوبیاهای معمولی دربرابر نژادهای مختلف بیمارگرها شود (Mahuku et al. 2002). اولین ژن مقاومت به آنتراکنوز با استفاده از نشانگرها RAPD[1] شناسایی شد (Kelly & Vallejo 2004). سپس نشانگرهای SCAR[2]، AFLP[3] و SSR[4] پیوسته با حداقل ۹ و ١٤ ژن اصلی *Co* گزارش شده است. محققان در شرایط عدم وجود نقشه پیوستگی لوبیا معمولی، در ابتدا جمعیت‌هایی در حال تفکیک را با نشانگرهای RAPD برای شناسایی پیوستگی غربال کردند. نشانگرهایی که همبستگی بیشتری با مقاومت به بیماری نشان دادند، برای تسهیل استفاده آنها در برنامه اصلاحی، به نشانگرهای قوی تر SCAR تبدیل شدند (Young et al. 1997). ثابت شده است که در بیشتر برنامه‌های اصلاحی، نشانگرهای SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) از کارائی بسیار خوبی برخوردار هستند (Young et al. 1998). تاکنون حدود بیست ونه ژن مقاومت به آنتراکنوز در لوبیای معمولی مشخص شده است (*Co*-1 تا *Co-14* و *Co-u*، *Co-v*، *Co-w*، *Co-x*، *Co-u* و*Co-z*)، که برخی از این ژنها، چندآللی هستند. این فهرست ژن *Co-9* را شامل نمی‌شود، زیرا مشخص شده است که *Co-9* آلل دیگری از ژن *Co-3* است. به استثنا ژن *Co-8* که مغلوب گزارش شده است،

1 Random Amplified Polymorphic DNA
2 Sequence Characterized Amplified Region
3 Amplified Fragment Length Polymorphism
4 Simple-sequence Repeats

بقیه ژن‌ها غالب هستند (Ferrea et al. 2013). گیتا و همکاران (Geetha et al. 2013) برای شناسایی ارقام مقاوم لوبیای فرانسوی به بیماری آنتراکنوز از ١٤ نشانگر SCAR استفاده کردند. پنج نشانگرSAS13، SF10، SC08، SZ04 و SBB14 به خوبی توانستند باندهای اختصاصی مرتبط با مقاومت در ارقام مورد بررسی ایجاد کنند. تا کنون گزارشی از کاربرد این نشانگرهای مولکولی جهت بررسی مقاومت در تفکیک ارقام لوبیا در ایران ارائه نشده است. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی نشانگر مولکولی SCAR در ردیابی ژن‌های مقاومت در لوبیاهای ایرانی و ارتباط آن با ارزیابی‌های مقاومت فنوتیپی رقم‌های مورد مطالعه نسبت به قارچ آنتراکنوز بود. پیوستگی و ارتباط این نشانگرها با ژن‌های مقاومت به آنتراکنوز پیش از این در ارقام غیر ایرانی به اثبات رسیده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ارقام لوبیا معمولی شامل شکوفا، پاک، الماس، درسا (لوبیا سفید)، درخشان، اختر، ناز، گلی (لوبیا قرمز)، صدری، تلاش، کوشا، محلی خمین (لوبیا چیتی) و ارقام افتراقی (Cornell79242، TO، G2333، TU، AB136 ، PI207262) حامل ژن مقاومت به بیماری آنتراکنوز (شاهد مثبت) استفاده شد. این ارقام از مرکز ملی تحقیقات لوبیا در خمین و مرکز بین المللی سیات درکلمبیا (CIAT) تهیه شدند. در ارزیابی صورت گرفته درآزمون بیماری زایی، از سویه نژاد دو *C. lindemuthianum* (کد کلکسیونی قارچ شناسی دانشگاه تهران: UTFC -C70) که اولین نژاد شناسایی شده در ایران می‌باشد، استفاده شد(Atghia 2015).

ارزیابی مقاومت فنوتیپی ارقام لوبیا

نخست تعداد ٣٠ بذر از هر رقم به منظور جوانه زنی به مدت ٤٨ ساعت در پارچه مرطوب نگهداری شد. سپس بذرها در گلدان‌هایی که حاوی بستر کوکوپیت و پرلایت بود در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار بیولوژیکی کشت شدند. سپس گلدان‌ها تحت شرایط دمایی ٢٥ درجه سلسیوس و ١٦ ساعت روشنایی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان قرار گرفتند. گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگی با سوسپانسیون (10^6 اسپوردر هر میلی لیتر) به طور کامل مایه زنی شدند. پس از مایه زنی، گلدان‌ها در دمای ٢٣-٢١ درجه سلسیوس و ١٢ ساعت در گلخانه با رطوبت بالای ٩٥٪، به مدت ٤٨ ساعت روشنایی قرار داده شدند(شکل ١). پس از ١٥ روز بعد از مایه زنی علائم بیماری به صورت لکه برگی و زخم روی ساقه ظاهر شد و آمار برداری از بوته‌ها آغازگردید. ارزیابی مقاومت بر اساس شاخص های ذکر شده به روش زیر صورت گرفت.

الف: شدت شاخص بیماری

این شاخص بر اساس روش موندا و همکاران (Munda et al. 2009) و مقیاس ٠-٩ تعیین گردید. در این مقیاس ٣-١ فاقد علائم یا تشکیل لکه‌های کوچک با میزان خسارت یک درصد، ٣/١-٦ = لکه‌های قهوه ای تیره روی برگ و ساقه با میزان خسارت ٢٠درصد و ٦/١-٩ = لکه‌های بزرگ با اسپور فراوان یا کل برگ خشکیده با میزان خسارت بیش از ٢٥درصد است. بر اساس این روش، ارقامی که شدت بیماری آنها در مقیاس یک تا سه باشد جزء ارقام مقاوم، ارقامی که مقیاس سه و یک تا شش را شامل شوند جزء ارقام نیمه مقاوم و ارقامی که مقیاس

شکل ۱. قرار گیری گلدان ها در گلخانه پس از تلقیح با اسپور قارچ *C. lindemuthianum* تحت شرایط محیطی کنترل شده

Fig. 1. Placement of pots in the greenhouse after inoculation with *C. lindemuthianum* spores under controlled environmental conditions

شش و یک تا نه را نشان دهند جزء ارقام حساس محسوب می‌شوند.

ب: درجه آلودگی

برای بررسی درجه آلودگی از روش ون شونوون و همکاران (Van Schoonhoven et al. 1987) و از مقیاس۱-۹ استفاده شد: در این مقیاس ۱= برگ‌های گیاه کاملا سالم، ۳ = فقط چند لکه کوچک روی رگبرگ اولیه برگ‌های پایینی یا غلاف با خسارت یک درصد، ۵ = چند لکه کوچک روی دمبرگ و رگبرگ‌های اولیه گیاه با خسارت حدود پنج درصد، ۷ = وجود لکه‌های فراوان و نکروتیک روی سطح برگ‌های بالائی با خسارت حدود ۱۰ درصد و ۹ = نکروز شدید در بیش از ۲۵ درصد از سطح گیاه و مرگ گیاه می‌باشد. شدت شاخص بیماری بر اساس فرمول (۱) بدست آمد، که در آن i نرخ شدت بیماری، p_i تعداد برگ با نرخ i، i_{max} بالاترین نرخ بیماری، و p_{total} تعداد کل برگ‌های مایه زنی شده در طی ارزیابی علائم می‌باشد.

$$DSI = \frac{\sum(i \times p_i)}{i_{max} \times p_{total}}$$

قبل از انجام تجزیه واریانس، داده‌ها مورد ارزیابی‌های آزمون‌های کنترل کفایت و درستی تجزیه واریانس قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی دار(LSD) در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از نرم افزار R انجام گرفت.

ردیابی ژن‌های مقاومت با استفاده از نشانگرهای SCAR

در این تحقیق شش ژن مقاومت با ده نشانگر پیوسته ردیابی شد. لازم به ذکر است که برای ژن *Co-4* دو آلل، برای ژن *Co-4*^{2} سه آلل و برای ژن *Co-6* دو آلل ردیابی گردید. برای ردیابی ژنهای مقاومت DNA از برگ گیاهچه‌های ارقام لوبیا رشد یافته درگلدان در مرحله ٤-٥ برگی با استفاده ازکیت (Genetbio) کره جنوبی استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و ژل آگاروز انجام شد. اجزای واکنش PCR برای حجم ۱۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA

جدول ۱. نشانگر های SCAR پیوسته به ژن های مقاومت به بیماری آنتراکنوز در لوبیای معمولی، نام ژن، اندازه، توالی آغازگر هـا، ارقـام افتراقی و دمای اتصال آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Table 1. Information's on sequence characterized amplified region (SCAR) markers linked to anthracnose resistance genes in common bean used in this study

Marker[a]	Gene linked to marker	Size(bp)	Primer sequence	Diffrential cultivar	Annealing Temperature (ºC)
SQ4	*Co-2*	1440	F: CCT TAG GTA TGG TGG GAA ACG A R: TGA GGG CGA GGA TTT CAG CAA GTT	Cornell 79242	62.2
SY20	*Co-4*	830	F: AGC CGT GGA AGG TTG TCA T R: CCG TGG AAA CAA CAC ACA AT	To	53
SC08	*Co-4*	910	F: AGA ATG CCT TTA GCT GTT GG R: CAG AGA GGC TAG GCT TAT CG	To	53.4
SAS13	*Co-4*[2]	950	F: CAC GGA CCG AAT AAG CCA CCA ACA R: CAC GGA CCG AGG ATA CAG TGA AAG	G2333	65.5
SH18	*Co-4*[2]	1100	F: CCA GAA GGA GCT GAT AGT ACT CCA CAA C R: GGT AGG CAC ACT GAT GAA TCT CAT GTT GGG	G2333	69
SBB14	*Co-4*[2]	1050	F: GTG GGA CCT GTT CAA GAA TAA TAC R: GTG GGA CCT GGG TAG TGT AGA AAT	G2333	58.4
SAB03	*Co-5*	400	F: TGG CGC ACA CAT AAG TTC TCA CGG R: TGG CGC ACA CCA TCA AAA AAG GTT	Tu	58.3
SZ20	*Co-6*	845	F: ACC CCT CAT GCA GGT TTT TA R: CAT AAT CCA TTC ATG CTC ACC	AB136	54.1
SZ04	*Co-6*	567	F: GGC TGT GCT GAT TAA TTC TGG R: TGC TCA TTT TAT AAT GGA GAA AAA	AB136	52
SB12	*Co-9*	350	F: CCT TGA CGC ACC TCC ATG R: TTG ACG ATGGG TTG GCC	PI207262	52.5

Source: Bean Improvement Cooperative (2018)

با غلظت ۲۰µl/ng ، آغـازگر مسـتقیم و معکـوس سـاخته شده توسط شرکت (Macrogen) کره جنوبی هرکـدام ۰/۵ میکرولیتـر، ۵/۷ میکرولیتـر مسـترمیکس (Genetbio) کـره جنوبی و ۵/۵ میکرولیتر آب سترون دوبار تقطیر شده بود. برنامه حرارتی PCR برای همه نشانگرها بـه غیـر از SB12 به ترتیب شامل یک چرخه واسرشتی اولیـه بـه مـدت ۳۰۰ ثانیه در ۹٤°c ادامـه بـا ۳۰ چرخـه واسرشـتی در ۹٤°c بـه مدت ٦۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمـای ۵۲ تا ٦۲.۲°c، مرحله بسط آغـازگر بـه مـدت ٦۰ ثانیـه در دمای ۷۲°c و بسط نهایی یک چرخه ٦۰ ثانیه ای در دمای ۷۲°c انجـام گرفـت. برنامـه حرارتـی واکـنش زنجیـره ای پلیمراز برای نشانگر SB12 به ترتیـب شـامل یـک چرخـه واسرشتی اولیه بـه مـدت ۳۰۰ ثانیـه در ۹۵°c ادامـه بـا ٤۰ چرخه واسرشتی در ۹۵°c به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال آغـازگر به مدت ۱۵ ثانیه در دمای۵۲/۵، مرحلـه بسـط آغـازگر بـه مـدت ۲۵ ثانیـه در دمـای ۷۲°c، و بسـط نهـایی یـک چرخه۳۰۰ ثانیه ای در دمای ۷۲°c انجام گرفت. بـه منظـور مشاهده محصولات PCR در ابتـدا ژل آگـاروز بـا اتیـدیوم برماید ۲٪ رنگ آمیزی شد و سپس باندهای مـورد نظـر بـا دستگاه ژل داک (Uvi doc, USA) مشاهده گردید.

نتایج

بررسی شدت شاخص بیماری در ارقام لوبیا

علائم بیماری به صـورت‌های مختلـف، لکـه قهـوه ای،

شکل۲. علائم ایجاد شده روی برگ و ساقه ی گیاه مبتلا به آنتراکنوز در رقم حساس خمین

Fig. 2. Anthracnose symptoms on the leaves and stems of susceptible Khomen bean cultivar

سوختگی رگبرگ، زخم روی ساقه و نهایتا بوته میری در ارقام حساس ظاهر شدند(شکل۲). نتایج حاصل از تجزیه واریانس شدت شاخص بیماری نشان داد ۱۲ رقم لوبیا مورد مطالعه نسبت به قارچ عامل آنتراکنوز اختلاف معنی دار داشتند(جدول۲). براساس میانگین شدت شاخص بیماری چهار رقم (الماس، درسا، شکوفا، ناز) با شدت شاخص بیماری بین ۱۵ درصد در (رقم ناز) تا ٤٢ درصد در (رقم الماس) درگروه مقاوم قرار گرفتند. دو رقم اختر و گلی با شدت شاخص بیماری ٤٥ و ۵۳ درصد به عنوان نیمه مقاوم ثبت شد و سایر ارقام با شدت شاخص ۵۸ درصد در رقم پاک تا ۹۷ درصد در رقم تلاش به عنوان حساس معرفی شدند. ارقام با توجه به اینکه اختلاف معنی‌داری از لحاظ شدت شاخص بیماری داشتند براساس مقایسه میانگین با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) به هفت گروه تقسیم شدند (شکل۳). برای رسم نمودار از رنگ‌های پکیج (colorBlindness) که مناسب افراد کورنگ می‌باشد، استفاده شد. در این تقسیم بندی گروه (a) کمترین مقاومت و گروه (f) بیشترین مقاومت به بیماری را دارا بود.

جدول ۲. تجزیه واریانس شدت شاخص بیماری ۱۲ رقم لوبیا در پاسخ به عامل بیماری آنتراکنوز *C. lindemuthianum*

Table 2. Analysis of variance for disease severity index of 12 bean genotypes in response to *C. lindemuthianum*

Source of Variation	DF	Mean squers
Genotypes	11	2954.01*
Error	24	23.18
CV%	8.12	

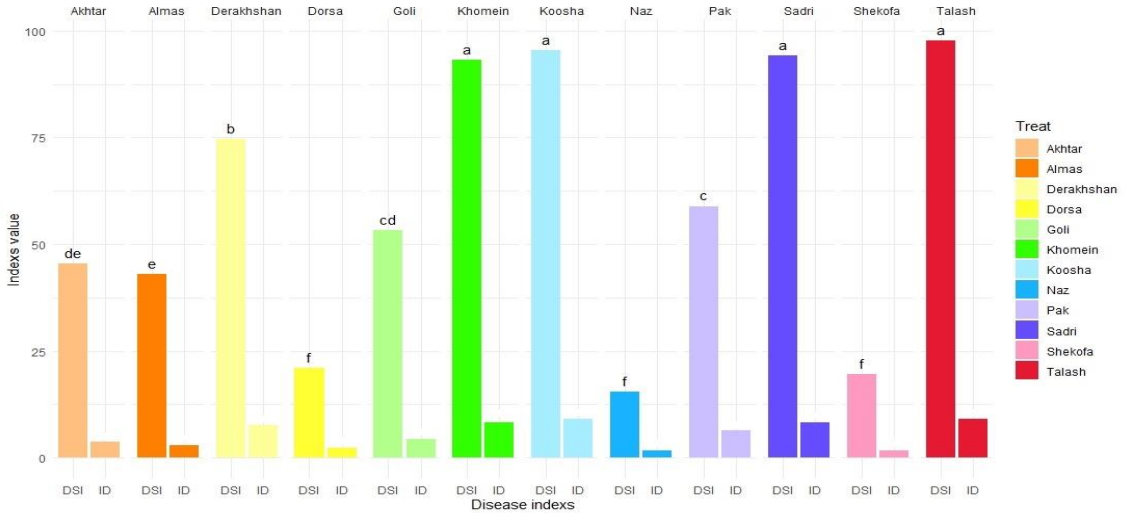
*: معنی دار بودن در سطح ۵٪

***: significant difference at 5%**

بررسی وجود ژن‌های مقاومت در ارقام لوبیا به کمک نشانگرهای SCAR

در بررسی ملکولی۱۰ نشانگر SCAR برای ارزیابی وجود ژن‌های مقاومت در این رقم‌ها از طریق PCR و الکتروفورز ژل آگاروز مورد استفاده قرار گرفت. به طور کلی حضور یک باند با اندازه مشخص نشان دهنده ژن مقاومت مورد نظر می‌باشد (Geetha et al. 2013). آغازگرهای SAS13، SY20، SZ04 و SB12 به ترتیب با تکثیر قطعات ۹۵۰، ۸۳۰، ٥٦٧ و ۳۵۰ جفت بازی در تمام ارقام مورد مطالعه و ارقام افتراقی(شاهدهای مثبت)، وجود ژن‌های مقاومت به آنتراکنوز *Co-4²*، *Co-4*، *Co-6* و *Co-9* را تایید کردند(شکل٤).

وجود ژن *Co-6* در برخی ارقام لوبیا و رقم شاهد توسط نشانگر SZ20 با تکثیر قطعه ٨٤٥ جفت بازی معلوم گردید. نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز موجب تکثیر قطعه ٨٤٥ جفت بازی که بیانگر حضور ژن *Co-6* می‌باشد در ارقام اختر، درخشان، الماس، تلاش، کوشا و رقم شاهد مثبت گردید. نشانگر SC08 موجب تکثیر قطعه ۹۱۰ جفت بازی (ژن *Co-4*) در ارقام اختر، درخشان، الماس، پاک و تمام ارقام لوبیا چیتی و رقم شاهد مثبت گردید. حضور ژن *Co-2* در رقم الماس و شاهد مثبت توسط نشانگر SQ4 با تکثیر قطعه ١٤٤٠ جفت بازی معلوم



شکل۳. مقایسه میانگین شدت شاخص بیماری آنتراکنوز و درجه آلودگی ۱۲ رقم لوبیای ایرانی

Fig. 3. Mean Comparison of anthracnose disease severity and infection indices of 12 Iranian bean cultivars

Disease indexs شاخص های بیماری، Indexs value کمیت شاخص ها، DSI شاخص شدت بیماری، ID درجه آلودگی، Treat تیمارها

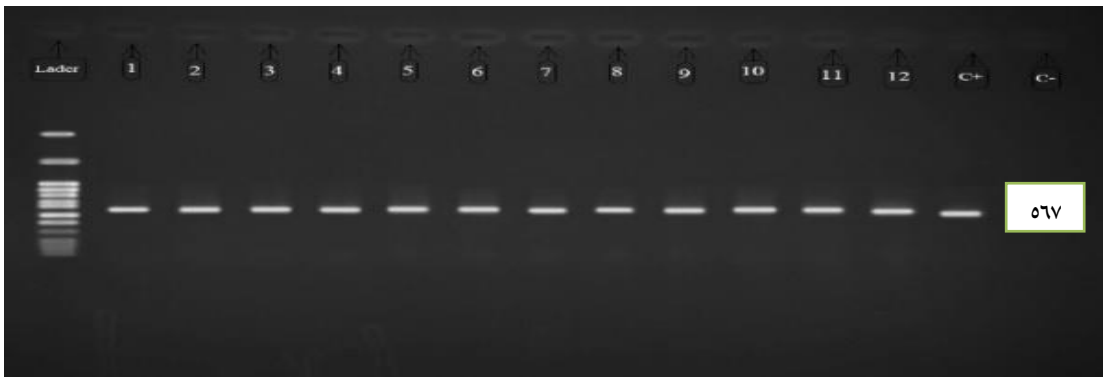
میانگین ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ می باشند

DSI disease severity index, ID degree index

Means with similar letters in each column bar are not significantly different at 5% probability level

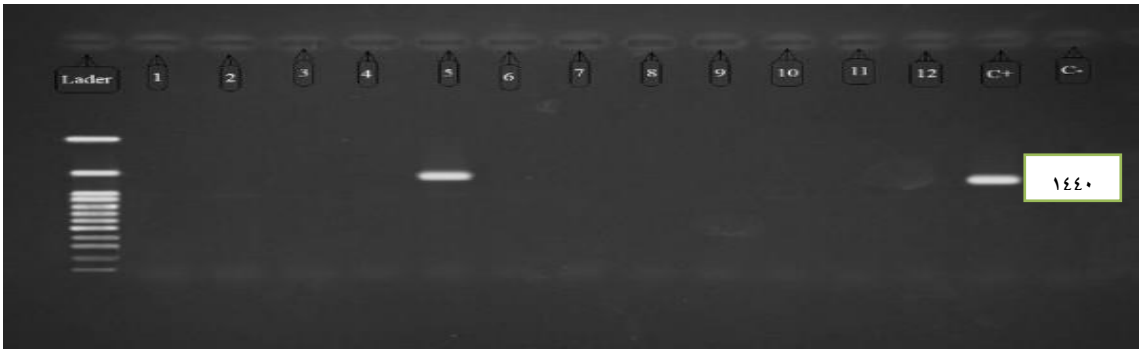
گردید(شکل۵).

بنابراین هشت رقم از دوازده رقم مورد مطالعه حاوی ژن *Co-4* بودند. نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز نشان داد که نشانگر SBB14 با تکثیر قطعه۱۱۵۰یا۱۰۵۰ جفت بازی حضور ژن مقاومت به آنتراکنوز *Co-4*^{2} را در بیشتر ارقام لوبیا مشخص ساخت. در تمام ارقام لوبیای قرمز، چیتی، دو رقم پاک و الماس(ارقام سفید) و همچنین رقم شاهد مثبت قطعه



شکل٤. الگوی ژل الکتروفورز آگارز حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز با آغازگر SZ04 در ارقام لوبیا: نشانگر اندازه ۱- اختر ۲- درخشان ۳- گلی ٤- ناز ٥- الماس ٦- درسا ۷- پاک ۸- شکوفا ۹- صدری ۱۰- تلاش ۱۱- کوشا ۱۲- خمین ۱۳- شاهد مثبت (AB136) ۱٤- شاهد منفی

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis profiles obtained from polymerase chain reaction with SZ04 primer in bean cultivars. 1-Akhtar 2- Derakhshan 3- Goli 4- Naz 5- Almas 6- Dorsa 7- Pak 8- Shekofa 9- Sadri 10- Talash 11- Kosha 12- Khomein 13- Positive control (AB136) 14- Negative control



شکل۵. الگوی ژل الکتروفورز آگارز حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز با آغازگر SQ4 در ارقام لوبیا: نشانگر اندازه ۱- اختر ۲- درخشان ۳- گلی ٤- ناز ٥- الماس ٦- درسا ۷- پاک ۸- شکوفا ۹- صدری ۱۰- تلاش ۱۱- کوشا ۱۲- خمین ۱۳- شاهد مثبت (Cornell79242) ١٤- شاهد منفی

Fig. 5. Agarose gel electrophoresis profiles obtained from polymerase chain reaction using SQ4 primer in bean cultivars. 1-Akhtar 2- Derakhshan 3- Goli 4- Naz 5- Almas 6- Dorsa 7- Pak 8- Shekofa 9- Sadri 10- Talash 11- Kosha 12- Khomein 13- Positive control (Cornell79242) 14- Negative control

مذکور تکثیر شد. حضور ژن *Co-4*^{2} پیوسته به نشانگر SH18 بر اساس تکثیر قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی در برخی ارقام مشخص شد. پروفایل ژل الکتروفورز حاصل از نتایج زنجیره ای پلیمراز نشان داد، تنها دورقم درسا، شکوفا و رقم شاهد مثبت حاوی ژن *Co-4*^{2} هستند. نشانگر SAB03 با تکثیر قطعه ٤۰۰ جفت بازی حضور ژن *Co-5* را تنها در رقم شاهد (Tu) مشخص ساخت (شکل٦ و جدول۳).

بحث

بیماری‌های گیاهی نتیجه‌ی تعامل بین یک میزبان حساس و یک بیمارگر پرآزار در شرایط محیطی مطلوب هستند. متغیرهایی مانند دما، رطوبت نسبی، زمان و وضعیت فیزیولوژیک گیاه یا بیمارگر می‌توانند نتیجه‌ی تعامل گیاه لوبیا با بیمارگر آنتراکنوز را تغییر دهند (Tu et al. 1980). عملکرد لوبیا در اثر بیماری آنتراکنوز و

شکل٦. الگوی ژل الکتروفورز آگارز حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز با آغازگرSAB03 در ارقام لوبیا: نشانگر اندازه ۱- اختر ۲- درخشان ۳- گلی ٤- ناز ٥- الماس ٦- درسا ۷- پاک ۸- شکوفا ۹- صدری ۱۰- تلاش ۱۱- کوشا ۱۲- خمین ۱۳- شاهد مثبت (TU) ١٤- شاهد منفی

Fig. 6. Agarose gel electrophoresis profiles obtained from polymerase chain reaction using SAB03 primer in bean cultivars. 1-Akhtar 2- Derakhshan 3- Goli 4- Naz 5- Almas 6- Dorsa 7- Pak 8- Shekofa 9- Sadri 10- Talash 11- Kosha 12- Khomein 13- Positive control (TU) 14- Negative control

جدول ۳. واکنش بیماری و ردیابی ملکولی ژن های مقاومت به عامل بیماری آنتراکنوز *C. lindemuthianum* در ارقام ایرانی و افتراقی لوبیا

Table 3. Disease reaction and molecular detection of *C. lindemuthianum* resistant genes in Iranian and differential bean genotypes

		SCAR markers and genes linked to them									
Cultivars	Response	SQ4 *Co-2*	SC08 *Co-4*	SY20 *Co-4*	SH18 *Co-4²*	SBB14 *Co-4²*	SAS13 *Co-4²*	SAB03 *Co-5*	SZ04 *Co-6*	SZ20 *Co-6*	SB12 *Co-9*
Naz	R	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
Almas	R	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Dorsa	R	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Shekoofa	R	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Akhtar	MR	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Goli	MR	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
Derakhshan	S	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Pak	S	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Sadri	S	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Talash	S	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Kosha	S	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Khomein	S	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
CORNEL79242	R	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
To	R	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G2333	R	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Tu	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AB136	R	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
PI207262	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

R مقاوم، MR نیمه مقاوم، S حساس

R Resistant, MR Moderately Resistance, S Susceptible

همچنین کیفیت دانه ممکن است به طور قابل توجهی کاهش یابد و تاثیر چشمگیری بر تبادل ژرم پلاسم و تجارت بین المللی بذر بگذارد (Neergaard P. 1977, Agarwal & Sinclair 1977). پیشگیری از همه گیر شدن آنتراکنوز درمزارع با به حداقل رساندن تلقیح بیماری به گیاه از طریق کاهش میزان آلودگی بذر از طریق تولید دانه در محیط‌های عاری از بیماری، اقدامات کنترل زراعی و شیمیایی انجام می‌گیرند (Rio et al. 2006). بهترین روش برای کنترل بیماری، استفاده از واریته‌های مقاوم از لحاظ ژنتیکی است. کاربرد نشانگرهای مولکولی نقش بسزایی در شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم لوبیا در برابر بیمارگر *C. lindemuthianum* دارد. از اینرو یکی از روش‌های مدیریت این بیمارگر بذرزاد آزمون غربالگری معتدد بر روی ارقام غالب کشور و جهت تایید، استفاده از نشانگرهای ملکولی میباشد. هدف از این تحقیق شناسایی ارقام مقاوم لوبیا به بیماری آنتراکنوز به دو روش ارزیابی گلخانه ای و غربال گری به کمک نشانگر SCAR می‌باشد. نتایج بیماری زایی نشان داد که از ارقام مورد بررسی ۳۳٪ مقاوم (٤رقم)، ١٦٪ نیمه مقاوم (٢رقم) و ٥٠٪ حساس (٦رقم) بودند. در ارزیابی مقاومت ٤٠ رقم لوبیا توسط موسوی و همکاران (Mousavi et al. 1394) انجام شد، ١٠ رقم مقاوم و بقیه رقم‌ها حساس بودند. اتقیا و همکاران (Atghia et al. 1394) با بررسی اثر جدایه (UTFC-C70) بر روی ارقام لوبیا نشان دادند، دو رقم خمین و تلاش جزء حساس ترین ارقام به این بیمارگر می‌باشند. نتایج این دو تحقیق مذکور با نتایج این پژوهش همخوانی داشتند. غربال گری

ملکولی به کمک نشانگرها نشان داد، از۱۰ نشانگر مورد استفاده در این تحقیق چهار نشانگر SAS13، SY20، SZ04 و SB12 طی واکنش زنجیره ای پلیمراز موفق به تکثیر باندهای مورد نظر در ارقام مورد بررسی شدند. نشانگرSAS13 پیوستگی کامل(0.0 cM) با ژن مقاومت به بیماری دارد بنابراین مطمئن ترین نشانگر در شناسایی ژن مقاومت به بیماری می‌باشد. پنج نشانگر باقیمانده در این تحقیق از نظر حضور باند متفاوت عمل کردند، براساس نشانگر SQ4 تنها رقم الماس حاوی ژن *Co-2* می‌باشد. نشانگر SBB14 در ۱۰ رقم و نشانگر SH18 در دو رقم درسا و شکوفا که از ارقام سفید هستند قادر به ردیابی ژن‌های مورد نظر مقاومت مربوطه شدند. بر اساس نشانگر SZ20 ارقام اختر، درخشان، کوشا، الماس و تلاش حاوی ژن *Co-4* می‌باشند. نشانگر SAB03 تنها در رقم افتراقی(Tu) موفق به تکثیر باند مورد نظر شد. اردینک و همکاران(Erdinc et al. 2017) با استفاده از نه نشانگر اختصاصی SCAR و یک نشانگر RAPD به ارزیابی مقاومت رقم‌های لوبیا پرداختند. نتایج آنها نشان داد چهار نشانگر(SW12، SAB03، SZ20، SB12) منجر به تکثیر باند در ارقام مورد مطالعه نگردید. تنها رقم G89 حاوی تمام ژن‌های متصل به نشانگرها بود. درتحقیقی از ۵۸ رقم مورد بررسی، ۲۸ رقم با شدت شاخص بیماری کمتر از ۳/۵ رقم‌های مقاوم و از این ۲۸ رقم ۱۰ رقم، مقاومت کامل به بیماری آنتراکنوز نشان دادند(شدت شاخص=۱). بررسی همزمان نتایج حاصل از ارزیابی فنوتیپی بیماری و ملکولی (حضور یا عدم حضور ژن‌ها) نشان داد تعدادی از رقم‌ها که از نظر شدت بیماری حساس بودند حاوی تعدادی از ژن‌های مقاومت می‌باشند. همچنین تعدادی از رقم‌ها که از نظر شدت بیماری مقاوم یا متحمل بودند، ژن‌های پیوسته به نشانگرهای SCAR مورد استفاده را از خود نشان ندادند (Vieira et al. 2018). نتایج ویرا و همکاران(Vieira et al. 2018) حاصل از استفاده نشانگرهای SCAR در پیش بینی واکنش مقاومت به بیماری آنتراکنوز با این تحقیق مطابقت داشت. در تحقیق حاضر دو نشانگر SQ4 و SH18 در طی واکنش زنجیره ای پلیمراز موفق به تکثیر باندهایی در ارقامی شدند که از نظر شدت شاخص بیماری واکنش مقاومت بروز دادند. نتایج ارزیابی فنوتیپی صورت گرفته توسط اتقیا در جهت تعیین نژاد جدایه (UTFC-C70) با استفاده از ارقام افتراقی نشان داد که از ۱۲ رقم افتراقی مورد بررسی تمام ارقام به غیر از MDRK نسبت به جدایه مورد نظر واکنش مقاومت از خود بروز داده اند. با توجه به این یافته‌ها در تحقیق حاضر از رقم افتراقی MDRK استفاده نشد و تنها از شش رقم افتراقی با توجه ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق استفاده شد. غربالگری ملکولی صورت گرفته در این تحقیق نشان داد شش رقم افتراقی مورد بررسی، حاوی ژن‌های مقاومت مورد نظر می‌باشند. بررسی نتایج دو تحقیق نشان داد بین ارزیابی فنوتیپی بیماری و ملکولی ارقام افتراقی تطابق کامل وجود دارد و با توجه به تضاد نتایج فنوتیپی بیماری و ملکولی در ارقام ایرانی مورد بحث در این تحقیق به نظر می‌رسد که احتمالا مقاومت به بیماری آنتراکنوز در ارقام حساس ایرانی تحت کنترل بیش از یک ژن و بیان همزمان آنها می‌باشد. مقاومت به بیماری آنتراکنوز تحت کنترل چند ژن است، که برآیند آنها مقاومت خوبی را ایجاد می‌کند ودر این تحقیق مقاومت تک ژنی ردیابی شده به تنهایی نمی‌تواند عامل بروز مقاومت باشد. در تحقیقی نتایج حاصل از ارزیابی مقاومت ارقام لوبیا به بیماری زردی فوزاریومی لوبیا با استفاده از نشانگر اختصاصی (SCAR) SU20 نشان داد دو رقم اختر و E9 که از لحاظ ارزیابی فنوتیپی بیماری حساس تشخیص داده شدند، قطعه

ای بـه انـدازه bp۷۲۰ توسـط ایـن نشـانگر ایجـاد کردنـد(Hasanvand et al. 2014). پاسـخ بـه مقاومـت و کنترل ژنتیکی در برابـر نژادهـا ی عامـل آنتراکنـوز توسـط لوکوس‌ها و ژنهای مختلف کنتـرل می‌شـوند (Ferreira et al. 2013). طبقه بندی ارقام به عنوان مقاوم یـا حسـاس بـا توجه به نژاد بیماری ممکن است متفاوت باشد. با توجه به چنین تنوع بیماری زایی ارزیابی‌ها باید توسط چندین نـژاد صورت گیرد. علاوه بر ایـن، نژادهـای عامـل آنتراکنـوز در مناطق جغرافیایی که ارقـام کشـت می‌شـوند، جمـع آوری شوند (Costa et al. 2017). معضـل عمـده در پاتوسیسـتم لوبیـا-آنتراکنـوز، وجـود نژادهـای مختلـف *C. lindemuthianum* در کشورهای مختلف در سراسر جهان است که علاوه بر احتمال افزایش توسعه نژادهای جدید در جمعیت‌های بیمارگر ممکن است منجر بـه شکسـته شـدن مقاومت، به دلیل مهـاجرت نژادهـا بـه منـاطق جغرافیـایی مختلف یا به دلیل جهش‌هایی باشد که منجـر بـه الگوهـای جدید بیمـاریزایی می‌شـوند (Vazin 2015). بـا توجـه بـه شناسایی تنها نژاد دو بیمارگر در ایران، جمع آوری جدایـه این گونه از کلیه استان‌ها کشور و بررسـی آنهـا نسـبت بـه ارقام افتراقی لوبیـا می‌توانـد وجـود سـایر نژادهـای عامـل بیماری در کشور را معلوم کند. همچنین اسـتفاده از تعـداد بیشتری نشانگر SCAR و ارقام ایرانی در تحقیقـات آینـده برای دستیابی به یافته‌های جامع تر راه گشا خواهد بود. بـا توجه به راهکارهـای ارائه‌شـده بـرای مقاومـت پایـدار بـه بیماری به نظر می‌رسد کارا ترین آنها هرمی کردن ژن‌هـای مقاومت به نژادهای مختلف *C. lindemuthianum* در گیاه لوبیا است. این راهکـار مبتنـی بـر اسـتفاده از نشـانگرهای پایدار پیوسته با ژن‌های مقاومت اسـت کـه میتوانـد تعـداد زیادی از ژنهای مقاومت از کروموزوم‌هـای مختلـف را در یـک رقـم واحـد گـردآوری کنـد(Arantes et al. 2010, Mahuku et al. 2004). پژوهش حاضر گامی در این راستا بود و نتایج بدست آمده در این رابطه امیدوار کننده است.

منابع

Arantes L. D. O., Abreu Â. D. F. B. and Ramalho M. A. P. 2010. Eight cycles of recurrent selection for resistance to angular leaf spot in common bean. Crop Breeding and Applied Biotechnology 10(3): 232-237.

Atghia O. 2015. Etiology of common bean (*Phaseolus vulgaris*) anthracnose in northern and west northern provinces of Iran. MSc. Thesis, Tehran University, Tehran Iran.

Costa L. C., Nalin R. S., Ramalho M. A., and de Souza E. A. 2017. Are duplicated genes responsible for anthracnose resistance in common bean?. PloS one 12(3): e0173789.

Erdinç Ç., Turkmen O., Demir S. and Şensoy S. 2017. Determination of the anthracnose(*Colletotrichum lindemuthianum*(Sacc. and Magn.) Lambs. Scrib.) resistance in some Turkish bean genotypes by artificial inoculation and molecular methods. Journal of Animal and Plant Sciences 27(1): 175-185.

Faostat. 2018. Available in http://faostat.fao.org/

Ferreira J. J. Campa A. and Kelly J. D. 2013. Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. Translational genomics for crop breeding: 1: 151-181.

Geetha S. B., Subbareddy S., Satishchandra P., Moses R. and Chandra S. 2013. Morphological and molecular screening of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm using SCAR markers for *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) Scrib. causing anthracnose resistance. Archives of Phytopathology and Plant Protection 46(1): 84-97.

Hasanvand .E, Vafaei .H and Mirzaei .H 2014. Evaluation of SU20 molecular marker in recognition of susceptible and resistant Iranian common bean genotypes to *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, the casual agent of Fusarium wilting. Manegment System 2(2): 35-44.

Kelly J. D. and Vallejo V. A. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. HortScience 36(6): 1196-1207.

Mahuku G. S. and Riascos J. J. 2004. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. European Journal of Plant Pathology 110(3): 253-263.

Mahuku G. S., Jara C. E., Cajiao C. and Beebe S. 2002. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. Plant Disease 86(12): 1383-1387.

Mousavi S. M., Maleki M. and Shariyari D. 2015. Study of pathogenicity diversity *Colletotricum lindemuthianum* (Sacc. and Magnus) Briosi and Cav. agent bean anthracnose and resistant evalution of common bean cultivars. Manegment System 4(2): 97-109.

Munda A., Radisek S., Šuštar-Vozlic J. and Javornik B. 2009. Genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Slovenia and resistance of local *Phaseolus vulgaris* germplasm. Journal of Plant Diseases and Protection 116(1): 23-29.

Rio, L. E., Lamppa, R. S., Gross, P. L., Pathology, P. and Dakota, N. 2003. Characterization of the reaction of North Dakota dry bean cultivars to three races of *Colletotrichum lindemuthianum*. Plant Disease 87: 2001–2003.

Singh S. P. and Schwartz H. F. 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. Crop Science 50(6): 2199-2223.

Tu J. C. and Aylesworth J. W. 1980. An effective method of screening white (pea) bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.) for resistance to *Colletotrichum lindemuthianum*. Phytopathologische Zeitschrift, 99(2): 131-137.

Van Schoonhoven A. and Pastor-Corrales M. A. 1987. Standard System for the Evaluation of Bean Germplasm. CIAT. Colombia. 56p.

Vazin M. 2015. Characterization of Anthracnose Resistance in Common Bean. MSc. Thesis, Guelph University, Guelph Canada.

Young R. A. and Kelly J. D. 1997. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. Crop Science 37(3): 940-946.

Young R. A., Melotto M., Nodari R. O. and Kelly J. D. 1998. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar,'G2333'. Theoretical and Applied Genetics 96(1): 87-94.