



دانشگاه گوارزی و منابع شیئی گوا

مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد شانزدهم، شماره سوم، ۱۳۸۸
www.gau.ac.ir/journals

بررسی امکان کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا با استفاده از موتانت‌های غیربیماری‌زای جدایه *Fusarium solani f.sp. phaseoli*

* حسین اهری‌مصطفوی^۱، ناصر صفایی^۲، بهنام ناصریان^۱، هادی فتح‌اللهی^۱،
حمیدرضا دری^۳، محمدرضا لک^۳ و محمد بابایی^۴

^۱ کارشناس ارشد پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج، آستادیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ^۲ کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی اراک، ^۳ تکنسین، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای پژوهشکده تحقیقات کشاورزی پزشکی و صنعتی کرج تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۱؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۲۵

چکیده

در سال‌های ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵ گیاهانی با علائم پوسیدگی ریشه و طوقه از ۴۸ مزرعه مختلف لوبیا واقع در استان‌های خوزستان و مرکزی جمع‌آوری شدند. با به‌کارگیری آغازگرهای اختصاصی (FspH و FspR) تشخیص *Fusarium solani f.sp. phaseoli*، تعداد ۳ جدایه به‌عنوان فرم مخصوص لوبیا مورد تأیید قرار گرفت. سوسپانسیون اسپور یکی از این سه جدایه (با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰ اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۳۸ گری در ثانیه) در محدوده دز ۱۳۰ گری با اشعه گاما مورد پرتوتابی قرار گرفت. مقایسه مولکولی موتانت‌های غیربیماری‌زا و جدایه مادری با استفاده از ۱۰ آغازگر تصادفی نشان داد که موتانت‌های غیربیماری‌زای M22 و M23 به ترتیب ۷۳ و ۵۰ درصد با جدایه مادری Kh12 تشابه دارند. این نتایج نشان می‌دهد که غیربیماری‌زا شدن موتانت‌های بیماری‌زا ناشی از تغییرات ژنتیکی در آنها می‌باشد. این اولین گام جهت القای موتاسیون و تعیین موتانت‌های غیربیماری‌زایی است که انتظار می‌رود برای کنترل بیولوژیکی این بیماری مهم لوبیا مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: اشعه گاما، القای موتاسیون، *Fusarium solani f.sp. phaseoli*، آغازگرهای اختصاصی، موتانت‌های غیربیماری‌زا

* مسئول مکاتبه: hahari@nrcam.org

مقدمه

گیاه لوبیا با سطح زیرکشت ۱۱۵۸۳۳ هکتار و تولید ۲۱۸۸۵۸ تن، در ایران به‌عنوان یکی از محصولات بسیار مهم در جیره غذایی مردم محسوب شده و ارقام مختلف آن به‌صورت سبز تا فرآورده‌های کنسروی به بازار مصرف عرضه می‌گردد (آمار سالیانه محصولات کشاورزی، ۲۰۰۳).

بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا ناشی از قارچ *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*، از همه مناطق لوبیاکاری دنیا گزارش شده است (گودی و همکاران، ۲۰۰۴). در ایران نیز این بیماری همه‌ساله خسارت قابل ملاحظه‌ای را به کشاورزان تحمیل می‌نماید، به‌طوری‌که در مناطق کاملاً آلوده، تا ۸۵ درصد محصول را از بین می‌برد. هنگامی که قارچ بیمارگر در زمین مستقر شود، ریشه‌کنی آن عملی غیرممکن است. روش‌های مبارزه زراعی شامل تناوب بلندمدت، تنظیم تاریخ کاشت، کوددهی و زهکشی مناسب زمین، تنها می‌توانند درصد خسارت را تا حدودی کاهش دهند. برای کنترل بیماری روش شیمیایی مؤثری وجود ندارد و اکثر ارقام مقاوم نیز دارای صفات منفی مانند دوره رشد طولانی و بذره‌های ریز می‌باشند.

از آنجا که صفت بیماری‌زایی *F. solani* تحت کنترل ناحیه‌ای از ژنوم قارچ می‌باشد، بنابراین پرتوتابی با اشعه گاما (در دامنه دز معین) می‌تواند موتانت‌هایی را ایجاد نماید که علی‌رغم از دست دادن صفت بیماری‌زایی، همه ویژگی‌های دیگر از قبیل شناسایی میزبان، استقرار در ریشه و رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها را حفظ کرده‌اند (جوریان و همکاران، ۱۹۹۹). چنین موتانت‌هایی پس از طی مراحل مختلف، در نهایت، می‌توانند به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیکی و به‌صورت تجارتي در سطح مزارع علیه عامل پوسیدگی ریشه لوبیا به‌کار گرفته شوند. جوریان و همکاران (۱۹۹۹) با انجام آزمایشاتی، دامنه دز ۱۳۰ گری را به‌عنوان محدوده القای موتاسیون در قارچ عامل پژمردگی گوجه‌فرنگی انتخاب کردند. آنها با پرتوتابی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* موفق به ایجاد موتانت‌های غیربیماری‌زا شدند و از آنها به‌منظور کنترل بیولوژیکی عامل بیماری استفاده نمودند. مقایسه ژنوم موتانت‌های حاصل با بیمارگر طبیعی نشان داد که علت اصلی غیربیماری‌زا شدن تغییر ژن کنترل‌کننده صفت بیماری‌زایی در ژنوم جدایه پرتوده‌ی شده می‌باشد.

لاکشمشا و همکاران (۲۰۰۵) با به‌کارگیری اشعه فرابنفش، موتانت‌هایی را در قارچ *Colletotrichum capsici* (عامل آنتراکنوز) ایجاد کردند که میزان تولید آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز در آنها حدود ۴۳ و ۴۰ درصد کاهش یافت. این کاهش موجب شد رشد موتانت‌های مزبور ۴۰

درصد و میزان تولید کنیدی در آنها ۱۰ درصد کاسته شود. آغاز علائم آنتراکنوز در موتانت‌های پرتودهی شده حدود ۴ روز دیرتر از قارچ‌های طبیعی بود و نرخ توسعه بیماری نیز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

لین و همکاران (۲۰۰۱) تأثیر اشعه فرابنفش را بر فعالیت آنزیم RNA پلی‌مراز در باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* مورد بررسی قرار دادند. بررسی‌های آنها نشان داد که پرتوتابی با شدت ۱۲ ژول بر مترمربع، قادر به القای موتاسیون مناسب در باکتری مزبور می‌باشد. مطالعات روی چهار جدایه قارچ بازیدیومیست *Coprinus cinereus* نشان داد که در ژنوم قارچ لوکوس مشخصی وجود دارد که در مقابل تابش پرتوهای یونیزه‌کننده حساسیت نشان می‌دهد. بررسی‌های کیم و سوندین (۲۰۰۰) نشان داد که القای موتاسیون در باکتری *Pseudomonas syringae* نیازمند تابش اشعه فرابنفش با شدت ۱۲ ژول بر مترمربع می‌باشد.

معرفی فناوری پی. سی. آر در اواسط دهه ۱۹۸۰ میلادی سرعت پیشرفت در شناسایی و توالی‌یابی ژنوم قارچ‌ها را بیشتر ساخت. سه نشانگر AFLP, SSR, RAPD به‌صورت گسترده‌تری مورد استقبال قرار گرفته‌اند (بیرن، ۲۰۰۳). استفاده از نشانگر RAPD به دلیل سادگی اجرا، عدم نیاز به اطلاعات اولیه از توالی دی. ان. ای برای ساخت آغازگر، سرعت بالا، هزینه اندک و عدم نیاز به کاوشگر و مواد رادیواکتیو، بسیار معمول شده است (فیلیپس و واسیل، ۲۰۰۱). این روش باعث کمک به ساخت نشانگرهایی شده است که در گونه‌هایی نظیر *F. solani* و *F. oxysporum* که دارای میزبان‌های اختصاصی هستند، اما به لحاظ ریخت‌شناسی قابل تفکیک از یکدیگر نمی‌باشند، مطالعه جمعیت را آسان‌تر می‌کند. فیلیون و همکاران (۲۰۰۳) برای شناسایی *F. solani* فرم مخصوص لوبیا، از آغازگر اختصاصی که با استفاده از توالی ناحیه 18S rRNA ریبوزومی طراحی شده بود، استفاده کردند. به کارگیری مارکر RAPD برای تفکیک جدایه‌های *F. solani* f. sp. *glycines* نشان داد که بین شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها (روی گیاه سویا) و نتایج حاصل از ژل الکتروفورز قطعات تکثیر یافته در PCR ارتباط کاملاً معنی‌داری وجود دارد (آچن باخ و همکاران، ۱۹۹۶).

در این پژوهش با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *F. solani* فرم مخصوص لوبیا تعیین هویت شد و سپس با تاباندن پرتو گاما و طی مراحل مختلف، دو موتانت غیربیماری‌زا به‌وجود آمدند. پس از انجام آزمایش درصد کلونیزه کردن ریشه، با استفاده از ۱۰ پرایمر تصادفی جدایه مادری و دو موتانت غیربیماری‌زا مقایسه مولکولی شدند.

مواد و روش‌ها

۱- شناسایی بیمارگر، آزمون بیماری‌زایی و دامنه میزبانی: نمونه‌برداری طی فصل زراعی سال‌های ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵ و یک ماه پس از شروع کشت لوبیا در مناطق عمده کشت این محصول در شهرستان‌های خمین و دزفول انجام شد. گیاهان آلوده براساس علائم ظاهری شامل کوتولگی، زردی و ریزش برگ‌ها انتخاب شدند. از ۴۸ مزرعه با توجه به سطح زیر کشت، ۵ تا ۱۰ عدد بوته آلوده در هکتار و به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. قطعاتی از قسمت‌های آلوده پس از ضدعفونی سطحی با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت دو دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل، روی محیط آب-آگار (۱/۵ درصد) کشت شدند. ریشه‌های خارج شده از قطعات گیاهی به محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز-آگار^۱ انتقال یافتند. خالص‌سازی قارچ‌ها به روش تک‌اسپور کردن روی محیط کشت آب-آگار ۲ درصد انجام پذیرفت. گونه *F. solani* با استفاده از کلید شناسایی نلسون و همکاران (۱۹۸۳) و با استفاده از محیط کشت‌های PDA و CLA^۲ تعیین گردید. برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های جمع‌آوری شده، آزمون بیماری‌زایی در گلخانه انجام گرفت. برای تهیه مایه تلقیح از روش وسترلاند و همکاران (۱۹۷۴) استفاده شد. یک روز پیش از مایه‌زنی، گلدان‌ها آبیاری شدند تا عمل مایه‌زنی راحت‌تر انجام شود. برای مایه‌زنی، خاک اطراف بوته‌ها کنار زده شد و زیر طوقه هر بوته ۵ عدد بذر کلنیزه شده گندم قرار گرفت و دوباره با خاک پوشانده شد. در این آزمایش، هر تیمار شامل ۴ تکرار بود. پس از گذشت یک ماه، بوته‌های لوبیا از خاک خارج شدند و شدت بیماری‌زایی هر ۲۰ جدایه براساس درجه‌بندی ۵ شماره‌ای مک‌فادن و همکاران (۱۹۸۹) مورد ارزیابی قرار گرفت. تعیین فرم مخصوص جدایه‌های بیماری‌زا طی دو مرحله انجام شد:

الف- بررسی دامنه میزبانی در گلخانه: تهیه مایه تلقیح همانند روش قبلی انجام شد و عمل مایه‌زنی روی گیاهانی از تیره بقولات (نخود، سویا، ماش و عدس) و کدوئیان (خیار، طالبی و خربزه) صورت پذیرفت.

ب- استفاده از پرایمر اختصاصی

- استخراج دی. ان. ای ژنومی: برای تولید توده میسلیمی جدایه‌ها در محیط کشت مایع PDB^۳ (عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی همراه با ۱۵ گرم دکستروز در یک لیتر آب)، دو قطعه از حاشیه پرگنه‌های ۵ روزه جدایه‌های بیمارگر به فلاسک‌ها حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع منتقل شدند.

1- Potato Dextrose Agar (=PDA)

2- Carnation-Leaf Agar

3- Potato Dextrose Broth

شیشه‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی شیکر (با سرعت ۶۰ دور در دقیقه) قرار گرفتند. سپس، با استفاده از فیلتر خلاء توده میسلیمی از محیط مایع جدا شد و با کاغذ صافی خشک گردید. حدود یک گرم از هر نمونه در هاون چینی با نیتروژن مایع به صورت پودر در آمد و در ۴۰۰ میکرولیتر محلول نمکی DNA (تریس HCl ۱۰۰ میلی مولار ۸-۷/۵ pH، ۵ میلی مولار EDTA و ۴/۱ مولار کلرید سدیم) سوسپانسیون شد. سوسپانسیون مذکور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس نگهداری شد و سپس روی یخ قرار گرفت. در ادامه، هر نمونه دو بار به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و فاز رویی به یک میکروتیوب جدید منتقل گردید. دی. ان. ای با ۰/۷ حجم ایزوپروپانول رسوب داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از حذف ایزوپروپانول و تبخیر باقی مانده الکل، نمونه‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل شدند. مقدار یک میکرولیتر آنزیم RNase به هر تیوب اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. نمونه‌ها برای انجام مراحل بعدی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند.

- واکنش پی. سی. آر (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز): برای شناسایی تکمیلی جدایه‌ها، از آغازگر ویژه *F. s. f.sp. phaseoli* که توسط فیلیون و همکاران (۲۰۰۳) طراحی شده است، استفاده گردید. بدین منظور آغازگر بالادست 5'-AACCCCGCCCGAGGACTCA-3' و پایین دست 5'-AGACATGAGCGATGAGAGGCA-3' مورد استفاده قرار گرفت. واکنش پی. سی. آر در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیبات واکنش پی. سی. آر برای حجم ۲۵ میکرولیتر.

مقدار	مواد
۱ میکرولیتر	پرایمر (بالادست) (۵ pM)
۱ میکرولیتر	پرایمر (پایین دست) (۵ pM)
۲/۵ میکرولیتر	بافر پی سی آر (۱۰ X)
۱/۵ میکرولیتر	MgCl ₂ (۵۰ mM)
۰/۵ میکرولیتر	<i>Taq</i> DNA polymerase (۱ U)
۱ میکرولیتر	dNTPs (۲۵ mM)
۰/۵ میکرولیتر	دی. ان. ای (۵۰ ng)

در هر آزمایش از یک واکنش پی. سی. آر بدون دی. ان. ای به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. برنامه پی. سی. آر شامل ۳۵ چرخه، ۹۴ درجه سلسیوس ۲ دقیقه، ۶۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه بود. در آغاز، واکنش به‌مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. در آخر واکنش، یک مرحله طویل شدن رشته در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۷ دقیقه منظور گردید. محصول پی. سی. آر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. همچنین، از لحاظ وزن با نشانگر اندازه 100 bp SMO321 (Fermentas) مقایسه شد.

۲- **دزیابی، پرتوتابی و ایجاد موتانت غیربیماری‌زا:** ابتدا، سوسپانسیونی از اسپور خالص قارچ حاوی 10^3 عدد اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد و سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مذکور با استفاده از یک میله شیشه‌ای روی سطح تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی - دکستروز - آگار پخش گردید. تشتک‌های مذکور با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰ اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۳۸ گری در ثانیه مستقر در پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی (سازمان انرژی اتمی ایران) در معرض دزهای ۰ (شاهد)، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ گری قرار گرفتند.

۱۲ ساعت پس از پرتوتابی، تعداد ۳ عدد اسپور جوانه زده مربوط به هر سطح دز مشخص شدند و با استفاده از سوزن به محیط سیب‌زمینی - دکستروز - آگار انتقال یافتند. پس از ۱۰ روز، مقادیر رشد با اندازه‌گیری قطر پرگنه مقایسه شدند. علاوه بر این، درصد جوانه‌زنی میکروکنیدی‌ها و ماکروکنیدی‌ها پس از گذشت ۱۸ ساعت ثبت شد. بدین منظور، چهار منطقه از سطح هر تشتک تعیین شدند و در محدوده بزرگ‌نمایی $10 \times$ میکروسکوپ نوری، تعداد اسپورهای جوانه زده و جوانه نزده شمارش شد و براساس آن، درصد جوانه‌زنی محاسبه گردید. مقایسه میانگین‌های درصد جوانه‌زنی و قطر پرگنه (پس از گذشت ۱۰ روز از پرتوتابی با دزهای مختلف) تیمارها را در سه گروه مختلف قرار داد. بر این اساس، محدوده دز ۱۲۰ و ۱۵۰ گری جهت القای موتاسیون‌های مفید انتخاب شد. سوسپانسیون رقیقی از اسپور یک جدایه بیماری‌زای *F.s. f.sp. phaseoli* تهیه شد و عملیات پرتوتابی با دز ۱۳۰ گری انجام پذیرفت. اسپورهای جوانه زده زیر بینوکولر مشخص شدند و جداگانه به محیط کشت PDA انتقال یافتند. تلقیح سوسپانسیون اسپور ۵۰۰ موتانت با غلظت 10^6 به روش فیلون و همکاران (۲۰۰۳) به سطح ریشه لوبیا انجام پذیرفت. بررسی علایم بیماری پس از یک ماه براساس درجه‌بندی شش شماره‌ای دار و همکاران (۱۹۹۷) نشان داد که دو موتانت M22 و M23 قدرت بیماری‌زایی خود

را از دست داده‌اند و علائم پوسیدگی را روی ریشه لوبیا نشان نمی‌دهند. این آزمایش به منظور اثبات پایداری غیربیماری‌زایی موتانت‌ها دوباره تکرار شد.

۳- بررسی توانایی کلنیزه کردن ریشه در موتانت‌های غیربیماری‌زا: بذور لوبیا پس از استریل سطحی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد در خاک استریل داخل گلدان کاشته شد. پس از ۲۰ روز، تلقیح سوسپانسیون اسپور ۵۰۰ موتانت با غلظت 10^6 به روش فیلپون و همکاران (۲۰۰۳) به سطح ریشه لوبیا انجام پذیرفت. یک ماه پس از تلقیح، کل طول ریشه اصلی به سه قسمت تحتانی، میانی و فوقانی تقسیم شد و از هر بخش، تعداد ۲۰ مقطع عرضی به ضخامت ۳ میلی‌متر برداشته شد. مقاطع عرضی پس از ضدعفونی با الکل اتیلیک روی محیط PDA کشت شدند (اونکار و جیمز، ۱۹۹۵). کشت‌ها از نظر وجود *F. s. f. sp. phaseoli* بررسی گردیدند. این آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار انجام شد و تعداد قطعات کلونیزه در مقایسه با نمونه مادری (موتانت بیماری‌زا قبل از پرتوتابی) بر حسب درصد به دست آمد.

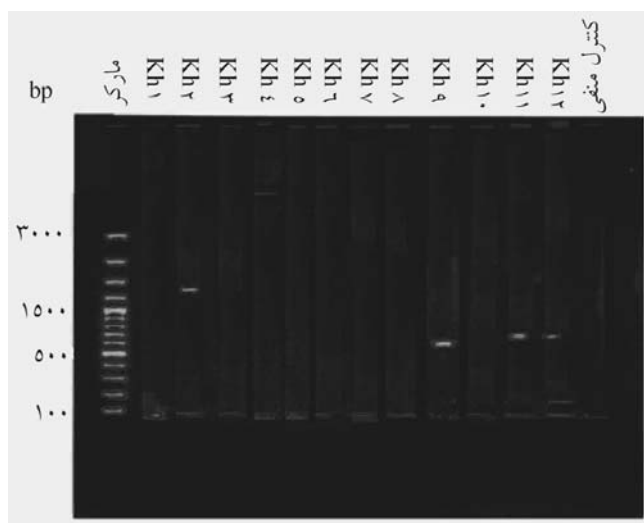
۴- بررسی تأثیر موتانت‌های غیربیماری‌زا به عنوان عامل کنترل بیولوژیکی: توانایی دو موتانت M22 و M23 در کنترل بیولوژیکی عامل پوسیدگی ریشه لوبیا در شرایط گلخانه بررسی شد. ده روز پس از کاشت لوبیا در خاک استریل و با دو برگگی شدن گیاهچه، خاک اطراف ریشه کنار زده شد و سطح ریشه اصلی در معرض ۱ سی سی محلول سوسپانسیون اسپور (به غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر) قرار گرفت (فیلپون و همکاران، ۲۰۰۳). با گذشت ۷ روز، سوسپانسیون اسپور قارچ بیماری‌زا (تیپ وحشی) دوباره روی ریشه گیاهان تلقیح شده با موتانت‌های M22 و M23 ریخته شد تا تأثیر کلونیزاسیون موتانت‌های غیربیماری‌زا بر کاهش قدرت بیماری‌زایی تیپ وحشی آشکار شود. این آزمایش به صورت طرح بلوک کامل تصادفی و با چهار تکرار اجرا شد. پس از گذشت دو هفته، گیاهان از خاک خارج شدند و شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها براساس درجه‌بندی شش شماره‌ای دار و همکاران (۱۹۹۷) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۵- مقایسه مولکولی موتانت‌های غیربیماری‌زا با تیپ مادری: به منظور بررسی تغییرات احتمالی در سطح ژنوم موتانت‌های غیربیماری‌زا، دی. ان. ای‌های جدایه مادری (Kh12) و موتانت‌های غیربیماری‌زا (M22 و M23) با استفاده از آغازگرهای تصادفی مقایسه شدند. به منظور بررسی الگوی بانندی جدایه مادری و موتانت‌های غیربیماری‌زا، از ۱۰ آغازگر استفاده شد. محصول پی. سی. آر با

الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲ درصد تفکیک شد، به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید و باندها با پرتو فرابنفش مریی شدند. در این مرحله، جدایه‌های مورد آزمایش از لحاظ وجود یا عدم وجود باندهای مختلف و نیز وزن با نشانگر اندازه 100 bp SMO321 (Fermentas) مقایسه گردیدند. به منظور رتبه‌بندی داده‌های حاصل از الکتروفورز، جدول توافقی یک (حضور باند) و صفر (عدم حضور باند) برای الگوهای تنوع در نشانگرها تشکیل گردید و ماتریس داده‌ها به روش خوشه‌ای^۱ و با نرم‌افزار MVSP (میرمجلسی، ۲۰۰۵) تجزیه و تحلیل شد.

نتایج و بحث

آزمون بیماری‌زایی و دامنه میزبانی: تعیین فرم مخصوص جدایه‌ها نشان داد که پرایمرهای اختصاصی در سه جدایه Kh9، Kh11 و Kh12 یک باند ۵۶۰bp ویژه فرم مخصوص *F.s.f.sp.phaseoli* را ایجاد می‌نمایند (شکل ۱).



شکل ۱- محصولات تکثیر یافته پی. سی. آر از دی. ان. ای استخراج شده جدایه‌های گونه *F. solani* روی ژل آگاروز.

به‌طورکلی، کاربرد آغازگر اختصاصی، نتایج حاصل از آزمایش‌های گلخانه‌ای را برای تعیین فرم مخصوص لویبا به‌جز در یک مورد تأیید کرد. جدایه Kh12 که بیشترین شدت بیماری‌زایی را داشت و به‌عنوان فرم مخصوص لویبا نیز انتخاب شد در پرتوتابی مورد استفاده قرار گرفت. دزیابی، پرتوتابی و ایجاد موتانت غیربیماری‌زا: مشاهده نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ نشان داد که با گذشت سه ساعت از زمان آزمایش در دزهای ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ گری هنوز جوانه‌زنی اسپورها مشاهده نشد، در حالی‌که در دزهای ۶۰ و ۹۰ گری، میکرو و ماکروکنیدی‌ها جوانه زدند. درصد جوانه‌زنی در دزهای ۱۵۰ و ۱۸۰ گری (پس از ۱۲ ساعت) به‌طور معنی‌داری از سایر دزها کمتر بود، نشان داد در حالی‌که دز ۶۰ گری نتوانست بر میزان جوانه‌زنی اسپورها تأثیر معنی‌داری بگذارد (جدول‌های ۲ و ۳).

جدول ۲- تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر درصد جوانه‌زنی اسپورها و قطر پرگنه قارچ

F. s. f.sp. phaseoli

منابع تغییر	درجه آزادی	جوانه‌زنی اسپور	قطر پرگنه
دز پرتوتابی	۵	۱۲۰۰/۸**	۲/۰۳۵**
خطا	۱۲	۵/۶۷۷	۰/۱۰۶
ضریب تغییرات (درصد)		۳/۲۸	۴/۸۳

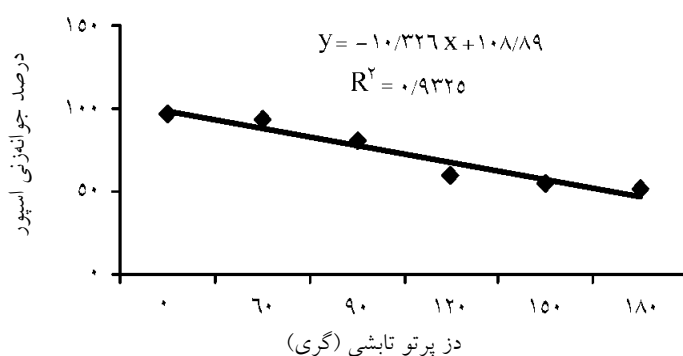
**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی و قطر پرگنه قارچ *F. solani f.sp. phaseoli* در دزهای مختلف تابش پرتو گاما.

دز تابشی پرتو گاما (گری)	جوانه‌زنی	قطر پرگنه (سانتی‌متر)
۰	۹۶/۳ ^a	۷/۷۳ ^a
۶۰	۹۳/۲ ^a	۷/۱۷ ^{ab}
۹۰	۸۱/۳۳ ^b	۷/۰۳ ^b
۱۲۰	۵۹/۶۷ ^c	۶/۹۷ ^b
۱۵۰	۵۴/۳۳ ^d	۶ ^c
۱۸۰	۵۱/۶۷ ^d	۵/۵ ^c

میانگین‌های دارای حرف مشترک در یک ستون، در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

مقایسه میانگین‌های قطر پرگنه پس از گذشت ۱۰ روز از پرتوتابی با دزهای مختلف، تیمارها را در سه گروه مختلف قرار داد. بر این اساس، پرتوتابی با دزهای ۱۵۰ و ۱۸۰ گری به شکل معنی‌داری سبب کاهش قطر پرگنه نسبت به شاهد و سایر دزها شد (جدول‌های ۲ و ۳). تأثیر پرتو گاما بر جوانه‌زنی اسپوره‌های *F. solani f.sp. phaseoli* از دز ۹۰ گری نمایان گردید به نحوی که با افزایش دز پرتو، درصد جوانه‌زنی اسپورها کاهش یافت. روند کاهش درصد جوانه‌زنی از یک تابع خطی تبعیت نمود (شکل ۲).



شکل ۲- ارتباط بین دز تابشی پرتو گاما و درصد جوانه‌زنی اسپور قارچ *F. s. f.sp. phaseoli*

این الگو با نتایج حاصل از تحقیقات جوریان و همکاران (۱۹۹۹) روی قارچ *F. oxysporum* و *f.sp. lycopersici* مطابقت می‌کند با این تفاوت که حساسیت این قارچ در برابر تابش پرتو گاما از *F. s.f.sp. phaseoli* بیشتر می‌باشد. در این آزمایش از دز تابشی ۱۲۰ گری میزان مرگ و میر ۴۰ درصدی اسپورها آغاز شد به طوری که در دز تابشی ۱۸۰ گری این مقدار به حدود ۵۰ درصد رسید. پس از پرتوتابی اسپور و انتقال اسپورهای جوانه‌زده به محیط کشت PDA، مجموعاً ۵۰۰ موتانت به دست آمد که به صورت پرگنه‌های ۵ روزه در دمای ۶ درجه سلسیوس قرار گرفت تا در مراحل بعد مورد استفاده قرار گیرد. با گذشت یک ماه از تلقیح گیاهان از خاک خارج شده، شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها براساس درجه‌بندی شش شماره‌ای دار و همکاران (۱۹۹۷) مورد ارزیابی قرار گرفت. در پایان این مرحله، دو عدد موتانت غیربیماری‌زا (M23 و M22) شناسایی گردید. موتانت‌های M23 و M22 از

جهت ایجاد علائم پوسیدگی روی ریشه و طوقه با نمونه شاهد تفاوت معنی داری نداشتند (جدول‌های ۴ و ۵). هر دو موتانت بالا به آسانی از ناحیه طوقه و ریشه گیاه لوبیا جداسازی مجدد شدند.

جدول ۴- تجزیه و تحلیل واریانس توانایی کلونه‌کنندگی جدایه‌های موتانت غیربیماری‌زا و شاهد *F. s. f.sp. phaseoli*

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد کلونه‌کنندگی ریشه
نوع جدایه	۲	۶۸۱/۲۵۰**
خطا	۶	۱۴/۵۸۳
ضریب تغییرات (درصد)		۴/۸۵

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۵- مقایسه میانگین درصد کلونه‌کنندگی ریشه به وسیله جدایه‌های موتانت غیربیماری‌زا و شاهد *F. s. f.sp. phaseoli*

جدایه	درصد کلونه‌کنندگی
Kh12	۸۷ ^a
M22	۶۳ ^b
M23	۸۵ ^a

میانگین‌های دارای حرف مشترک در یک ستون، در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

بررسی تأثیر موتانت‌های غیربیماری‌زا به عنوان عامل کنترل بیولوژیکی: نتایج حاصل از بررسی توان موتانت‌های غیربیماری‌زا در کنترل بیولوژیکی نشان دادند که درصد پوسیدگی ریشه در اثر کاربرد موتانت غیربیماری‌زا در مقایسه با گیاهان تلقیح شده با جدایه بیماری‌زا به طور معنی‌داری کاهش یافت به طوری که درصد پوسیدگی از ۷۷/۵ به ۵۸/۷۵ تحت تأثیر جدایه M22 و ۲۲/۵ تحت تأثیر جدایه M23 کاهش یافت (جدول‌های ۶ و ۷).

جدول ۶- تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر تیپ وحشی و موتانت‌های *F. solani f.sp. phaseoli* بر درصد پوسیدگی ریشه لوبیا.

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد پوسیدگی ریشه
بیمارگر	۴	۴۶۱۳/۷۵**
خطا	۱۲	۳۷/۹۱۷
ضریب تغییرات (درصد)		۱۸/۸

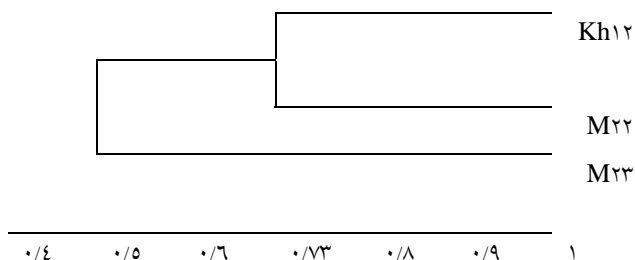
**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۷- مقایسه میانگین درصد پوسیدگی ریشه لوبیا تحت تأثیر تیپ وحشی و موتانت‌های *F. s. f.sp. phaseoli*

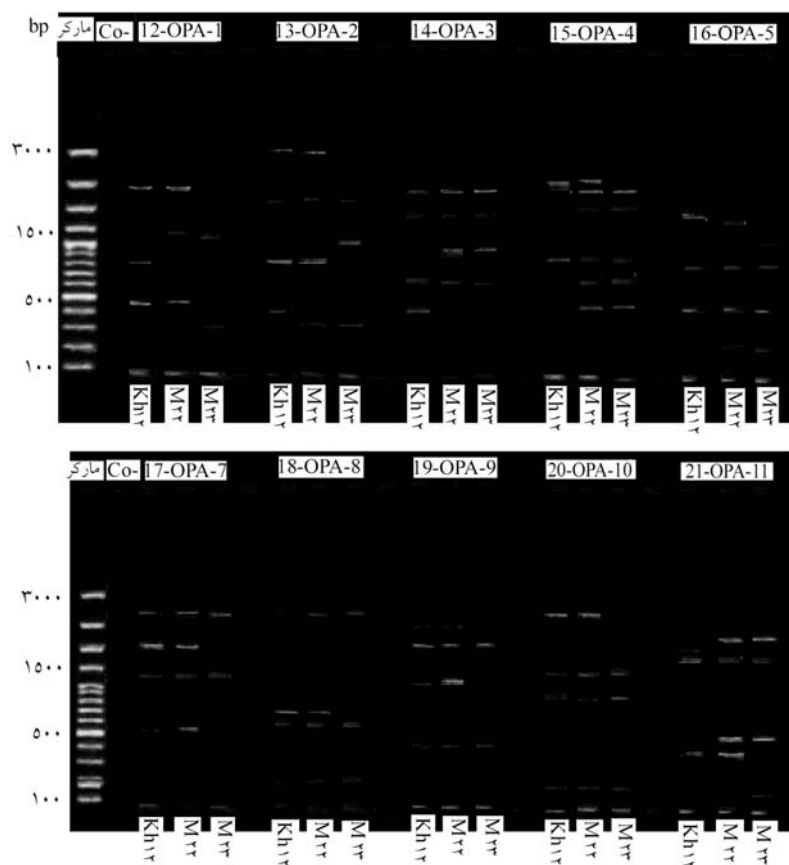
بیمارگر	درصد پوسیدگی ریشه
تیپ وحشی (W)	۷۷/۵ ^a
M22 موتانت	۲/۵ ^d
M23 موتانت	۲/۵ ^d
M22 + W	۵۸/۷۵ ^b
M23 + W	۲۲/۵ ^c

میانگین‌های دارای حرف مشترک در یک ستون، در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

مقایسه مولکولی موتانت‌های غیربیماری‌زا با تیپ مادری: الگوی بانندی و آنالیز خوشه‌ای اطلاعات به‌دست آمده براساس الگوی RAPD حاصل از تکثیر دی. ان. ای توسط ۱۰ آغازگر نشان داد که موتانت‌های غیربیماری‌زای M22 و M23 به ترتیب ۷۳ و ۵۰ درصد با جدایه مادری Kh12 تشابه دارند (شکل‌های ۳ و ۴). این بدین معنی است که ایجاد صفت غیربیماری‌زایی در موتانت‌ها نتیجه تغییرات ژنتیکی در دی. ان. ای جدایه مادری می‌باشد. این اولین گام جهت ایجاد موتانت‌های غیربیماری‌زا به‌منظور استفاده در کنترل بیولوژیک این بیماری مهم لوبیا می‌باشد.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از داده‌های ده آغازگر تصادفی با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای سه جدایه M22، M23 و Kh12.



شکل ۴- الگوی بانندی محصولات پی. سی. آر ده آغازگر در جدایه مادری (Kh12) و موتانت‌های M22 و M23 *F. s. F.sp.phaseoli*

منابع

1. Achenbach, L.A., Patrick, J., and Gray, L. 1996. Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. *Plant Dis.* 80: 1228-1232.
2. Annual Sum of Agricultural Products of Markazi provinces in 2001-2. 2003. Jahad-e-Keshavarzi Organization of Markazi province, 20p.
3. Birren, B. 2003. Fungal genome initiative a white paper for fungal comparative genomics. <http://www.broad.mit.edu/fungi/fgi/FGI-WHITEPAPER-Oct2003>.

4. Dar, G.H., Zargar, M.Y., and Beigh, G.M. 1997. Biocontrol of fusarium root rot in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. Micro. Eco. 34: 74-80.
5. Filion, M., St-Arnaud, M., and Jabaji-Hare, S.H. 2003. Quantification of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. Plant Dis. APS Press, 93: 2. 229-235.
6. Goody, P., Cano, J., Gene, J., Guarro, J., Luisa Hufing-Lima, A., and Lopes Colombo, A. 2004. Genotyping of 44 isolates of *F. solani*, The main agent of fungal keratitis in Brazil. J. of Clinical Microb. Pp: 4494-4497.
7. Jurrian, J.M., Wit, R., Christa, S.T., Francis, D.G., Michel, A.H., and Ben, J.C. 1999. Loss of avirulence and reduced pathogenicity of a gamma-irradiated mutant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Phytopathol. 89: 1131-1137.
8. Kim, J., and Sundin, W. 2000. Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290-320 nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability *in vitro* and *in planta*. Microb. 40: 84-92.
9. Lakshmesha, K.K., Lakshmidevi, N., and Mallikarjuna, S. 2005. Changes in pectinase and cellulase activity of *Colletotrichum capsici* mutants and their effect on anthracnose disease on Capsicum fruit. Archi. of Phytopathol. and Plant Protec. 38: 267-279.
10. Lin, S.H. 2001. Uv-induced increase in RNA polymerase activity in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. Microb. 43: 120-123.
11. McFadden, W., Hall, R., and Philips, L. 1989. Relation of initial inoculum density to severity of fusarium root rot of white bean in commercial fields. Can. J. Plant Pathol. 11: 122-126.
12. Mirmajlessi, S.M. 2005. Investigation of anastomosis groups and genetic diversity of *Rhizoctonia solani* causal agent of root and crown rot of cucurbits in Iran. M.Sc. thesis of Tarbiat Modares University, 156p. (In Persian).
13. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press. University Park, 193p.
14. Onkar, D., Dhingra, B., and Sicclair, B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, INC, 434p.
15. Phillips, R.L., and Vasil, I.K. 2001. DNA Based Markers in Plants. Kluwer Academic Publishers, 512p.
16. Westerland, F.U., Campbell, J.R., and Limble, K.A. 1974. Fungal root rots and wilt of chickpea in California. Phytopathol. 64: 432-436.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 16(3), 2009
www.gau.ac.ir/journals

Possibility of biological control of bean root rot disease, using of avirulent mutants of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* isolate

***H. Ahari Mostafavi¹, N. Safaie², B. Naserian¹, H. Fathollahi¹,
H. Dorri³, M. Lak³ and M. Babaie⁴**

¹Senior Expert (M.Sc.), Nuclear Science and Technology Research Institute, Agricultural, Medical and Industrial Research Center Karaj, ²Assistant Prof., Dept. of Plant Pathology, Tarbiat Modares University, ³Senior Expert (M.Sc.), Agricultural and Natural Resources Researches Center of Markazi province, ⁴Technicians, Nuclear Science and Technology Research Institute, Agricultural, Medical and Industrial Research Center Karaj

Abstract

Plants showing root and crown rot were collected from 48 bean fields in the Khuzestan and Markazi provinces During 2005-2006. Using specific primers (FspR/FspF) for these forma specialis, three isolates were identified as *F.s. f.sp. phaseoli*. Conidial suspension of one of these isolates were irradiated (in a ⁶⁰Co-gamma cell with activity of 2500 curi and 0.38 grey per second dose rates) with 130 Gy. Pathogenicity and root colonization tests confirmed two avirulent mutants. Molecular comparison using 10 primers between avirulent mutants and wild type showed that, avirulent mutants M22 and M23 have 73% and 50% similarity with wild type kh12. These results showed that, avirulent mutants were produced due to genetical differences. This is the first step to induce mutation and screening for avirulent mutants which are promising prerequisite for biological control of this important disease in bean.

Keywords: Gamma ray, Mutation induction, *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, Specific primers, Avirulent mutants

* Corresponding Author; Email: hahari@nrcam.org

