مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۷
صفحه ٦٤-٥٣

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

استفاده از تکنیک PCR کمی برای کمیت‌سنجی *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* در لوبیا سفید حساس و مقاوم

Development of a Quantitative PCR Assay for Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in Resistant and Susceptible White Bean

ندا زند*[۱]، رقیه همتی[۲]، حسین جعفری[۳]

Neda Zand[1*], Roghayeh Hemmati[2], Hossein Jafary[3]

۱- دانشجوی دکترا ۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۳- دانشیار، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران

1- PhD Student, 2- Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
3- Associate Professor of Plant Protection Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: nedazand@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا توسط بیمارگر خاکزی *Fusarium solani f. sp. phaseoli* ایجاد می‌شود و خسارت فراوان در مزارع لوبیا در دنیا و ایران ایجاد می‌کند. در حال حاضر مهمترین و اقتصادی‌ترین روش کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. برای این منظور در این تحقیق عکس‌العمل پنج رقم رایج کشت و ١٤ لاین لوبیا سفید به قارچ عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا ابتدا به صورت ارزیابی علائم بیماری و سپس کمیت‌سنجی با Real time PCR انجام شد. بر اساس نتایج ارزیابی علائم بیماری لاین KBC43106 و رقم درسا به ترتیب حساس و متحمل شناخته شدند، سپس به منظور ارزیابی کمی و روند رشد قارچ عامل بیماری در لاین حساس و رقم متحمل گیاهچه‌های دو برگچه‌ای با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر قارچ عامل بیماری به روش فرو بردن ریشه (Root dip) تلقیح گردیدند و در فواصل زمانی صفر،۲ ، ۷، ۱۵، ۲۱ و ۳۰ روز پس از آلودگی از ریشه گیاهچه‌های تلقیح شده و شاهد نمونه‌برداری و استخراج DNA از آنها انجام شد. روند افزایش تدریجی میزان DNA قارچ موجود در ریشه‌ها با استفاده از تکنیک Real time PCR و به کارگیری سیستم SYBR Green همراه با آغازگرهای اختصاصی برای ژن α-1 elongation factor کمیت‌سنجی گردید. نتایج نشان داد تفاوت معنی-داری بین مقدار DNA بیمارگر در ریشه گیاهان حساس و متحمل وجود دارد و بنابراین تکنیک Real time PCR ، تکنیک مناسبی برای ارزیابی مقاومت ارقام و لاین‌های لوبیا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

پوسیدگی فوزاریومی ریشه،
ارزیابی مورفولوژیک،
کمیت سنجی،
رقم،
لاین

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]

مقدمه

لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) یکی از مهمترین گونه‌های تیره بقولات و از مهمترین محصولات دنیا می‌باشد. در سراسر دنیا لوبیا منبع مهم پروتئین (۲۲٪)، ویتامین‌ها (فولات) و مواد معدنی (کلسیم، مس، آهن، منگنز، منیزیوم و روی) می‌باشد و در رژیم غذایی به ویژه در کشورهای در حال توسعه نقش مهمی دارد (Broughton *et al.*, 2003). در کشورهای توسعه یافته مزایای تغذیه‌ای و نقش لوبیا در سلامت انسان و جلوگیری از بیماری‌هایی مانند سرطان، دیابت و بیماری‌های قلبی تایید شده است (Hangen and Benninek, 2003). تولید سالانه انواع لوبیا بیش از ۲۱ میلیون تن در سراسر دنیا می‌باشد که بیش از نصف کل محصول حبوبات را شامل می‌شود. در سراسر دنیا عوامل زیادی مانند مشکلات زراعی، عوامل زنده و غیر زنده تولید و عملکرد این محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Miklas *et al.*, 2006). از جمله عواملی که عملکرد لوبیا را تحت تأثیر قرار می‌دهند عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشند که گیاه لوبیا را آلوده نموده و موجب درجات مختلفی از خسارت می‌گردند (Burke *et al.*,1991). اکثر پوسیدگی‌های ریشه به طور گسترده در مناطق لوبیا کاری شیوع دارند و بیماری‌های اقتصادی مهمی روی لوبیای معمولی ایجاد می‌کنند (Abawi and Pastor- Corrales, 1990).

بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا (Fusarium Root Rot) توسط بیمارگر خاکزی *F. solani* f. sp. *phaseoli* ایجاد می‌شود و خسارت فراوانی در مناطق لوبیا کاری دنیا ایجاد می‌کند (Hall, 1991). این پاتوژن در خاک بسیار پایدار می‌باشد و برای مدت طولانی دوام می‌آورد و کنترل آن بسیار دشوار می‌باشد. پوسیدگی فوزاریومی ریشه زخم‌های قرمز مایل به قهوه‌ای بر روی ریشه و انتهای هیپوکوتیل ایجاد می‌کند، زخم‌های بیماری با افزایش سن گیاه افزایش می‌یابد و به تدریج قهوه‌ای می‌شود. پوسیدگی ریشه به خصوص تحت شرایط استرس آبی افزایش می‌یابد (Burke and Hall, 1991). بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه روی انواع لوبیا در اغلب مزارع در سراسر دنیا جزء بیماری‌های مهم محسوب می‌شود. این بیماری تقریباً تمام محصول لوبیا را با زیان و خسارت روبه رو می‌کند و کاهش بازده لوبیا بالای ۸۶ درصد نیز می‌تواند اتفاق بیافتد (Schwartz *et al.*, 2005).

توسعه ارقام مقاوم و متحمل به تنش‌های زنده و غیر زنده از مهمترین برنامه‌های اصلاحی در سراسر دنیا می‌باشد. ارقامی که مقاومت بهتری در برابر تنش‌ها دارند وابستگی به استفاده از سموم را کاهش می‌دهند و به این ترتیب تولید محصول لوبیا در شرایط مختلف سالم‌تر و با ثبات‌تر می‌شود (Miklas *et al.*, 2006).

کمیت‌سنجی یک بیمارگر در بافت گیاهی بیمار یکی از مهمترین ابزارها برای ارزیابی درجه حساسیت یا مقاومت میزبان به بیمارگر را نشان می‌دهد و به این ترتیب می‌توان از این روش برای برنامه اصلاحی گیاهان استفاده کرد (Moretti *et al.*, 2015). کمیت‌سنجی درست، قابل اعتماد و با توان عملیاتی بالای DNA هدف، نیازمند روش Real time PCR است. تکنیک Real time PCR بخاطر حساسیت بالا برای شناسایی تغییرات اندک در بررسی مقاومت میزبان و حساسیت آن روش ایده‌آلی است.

کمیت‌سنجی و ارزیابی سرعت توسعه و کلونیزاسیون پاتوژن های گیاهی یکی از مهمترین کاربردهای Real time PCR است. استفاده از روش‌های شناسایی کمی برای شناسایی *Helminthosporium solani* و *Colletotrichum coccodes* در غده‌های سیب زمینی و خاک انجام شده است (Cullen *et al.*, 2001, 2002). عوامل بیماریزای *Glomus mosseae*، *Phytophtora. infestans* و *P. citrophthora* در میزبان‌های مختلف (Bohm *et al.*, 1999) و *Diaporte phaseolorum* و *Phomopsis longicolla* در بذور سویا، *Rosellinia necatrix* در ریشه و پوست میزبان‌های مختلف (Schena and Ippolito, 2003)، *P. nicotianae* و *P. citrophthora* درریشه مرکبات (Ippolito *et al.*, 2004) با استفاده از Real time PCR ردیابی و شناسایی شده‌اند.

کمیت‌سنجی DNA قارچ عامل بیماری پوسیدگی پیاز (*Botrytis* spp) در بذر پیاز به روش Real time PCR با استفاده از SYBR Green انجام شده و روش Real time PCR در مقایسه با روش معمول کشت در محیط‌های غذایی برای شناسایی گونه‌های عامل پوسیدگی گردن در داخل یا روی بذر پیاز حساس‌تر گزارش شده است (Chilvers *et al.*, 2007).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]

هدف از این مطالعه، غربالگری ارقام و لاین‌های لوبیا سفید نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه، توسعه و معرفی روش Real time PCR برای تعیین مقدار و بررسی روند توسعه و کلونیزاسیون *F. solani* f. sp. *phaseoli* در لوبیا و استفاده از این روش برای بررسی ارتباط بین شدت بیماری و تجمع DNA بیمارگر در ارقام مختلف لوبیا و بررسی میزان حساسیت و مقاومت ارقام در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچ، ارقام و لاین‌های لوبیا سفید

در این تحقیق از سه جدایه *F. solani* f. sp. *phaseoli* موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات زنجان استفاده شد، این جدایه‌ها از مناطق مختلف استان زنجان جمع‌آوری شده بودند و قبلاً با روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی و بیماری‌زایی آنها در مرکز تحقیقات زنجان اثبات شده بود استفاده گردید.

ارقام و لاین‌های لوبیا سفید مورد استفاده در این تحقیق از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان تهیه گردیدند که شامل ۵ رقم رایج لوبیا سفید (الماس، درسا، پاک، دانشکده و صدف) و ۱٤ لاین لوبیا سفید بود که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ – اسامی لاین‌های لوبیا سفید مورد استفاده در آزمایش

Table1- Common bean lines used in the experiment

شماره لاین	نام لاین	شماره لاین	نام لاین
۱	KBC42104	۸	KBC43106
۲	KBC42101-1	۹	KBC42107-2
۳	KBC43107-1	۱۰	KBC42101-3
٤	KBC42107-2	۱۱	KBC42121
٥	KBC42101-2	۱۲	KBC42106
٦	KBC43107-1	۱۳	KBC42128
۷	KBC43107-3	۱٤	KBC42128

بررسی واکنش ارقام و لاین‌های مختلف لوبیا سفید نسبت به قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* در شرایط گلخانه‌ای

بذور ارقام و لاین‌های لوبیا سفید ابتدا با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه ضد عفونی سطحی شده و سپس با آب مقطر استریل شستشو شدند. گلدان‌ها با حجم دو لیتر به نسبت (۲:۱) از خاک مزرعه (استریل) و پرلیت پر شدند. به ازای هر رقم و یا لاین لوبیا سفید، سه گلدان و در هر گلدان سه بذر لوبیا در عمق دو سانتی‌متری سطح خاک کشت شدند و یک گلدان نیز به عنوان شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی در نظر گرفته شد. گیاهان در گلخانه با دامنه دمایی ۲۵- ۱٦ °C و نور طبیعی قرار گرفتند. جهت مایه‌زنی از گیاهچه‌های جوان لوبیا، در مرحله دو برگچه‌ای استفاده شد. به این ترتیب که از سوسپانسیون اسپور با غلظت تقریبی $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر از کشت هفت روزه هر جدایه استفاده شد (Abawi *et al.*, 1990). برای ایجاد بیماری زخم بسیار کوچکی به کمک اسکالپل سترون در قسمت طوقه لوبیا ایجاد شد و سپس دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور تهیه شده بر روی محل زخم اضافه گردید. پس از یک ماه و با مشاهده علائم بیماری بوته‌ها از گلدان خارج و علائم ثبت گردید. ریشه گیاهان تیمار و شاهد جهت جداسازی و تایید قارچ مایه‌زنی شده به عنوان عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند.

فاکتورهای ارزیابی شده در آزمون‌های گلخانه‌ای پس از ۳۰ روز از رشد لوبیا شامل ارتفاع بوته در زمان برداشت از سطح خاک تا نوک بوته (سانتی‌متر)، طول ریشه (سانتی‌متر)، وزن خشک اندام هوایی (گرم)، وزن خشک ریشه (گرم)، طول زخم بر روی طوقه و ریشه، درصد آلودگی و شدت بیماری در ریشه و درصد علائم برگی بودند.

برای بررسی اثرات آلودگی گیاهچه‌های لوبیا با *F. solani* f.sp. *phaseoli* بر طول بوته و ریشه، وزن خشک بوته و ریشه در ابتدا با استفاده از فرمول زیر درصد تغییرات طول بوته و ریشه، وزن خشک بوته و ریشه نسبت به شاهد بدون آلودگی محاسبه شد و پس از آن اقدام به تجزیه آماری داده‌ها گردید.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]

$$\%L=\frac{(L_{control}- L_{treatment})}{L_{control}} * 100$$

L: درصد تغییرات طول بوته

$L_{control}$: طول بوته شاهد

$L_{treatment}$: طول بوته تیمار

برای اندازه گیری علائم اندام هوایی از روش هارتمن و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد : نبود علائم در اندام هوایی =۱، روشن شدن برگ‌ها با حالت ابلقی و موزائیک (۱–۲۰ درصد آلودگی برگی) = ۲، علائم متوسط با کلروز و نکروز بین برگی (۲۱– ۵۰ درصد آلودگی برگی) = ۳، علائم سنگین با کلروز و نکروز بین برگی (۵۱–۸۰ درصد آلودگی برگی) = ٤، علائم شدید با کلروز و نکروز بین برگی (۸۱ – ۱۰۰ درصد آلودگی برگی) = ۵. برای اندازه‌گیری علائم ریشه از روش کیم و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد: گیاهان سالم بدون هیچ یک از علائم آلودگی = ۰، کمتر از ۲۰ درصد ریشه آلوده شده و حداقل یک شانکر قهوه‌ای درشت داشته باشد=۱، حدود ۵۰ درصد ریشه دارای شانکر تیپیک باشد = ۲، بیش از ٦۰–۷۰ درصد ریشه دارای شانکر باشد=۳، مرگ گیاهچه پس از درآمدن از خاک، طول گیاهچه کمتر از ۵ سانتی‌متر باشد=٤، مرگ گیاهچه قبل از درآمدن از خاک یا پوسیدگی بذر=۵. سپس میانگین شدت بیماری برای هر تیمار (ارقام و لاین-ها) در هر تکرار محاسبه شد. در این پژوهش، تجزیه و تحلیل آماری داده‌های اندازه‌گیری شده با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح یک درصد انجام گرفت.

کمیت‌سنجی DNA قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* در ریشه لاین حساس و رقم متحمل لوبیا سفید به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا

به منظور کمیت‌سنجی DNA پاتوژن در ژنوتیپ حساس و متحمل لوبیا سفید به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا بر اساس ارزیابی شدت و علائم بیماری و آنالیز نتایج یک لاین حساس و یک رقم متحمل برای انجام مراحل بعدی آزمایش و کمیت‌سنجی پاتوژن عامل بیماری در زمان‌های مختلف پس از آلودگی انتخاب شد. سپس به منظور کمیت‌سنجی میزان ژنوم قارچ عامل بیماری در ریشه ژنوتیپ حساس و متحمل لوبیا سفید در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در شش زمان انجام شد. ابتدا بذور به مدت یک دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل شستشو شدند. گلدان‌ها با حجم یک لیتر به نسبت (۲:۱) از خاک مزرعه (استریل) و پرلیت پر شدند. در هر گلدان دو بذر لوبیا در عمق دو سانتی‌متری سطح خاک کشت شدند و یک گلدان نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. گیاهان در گلخانه با دامنه دمایی ۲۵ °C– ۱٦ و نور طبیعی قرار گرفتند. جهت مایه‌زنی از گیاهچه‌های جوان لوبیا، در مرحله دو برگچه‌ای استفاده شد به این ترتیب که از سوسپانسیون اسپور با غلظت تقریبی $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر از کشت هفت روزه هر جدایه استفاده شد (Abawi *et al.*, 1990). در مرحله بعد ریشه گیاهچه‌های دو برگچه‌ای رقم حساس و متحمل لوبیا سفید درون سوسپانسیون اسپور جدایه قارچ بیمارگر با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر به مدت ده دقیقه قرار گرفتند و سپس گیاهچه‌ها دوباره در خاک کشت گردیدند. سپس نمونه-برداری از کل ریشه و طوقه گیاهچه‌های شاهد و آلوده در زمان صفر (در همان زمان تلقیح)، ۲، ۷، ۱۵، ۲۱ و ۳۰ روز بعد از تلقیح قارچ از گیاهچه‌های لاین حساس و متحمل لوبیا سفید صورت گرفت. سپس نمونه‌ها داخل فویل آلومینیومی و سریعاً درون ازت مایع قرار گرفتند و سپس به آزمایشگاه منتقل شده و در فریزر ۷۰– درجه سلسیوس برای انجام مراحل بعد نگهداری شدند.

استخراج DNA کل از ریشه بوته‌های لوبیای آلوده با روش CTAB (Novaes *et al.*, 2009) با اندکی تغییرات انجام شد. سپس جهت تعیین درجه خلوص و غلظت نمونه‌های DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ و ژل آگارز استفاده و کیفیت و کمیت نمونه‌ها بررسی شد. همچنین تمام نمونه‌های DNA استخراج شده از ریشه‌های لوبیا بعد از انجام نانودراپ همگی تا غلظت ۱۰۰ نانوگرم DNA رقیق شدند تا ارزیابی دقیقی در شرایط یکسان از میزان DNA پاتوژن در ریشه انجام شود. برای رقیق سازی از DNA گیاهان شاهد استفاده شد تا تغییر پذیری فرآیندهای داخلی با استفاده از DNA گیاه نیز بررسی شود (Mercado-Blanco *et al.*, 2003).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]

به منظور طراحی پرایمرهایی که قادر به شناسایی *F. solani* f. sp. *phaseoli* باشند، از توالی ژن elongation factor 1-α استفاده شد، توالی ایزوله‌های مختلف پاتوژن از پایگاه نوکلئوتیدی NCBI به دست آمدند، سپس توسط هم ردیفی چندگانه (Multiple Alignment) توالی‌ها بوسیله نرم افزار MEGA4، نواحی حفاظت شده تعیین شد و در نهایت پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار AlleleID 7 طراحی شدند. توالی آغازگرهای طراحی شده برای کمیت سنجی قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* شامل آغازگر رفت Ef1α- F با توالی 3′- ACAATCAATCACAGACCG -5′ و آغازگر برگشت Ef1α- R با توالی 3′-GAGATGTCACCAACCTTC-5′ می‌باشد.

در این مطالعه، به منظور بررسی روند توسعه و گسترش قارچ بیمارگر در میزبان و همچنین تفاوت میزان رشد بیمارگر در میزبان حساس و متحمل لوبیا به قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* از روش ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از سیستم SYBER Green استفاده شد.

کمیت‌سنجی میزان DNA قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* با استفاده از دستگاه Real time PCR مدل EXI-05C-1303021 Bioneer انجام شد. هر واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر از مخلوط آماده (Master Mix) شرکت JenaBioscience، ۰/۱ میکرومولار از هر آغازگر رفت (Forward primer) و آغازگر برگشت (Reverse primer) و ٤ میکرولیتر از DNA بافت ریشه و طوقه لوبیا بود. واکنش Real time PCR با سه تکرار و بصورت مجزا، برای هر یک از تکرارهای کشت شده در گلخانه انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۹۵ °C و یک برنامه ٤۰ چرخه‌ای شامل دمای ۹۵ °C به مدت ۲۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها در دمای ۵۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه بود. پس از آخرین چرخه مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ °C نگهداری شد. پس از پایان واکنش رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ۹۵ °C –۶۰ با اختلاف ۰/۵ درجه سلسیوس در هر چرخه انجام گرفت. برای اطمینان از درستی انجام واکنش و اختصاصی بودن واکنش، فراورده‌های واکنش Real time PCR بر روی ژل آگارز (۱٪) بارگذاری شدند. عمل الکتروفورز با شدت ولتاژ ۸۰ V در مدت زمان ۱ ساعت انجام شد.

رسم منحنی استاندارد برای ژنوم قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli*

سری رقت‌های DNA قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* خالص بر اساس روش سانگ و همکاران (Song *et al*., 2002) با غلظت‌های ۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ نانوگرم آماده شدند و در Real time PCR برای ترسیم منحنی استاندارد با سه تکرار مورد استفاده قرار گرفتند. برای رقیق سازی از DNA گیاهان شاهد استفاده شد تا تغییر پذیری فرآیندهای داخلی با استفاده از DNA گیاه نیز بررسی شود. آزمایش با استفاده از سری‌های رقیق سازی شده پنج‌گانه، اجرا گردید. در نهایت هر کدام از نمونه‌های مجهول و شاهد نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. آزمایش برای نمونه بیمارگر خالص به عنوان کنترل مثبت تکرار شد. سپس داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SAS 9.1 تجزیه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی علائم بیماری و شدت آلودگی ارقام و لاین‌های مختلف لوبیا سفید نسبت به قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* در شرایط گلخانه‌ای

با توجه به جدول تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده ارقام و لاین‌های لوبیا سفید در گلخانه (جدول ۲) مشاهده می‌شود که بین ارقام و لاین‌های مختلف لوبیا سفید از لحاظ میزان حساسیت و علائم مورفولوژیکی نسبت به بیماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد.

بر اساس ارزیابی علائم بیماری و شدت آلودگی ارقام و لاین‌های آلوده شده به *F. solani* f.sp. *phaseoli* مشخص شد که هیچکدام از ارقام و لاین‌هایی که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند، در مقابل بیماری پوسیدگی فوزاریومی کاملاً مصون نبودند و تمامی آنها درجاتی از حساسیت را نشان دادند. ولی همانطور که

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]

در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود براساس مقایسه میانگین صفات بررسی شده، ارقام و لاین‌های لوبیا سفید بر اساس درجه حساسیت نسبت به این بیماری در گروه‌های مختلفی قرار گرفتند. لاین‌های KBC43106 و KBC42101-2 به عنوان حساسترین و رقم درسا و لاین‌های KBC42107-2 و KBC42101-1 به عنوان مقاوم‌ترین لاین‌ها و رقم در این پژوهش شناخته شدند.

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات ارزیابی شده در آزمایش اثر قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* روی ارقام و لاین‌های لوبیا سفید در شرایط گلخانه‌ای

Table 2- Analysis of variance of data obtained from measuring the traits evaluated in the experiment of *F. solani* f. sp. *phaseoli* on white bean cultivars and lines in greenhouse conditions.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		طول بوته	طول ریشه	وزن خشک بوته	وزن خشک ریشه	طول زخم	درصد نکروز ریشه	علائم اندام هوایی
رقم	۱۸	۲۰۹/۳۰۲٤ **	٤٦٦/٤٤٨٥ **	۲۳۳/۲۸۱٦ **	۱٤٦/۰۲۰۳ **	۳/۲٤۲٥ **	۰/۱۲۷٥ **	۰/۱۳٤۸ **
اشتباه آزمایشی	۱٥۲	۱٤/۲۱٦۳	٦۰/۱۹٦۱	٤۲/۱٥۷۷	۸/۸۲٦٥	۰/۳٥۰٥	۰/۰۲٦۱	۰/۰۸٤٥
ضریب تغییرات (درصد)		۲۲/٦٤	۲۲/۸۹	۲٤/٦۹	۱٥/۰۰	۲٦/٥۰	۱۲/۱۳	۲۷/٤۸

**: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشد. **: indicated significant differences at 1% level.

جدول ۳- مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه در ارقام و لاین‌های مختلف لوبیا سفید تلقیح شده با *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* در شرایط گلخانه‌ای

Table 3- Comparison of mean values of the studied traits in different cultivars and lines of inoculated beans inoculated with *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in greenhouse conditions.

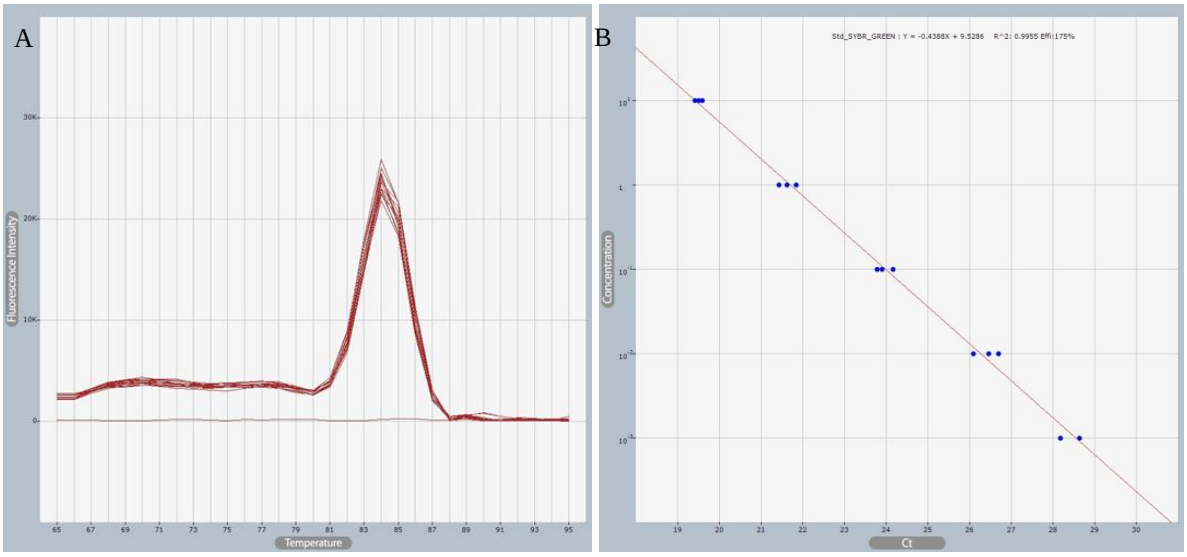
رقم	طول بوته	طول ریشه	وزن خشک بوته	وزن خشک ریشه	طول زخم	درصد نکروز ریشه	علائم اندام هوایی
لاین ۱	۱٥/۸٤ def	۳۲/۲٦ cde	۲۷/٥۰ a-e	۱۸/٥۳ d-h	۲/۳۹ abc	۱/۳۳ bc	۰/٦۷ b
لاین ۲	۱۱/۸٤ fg	۲۳/۸۱ e	۱۹/۸۷ e	۱۳/۸۲ i	۱/٤٤ d	۱/۰۰ c	۰/٤٤ b
لاین ۳	۲۱/۲۷ bc	٤۱/۲۰ abc	۳۰/٥٤ abc	۲۳/۳٥ b	۲/۸۳ a	۱/٦۷ ab	۰/۸۹ ab
لاین ٤	۱٤/۲۰ d-g	۲۷/٤۷ de	۲۱/۲۳ e	۱٦/۲۰ ghi	۱/٥٥ d	۱/۰۰ c	۰/٥٥ b
لاین ٥	۲٦/۷۲ a	٤۲/۸۱ ab	۳٥/٤٥ a	۲۸/۱۳ a	۳/۰٥ a	۲/۱۱ a	۱/٤٤ a
لاین ٦	۱۱/٤٥ fg	۳۰/٤۸ de	۲٥/۰۰ cde	۱۷/۸۲ fgh	۱/٦۱ d	۱/۱۱ bc	۰/٥٥ b
لاین ۷	۱۲/٥۰ efg	۲٤/۸٦ de	۲۱/٦۷ de	۱۷/۹٥ e-h	۱/٥٥ d	۱/۰۰ c	۰/٥٥ b
لاین ۸	۲٦/۱۷ a	٤٤/۷۹ a	۳۳/۹۳ ab	۲۸/٥۷ a	۳/۰٥ a	۲/۱۱ a	۱/٤٤ a
لاین ۹	۱۱/۰۷ g	۲٥/۱٦ de	۲۱/۰۲ e	۱٤/۹۷ hi	۱/٥۰ a	۱/۰۰ c	۰/٥٥ b
لاین ۱۰	۱۷/۰٥ cde	٤۰/۱٦ abc	۲٥/۹٥ cde	۲۲/۰۳ bcd	۲/٥۰ abc	۱/۳۳ bc	۰/٦۷ b
لاین ۱۱	۱۷/٦۷ cd	٤۰/٤٤ abc	۳۱/۲۸ abc	۲۱/٥۳ b-e	۲/۷۸ ab	۱/۳۳ bc	۰/٦۷ b
لاین ۱۲	۱۳/٤۷ d-g	۳۱/۹۲ cde	۲٦/۲۳ b-e	۱۸/٦۳ c-g	۱/۸۹ cd	۱/۱۱ bc	۰/٥٥ b
لاین ۱۳	۲۰/٥٦ bc	٤۱/۰۹ abc	۳۰/٥٤ abc	۲۲/۲۲ bc	۲/۸۹ a	۱/٦۷ ab	۰/۸۹ ab
لاین ۱٤	۲۳/۳۸ ab	٤۰/۱٦ abc	۳۰/۷۲ abc	۲۲/۰۳ bcd	۲/۷۸ ab	۱/٤٤ bc	۰/٦۷ b
الماس	۱٥/۳٦ d-g	٤۰/٤۰ abc	۲۹/٥۳ a-d	۲۰/٥٥ b-f	۲/۷۸ ab	۱/۳۳ bc	۰/٦۷ b
درسا	۱۳/۲٦ d-g	۲٤/۲۷ e	۱۹/۸٦ e	۱٤/۹۲ hi	۱/٥۰ a	۱/۰۰ c	۰/٥٥ b
پاک	۱۲/۹۸ efg	۲٦/۸۱ de	۱۹/۷۲ e	۱۷/٥۹ fgh	۱/۸۳ cd	۱/۱۱ bc	۰/٥٥ b
صدف	۱٥/۷۰ d-g	۳۱/۹۲ cde	۲۱/۸۱ de	۱۸/۳٦ e-h	۲/۰٥ bcd	۱/۱۱ bc	۰/٥٥ b
دانشکده	۱٥/۹۰ def	۳۳/۹۳ bcd	۲٦/۸۳ b-e	۱۹/۰۸ c-g	۲/٤٤ abc	۱/۳۳ bc	۰/٦۷ b

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]

ارزیابی منحنی استاندارد و واکنش Real time PCR

منحنی استاندارد برای DNA قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* با روش Real time PCR رسم شد (شکل۱–A) و برای تعیین مقدار DNA بیمارگر در نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. میزان R^2 برای نمونه استاندارد تهیه شده از سری رقت‌های فوزاریوم در این مطالعه برابر با ۰/۹۹۵ بود که نشانگر بالا بودن سطح دقت واکنش بر اساس نمودار استاندارد است. کارایی (Efficiencies= E) واکنش برابر با ۱۷۵٪ بود. در شکل یک نمودار استاندارد با معادله Y=-0.4388X +9.5286 آورده شده است. تخمین غلظت‌های مجهول DNA فوزاریوم در نمونه‌های DNA کل ریشه بوته‌های آلوده با توجه به سیکل آستانه هر نمونه در دوره‌های زمانی بعد از آلوده‌سازی با قرار دادن سیکل آستانه به دست آمده در معادله خطی نمودار استاندارد طبق روش (Mercado-Blanco *et al.*, 2003) برآورد شده است.

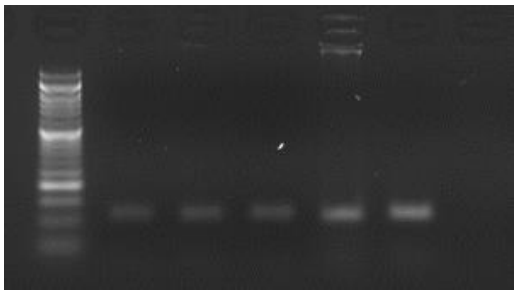


شکل ۱– A) منحنی استاندارد با R^2= ۰/۹۹۵ و معادله Y=-0.4388X + 9.5286. همچنین Efficiency=175% که محور عمودی لگاریتم غلظت DNA و محور افقی سیکل آستانه می باشد. B) منحنی دمای ذوب قطعات تکثیر شده در نمونه‌های تلقیح شده با *F. solani* f. sp. *phaseoli*.

Fig 1–A) Standard curve with R^2= 0/995 and equation Y=-0.4388X + 9.5286. Also Efficiency=175% threshold cycles that horizontal axis and the vertical axis is the logarithm of the concentration of DNA. B) Melting curve samples infected with *F. solani* f. sp. *phaseoli*.

به منظور انجام واکنش Real time PCR از آغازگرهای Ef1α- R (GAGATGTCACCAACCTTC) و Ef1α- F (ACAATCAATCACAGACCG) که قطعه اختصاصی از ژن elongation factor 1-α بیمارگر به اندازه 91 bp را در واکنش تکثیر می‌کرد، برای کمیت سنجی DNA قارچ استفاده شد و از آغازگرهای AB101 و AB102 (Sun *et al.*, 1994) در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز برای کیفیت سنجی DNA گیاه استفاده گردید. دمای متوسط ذوب محصول مورد انتظار برای تکثیر فوزاریوم در حدود ۸٤ درجه سلسیوس بود و آنالیز منحنی ذوب بعد از اتمام واکنش تأیید کرد که هیچ گونه محصول غیراختصاصی ایجاد نشده است و شرایط آزمایش برای تکثیر مطلوب بوده است (شکل ۱–B) همچنین برای اطمینان بیشتر و تأیید نتایج، محصول تکثیر واکنش Real time PCR در روی ژل آگارز بارگذاری شد و نتایج حاصل از الکتروفورز نشان داد که یک قطعه اختصاصی به اندازه ۹۱ bp در واکنش تکثیر شده است و هیچ گونه محصول غیر اختصاصی تولید نشده است (شکل ۲).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]



شکل ۲- الکتروفورز محصولات تکثیر شده در واکنش Real time PCR روی ژل آگارز. L: Orange Ruler 50 bp DNA Ladder.

Fig 2- Electrophoresis of amplified products in Real time PCR reaction on agarose gel. L :Orange Ruler 50 bp DNA Ladder.

کمیت سنجی مقدار DNA قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* در ریشه لوبیا سفید حساس و مقاوم در زمان‌های مختلف بعد از آلودگی

بر اساس ارزیابی علائم بیماری و شدت آلودگی حساسیت ارقام و لاین‌های لوبیا سفید نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه در شرایط گلخانه‌ای لاین حساس KBC43106 و رقم متحمل درسا به منظور بررسی کمیت‌سنجی و روند رشد پاتوژن در میزبان انتخاب شدند.

واکنش دو ژنوتیپ حساس و متحمل لوبیا سفید نسبت به بیماری ایجاد شده توسط *F. solani* f. sp. *phaseoli* با کمیت سنجی مقدار DNA بیمارگر در زمان‌های صفر، ۲، ۷، ۱۵، ۲۱ و ۳۰ روز پس از آلودگی با استفاده از تکنیک Real time PCR ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های این بخش بصورت آزمایش فاکتوریل (فاکتور اول رقم و فاکتور دوم زمان نمونه‌برداری) انجام و تجزیه واریانس گردید. نتایج تجزیه واریانس (جدول ٤) نشان داد که اثرات اصلی رقم (حساس و متحمل)، زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل این دو فاکتور در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد.

نتایج کمیت‌سنجی‌های Real time PCR با استفاده از نمونه‌های DNA کل ریشه آلوده در لوبیا سفید حساس و متحمل در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ٤- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایش بر میزان غلظت DNA قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* در ریشه و طوقه لوبیا سفید حساس و متحمل

Table 4 – Analysis of variance for the effect of treatments on the DNA concentration of *F. solani* f. sp. *phaseoli* in the root and crown of sensitive and tolerated white beans.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات غلظت DNA
رقم	٥	١٩/٤٤٧٢ **
زمان	١	١٦/٥٣٤١ **
رقم × زمان	٥	١/٠٧٥١ **
خطا	٦٠	٠/٠٢٤٢٤
ضریب تغییرات (درصد)		٩/١٧

معنی‌دار در سطح احتمال آماری ١٪ : Significant at 1% probability level

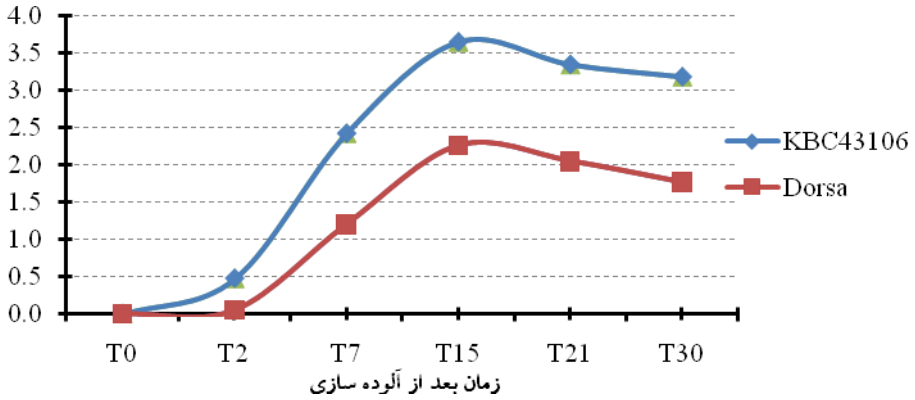
جدول ٥- مقایسه میانگین غلظت DNA قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* در ریشه و طوقه لوبیا سفید حساس و متحمل در فواصل زمانی مختلف بعد از آلودگی

Table 5- DNA concentration of *F. solani* f. sp. *phaseoli* in the root and crown of sensitive and tolerated white beans, in a time course after inoculation.

	روز پس از تلقیح (dpi)	غلظت DNA پاتوژن(ng)/ DNA ١٠٠ (ng) کل گیاه آلوده
حساس (KBC43106)	T_0	٠/٠٠ h
	T_2	٠/٤٧ g
	T_7	٢/٤٢ c
	T_{15}	٣/٦٥ a
	T_{21}	٣/٣٤ b
	T_{30}	٣/١٨ b
متحمل (درسا)	T_0	٠/٠٠ h
	T_2	٠/٠٥ h
	T_7	١/٢٠ f
	T_{15}	٢/٢٥ cd
	T_{21}	٢/٠٤ d
	T_{30}	١/٧٦ e

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]



نمودار ۱– نتایج حاصل از کمیت‌سنجی DNA بیمارگر *F. solani* f. sp. *phaseoli* در طوقه و ریشه رقم متحمل درسا و لاین حساس KBC43106 در فواصل زمانی مشخص بعد از فرآیند آلوده‌سازی

Chart 1- Results of DNA quantitative determination of *F. solani* f. sp. *phaseoli* in the crown and root of the tolerated cultivar Dorsa and the sensitive line KBC43106 in a time course after inoculation process.

بیشترین مقدار DNA در هر دو رقم متحمل و لاین حساس در زمان ۱۵ روز بعد از آلوده‌سازی اتفاق افتاده است و پس از آن غلظت DNA کاهش یافته است. بررسی توسعه بیماری در لاین حساس KBC43106 همچنین نشان داد که علائم بیماری با شدت بیشتری بروز پیدا می‌کند و در این لاین قارچ با سرعت بیشتری در مقایسه با رقم متحمل توانست ریشه و طوقه بوته‌های تلقیح شده لوبیا را کلونیزه کند.

همچنین نتیجه کمیت‌سنجی DNA بیمارگر در ریشه و طوقه لاین حساس و رقم متحمل نشان می‌دهد که سرعت رشد و تکثیر بیمارگر در لاین حساس با سرعت بیشتری انجام می‌شود و در نهایت غلظت DNA بیمارگر در لاین حساس به میزان قابل توجهی بیشتر از رقم متحمل می‌باشد. نمودار ۱ مقایسه روند تجمع غلظت DNA، *F. solani* f. sp. *phaseoli* در رقم متحمل درسا و لاین حساس KBC43106 در زمان‌های مختلف بعد از نمونه‌برداری نشان می‌دهد، این نمودار نشان‌دهنده رشد سریع قارچ عامل بیماری بین زمان صفر تا ۲ روز در لاین حساس نسبت به رقم متحمل بوده است. همچنین تجمع بیمارگر تا ۱۵ روز پس از آلودگی در لاین حساس بیشتر و سریع تر بوده است و در رقم متحمل تجمع غلظت DNA با روند کندتری پیش رفته است. ۱۵ روز پس از آلودگی غلظت DNA بیمارگر به بیشترین میزان خود می‌رسد و پس از آن میزان تجمع بیمارگر در ریشه گیاه لوبیا افزایش چشمگیری نداشته و تقریباً ثابت مانده است. نتایج بررسی مقاومت ارقام با استفاده از روش سنتی (تلقیح گیاهچه‌ها و بررسی شدت بروز علائم) با نتایج حاصل از کمیت سنجی DNA بیمارگر در ریشه و طوقه گیاه میزبان با استفاده از تکنیک Real time PCR همپوشانی مناسبی داشته است.

در سال‌های اخیر، اندازه‌گیری کمی DNA در گیاه به جای ارزیابی مستقیم قارچ عامل بیماری روش سریع و مطمئنی برای شناسایی ارقام مقاوم گزارش شده است. استفاده از تکنیک Real time PCR برای تشخیص سریع و کمیت‌سنجی *F. oxysporom* f. sp. *solani* در بذر لوبیا به منظور جلوگیری از گسترش بیمارگر با بذر لوبیا آلوده انجام شد (Sousa *et al.*, 2014). تکنیک Real time PCR برای مطالعه میزان رشد و کمیت‌سنجی *F.solani* f. sp. *glycines* در ریشه گیاه سویا استفاده شده و مشخص شد که می‌تواند به عنوان یک روش مناسب برای ارزیابی مقاومت لاین‌های سویا در برابر این بیمارگر استفاده شود (Lie *et al.*, 2008). تکنیک Real time PCR به عنوان یک روش حساس و قوی برای ارزیابی روند رشد و مقاومت میزبان در برابر بیماری در ژنوتیپ‌های مختلف سیب زمینی استفاده شده است (Hussain *et al.*, 2013). با استفاده از این روش وجود قارچ *V.dahliae* در ارقام مختلف سولاناسه مورد بررسی قرار گرفته و ثابت شده است که نسبت DNA قارچ به گیاه در رقم مقاوم به ورتیسلیوم کمتر از سایر ارقام بوده است. نتایج همچنین نشان داد که رابطه زیادی بین شدت علائم گیاه آلوده در ژنوتیپ‌های مختلف و مقدار DNA قارچ وجود دارد (Gayoso and Pomar , 2007). در مجموع اندازه‌گیری DNA در گیاه به جای ارزیابی مستقیم قارچ عامل

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]

بیماری روش دقیق، کارآمد و مطمئنی برای شناسایی ارقام مقاوم گزارش شده است (Moretti *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2004; Mercado-Blanco *et al*., 2003). با توجه به پژوهش‌های انجام شده با این روش روی تعامل پاتوژن- میزبان در دنیا و نتایج این پژوهش می‌توان از این روش در آینده نسبت به غربالگری لاین‌های امیدبخش و ارقام لوبیا به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه اقدام نمود.

منابع

Abawi G S, Pastor- Corrales M A. 1990. Root rot of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies and Management Strategies. Centro International de Agriculture Tropical, Cali, Colombia.

Bohm J, Hahn A, Schubert R, Bahnweg G, Adler N, Nechwatal J, Ehlmann R, Obwald W. 1999. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus Glomus mosseae and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. European Journal of Phytopathology 147: 09–416.

Broughton W J, Hernández G, Blair M, Beebe S. Gepts P, Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. Plant Soil 252:55-128.

Burke D W. Hall R. 1991. Fusarium root rot. In: Hall, R. (ed): Compendium of bean diseases. The American Phytopathological Society, Paul, MN. 9-10.

Chilvers M I, du Toit L J, Akamatsu H, Peever T L. 2007. A real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. Plant Disease 91: 599-608.

Cullen D W, Lees A K, Toth I K, Duncan J M. 2001. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and potato tubers. European Journal of Plant Pathology 107: 387–398.

Cullen D W, Lees A K, Toth I K, Duncan J M. 2002. Detection of Colletotrichum coccodes from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. Plant Pathology 51: 281–292.

Gao X, Jackson T A, Lambert K N, Li S. 2004. Detection and Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in Soybean Roots with Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. Plant Disease 88: 372- 380.

Gayoso C, pomar F. 2007. Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivares. European Journal of Plant pathology 118: 199-209.

Hall R. 1991. Compendium of bean diseases. APS press, USA.

Hangen L A, M R Bennink. 2003. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethaneinduced colon cancer in rats. Nutr Cancer 44: 60–65.

Hartman G L, Nelson R L, Noel G R. 1997. Germplasm evaluation of Glycine max for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. Plant disease 81: 515-518.

Hussain T, Singh B P, Anwar F. 2013. A Quantative Real-Time PCR of *Phytophthora infestans* in different Indian potato cultivars. Journal of Agriculture and Veterinary Science. 4:17- 26.

Ippolito A, Schena L, Nigro F, Soleti –Ligorio V, Yaseen T. 2004. Real-time detection of Phytophthora nicotianae and P. citrophthora in citrus roots and soil. European Journal of Plant Pathology 110: 833–843.

Kim D S, Cook R J, Weller D M. 1997. Bacillus sp. L 324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology 87: 551-558.

Li S, Hartman G L, Domier L L, 2008. Quantification of Fusarium solani f. sp. glycines isolates in soybean roots by colony-forming unit assays and real-time quantitative PCR. Theoretical and Applied Genetics 117:343-352.

Mercado-Blanco J, Collado-Romero M, Parrilla-Araujo S, Rodrigues-Jurado D, Jimenes-Diaz D. 2003. Quantitive monitoring of Colonization of olive genotypes by *verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. Physiological and Molecular Plant Pathology 63: 91-105.

Miklas P N, Kelly J D, Beebe S E, Blair M W. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stress: From classical to MAS breeding. Euphytica 147:105-131.

Moretti C, Quaglia M, Cerri M, Nicosia D E, Buonaurio R. 2015. A real-time PCR assay for detection and quantification of Botrytis cinerea in Pelargonium x hortorum plants, and its use for evaluation of plant resistance. European Journal of Plant pathology 143: 159.

Novaes R M L, Rodrigues J G, Lovato M B. 2009. An efficient protocol for tissue sampling and DNA

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]

isolation from the stem bark of Leguminosae trees. Genetics and Molecular Research 8: 86-96.

Schena L, Ippolito A. 2003. Rapid and sensitive detection of *Rosellinia necatrix* in roots and soils by real time Scorpion- PCR. Journal of Plant Pathology 85: 15–25.

Schwartz H F, Franc G D, Hanson L E, Harveson R M. 2005. Disease management. Pages 109-143 in: Dry Bean Production and Pest Management. H. F. Schwartz, M. A. Brick, R. M. Harveson, and G. D. Franc, eds. Bull. No. 562A, Colorado State Univ., Cort Collins, CO.

Sousa M V, Machado J C, Simmons H E, Munkvold G P. 2014. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. Plant Pathology 64: 478-488.

Sun Y, Skinner DZ, Liang GH, Hulbert SH. 1994. Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. Theoretical and Applied Genetics 89:26–32.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

Development of a Quantitative PCR Assay for Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in Resistant and Susceptible White Bean

Neda Zand[1*], Roghayeh Hemmati[2], Hossein Jafary[3]

1- PhD Student, 2- Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

3- Associate Professor of Plant Protection Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran.

*Corresponding author Email: nedazand@znu.ac.ir

Abstract

Bean root rot caused by soil pathogenic fungus, *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, is considered as one of the most important diseases of bean in the world and in Iran. The use of resistant cultivars is the most effective method of its control. For this reason, the response of five cultivars and 14 lines of white beans were evaluated to Fusarium root rot. Firstly, a morphological evaluation of disease symptoms and then real time PCR quantification were performed. Based on the results of morphological evaluation the KBC43106 line and Dorsa cultivar, were found to be sensitive and tolerant, respectively. For quantitative assessment and growth trend of the pathogen in sensitive and tolerant genotypes, the bean seedlings were inoculated by 10^7 suspension of relevant pathogen with root dip method, then DNA was extracted from root of inoculated and control seedlings at regular sampling intervals. The gradual increase in the amount of fungal DNA of roots was quantified by Real time PCR technique and utilizing of SYBR Green system with specific primers for elongation factor 1-α gene. The results showed that there is a significant difference between the amount of pathogen's DNA in the roots of susceptible and tolerant plants, therefore, the Real time PCR technique is suitable for resistance screening of bean genotypes against Fusarium root rot.

Key words: Fusarium root rot, Morphological evaluation, Quantitative, Cultivar, Line

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.9.8]