

## ارزیابی نشانگر مولکولی SU20 در تفکیک ژنوتیپ های حساس و مقاوم ایرانی لوبیا نسبت به قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* عامل پژمردگی (زردی) فوزاریومی

احسان حسنونند<sup>۱</sup>، سید حسین وفايي<sup>۲\*</sup>، حسین میرزایی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۲۷

### چکیده

پژمردگی فوزاریومی لوبیا با عامل *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* یک بیماری مهم است و می تواند خسارت شدیدی را به محصول لوبیا در سراسر جهان وارد نماید و باعث کاهش عملکرد شود. روش های زراعی برای کنترل بیماری به طور کامل مؤثر نیست، بنابراین ارقام با مقاومت ژنتیکی برای مبارزه با این بیماری توصیه می گردد. به منظور شناسایی ارقام مقاوم آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و ۱۲ تیمار (شامل ژنوتیپ های مختلف لوبیا) با روش مایه زنی بوته به صورت قرار دادن ریشه آن در سوسپانسیون اسپور بیمارگر انجام شد. بوته ها تا چهار هفته پس از مایه زنی در شرایط گلخانه با دمای ۲۵-۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. شدت علائم بیماری روی بوته ها با استفاده از مقیاس و دادن نمره از ۱ تا ۹ برای ارزیابی فنوتیپی مقاومت، اندازه گیری شد. بر این اساس به ترتیب ژنوتیپ های ناز، صیاد، WA و صدری مقاوم، جگری، اختر و E9 نیمه حساس و خمین، کپسولی، ایچ، شکوفا و تلاش حساس شناخته شدند سپس واکنش ژنوتیپ ها به قارچ با استفاده از نشانگر اختصاصی Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) ارزیابی گردید. بر این اساس ژنوتیپ های اختر، ناز، صدری، صیاد، E9 و WA با جفت آغازگر SU20 تکثیر و در الکتروفورز ایجاد باند ۷۵۰ جفت بازی کردند بنابراین دارای ژن مقاوم A55 می باشند اما ژنوتیپ های تلاش، شکوفا، جگری، ایچ، خمین و کپسولی با جفت آغازگر اختصاصی SU20 تولید باند نکردند.

**واژه های کلیدی:** پژمردگی فوزاریومی، لوبیا، مقاومت، نشانگر مولکولی SCAR.

<sup>۱</sup> - دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، شیراز، ایران.

<sup>۲</sup> - مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم آباد، گروه بیماری شناسی گیاهی، خرم آباد، ایران.

<sup>۳</sup> - دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

\* - نویسنده مسئول مقاله: vafaei\_h1353@yahoo.com

## مقدمه

یکی از بیماری های قارچی لوبیا پژمردگی فوزاریومی (زردی) می باشد که عامل آن قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* می باشد (Kendrick, 1942). این بیماری اولین بار توسط هارتر و ویمر (Harter and Weimer, 1929) در آمریکا شناسایی شد. بیماری پژمردگی فوزاریومی لوبیا در خیلی از نواحی کشت لوبیا در سراسر دنیا از جمله برزیل، کلمبیا، پرو، کاستاریکا، ایتالیا، اسپانیا، یونان، نیوزلند، آفریقای جنوبی و آمریکا خسارت وارد می کند (Alves-Santos et al., 1999; Buruchara and Camacho, 2000; Schwartz et al., 1996; Schwartz et al., 2005). بنا به گزارش سالگادو و همکاران (Salgado et al., 1995) در مناطق کشت لوبیا در دنیا ۱۰ درصد خسارت به دلیل زردی ناشی از قارچ *F. oxysporum* می باشد که به بافت آوندی نفوذ و باعث زردی و پژمردگی بوته می شود. همچنین گزارشاتی مبنی بر وجود این بیمارگر در مزارع لوبیا در ایران وجود دارد (Heidarian and Ershad, 2002; Faraji et al., 2004). این بیماری خسارت اقتصادی را در بیشتر مناطق کشت لوبیا ایجاد می نماید به طوری که در برخی از مناطق در شمال غربی کشور خسارت به بیش از ۷۰ درصد هم می رسد (Nasari, 2008; Saremi et al., 2011). در ارقام حساس به خصوص اگر در اوایل مرحله گیاهچه ای شرایط سرما بر مزرعه مسلط شود خسارت قابل توجه می باشد (Nasari, 2008). فشردگی خاک و زهکشی ضعیف باعث تشدید بیماری می شود (Schwartz et al., 1996). این بیماری معمولاً در گیاهانی که تحت تنش محیطی هستند خسارت شدیدی بر جای می گذارد زیرا ریشه اصلی آسیب می بیند و باعث افزایش ریشه های فرعی شده که تنها می توانند آب سطحی که برای گیاه ناکافی می باشد را از خاک جذب کنند. این قارچ از قارچ های خسارت زا روی لوبیا به ویژه در مناطقی است که دما بالا بوده و خشکسالی در طول فصل رشد لوبیا رخ می دهد. در خاک هایی که در اثر کمبود رطوبت و اکسیژن ریشه رشد مطلوبی ندارد آلودگی ریشه به فوزاریوم تقریباً تمام محصول لوبیا را با خسارت جدی روبرو می کند. حتی در ارقامی از میزبان که دارای بالاترین سطح مقاومت نسبت به این بیماری هستند در صورتی که ریشه ها در خاک غرقاب و فاقد اکسیژن کافی به مدت ۲۴ ساعت قرار گیرند، بیماری گسترش می یابد (Bruton and Miller, 1997). استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل در کنار روش های دیگر از جمله کنترل رطوبت و مواد غذایی خاک، اثرات چشم گیری در مدیریت تلفیقی پژمردگی فوزاریومی ریشه لوبیا ایجاد می کند (Hooda et al., 2004; Jensen et al., 2009). تناوب زراعی با گیاهان غیرحساس به قارچ در کاهش سطح زاد مایه قارچ مؤثر است (Hall and Nasser, 1996). در تحقیقی که صارمی و همکاران (Saremi et al., 2007) روی ارزیابی مقاومت ژنوتیپ های مختلف لوبیا به قارچ زردی فوزاریومی در استان های شمال غربی ایران انجام دادند از لحاظ مقاومت و عملکرد محصول، از بین ژنوتیپ های لوبیا ژنوتیپ ناز مقاوم ترین ژنوتیپ و بیشترین عملکرد محصول و ژنوتیپ سهیر حساس ترین ژنوتیپ و کمترین عملکرد را نشان داد. از سال ۱۹۸۰ با کشف نشانگرهای مولکولی نقشه یابی ژنتیکی ژنهای مقاومت به بیماری کارایی اصلاح گیاهان را افزایش داد. SCAR یکی از نشانگرهای مهم می باشد که از آن در ارزیابی ارقام مقاوم به بیمارگرهای مختلف در گیاه لوبیا استفاده می شود (Brick et al., 2006; Fall et al., 2001). فال و همکاران (Fall et al., 2001) یک نشانگر SCAR لینک شده به مکان کنترل صفات کمی را توسعه

دادند و آن را در طیف گسترده ای از ژرم پلاسماهای لوبیا آزمایش کردند. بریک و همکاران (Brick et al., 2006) در تحقیقی، واکنش ارقام حاصل از خودباروری یک گیاه دگربارور لوبیا به قارچ زردی فوزاریومی را بررسی کردند که در ابتدا برای تعیین شدت بیماری با استفاده از مقیاس ۹-۱ ارقام مقاوم و حساس را در شرایط گلخانه از هم تفکیک نمودند سپس از نشانگر SU20 برای شناسایی ارقام مقاوم لوبیا به زردی فوزاریومی استفاده کردند. گزارشی از کاربرد این نشانگر مولکولی در تفکیک ارقام حساس و مقاوم لوبیا در ایران وجود ندارد و هدف از این تحقیق ارزیابی تأثیر نشانگر مولکولی SCAR در تفکیک ارقام مقاوم و حساس ایرانی لوبیا نسبت به قارچ عامل پژمردگی (زردی) فوزاریومی بود که در پژوهش‌های قبلی پیوستگی و ارتباط این نشانگر با ژن‌های مقاومت به فوزاریوم در لوبیا به اثبات رسیده است. نشانگر SU20 تنها نشانگری است که تاکنون در ارزیابی مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی لوبیا مورد استفاده قرار گرفته است (Brick et al., 2006; Fall et al., 2001).

## مواد و روش‌ها

### جداسازی، خالص سازی و شناسایی بیمارگر

در بازدید از مزارع لوبیا در استان لرستان در تابستان سال ۱۳۹۱ از گیاهان لوبیای مشکوک به پژمردگی فوزاریومی نمونه برداری انجام شد، پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و اعمال ضدعفونی سطحی با هیپوکلرید سدیم یک درصد با کشت قطعاتی از ساقه (حدود ۲۰ سانتی متری طوقه)، روی محیط کشت PDA، عامل بیماری را جدا شد. خالص سازی جدایه‌ها با روش تک اسپور انجام گرفت و شناسایی گونه‌ی *Fusarium oxysporum* جدا شده از نمونه‌های آلوده با استفاده از منوگراف لزل و سامرل (Leslie and Summerell, 2006) صورت پذیرفت.

### آزمون بیماری‌زایی و تعیین فرم تخصصی

برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های جمع آوری شده و تعیین فرم تخصصی آن‌ها، آزمون بیماری‌زایی در گلخانه بر روی گیاه میزبان (لوبیا) انجام گرفت. بذور ژنوتیپ‌های مختلفی از لوبیا با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. سه مرتبه و هر بار به مدت پنج دقیقه با آب مقطر شسته و روی کاغذ صافی سترون به صورت سطحی رطوبت زدایی شدند. سپس پارچه مرطوبی روی بذور کشیده شد و ظروف جهت جوانه زنی بذر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از دو روز بذور جوانه زده به صورت نشاء در گلدان‌هایی که حاوی نسبت ۱ به ۱ از خاک و ماسه بادی سترون بود کشت گردیدند و در شرایط گلخانه با دمای ۲۵-۲۰ نگهداری شدند. وقتی که بوته‌ها به مرحله دو برگچه‌ای رسیدند (ده روز پس از کشت) با سوسپانسیون اسپور مایه‌زنی شدند. بدین روش که مقدار پنج میلی لیتر آب مقطر استریل به پرگنه‌های دو هفته‌ای جدایه‌ها درون تشتک‌های پتری حاوی PDA اضافه شد و با یک میله شیشه‌ای استریل تمام سطح پرگنه قارچ خراشیده شد. سوسپانسیون به دست آمده به منظور زدودن قطعات میسلیوم از پارچه ململ (گاز استریل) عبور داده شد. غلظت اسپور با کمک لام گلبول شمار اندازه‌گیری و تا ۱۰۶ اسپور در هر میلی لیتر آب مقطر تنظیم شد. سپس با استفاده از روش مایه زنی فروبردن ریشه

در سوسپانسیون اسپور مایه زنی صورت گرفت. پس از گذشت چهار تا پنج هفته از مایه زنی علائم بیماری در بخش هوایی گیاه، شامل توقف رشد و پژمردگی گیاه و زردی و ریزش برگ ها و علائم در بافت آوندی گیاه بررسی شد و بوته های مشکوک به آلودگی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از کشت نمونه های آلوده روی محیط کشت PDA قارچ عامل بیماری بازیابی گردید (Pastor-Corrales and Abawi, 1987).

### بررسی فنوتیپی مقاومت ژنوتیپ های لوبیا

در این تحقیق ۱۲ ژنوتیپ مختلف از لوبیای معمولی شامل ۳ تیپ قرمز (کپسولی، جگری، ناز، صیاد و اختر)، چیتی (تلاش، ایچ، خمین، صدری و E9) و سفید (شکופا و WA) استفاده شد. ژنوتیپ های لوبیا در گلدان هایی حاوی خاک رس و ماسه بادی به نسبت ۱:۱ سترون شده با اتوکلاو در شرایط گلخانه کشت گردیدند. طرح آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و در هر گلدان ۳ بذر در نظر گرفته شد. برای این تحقیق ۷۲ گلدان کشت شد که نیمی از گلدان های کشت شده برای آزمایش مایه زنی و نیمی دیگر به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. وقتی گیاهچه ها به مرحله دو برگچه ای رسیدند مایه زنی انجام گرفت. برای انجام مایه زنی ابتدا بوته های لوبیا از گلدان خارج و پس از شستشوی ریشه با آب، ۱/۳ ریشه ها قطع و داخل سوسپانسیون ۱۰۶ اسپور در هر میلی لیتر آب مقطر به مدت ۵ دقیقه قرار داده و بوته های مایه زنی شده در گلدان با خاک سترون کشت گردیدند. گلدان ها در شرایط گلخانه با دمای ۲۰-۳۰ درجه ی سلسیوس و با نور طبیعی نگهداری شدند. گلدان ها یک روز در میان آبیاری و ۱۰ روز بعد از مایه زنی برای رشد بهتر یک مرتبه با ۱/۰ گرم (8-28-16) N.P.K. کوددهی شدند (Pereira et al., 2009).

### درجه بندی شدت بیماری

شدت بیماری با مقیاس از ۱ تا ۹ مشخص گردید. به شکلی که اعداد بین ۱/۰ تا ۳/۰ نشان دهنده ژنوتیپ مقاوم ، بین ۳/۱ تا ۶/۰ نشان دهنده ژنوتیپ متوسط (متحمل) و بین ۶/۱ تا ۹/۰ ژنوتیپ حساس می باشد (جدول ۱) (Pereira et al., 2009).

جدول ۱- تعیین واکنش ارقام لوبیا به بیمارگر *F. oxysporum f.sp. phaseoli* با استفاده از شدت بیماری.

علائم بیماری	میزان خسارت	مقیاس (Scale)
بدون علائم، سالم	۰	۱
پژمردگی و زردی جزئی بوته	۱۰٪	۳
پژمردگی و زردی متوسط بوته	۲۵٪	۵
پژمردگی و زردی شدید بوته و تغییر رنگ آوندی	۵۰٪	۷
مرگ گیاه	۷۵٪	۹

## ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های لوبیا با استفاده از نشانگر مولکولی SCAR

استخراج دی.ان.ای کل از گیاهان به روش Hot CTAB براساس روش ژانگ و مک استوارت ( Zhang and McStewart, 2000) با اندکی تغییرات جزئی انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگاروز اندازه‌گیری شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Quanta Biotech مدل Auto QB96 با ۱ میکرولیتر DNA، ۲ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۷ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> (50μM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10μM)، ۰/۳ آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/μl) و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر SU20 (10μM) ساخت شرکت سیناژن (ایران) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با برنامه مطابق جدول ۲ صورت گرفت. سپس محصول PCR به منظور ایجاد باند اختصاصی بر روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد الکتروفورز گردید و بعد به کمک دستگاه عکس برداری ژل UVidoc مدل GAS9000 از آن‌ها عکس برداری شد.

## جدول ۲- برنامه زمانی و چرخه‌های دمایی آغازگرهای SU20 (برای ۳۰ سیکل).

دمای اولیه	واسرشت	اتصال	بسط	دمای نهایی
۹۴	۹۴	۵۳	۷۲	۷۲
۵	۱	۱	۱	۵

درجه حرارت (سلسیوس)  
زمان (دقیقه)

جدول ۳- نشانگر مولکولی SCAR در رابطه با ژن‌های مقاوم به *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* در لوبیا.

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

## نتایج و بحث

ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های لوبیا به قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* با استفاده از علائم و شدت بیماری

برای ارزیابی مقاومت در این روش شدت علائم ظاهر شده بیماری با مقیاس و دادن عدد از ۱ تا ۹ مشخص شد. براین اساس به ترتیب ژنوتیپ‌های ناز، صیاد، WA و صدی مقاوم، جگری، اختر و E9 نیمه حساس و خمین، کیسولی، ایچ، شکوفا و تلاش حساس شناخته شدند (جدول ۴).

جدول ۴ - مقایسه شدت بیماری در ژنوتیپ مختلف لوبیا آلوده به زردی فوزاریومی.

ژنوتیپ	مقیاس								
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
ناز	۳۱	۵	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
صیاد	۲	۴	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰
WA	۲	۳	۲	۱	۱	۰	۰	۰	۰
صدری	۰	۳	۳	۲	۱	۰	۰	۰	۰
جگری	۱	۰	۰	۳	۲	۱	۲	۰	۰
اختر	۰	۰	۲	۱	۲	۱	۳	۰	۰
E9	۰	۰	۰	۲	۳	۱	۲	۱	۰
تلاش	۰	۰	۱	۰	۲	۱	۰	۳	۲
شکופا	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۲	۳	۲
ایچ	۰	۰	۰	۰	۱	۲	۱	۱	۳
کپسولی	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۳	۴
خمین	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۳	۴

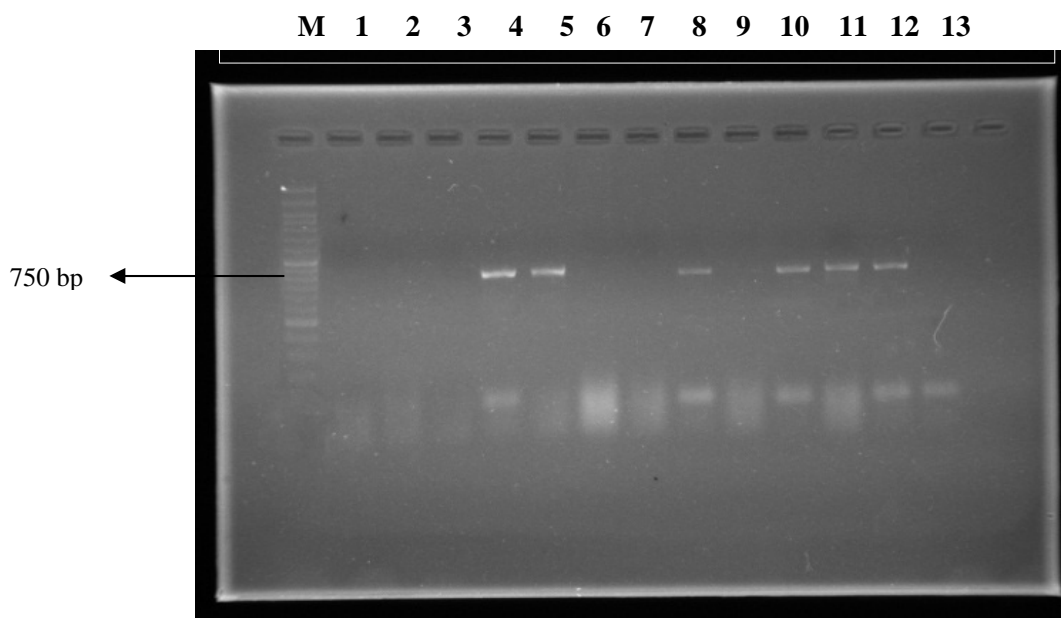
۱: تعداد بوته های ژنوتیپ که علائم بیماری در آن ها برای ثبت مقیاس استفاده شد.

ارزیابی واکنش ژنوتیپ های لوبیا به قارچ *F. oxysporum f.sp. phaseoli* با استفاده از نشانگر اختصاصی SCAR

جدول ۵ و شکل ۱ نتایج حاصل از ارزیابی واکنش ژنوتیپ های لوبیا به جفت آغازگر اختصاصی SU20 (مشخص کننده ژن A55) را نشان می دهد. همان طور که دیده می شود ژنوتیپ های اختر، ناز، صدری، صیاد، E9 و WA با جفت آغازگر SU20 یک قطعه دی ان ای به اندازه 750 bp را تکثیر کرده اند و دارای ژن مقاوم A55 می باشند. اما ژنوتیپ های تلاش، شکופا، جگری، ایچ، خمین و کپسولی با جفت آغازگر اختصاصی SU20 تولید هیچ محصولی نکردند. ژنوتیپ های اختر، صدری و E9 با وجود اینکه براساس شدت بیماری نیمه حساس بودند با جفت آغازگر SU20 یک قطعه دی ان ای به اندازه 750 bp را ایجاد کردند. ژنوتیپ جگری با وجود این که براساس شدت بیماری متحمل بود با جفت آغازگر فوق محصولی را تولید نکرد. در این تحقیق شش رقمی که با جفت آغازگر SU20 ایجاد یک قطعه دی ان ای به اندازه 750 bp کرده اند از لحاظ شدت بیماری و صفات اندازه گیری شده هم مقاوم یا متحمل بوده اند در واقع دارای ژن مقاوم A55 می باشند.

جدول ۵ - ارزیابی کلی واکنش ژنوتیپ های لوبیا به بیماری زردی فوزاریومی براساس نتایج فنوتیپی (شدت بیماری) و مولکولی (وجود یا فقدان ژن A55).

ردیف	ژنوتیپ	نوع	شدت بیماری	ژن A55
۱	تلاش	چیتی	حساس	-
۲	شکופا	سفید	حساس	-
۳	جگری	قرمز	متحمل	-
۴	اختر	قرمز	متحمل	+
۵	ناز	قرمز	مقاوم	+
۶	ایچ	چیتی	حساس	-
۷	خمین	چیتی	حساس	-
۸	E9	چیتی	متحمل	+
۹	کپسولی	قرمز	حساس	-
۱۰	صدری	چیتی	مقاوم	+
۱۱	صیاد	قرمز	مقاوم	+
۱۲	WA	سفید	مقاوم	+



شکل ۱- باند اختصاصی مربوط به نشانگر SU20 (750bp SCAR marker for A55 gene) در ژنوتیپ لوبیا. اعداد بالای شکل نشان دهنده ژنوتیپ های مختلف لوبیا است. M: مارکر (2kb)، ۱: ژنوتیپ تلاش، ۲: شکופا، ۳: جگری، ۴: اختر، ۵: ناز، ۶: آجیلی، ۷: خمین، ۸: E9، ۹: کپسولی، ۱۰: صدری، ۱۱: صیاد، ۱۲: WA و ۱۳: شاهد.

در این تحقیق نتایج کاربرد نشانگر مولکولی SCAR در پیش بینی واکنش ژنوتیپ های لوبیا به بیماری زردی فوزاریومی با مطالعات بریک و همکاران (2006) و فال و همکاران (2001) مطابقت داشت. دو ژنوتیپ اختر و E9 با وجود این که براساس شدت بیماری نیمه حساس بودند با جفت آغازگر SU20 یک قطعه دی ان ای به اندازه 750 bp را ایجاد کردند. در واقع دارای ژن مقاوم A55 می باشند اما احتمالاً مقاومت در این ژنوتیپ تحت کنترل بیش از یک ژن باشد که جهت ایجاد مقاومت به بیان همزمان این ژن ها نیاز است (Cross *et al.*, 2000). ژنوتیپ جگری با وجود این که براساس شدت بیماری و ارزیابی صفات اندازه گیری شده متحمل بود با جفت آغازگر فوق قطعه دی ان ای به اندازه 750 bp را ایجاد نکرد به عبارت دیگر فاقد ژن مقاوم A55 می باشد. احتمال وجود ژن دیگری غیر از این ژن در این ژنوتیپ وجود دارد که روشن شدن این موضوع نیاز به مطالعات تکمیلی بیشتری دارد. نتایج مطالعات قبلی نیز نشان می دهد که توارث مقاومت در ارقام لوبیا به پژمردگی فوزاریومی متفاوت است و الگوی مقاومت در برخی با یک ژن غالب و در برخی دیگر با یک الگوی کمی (چند ژن) می باشد (Salgado *et al.*, 1995; Cross *et al.*, 2006). همچنین با توجه به اثبات وجود نژاد های مختلف در قارچ عامل بیماری (Salgado *et al.*, 1995) و واکنش متفاوت ژنوتیپ های لوبیا به نژادهای مختلف و عدم تعیین نژاد در این تحقیق، عدم تطابق بررسی های فنوتیپی و ژنوتیپی در مورد برخی ژنوتیپ ها به همین دلیل می تواند باشد. تحقیقات بیشتری با ارقام مختلف لوبیا و نژادهای مختلف قارچ لازم است تا این احتمالات بیشتر بررسی شوند. لازم به توضیح است که نشانگر SU20 تنها نشانگری است که تاکنون در ارزیابی مقاومت برخی ارقام لوبیا به پژمردگی (زردی) فوزاریومی استفاده شده است و در ایران گزارشی از کاربرد این نشانگر وجود ندارد.



## References

1. Alves-Santos FM, Benito EP, Eslava AP and Diaz-Minguez JM. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied Environment Microbiology* 65: 3335–3340.
2. Brick MA, Ogg JB, Schwartz HF, Byrne PF and Kelly JD. 2004. Resistance to multiple races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* in common bean. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 47:131–132.
3. Brick MA, Byrne PF, Schwartz HF, Ogg JB, Otto K, Fall, AL and Gilbert J. 2006. Reaction to three races of *Fusarium* wilt in the *Phaseolus vulgaris* Core Collection. *Crop Science* 46: 1245–1252.
4. Bruton BD and Miller ME. 1997. Occurrence of Vine Decline Diseases of Muskmelon in Guatemala. *Phytopathology* 81: 589–69.
5. Buruchara RA and Camacho L. 2000. Common Bean Reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in central Africa. *Phytopathology* 148: 39–45.
6. Cross H, Brick MA, Schwartz, HF, Panella LW and Byrne PF. 2000. Inheritance of Resistance to *Fusarium* wilt in Two Common Bean Races. *Crop Science* 40: 954–958.
7. Fall AL, Byrne PF, Jung G, Coyne DP, Brick MA and Schwartz HF. 2001. Detection and mapping of a major locus for *Fusarium* wilt resistance in common bean. *Crop Science* 41: 1494–1498.
8. Faraji M, Okhovat M, Kheiri A and Niknam G. 2004. Study of pathogenicity of different isolates of *Fusarium* spp. on six genotypes of bean. Paper presented at: 16<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress; 28 August–11 September; Tabriz, Iran.
9. Hall R and Nasser LCB. 1996. Practice and precept in cultural management of bean diseases. *Candian Journal of Plant Pathology* 18: 176–195.
10. Harter LL and Weimer JL. 1929. A monographic study of sweetpotato diseases and their control. U.S.A Department of Agriculture, Technology Science Service, Bulletin 99, 118 pp.
11. Heidarian A and Ershad J. 2002. Identification and study of the fungi causing foot and root rot on French bean in Chaharmahal and Bakhtiari Province. Paper presented at: 15<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress; 7–11 September; Kermanshah, Iran.
12. Hooda KS, Bhatt JC, Mina BL and Gupta HS. 2009. Suppressive effects of composts on soil-borne and foliar diseases of French bean in the field in the western Indian Himalayas. *Crop Protection* 28: 608–615.
13. Jensen C, Kurle JE and Percich JA. 2004. Integrated management of edaphic and biotic factors limiting yield of irrigated soybean and dry bean in Minnesota. *Field Crops Research*. 86: 211–224.
14. Kendrick, S. 1942. *Fusarium* yellows of beans. *Phytopathology* 32: 1010–1014.
15. Leslie JF and Summerell BA. 2006. *Fusarium* laboratory manual. New York: Black Well Publishing. 387 p.
16. Naseri B. 2008. Root rot of common bean in Zanjan, Iran: major pathogens and yield loss estimates. *Australasian Plant Pathology* 37: 546–551.
17. Pastor-Corrales MA and Abawi GS. 1987. Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease* 71: 990–993.
18. Pereira MJZ, Ramalho MAP and Abreu AFB. 2009. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* Braxilian race 2 in common bean. *Science Agriculture* 66: 788–792.

19. Salgado MO, Schwartz HF and Brick MA. 1995. Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Disease* 79: 279–281.
20. Saremi H, Mohammadi J and Okhovvat SM. 2007. Naz, a resistant cultivar on bean root rot disease in Zanzan Province, Northwest Iran. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 72: 757–764.
21. Saremi H, Amiri ME and Ashrafi J. 2011. Epidemiological aspects of bean decline disease caused by *Fusarium* species and evaluation of the bean resistant genotypes to disease in Northwest Iran. *Biotechnology* 10: 14954–14961.
22. Schwartz HF, Franc GD and Kerr ED. 1996. Fungal diseases. Dry bean production and pest management regional bulletin. Colorado: Colorado State University Publishing.
23. Schwartz HF, Steadman JR, Hall R and Forster RF. 2005. Compendium of bean diseases. New York: American Phytopathology Society Press. 109 p.
24. Zhang J and McStewart JD. 2000. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. *Journal of Cotton Science* 4: 193–201.

## **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**

E. Hasanvand<sup>1</sup>, H. Vafaei<sup>2</sup>, H. Mirzaei<sup>3</sup>

### **Abstract**

Fusarium wilt in common bean by *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* occurs worldwide and can result in severe yield loss. Cultural methods are not completely effective to reduce disease loss, therefore are recommended genotypes with genetic resistance. In order to identify resistant genotypes an experiment was carried out by using a randomized completely design with three replicates and 12 treatments (common bean genotypes). Plants were root-dip inoculated with suspension of spores and held in a greenhouse at 25-30° C. Severity of symptoms on plants were measured basis on a scale of 1 to 9 to evaluate of phenotypic resistance four weeks after inoculation. The results showed that Naz, Sayad, WA and Sadri genotypes were resistant, Jegari, Akhtar and E9 moderately susceptible and Khomein, Capsoli, Aej, Shokofa and Talash susceptible. It also indicated that SCAR marker (SU20) was associated with resistance in some of genotypes but not all and among the genotypes evaluated, PCR amplification with primers SU20 produced a single DNA fragment of approximately 750 bp in Naz, Sayad, Sadri, Akhtar, E9 and WA genotypes, while Khomein, Capsoli, Aej, Shokofa, Jegari, and Talash did not.

**Key words:** Fusarium wilt, common bean, resistance, SCAR.

---

<sup>1</sup>- Former MSc student, Department of Plant Pathology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

<sup>2</sup>- Instructor, Plant Protection Department, Khorramabad branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

<sup>3</sup>- Ph.D. Student, Plant Pathology Department, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.

\*Corresponding author: vafaei\_h1353@yahoo.com