

ارتباط نشانگرهای پروتئینی با مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی در برخی ژنوتیپ‌های عدس

Correlation of protein markers with the resistance to Fusarium wilt in some lentil lines

سمیرا حسینیان^۱، امید سفالیان^{۲*}، مهدی داوری^۳، علی اصغری^۴، منیژه جمشیدی^۴

Samira Hasanian¹, Omid Sofalian^{2*}, Mahdi Davari³, Ali Asghari², Manije Jamshidi⁴

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، ۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات، ۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی،

دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۴- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی

واحد تبریز

1- Phd student of Plant Breeding, 2- Associate Professor of Agronomy and Plant Breeding Department, , 3- Associate Professor of Plant Protection Department, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sofalian@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۹)

چکیده

به منظور ارزیابی مقاومت به قارچ بیماری‌زای *Fusarium oxysporum f.sp. lentis* در ژنوتیپ‌های مختلف عدس و ارتباط آن با نشانگرهای پروتئینی، پژوهشی گلخانه‌ای و آزمایشگاهی روی ۳۸ ژنوتیپ عدس انجام شد. تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه به صورت آزمایش فاکتوریل با دو سطح برای فاکتور A (شرایط بدون بیماری و شرایط آلودگی به بیماری) و ۳۸ سطح (ژنوتیپ) برای فاکتور B، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. یادداشت برداری در هفته چهارم و هشتم پس از مایه‌زنی صورت گرفت که میانگین درصد مرگ و میر بوته‌ها در هفته هشتم بیشتر از هفته چهارم بود. مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه با استفاده از روش LSD در سطح احتمال یک درصد نشان داد که میانگین‌های آن‌ها در گروه‌های آماری مختلف قرار دارند. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به سه گروه مجزا تقسیم شدند که میانگین درصد مرگ و میر متفاوتی داشتند. نتایج حاصل از تجزیه پروتئین‌های محلول در آب و نمک نشان داد که میانگین تنوع ژنتیکی برای تمام مکان‌های ژنی برابر ۰/۳۴ و میانگین شاخص شانون ۰/۵ است. در تکنیک SDS-PAGE برای پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، ژنوتیپ‌ها در تجزیه خوشه‌ای به سه گروه تقسیم شدند. تجزیه رگرسیون داده‌های حاصل از پروتئین‌های محلول در آب و نمک با صفات مورفولوژیکی نشان داد که ضریب رگرسیون بین صفات درصد مرگ و میر در هفته چهارم و هشتم با نشانگر ۱۲ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. نشانگرهای ۴ و ۱۲ به دلیل داشتن ارتباط با بیش از یک صفت به عنوان موثرترین نشانگرهای شناسایی شدند. به نظر می‌رسد در برنامه‌های اصلاحی برای بررسی مقاومت به این بیماری، علاوه بر در نظر گرفتن صفات مهم مورفولوژیکی، از نشانگرهای پروتئینی نیز می‌توان بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی

پژمردگی فوزاریومی،

عدس،

مقاومت،

نشانگر پروتئینی،

Fusarium

مقدمه

عدس گیاهی زراعی از خانواده حبوبات (*Fabaceae*)، دیپلوئید ($2n=14$)، خودبارور و مناسب کشت در مناطق سردسیر است که در سرتاسر جهان تولید می‌شود و به دلیل داشتن ۲۸/۵ درصد پروتئین از نظر ارزش غذایی حایز اهمیت است. این گیاه به خاطر همزیستی با باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن، نقش موثری در حاصلخیزی خاک دارد (Rubeena and Taylor 2003). یکی از عوامل محدودکننده کشت عدس در ایران قارچ‌های خاکزاد مانند گونه‌های مختلف فوزاریوم به خصوص *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی و بوته‌میری است. ببله سوار مغان (اردبیل) که یکی از بزرگ‌ترین مناطق کشت عدس در ایران محسوب می‌شود، در سال‌های گذشته به شدت به بیماری پژمردگی فوزاریومی آلوده شده است و این بیماری در ۷۰-۵۰ درصد مزارع عدس با شدت‌های ۷۰ تا ۱۰۰ درصد وجود دارد و خسارت زیادی به تولید عدس وارد می‌کند (Mohammadi et al. 2011). عامل بیماری پژمردگی عدس، قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* است که اختصاصاً روی عدس بیماری‌زا است (Taylor et al. 2007). علایم این بیماری شامل پژمردگی برگ‌ها، کوتاهی قد بوته، کوچک شدن و پیچش برگ‌ها، پوسیدگی دانه و در قسمت ریشه، کاهش رشد ریشه و تغییر رنگ به قهوه‌ای است (Mohammadi et al. 2011). این قارچ می‌تواند در غیاب میزبان خود بیش از ۵ سال در خاک روی مواد آلی و بقایای گیاهی به صورت ساپروفیتی زنده بماند، به همین دلیل کنترل بیماری با تناوب معمول زراعی امکان‌پذیر نیست (Davari et al. 2012). به علاوه، کنترل شیمیایی این بیماری‌ها در سطوح وسیع به دلیل خاکزی بودن عامل بیماری تقریباً غیرممکن است. از طرف دیگر، در حال حاضر اغلب ارقام رایج کشور به ویژه در منطقه مغان به این بیماری حساس هستند. بنابراین، توجه جدی به اصلاح و معرفی ارقام مقاوم و جایگزینی آنها با ارقام حساس، ضروری به نظر می‌رسد. از طرفی معرفی و اصلاح ارقام مقاوم، مستلزم مطالعه عامل بیماری در مناطق مختلف، ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف در برابر عامل بیماری‌زا، شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم و مطالعه ژنتیک مقاومت آنهاست (Davari et al. 2012). بنابراین دستیابی به ارقام مقاوم که بتواند میزان مقاومت بالایی را

نسبت به بیماری بوته‌میری و پژمردگی فوزاریومی در مقایسه با ارقام محلی داشته باشد، بهترین روش پیشگیری این بیماری‌ها است.

برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی و حفاظت منابع ژنتیکی دارد. از جمله روش‌های برآورد تنوع ژنتیکی می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی اشاره کرد. نشانگرهای مولکولی مانند الگوهای DNA و پروتئین، ابزار مفید و ارزشمندی برای آنالیز تفاوت‌های ژنتیکی ارقام و گونه‌های مختلف گیاهی هستند. به کارگیری نشانگرهای پروتئینی با استفاده از روش SDS-PAGE نیز برای شناسایی گونه‌ها، واریته‌ها و ارقام زراعی در گیاهان مورد توجه قرار گرفته است (Fufa et al. 2005). الکتروفورز PAGE دارای قدرت تفکیک بسیار بالایی بوده و بیش‌تر برای تفکیک پروتئین‌ها و برخی از اسیدهای نوکلئیک به کار گرفته می‌شود. به منظور بررسی پروتئین‌ها با استفاده از PAGE، پس از ایجاد میدان الکتریکی، پروتئین‌ها به حرکت در می‌آیند و طول ژل را طی می‌کنند. اما به طور معمول، بار مؤثر در ایجاد حرکت بار خود پروتئین نیست، بلکه بار ماده‌ای است به نام SDS که مولکول بزرگی با بار منفی است که به طور معمول الکتروفورز پروتئین‌ها در حضور آن انجام می‌شود. در واقع یک رابطه‌ی خطی بین میزان حرکت مولکول‌ها روی ژل و وزن مولکولی آنها وجود دارد. از سوی دیگر هر چه غلظت پلی-اکریل‌آمید بیشتر باشد؛ قدرت تفکیک ژل بیشتر خواهد بود و مولکول‌های دارای وزن مولکولی نزدیک به هم را بهتر تفکیک می‌نماید (Behzadi 2007).

مواد و روش‌ها

تهیه سوسپانسیون قارچ و گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های عدس: در این آزمایش ۳۸ ژنوتیپ عدس مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). در این آزمایش، ۳۸ ژنوتیپ عدس تهیه شده از موسسه‌ی تحقیقات کشاورزی گچساران، در گلخانه و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه محقق اردبیلی مورد بررسی قرار گرفت. برای تولید سوسپانسیون قارچ، جدایه‌های خالص *F. oxysporum* f. sp. *lentis* که از گیاهان عدس بیمار منطقه ببله‌سوار مغان جداسازی

گیرند. میانگین درصد گیاهان مرده مشاهده شده در تکرارها به عنوان نتیجه نهایی منظور شد. تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده به صورت آزمایش فاکتوریل با دو سطح برای فاکتور A (شرایط بدون بیماری و شرایط آلودگی به بیماری) و ۳۸ سطح (ژنوتیپ) برای فاکتور B، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین به روش LSD برای صفات مورد مطالعه انجام شد. در این قسمت، صفر درصد آلودگی و میانگین‌هایی که اختلاف معنی‌داری با صفر درصد آلودگی نداشتند (دارای حروف مشترکی با آنها بودند) به عنوان واکنش مقاوم در نظر گرفته شدند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های عدس نیز بر اساس میانگین درصد گیاهان مرده و صفات ارتفاع بوته، وزن صد دانه و تعداد دانه در بوته به وسیله تجزیه خوشه‌ای به روش Ward انجام شد.

به منظور ارزیابی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول در آب و نمک و پروتئین‌های بذر در عدس از روش SDS-PAGE یک بعدی ناپیوسته به روش لاملی (Laemmli 1970) به کار برده شد. برای استخراج پروتئین‌های بذر عدس از روش پایین و لاورس (Payne and Lawrence 1983) استفاده شد. تهیه محلول ژل‌ها و ژل‌گذاری مطابق با روش لاملی (Laemmli 1970)، انجام شد.

جهت رتبه‌بندی و تجزیه آماری داده‌ها، نوارهای حاصل به صورت حضور (۱) و عدم حضور (صفر) در هر نمونه امتیازدهی شدند. تجزیه‌ی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای NTSYSPc1 و PopGen32 انجام گرفت. تجزیه خوشه‌ای به روش دورترین همسایه‌ها بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده صورت گرفت. جهت بررسی همسویی و مقایسه نشانگرهای پروتئینی و داده‌های زراعی از آزمون مانیتل استفاده شد. تعیین ارتباط بین صفات مورفولوژیکی و داده‌های مولکولی (داده‌های پروتئینی) با تجزیه رگرسیون به روش گام به گام با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت گرفت.

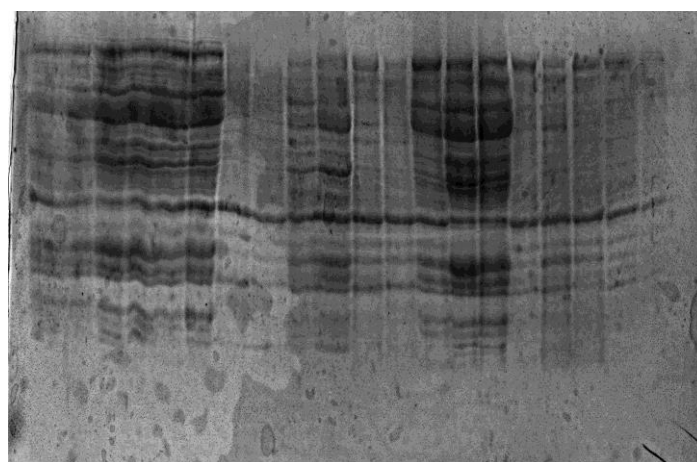
شده بود، در پتری‌های حاوی PDA (potato dextrose agar) کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. از کشت پنج روزه، یک بلوک به قطر ۵ میلی‌متر برداشته و در ویال‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری که محتوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط PDB (potato dextrose broth) (۲۰۰ گرم سیب زمینی، ۲۰ گرم دکستروز در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) بودند، کشت داده و به مدت سه روز روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار دادند تا قارچ رشد کند. سپس، محتویات هر ویال با پارچه مللمل اتوکلاو شده صاف شد. پس از آن با استفاده از لام هماسیتومتر تراکم اسپورها تعیین شد. در آزمون بیماری‌زایی از سوسپانسیون اسپور 1×10^6 استفاده شد (Zaker Tavallaie et al. 2006). بذور عدس به مدت ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و پس از آن با آب مقطر سترون شستشو داده شدند و در پتری‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب، در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت ۱۲ روز، گیاهچه‌ها از پتری خارج و پس از قطع نوک ریشه آنها با تیغ ضدعفونی شده، به مدت پنج دقیقه با غوطه‌ورسازی در محلول سوسپانسیون اسپور 10^6 اسپور در میلی‌لیتر مایه‌زنی شدند. گیاهچه‌ها برای رشد به مخلوط خاک و ماسه (۱:۳) ضدعفونی شده، منتقل شدند. دمای ۲۷-۲۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۸۰٪ و نور طبیعی بر آزمایش گلخانه‌ای حاکم بود (Pouralibaba et al. 2008). برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. ارزیابی بیماری پس از ظهور علائم در دو مرحله رشدی چهار هفتگی و هشت هفتگی بر مبنای درصد گیاهان از بین رفته به روش ارسکین و بایا (Erskine and Bayaa 1990) انجام شد. به این ترتیب که کمتر از ۱٪ گیاه مرده به عنوان خیلی مقاوم (HR)، ۱۰-۲۰٪ به عنوان مقاوم (R)، ۲۰-۱۱٪ به عنوان نیمه مقاوم (MR)، ۵۰-۲۱٪ به عنوان نیمه حساس (MS) و بیش از ۵۰٪ گیاه مرده به عنوان حساس (S) در نظر گرفته شد. صفات دیگر شامل تعداد روز تا گلدهی (تعداد روزهای پس از کاشت تا زمانی که ۵۰ درصد گیاهان دارای گل می‌شد)، تعداد روز تا رسیدگی (تعداد روز پس از کاشت تا زمانی که ۹۰ درصد گیاهان به بلوغ می‌رسید)، طول بوته، وزن صد دانه و تعداد دانه در بوته نیز در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بررسی شد تا علاوه بر واکنش به قارچ بیماری‌زا، از نظر ویژگی‌های زراعی نیز مورد ارزیابی قرار

نتایج

اولین علائم بیماری حدوداً ۲۰ روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد. علائم به صورت کلروز، نکروز و بالاخره مرگ تدریجی بوته‌ها ظاهر شد که این علائم بسته به میزان حساسیت ژنوتیپ‌ها شدت‌های متفاوتی داشتند. یادداشت‌برداری در هفته چهارم (مرحله گیاهچه‌ای) و هشتم (مرحله بلوغ) پس از مایه‌زنی صورت گرفت که میانگین درصد مرگ و میر بوته‌ها در هفته هشتم بیشتر از هفته چهارم بود به این صورت که در هفته چهارم، تعداد هشت ژنوتیپ از ۳۸ ژنوتیپ با درصد مرگ و میر گیاهچه کمتر از یک درصد، به عنوان خیلی مقاوم شناخته شدند، ولی در هفته هشتم تعداد ژنوتیپ‌های خیلی مقاوم به سه عدد (ILL7531، L 1278-2580، PI 299127-358-RINV-63-64) کاهش یافت که نشان دهنده‌ی گسترش عامل بیماری در مراحل بعدی رشد گیاهچه بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس درصد مرگ و میر بوته‌ها نشان داد که اثر متقابل بین ژنوتیپ‌ها و دوره رشدی گیاه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد دارد (جدول ۲). هم‌چنین، تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه ژنوتیپ‌های عدس اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها برای همه صفات نشان داد. صفات ارتفاع بوته، تعداد دانه در بوته و وزن صد دانه دارای اختلاف معنی‌داری بین شرایط بدون آلودگی و شرایط تحت تنش بیماری بودند (جدول ۳). مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه ژنوتیپ‌های عدس با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال یک

درصد نشان داد که میانگین‌های آن‌ها در گروه‌های آماری مختلف قرار دارند. بر اساس نتایج این آزمون، میانگین مرگ و میر گیاهچه صفر درصد و میانگین‌هایی که تفاوت معنی‌داری با میانگین صفر درصد نداشتند، به عنوان ژنوتیپ خیلی مقاوم در نظر گرفته شدند.

از پارامترهای مهم در مقایسه و بررسی تنوع ژنتیکی، شاخص تنوع ژنی نی (Nei 1973) و شاخص اطلاعات شانون (Lewontin 1972) است. شاخص تنوع ژنی نی بازگوکننده معیاری برای تعداد ژن یا کدون هر جایگاه ژنی در زمان اشتقاق دو جمعیت مورد مطالعه و برای ارزیابی تنوع بین ژنوتیپ‌ها و تفرق ژنتیکی (هتروزیگوتی) بکار می‌رود. شاخص شانون یکی از چندین شاخص تنوع ژنی نی است که برای ارزیابی گوناگونی و تنوع ژنتیکی درون جمعیت به کار می‌رود. شاخص شانون از رابطه $H' = -\sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$ که در آن p_i فراوانی آلل i ام و s تعداد کل آلل‌های مشاهده شده است. در تحقیق حاضر، میانگین شاخص شانون ۰/۵ بود و بیشترین میزان آن مربوط به مکان ۲ (۰/۶۹) به دست آمد. میانگین شاخص نی ۰/۳۴ به دست آمد که بیشترین میزان آن نیز مربوط به مکان ۲ (۰/۵) بود. در مجموع از ۳۸ ژنوتیپ مورد مطالعه، ژنوتیپ‌های شماره ۳۲، ۳۱، ۲۴، ۲۱، ۱۰، ۶، ۳ بیشترین تعداد نوار را دارا بودند. طبق اطلاعات به دست آمده از جدول تنوع ژنی، ۲۰ نوار با تکرار پذیری بالا شناسایی شد که ۱۹ نوار دارای چندشکلی بودند و یک نوار (مکان ژنی ۱۱) مونومورف بود.



شکل ۱- نمونه‌ای از الگوهای پروتئین‌های ذخیره‌ای محلول در آب و نمک بذور ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه

Fig. 1. Sample of patterns of seeds water and salt-soluble proteins of lentil promising genotypes

جدول ۱- واکنش گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه نسبت به عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی

Table 1. Reaction of advanced lentil lines to Fusarium wilt

شماره	ژنوتیپ‌ها	درصد گیاهان مرده در هفته چهارم	واکنش گیاهان در هفته چهارم	درصد گیاهان مرده در هفته هشتم	واکنش گیاهان در هفته هشتم	شماره	ژنوتیپ‌ها	درصد گیاهان مرده در هفته چهارم	واکنش گیاهان در هفته چهارم	درصد گیاهان مرده در هفته هشتم	واکنش گیاهان در هفته هشتم
۱	ILL7531	۰	HR	۵۲/۳	S	۲۰	Bari Masur 6-10848-ILL 5888 / ILL8008	۱	HR	۰	S
۲	L 1278-2580	۱	HR	۲	R	۲۱	Gachsaran	۱	HR	۰	R
۳	SYRIAN LOCAL-4400	۱۰	R	۳۶/۷	M	۲۲	GACH LOC 2010-01	۲۴/۳	MS	۰	M
۴	340-4404	۰	HR	۲۲/۳	R	۲۳	FLIP2007-16L ILL 2126 X ILL 4659	۲۱/۳	MS	۰	M
۵	PI 299127-358-RINV-63-64	۰	HR	۹/۳	R	۲۴	FLIP2010-8L ILL 2126 X ILL 6199	۰	HR	۰	R
۶	78S 26013-5588ILL-16 selection	۲	R	۳۳/۳	R	۲۵	FLIP2011-5L ILL 6434 X ILL 6972	۵	R	۰	M
۷	FLIP 84-51L-5722-ILL 883 / ILL 470	۳	R	۱۸	M	۲۶	FLIP2011-6L ILL 6434 X ILL 6972	۳۱/۳	MS	۰	M
۸	81S15-5883UJL-197 / ILL 4400	۱۵/۷	MR	۱۹/۳	M	۲۷	FLIP1996-15L(Ibla 1)ILL6209xILL5671	۲۶/۷	MS	۰	M
۹	FLIP 89-63L-3821ILL 4225 / ILL 4605	۱	HR	۶/۷	R	۲۸	ILL 4605 x ADDA 2006-03-0GA-0GA-0GA-11	۳/۳	R	۰	R
۱۰	FLIP 89-71L-3829ILL 4407 / ILL 4605	۸/۳	R	۲	R	۲۹	ILL 6434 x ILL 8008 2006-03-0G-0GA-0GA-11	۲۱/۷	MS	۰	R
۱۱	FLIP 90-25L-3994ILL 5588 / ILL 99	۶	R	۵۳/۳	M	۳۰	ILL 4605 x ADDA 2006-06-0G-0GA-0GA-11	۱۳/۳	MR	۰	S
۱۲	FLIP 92-12L-7177ILL 5582 / ILL 707	۰	HR	۳۹/۷	R	۳۱	ILL 4605 x ILL 6002 2006-02-0G-0GA-0GA-11	۴	R	۰	M
۱۳	FLIP 92-36L-7201ILL 5879 / ILL 5714	۲	R	۳۱	R	۳۲	ILL 7547 x ILL 6211 2006-02-0G-0GA-0GA-11	۳۰	MS	۰	M
۱۴	FLIP 95-30L-7686	۳	R	۵۹	M	۳۳	ILL 7547 x ILL 6002 2006-03-0G-0GA-0GA-11	۲۶/۷	MS	۰	S
۱۵	FLIP 96-15 L-7947ILL-6209 / ILL 5671	۶/۷	R	۷۰/۳	S	۳۴	ILL 6211 x ILL 6002 2006-07-0G-0GA-0GA-11	۲۸/۷	MS	۰	H
۱۶	FLIP 96-46 L-7978	۷/۳	R	۷۱/۷	S	۳۵	FLIP 2005-32L	۴۵/۷	MS	۰	H
۱۷	FLIP 96-50 L-7982	۲۲/۳	MS	۵۳/۳	M	۳۶	FLIP 2005-53L	۳۷/۷	MS	۰	S
۱۸	Bari Masur 4-8006-ILL 5888 / ILL 5782	۵/۷	R	۶۲/۷	S	۳۷	KIMIA	۲۱/۷	MS	۰	H
۱۹	CIFIC-10837	۱۳/۳	MR	۷۶	S	۳۸	Local check	۳۳/۳	MS	۰	H

HR: Highly Resistant; R: Resistant; MR: Moderately Resistant; MS: Moderately Susceptible; S: Susceptible; HS: Highly Susceptible.

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد مرگ و میر گیاهچه ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه

Table 2. Analysis of variance for percentage of dead plants in studied lentil genotypes

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
دوره رشدی (A)	۱	۱۳۵۵۲/۲۱**
ژنوتیپ (B)	۳۷	۲۰۶۴/۲۱۹**
A*B	۳۷	۱۷۵/۷۹۲**
اشتباه	۱۵۲	۲/۱۸۸
ضریب تغییرات (%)		۷/۰۲

** : معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪

جدول ۳- تجزیه واریانس و مقدار LSD برای مقایسه میانگین‌های صفات مورد بررسی ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه

Table 3. Analysis of variance and the amount of LSD for mean comparison for studied traits of lentil promising genotypes

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین	مربعات	میانگین مربعات روز	میانگین مربعات روز	میانگین مربعات روز	میانگین مربعات	تعداد
		ارتفاع بوته	تا رسیدگی	تا رسیدگی	تا رسیدگی	تا رسیدگی	وزن صدانه	دانه در بوته
تنش (A)	۱	۳۸/۷۴۶**	۰/۸۸۴	۱/۱۶۷	۷۲/۷۴۶**	۹/۱۵۵**		
ژنوتیپ (B)	۳۷	۶/۸۵۵**	۶۲۸/۱۰۲**	۵۹۳/۹۵۷**	۴/۱۶**	۱۶۰/۷۱۵**		
A*B	۳۷	۲/۱۵ ^{ns}	۶۵/۷۲ ^{ns}	۲۷/۲۱۵ ^{ns}	۵/۸۱ ^{ns}	۶۹/۱۸ ^{ns}		
اشتباه	۱۵۲	۰/۹	۳/۶۱۹	۲/۴۸۴	۰/۳	۱/۲۷۵		
ضریب تغییرات (%)		۱۱/۸۱	۲/۲	۱/۴۳	۱۱/۵	۸/۱۶		
صفات	درصد مرگ و	ارتفاع بوته	روز تا گلدهی	روز تا رسیدگی	وزن صدانه	تعداد دانه در بوته		
	میر گیاهچه							
LSD مقدار	۱/۹۳	۱/۲۳	۲/۴۸	۲/۰۶	۰/۷۲	۱/۴۷		

** : معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪

جدول ۴- تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص نی و شاخص شانون در پروتئین‌های محلول در آب و نمک

Table 4. Genetic diversity on basis of Nei index and Shanon index in water and salt-soluble proteins

نشانگر	شاخص نی	شاخص شانون
۱	۰/۱	۰/۲۱
۲	۰/۵	۰/۶۹
۳	۰/۴۸	۰/۶۷
۴	۰/۴۹	۰/۶۸
۵	۰/۱۹	۰/۳۴
۶	۰/۴۸	۰/۶۷
۷	۰/۴۶	۰/۶۶
۸	۰/۰۵	۰/۱۲
۹	۰/۴۹	۰/۶۹
۱۰	۰/۴۵	۰/۶۴
۱۱	۰/۰	۰/۰
۱۲	۰/۵	۰/۶۹
۱۳	۰/۱	۰/۲۱
۱۴	۰/۳۳	۰/۵۱
۱۵	۰/۱	۰/۲۱
۱۶	۰/۳۳	۰/۵۱
۱۷	۰/۳۹	۰/۵۸
۱۸	۰/۴۸	۰/۶۷
۱۹	۰/۴۵	۰/۶۴
۲۰	۰/۴۹	۰/۶۹
میانگین	۰/۳۴	۰/۵

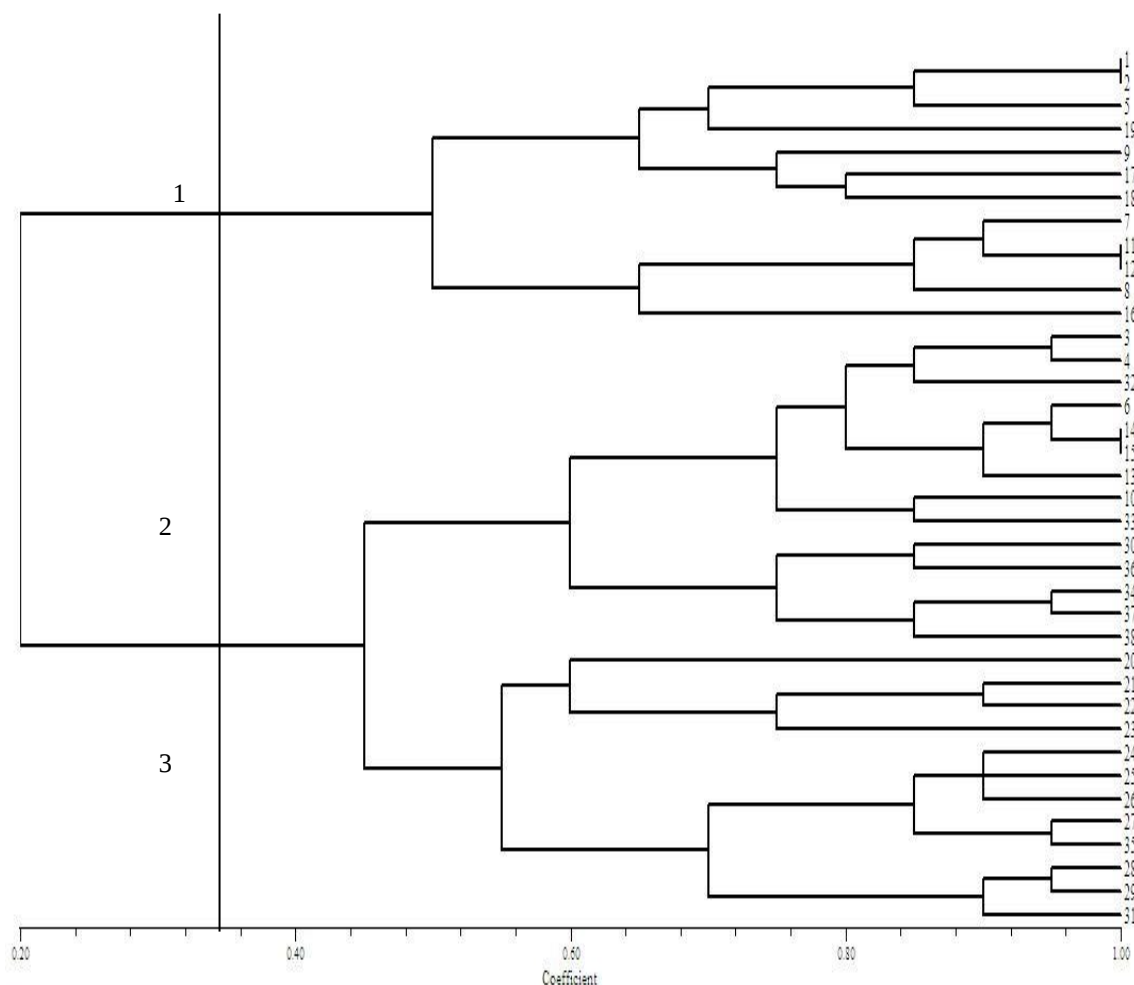
این روش به عنوان روش مکمل تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی و بررسی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها انجام شد. سه مولفه اصلی اول در مجموع ۷۶/۱۰ درصد تغییرات مولکولی بین ژنوتیپ‌ها را تبیین کردند. مولفه اول، دوم و سوم به ترتیب ۴۴/۱۹، ۱۹/۹۶ و ۱۱/۹۴ درصد از تنوع کل را تبیین کرد. نمودار دو بعدی، جهت گروه‌بندی رسم شد که ژنوتیپ‌ها را به سه گروه اصلی تقسیم‌بندی کرد که با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت (شکل ۲).

به منظور بررسی میزان ارتباط داده‌های پروتئینی و صفات مورفولوژیکی، آزمون مانتل با استفاده از ماتریس فاصله برای داده‌های پروتئینی و ماتریس فاصله بر اساس صفات مورفولوژیکی با استفاده از روش توان دوم اقلیدسی انجام شد (Mantel 1967). ضریب همبستگی برای پروتئین‌های محلول در آب و نمک با صفات مورفولوژیکی برابر با ۰/۰۴۳- به دست آمد که با توجه به ضریب آزمون مانتل، معنی‌دار نبود (شکل ۴). به عبارت دیگر، تمایز بین ژنوتیپ‌ها بر اساس هر کدام از نشانگرهای مذکور، متفاوت و مستقل از یکدیگر بودند. از این‌رو به نظر می‌رسد که این دو نوع داده بایستی به عنوان مکمل یکدیگر در ارزیابی ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گیرند. با وجود این، عدم همبستگی معنی‌دار میان اندازه‌گیری‌های تنوع مولکولی و زراعی در گزارش حاضر و سایر گزارش‌های موجود نشان می‌دهد که در برنامه‌های اصلاحی علاوه بر در نظر گرفتن صفات مهم مورفولوژیکی، از صفات مولکولی (در سطح DNA و پروتئین) و روابط بین آن‌ها نیز بهره گرفته شود. کوئبر و همکاران (Koebner et al. 2002) اظهار کرده‌اند که فقدان همبستگی میان تنوع زراعی و مولکولی در گیاهان کشت شده به این دلیل است که ماهیت آن‌ها نامعلوم است و بنابراین یکی از آن‌ها توسط اصلاح کنندگان انتخاب نمی‌شود، در حالی که ممکن است دیگری در معرض انتخاب قرار گیرد.

در تجزیه رگرسیون به روش گام به گام برای نشانگرهای پروتئینی، صفات ارزیابی شده به عنوان متغیر تابع و داده‌های مولکولی (۱ و ۰) به عنوان متغیر ثابت وارد مدل رگرسیونی شدند. با توجه به صفات وارد شده به مدل، مدل‌هایی که مقدار R^2 بالاتری داشتند، مورد بحث و بررسی قرار گرفتند.

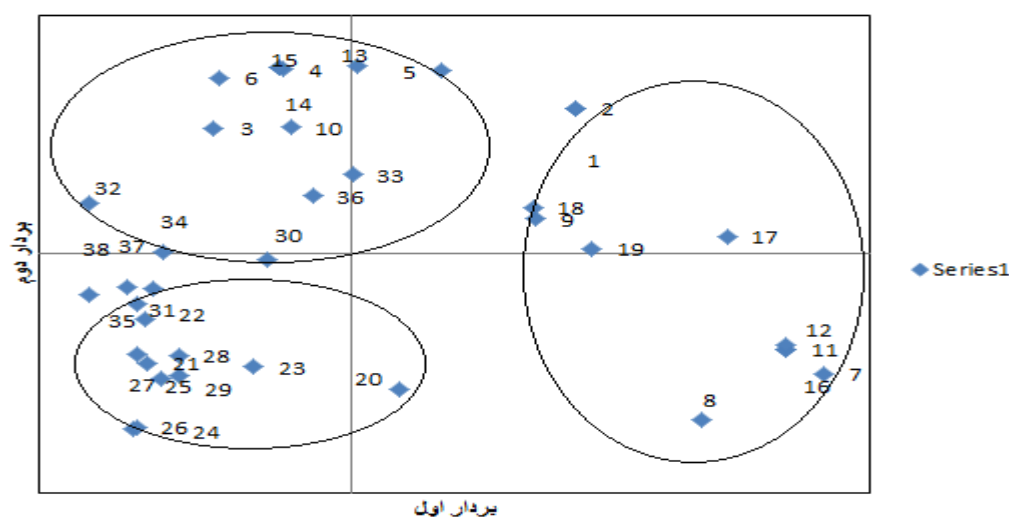
تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تطابق ساده (ماتریس شباهت Simple Matching) صورت گرفت و در نهایت نمودار درختی با روش دورترین همسایه‌ها ترسیم شد (شکل ۱) و مناسب‌ترین گروه‌بندی را نشان داد. مناسب بودن روش تجزیه خوشه‌ای با توجه به معنی‌دار بودن ضریب همبستگی کوفنتیک (۰/۷۳) مشخص شد. نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌های عدس بر اساس پروتئین‌های محلول در آب و نمک، ژنوتیپ‌ها را در سه گروه طبقه‌بندی کرد. در گروه اول ژنوتیپ‌های ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۲، ۱۱، ۹، ۸، ۷، ۵، ۲، ۱ و در گروه دوم ژنوتیپ‌های ۳۸، ۳۷، ۳۶، ۳۴، ۳۳، ۳۲، ۳۰، ۱۵، ۱۴، ۱۳، ۱۰، ۶، ۴، ۳ قرار گرفتند. گروه سوم نیز شامل ۳۵، ۳۱، ۲۹، ۲۸، ۲۷، ۲۶، ۲۵، ۲۴، ۲۳، ۲۲، ۲۱، ۲۰ بود. ماتریس شباهت تطابق ساده نیز محاسبه شد. بیشترین شباهت یا کمترین فاصله ژنتیکی با ضریب تشابه ۱ بین ژنوتیپ‌های (۱) FLIP 90-25L- (۱۱) و L 1278-2580 (۲) ILL 7531 99 / ILL 5588 3994ILL (۱۲) FLIP 92-12L-7177ILL 707 / ILL 5582 وجود داشت. هم‌چنین کمترین تشابه را ژنوتیپ FLIP 84- (۷) ، Gachsaran (۲۱) FLIP 96-46 L-7978 (۱۶) 470 / ILL 883 51L-5722-ILL (۳۲) ILL 7547 x ILL 2006-02-0G-0GA-0GA-11 FLIP 84-51L-5722-ILL (۷) و Local check (۳۸) به میزان ۰/۲ داشتند. این ژنوتیپ‌ها با داشتن کمترین شباهت ژنتیکی، بیشترین فاصله ژنتیکی را از هم دارند. از فاصله ژنتیکی ارقام می‌توان در برنامه‌های دورگ‌گیری به منظور تولید نتاج برتر از والدین استفاده کرد. با ترکیب ژنوتیپ‌هایی که از نظر ژنتیکی بیشترین فاصله را از هم دارند، می‌توان انتظار داشت نتاج نوترکیب هتروزیس جهت انتخاب در برنامه‌های اصلاحی تولید شود. یکی از راه‌های مطمئن برای دستیابی به هتروزیس بالا، استفاده از والدینی با کمترین خویشاوندی است و به طور معمول والدینی با قدرت ترکیب-پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالا تولید کنند.

تجزیه به مولفه‌های هم‌هانگ اصلی براساس داده‌های مولکولی نیز بر پایه ماتریس ضریب تشابه انجام گرفت. این تجزیه در واقع به تقسیم‌بندی افراد در نمودار پراکنش دو یا سه بعدی کمک می‌کند.



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه بر اساس داده‌های مولکولی پروتئین‌های محلول در آب و نمک برای بذور.

Fig. 2. Clustering of lentil promising genotypes based on water and salt-soluble proteins molecular data for seeds.



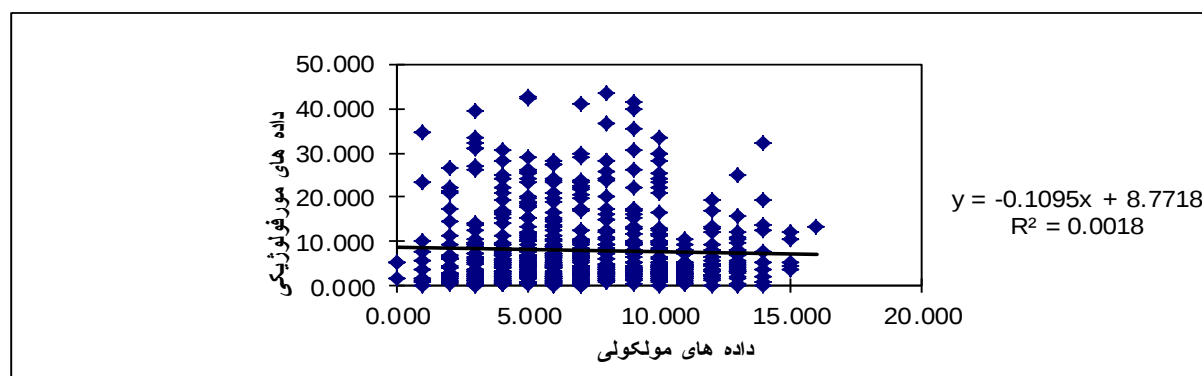
شکل ۳- نمایش دو بعدی ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه براساس سه مولفه هماهنگ اصلی اول نشانگرهای حاصل از داده‌های الکتروفورز SDS-PAGE

Fig. 3. Two-dimensional representation lentil promising genotypes based on three main coordinates of markers of SDS-PAGE electrophoresis data.

به شمار می‌رود. برای شناسایی ارقام مقاوم می‌توان از نشانگرهای مولکولی استفاده کرد که به جایگاه‌های ژنی متصل می‌شوند و بنابراین می‌توان از آن‌ها برای برنامه‌های اصلاحی انتخاب بر مبنای نشانگرها استفاده کرد. علاوه بر این، توسعه سریع روش‌های مولکولی همراه با افزایش دانش نسبت به ساختار و عملکرد ژن‌های مقاومت، توانسته‌اند نقش مهمی در دستیابی به نشانگرهای جدید مولکولی ایفا کنند (Hulbert et al. 2001). تجزیه رگرسیون داده‌های حاصل از پروتئین‌های محلول در آب و نمک با صفات مورفولوژیکی نشان داد که ضریب رگرسیون بین صفات درصد مرگ و میر در هفته چهارم و هشتم با نشانگر ۱۲ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. نشانگرهای ۴ و ۱۲ به دلیل داشتن ارتباط با بیش از یک صفت به عنوان موثرترین نشانگرها شناسایی شدند. به نظر می‌رسد در برنامه‌های اصلاحی برای بررسی مقاومت به این بیماری، علاوه بر در نظر گرفتن صفات مهم مورفولوژیکی، از نشانگرهای پروتئینی نیز می‌توان بهره گرفت. به دلیل وجود ارتباط بین برخی نشانگرهای مولکولی با صفات بررسی شده، توصیه می‌شود پروتئین‌های موثر در کنترل این صفات شناسایی شوند و هم‌چنین پروتئین‌های موثر در مقاومت به بیماری‌ها و ژن‌های رمز کننده این پروتئین‌ها شناسایی شوند. امروزه، استفاده از پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ژن‌های کنترل کننده صفات کمی، فرآیند اصلاح نباتات را تسریع کرده است.

نتایج تجزیه رگرسیون برای پروتئین‌های محلول در آب و نمک با صفات مورفولوژیکی نشان داد که داده‌های پروتئینی با صفات درصد مرگ و میر در هفته چهارم و هشتم، ارتفاع بوته، روز تا گلدهی و روز تا رسیدگی ارتباط معنی‌داری اما تقریباً ضعیف دارند. نشانگر ۴ با صفت روز تا گلدهی و نشانگر ۱۰ با صفت ارتفاع بوته ارتباط مثبت داشتند. هیچ کدام از نشانگرها با صفات تعداد دانه در بوته و وزن صددانه ارتباط نداشتند. در رابطه با نشانگرهای منفی برای همه صفات یک نشانگر منفی وجود داشت. برای این نوع پروتئین‌ها بیشترین میزان ضریب تبیین تصحیح شده (۰/۲۷) برای صفت روز تا رسیدگی و کمترین میزان ضریب تبیین تصحیح شده (۰/۱۰) در صفت روز تا گلدهی مشاهده شد. نشانگرهای ۴ و ۱۲ به دلیل داشتن ارتباط با بیش از یک صفت به عنوان موثرترین نشانگرها شناسایی شدند. ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi et al. 2013) نیز تنوع ژنتیکی تحمل به شوری گیاه کنجد را با استفاده از نشانگرهای پروتئینی مورد ارزیابی قرار دادند که براساس تجزیه‌ی رگرسیون در مجموع، ۲ نشانگر مثبت برای صفات مورفوفیزیولوژیک در سطح شاهد و یک نشانگر مثبت در سطح تنش اول (شوری ۷۵ میلی‌مولار) شناسایی شدند.

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به سه گروه مجزا تقسیم شدند که میانگین درصد مرگ و میر متفاوتی داشتند. مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی به عنوان یکی از راهبردهای اساسی در افزایش تولید محصولات کشاورزی



شکل ۴- نمودار آزمون مانتل با استفاده از ماتریس شباهت حاصل از داده‌های پروتئینی (پروتئین محلول در آب و نمک) و ماتریس فاصله حاصل از صفات مورفولوژیکی در ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه.

Fig. 4. Mantel test charts using a similarity matrix proteins data (water and salt-soluble protein) and distance matrix of morphological traits in lentil genotypes studied.

جدول ۵- ضرایب رگرسیون و ضریب تبیین تصحیح شده در رگرسیون گام به گام بین صفات و نشانگرهای پروتئینی.

Table 5. Regression coefficients and coefficient of determination corrected in stepwise regression between traits and protein markers.

نشانگر	درصد گیاهان مرده در هفته چهارم	درصد گیاهان مرده در هفته هشتم	ارتفاع گیاهان در هفته بوته	روز گلدهی	تا روز رسیدگی	تا تعداد دانه	وزن صدانه
عرض از مبدا	۲۰/۸۸	۳۷/۲۳	۷/۶۱	۹۱/۰۵	۱۱۲/۷۱		
۱							
۲							
۳							
۴			-۱/۰۴*		۱۳/۱۳**		
۵							
۶							
۷							
۸							
۹							
۱۰			۱/۷۵**				
۱۱							
۱۲	-۱۵/۸**	-۱۷/۷۸**					
۱۳							
۱۴							
۱۵							
۱۶							
۱۷							
۱۸							
۱۹					-۱۴/۶۸**		
۲۰				-۱۰/۵*			
R ²	۰/۲	۰/۱۵	۰/۲۴	۰/۱	۰/۲۷		

* و **: به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد و معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد

* and ** significant in $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$

ژرم پلاسما، تسهیل مکان یابی خیلی دقیق QTLها و تایید ژنهای کاندیدای مسوول صفات کمی (Gebhardt et al. 2004). از ژنوتیپهای معرفی شده می توان در برنامه های اصلاح عدس استفاده کرد. این امر، مستلزم مطالعه ژنتیک مقاومت و شناسایی

مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی، دارای کاربردهای متعددی است که برخی از آنها عبارت است از امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپهای خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی، شناسایی اللهای صفت مطلوب در مجموعه های

و مقاوم به تنش‌های زیستی می‌توان به میزان قابل توجهی عملکرد محصول را افزایش داد.

ژن‌های عامل بروز مقاومت در این ارقام است. علاوه بر این، بهتر است واکنش ارقام و لاین‌های بیشتری مورد ارزیابی قرار گیرد تا منابع مقاومت موثرتری شناسایی شود. با کاشت ارقام پرمحصول

منابع

- Bayaa B, Erskine W. 1990.** A screening technique for resistance to vascular wilt in lentil. Arab Journal of Plant Protection 8: 30-33.
- Bayaa B, Erskine W, Singh M. 1997.** Screening lentil for resistance to fusarium wilt: methodology and source of resistance. Euphytica 98: 67-74.
- Behzadi E. 2007.** Electrophoresis of Nucleic Acids, Pajhwok Journal, Year 2, Number 3. (In Farsi with English abstract).
- Boroumand Sh. 2011.** Assessing genetic diversity of traits related to salt tolerance in some lentil cultivars. Master's thesis in plant breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili. (In Farsi with English abstract).
- Davari M, Abrianbana M, Asghari Zakaria R, Arzanlou M. 2012.** Assesment of some wheat cultivars resistance to *Mycosphaerella graminicola* isolates, causal agent of septoriosi in Moghan region. Iranian Journal of Plant Protection Science 43, 379-389. (In Farsi with English abstract).
- Ebrahimi H, Sofalian O, Asghari A, Dezhsetan S, khomari S. 2013.** Assessing genetic diversity of salt tolerance in some sesamum cultivars and their relations with protein markers. Master's thesis in plant breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili. (In Farsi with English abstract).
- Fufa H, Baenziger PS, Beecher B, Dweikati S, Graybosch RA, Eskridge KM. 2005.** Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. Euphytica 145:133-146.
- Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B, Oberhagemann P, Schuler K. 2004.** Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: A case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. Molecular Breeding 13: 93-102.
- Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q. 2001.** Resistance gene complexes: evolution and utilization. Annual Review of Phytopathology 39: 285-312.
- Koebner RMD, Donini P, Reeves J, Cooke RJ, Law JR. 2002.** Temporal flux in the morphological and molecular diversity of UK barley. Theoretical and Applied Genetics 106: 550-558.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lewontin RC. 1972.** The apportionment of human diversity. Evolutionary Biology 6: 381-398.
- Mantel N. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cencer Research, February 27: (2): 209-220.
- Mohammadi N, Mohammadi Goltapeh E, Kari Dolatabadi H, Babaie Ahari A, Pouralibaba HR. 2011.** The genetic diversity of Iranian isolates causing fusarium wilt of Lentil. Journal of Agricultural Technology 7(6): 1809-1822.
- Nei M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy Sciences, USA 70: 3321-3323.
- Payne PI, Lawrece J. 1983.** Catalogue of alleles for the complex gene loci Glu-B1 and Glu-D1 which code for high molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. Cereal Research Communications 11: 29-35.
- Pouralibaba HR, Sabbaghpour SH, Mehraban A, Asghari S. 2008.** Selection of new lentil lines resistant to wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, for Bilehsavar region, Moghan, Seed and Plant 24: 444-429. (In Farsi with English abstract).
- Rubeena R, Taylor WJ. 2003.** Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*). Theoretical and Applied Genetics 107: 910-916.
- Taylor P, Lindbeck K, Chen W, Ford R. 2007.** Lentil diseases. In: S. S.Yadav, D. L. McNeil, and P. C. Stevenson. (eds.). Lentil, an ancient crop for modern times. Springer Publisher, Netherlands 291- 313.
- Zaker Tavallaie F, Bagheri AR, Eskandari MM, Shokouhifar F. 2006.** Genetic diversity among chickpea *Fusarium oxysporum* isolates using RAPD markers. 12th Mediterranean Phytopathology Union congress.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

Correlation of protein markers with the resistance to *Fusarium* wilt in some lentil lines

Samira Hasanian¹, Omid Sofalian^{2*}, Mahdi Davari³, Ali Asghari², Manije Jamshidi⁴

1- Phd student of Plant Breeding, 2- Associate Professor of Agronomy and Plant Breeding Department,

3- Associate Professor of Plant Protection Department, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

* Corresponding author: sofalian@gmail.com

Abstract

In order to assessing the resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lentis* in different genotypes of lentil and its relation to protein markers, a research was programmed using 38 genotypes of lentil in Greenhouse and laboratory conditions. Analysis of studied traits was performed as a factorial experiment with two levels for Factor A (conditions without disease and conditions for disease) and 38 levels (genotypes) for Factor B based on completely randomized design with three replications. Our data showed that the average mortality of plants in the eighth week was more than the fourth week dpi. The mean comparison of studied traits by using LSD test ($p=0.01$) indicated that they are in different demographic groups. According to the results of cluster analysis, genotypes were divided into three groups, which were differed in the average mortality rate. Analysis of water and salt-soluble proteins showed that the average genetic variation for all loci is 0.5 and the average of Shannon index is 0.34. In the SDS-PAGE analysis for seed storage protein, genotypes were divided into three groups in cluster analysis. Regression analysis of data from proteins and water-soluble salt with morphological traits showed that regression coefficient for the average mortality of plants in the fourth and eighth week with marker 12 was significant ($p=0.01$). Markers 4 and 12 because of having ties with more than one trait were identified as the most effective markers. It seems that in breeding programs for resistance to the disease, protein markers can be utilized in addition to morphological traits.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, fusarium wilt of lentil, protein markers, resistance