

اهمیت نسبی و پراکنش اقلیمی قارچ‌های بیماری‌زای همراه ریشه و طوقه لوبیا در مزارع استان لرستان

علی دهقانی^۱، ناصر پنجه‌که^۲✉، مصطفی درویش‌نیا^۳، محمد سالاری^۴ و هادی اسدی‌رحمانی^۴

۱- دانشجوی دکتری تخصصی و عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، خرم‌آباد، ایران؛ ۲- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه زابل، زابل، ایران؛ ۳- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه لرستان، ایران؛ ۴- دانشیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۷)

چکیده

پوسیدگی ریشه و طوقه لوبیا یکی از بیماری‌های مهم و اقتصادی این محصول در جهان است. پراکنش و غالبیت نسبی عوامل قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه لوبیا در مناطق و اقلیم‌های لوبیاکاری استان لرستان ارزیابی گردید. شناسایی بیمارگرهای غالب براساس ریخت‌شناسی پرگنه و ویژگی‌های میکروسکوپی انجام و با استفاده از ژن‌های *TEF1-α* و *β-tubulin* مورد تأیید ملکولی قرار گرفت. فراوانی جدایه‌های قارچی و آزمایش بیماری‌زایی عوامل قارچی نشان داد که *Fusarium solani* با ۳۳/۴۲ درصد، مهم‌ترین عامل پوسیدگی ریشه لوبیا در استان و پس از آن، *Rhizoctonia solani* و *Macrophomina phaseolina* به ترتیب ۲۶/۵۵، ۱۵/۵۵ و ۷/۷۳ درصد از جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند. فراوانی جدایه‌های قارچی در شهرستان‌های سلسله، بروجرد، ازنا، دورود و الیگودرز به ترتیب ۲۴/۵۷، ۱۸/۶۴، ۱۶/۵۸، ۱۵/۲۰ و ۸/۲۵ درصد بود. فراوانی جدایه‌های قارچی به دست آمده در مراحل رشد اولیه، گل‌دهی و غلاف‌دهی میزبان لوبیا به ترتیب ۲۰/۷۰، ۲۶/۳۷ و ۵۲/۹۲ درصد بود. براساس انطباق اقلیمی مناطق نمونه‌برداری، بیشترین فراوانی عوامل قارچی در اقلیم نیمه مرطوب معتدل ارزیابی گردید.

واژه‌های کلیدی: پراکنش اقلیمی، پوسیدگی ریشه، *TEF1-α*، *Fusarium β-tubulin*

Importance and climatic distribution of pathogenic fungi associated with bean root and crown in Lorestan province

A. DEGHANI¹, N. PANJEHKEH²✉, M. DARVISHNIA³, M. SALARI² and H. ASADI RAHMANI⁴

1- Ph.D. student and academic member of Lorestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Khorramabad, Iran ; 2- Associate Professor of Plant Protection Department, University of Zabol, Iran; 3- Associate Professor of Plant Protection Department of Lorestan University, Khorramabad, Iran ; 4- Associate Professor of Soil Biology Research Department, National Iranian Soil and Water Research Institute, Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Abstract

Common bean root rot which is an economically important fungal diseases worldwide. Distribution and relative dominance of the disease was investigated in the farms of the major bean cultivating regions and clima of Lorestan province. The dominant pathogenic fungi were identified based on colony morphology and microscopic characteristics, and then confirmed by molecular technique using *β-tubulin* and *TEF1-α* genes. Frequency of fungal isolate and the pathogenicity tests showed that *F. solani*, with 33.42 % isolation frequency was the most important causal agent of common bean root and crown rot in Lorestan province followed by *F. oxysporum*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* with 26.55, 15.55 and 7.73 %, respectively. Frequencies of root rot pathogens distributed across bean farms of Selseleh, Borujerd, Azna, , Doroud and Aligudarz were 24.57, 18.64, 16.58, 15.20 and 8.25 %. respectively. The frequency of the pathogen isolated from common bean plants at the early growth, flowering and podding stages was 20.70, 26.37 and 52.92 %, respectively. Based on the climate zone parameter, the highest frequency of fungal agents was belonged to semi-humid temperate climate.

Key words: Climatic distribution, *Fusarium*, Root rot, *β-tubulin*, *TEF1-α*

مقدمه

لوبیا با سطح زیر کشت جهانی بیش از ۲۷ میلیون هکتار در سال با میزان تولید سالیانه ۱۱۶ میلیون تن دانه از محصولات مهم جهانی است (FAO, 2015). بر اساس آمار وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۹۵، این گیاه با سطح زیر کشت ۱۰۷۵۱۵ هکتار در ایران از محصولات مهم کشاورزی کشور است. استان لرستان با داشتن شرایط مناسب خاک و اقلیم برای کشت حبوبات، بعد از استان فارس، رتبه دوم را از نظر میزان سطح و تولید لوبیا به ترتیب با سهم ۱۶/۶ و ۱۷/۹ درصدی از کشور، دارا می‌باشد (Ahmadi et al., 2016).

بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا، توسط قارچ‌های خاک‌زاد مختلف از جمله *Fusarium sp.*، *Rhizoctonia solani* و *Pythium sp.* ایجاد می‌شود (Schwartz et al., 2005). لوبیا در شرایط نامطلوب و تنش محیطی، به‌طور شدیدتری به‌ویژه در مراحل اولیه رشدی و گل‌دهی از جانب عوامل پوسیدگی ریشه دچار خسارت می‌شود (Hall, 1996؛ Harveson et al., 2005).

خسارت ناشی از پوسیدگی ریشه لوبیا بسته به شرایط بین ۱۰ تا ۱۰۰ درصد می‌باشد (Schwartz et al., 2005) و از چالش‌های امنیت غذایی در جهان محسوب می‌شود (Mecedo et al., 2017). در ایران نیز کاهش عملکرد ناشی از بیماری در استان مرکزی ۳۴ درصد (Lak, 2016) و زنجان تا ۶۵ درصد (Naseri, 2008) ارزیابی شده است. عدم رعایت تناوب زراعی و نامناسب بودن مراحل داشت محصول باعث ایجاد خسارت قابل توجه بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا به محصول می‌شود. عوامل مهم این بیماری در ایران قارچ‌های فوزاریوم، ریزوکتونیا و ماکروفومینا گزارش شده و در مجموع عامل اصلی و غالب در گزارشات مناطق مختلف جهان و ایران، گونه *Fusarium solani* و در مواردی *Fusarium oxysporum* معرفی شده است (Naseri, 2008؛ Safarloo and Hemmati, 2014؛ Edel-; Hermann et al., 2002؛ Estevez de Jensen et al., 2015). پوسیدگی خشک فوزاریومی ریشه لوبیا به‌عنوان عامل مهم خسارت به این محصول در کشورهای آمریکا

(Harveson et al., 2005)، ترکیه (Erper et al., 2008)، استرالیا (Brien et al., 1991)، کنیا (Mwangi Ombi et al., 2007)، نبراسکا (Steadman et al., 1975)، کانادا (Hall and Phillips, 1992) و همچنین در برخی مناطق داخل کشور شامل استان‌های مرکزی (Lak, 2003)، زنجان (Naseri, 2008) و چهارمحال بختیاری (Ershad, 2010) معرفی شده است. یکی از ضرورت‌های پژوهشی در زمینه زیست اقلیم و آینده‌پژوهی عوامل پوسیدگی ریشه، بررسی جامع در یک مکان مشخص، به‌جای پژوهش در پراکنش عوامل بیمارگر در سطح وسیع و کلی است (Mecedo et al., 2017). گزارشی از اهمیت و پراکنش قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه و طوقه در استان لرستان وجود ندارد. موقعیت این استان در زاگرس میانه و بین مناطق سرد و گرم کشور با تنوع اقلیمی و اکولوژیکی (Seidi et al., 2013) بیانگر اهمیت و ضرورت این پژوهش است. استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به‌عنوان یک ابزار کارآمد جهت شناسایی بیمارگرهای گیاهی (Vincelli and Tisserat, 2008) به‌طور فزاینده‌ای در طی سالیان اخیر به کار گرفته شده است. بر اساس منابع موجود روش معمول جهت تفکیک *F. solani* به‌وسیله PCR انجام شده و روش‌های نوین ملکولی مبتنی بر ترادف ژن‌های ITS، rDNA و TEF1- α در منابع معدودی مورد استفاده قرار گرفته است (Khodaghali et al., 2013؛ Arif et al., 2012؛ Saremi and Saremi, 2013). این پژوهش با هدف تعیین غالبیت نسبی عوامل قارچی بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه لوبیا، پراکنش در شهرستان‌ها، مراحل رشدی و اقلیم‌های استان و بررسی ملکولی عوامل غالب انجام شد.

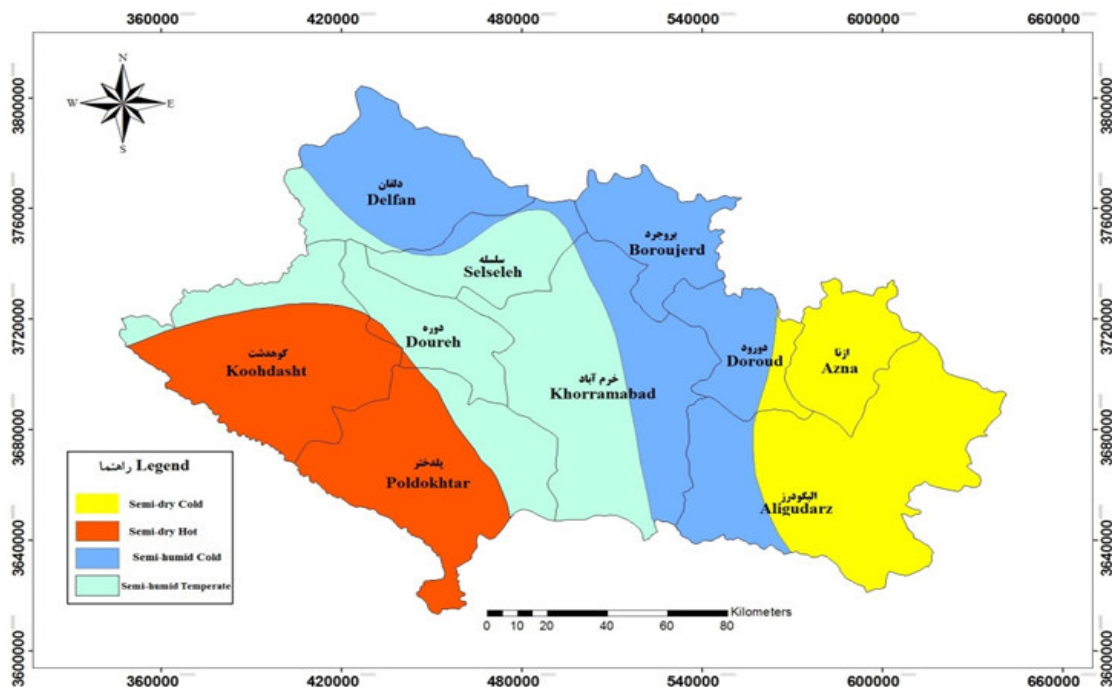
روش بررسی

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها

نمونه برداری از مناطق عمده کشت لوبیا در استان لرستان شامل شهرستان‌های ازنا، الیگودرز، سلسله، بروجرد و دورود که دارای سابقه آلودگی بودند، در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴

قطعات مجدداً با آب سترون شسته شد و سپس با کاغذ خشک‌کن واتمن رطوبت‌گیری و بر اساس روش‌های ارائه شده، محیط کشت‌های عمومی سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA)، آرد ذرت-آگار (CMA) و برای موارد مشکوک به شبه‌فارچ‌های اوومیسیت، محیط کشت اختصاصی، تهیه و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد (Dhingra and Sinclair, 1995; Singelton *et al.*, 1993). برای جلوگیری از رشد باکتری از اسید لاکتیک ۲۵ درصد به میزان یک میلی لیتر در هر لیتر محیط کشت پس از خنک شدن حرارت آن تا ۵۰ درجه سلسیوس افزوده شده و در تشتک‌های پتری ریخته شد. قطعات بافتی در زیر هود سترون در محیط‌های مربوطه کشت داده شدند. از چهار قطعه کشت شده از هر بوته، دو قطعه با روش تک‌اسپور و دو قطعه با روش نوک‌ریسه در مراحل جداسازی و خالص‌سازی متوالی و نگهداری در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت.

به عمل آمد. و در هر شهرستان با اقلیم مشخص (شکل ۱) سه مزرعه با مساحت تقریبی یک هکتاری و فاصله حداقل ۱۰ کیلومتر از یکدیگر انتخاب شد. بر اساس مراحل اصلی رشد لویسا (Van Schooven and Pastor-Corrales, 1987)، نمونه‌برداری در سه مرحله رشد اولیه، گل‌دهی و غلاف‌دهی که حدوداً هم‌زمان با ماه‌های تیر، مرداد و شهریور بود انجام شد. برای نمونه‌برداری با استفاده از کادر یک متر مربعی و حرکت پیمایشی در قطر مزرعه سه بار کادر اندازی و از بوته‌های مشکوک و دارای علائم بیماری در هر کادر سه بوته انتخاب (Mila *et al.*, 2004; Naseri, 2013) و پس از انتقال به آزمایشگاه ریشه‌های آن‌ها زیر جریان ملایم آب شستشو داده شد. از هر بوته چهار قطعه ۱-۰/۵ سانتی‌متری از مرز بافت آلوده و سالم ریشه‌ها تهیه و سپس برای سترون کردن سطح بافتی به مدت ۲-۳ دقیقه در هیپوکلریت سدیم تجاری دو درصد قرار داده شد. برای حذف باقیمانده هیپوکلریت سدیم،



شکل ۱- نقشه شهرستان‌ها و پهنه بندی اقلیمی استان لرستان (Zand, 2016)

Fig. 1- Counties and climatic zonation map in Lorestan province.

تعیین غالبیت نسبی عوامل قارچی

غالبیت نسبی گونه‌های قارچی جدا شده به صورت درصد هر جدایه قارچی از کل جدایه‌ها محاسبه گردید. برای محاسبه آماری و مقایسه‌های بین عوامل قارچی، شهرستان‌ها و مراحل نمونه‌برداری و اقلیم‌ها، جهت تشخیص نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلمواسمیرنوف استفاده شد. آزمون نرمال، بیانگر عدم توزیع نرمال داده‌ها بود و اقدام به نرمال کردن داده‌ها شد. با توجه به چولگی داده‌ها و وجود عدد صفر (فقدان عامل قارچی در نمونه) ابتدا به داده‌ها یک واحد اضافه ($x+1$) و سپس برای نرمال کردن داده‌ها از لگاریتم طبیعی ($\log x + 1$) استفاده گردید (Rezaee, 1995). به منظور تحلیل داده‌ها در محیط نرم‌افزار آماری SPSS, version 22 تجزیه واریانس با استفاده از آنالیز یک طرفه به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و سپس آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید. در خصوص جدایه‌های اندام‌های گیاهی ریشه و طوقه از آزمون تی استفاده شد.

شناسایی بیمارگرها بر اساس صفات ریخت‌شناسی

شناسایی عوامل قارچی مختلف بسته به گروه قارچی، با استفاده از کلیدها و منابع معتبر انجام شد. بدین منظور برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم، از محیط کشت آب-آگار-برگ میخک (CLA)، ویژه آگار (SNA) و کلرید پتاسیم (KCl) استفاده شد (Nelson et al., 1983; Gerlach and Nirenberg, 1982; Bergess et al., 1994; Lesli and Summerell, 2006). برای شناسایی گونه‌های ریزوکتونیا، فیتوفتورا، پیتیوم، ماکروفومینا و قارچ‌های دیگر از کلیدها و منابع معتبر استفاده گردید (Sneh et al., 1991; Ershad, 1992; Singelton et al., 1993).

آزمایش بیماری‌زایی جدایه‌ها

با توجه به تعداد زیاد جدایه‌های قارچی بدست آمده از مزارع استان، فقط گونه‌های عمده قارچی شامل *F. solani*، *F. oxysporum*، *M. phaseolina* و *R. solani*، مورد بررسی بیماری‌زایی قرار گرفتند و برای این منظور از هر گونه قارچی، تعداد ۲۰ جدایه به طور تصادفی انتخاب گردید.

برای تهیه خاک بستر از خاک زراعی با بافت لومی استفاده شد. این خاک در دومرحله با فاصله ۲۴ ساعت، در آن با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت سترون شد. در آزمایش‌های بیماری‌زایی از گلدان‌های پلاستیکی با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر و از لوبیای رقم اختر استفاده گردید. تهیه زادمایه برای آزمون بیماری‌زایی قارچ‌های فوزاریوم، به روش خاک آلوده به قارچ عامل بیماری (Pan and More, 1996) و روش غوطه‌ور کردن ریشه گیاهچه دو برگی در سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر (Dhingra & Sinclair, 1995) انجام شد.

برای تهیه خاک آلوده مخلوط ماسه-آرد ذرت با نسبت وزنی ۹۵ به ۵ داخل فلاسک ریخته و در اتوکلاو سترون شد. دو قطعه محیط کشت ۷ روزه قارچ به هر ارلن افزوده و به مدت چهار هفته برای کلنیزه شدن توسط قارچ در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. دو سوم حجم پایینی هر گلدان با خاک سترون و یک سوم باقیمانده با اختلاط خاک سترون و مخلوط ماسه-آرد ذرت کلونیزه شده به وسیله قارچ، با نسبت ۹ به ۱ پُر شد. به گلدان‌های شاهد، از مخلوط ماسه-آرد ذرت سترون عاری از مایه قارچ اضافه شد. در مورد قارچ ریزوکتونیا از روش بذور گندم آلوده شده به قارچ و قرار دادن ۲-۳ بذر آلوده به مجاورت ریشه گیاهچه و در مورد قارچ ماکروفومینا از روش بذر برنج آلوده به قارچ و افزودن بذور خُرد شده در اطراف ریشه گیاهچه استفاده شد (Cardona and Mishereh et al., 2008; Sneh et al., 1996; Rodriguez, 2006).

گلدان‌ها در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری و هر سه روز یکبار آبیاری شدند. بذره‌های لوبیا رقم اختر ضد عفونی سطحی و تعداد سه بذر در هر گلدان، در عمق یک سانتی متری کشت شد. کوددهی گلدان‌ها به همراه آب آبیاری به صورت هفتگی با ترکیب کودی سدیم-پتاسیم-فسفر (۲۰:۲۰:۲۰) با غلظت ۲۵۰۰ پی پی ام انجام شد (Bilgi et al., 2008). به منظور ارزیابی و مقایسه بیماری‌زایی جدایه‌ها،

پتاسیم ۹ pH)، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، ۰/۲ میکرومولار از هر آغازگر، ۲/۵ میلی‌مولار از MgCl₂ و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به همراه مقدار ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده با غلظت دو نانوگرم بود. آب دوبار تقطیر سترون به عنوان کنترل منفی به جای DNA استفاده شد. تعداد ۳۲ سیکل حرارتی با دمای ۹۴°C (۵ دقیقه و ۴۵ ثانیه)، ۵۲°C (۴۵ ثانیه) و ۷۲°C (۱۲ دقیقه) به ترتیب برای واسرشت شدن، اتصال و بسط DNA در نظر گرفته شد (Cook et al., 2000). محصول حاصل از واکنش PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در دستگاه الکتروفورز Bio-Rad با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد.

تعیین توالی محصول PCR

محصول PCR حاصل، با استفاده از کیت the Accuprep® PCR purification (Roche Molecular Biochemicals) بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت خالص سازی شد. تعیین توالی محصول PCR توسط آزمایشگاه تعیین توالی Bioneer (کره جنوبی) در هر دو جهت انجام شد. اطلاعات مربوط به توالی توسط نرم افزار Vector NTI V.10 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. توالی‌های DNA به دست آمده در این مطالعه با توالی‌های یکسان ثبت شده در Gen Bank با استفاده از دستورالعمل standard nucleotide BLAST protocol (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) مقایسه شدند.

نتیجه و بحث

نمونه برداری و شناسایی مورفولوژی جدایه‌ها: در همه مراحل رشدی لوبیا و در زمان نمونه برداری، نشانه‌های بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه مشاهده گردید. مجموعاً از ریشه و طوقه گیاهان لوبیا دارای نشانه‌های پوسیدگی ریشه و طوقه، تعداد ۱۱۶۴ جدایه قارچی به دست آمد. عوامل قارچی عمده جدا شده که در اکثریت مزارع مشاهده شد *Fusarium* spp.

میزان وقوع بیماری پس از هفته سوم و ظهور گیاهچه‌ها، با بروز نشانه‌های بیماری روی ریشه، طوقه و اندام‌های هوایی ثبت شد. آزمون بیماری‌زایی برای ۲۰ جدایه از هر یک از گونه‌های عمده ذکر شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. با توجه به این‌که گونه‌های فوزاریوم و ماکروفومینا جهت بیماری‌زایی وابسته به تنش رطوبتی هستند (Nelson et al., 1983؛ Bease-Fernandez et al., 2006) در طول دوره رشدی گیاهان سه مرتبه تحت تنش رطوبتی قرار گرفتند.

شناسایی بیمارگر با استفاده از روش‌های مولکولی

استخراج DNA

هر جدایه در محیط کشت مایع PDB کشت شد. میسلیوم‌های جمع‌آوری شده به مقدار ۰/۵ گرم، درون ازت مایع و با استفاده از هاون چینی کاملاً پودر و در داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. استخراج DNA به روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) با اندکی تغییرات انجام شد (Doyle, 1987).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

جهت تأیید شناسایی عوامل بیماری‌زای قارچی غالب *Fusarium solani* و *F. oxysporum* ژن‌های *TEF-1a* و *β-tubulin* آن‌ها تعیین توالی شد (O'Donnell et al., 1998؛ Kari Dolatabad et al., 2017). تکثیر نواحی مورد نظر با استفاده از ترموسایکلر C-1000 (Techne, Genius FGEN02TP, USA) انجام شد. برای تکثیر ژن *TEF-1a* در نمونه‌های قارچی، از آغازگرهای اختصاصی بالادست EF1 (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') و پایین دست EF2 (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') و برای تکثیر ژن *β-tubulin* از آغازگرهای بالادست Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') و پایین دست Bt2b (5'-ACCCTCAGTGATGACCCTTGGC-3') استفاده شد (Glass and Donaldson, 1995؛ O'Donnell et al., 1998). مخلوط هر واکنش (۵۰ میکرولیتر) شامل بافر PCR ۲x (۱۰ میلی‌مولار تریس-اسیدکلریدریک و ۵۰ میلی‌مول کلرید

به قهوه‌ای تیره، اندکی متمایل به قرمز بود. ریشه‌های قارچ به تدریج قهوه‌ای و تیره با انشعابات عمودی و قطر ۴-۱۰ میکرومتر مشاهده گردید. در هفته دوم سختینه‌های فراوان به اشکال نامنظم در سطح آگار تولید شد که ابتدای تشکیل، سفید رنگ و به تدریج به رنگ قهوه‌ای مایل به خاکستری یا قهوه‌ای تیره در آمدند. در این تحقیق قارچ *R. solani* دو نوع سختینه مشاهده شد، نوع اول پُر تعداد و کروی تا بیضوی در کنارهای پرگنه، به قطر ۰/۵-۱/۴ × ۰/۳-۲ میلی‌متر و نوع دوم معمولاً کروی بر روی سختینه‌های نوع اول و به ابعاد بزرگ‌تر ۰/۵ × ۰/۵ - ۰/۵-۴/۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. مشخصات قارچ جداشده با قارچ *Rhizoctonia solani* Kuhn، یا به عبارتی mycelial state of *Thanatephorus cucumeris* (Frank) (Donk) مطابقت داشت (Domsch et al., 1980).

آزمایش بیماری‌زایی جدایه‌ها: گیاهان مایه‌زنی شده با چهار گونه غالب، نشانه‌های مشابه با نشانه‌های بیماری مشاهده شده در مزرعه را برای هر بیمارگر نشان دادند. نشانه‌های مشاهده شده ناشی از مایه‌زنی قارچ‌های *F. solani* و *F. oxysporum* شامل زردی، پژمردگی گیاه، پوسیدگی در ناحیه ریشه و تغییر رنگ قهوه‌ای روشن بافت‌های آوندی ریشه بود که در خصوص گونه *F. solani* نشانه‌های مشخص پوسیدگی خشک، همراه با ترک‌های طولی در ریشه اصلی ایجاد گردید. تغییر رنگ در بافت‌های داخلی ریشه‌ها به خاکستری تا سیاه زغالی ناشی از تشکیل میکرواسکلروت‌های فراوان در بافت‌های داخلی، سیاه شدن سطح بافت ریشه‌ها و زردی برگ‌ها در اثر *M. phaseolina* مشاهده شد. بروز لکه‌های نکروزه و فرورفتگی بافتی یا شانکرهای قرمز و قرمز مایل به قهوه‌ای تا سیاه، و امتداد آن‌ها از نواحی زیر طوقه و یا ریشه اصلی تا محل انشعابات ریشه‌های فرعی از اصلی و نشانه‌های زردی و پژمردگی ناشی از قارچ *R. solani* ملاحظه گردید.

آزمایش مقدماتی بیماری‌زایی جدایه‌های فوزاریوم در شرایط گلخانه از ثبات نسبی دما و رطوبت در مقایسه با سطح مزرعه برخوردار بود و وقوع آلودگی پوسیدگی ریشه

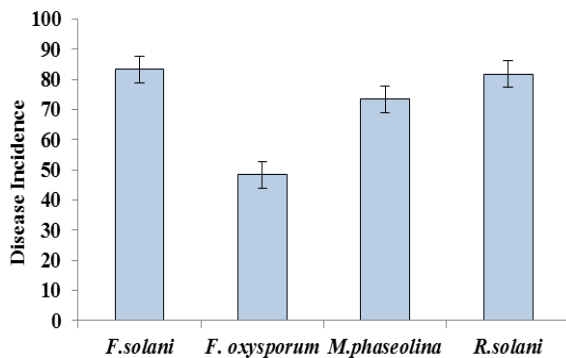
Rhizoctonia solani و *Macrophomina phaseolina* با مشخصات زیر بودند.

ریخت‌شناسی *F. solani* و مقایسه با *F. oxysporum*: قارچ *F. solani* روی محیط کشت PDA با سرعت رشد کرده و با تولید پرگنه عمدتاً به رنگ کرم و گاهی صورتی تا بنفش کمرنگ و رشد میسلیمی تُنک، پراکنده، ریشه هوایی سفید، همراه با دواير رشدی پنبه‌ای مشاهده گردید. اسپورودوکوم فراوان و کرم رنگ، ماکروکنیدیوم سوسیسی شکل (با نوک پخ از هر دو طرف) دارای ۳-۴ دیواره عرضی، میکروکنیدیوم فراوان و ۱-۲ سلولی (در کشت‌های ۴-۵ روزه)، بیضوی تا لوبیایی شکل تجمع یافته در سرهای دروغین (False heads)، میکروکنیدی بر بلند به طول ۲۵-۳۸ میکرومتر (وجه تمایز مهم از گونه *F. oxysporum* با طول میکروکنیدی بر ۹-۱۳ میکرومتر) بود و در کشت‌های ۱۰ روزه به بعد کلامیدوسپور فراوان بصورت‌های تکی یا زنجیری، انتهای ریشه یا بین‌ریشه‌ای تولید کرد. مشخصات قارچ جداشده با قارچ *F. solani* (Mart.) *f.sp. phaseoli* (Burk) Synd. and Hans. (Booth, 1971; Burgess et al., 1994; Leslie & Summerell, 2006).

ریخت‌شناسی قارچ *M. phaseolina*: با استفاده از محیط کشت PDA در ابتدا کلنی سفید تا خاکستری بدون ریشه‌های هوایی و بعد از ۷ تا ۱۰ روز زیر تشک پتری به رنگ کاملاً تیره مشاهده و میکرواسکلروت‌های سیاه‌رنگ فراوان تولید شد. از برخی جدایه‌های قارچ عامل بیماری روی قطعات گیاهچه لوبیا در محیط کشت آب-آگار، پیکنیدیوم‌های سیاه‌رنگ به قطر ۱۱۰-۱۴۵ میکرومتر و کنیدیوم‌های شفاف بیضوی شکل به ابعاد ۲۰-۱۵ × ۱۰-۵ میکرومتر تولید شد. مشخصات قارچ جداشده از نمونه‌ها با قارچ *Macrophomina phaseolina* (Holliday and Punithalingam, 1970) مطابقت داشت.

ریخت‌شناسی قارچ *R. solani*: در این قارچ، میسلیم به صورت چسبیده به سطح محیط کشت با رشد هوایی بسیار کمی تولید گردید. پرگنه در اوایل رشد اغلب بی‌رنگ تا سفید و کرمی مشاهده می‌شد و رنگ زیر تشک در هفته دوم مایل

جدایه 13C9 براساس ژن‌های *TEF1-α* و *β-tubulin*، به میزان ۹۹ درصد با *F. solani* به ترتیب با کدهای دسترسی KP400743 و KT374270 در پایگاه NCBI تشابه داشت. همچنین جدایه 13R2 بر اساس ژن‌های *TEF1-α* و *β-tubulin*، به میزان ۹۹ درصد با *F. solani* به ترتیب با کدهای دسترسی LN827998 و KT374270 در پایگاه NCBI تشابه نشان داد. جدایه 14R12 نیز بر اساس ژن‌های *TEF1-α* و *β-tubulin* به میزان ۹۹ درصد با *F. solani* به ترتیب با کدهای دسترسی KR935896 و KT374270 در پایگاه NCBI مشابهت داشت. جدایه 23R5 نیز که جدایه برتر گونه *F. oxysporum* در آزمایش بیماری‌زایی بود، براساس ژن‌های *TEF1-α* و *β-tubulin*، به میزان ۹۹ درصد به ترتیب با کدهای دسترسی KY009876 و KY498526 در پایگاه NCBI تشابه داشت. تفاوت جزئی تشابهات در جدول ۱ را می‌توان ناشی از چالش عمده این قارچ‌های فوزاریوم از نظر کمپلکس گونه‌ای، تنوع ژنوم، هتروتالیسم قارچ و یا پویایی جمعیتی ناشی از تنوع اقلیمی بیان نمود (Zhang *et al.*, 2006; O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 2015).



شکل ۲- میزان وقوع بیماری توسط جدایه‌های قارچی مختلف روی گیاه زراعی لوبیا. خطای معیار میانگین‌ها نشان داده شده است.
Fig. 2. Disease incidence caused by fungal isolates on common bean. Means error showed by standard error.

تعیین غالبیت نسبی عوامل قارچی: در مجموع، گونه‌های عمده قارچی به دست آمده *F. solani*، *F. oxysporum*

فوزاریومی و ماکروفومی‌نایی به ندرت رخ داد. منابع مختلف وابستگی این قارچ‌ها به تنش‌های رطوبتی برای بیماری‌زایی و اهمیت وجود تنش خشکی به منظور وقوع بیماری را یادآور شده‌اند (Nelson *et al.*, 1983; Saremi *et al.*, 2011; Naseri and Mousavi, 2015) و تنش خشکی را مهم‌ترین عامل پیش‌آمدگی در بیماری‌زایی و خسارت قارچ *F. solani* (Amanifar *et al.*, 2017) بیان نموده‌اند. تنش خشکی می‌تواند باعث افزایش میزان کلینزاسیون ریشه توسط جدایه‌های *F. solani* و در نتیجه افزایش شدت بیماری‌زایی این جدایه‌ها گردد (Salagegheh *et al.*, 2014).

در خصوص قارچ *F. oxysporum* همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود فراوانی نسبی جدایه‌های بیمارگر ۴۸/۳۳ درصد ارزیابی شد. ملاحظه می‌گردد با وجودیکه در شرایط آزمون بیماری‌زایی مشابه آنچه در خصوص جدایه‌های *F. solani* انجام و تنش رطوبتی نیز وارد شد، اما کمتر از نصف جدایه‌ها ایجاد بیماری کردند که به نظر می‌رسد جمعیت قابل توجهی از این گونه قارچی، خاصیت غیربیماری‌زا و یا اندوفیتی در گیاه داشته باشند (Dhingra *et al.*, 2006) و یا مربوط به تغییرپذیری زیاد در این گونه قارچی باشد (Werner and Irzykowska, 2007). براساس پژوهش‌های مختلف وقوع بیماری ناشی از قارچ ماکروفومینا نیز به واسطه عوامل گوناگون اکولوژیکی و فیزیولوژیکی افزایش می‌یابد (Guler Guney and Guldur, 2018) و در مناطق کم‌آب جهان باعث بیماری ساق سیاه می‌شود (Das *et al.*, 2008). بنابراین در طول دوره بررسی گلخانه‌ای سه مرتبه تنش خشکی اعمال گردید و نتایج ارائه شده در شکل ۲ به دست آمد.

تعیین توالی و بررسی خصوصیات ناحیه rDNA-ITS

بررسی‌های مولکولی جهت تأیید شناسایی عوامل غالب بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه لوبیا شامل دو گونه *F. solani* و *F. oxysporum* که در آزمایشات بیماری‌زایی، برتری نشان دادند با استفاده از ژن‌های *B-tubulin* و *TEF1-α*، بیانگر تشابه ژنتیکی بالایی بود (جدول ۱).

براساس مقایسه میانگین جدایه‌ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن، بیشترین فراوانی مربوط به قارچ‌های *F. solani* و *F. oxysporum* بود (شکل ۳) و جدایه‌های این دو گونه به‌طور معنی‌داری بیشتر از گونه‌های دیگر بود.

گزارش‌های برخی مناطق دیگر داخل کشور نیز مؤید غالبیت گونه *F. solani* در وقوع بیماری پوسیدگی ریشه لوبیاست (Saremi and Ershad, 2010; Naseri, 2008; Lak, 2003). در پژوهش‌های مختلف در جهان نیز گونه‌های فوزاریوم عامل غالب بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه لوبیا گزارش شده‌اند که تنش‌های محیطی و اقلیمی در

M. phaseolina و *R. solani* به ترتیب ۳۸۹، ۳۰۹، ۱۸۱ و ۹۰ جدایه و سایر گونه‌های با تعداد کم نیز ۱۹۵ جدایه بود. قارچ *F. solani* با فراوانی ۳۳/۴۲ درصد را به خود اختصاص داد و به عنوان گونه غالب در وقوع پوسیدگی ریشه لوبیا در استان تعیین گردید (شکل ۳). فراوانی قارچ‌های عمده بعدی *Rhizoctonia solani* و *Macrophomina phaseolina* *F. oxysporum* به ترتیب ۲۶/۵۵، ۱۵/۵۵ و ۷/۷۳ درصد از جدایه‌ها و فراوانی مجموع سایر گونه‌ها ۱۶/۷۵ درصد بود. همان‌طور که در جدول شماره ۲ تجزیه واریانس مشخص شد بین گروه‌های آماری در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

جدول ۱- شناسایی ملکولی جدایه‌های غالب فوزاریوم جدا شده از لوبیا بر اساس ژن‌های *TEFI-α* و *β-tubulin*

Table 1. Molecular identification of dominant *Fusarium* isolates from common bean based on *TEFI-α* and *β-tubulin* ¹NCBI: National Center for biotechnology information.

Isolate	Mycobank		NCBI ¹		
	<i>TEFI-α</i> و <i>β-tubulin</i>	<i>TEFI-α</i>	Similarity	<i>β-tubulin</i>	Similarity
13C9	99%	<i>Fusarium solani</i>	99%	<i>Fusarium solani</i>	99%
13R2	100%	<i>Fusarium solani</i>	99%	<i>Fusarium solani</i>	99%
14R12	99%	<i>Fusarium solani</i>	99%	<i>Fusarium solani</i>	99%
23R5	100%	<i>Fusarium oxysporum</i>	99%	<i>Fusarium oxysporum</i>	99%

جدول ۲- تجزیه واریانس جدایه‌های قارچی از مراحل رشدی در مزارع لوبیای شهرستان‌های مختلف استان لرستان

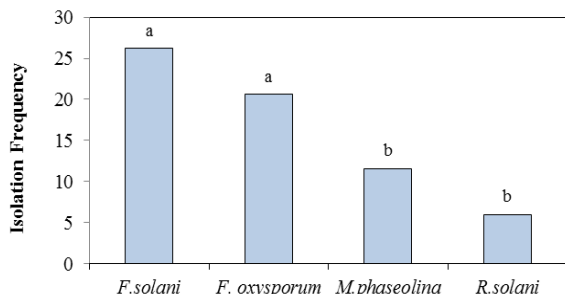
Table 2. Analysis of variance of fungal isolates from growth stages in common bean farms of Lorestan province counties.

Factor	Df	SS	MS	F
Fungus	3	1831.292	610.431	19.418**
County	4	792.5	198.137	6.303**
Stage	2	1691.5	845.7	26.904**
Part of plant	1	1740.4	1740.4	55.363**
Fungus × County	12	942.2	78.5	2.498**
Fungus × Stage	6	749.8	124.98	3.976**
County × Stage	8	454.6	56.831	1.808 ^{n.s.}
Fungus × Part of plant	3	932.7	310.919	9.891**
County × Part of plant	4	185.5	46.388	1.476 ^{n.s.}
Stage × Part of plant	2	302.1	151.058	4.805**
Fungus × County × Stage	24	720.950	30.04 ^{n.s.}	0.956 ^{n.s.}
Fungus × Stage × Part of plant	6	185.417	30.903 ^{n.s.}	0.983 ^{n.s.}
County × Stage × Part of plant	8	155.55	19.444 ^{n.s.}	0.619 ^{n.s.}
Error	36	31.436		
Total	119			

* بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و ** بیانگر اختلاف در سطح یک درصد بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن است.

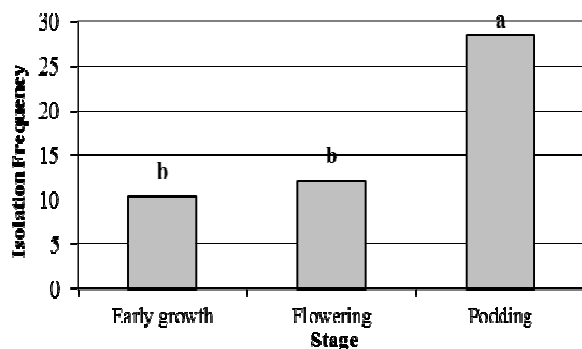
* and ** Indicate no significant difference at the 5% and 1% level based on Duncan's mean comparison test

فراوانی جدایه‌های قارچی حاصل از اندام‌های ریشه و طوقه لوبیا نیز به ترتیب ۷۳/۲۳ و ۲۶/۷۶ درصد از کل جدایه‌ها بود که مقایسه آماری و تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها به صورت کلی در شکل ۷ و مقایسه مراحل و شهرستان‌های مختلف در شکل ۸ ارائه گردیده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، روند حاکم بر تغییرات فراوانی جدایه‌های طوقه و ریشه در مراحل رشدی، سیر افزایشی است.



شکل ۳- مقایسه میانگین جدایه‌های قارچی. وجود حداقل یک حرف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن است. داده‌ها میانگین مراحل مختلف نمونه‌برداری در شهرستان‌های مختلف است.

Fig. 3. Comparison of the average of fungal isolates. The presence of one common letter at least, indicates no significant difference at the 5% level based on Duncan's mean comparison test. Data is the average of different sampling stages in different counties .

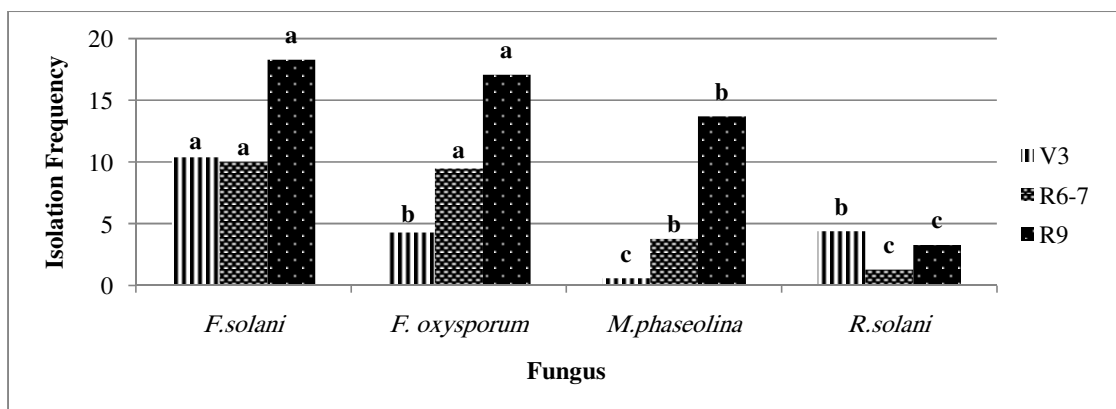


شکل ۴- مقایسه میانگین تعداد کل جدایه‌های قارچی برای مراحل مختلف رشدی لوبیا. وجود حداقل یک حرف مشترک گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن است. داده‌ها میانگین مناطق مختلف نمونه‌برداری است.

Fig. 4. Comparison of the total number of fungal isolates for different growth stages of beans. The presence of at least one common letter indicates no significant difference at the 5% level based on Duncan's mean comparison test. Data is the mean of different sampling areas.

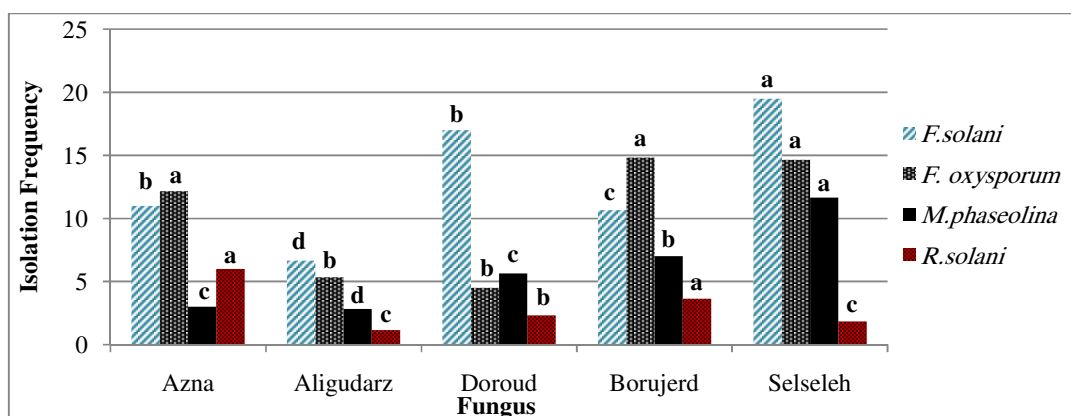
تشدید خسارت دخیل بوده‌اند (Estevez de Jensen *et al.*, 2002) در پژوهش ادل و همکاران (Edel-Hermann *et al.*, 2015) قارچ *F. oxysporum* بیشترین فراوانی را نشان داد و بعد از آن *F. solani* قرار داشت. ردیابی، جداسازی‌ها و تفکیک کلونی‌ها در طول تحقیق نشان داد که عوامل قارچی به صورت توأم نیز در بوته‌های آلوده، به فراوانی مشاهده شده و همراهی دو قارچ *F. oxysporum* و *F. solani* در یک بوته واحد بیشتر از بقیه عوامل و این موضوع به اهمیت کمپلکس بودن بیماری از نظر عوامل دلالت دارد. همراهی قارچ‌های ریزوکتونیا و ماکروفومینا با *F. solani* نیز به کرات مشاهده شد که گزارشات موجود هم مؤید این موضوع است (Estevez de Jensen *et al.*, 2002).

پراکنش مکانی جدایه‌های قارچی در شهرستان‌های سلسله، بروجرد، ازنا، دورود و الیگودرز به ترتیب ۲۴/۵۷، ۱۸/۶۴، ۱۶/۵۸، ۱۵/۲۰ و ۸/۲۵ درصد از کل جدایه‌ها بود. فراوانی جدایه‌های قارچی به دست آمده از مراحل رشدی اولیه، گل دهی و غلاف‌دهی میزبان لوبیا به ترتیب ۲۰/۷۰، ۲۶/۳۷ و ۵۲/۹۲ درصد بود (شکل ۴). بیشترین فراوانی جدایه‌های قارچی مربوط به شهرستان سلسله با ۲۴/۵۷ درصد بود که فراوانی جدایه‌های *F. solani*، *Macrophomina phaseolina*، *F. oxysporum* و *Rhizoctonia solani* به ترتیب ۳۵/۷۷، ۲۶/۹۱، ۱۹/۲۶ و ۳/۳۶ درصد بود. کمترین فراوانی جدایه در شهرستان الیگودرز با ۱۰/۶ درصد مشاهده شد که فراوانی قارچ‌های مذکور به ترتیب ۳۱/۲۵، ۲۵، ۱۳/۲۸ و ۵/۴۶ درصد بود. بر اساس جدول ۲ تجزیه واریانس و مقایسه میانگین جدایه‌های قارچی در شکل ۴، بررسی مراحل نمونه‌برداری بیانگر تفاوت معنی‌دار و روند غالب افزایشی عوامل قارچی بود، به طوری که فراوانی جدایه در مرحله آخر نمونه‌برداری (غلاف‌دهی) نسبت به مرحله گیاهچه و گل دهی به ترتیب ۱۶۴/۴ و ۱۱۶/۱ درصد افزایش داشت. روند افزایشی شاخص وقوع بیماری به سمت آخر فصل در بخش عمده‌ای از مزارع استان زنجان نیز گزارش شده است (Nasari, 2013).



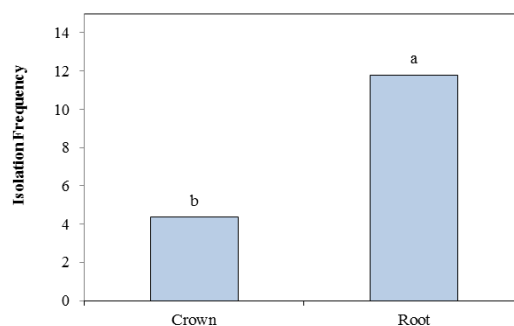
شکل ۵- مقایسه میانگین جدایه‌های قارچی در مراحل مختلف نمونه‌برداری شامل مراحل رشد اولیه، گل‌دهی و غلاف‌دهی. وجود حداقل یک حرف مشترک گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن است.

Fig. 5. Comparison of the fungal isolates mean in different sampling stages of beans including of early growth (V3), flowering (R6-7) and podding (R9) stages. The presence of one common letter at least, indicates no significant difference at the 5% level based on Duncan's mean comparison test.



شکل ۶- مقایسه میانگین جدایه‌های قارچی در شهرستان‌های مورد نمونه‌برداری. وجود حداقل یک حرف مشترک گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن است.

Fig. 6. Comparison of the fungal isolates in sampled counties. The presence of one common letter at least, indicates no significant difference at the 5% level based on Duncan's mean comparison test.



شکل ۷- مقایسه میانگین جدایه‌های قارچی در مراحل مختلف نمونه‌برداری.

Fig. 7. Comparison of the fungal isolates mean in different sampling stages of beans

نسبت به شهرستان‌های الیگودرز، ازنا، دورود و بروجرد که نماینده اقلیم خود هستند به ترتیب ۱۹۸، ۶۱، ۴۸ و ۳۱ درصد بیشتر بود. قابل توجه است که از ناحیه شرق استان (ازنا و الیگودرز) با خاک سبک‌تر و اقلیم سرد و خشک، به سمت غرب استان (سلسله) با بافت خاک سنگین‌تر و اقلیم معتدل و مرطوب، فراوانی نسبی مجموع عوامل قارچی، به‌ویژه قارچ وابسته به تنش ماکروفومینا روند افزایشی نشان می‌دهد (شکل ۶). بر اساس منابع نیز وقوع و شدت بیماری‌های پوسیدگی ریشه در خاک‌های سنگین و pH بالا، بیشتر است و *F. solani* از قارچ‌های ویژه ریشه در شرایط خاک قلیایی است (Dix and Webster, 1995). همچنین ارتفاع از سطح دریا در مزارع الیگودرز در ناحیه شرقی‌ترین مزارع کشت لویبای استان که از نظر دمایی جزو اقلیم سرد است حدود ۱۹۰۰ متر است و با کاهش نسبی ارتفاع به سمت غربی‌ترین مزارع کشت لویبای، در شهرستان سلسله با اقلیم معتدل به حدود ۱۵۰۰ متر کاهش پیدا می‌کند. بر اساس منابع به ازای هر ۱۰۰ متر ارتفاع، دمای منطقه یک درجه کاهش می‌یابد (Alizadeh et al., 2012) که تأثیر فاکتور تعیین کننده اکولوژیکی ارتفاع را نشان می‌دهد. همانطور که بیشترین فراوانی نسبی جدایه‌ها در شهرستان سلسله در پژوهش حاضر در شکل ۹ ملاحظه می‌گردد، شیوع و وقوع شدیدتر بیماری پوسیدگی ریشه لویبای در مزارع اوگاندا نیز در ارتفاعات نسبتاً کم و متوسط با شرایط نسبتاً گرم‌تر مشاهده شده است (Paparou et al., 2017).

بر اساس منابع مختلف عوامل غالب بیماری شامل فوزاریوم و ماکروفومینا قارچ‌های وابسته به تنش‌های محیطی هستند (Das et al., 2008؛ Guler Guney and Guldur, 2018؛ Amanifar et al., 2017) و تنش خشکی، از نیازهای مهم اکولوژیکی برای وقوع بیماری ناشی از این قارچ‌هاست. پدیده پیش‌آمودگی یا مستعد شدن میزبان برای بروز بیماری ناشی از این عوامل در مناطقی که نوسانات دما و رطوبت بیشتر است باعث توسعه بیشتر پاتوسیستم‌های میزبان-بیمارگر می‌شود (Ravanlou and Dehghani, 2011؛ Naseri and Mousavi, 2015)

گونه‌های متفرقه و با فراوانی کم که از ریشه و طوقه جداسازی شد *Fusarium chlamidosporum*، *Phytophthora* sp.، *Pythium* sp.، *Rhizopus* sp.، *F. roseum*، *F. accuminatum*، *F. equiseti*، *F. semitectum*، *Sclerotium* sp.، *F. javanicum*، *F. culmorum*، *Chaetomium* sp.، *Aspergillus* sp.، *Stemphyllium* sp.، *Alternaria* sp. و *Bipolaris* sp.، *Penicillium* sp.، *Trichoderma* sp. بودند.

بررسی‌های اکولوژی و اقلیمی: برنامه‌ریزی و مدیریت

تولید محصولات کشاورزی بر اساس اطلاعات اقلیمی، در جلوگیری از خسارت عوامل زنده و غیرزنده مؤثر است (Zand, 2016). ویژگی تنوع اقلیمی (Seidi, 2013) و موقعیت زاگرس میانه، استان لرستان را به‌عنوان قطب مهم تولید لویبای کشور، از مناطق دیگر متمایز می‌سازد. این استان بین ۴۶ درجه و ۵۱ دقیقه تا ۵۰ درجه و ۳ دقیقه طول شرقی از نصف‌النهار گرینویچ و ۳۲ درجه و ۳۷ دقیقه تا ۳۴ درجه و ۲۲ دقیقه عرض شمالی از خط استوا قرار گرفته و به چهار نوع اقلیم (شکل ۱) تقسیم می‌شود (Zand, 2016). بافت غالب خاک‌های استان لومی رسی (در ناحیه شمالی و غربی شامل شهرستان سلسله) تا سیلتی لومی (در ناحیه شرقی شامل ازنا و الیگودرز)، و pH غالب بین ۷/۵ تا ۷/۸ است (Mohajeri Shoaee et al., 1992).

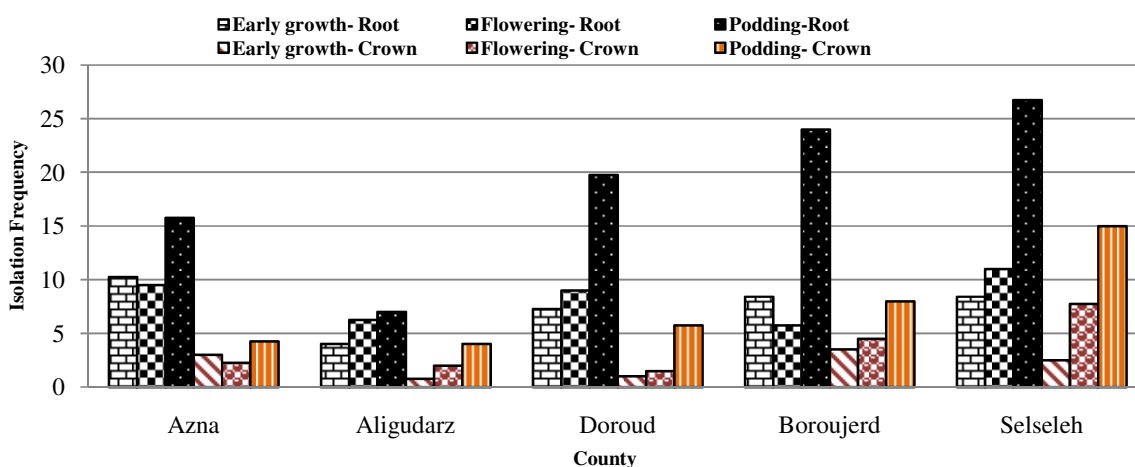
همبستگی قوی بین نیازهای محیطی محصول لویبای و توسعه بیماری در مناطق گرمسیری (Mecedo et al., 2017) زمینه حساسیت لویبای به تنش زنده و غیرزنده به‌ویژه در مرحله گل‌دهی را فراهم می‌آورد (Shekari et al., 2010؛ Sabbaghpour, 2014).

الیگودرز و بخش عمده لویبایکاری دورود در اقلیم نیمه خشک سرد، بروجرد در اقلیم نیمه مرطوب سرد و سلسله در اقلیم نیمه مرطوب معتدل واقع می‌شوند.

در شکل ۹ که مقایسه فراوانی جدایه‌های مناطق مربوط به هر اقلیم ملاحظه می‌گردد، اقلیم نیمه‌معتدل مرطوب (سلسله) دارای بیشترین و اقلیم نیمه‌خشک سرد (الیگودرز) دارای کمترین فراوانی بود. فراوانی جدایه در شهرستان سلسله

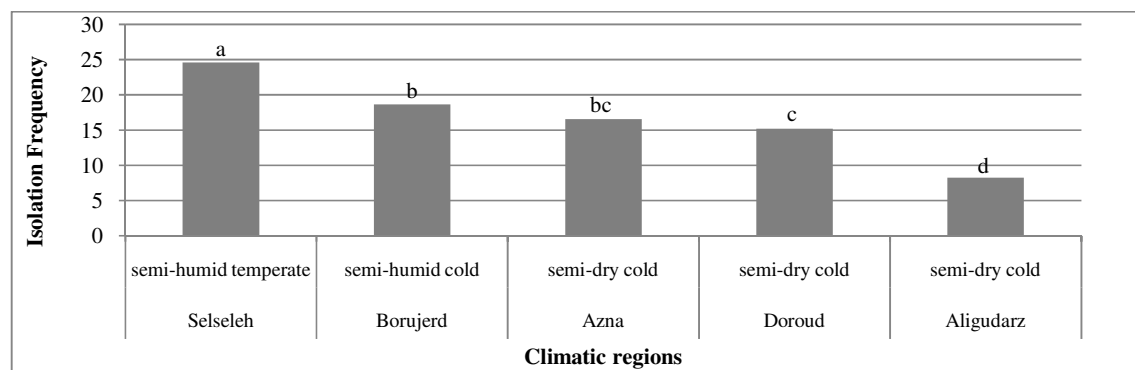
برای آسیب‌پذیری از تنش‌های غیرزنده و زنده از جمله عوامل قارچی وابسته به تنش، امروزه منطقه مناسب کشت لوبیا تلقی نمی‌شود. تجربیات و اظهارات زارعین بومی نیز این موضوع را تأیید می‌کند. پژوهش‌های جدید جهانی حاکی از تأثیر تغییر اقلیم و کاهش سرمای مناطق، به‌صورت گسترش بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا به سمت مناطق نسبتاً سردتر است (Macedo *et al.*, 2017) و این موضوع در تنظیم برنامه الگوی کشت برای مناطق کشت لوبیا و همچنین مطالعات اپیدمیولوژیکی بیماری حایز اهمیت است.

همان‌طوری که در شکل‌های ۱ و ۹ مشاهده می‌شود، از مناطق لوبیاکاری استان، شهرستان‌های ازنا، شهرستان سلسله که از دیرباز منطقه کشت عمده لوبیا و سویا بوده، در دو دهه اخیر طبق پژوهش‌های اقلیمی از اقلیم نیمه مرطوب سرد به نیمه مرطوب معتدل تغییر یافته است (Zand, 2016). این شهرستان که اکنون دارای دو ویژگی مرطوب و معتدل ارزیابی می‌شود و در مجاورت با اقلیم نیمه خشک گرم استان در معرض تنش‌های محیطی است، به‌نظر می‌رسد به‌واسطه مستعدسازی گیاه زراعی لوبیا



شکل ۸- مقایسه فراوانی جدایه‌های قارچی جدا شده از ریشه و طوقه لوبیا در مراحل و شهرستان‌های استان لرستان.

Fig. 7. Comparison of isolation frequency of the fungal isolated from root and crown of common bean at the growth stages and counties in Lorestan province



شکل ۹- مقایسه میانگین جدایه‌های قارچی در اقلیم‌های مورد نمونه برداری. وجود حداقل یک حرف مشترک گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن است.

Fig. 5. Comparison of the fungal isolates in simplified climatic region. The presence of one common letter at least, indicates no significant difference at the 5% level based on Duncan's mean comparison test.

سپاس‌گزاری

و آقای دکتر کاری دولت‌آباد در بخش بیولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب که در بررسی‌های ملکولی مساعدت داشتند، صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود.

بدین‌وسیله از خانم‌ها مهندس مهدی‌نیا، امانی، پاس و درویشیان که در آزمایشگاه مرکز تحقیقات کشاورزی لرستان

Reference

- AHMADI, K., GHOLIZADEH, H., EBADZADEH, H., HOSEINPOOR, R., ABDESHAH, H., KAZEMIAN, A. and RAFIEE, M. 2016. Agriculture statistics. Ministry of Jihad e Agriculture of Iran. Tehran, Iran. Vol:1, 125p.
- ALIZADEH, A., KAMALI, GH., MOUSAVI, F. and MOUSAVI, M. 2012. Climatology. Publication of Ferdowsi Mashhad University, 392p.
- AMANIFAR, N., GHADIRIAN, M. And SALEHI, F. 2017. Commonbean cultivars and genotypes reaction to *Fusarium solani* f.sp. *phaseolina* with and without wet stress in greenhouse condition. *Plant Pests and Diseases*, 85(1):56-68.
- ARIF, M., CHAWLA, S., ZAIDI, N.W., RAYAR, J.K., VARIAR, M. and SINGH, U.S. 2012. Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(2), pp. 444-447.
- BEAS-FERNANDEZ, R., DE SANTIAGO-DE SANTIAGO, A., HERNANDEZ-DELGADO, s. and MAYEK-PEREZ, N. 2006. Characterization of Mexican and non-mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristic, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. *Journal of Plant Pathology*. 88(1): 53-60
- BILGI, V.N., BRADLEY, C.A., KHOT, S. D., GRAFTON, K.F. and RASMUSSEN, J.B. 2008. Response of dry bean genotypes to *Fusarium* root rot, caused by *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, under field and controlled conditions. *Plant Disease*. 92: 1197-1200.
- BRIEN, R.G.D., HARE, P.J.O., GLASS, R.J. 1991. Cultural practices in the control of bean root rot. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 31: 551-555.
- BURGESS, L.W., SUMMERELL, B.A., BULLOCK, S., GOTT, K.P. and BACKHOUSE, D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. *Fusarium Research Laboratory*. Department of Crop Science, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, 133 p.
- CAMPBELL, C. L. and NEHER, D. A. 1994. Estimating disease severity and incidence. In: *Epidemiology and management of root diseases*, edited by Campbell C. L. and Benson D. M. Springer Verlag Berline. Heidelberg, New York, 344pp.
- DEACON, J.D. 1997. *Modern Mycology*. Blackwell science Ltd, Australia 303p.
- DAS, I. K., FAKHRODDIN, B., and ARORA, D.K. 2008. RAPD Cluster analysis and chlorate sensitivity of some indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationships with pathogenesis. *Microbiologica Research*, 163(2): 215-224.
- DEHGHANI, A. 2011. Importance of predisposition in plant diseases incidence (Khuzestan case study). proceeding of 20th Iranian Plant Protection Conference, Shiraz, Iran.
- DHINGRA, O. D. and SINCLAIR, J.B. 1995. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Lewis Publishers. 433p.
- DHINGRA, O. D., COELHO-NETTO, R. A., RODRIGUES, F. A. SILVA JR, G. J. and MAYA, C. B. 2006. Selection of endemic nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* from bean roots and rhizosphere competent fluorescent *Pseudomonas* species to suppress *Fusarium*-yellow of beans. *Biological Control*, 39:75-86.
- DIX N. J. and WEBESTER. J. 1995. *Fungal ecology*. Chapman and Hall, 549p.
- DOMSCH, K.H., GAMS, W. and ANDERSON, T.H. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Verlag Eching Germany. 672p.

- DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- EDEL-HERMANN, V., GAUTHERON, N., MOUNIER, A. and STEINBERG, C. 2015. Fusarium diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. *Journal of Microbiological Methods*. 11: 64-71.
- ERPER, I., KARACA, G.H. and OZKOC, I. 2008. Root rot disease incidence and severity on some legume specks grown in samsun province and the fungi isolated from roots and soils. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 41(7): 501-506
- ERSHAD, J. 2010. Fungi of Iran. Agricultural research, education and extention publication. Ministry of Jihad e Agriculture of Iran. Tehran, Iran. 874p.
- ESTEVEZ DE JENSEN, C., KURLE, J.E. and PERCICH, J.A. 2004. Integrated management of edaphic and biotic factors limiting yield of irrigated soybean and dry bean in Minnesota. *Field Crop Research*. 86: 211-224.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 2015. FAO statistics. Available in: <http://www.fao.org>
- GLOSS, N.L. and DONALDSON, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology*. 64(4):1323-1330.
- GULER-GUNEY, I. and GULDUR, M.E. 2018. Inoculation techniques for assessing pathogenicity of *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* and *F. solani* on peper seedlings. *Turkish Journal of Agricultural Research* 5(1): 1-8.
- HALL, R. 1996. Inoculum dynamics of *Fusarium solani* f.sp. phaseoli and management of *Fusarium* root rot. In: Hall,R.(Ed.), *Principle and Practice of Managing Soilborn Plant Pathogens*.The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp. 279- 320.
- HALL, R. and PHILLIS, L.G. 1992. Effect of crop sequence and rainfall on population dynamics of *Fusarium solani* f.sp. phaseoli in soil. *Canadian Journal of Botany*.70: 2005-2008.
- HOLLIDAY, P. and PUNITHALINGAM, E. 1970. *Macrophomina phaseolina*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria: CMI 275:1-2.
- HARVESON, R.M., SMITH, J.A. and STROUP, W.W. 2005. Improving root health and yield of dry bean in the Nebraska panhandle with a new technique for reducing soil compaction. *Plant Disease*. 89: 279-284.
- KARI DOLATABAD, H., JAVAN-NIKKHAH, M. and SHIER, W. T. 2017. Evaluation of antifungal, phosphate solubilisation, and siderophore and chitinase release activities of endophytic fungi from *Pistacia vera* .*Mycology Progress*, published online: 21 June 2017.
- KHODAGHOLI, M., HEMMATI, R., NASERI, B. and MAREFAT, A. 2013. Genotypic, phenotypic and pathogenicity variation of *Fusarium solani* isolates, the causal agent of bean root rot in Zanjan province. *Iranian Journal of Pulses Research*, 4(1): 111-125.
- LAK, M.R. 2003. Common bean root rot diseases.Markazi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center.Extention Publication.20p.
- LAK, M.R. 2016. Determination of the main agents of bean root rot and evaluation of potential and damage in khomein. Final report of project. Markazi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center.20p.
- LESLIE, J.F., SUMMEREL, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing Ltd.: USA. 388p.
- MACEDO, R., PATRICIA SALES, L., YOSHIDA, F. LEMES SILVA-ABUD, L. AND JUNIOR, M. L.2017. Potential worldwide distruction of *Fusarium* dry root rot in common beans based on the optimal environment fir disease occurrence. Available in: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0187770>
- MC DONALD, J. D. 1994. The soil environment. In: *Epidemiology and management of root diseases*, edited by Campbell C. L. and Benson D. M. Springer Verlag Berline. Heidelberg, New York, 344pp.
- MILA, A.L., CARRIQUIRY, A.L. and YANG, X.B. 2004. Logistic regression modeling of prevalence of soybean

- Sclerotinia stem rot in the northcentral region of the United States. *Phytopathology*. 94, 102-110.
- MOHAJER SHOOAEI, M. H., REZAEI, A., RAHIMI, A. M., EMAMYARI, K. and SALEHI, P. 1992. Evaluation of resources and land ability of Lorestan regions. Publication no. 608, 75p.
- MWANG OMBE, A.W., THIONG, G., OLUBAYO, F.M. and KIPROP, E.K. 2007. Occurrence of root rot disease on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in association with bean stem maggot (*Ophiomyia* sp.) in EMBU district, Kenya. *Plant Pathology Journal*. 6:141-146.
- NASERI, B. 2008. Root rot of common bean in Zanjan, Iran: major pathogens and yield loss estimates. *Australian Plant Pathology*. 37: 548-551.
- NASERI, B. 2013. Epidemics of rhizoctonia root rot in association with biological and physicochemical properties of field soil in bean crops. *Journal of Phytopathology*, 161:397-404.
- NASERI, B. and MOUSAVI, S.S. 2015. Root rot pathogens in field soil, roots and seeds in relation to common bean (*Phaseolus vulgaris*), disease and seed production. *International Journal of Pest Management*. Published online: <http://www.tandfonline.com>
- NELSON, P.E., TOUSOUN, T.A. and MARASAS, W.F.O. 1983. *Fusarium* species, An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 p.
- ODNELL, K., KISTLER, H.C., CIGELINK, E. and PLOETS, R.C. 1988. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: cocordantevidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(5):2044-2049.
- O'DONNELL, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*/*Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92:919-938.
- O'DONNELL, K., TODD, J. W., VINCENT, A. R., ROBERT, G., PEDRO, W., CROUS, A., DAVID, M. G. and KANG, S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43:583-595
- PAN, R.S. and MORE, T.A. 1996. Screening of melon (*Cucumis melo* L.) germplasm for multiple disease resistance. *Euphytica*. 88(2):125-128.
- PAPARU, P., ACUR, A., KATO, F., ACAM, C., NAKIBUULE, J., MUSOKE, S., NKALUBO, S. and MUKANKUSI, C. 2017. Prevalence and incidence of four common bean root rots in Uganda. *Expelation of Agriculture*. Available in: <https://creativecommons.org>
- REZAEI, A. M. 1995. Concepts of probability and statistics. Mashhad publishing co. 431p.
- SABBAGHPOUR, S. H. 2014. National document of iranian research strategy. Publication of Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), 417p.
- SAFARLOO, Z. and HEMMATI, R. 2014. Identification and pathogenesis study of *Fusarium* species related to commonbean root rot in Zanjan Province, *Applied Research in Plant Protection*, 3(1): 77-92.
- SALAGEGHEH, F., MOHAMMADI, H. and SARCHEMEHPOUR, M. 2014. Effect of water stress on root rot disease of Pistacio seedling caused by *Fusarium solani*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, vol. 50(3):266-280.
- SAREMI, H., AMIRI, M. E. and ASHRAFI, J. 2011. Epidemiological aspects of bean decline disease caused by *Fusarium* species and evaluation of the bean resistant cultivars to disease in Northwest Iran. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(66), pp. 14954-14961.
- SAREMI, H. and SAREMI, H. 2013. Isolation of the most common *Fusarium* species and the effect of soil solarization on main pathogenic species in different climatic zones of Iran. *European Journal Plant Pathology*. 137: 585-596.
- SCHWARTZ, H.F., STEADMAN, J. R., HALL, R. and FORSTER, R.L. 2005. *Compendium of Bean Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 109 p.
- SEIDI, M., KHALEDI, SH., SHAKIBA, A. and MIRBAGHERI, B. 2013. The zoning of agricultural climate in Lorestan province using GIS techniques. *Applied Geosciences Research*, 29 (3): 71-82.

- SHEKARI, F., ESMAEELPOUR, B. and SHEKARI, F. 2010. The physiology of vegetable crops. Vol 2. Danesh Publication, Zanjan. 336p.
- SINGELTONE, L.L., MIHAIL, J.D. and RUSH, Gh. M. 1993. Methods for research on soil born phytopathogenic fungi. APS Press. St Paul. Minnesota, 263p.
- VAN SCHOOVEN, A. and PASTOR-CORRALES, M.A. 1987. Standard system for the evaluation of Bean Germplasm. Cali, Colombia, Centro International de Agricultura Tropical.
- VINCELLI, P. and TISSERAT, N. 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. Plant Disease, 92(5): 660-669.
- WERNER, M. and IRZYKOWSKA, L. 2007. The pathogenecity and DNA polymorphism of *Fusarium oxysporum* originating from *Dianthus caryophyllus*, *Gypsophila* spp. and soil. Phytopathol. Pol. 46: 25-36
- ZAND, 2016. Identification of homogenous climatic zones in Lorestan Province. Final Report, Lorestan Agricultural and Natural Resources and Education Center. 20p.
- ZHANG, N., O'DONNELL, K., SUTTON, D. A., NALIM, F. A., SUMMERBELL, R. C., PADHYE, A. A. and GEISER, D. M. 2006. Members of the *Fusarium solani* Species Complex That Cause Infections in Both Humans and Plants Are Common in the Environment. Journal of Clinical Microbiology, 2186-2190.