

## ارزیابی مقاومت و واکنش آنزیمی ارقام مختلف باقلا در برابر لکه برگی آلترناریایی

محمد علی تاجیک قنبری<sup>۱\*</sup>، صغری طاهرپور کلائی<sup>۲</sup>، ولی الله بابایی زاد<sup>۳</sup> و شیده موجرلو<sup>۴</sup>  
 ۱. ۳ و ۱. دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری  
 ۲. کارشناسی گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری  
 ۳. استادیار گروه باغبانی و گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود  
 (تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۲۷)

## چکیده

باقلا (*Vicia faba*) یکی از مهم‌ترین لگوم‌های دانه‌ای در گیاهان زراعی است. بیماری لکه‌برگی آلترناریایی یکی از بیماری‌های باقلا در استان گلستان و مازندران و عامل خسارت و کاهش عملکرد در این گیاه است. در پژوهش حاضر از مزارع باقلا آلوده به بیماری در استان‌های گلستان و مازندران نمونه‌برداری انجام شد. جدایی به دست آمده بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی *Alternaria alternata* شناسایی شد. به منظور ارزیابی مقاومت نسبی نه رقم باقلا نسبت به این بیماری در شرایط گلخانه، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) اندازه‌گیری شد. همچنین تغییرات برخی از آنزیم‌های مرتبط با مقاومت در رقم حساس و مقاوم در زمان‌های مختلف پس از آلودگی بررسی شدند. نتایج نشان دادند اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد در نرخ حساسیت به بیماری در ارقام مختلف در مقابل *A. alternata* وجود دارد. رقم اوتونو با بیشترین مقدار AUDPC حساس‌ترین و ارقام زرشکی و زینامورا با کمترین مقدار، مقاوم‌ترین ارقام بودند. همچنین نتایج داده‌های فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد در فعالیت هر سه آنزیم پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز پس از وقوع بیماری هستند. افزایش در مقادیر آنزیم‌ها در تعامل ناسازگار (رقم مقاوم زرشکی) در مقایسه با تعامل سازگار (رقم حساس اوتونو) بیشتر بود که نقش این آنزیم‌ها در فعال‌سازی واکنش‌های دفاعی گیاه باقلا در تعامل با بیمارگر و بروز مقاومت را نشان می‌دهد. به‌طور کلی نتایج نشان دادند که رقم زرشکی با مقدار کم AUDPC و بیان بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از پتانسیل بالایی برای اصلاح ژنتیک در مقاومت به بیماری لکه‌برگی آلترناریایی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، لکه‌برگی آلترناریایی.

Evaluation of resistance and enzyme production of Faba Bean cultivars against *Alternaria* leaf spot

Mohammad Ali Tajik Ghanbari 1 \*, Soghari Taherporkolai 2, Valiullah Babaeizad 3 and Shideh Mojerloo 4

1 and 3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources  
 Bachelor of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

4. Assistant Professor, Department of Horticulture and Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahroud University of Technology

(Received: January 26, 2020 - Accepted: May 16, 2020 )

## ABSTRACT

Faba Bean (*Vicia faba*) is an important legume among cultivated plants and the *Alternaria* leaf spot is a serious disease that causes broad damages and yield loss in Golestan and Mazandaran provinces. In the current research, sampling was carried out from Mazandaran and Golestan provinces. Morphological and molecular surveys of the obtained isolates showed that they belonged to *A. alternata* species. To evaluate the resistance of nine Faba Bean cultivars against the *Alternaria* leaf spot, area under disease progress curve (AUDPC) was calculated in the greenhouse condition. Also, the variation of some resistance related enzymes between resistant and susceptible lines was tested at different time intervals after inoculation. Statistical analysis showed a significant difference between cultivars ( $P \leq 0.05$ ). The Otono cultivar with the highest AUDPC and Zereshki cultivar with the least AUDPC were suggested as susceptible and resistant cultivars, respectively. The ANOVA of antioxidant enzymes showed positive effects on CAT, APX, and GPX levels after inoculation ( $P \leq 0.01$ ). Increasing the concentration of enzymes in incompatible interaction (Zereshki resistant cultivar) was greater than that of compatible interaction (Otono susceptible cultivar), indicates the role of these enzymes in activating plant defense responses in Faba Bean to interact with the pathogen and induce resistance. In general, the results showed that Zereshki cultivar with a low level of AUDPC and high expression of antioxidant enzymes has high potential to be used in breeding programs for resistance to *Alternaria* leaf spot.

**Keywords:** Catalase, ascorbate peroxidase, area under disease progress curve, *Alternaria* leaf spot.

\* Corresponding author E-mail: m.tajick@sanru.ac.ir

## مقدمه

باقلا (*Vicia faba* L.) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین لگوم‌های دانه‌ای و قدیمی‌ترین گیاهان زراعی در بیش از ۵۰ کشور جهان کشت می‌شود. بر اساس آمار سازمان خواروبار کشاورزی جهانی، کشور چین با تولید ۴/۱ میلیون تن باقلا در سال ۲۰۱۲ در مقام اول است (Anonymous, 2013). سطح زیر کشت باقلا در ایران در حدود متوسط ۲۰۰۰۰ هکتار و عملکرد باقلای خشک حدود دو تن در هکتار است. عمده سطح زیر کشت باقلا در استان‌های خوزستان، لرستان، گلستان و مازندران است (Khosravi, 2016). لکه‌برگی آلترناریایی با عامل (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl) از بیماری‌های شایع باقلا محسوب می‌شود که با خسارت به برگ و محدود نمودن فتوسنتز، باعث کاهش تولید باقلا در واحد سطح می‌شود (Mahmoud *et al.*, 2012). بیمارگر با ایجاد بیماری در بخش‌های هوایی گیاه باقلا، در بقایای گیاهی به مدت ۱۰-۱۲ ماه و در بذور آلوده تا ۱۳ ماه دوام داشته و زنده می‌ماند و این آلودگی خاک و بذور در آلودگی اولیه گیاهان و کنیدیوم‌های هوازداد در گسترش ثانویه بیماری نقش دارند (Dubey & Patel, 2000; Saleem *et al.*, 2012). درصد کاهش عملکرد ناشی از بیماری‌های برگ باقلا حدود ۲۵ درصد تخمین زده شده است و در شرایط مساعد بیماری، میزان خسارت به ۵۰ درصد هم می‌رسد (Aghajani, 2009).

سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری<sup>۱</sup> (AUDPC) روشی برای خلاصه کردن داده‌های پیشرفت بیماری به یک عدد است و به‌عنوان روش بسیار مفید در تخمین‌های مربوط به مدیریت بیماری به کار رفته است (Jeger, 2004). محمود و همکاران (Mahmoud *et al.*, 2012) با محاسبه شدت بیماری لکه شکلاتی باقلا با عامل *Botrytis faba* Sardina در سه رقم Giza429، Giza40 و Giza461 مقاومت ارقام موردبررسی را در مقابل بیماری ارزیابی کردند و به ترتیب سه رقم مذکور را به‌عنوان رقم حساس، با حساسیت متوسط و مقاوم معرفی کردند. آل کومی

(El-Komy, 2014)، برای تعیین شدت بیماری لکه شکلاتی باقلا در دو رقم Nubaria و Giza40 مقدار AUDPC را در فواصل زمانی ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از آلودگی محاسبه و رقم Nubaria را به‌عنوان رقم مقاوم و رقم Giza40 را به‌عنوان رقم حساس معرفی کرد. مقسم و همکاران (Moghasem *et al.*, 2014)، واکنش مزرعه‌ای ۱۳ ژنوتیپ باقلا در برابر بیماری‌های لکه شکلاتی، لکه‌برگی آلترناریایی، برق‌زدگی و سوختگی استمفیلیومی را با اندازه‌گیری میزان وقوع و شدت بیماری در فاصله زمانی ظهور علائم تا برداشت را بررسی کردند. این پژوهش‌گران از شاخص‌های AUDPC و SAUDPC<sup>۲</sup> (سطح زیر منحنی پیشرفت زمانی استاندارد) برای مقایسه ارقام استفاده کردند و بر اساس نتایج آن‌ها ژنوتیپ برکت مقاوم‌ترین ژنوتیپ در برابر لکه شکلاتی و لکه‌برگی آلترناریایی معرفی شد. تنش‌های زنده و غیرزنده منجر به تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان می‌شوند (Amini *et al.*, 2018; Darvishzadeh *et al.*, 2014). یکی از پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر حمله بیمارگرها استفاده از گونه‌های اکسیژن فعال<sup>۳</sup> (ROS) و رادیکال‌های آزاد شده به‌وسیله پراکسیداز به‌عنوان کاتالیزور برای تغییر در دیواره سلولی و همچنین به‌عنوان سیگنال در واکنش‌های مرگ سلولی است (Allen & Fluhr, 2005; Passardi *et al.*, 1997). لوبینا و موروگان (Lubaina & Murugan, 2012) افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز<sup>۴</sup> (GPX) را در گیاه کنگد آلوده به *Alternaria sessami* (E. Mohanty & Behera) گزارش کردند. محمود و همکاران (Mahmoud *et al.*, 2012) در بررسی میزان فعالیت آنزیم GPX در دو رقم باقلا شامل Giza 429 و Giza 461 به‌عنوان رقم حساس و مقاوم به *Botrytis fabae* نشان دادند مقدار فعالیت آنزیم پس از آلودگی در هر دو رقم افزایش معنی‌داری داشته که میزان آن‌ها در رقم مقاوم بیش از رقم حساس بوده است. طی پژوهشی تغییرات آنتی‌اکسیدانی در نه

2 Standard area under disease progress curve (SAUDPC)

3 Reactive oxygen species (ROS)

4 Guaiacol peroxidase (GPX)

1 Area under disease progress curve (AUDPC)

گزارش کردند.

آنزیم کاتالاز<sup>۶</sup> (CAT) همراه با سوپراکسید دسموتاز<sup>۷</sup> (SOD) و GPX یک سامانه دفاعی قوی را برای از بین بردن رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن تشکیل می‌دهند. در زمان تنش معمولاً فعالیت آنزیم‌های SOD، APX، CAT و گلوکاتایون ردوکتاز تحریک می‌شود (Mishra et al., 1995). نتایج بررسی‌های انجام‌شده روی باقلا آلوده به *B. fabae* (El-Komy, 2014)، گیاه کنجد آلوده به *A. sesami* (Lubaina & Murugan, 2012) و هندوانه آلوده به *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Hanifei et al., 2013) افزایش آنزیم CAT پس از آلودگی به عوامل بیماری‌زای نکروتروف را نشان می‌دهند. نتایج پژوهش‌های دیونا و همکاران (Debona et al., 2012) بیانگر افزایش مقدار CAT در گندم آلوده به *Cavara Pyricularia oryzae* است که مقدار CAT انباشته‌شده در برگ‌های رقم مقاوم بیشتر از مقادیر آن در رقم حساس است. نتایج پژوهش‌های چنگ و همکاران (Cheng et al., 2011) نشان دادند در گیاه توتون آلوده به *A. alternata* میزان فعالیت آنزیم CAT به‌طور قابل‌توجهی افزایش داشته است و با ممانعت از انباشتن ROS در سلول‌ها از مرگ برنامه‌ریزی‌شده<sup>۸</sup> (PCD) جلوگیری می‌کند. جیا و همکاران (Jia et al., 2010) نشان دادند تیمار برگ‌های مسن گیاه توتون با محصولات متابولیک *A. alternata* باعث افزایش مفرط  $H_2O_2$  و کاهش فعالیت CAT شده و فرآیند پیری در برگ‌ها را تسریع می‌کند. فرآیند پیری ممکن است به دلیل افزایش سطح  $H_2O_2$  و کاهش فعالیت آنزیم CAT در گیاه اتفاق افتد. درویش زاده و همکاران (Darvishzadeh et al., 2018)، فعالیت آنزیم‌های CAT، APX و GPX را در گیاه آفتابگردان در تعامل با بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary بررسی و افزایش فعالیت هر سه آنزیم را در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس گزارش کردند.

ژنوتیپ کتان با شدت حساسیت مختلف به سفیدک پودری (بسیار حساس تا بسیار مقاوم) ارزیابی شد. در ژنوتیپ‌های مقاوم فعالیت بالای از آنزیم GPX نسبت به ژنوتیپ‌های حساس مشاهده شد که بیانگر همبستگی بین این آنزیم با شدت آلودگی بوده است (Mishra et al., 1995). آنجانا و همکاران (Anjana et al., 2008) افزایش فعالیت آنزیم GPX در دو رقم مقاوم و حساس گیاه آفتابگردان در واکنش به قارچ *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tub. & Nish. گزارش کردند که بیشترین میزان آن در زمان‌های ۲ و ۱۲ ساعت پس از آلودگی بوده است. آسکوربات پراکسیداز<sup>۵</sup> (APX) مسئول سمیت‌زدایی  $H_2O_2$  در برگ‌های سبز بوده (Ghauidiere & Ferrari-Iliou, 1994; Foyer & Harbinson, 1994) و به‌عنوان آن‌تی‌اکسیدان کلیدی در گیاهان است. آل کومی (El-Komy, 2014) در بررسی تأثیر آنزیم‌های ضداکسیداتیو در مقاومت باقلا نسبت به *B. fabae* نشان دادند فعالیت آنزیم APX پس از آلودگی به‌طور معنی‌داری در رقم مقاوم افزایش داشته است. جی و همکاران (Ge et al., 2014) مقادیر بالای APX را در گیاه هندوانه آلوده به *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis & Halst. گزارش کردند که مقدار آن به‌طور قابل‌توجهی در ارقام مقاوم بیشتر است. نتایج پژوهش نیک‌رفتار و همکاران (Nikraftar et al., 2013) سطوح بالای فعالیت APX را در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به *Rhizoctonia solani* Kuhn نشان دادند، به‌طوری‌که مقادیر آن در گیاهان با مقاومت بالا بیش از گیاهان حساس است. نتایج پژوهش‌های انجام‌شده نشان‌دهنده همبستگی افزایش APX با مقاومت هندوانه آلوده به *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Leach & Currence) W.C. Snyder & H.N. Hansen (Hanifei et al., 2013) و گیاه کنجد آلوده به *A. sesami* (Lubaina & Murugan, 2012) هستند. مندال و همکاران (Mandal et al., 2008) افزایش معنی‌دار آنزیم APX را در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به *F. oxysporum*

6 Catalase (CAT)

7 Superoxide dismutase (SOD)

8 Programmed cell death (PCD)

5 Ascorbate peroxidase (APX)

نحوه قرار گرفتن کنیدی‌ها روی کنیدیوفور انجام شد. آزمون بیماری‌زایی به روش مایه‌زنی یک قطعه از محیط کشت PDA به ابعاد ۹ در ۹ میلی‌متر، حاوی قارچ *A. alternata* به گیاهچه‌های کاشته‌شده در خاک سترون انجام شد (Mostafa *et al.*, 2010). برای نمونه شاهد یک قطعه از محیط کشت PDA بدون قارچ با همان ابعاد استفاده گردید. پس از مایه‌زنی، به‌منظور تأمین رطوبت کافی گلدان‌ها به زیر پوشش پلاستیکی مرطوب منتقل و آبیاری هرروز به‌صورت مه‌پاشی انجام شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ظهور علائم، قارچ مجدداً از برگ‌های آلوده جداسازی و از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی بررسی شد.

#### شناسایی مولکولی بیمارگر

جدایه‌های خالص‌شده در محیط مایع دکستروز-سیب‌زمینی کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی شیکر قرار داده شد و بعد از پنج تا هفت روز توده میسلیمی توسط آب مقطر سترون شسته و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از CTAB انجام شد (Moeller *et al.*, 1992). برای تعیین غلظت و خلوص نسبی DNA استخراج‌شده، از دو روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری استفاده شد. به‌منظور شناسایی مولکولی از دو آغازگر ITS4 و ITS5 (Hibbett, 2003) برای تکثیر ناحیه ITS1، 5.8s و ITS2 استفاده شد. تکثیر با برنامه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و درنهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای ارزیابی محصول، از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. سپس ژل در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه Gel-Doc (Kodak Gel Logic) عکس‌برداری شد.

استفاده از ارقام مقاوم، از روش‌های مؤثر و مقرون‌به‌صرفه علیه بیماری لکه‌برگی آلترناریایی است. کنترل مؤثر بیماری‌ها تنها در صورتی امکان‌پذیر است که مقاومت به‌عنوان یک رکن مهم در راهبرد کنترل بیماری‌ها مدنظر قرار گیرد (Tivoli *et al.*, 2006). درزمینه ارزیابی واکنش ارقام باقلا در برابر بیماری لکه‌برگی آلترناریایی، پژوهش‌های زیادی در نقاط مختلف دنیا انجام نشده است. این بیماری، یکی از بیماری‌های کم‌اهمیت باقلا در دنیا است که هنوز گزارش رسمی از آن در کشور وجود ندارد، اما از سال‌های نسبتاً دور در مناطق مختلف استان گلستان و مازندران مشاهده شده است و موجب خسارت و کاهش عملکرد در این گیاه می‌شود (Aghajani *et al.*, 2009). در بررسی حاضر به‌منظور ارزیابی میزان مقاومت، چند رقم باقلا در برابر عامل بیماری لکه‌برگی آلترناریایی غربال‌گری شده و مقدار AUDPC ارقام اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد جهت بررسی آنزیم‌های دخیل در مقاومت، میزان فعالیت چند آنزیم مرتبط با بیماری‌زایی در تعدادی از ارقام مقاوم و حساس در زمان‌های مختلف پس از آلودگی ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده در راستای نیل به ارقام پر محصول و مقاوم به بیماری مدنظر قرار خواهند گرفت.

#### مواد و روش‌ها

**جداسازی، شناسایی و اثبات بیماری‌زایی بیمارگر**  
به‌منظور جداسازی بیمارگر نمونه‌برداری از استان گلستان و مازندران انجام شد. پس از انتقال برگ‌های دارای علائم به آزمایشگاه، ابتدا ضدعفونی سطحی انجام شد و قسمت‌های دارای علائم به محیط کشت عصاره سیب‌زمینی-دکستروز-آگار<sup>۹</sup> (PDA) منتقل و در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بعد از رشد قارچ به‌منظور خالص‌سازی از محیط کشت آب-آگار ۲ درصد استفاده شد. شناسایی اولیه بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی مثل رنگ و شکل پرگنه در محیط کشت و خصوصیات میکروسکوپی قارچ مثل شکل و اندازه کنیدی‌ها، طول کنیدیوفورها و

9 Potato dextrose agar (PDA)

داده‌ها به ترتیب به کمک نرم‌افزارهای Digimizer (MedCalc Software Ltd) 4.3.0 و SPSS 16.0 انجام شد.

### سنجش فعالیت آنزیمی

برای اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی، نمونه‌برداری از برگ‌های آلوده ارقام اوتونو، زرشکی، برکت، سرازیری و هیستال و گیاهان شاهد متناظر آن‌ها در طی بازه‌های زمانی صفر، شش، ۱۸، ۲۴، ۳۰، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ایجاد آلودگی انجام شد و بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شده و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. به‌منظور تهیه عصاره گیاهی، ۰/۵ گرم از بافت برگ با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی کاملاً سرد به‌صورت پودر درآمده و در لوله‌های دو میلی‌لیتری تقسیم شدند. سپس دو میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۱ مولار حاوی ۰/۵ میلی‌مولار EDTA<sup>۱</sup> (۸ pH) به آن اضافه شد. هموزن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش در ۱۳۰۰۰g و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس محلول رویی جدا شده و جهت سنجش میزان پروتیین کل و فعالیت آنزیم‌های GPX، CAT و APX استفاده شد (Sairam et al., 2002). میزان پروتیین عصاره برگ به روش برادفورد (Bradford, 1976)، میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به روش تانگ و نیوتن (Tong & Newton, 2005)، آنزیم کاتالاز به روش ابی (Aebi, 1984) و آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش یوشیمورا و همکاران (Yoshimura et al., 2000) اندازه‌گیری شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین به روش دانکن در سطوح ۱ و ۵ درصد انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

### نتایج

#### اثبات بیماری‌زایی و شناسایی ریخت‌شناسی بیمارگر

پس از جداسازی و خالص‌سازی جدایه به روش نوک

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست (بایونیر کره جنوبی) فرستاده شد. توالی ژنوم به‌دست‌آمده در پایگاه NCBI، بلاست و تشابه آن با سایر توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی تعیین شد.

### ارزیابی واکنش ارقام

برای ارزیابی ارقام باقلا در مقابل بیماری به‌منظور ایجاد گیاهچه‌های هم‌سن، ابتدا بذور موردنیاز هر رقم به مدت یک دقیقه با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شده و پس از شست‌وشو با آب به محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد منتقل و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه ضدعفونی و پس از سه بار شست‌وشو با آب، بذور هر رقم بر روی کاغذ فیلتر مرطوب در ظروف یک‌بارمصرف سترون قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌های همسان به داخل گلدان حاوی خاک مناسب منتقل شدند. گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با تناوب ۱۴ ساعت روشنایی با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و ۱۰ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۷۰ درصد به مدت دو هفته نگهداری شدند. به‌منظور ارزیابی مقاومت/حساسیت ارقام، ۹ رقم باقلا شامل اوتونو، برکت، توشن، زرشکی، زینامورا، زهره، سرازیری، شامی و هیستال به‌عنوان ۹ تیمار در کنار شاهد در نظر گرفته شدند. در مورد هر تیمار از سه گلدان به‌عنوان سه تکرار استفاده گردید. برای مایه‌زنی از جدایه *A. alternata* با کد ALT01 که در آزمایش بیماری‌زایی نتایج مناسبی داشت، استفاده شد. این آزمایش سه بار تکرار شد. شدت بیماری بر اساس اندازه لکه ایجاد شده روی برگ در فواصل زمانی سه، هفت، ۱۰ و ۱۴ روز پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری از معادله زیر (Campbell & Madden, 1990) محاسبه شد:

$$AUDPC = \sum_{i=0}^n [(y_i + y_{i+1})/2] [t_{i+1} - t_i]$$

در معادله فوق  $Y_i$  شدت بیماری در ارزیابی  $t_i$  زمان برحسب روز و  $n$  تعداد مراحل یادداشت‌برداری هستند. اندازه‌گیری مساحت لکه‌ها و تجزیه واریانس

ریخت‌شناسی همچون اندازه کنیدیوم‌ها و محل تشکیل آن‌ها و رنگ پرگنه‌ها در محیط کشت عصاره سیب‌زمینی- هویج-آگار<sup>۱۱</sup> (PCA) بررسی شد. گونه شناسایی شده در این پژوهش با توصیف گونه *Alternaria alternata* ارائه شده توسط سیمونز (Simons, 1967, 2007) مطابقت داشت.

هیف بر روی محیط آب-آگار، برای اثبات بیماری‌زا بودن جدایه بر اساس اصول کخ از سه رقم باقلا شامل برکت، اوتونو و هیستال استفاده شد. پس از مایه‌زنی، علایم اصلی بیماری لکه‌برگی آلترناریایی شامل لکه‌های نکروز قهوه‌ای تا سیاه با هاله خاکستری روی برگ ایجاد شد (شکل ۱) و سپس بیمارگر موردنظر مجدد از برگ‌های آلوده جداسازی شد. خصوصیات



شکل ۱. مایه‌زنی جدایه ALT01 فارچ *Alternaria alternata* روی گیاهچه‌های باقلا (A, B) و علایم بیماری (C) در آزمون بیماری‌زایی کخ

Figure 1. Inoculation of *Alternaria alternata* isolate on Faba Bean seedlings (A, B) and disease symptom (C) in Koch's postulates

همچنین، سرعت ایجاد و افزایش علایم در ارقام با مقاومت بالاتر، کمتر از ارقام حساس بوده است. مقایسه میانگین مقادیر AUDPC نشان داد که رقم زرشکی با میانگین ۳۲۸/۵۱۹ و رقم اوتونو با میانگین ۱۴۲۹/۶۴۴ به ترتیب کمترین و بیشترین دامنه تغییرات AUDPC بیماری لکه‌برگی آلترناریایی را داشتند (شکل ۲). بر اساس مشاهدات مربوط به پیشرفت بیماری در گلخانه، ارقام زرشکی و زینامورا مقاوم‌ترین و در مقابل، رقم اوتونو حساس‌ترین نسبت به این بیماری بوده است. در نتیجه کمترین مقدار AUDPC در ارقام زرشکی و زینامورا و بیشترین مقدار آن در رقم اوتونو مورد انتظار است.

#### بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیم پراکسیداز (GPX)

نتایج تجزیه واریانس میزان فعالیت آنزیم GPX حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد در هر پنج رقم مورد استفاده پس از آلودگی با فارچ *A. alternata* بودند. مقادیر این آنزیم در هر پنج رقم پس از آلودگی

#### شناسایی مولکولی بیمارگر

تکثیر دی‌ان‌ا ریپوزومی با جفت آغازگرهای ITS4 و ITS5 منجر به تولید قطعه‌ای با طول ۷۰۰ جفت باز گردید. توالی‌های به دست آمده از تکثیر ناحیه ITS با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI مقایسه شد و تشابه ۹۹-۱۰۰ درصدی با فارچ *Alternaria alternata* نشان داد که تأییدکننده نتایج ریخت‌شناسی است. این توالی با کد دسترسی KP288493 در بانک ژن ثبت گردید.

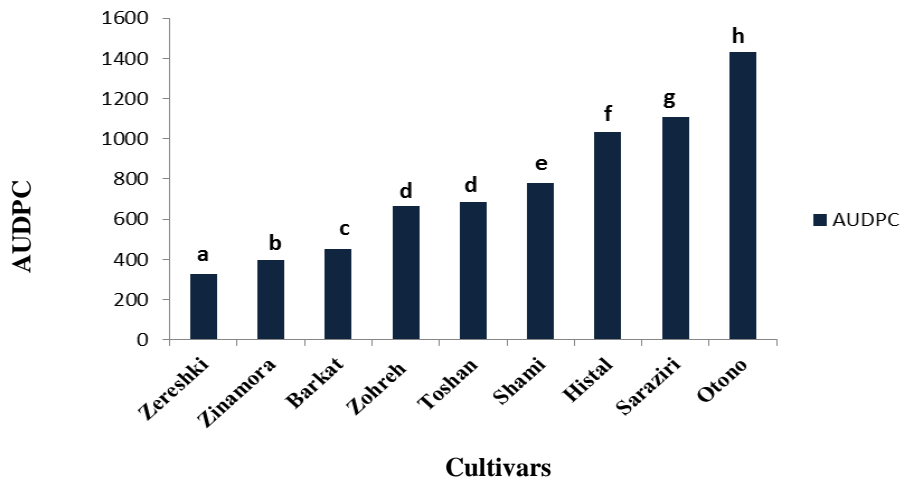
#### ارزیابی مقاومت ارقام

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر متقابل نه رقم (اوتونو، برکت، توشن، زرشکی، زهره، زینامورا، سرازیری، شامی و هیستال) باقلا با فارچ *A. alternata* نشان داد که تفاوت واکنش ارقام مختلف باقلا و جدایه بیمارگر و برهمکنش آن‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. بر اساس نتایج، شدت بیماری در همه ارقام مورد بررسی در تمام زمان‌های اندازه‌گیری به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. در حالی که شدت بیماری در ارقام مقاوم، کمتر از ارقام با حساسیت بیشتر بود.

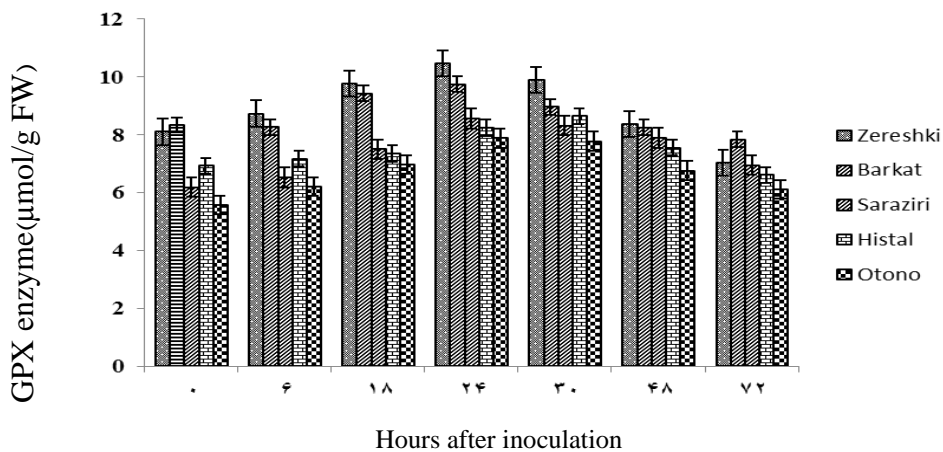
1 Potato carrot agar (PCA)

۶ ساعت پس از آلودگی و به دنبال آن افزایش مقدار در ۱۸ ساعت پس از آلودگی است و در نهایت در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به بیشترین میزان فعالیت خود رسیده است و سپس ۳۰ تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی روند کاهشی داشته است (شکل ۳). بین ارقام مقاوم زرشکی و برکت از نظر میزان فعالیت این آنزیم در هیچ کدام از بازه‌های زمانی پس از آلودگی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است.

روند افزایشی داشته و اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان داده است. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم در رقم زرشکی و در زمان ۲۴ ساعت پس از آلودگی ثبت شده است که اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد با مقدار این آنزیم در رقم اوتونو دارد. نتایج آنالیز آماری نشان دادند تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بین بازه‌های زمانی مختلف پس از آلودگی در هر پنج رقم وجود دارد. بررسی الگوی میزان فعالیت آنزیم GPX نشانگر آغاز فعالیت این آنزیم در ارقام مختلف در زمان



شکل ۲. مقایسه میانگین ارقام مختلف باقلا پس از مایه‌زنی با *Alternaria alternata*  
 Figure 2. AUDPC mean comparison between Faba Bean cultivars after inoculation by *Alternaria alternata*

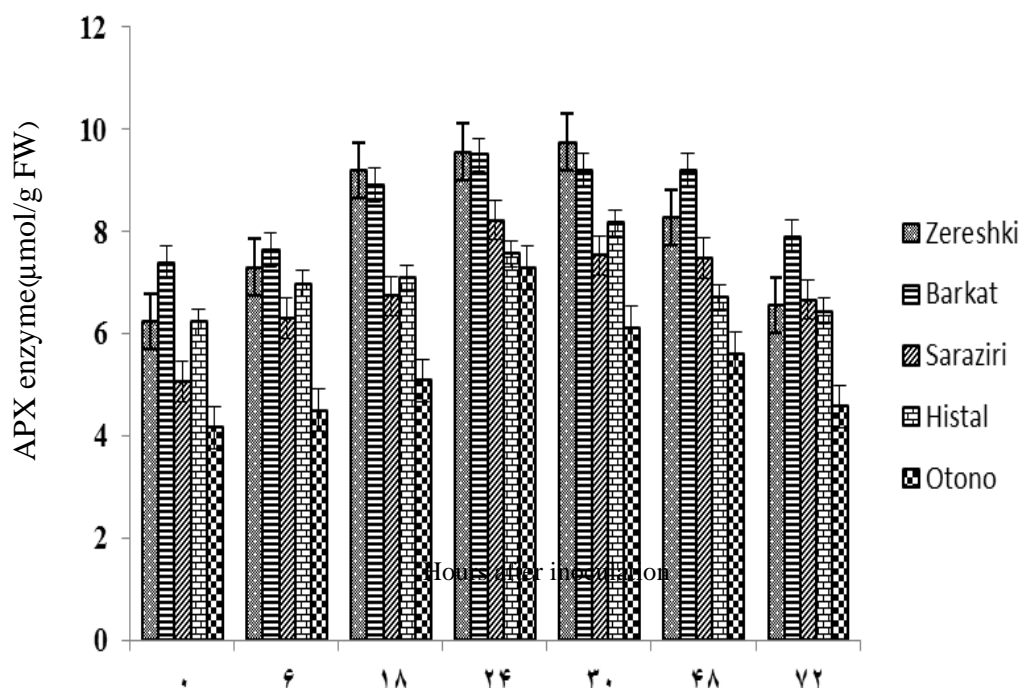


شکل ۳. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (GPX) برحسب میکرومول بر گرم بافت تازه در ارقام مختلف پس از مایه‌زنی با *Alternaria alternata* خطای استاندارد روی ستون‌ها نشان داده شده است.  
 Figure 3. Peroxidase enzyme (GPX) activity ( $\mu\text{mol/g FW}^{11}$ ) in different cultivars after inoculation by *Alternaria alternata*. Error bars are shown on the columns.

فعالیت آنزیم APX نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در ارقام مختلف در ۶ ساعت پس از آلودگی با تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد آغاز شد و در نهایت در ۳۰ ساعت پس از آلودگی به بیشترین میزان فعالیت خود در ارقام مقاوم زرشکی و برکت رسیده است و پس‌از آن تا زمان ۷۲ ساعت روند کاهشی را نشان داده است (شکل ۴).

### آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس میزان فعالیت آنزیم نشان دادند که تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد در هر پنج رقم از نظر فعالیت آنزیم APX وجود داشت. پس از اعمال آلودگی، هر پنج رقم روند افزایشی از فعالیت آنزیم APX را نشان دادند. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در رقم زرشکی ۳۰ ساعت پس از آلودگی بود که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد با کمترین میزان آنزیم آن در رقم اوتونو است. بررسی الگوی میزان



شکل ۴. میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) برحسب میکرومول بر گرم بافت تازه در ارقام مختلف پس از مایه‌زنی با *Alternaria alternata* خطای استاندارد روی ستون‌ها نشان داده شده است.

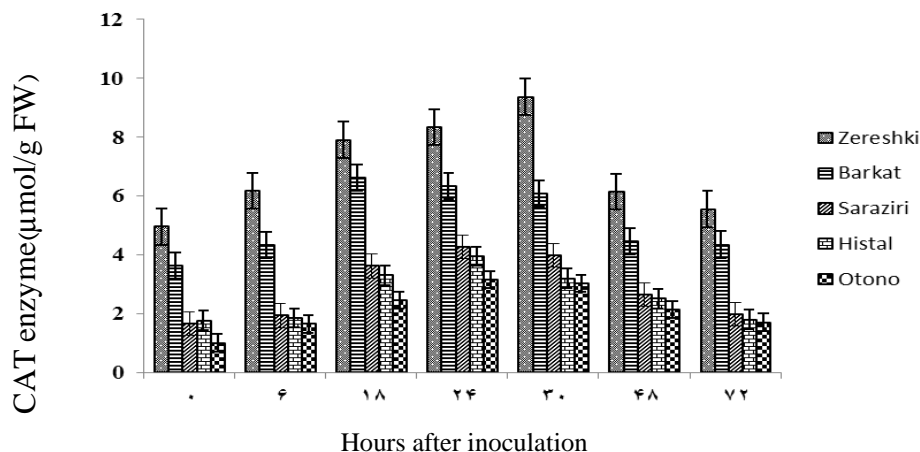
Figure 4. Ascorbate Peroxidase enzyme (APX) activity ( $\mu\text{mol/g FW}$ ) in different cultivars after inoculation by *Alternaria alternata*. Error bars are shown on the columns.

معنی‌دار در سطح یک درصد را با مقدار این آنزیم در رقم اوتونو نشان می‌دهد. به‌طورکلی روند افزایشی در میزان فعالیت این آنزیم پس از آلودگی گیاه با بیمارگر مشاهده می‌شود. این افزایش در ارقام مختلف شش ساعت پس از آلودگی آغاز شده و در نهایت در ۳۰ ساعت پس از آلودگی به حداکثر میزان خود رسیده و پس‌از آن تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی روند کاهشی نشان می‌دهد (شکل ۵).

### آنزیم کاتالاز

نتایج تجزیه واریانس میزان فعالیت آنزیم CAT نشان دادند ارقام مختلف از نظر تولید این آنزیم در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار دارند. همچنین تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد بین بازه‌های زمانی مختلف پس از آلودگی در هر پنج مشاهده شده است. بیشترین مقدار فعالیت این آنزیم در رقم زرشکی و در زمان ۳۰ ساعت پس از آلودگی است که اختلاف





شکل ۵. میزان فعالیت کاتالاز (CAT) برحسب میکرومول بر گرم بافت تازه در ارقام مختلف پس از مایه‌زنی با *Alternaria alternata* خطای استاندارد روی ستون‌ها نشان داده شده است.

Figure 5. Catalase enzyme (CAT) activity ( $\mu\text{mol/g FW}$ ) in different cultivars after inoculation by *Alternaria alternata*. Error bars are shown on the columns.

هدف کنترل بیماری می‌تواند اقدامی مناسب باشد، البته نیاز است تا مجموع ویژگی‌های زراعی در انتخاب رقم در نظر گرفته شود. بر اساس نتایج این پژوهش، مقدار فعالیت هر سه آنزیم GPX، APX و CAT در تعامل سازگار (رقم مقاوم زرشکی) در مقایسه با تعامل سازگار (رقم حساس اوتونو) بیشتر بوده است که نشان‌دهنده دخالت این آنزیم‌ها در فعال‌سازی واکنش دفاعی گیاه باقلا در تعامل با بیمارگر آلترناریا و بروز مقاومت است. همچنین مشخص شد که مقادیر فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام موردبررسی در مقابل بیماری بیش از دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بوده و فعالیت آنزیم کاتالاز نیز کمتر از دو آنزیم دیگر بوده است که نشان‌دهنده نقش اصلی آنزیم پراکسیداز در کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از بیماری در باقلا است. فعالیت GPX به‌عنوان پاسخ اولیه و زود هنگام در تعامل بین گیاه-بیمارگر است، به‌طوری‌که افزایش فعالیت این آنزیم با مقدار  $\text{H}_2\text{O}_2$  گیاهان در هنگام تنش رابطه مستقیمی دارد. آنزیم GPX در سیتوزول فعالیت داشته و از گلوکاتیون به‌عنوان کوفاکتور استفاده می‌کند (Dixon *et al.*, 1998). این آنزیم  $\text{H}_2\text{O}_2$  را تجزیه و به آب تبدیل می‌کند. افزایش فعالیت این آنزیم به همراه سایر سازوکارهای دفاعی در سیتوزول به حفظ پایداری در این بخش کمک شایانی می‌نماید (Esfandiari *et al.*, 2009).

### بحث و نتیجه گیری

نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش در رابطه با شناسایی گونه قارچ عامل بیماری لکه‌برگی باقلا نشان دادند که جدایه موردبررسی *A. alternata* است. در بررسی‌های اولیه ویژگی‌های ریخت‌شناسی با توصیفات مربوط به گونه *A. alternata* در توصیفات سیمونز (Simons, 1967, 2007) مطابقت داشت. نتایج توالی‌یابی ناحیه ITS ژنومی نیز پژوهش‌های ریخت‌شناسی را تأیید نمودند. همچنین جدایه موردنظر توانایی بیماری‌زایی روی باقلا را داشته است. این نتایج با نتایج منصور (Mansour, 1980)، گورها و همکاران (Gurha *et al.*, 1981)، فیلیپویکس (Filipowicz, 1984)، جین هیوک و چانگ سیوک (JinHyeuk & ChangSeuk, 2002) و محمود و همکاران (Mahmoud *et al.*, 2012) مطابقت داشتند و اولین گزارش از جداسازی و بیماری‌زایی این گونه قارچی از باقلا در کشور است. نتایج نشان دادند که رقم زرشکی و زینامورا با کمترین مقدار AUDPC، مقاوم‌ترین ارقام نسبت به بیماری و رقم اوتونو با بیشترین مقدار AUDPC، بیشترین نرخ حساسیت را در سطح ۵ درصد دارا می‌باشند. نتایج پژوهش حاضر با نتایج مقسم و همکاران (Moghasem *et al.*, 2014) همسو هستند. مقاوم‌تر بودن ارقام زرشکی و زینامورا نسبت به بیماری نشان می‌دهد که کاشت این ارقام با

آنتی‌اکسیدانی است که  $H_2O_2$  تولیدشده از فعالیت آنزیم SOD را تجزیه می‌کند (Foyer *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2009; Gill & Tuteia, 2010). نتایج حاصل از این بررسی از نظر میزان فعالیت آنزیم CAT حاکی از افزایش مقادیر این آنزیم پس از آلودگی به *A. alternata* در هر پنج رقم موردبررسی است که افزایش آن در ارقام مقاوم تفاوت مثبت معنی‌داری با رقم حساس دارد. مقدار فعالیت این آنزیم در تمام بازه‌های زمانی اندازه‌گیری شده با اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد کمتر از دو آنزیم GPX و APX بوده است. نتایج پژوهش حاضر در ارتباط با افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه در واکنش به آلودگی به عامل بیماری‌زای نکروتروف به‌منظور کاهش خسارت اکسیداتیو و همبستگی افزایش فعالیت این آنزیم در ارقام مقاوم با نتایج جیا و همکاران (Jia *et al.*, 2010)، چنگ و همکاران (Cheng *et al.*, 2011)، دبونا و همکاران (Debona *et al.*, 2012)، حنیفی و همکاران (Hanifei *et al.*, 2013)، لوبینا و موروگان (Lubaina & Murugan, 2012) و آل کومی (El-Komy, 2014) مطابقت دارند. فعالیت GPX یک نشانگر شیمیایی است که ممکن است بخشی از مقاومت باشد ولی می‌تواند برای پیش‌بینی مقاومت به بیماری نیز به کار گرفته شود (Shimoni *et al.*, 1991). لذا بر اساس نتایج این بررسی، افزایش فعالیت آنزیم GPX در گیاهان مقاوم و حساس، در کل یک نوع پاسخ به تنش اعمال شده بوده که سبب تحریک پراکسیدازهای جاروب‌کننده  $H_2O_2$  می‌گردد. افزایش فعالیت آنزیم GPX در این پژوهش را نمی‌توان به‌طورقطع به فعالیت جاروب‌کنندگی آن نسبت داد. لذا برای اطمینان بیشتر از نحوه عملکرد این آنزیم انجام پژوهش‌ها در سطح پروتئین و شناسایی ایزوزیم‌های این آنزیم و نحوه عملکرد آن‌ها تحت تنش، پیشنهاد می‌شود.

### سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری است.

بر اساس نتایج این پژوهش میزان فعالیت آنزیم GPX در ارقام مقاوم، دارای حساسیت متوسط و رقم حساس پس از آلودگی با قارچ *A. alternata* افزایش داشته است و ارقام مختلف در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند. بیشینه فعالیت این آنزیم در رقم مقاوم زرشکی و کمترین آن در رقم حساس اوتونو بوده است. نتایج بررسی حاضر از نظر همبستگی افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه در واکنش به ایجاد بیماری و افزایش مقادیر آن در ارقام با مقاومت بالاتر نسبت به ارقام حساس‌تر با نتایج یانگ و همکاران (Yong *et al.*, 1995)، هی و وولین (He & Wolyn, 2005)، آنجنا و همکاران (Anjana *et al.*, 2008)، محمود و همکاران (Mahmoud *et al.*, 2012)، حنیفی و همکاران (Hanifei *et al.*, 2013) و لوبینا و موروگان (Lubaina & Murugan, 2012) مطابقت دارند. آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) نقش بسیار مهمی را به‌عنوان واسطه سیگنال‌دهی، برای فعال کردن اتفاقات پایین‌دست از جمله بیان ژن برای ایجاد مقاومت به تنش بازی می‌نماید (Bowler *et al.*, 1992). آنزیم‌های کاتالاز از بین برنده  $H_2O_2$  در میتوکندری بوده درحالی‌که APX آنزیم اصلی چرخه آسکوربات-گلوتاتیون است که در سرکوب کردن تجمع  $H_2O_2$  در کلروپلاست، سیتوزول، پراکسی زوم و آپوپلاست و محافظت سلولی نقش دارد (Shigeoka *et al.*, 2002). در بررسی حاضر مقدار آنزیم APX در هر پنج رقم موردبررسی پس از آلودگی با *A. alternata* افزایش یافته است که مقادیر آن در ارقام با مقاومت بالا بیش از رقم حساس است. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج مندل و همکاران (Mandal *et al.*, 2008)، حنیفی و همکاران (Hanifei *et al.*, 2013)، لوبینا و موروگان (Lubaina & Murugan, 2012)، آل کومی (El-Komy, 2014) و جی و همکاران (Ge *et al.*, 2014) در ارتباط با افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان پس از آلودگی با عوامل بیماری‌زای نکروتروف و ارتباط مقدار فعالیت این آنزیم در کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از بیماری همخوانی دارند. کاتالاز یکی از اجزای سامانه

## REFERENCES

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Method in Enzymology*, 105, 121-126.
2. Aghajani, M. A. (2009). Stemphylium leaf blight of broad bean in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 91, 103.
3. Aghajani, M. A., Razi Nataj, M. & Mohammadi, H. (2009) *Guide of Faba Bean Disease Identification and management*. Gorgan Ershad Publication. (in Farsi)
4. Allen, A. C. & Fluhr, R. (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *The Plant Cell*, 9, 1559-1572.
5. Amini, Z., Moalemi, N. A. & Saadati, S. (2014). Effects of water deficit on proline content and activity of antioxidant enzymes among three olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Journal of Plant Research*, 27 (2), 156-167. (in Farsi)
6. Anjana, G., Kini, K. R., Shetty, H. S. & Prakash, H. S. (2008). Changes in Peroxidase activity in sunflower during infection by necrotrophic pathogen *Alternaria helianthi*. *Phytopathology and plant protection*, 41, 586-596.
7. Anonymous. (2013). FAO Statistics. <http://data.fao.org/>.
8. Bowler, C., Van Montagu, M. & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 83-116.
9. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
10. Campbell, C. L. & Madden, L. V. (1990) *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. Wiley-Interscience Publication.
11. Chaudiere, J. & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidant: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chemical Toxicology*, 37, 949-962.
12. Cheng, D. D., Jia, Y. J., Gao, H. Y., Zhang, L. T., Zhang, Z. S., Xue, Z. C. & Meng, Q. W. (2011). Characterization of the programmed cell death induced by metabolic products of *Alternaria alternata* in tobacco BY-2 cells. *Physiologia Plantarum*, 141(2), 117-129.
13. Darvishzadeh, R., Arjomand, N., Najafzadeh, R. & Heydari, R. (2018). Evaluation of biochemical changes and enzymatic activity of sunflower (*Helianthus annuus* L.) susceptible and resistant lines in response to Sclerotinia disease. *Journal of Plant Research*, 31 (3): online. (in Farsi)
14. Debona, D., Rodrigues, F. Á., Rios, J. A. & Nascimento, K. J. (2012). Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 102(12), 1121-1129.
15. Dixon, D. P., Cummins, I., Cole, D. J. & Edwards, R. (1998). Glutathione-mediated detoxification system in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 258-266.
16. Dubey, S. C. & Patel, B. (2000). Mode of perpetuation and spread of *Alternaria* blight of broad bean. *Indian Phytopathology*, 53(2), 175-177.
17. El-komy, M. H. (2014). Comparative Analysis of Defense Responses in Chocolate Spot-Resistant and -Susceptible Faba Bean (*Vicia faba*) Cultivars Following Infection by the Necrotrophic Fungus *Botrytis fabae*. *Plant Pathology Journal*, 30(4), 355-366.
18. Esfandiari, E., Mahboob, S. & Shekari, F. (2009) *Plant Physiology*. Amidi Publication, Tabriz. (in Farsi)
19. Filipowicz, A. (1984). Occurrence of fungus disease of faba bean (*Vicia faba* L. var. major Harz) in the field. *Biuletyn Warzywniczy*, 27, 393-416.
20. Foyer, C. H. & Harbinson, J. (1994) Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In C.H. Foyer and P.M. Mullineaux (eds.), Causes of photo-oxidative stress and amelioration of defense systems in plants. (pp. 1-42). Boca Raton, FL: CRC Press.
21. Ge, Y., Guest, D. I. & Bi, Y. (2014). Differences in the Induction of defence responses in resistant and susceptible muskmelon plants infected with *Colletotrichum lagenarium*. *Journal of Phytopathology*, 162, 48-54.
22. Gill, S. S. & Tuteja, N. (2010). Review Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
23. Gurha, S. N., Misra, D. P., Shrivastava, Y. C., Shukla, A. K. & Misra, R. (1981). A new record of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler on *Vicia faba* Linn. and sources of resistance. *Indian journal of agricultural science*, 51(12), 904-906.
24. Hanifei, M., Dehghani, H. & Choukan, R. (2013). The Role of Antioxidant Enzymes and Phenolic Compounds in Disease Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* Race 1.2. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(8), 1985-1996.
25. He, C. Y. & Wolyn, D. J. (2005). Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi*. *Plant Pathology*, 54: 227-232.

26. Hibbett, D. S. (2003). Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transaction of the Mycological Society of Japan*, 33, 533-577.
27. Jeger, M. J. (2004). Analysis of disease progress as a basis for evaluating disease management practices. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 61-82.
28. Jia, Y. J., Cheng, D. D., Wang, W. B., Gao, H. Y., Liu, A. X., Li, X. M. & Mang, Q. W. (2010). Different enhancement of senescence induced by metabolic products of *Alternaria alternata* in tobacco leaves of different ages. *Physiologia Plantarum*, 138(2), 164-175.
29. JinHyeuk, K. & ChangSeuk, P. (2002). Leaf spot of broad bean (*Vicia faba*) caused by *Alternaria tenuissima*. *Research in plant disease*, 8(2), 117-119.
30. Khosravi, H. (2016). Evaluation of some physiological characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* native to soils of Iran. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 28 (4), 513-523. (in Farsi).
31. Lubiana, A. S. & Murugan, K. (2012). Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between sesame (*Sesamum indicum* L.) in response to *Alternaria sesame*. *International journal of advanced biological research*, 2, 86-91.
32. Mahmoud, M. A., Al-Sohaibani, S. A., Al-Othman, M. R., & Abd El-Aziz, A. R. M. (2012). Biochemical screening of chocolate spot disease on faba bean caused by *Botrytis fabae*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(32), 6122-6129.
33. Mandal, S., Mitra, A. & Mallick, N. (2008). Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 56-61.
34. Mansour, K. 1980. Chemical control of rust and leaf spots of field beans (*Vicia faba* L.). *Agricultural research review*, 58(2), 49-56.
35. Mishra, N. I., Mishra, R. K. & Singhal, G. S. (1995). Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of in heat leaves to strong visual light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiology*, 102, 903-910.
36. Moeller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H. & Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 22, 6115-6116.
37. Moghasem, M., Aghajani, M. A. & Sheikh, F. (2014). Evaluation of different Faba bean genotypes reaction against leaf diseases in Gorgan region. In: Proceedings of 5<sup>th</sup> Iranian Pulse Crops Conference, 26 Feb., Karaj, Iran, pp. 697-700. (In Farsi)
38. Mohamed, H., EL-Hady, A. A., Mansour, M. & EL-Samawaty, A. E. (2012). Association of oxidative stress components with resistance to flax powdery mildew. *Tropical Plant Pathology*, 37, 386-392.
39. Mostafa, M., Sharifnabi, B., Esmaeili, A. & Safaie, N. (2010). Role of *abreatr1* gene in protective mechanism and pathogenicity of *Alternaria brassicae*, the causal agent of leaf spot in canola using real time PCR. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 46(4), 283-292. (in Farsi).
40. Nikraftar, F., Taheri, P., Rastegar, M. F. & Tarighi, S. (2013). Tomato partial resistance to *Rhizoctonia solani* involves antioxidative defense mechanisms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 81, 74-83.
41. Pan, Y., Jun Wu, L. & Liang Yu, Z. (2006). Effect of salt and drought stress on antioxidant enzyme activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant Growth Regulation*, 49, 157-165.
42. Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24, 255-265.
43. Sabaghpour, S. H. (1995). Study of plant density effect on Barkat faba bean yield. *Seed and Plant Journal*, 11(4), 9-13. (in Farsi).
44. Sairam, R. K., Veerabhadra Rao, K. & Srivastava, G. C. (2002). Differential of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163, 1037-1046.
45. Saleem, A., El-Said, A. H. M., Maghraby, T. A. & Hussein, M. A. (2012). Pathogenicity and Pectinase Activity of Some Facultative Mycoparasites Isolated from *Vicia faba* Diseased Leaves in Relation to Photosynthetic Pigments of Plant. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 3(6), 141. doi:10.4172/21577471.1000141
46. Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T. & Yabuta, Y. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1305-1319.

47. Shimoni, M., Bar-Zur, A. & Reuveni, R. (1991). The association of peroxidase activity and resistance of maize to *Exserohilum triticum*. *Journal of Phytopathology*, 131, 315-321.
48. Simmons, E. G. (1967). Typification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Mycologia*, 59, 67-92.
49. Simmons, E. G. (2007) *Alternaria: an identification manual*. American Society of Microbiology.
50. Tivoli, B., Baranger, A., Avila, C. M., Banniza, S., Barbetti, M., Chen, W., Davidson, J., Lindeck, K., Khar-rat, M., Rubiales, D., Sadiki, M., Sillero, J. C., Sweetingham, M., & Muehlbauer, F. J. (2006). Screening techniques and sources of resistanceto foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica*, 147, 223-253.
51. Tong, W. & Newton, R. J. (2005). Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. *Plant Pysiology and Biochemistrty*, 43, 760-769.
52. Yong, T., Zongsuo, L., Hongbo, S. & Feng, D. (2006). Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix astragali* at seedling stage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49, 60-65.
53. Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. & Shigeoka, S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, 123(1), 223-233.
54. Zhu, Z., Liang, Z. & Han, R. (2009). Saikosaponin accumulation and antioxidative protectionin drought-stressed *Bupleurum chinense* DC. plants. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 326-333.