

اولین گزارش از وجود نژادهای ۲ و ۴ *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* عامل بیماری زردی و پژمردگی نخود در ایران

حمیدرضا پورعلی بابا^{۱*}، مژگان تبریزی وند طاهری^۱، فرشید محمودی^۲، عباسعلی روانلو^۳، بهرام سامانی کمانگر^۴، صبا کوکب^۱، محمد کوهستانی^۱

- ۱- مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران.
- ۲- مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، معاونت سرارود کرمانشاه، ایران.
- ۳- مؤسسه تحقیقات کشاورزی گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
- ۴- بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، سنندج، ایران.

چکیده مبسوط

مقدمه: نخود (*Cicer arietinum* L.) با دارا بودن مقادیر بالای پروتئین و مواد معدنی ارزشمند از اقلام مهم در سبد غذایی مردم ایران محسوب می‌گردد. این محصول به دلیل سازگار بودن با شرایط سخت اقلیمی دیمزارهای کشور، در بیش از پانصد هزار هکتار از اراضی دیم ایران کشت می‌شود. نخود، مهم‌ترین محصول حبوبات دیم کشور بوده و به دلیل در تناوب قرار گرفتن با غلات نقش مهمی در پایداری کشاورزی این مناطق دارد. بیماری زردی و پژمردگی نخود با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* از مهم‌ترین بیماریهای این گیاه بوده و باعث کاهش کمی و کیفی تولید در کلیه مناطق تحت کشت این محصول در ایران می‌شود. مؤثرترین و اقتصادی‌ترین شیوه مدیریت و کنترل این بیماری، تولید و استفاده از ارقام مقاوم است. **روش‌شناسی:** در این بررسی تعداد ۹۲ مزرعه مشکوک به بیماری که علائم زردی و پژمردگی را نشان می‌دادند بازدید شد و تعدادی نمونه آلوده با ثبت مشخصات از مناطق مختلف غرب و شمالغرب کشور جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه اقدام به جداسازی و خالص‌سازی بیمارگر از آنها شده و اثبات بیماریزایی بر روی رقم حساس انجام گرفت. برای شناسایی جدایه‌ها، در گام نخست از روش‌های کلاسیک مبتنی بر مشخصه‌های ریخت‌شناسی و با استفاده از کلیدهای تاکسونومیکی و در گام دوم از روش‌های مبتنی بر تکنیک‌های مولکولی استفاده شد.

یافته‌های پژوهش: بر مبنای روش‌های کلاسیک، تعلق تمام نمونه‌ها به‌عنوان گونه‌هایی از جنس فوزاریوم (*Fusarium* spp.) نشان داده‌شد. بر اساس کلیدهای تاکسونومیک و ریخت‌شناسی، ۳۹ جدایه به عنوان *F.oxysporum* شناسایی شدند. متعاقباً و با استفاده از یک نشانگر مولکولی تعلق ۳۲ جدایه به فرم مخصوص (*forma specialis*) نخود تأیید گردید. در گام نهایی، با استفاده از نشانگرهای اختصاصی، تعداد ۱۵ جدایه به عنوان نژادهای 1B/C، ۲، ۴ و ۶ شناسایی شدند. این نتایج نشانگر وجود نژادهای ۲ و ۴ در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده است که اولین گزارش از حضور آنها در ایران به شمار می‌رود. این یافته می‌تواند در تولید ارقام مقاوم به بیماری برای مناطق آلوده کشور کاربرد داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: تعیین نژاد، مارکر مولکولی، پرایمر، مورفولوژی، کلید تاکسونومیکی



* نگارنده مسئول: hpouralibaba@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

نخود (*Cicer arietinum* L.)، سومین محصول مهم حبوبات است که به دلیل دارا بودن پروتئین زیاد در دانه (حدود ۲۳٪) در اغلب نقاط جهان (بیش از ۵۹ کشور) کشت می‌شود (FAO, 2020). نخود یک گیاه خود گشن دیپلوئید ($2n = 2x = 16$) متعلق به خانواده فاباسه (لگومینوز) است که به دو تیپ عمده کابلی (درشت دانه و سفید) و دسی (ریز دانه و رنگی) تقسیم‌بندی می‌شود. کشور ایران با داشتن ۵۰۶ هزار هکتار و تولید یک میلیون و صد و نود و نه هزار تن بزرگترین تولید کننده در منطقه غرب آسیا به شمار می‌رود. متوسط عملکرد جهانی آن در سال ۲۰۱۹، کمی بیش از یک تن در هکتار بود که فاصله‌ی قابل توجهی با متوسط تولید ایران یعنی ۴۴۰ کیلوگرم دارد (FAO, 2020). از مهم‌ترین دلایل پائین بودن میزان عملکرد محصول در کشور علاوه بر مسائل مدیریتی مانند مکانیزاسیون، هزینه تولید و ... می‌توان به تنش‌های غیر زیستی و زیستی اشاره کرد. از مهم‌ترین عوامل تنش زیستی، بیماری پژمردگی فوزاریومی با عامل FOC است که از ۳۲ کشور از ۶ قاره جهان گزارش شده است (Singh and Sharma, 2002). این بیماری قادر به ایجاد خسارت ۱۰ تا ۹۰ درصدی بر روی محصول است (Haware and Nene, 1980; Jiménez-Díaz et al., 1989; Singh and Reddy, 1991). دو پاتوتایپ عمده براساس توانایی تولید علائم زردی یا پژمردگی تا به حال شناسایی شده‌است. سندرم زردی با علائم زردی شاخ و برگ آهسته-پیش‌رونده و مرگ دیرهنگام از سندرم پژمردگی که با کلروز سریع و شدید، پلاسیدگی، تغییر رنگ آوندی و مرگ‌زود هنگام همراه است، متمایز می‌شود (Trapero-casas and Jiménez-Díaz, 1985). علاوه بر پاتوتایپ-ها، هشت نژاد فیزیولوژیک شامل نژادهای صفر، 1A، 1B/C، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ بر مبنای عکس‌العمل ۱۰ رقم افتراقی قابل تفکیک هستند (Haware and Nene, 1989; Jimenez-Diaz et al., 1982). اخیراً سامانه‌ای از ارقام افتراقی مشتمل بر ۸ لاین / رقم نخود که چهار لاین آن خویش آمیخته نوترکیب حاصل تلاقی ارقام WR315 (مقاوم به بیماری) و C-104 (حساس به بیماری) هستند برای تمایز نژادهای بیماری معرفی شده‌اند

(Sharma et al., 2005). نژادهای صفر و 1B/C تولید زردی و بقیه باعث پژمردگی در گیاه می‌شوند (Jiménez-Díaz et al., 1993). نژادهای ۱، ۲، ۳ و ۴ در هندوستان گسترش دارند (Dandale, 1982; Haware and Nene, 2021). نژادهای صفر، ۵ و ۶ برای اولین بار از اسپانیا گزارش شده‌اند (Jiménez-Díaz et al., 1989). علاوه بر آن؛ نژادهای صفر، 1A، 1B/C، ۵ و ۶ از حوضه دریای مدیترانه گزارش شده‌اند (Jiménez-Díaz et al., 1993; Halila and Strange, 1997, Alloosh et al., 2017). نژادهای ۲ و ۳ از ترکیه (Bayraktar and Shehabu et al., 2012)، ۲، ۳ و ۴ از اتیوپی (Dolar, 2012)، صفر، 1B/C، ۵ و ۶ از مکزیک (Arvayo-Ortiz, 2008)، صفر، 1B/C، ۴ و ۵ از عراق (Al-Taae et al., 2011)، و گزارش شده‌اند. از ایران نیز، شگری و همکاران (Shokri et al., 2020) وجود پنج نژاد صفر، 1A، 1B/C، ۶ و ۵ را گزارش کرده‌اند. در یک بررسی دیگر حضور نژادهای صفر و 1B/C از استان کردستان گزارش شده است (Naeim Abadi et al., 2022).

مقاومت برای نژادهای خاص این قارچ به خوبی شناخته و توصیف شده‌است که به صورت تک یا چند ژنی می‌باشد که مفصلاً توسط جندوبی و همکاران (Jendoubi et al., 2017) تشریح گردیده‌است. از آنجایی که شناخت الگوی پراکنش نژادها در مناطق مختلف و نیز مشخص بودن نوع نژاد در غربال ژنوتیپ‌های نخود طی فرآیند اصلاح برای مقاومت از مبانی مدیریت و مهار این بیماری است، این تحقیق در مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور به منظور شناسایی نژادهای عامل بیماری بر روی نمونه‌های گیاهی که اخیراً از مناطق مختلف غرب و شمالغرب کشور جمع آوری شده بودند، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، شناسایی و خالص‌سازی جدایه‌ها: نمونه برداری با یک روش بصری و پیمایش زیگزاگی شکل که در آن در هر چند گام؛ بسته به وسعت مزرعه توقف کرده و از بوته‌های آلوده یا مشکوک نمونه‌برداری انجام می‌شد، صورت گرفت. درصد وقوع بیماری و شدت آن که به ترتیب عبارت است از تعداد یا نسبت یک جمعیت گیاهی که تحت

میخک در محیط برگ میخک - آگار منتقل شده و تحت همان شرایط مذکور نگهداری شدند. در نهایت، ساختارهای مورفولوژیکی اجزای قارچ (شکل، طول و عرض ماکرو و میکروکنیدی، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور و نحوه آرایش آنها، اندازه و شکل فیالید) در زیر میکروسکوپ (اولمپوس مدل BH2) تعیین گردید. برای عکس برداری از دوربین عکاسی دیجیتالی نیکون مدل 1300-D استفاده شد و با کلیدهای شناسایی تاکسونومیک (Leslie and Summerell, 2006; Nelson et al., 1983) مقایسه شدند. شناسایی با استفاده از روش مولکولی: جدایه‌هایی که از نظر ریخت‌شناسی و با استفاده از روش‌های کلاسیک به عنوان *F. oxysporum* تشخیص داده شده بودند به این منظور انتخاب شدند.

تهیه هیف قارچی: به منظور استخراج DNA قارچی از هیف قارچ استفاده شد. بدین منظور، برای تهیه توده‌های هیف از محیط مایع آبگوشت سیب زمینی دکستروز (عصاره سیب‌زمینی ۲۰۰ گرم، دکستروز ۲۰ گرم، آب ۱ لیتر) استفاده گردید که در طی آن ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط مذکور با اسپورها یا قطعات هیفی قارچ مورد نظر مایه‌زنی شده و به مدت ۳ تا ۶ روز بسته به جدایه مورد نظر بر روی شیکر انکوباتوردار در دمای ۲۷ درجه به هم‌زده شدند. قطعات هیفی با گذراندن مایع از دو لایه پارچه لمل و دو بار شست و شو با آب مقطر استریل، در فویل آلومینیومی به ازت مایع منتقل شدند و سپس در اسرع وقت استخراج صورت گرفت.

استخراج DNA: برای استخراج ژنوم از روش پیشنهادی دلاپورتا و همکاران (Dellaporta et al., 1983) با اندکی تغییرات استفاده شد. کیفیت DNA تولیدی با استفاده از ژل الکتروفورز سنجیده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز PCR: قطعات خاصی از DNA ی قارچی با استفاده از آغازگر اختصاصی FOC0-12f/ FOC0-12r (Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003) تحت چرخه‌های دمایی خاص تکثیر شده و

تأثیر بیماری قرار گرفته‌است، و سطح گیاه یا هر یک از اندام‌های گیاهی تحت تأثیر بیماری؛ در حین نمونه برداری یادداشت برداری گردید. همچنین، مشخصاتی مانند محل نمونه برداری، مختصات جغرافیایی (طول، عرض و ارتفاع از سطح دریا)، رقم گیاه زراعی (در صورت مصاحبه با زارع) و تاریخ نمونه برداری یادداشت شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه کدهای مربوطه را گرفته و در شرایط طبیعی آزمایشگاه هر چند روز یک‌بار هوادهی شده و خشک شدند. تعدادی نمونه دیگر از کلکسیون‌های مواد آلوده گیاهی در استان‌های کردستان و ایلام دریافت گردید که بدون مشخصات فوق‌الذکر بودند (جدول ۱).

جداسازی بیمارگر: اندام ریشه نمونه‌های گیاهی از بوته جدا شده و پس از شستشو زیر آب شیر و خشک شدن در دمای اتاق، با محلول نیم درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه ضد عفونی سطحی گردیده پس از آبکشی و خشک شدن در طشتک‌هایی به قطر ۷ سانتی‌متر حاوی محیط کشت عمومی QPDA (Salas et al., 1999) کشت شده و در در دمای ۲۵ - ۲۰ درجه زیر رژیم نوری ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی و نور حاصل از لامپ سیاه نزدیک ماوراء بنفش (به منظور تسریع در اسپوردهی) به مدت ۱۰ تا ۲۰ روز نگهداری شدند. پس از اسپوردهی که معمولاً پس از ۷ تا ۲۰ روز بعد از کشت شروع می‌شد، خالص‌سازی نمونه‌ها با استفاده از روش تک اسپور انجام گرفت (Goh, 1999). برای نگهداری دراز مدت و انبار جدایه‌ها، از سوسپانسیون اسپور ریخته شده بر روی قطعات کاغذ صافی استریل و سپس خشک کردن آن‌ها در شرایط استریل استفاده شد. پس از خشک شدن، قطعات کاغذ حاوی کلنی قارچ به کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار در ابعاد ۴ × ۸ سانتی‌متر منتقل شدند و در یخچال در دمای ۲۰°C - نگهداری شدند.

شناسایی با استفاده از روش‌های کلاسیک: در این روش، مشخصات مورفولوژیکی پرگنه (مانند رنگ سطح زیرین و زبرین، شکل، اندازه، نوع حاشیه و ...) بر روی QPDA یادداشت برداری شد (McKnight and Rayner, 1972). کلنی‌های خالص قارچی به روی قطعات برگ

جدول ۱ - مشخصات نمونه‌های قارچی شناسایی شده به عنوان *Fusarium oxysporum* با استفاده از روش های کلاسیک و ریخت شناسی از بین ۹۳ نمونه جمع آوری شده اولیه دارای علائم زردی و پژمردگی نخود از مناطق غرب و شمالغرب کشور در طی سال ۱۴۰۰-۱۳۹۷

Table 1- Identities of the fungal isolates identified as *Fusarium oxysporum* using classical and morphological methods obtained from 93 preliminary samples showing yellow and wilt symptoms collected from west and north -west of Iran during 2018-2021

شماره No.	جدایه Isolate	محل جمع آوری Sampling Location			تاریخ Date	رقم Variety	وقوع % Incidince%	شدت Severity	نژاد Race
		محل Location	مختصات جغرافیایی Geographical coordinates	ارتفاع (متر) Elevation (m)					
1	C-1	آتی کندی کلیبر	39 03 13 N 47 13 50 E	893	97/3/5	محلی	20	2†	ناشناس
2	C-5	نالوس اشنویه	36 58 51 N 45 07 13 E	1591	97/3/6	لب لب	20	4	ناشناس
3	C-6	نقده-پیرانشهر	36 56 36 N 45 19 39 E	1430	97/3/6	محلی	30	2	ناشناس
4	C-15	ایستگاه چرداول ایلام	33 27 46 N 46 34 46 E	1021	97/3/2	لاین	10	2	ناشناس
5	C-48	آتی کندی کلیبر	39 03 04 N 47 13 30 E	908	97/3/5	محلی	30	2	ناشناس
6	C-54	خورم آباد اورمیه	37 25 32 N 45 04 25 E	1417	97/3/15	محلی	20	4	4
7	C-56	ایستگاه دیم اورمیه	37 25 32 N 45 04 25 E	1417	97/3/31	لاین	20	2	ناشناس
8	C-75	روستای گل مراغه	37 17 29 N 46 28 24 E	1021	96/4/16	کاکا	70	4	ناشناس
9	C-91	روستای قوش قیه سی مراغه	37 7 16 N 46 27 23 E	1706	99/3/11	کاکا	100	4	ناشناس
10	C-93	علی آباد هرسین	34 23 30 N 47 32 10 E	1333	99/3/10	محلی	نا معلوم	4	4
11	C-97-1	چقاکیود-کرمانشاه	34 20 50 N 46 41 21 E	1362	99/3/8	محلی	نا معلوم	4	ناشناس
12	C-100	سرارود کرمانشاه	34 19 35 N 47 20 09 E	1419	99/3/10	محلی	نا معلوم	4	4
13	C-101-1	گوآور گیلانغرب	34 00 48 N 46 20 13 E	1532	99/3/6	محلی	نا معلوم	4	ناشناس
14	C-102	حسن آباد اسلام آباد غرب	34 10 38 N 46 40 12 E	1507	99/3/6	محلی	نا معلوم	4	2
15	C-103	کانی سفید روانسر	34 41 02 N 46 33 20 E	1352	99/3/8	محلی	نا معلوم	4	4
16	C-104-2	سقز، صاحب	36 12 00 N 46 28 47 E	1534	98/5/1	محلی	20	4	ناشناس
17	C-106	کامیاران، گشکی	34 53 24 N 46 45 00 E	1629	98/2/30	محلی	20	3	ناشناس
18	C-107-1	گریزه، ایستگاه	32 16 12 N 47 01 12 E	1383	98/3/11	محلی	20	4	ناشناس
19	C-108-1	دیواندره-دا	35 29 30 N 47 02 41 E	1645	98/5/1	محلی	نا معلوم	2	ناشناس

†: Symptoms on a yellowed and wilted plant, 0=0%, 1=1 to 33%, 2 = 34 to 66%, 3 = 67 to 100%, 4=dead plant (Jimenez-Diaz *et al.*, 1989)

جدول ۱- ادامه
Table 1. Continued.

20	C-108-2	دیواندره-دا	35 29 30 N 47 02 41 E	1645	98/5/1	محلی	نا معلوم	4	ناشناس
21	C-119	دریافتی از کردستان	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	4	ناشناس
22	C-121	دریافتی از کردستان	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	4	4
23	C-126	دریافتی از کردستان	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	4	1B/C
24	C-128	دریافتی از کردستان	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	4	2
25	C-129	دریافتی از کردستان	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	4	2
26	C-131	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	ناشناس
27	C-133	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	ناشناس
28	C-135	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	ناشناس
29	C-136	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	2
30	C-142	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	ناشناس
31	C-143	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	ناشناس
32	C-145	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	4
33	C-146	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	4
34	C-147	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	ناشناس
35	C-149	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	2
36	C-155	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	ناشناس
37	C-156	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	ناشناس
38	C-157	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	4
39	C-158	دریافتی از ایلام	نا معلوم	نا معلوم	نا معلوم	محلی	نا معلوم	نا معلوم	6

†: Symptoms on a yellowed and wilted plant, 0=0%, 1=1 to 33%, 2 = 34 to 66%, 3 = 67 to 100%, 4=dead plant (Jimenez-Diaz *et al.*, 1989)

سپس روی ژل آگاروز ۰.۲٪ الکتروفورز شدند. این نشانگر امکان شناسایی جدایه‌های متعلق به *F. oxysporum* f. *ciceris* sp. را فراهم می‌ساخت. درگام دوم برای شناسایی نژاد، از نشانگرهای اختصاصی Foc Race 5، Foc Race 6، FDP11 (Race 2)، FDP1 (Race 4)، Foc Race 1A/B، Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003;) (Poornima et al., 2017) استفاده شد.

برنامه حرارتی واکنش PCR برای آغازگرهای FOC شامل یک چرخه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۳۶ چرخه واسرشت در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای متناسب با آغازگر (جدول ۲) به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه با یک بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۶ دقیقه بود. برای آغازگرهای FDP این شرایط عبارت بود از: یک چرخه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۶ چرخه واسرشت در دمای ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه، اتصال در دمای متناسب با آغازگر (جدول ۲) به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه با یک بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۲ دقیقه.

اثبات بیماریزائی: برای این منظور از پرگنه قارچی ۱۰-۷ روزه جدایه‌ها که بر روی محیط QPDA کشت شده بود، استفاده شد که در طی آن پرگنه با کارد استریل همراه با ریختن آب مقطر استریل از سطح محیط کشت جدا شده، از پارچه ملامل استریل ۴ لایه رد شده و در سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس فاز بالایی بیرون ریخته شده و فاز پائین نگهداری شده و با تثبیت غلظت آن در تعداد نیم میلیون کنیدی در سی‌سی بر روی گیاهچه‌های نخود رقم کاکا در مرحله ۴ تا ۶ برگگی با برش نوک ریشه (Poualibaba et al., 2016)، مایه‌زنی انجام گرفت. سپس به اطاقک رشد در دمای ۲۲ و ۲۵ درجه روز / شب با رژیم نوری ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی و شدت نور $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ منتقل شده و در نهایت با محلول مغذی کود ۲۰-۲۰-۲۰ به غلظت ۲ در هزار آبیاری شدند. کود دهی هر هفته یکبار تا پایان آزمایش تکرار شد. آبیاری گلدان‌ها با ریختن آب شیر به داخل طشتک‌ها و

آبیاری از ته گلدان‌ها هفته‌ای دو بار انجام گرفت. تعداد ۳ گیاهچه (تکرار) با استفاده از جدایه مشخص تلقیح شده و تولید یا عدم تولید علائم زردی/ پژمردگی بررسی گردید.

نتایج

در این آزمایش ۹۳ نمونه مشکوک به آلودگی به بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* از مناطق مختلف شمالغرب و غرب کشور شامل استان‌های آذربایجان شرقی (۲۶ نمونه)، آذربایجان غربی (۱۴ نمونه)، کردستان (۱۵ نمونه)، کرمانشاه (۱۸ نمونه)، ایلام (۱۶ نمونه) و لرستان (۳ نمونه) جمع آوری شدند. در طی این بازدیدها مشخص شد که درصد وقوع بیماری در مناطق مختلف تفاوت داشته و از ۱ تا ۱۰۰ در نوسان است. بیشترین درصد آلودگی در روستای قوش قیه‌سی مراغه مشاهده شد (شکل ۱ و جدول ۱) که در آن کل مزرعه از بین رفته بود، اما به طور متوسط در مناطق مورد بررسی، ۱۷/۷۳٪ از مزارع آلوده به بیماری بودند.

شدت بیماری مشاهده شده بر روی ارقام و توده‌های محلی کشت شده در مزارع مذکور بین ۲ تا ۴ و میانگین ۳/۵ در مقیاس ۴ تایی بود. مطالعات مورفولوژیکی به ویژه بر مبنای شکل فیالید و نحوه تولید میکروکنیدی منجر به انتخاب ۳۹ جدایه مختلف با احتمال قوی تعلق به *F. oxysporum* شد. در این جدایه‌ها اندازه‌های کلامیدوسپور، ماکرو و میکرو کنیدی و اندازه و سرعت رشد کلنی‌های متفاوتی مشاهده گردید، به طوریکه حداقل و حداکثر طول، حداقل و حداکثر عرض و تعداد دیواره عرضی ماکروکنیدی‌ها به ترتیب $(8/5 \pm 3/5)$ ، $(9-6/5)$ ، $(3/5 \pm 0/5)$ (۲-۵ میکرون و $(1 \pm 3/5)$ ۷-۱ عدد بر آورد شد، در حالی که حداقل و حداکثر طول، و حداقل و حداکثر عرض میکروکنیدی‌ها به ترتیب (2 ± 9) ۱۷-۳ و $(0 \pm 2/5)$ ۴-۱ میکرون بود. حداقل و حداکثر طول، و حداقل و حداکثر عرض کلامیدوسپور به ترتیب $(2 \pm 8/5)$ ۲۰-۳ و (2 ± 8) ۱۸-۳ میکرون اندازه‌گیری شد. حداقل و حداکثر اندازه کلنی در روزهای هفتم تا پانزدهم پس از

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه جهت تعیین نژاد
Table 2- The specific primers used in this study to identify races

آغازگرها Primers	توالی (۵'-۳') Sequence (5'-3')	نقطه ذوب (درجه سانتیگراد) Melting Point (°C)	نژاد تعیین شده Identified Race	منبع Reference
Foc012f/Foc012r	F: GGC GTT TCG CAG CCT TAC AAT GAA G R: GAC TCC TTT TTC CCG AGG TAG GTC AGA T	58	-	Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003
FocR6-O2f/FocR6-O2r	F: GAG CAG TCA ATG GCA ATG G R: AGA GCA GGG TCA GCG TAG ATA	F (57) – R (61)	6	Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003
FocR5-L10f/FocR5-L10r	F: GGA AGC TTG GCA TGA CAT AC R: AAG CTT GGG CAC CCT CTT	F (58) – R (56)	5	Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003
FocR1B/C-N5f/FocR1B/C-N5r	F: GAG AGC AGG GTC AGC GTA GAT AG R: GCA GCA GAA GAG GAA GAA AAT GTA	F (66) – R (62)	1B/C	Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003
FDP-1	F: CTT GGT AGG GGG GAC AGA CAC GC R: CCA TTCCAC GCTCGA CAG ACC T	52-57	4	Poornima <i>et al.</i> , 2017
FDP-14	F: GAG CAG TCA ATG GCA ATG G R: AGA GCA GGG TCA GCG TAG ATA	52-57	2	Poornima <i>et al.</i> , 2017

جدول ۳- مشخصات ریخت‌شناسی و ساختارهای قارچی جدایه‌های شناسایی‌شده به عنوان *Fusarium oxysporum* بر روی نخود جمع‌آوری شده از مناطق غرب و شمال‌غرب ایران در طی سال ۱۴۰۰-۱۳۹۷

Table 3- Morphological and structures of the isolates identified as *Fusarium oxysporum* on chickpea collected from west and north -west of Iran during 2018-2021

شماره No.	جدایه Isolate	ماکروکنیدی Macroconidi				میکروکنیدی Microconidi				کلامیدوسپور Clamidospore				اندازه پرگنه Colony Size				
		تعداد دیواره عرضی Septate (Number)		طول (میکرون) Length (μ)	عرض (میکرون) Wide (μ)	طول (میکرون) Length (μ)	عرض (میکرون) Wide (μ)	طول (میکرون) Length (μ)	عرض (میکرون) Wide (μ)	طول (میکرون) Length (μ)	عرض (میکرون) Wide (μ)	ابعاد (سانتیمتر) Diameter (cm)						
		بیشینه Max	کمینه Min	بیشینه Max	کمینه Min	بیشینه Max	کمینه Min	بیشینه Max	کمینه Min	بیشینه Max	کمینه Min	بیشینه Max	کمینه Min	روبین Surface	زبرین Reverse	روز پس از تلفیح dai†		
1	C-1	4	1	41	9	4	3	17	5	4	3	n††	n	n	n	6	6	7
2	C-5	4	3	39	25	4	3	12	5	3	2	n	n	n	n	5	5	7
3	C-6	3	1	30	12	5	3	13	4	4	2	12	4	12	4	6	6	7
4	C-15	5	3	56	30	3	2	14	4	3	2	8	3	7	3	6	6	12
5	C-48	4	1	48	18	4	3	14	5	3	2	n	n	n	n	5	5	7
6	C-54	6	3	58	35	4	3	11	4	3	2	12	4	10	4	7	7	8
7	C-56	4	1	34	16	4	3	13	5	3	2	n	n	n	n	5	5	7
8	C-75	4	1	46	15	5	3	14	6	4	2	n	n	n	n	6	6	8
9	C-91	4	3	44	30	4	3	13	4	3	2	15	5	15	5	6	6	10
10	C-93	7	3	64	34	4	3	15	5	3	2	15	5	14	4	4	4	10
11	C-97	6	2	65	24	4	3	10	4	3	2	12	5	10	5	8	8	15
12	C-100	6	3	60	27	3	3	16	4	3	2	10	4	9	4	7	7	12
13	C-101	4	1	41	14	5	3	14	5	4	3	12	4	10	4	8	8	8
14	C-102	3	1	34	16	5	3	16	5	3	2	18	8	18	8	6	6	8
15	C-103	5	3	60	30	3	2	16	4	3	2	8	3	7	3	7	7	8
16	C-104-2	7	3	57	30	5	3	11	4	3	2	12	4	12	4	3	3	10
17	C-106	5	3	54	30	3	3	15	4	3	2	10	3	7	3	3	3	10
18	C-107-1	5	2	42	23	3	3	14	4	3	2	14	5	10	4	4	7	8
19	C-108-1	6	3	39	25	5	3	12	4	3	2	n	n	n	n	5	5	10

days after inoculation : †

††: عدم وجود اندام در پرگنه

جدول ۳- ادامه
Table 3. Continued.

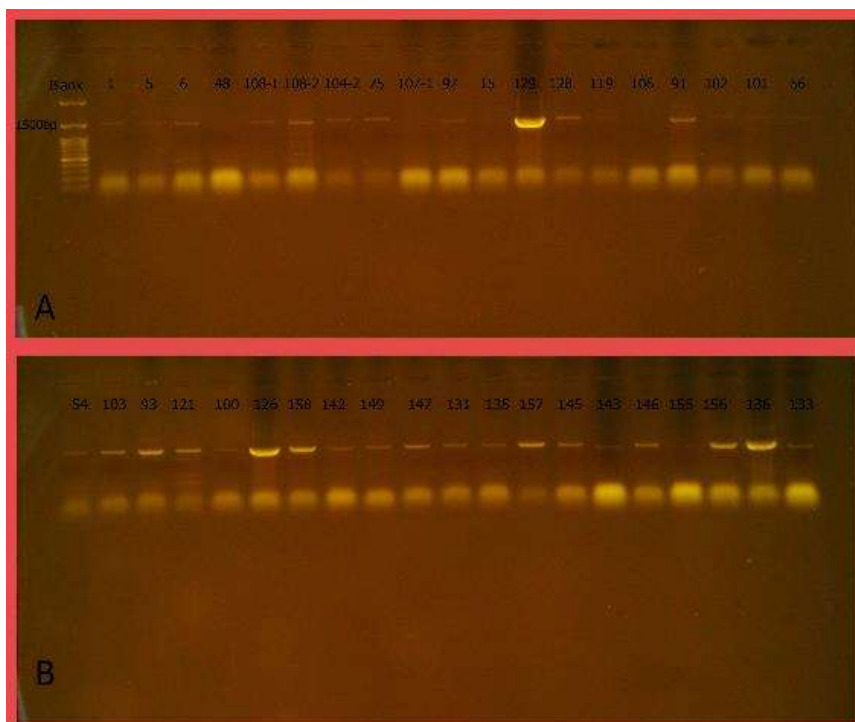
20	C-108-2	6	4	44	27	5	3	13	5	3	2	18	4	14	4	6	6	7
21	C-119	5	3	40	25	4	3	10	4	3	2	14	5	14	5	5	5	8
22	C-121	5	3	47	32	5	4	15	4	3	2	11	4	10	4	4	4	8
23	C-126	5	3	42	22	4	2	14	4	3	1	13	4	12	4	6	6	10
24	C-128	6	3	50	28	4	3	13	4	3	2	10	3	10	3	7	7	12
25	C-129	5	2	55	22	4	3	15	5	3	2	8	4	8	4	7	7	7
26	C-131	4	3	52	25	3	3	14	4	3	2	18	5	18	5	7	7	10
27	C-133	4	2	41	24	4	2	14	5	3	2	12	4	12	4	5	5	8
28	C-135	6	3	54	30	4	3	10	4	3	2	9	3	8	3	6	6	8
29	C-136	4	3	35	21	4	3	13	5	4	2	14	3	14	4	5	5	8
30	C-142	3	1	45	16	4	3	17	5	4	2	13	5	13	5	6	6	15
31	C-143	3	3	46	22	4	3	15	4	4	2	15	8	13	7	6	6	8
32	C-145	3	1	40	20	4	3	12	3	3	2	13	5	12	4	7	7	8
33	C-146	5	3	52	27	3	3	15	4	3	2	20	4	18	4	7	7	12
34	C-147	5	1	47	18	3	3	14	4	3	2	17	5	14	5	5	5	10
35	C-149	4	2	40	17	4	3	14	4	4	2	14	4	12	4	5	5	7
36	C-155	5	2	56	15	4	3	15	6	3	2	n	n	n	n	4	4	7
37	C-156	6	3	52	32	3	3	13	4	3	2	n	n	n	n	6	6	7
38	C-157	3	4	30	36	3	3	4	7	2	2	5	6	4	6	6	7	8
39	C-158	2	3	18	28	3	4	5	8	2	2	n	n	n	n	6	5	8
	Average	5	2	46	24	4	3	13	5	3	2	13	4	12	4	6	6	9
	Std.Dev.	1	1	10	7	1	0	3	1	0	0	3	1	3	1	1	2	2
	Max.	7	4	65	36	5	4	17	8	4	3	20	8	18	8	8	15	15
	Min.	2	1	18	9	3	2	4	3	2	1	5	3	4	3	3	3	7

نشان داد که ۵ جدایه C-129, C-128, C-102, C-149 و C-136 در ناحیه 1000bp تولید باند کردند که بدینوسیله به عنوان نژاد ۲ شناسایی شدند (شکل ۴). از ۲۶ جدایه باقی مانده که با آغازگرهای FOC R1-B/C و FDP-14 باندی تولید نکرده بودند، ۸ جدایه شامل C-121, C-54, C-103, C-93, C-100, C-157, C-145, C-146 با آغازگر FDP-1 (Poornima *et al.*, 2017) در ناحیه 2100 bp تولید باند کردند که به عنوان نژاد ۴ شناسایی شدند (شکل ۵). هیچ یک از جدایه‌های مورد مطالعه با آغازگر نژاد ۵ یعنی FocR5-L10f/FocR5-L10r (Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003) واکنش نشان ندادند اما از ۱۸ جدایه باقیمانده، تنها یک جدایه با آغازگر FOC R6-O2f/FOC R6-O2r که نژاد ۶ را شناسایی می‌کرد تولید باند در درازای 1000bp نمود (شکل ۶).

تلقیح نیز در هر دو سطح پشتی و رویی به ترتیب (۲ ± ۶) و ۱۵-۳ (۱ ± ۶) سانتی متر برآورد شد (جدول ۳). استفاده از آغازگر FOC0-12f/FOC0-12r (Jiménez-Díaz, 2003) برای تایید تعلق به فرم مخصوص FOC بر روی ۳۹ نمونه قارچی منجر به ایجاد باند به درازای 1500bp در ۳۲ نمونه گردید (شکل ۲). اثبات بیماریزایی تمامی این ۳۲ نمونه بر روی رقم حساس کاکا نشان داد که آنها قادر به تولید علائم زردی / پژمردگی بوده و بیماریزا هستند. کار تعیین نژاد با استفاده از مارکرهای مولکولی بر روی این ۳۲ جدایه، با آغازگر FOC R1B/C (Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003) شروع گردید و نتایج نشان داد که تنها یک جدایه (C-126) در ناحیه 500bp باند تولید می‌کند (شکل ۳). بدین ترتیب، ۳۱ جدایه وارد دور بعدی تعیین نژاد شدند که در طی آن با آغازگر FDP14 (Poornima *et al.* 2017) واکنش داده شدند. نتایج

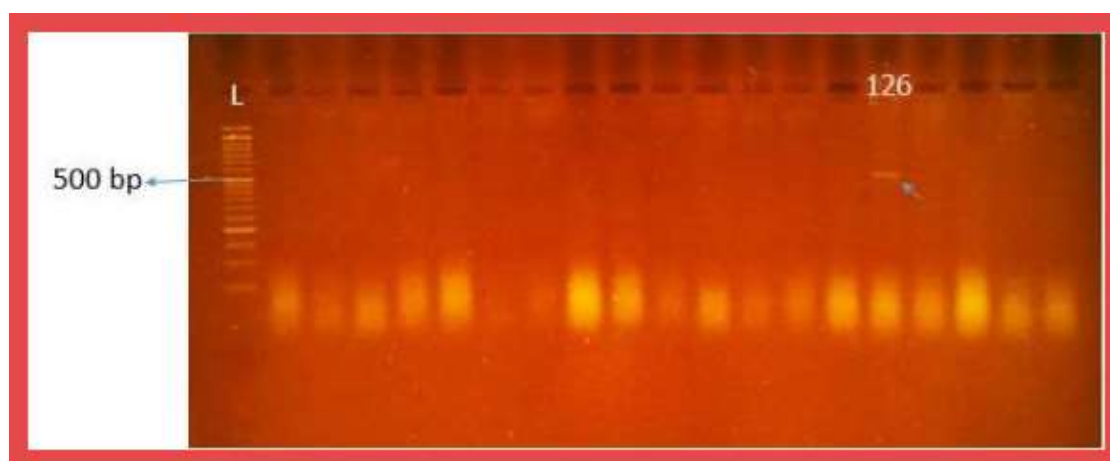


شکل ۱- آلودگی ۱۰۰٪ مزرعه توسط بیماری پژمردگی فوزاریومی و انهدام کل محصول، خرداد ۹۷، قوش قیبه سی، مراغه
Figure 1- Infestation of 100% field and total yield loss due to Fusarium wilt disease, June 2018, Qush-Qayasi, Maragheh province



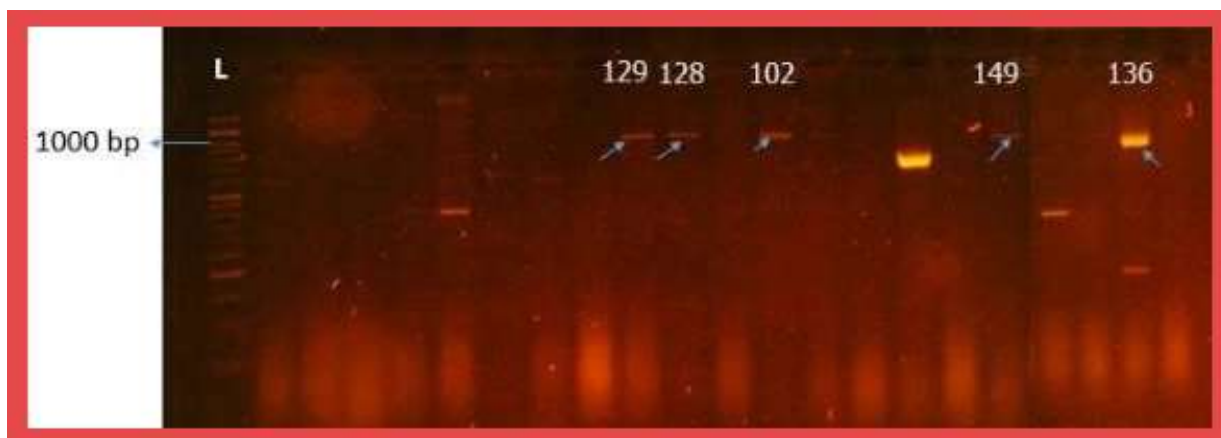
شکل ۲- A و B، باند DNA به درازای ۱۵۰۰ جفت باز بر روی ژل آگاروز ۲٪ تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر FOC0-12f/FOC0-12r متعلق به جدایه های قارچ شناسایی شده به عنوان *Fusarium oxysporum* با استفاده از روش های کلاسیک و مورفولوژیک برای تشخیص اختصاصی بودن آنها به عنوان فرم مخصوص نخود. شماره های بالا: کد جدایه ها، Blank: نشانگر اندازه DNA

Figure 2-A and B, DNA bands in 1500 bp on agarose gel 2% amplified by FOC0-12f/FOC0-12r primers belonging to the fungal isolates identified as *Fusarium oxysporum* using classical and morphological methods in order to their specific detection as forma specialis (f.sp.) of chickpea. Upper numbers: Codes of the isolates, Blank: Marker for DNA size



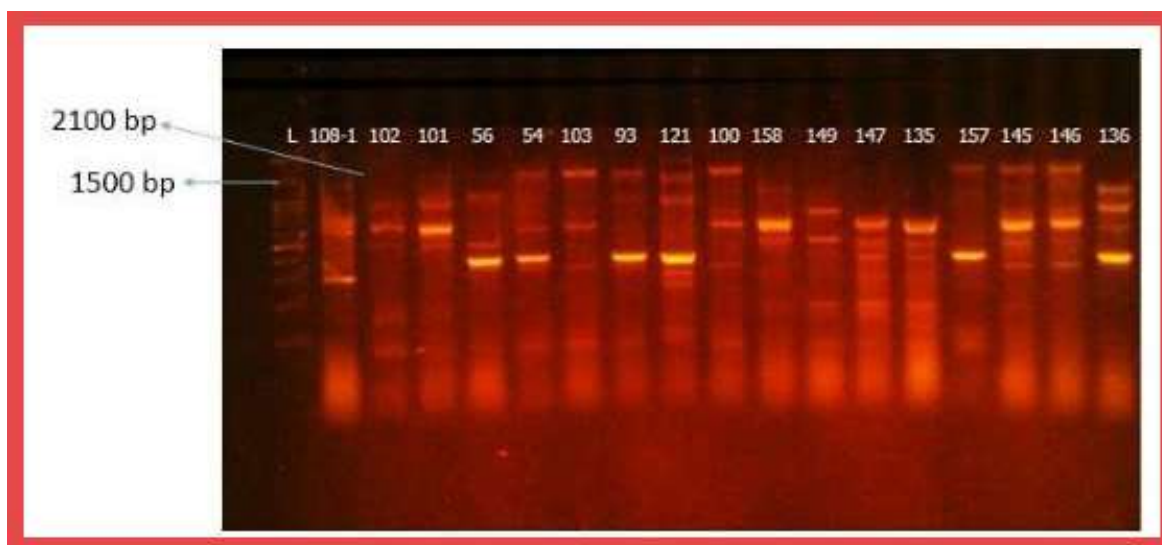
شکل ۳- ایجاد باند در ناحیه ۵۰۰ جفت باز بر روی ژل آگاروز ۲٪ با استفاده از جفت آغازگر FOC R1-B/C. جدایه C-126 عامل بیماریزای FOC تولید باند بسیار مشخص و اختصاصی کرده است که نشانگر تعلق آن به نژاد 1B/C است

Figure 3- DNA band of 500 bp on agarose gel 2% using FOC R1-B/C primer. Isolate C-126 of FOC generated highly-detective and specific band which shows it's belonging to race 1B/C



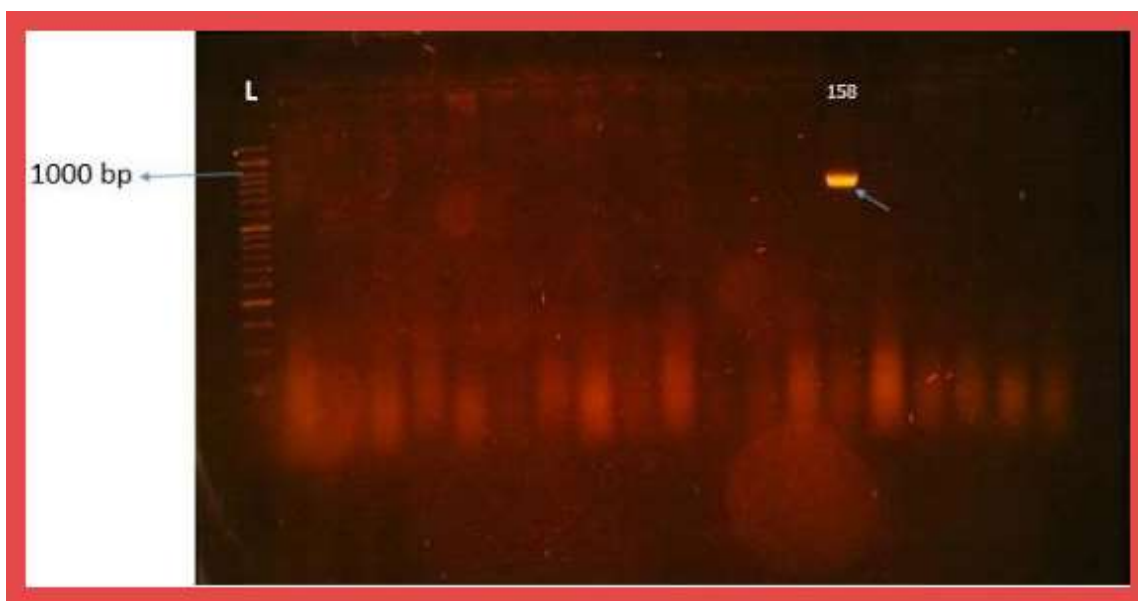
شکل ۴- ایجاد باند در ناحیه ۱۰۰۰ جفت باز بر روی ژل آگاروز ۲٪ با استفاده از جفت آغازگر FDP-14. جدایه های C-129, C-128, C-102, C-149, C-136 عامل بیماریزای FOC تولید باند بسیار مشخص و اختصاصی کرده است که نشانگر تعلق آنها به نژاد ۲ است

Figure 4- DNA band of 1000 bp on agarose gel 2% using FDP-14 primer. Isolates C-129, C-128, C-102, C-149 and C-136 of FOC generated highly-detective and specific band which shows its belonging to race 2



شکل ۵- ایجاد باند در ناحیه ۲۱۰۰ جفت باز بر روی ژل آگاروز ۲٪ با استفاده از جفت آغازگر FDP-14. جدایه های C-54, C-103, C-93, C-121, C-100, C-157, C-145, C-146 عامل بیماریزای FOC تولید باند اختصاصی کرده است که نشانگر تعلق آنها به نژاد ۴ است

Figure 5- DNA band of 2100 bp on agarose gel 2% using FDP-14 primer. Isolates C-54, C-103, C-93, C-121, C-100, C-157, C-145, C-146 of FOC generated specific bands which shows their belonging to race 4



شکل ۶- ایجاد باند در ناحیه ۱۰۰۰ جفت باز بر روی ژل آگاروز ۲٪ با استفاده از جفت آغازگر FOCR6- O2f / FOCR6-O2r. جدایه C-158 عامل بیماریزای FOC تولید باند بسیار مشخص و اختصاصی کرده است که نشانگر تعلق آن به نژاد ۶ است
Figure 6- DNA band of 1000 bp on agarose gel 2% using FocR6-O2f/FocR6-O2r primer. Isolates C-158 of FOC generated highly-detective and specific band which shows their belonging to race 6

بحث

خسارت سالیانه گزارش شده ناشی از این بیماری، یعنی ۱۵ تا ۱۷٪، در سایر نقاط جهان است (Trapero-Casa and Jiménez-Díaz, 1985; Jalili and Chand, 1992). در یک مزرعه، در قوش‌قیه‌سی مراغه، میزان وقوع ۱۰۰ درصدی ناشی از این بیماری برآورد شد که این میزان وقوع در سایر نقاط دنیا قبلاً گزارش شده است (Haware and Nene, 1982; Halila and Strang, 1997, Ali and Terefe, 2021).

در این بررسی، میزان شدت بیماری در مقیاس ۴ تایی، ۳/۵ برآورد گردید که نشان می‌دهد اکثر ارقام آلوده که از توده‌های محلی بودند، حساس یا نیمه حساس به بیماری هستند. نشان داده شده است که میزان شدت بیماری و به تبع آن میزان خسارت ناشی از این بیماری، به تاریخ کاشت، رقم کشت شده و نژاد عامل بیماری بستگی دارد؛ به طوری که کشت دیر هنگام باعث افزایش احتمال خسارت می‌شود، و در مورد اثر نژاد و رقم گزارش شده است که کاهش محصول در تعامل نژاد ۵ و صفر عامل بیماری بر روی رقم حساس به ترتیب ۹۹/۷٪ و ۵۶/۶٪ بوده است (Navas-Cortes et al., 2000). در مورد نمونه مزرعه

بیماری پژمردگی و زردی نخود از جمله بیماری‌های مهم نخود در جهان و ایران می‌باشد و در تمام مناطق نخود-کاری کشور گزارش حضور دارد. در این پژوهش، با نمونه-برداری از ۹۳ مزرعه آلوده در مناطق نخودکاری غرب و شمالغرب کشور، درصد وقوع بیماری برابر با ۱ تا ۱۰۰٪ (میانگین ۱۷/۷۳٪) تعیین شد و بدین ترتیب مشخص گردید که این مقدار وقوع بیماری در تشابه کامل با مقدار گزارش شده توسط منوچهری و مصری (Manuchehri and Mesri, 1968) در سال ۱۳۴۷ است. در یک بررسی در اتیوپی، میانگین میزان درصد وقوع بیماری در مزارع نخود و با استفاده از همین روش برابر با ۳۴/۳ گزارش شده است (Ali and Terefe, 2021). از آنجایی که در بیماری‌های دارای علائم پژمردگی و زردی، میزان خسارت تقریباً برابر با میزان درصد وقوع است (Teng and James, 2001)، می‌توان همه ساله میزان خسارتی برابر با ۱۷/۷۳٪ که از این بیماری بر محصول نخود در دیمزارهای کشور وارد می‌شود را، در نظر گرفت. این مقدار، برابر با میانگین

آلوده قوش‌قیه‌سی مراغه با بالاترین میزان خسارت (جدول ۱)، رقم نخود میزبان، تیپ دسی کاکا و زمان کشت، اوایل بهار بود که در هماهنگی با یافته‌های قبلی است. با توجه به گزارش نژادهای صفر، 1A، 1B/C، ۶ و ۵ از غرب ایران (Shokri et al., 2020) در این بررسی وجود نژادهای ۲ و ۴ عامل این بیماری برای اولین بار از مناطق نخودکاری غرب و شمالغرب کشور گزارش می‌شود. نعیم آبادی و همکاران (Naeim Abadi et al., 2022) با بررسی ۳۲ جدایه جمع‌آوری شده از استان کردستان نشان دادند که ۲۸ جدایه متعلق به نژاد صفر و بقیه متعلق به نژاد 1B/C هستند، در صورتی که در تحقیق حاضر، نشان داده شد که در این منطقه علاوه بر نژاد 1B/C؛ نژادهای ۲ و ۴ نیز حضور دارند (جدول ۱). با توجه به اینکه در این بررسی از مارکر اختصاصی نژاد صفر و 1A استفاده نشده بود؛ احتمال حضور این نژادها در بین ۱۷ جدایه باقی‌مانده، وجود دارد. همچنین ممکن است نژادهای ناشناخته‌ای نیز در بین این جدایه‌ها وجود داشته باشند که تاکنون نشانگر اختصاصی برای آن طراحی نشده است (Vujanovic et al., 2006; Aloosh et al., 2019). در این بررسی مشخص گردید که بین تنوع نژادها و خاستگاه جغرافیایی آنها ارتباطی وجود ندارد، به‌عنوان مثال پراکنش نژاد ۴ در پهله وسیعی از اورمیه تا ایلام اثبات گردید که در هماهنگی با یافته‌های

منابع

- Ali B, Terefe H. 2021. Spatial distribution and characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* of chickpea in Northern Shoa, Ethiopia. Archives of Phytopathology and Plant Protection 54 (19): 1578-1602. <https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1929689>
- Alloosh M, Hamwieh A, Ahmed S, Alkai B 2019. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates affecting chickpea in Syria. Crop Protection 124: 48-63. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104863>
- Al-Taae AK, Hadwan HA, Al-jobory SAE. 2013. Physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in Iraq. Journal of Life Sciences 7: 1070-1075
- Arvayo-Ortiz RM, Esqueda M, Acedo-Felix, E, Sanchez A, Gutierrez A. 2011. Morphological variability and races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* associated with chickpea (*Cicer arietinum*) crops. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6: 114-121. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.114.121>
- Bayraktar H, Dolar FS. 2012. Pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates from chickpea in Turkey. Pakistan Journal of Botany 44: 821-823
- Dandale S, Mane SS, Ingle ST, Jadhav PV, Patil AN, Nandanwal RS, Jankar KB, Tatte RR, Kalane PN. 2021. Pathogenic variability among specific isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. The Pharma Innovation 1(6):20-28
- Dellaporta CSL, Wood J, Hicks JB, Dna A. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21

بررسی های گذشته در خصوص این پاتوسیستم است (Alloosh et al., 2019; Shokri et al., 2020; Dandale et al., 2021; Naeim Abadi et al., 2022). این یافته به این معنی است که در فرآیند غربال ژنوتیپ‌ها باید تا حد ممکن از همه نژادهای حاضر در کشور استفاده شود. یکی از پیش‌نیازهای یک فرآیند منسجم غربالگری مواد ژنتیکی برای بیماری های گیاهی، شناخت کامل از تنوع بیماریزایی بیمارگر و تعیین الگوی پراکنش جغرافیایی آن عنوان شده است (Infantino et al. 2006). در این بررسی ما موفق به شناسایی نژادهای 1B/C، ۲، ۴ و ۶ از بین ۹۳ نمونه جمع‌آوری شدیم که دو تای آنها یعنی نژادهای ۲ و ۴ برای کشور جدید هستند. با توجه با غربال همه ساله دهه ژنوتیپ نخود حاصل از برنامه های به‌نژادی که در مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور در جریان است، از جدایه‌های تعیین نژاد شده در انجام این فرآیند استفاده خواهد شد. با توجه به پایین بودن تعداد جدایه‌های تعیین نژاد شده، بحث در مورد الگوی پراکنش آنها در مناطق نمونه-برداری امکان‌پذیر نبوده و نیاز به بررسی‌های تکمیلی دارد. **قدردانی:** بدین وسیله از زحمات آقای دکتر جعفر شگری، دانشگاه ایلام، در ارسال نمونه های بیماری از آن استان قدردانی می‌شود.

- FAO. 2022. FAOSTAT. Food Agric. Organ. United Nations, Rome, Italy. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>, Accessed 20 Jan 2023
- Goh TK. 1999. Single-spore isolation using a hand-made glass needle. *Fungal Diversity Notes* 2: 47–63
- Halila MH, Strange RN. 1997. Screening of Kabuli chickpea germplasm for resistance to *Fusarium* wilt. *Euphytica* 96: 273–279
- Haware MP, Nene YL. 1980. Influence of wilt at different stages on the yield loss in chickpea. *Tropical Grain Legume Bulletin* 19: 38–40
- Haware MP, Nene YL. 1982. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease* 66: 809–10
- Infantino A, Kharrat M, Riccioni L, Coyne CC, McPhee KE, Grunwald NJ. 2006. Screening techniques and sources of resistance to root diseases in cool season food legumes. *Euphytica* 147: 201–221. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-6963-z>
- Jalali BL, Chand H. 1992. Chickpea wilt. In: Singh US, Mukhopadhyay AN, Kumar J, Chaube HS (eds.), *Plant Diseases of International Importance. Vol. 1. Diseases of Cereals and Pulses*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ
- Jendoubi W, Bouhadida M, Boukteb A, Béji M, Kharrat M. 2017. *Fusarium* wilt affecting chickpea crop. *Agriculture (Switzerland)* 7: 1–16. <https://doi.org/10.3390/agriculture7030023>
- Jiménez-Díaz RM, Alcalá-Jiménez A, Hervas A, Trapero-Casas JL. 1993. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* / *Cicer arietinum* pathosystem. *Proc. 3rd Eur. Semin. Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance*. Radzikov (Poland): Plant Breeding and Acclimatization Institute. pp. 87–94
- Jiménez-Díaz RM, Trapero-casas A, Cabrera de la Colina J. 1989. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* infecting chickpeas in Southern Spain. In: Tjamos EC, Beckman C, editors. *Vascular Wilt Diseases of Plants*, Springer, Berlin, p. 515–20. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-73166-2>
- Jiménez-Gasco MM, Jiménez-Díaz RM. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5 and 6. *Phytopathology* 93: 200–209
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publ. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470278376.ch13>
- Manuchehri A, Mesri A. 1968. Chickpea yellow disease. *Iranian Journal Plant Pathology* 3: 10–15 (In Persian)
- McKnight KH, Rayner RW. 1972. A mycological colour chart. *Mycologia* 64(1): 230–233. <https://doi.org/10.2307/3758035>
- Navas-cortés JA, Alcalá-Jiménez A, Hau B, Jiménez-Díaz RM. 2000. Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 106: 135–146. <https://doi.org/10.1023/A>
- Naeim Abadi T, Abbasi Moghadam A, Babaeizad V, Hashemi M. 2022. Variation among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates causing chickpea root and crown rot from Kurdistan province. *Mycolgia Iranica* 9(1): 85–95. DOI: 10.22043/MI.2023.359141.1239
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WF. 1983. *Fusarium species - An Illustrated Manual for Identification*. Transactions of the British Mycological Society. The Pennsylvania State University Press
- Poornima K, Sabaale PR, Patil PG, Das A, Soren KR, Singh NP. 2017. PCR based race identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* using molecular markers. *Journal of Food Legumes* 30: 6–10
- Pouralibaba HR, Rubiales D, Fondevilla S. 2016. Identification of pathotypes in *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*. *European Journal of Plant Pathology* 144(3):539–549. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0692-x>
- Salas B, Steffenson BJ, Casper HH, Tacke B, Prom LK, Fetch TG, Schwarz PB. 1999. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Disease* 83(7): 667–674
- Sharma KD, Chen W, Muehlbauer FJ. 2005. Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease* 89: 385–90
- Shehabu M, Ahmed S, Sakhuja P. 2008. Pathogenic variability in Ethiopian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and reaction of chickpea improved varieties to the isolates. *International Journal of Pest Management* 54: 143–9. <https://doi.org/10.1080/09670870701780153>
- Shokri J, Javan-Nikkhah M, Rezaee S, Zamanizadeh HR, Nourollahi K. 2020. Molecular identification of the races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of chickpea wilt in western and north western provinces of Iran. *Applied Entomology and Phthopathology* 88: 11–22. <https://doi.org/10.22092/JAEP.2020.126209.1281> (In Persian)
- Singh G, Sharma YR. 2002. *Fungal diseases of pulses*. In: Gupta VK, Paul YS, editors. *Diseases of Field Crops*, Indus Publishing, New Delhi, India. p. 155–192

- Singh KB, Reddy MV. 1991. Advances in disease-resistance breeding In chickpea. *Advances in Agronomy* 45: 191–222
- Teng PS, James WC. 2001. Disease and yield loss assessment. In: Waller JM, Lenné JM, Walker SJ (eds.), *Plant Pathologist's Pocketbook*, Third edition. 528 pp. CABI, Wallingford, UK
- Trapero-Casas A, Jiménez-Díaz RM. 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology*: 75: 1146-1151
- Vujanovic V, Hamel C, Yergeau E, St-Arnaud M. 2006. Biodiversity and biogeography of *Fusarium* species from northeastern North American asparagus fields based on microbiological and molecular approaches. *Microbial Ecology* 51: 242–55. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-0046-x>



First report of existence races 2 and 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causing agent of yellow and wilt disease of chickpea in Iran

Hamid Reza Pournalibaba^{1*}, Mojghan Tabrizivand Taheri¹, Farshid Mahmodi², Abas Ali Ravanlou³, Saman Bahrami Kamangar⁴, Saba Kowkab¹, Mohammad Kouhestani¹

- 1- Dryland Agricultural Research Inst. (DARI); Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran.
- 2- Dryland Agricultural Research Inst. (DARI); Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sararoud Kermanshah, Iran.
- 3- Abbas Ali Ravanlou: Plant Protection Institute (PPI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
- 4- Kurdistan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center; Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sanandaj, Iran.

Extended abstract

Introduction: Chickpea (*Cicer arietinum* L.) with a high amount of protein and valuable minerals, is considered one of the important items in the Iranian food basket. Due to its adaptability to the harsh climatic conditions of the country's drylands, it is grown in 500,000 ha of rain-fed and dry areas of Iran. It is considered as the most important county's rainfed legume crop and because of its rotation cultivation with cereals, plays an important role in the sustainability of agriculture in these areas. Yellowing and wilting disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* is one of the most important diseases of the plant worldwide. The disease causes a quantitative and qualitative decrease in the production of the crop in all areas of the country. The most effective and economical method of managing and controlling the disease is the production and use of resistant cultivars.

Methodology: In this study, 92 infested farms with suspected plants showing symptoms of yellowing and wilting were visited in the northwest and west of the country. The detailed characters of the samples were recorded. Subsequently, they were transferred to the laboratory and the pathogen was isolated from the host, purified and their pathogenicity on a susceptible chickpea variety was verified. For identification, in the first step, classical methods based on morphological characteristics and taxonomic keys were used, while in the second step, molecular techniques were applied.

Research findings: Based on classical methods, all samples were characterized as a species of *Fusarium* genus (*Fusarium* spp.). Based on taxonomic and morphological methods, 39 isolates were identified as *F.oxysporum*. Subsequently, by using a molecular marker, the belonging of 32 isolates to the special form (forma specialis) of chickpea was confirmed. In the final step, using specific markers, 15 isolates were identified as races 1B/C, 2, 4 and 6. These results indicate the existence of races 2 and 4 among the collected samples, which is the first report of their presence in Iran. These findings can be used in the production of disease-resistant cultivars for the infested areas of the country.

Keywords: Race identification, Molecular Marker, Primer, Morphology, Taxonomic Key

* Corresponding author: hpournalibaba@gmail.com
Submit date: 2023/08/12 Accept date: 2024/03/05

