



Study of *Fusarium* species causing wilt and root rot in chickpeas in Lorestan Province

F. Mehdinia ¹, M. Darvishnia ^{*2}, H. Mirzaei Najafgholi ³, F. Nazarian-Firouzabadi ⁴

1. Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2. ***Corresponding Author:** Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (darvishnia.m@lu.ac.i)
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
4. Professor, Agronomy and plant breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University

Received: 4 November 2024

Revised: 4 December 2024

Accepted: 9 December 2024

Abstract

Background and Objectives

Fusarium is a significant soil fungus found globally. The fungus responsible for the disease can survive as chlamydospores in infected seeds and plant debris for more than five years in the soil. When conditions are right, it can devastate entire crops. This fungus releases spores that grow when they come into contact with chemicals from the chickpea roots. The fungal threads invade the plant's roots and vascular system, which blocks the plant's ability to absorb water. As a result, the chickpea plant can die from lack of moisture. In Iran, the disease is common in many areas where chickpeas are grown, resulting in a 17% decrease in chickpea yields. In Lorestan Province, it causes root rot and wilting in chickpeas, severely impacting their production. Under suitable conditions, this disease can entirely devastate crops. To effectively manage this issue, it is crucial to identify the various *Fusarium* species, understand their detrimental effects, and evaluate which plants they can infect. Also, studying these species' genetic relationships can facilitate the development of improved disease control strategies.

Materials and Methods

This study focused on identifying *Fusarium* species that cause root rot in chickpeas in Lorestan Province. Researchers visited chickpea farms, collecting 155 samples from plants exhibiting yellowing, wilting, and root rot symptoms. The samples underwent isolation, purification, and identification in the laboratory based on their morphological traits. Pathogenicity tests were conducted on a susceptible chickpea cultivar named Arman to evaluate the pathogenic potential of the identified *Fusarium* species. This study focused on analyzing specific genetic markers to identify particular isolates. Researchers amplified two gene regions: the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA and the *ef1- α* gene, utilizing materials from SinaGen Company. The amplified DNA fragments were sequenced by Biomegic Company in Tehran. The sequences were edited and analyzed using BioEdit 7.1 software and registered in the NCBI GenBank database. MEGA 7.0 software was employed for phylogenetic analysis to construct a phylogenetic tree, comparing the isolates with others in the gene bank. A bootstrap analysis with 1,000 repetitions was conducted to confirm the stability of the phylogenetic tree branches. The study evaluated specific isolates' harmful effects on the above-ground parts and roots of intentionally infected plants.

Results

The phylogenetic tree presented in this study, constructed from specific gene sequences, aligns with the results of morphological analyses. The research identified *Fusarium oxysporum* and

Fusarium solani as the most prevalent isolates. *F. falciforme* affects plants by causing yellowing and wilting, starting from the lower leaflets and spreading upwards. The roots also show signs of damage, with visible root rot symptoms after emerging from the soil. Additionally, there are instances of discoloration in the vascular bundles when looking at sections of the stem, both longitudinally and cross-sectionally. These findings correspond with previous studies in the field. Furthermore, the study uncovered that *Fusarium falciforme* is a weak pathogen for chickpea roots. Importantly, this research represents the first documented evidence of the pathogenic effects of *Fusarium falciforme* on chickpeas.

Discussion

The phylogenetic tree presented in this study, constructed from specific gene sequences, aligns with the findings of morphological analyses. The research identified *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* as the most prevalent isolates. The disease symptoms linked to most isolates from the *F. oxysporum* complex in this study resemble those caused by *F. redolens*. DNA sequencing revealed that the *F. oxysporum* isolates are closely related to *F. redolens*, with a 96% genetic similarity. All isolates of *F. redolens* showed symptoms similar to those of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* in pathogenicity tests but without any color change in the vascular tissue. Since black root rot is a localized issue, it is crucial to differentiate it from systemic diseases like wilting for effective plant pathology understanding. A combination of molecular analysis and thorough morphological examination is essential to identify these isolates correctly. These results are consistent with previous studies on the subject. Furthermore, the investigation revealed that *Fusarium falciforme* exhibits weak pathogenicity towards chickpea roots. Importantly, this research represents the first documentation of the pathogenic effects of *Fusarium falciforme* on chickpeas.

Keywords: Chickpea, *Fusarium*, Lorestan, Yellowing, Wilting

Associate editor: A. Omrani (Ph.D.)

Citation: Mehdinia, F., Darvishnia, M., Mirzaei Najafgholi, H. & Nazarian-Firouzabadi, F. (2024). Study of *Fusarium* species causing wilt and root rot in chickpeas in Lorestan Province. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 47(3), 99-116. <https://doi.org/10.22055/ppr.2024.48286.1774>.



بررسی گونه‌های فوزاریوم مولد پژمردگی و پوسیدگی ریشه نخود در استان لرستان

فرشته مهدی نیا^۱، مصطفی درویش نیا^۲، حسین میرزایی نجفقلی^۳، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- * نویسنده مسوول: استاد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران (darvishnia.m@lu.ac.ir)

۳- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۴- استاد گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۹/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۴

چکیده

پوسیدگی ریشه و پژمردگی نخود از مخرب‌ترین بیماری‌های محدود کننده‌ی تولید نخود در استان لرستان محسوب می‌گردد. به منظور بررسی فوزاریوم‌های عامل پوسیدگی ریشه نخود، از مزارع نخود در استان لرستان بازدید به عمل آمد و تعداد ۱۵۵ نمونه از بوته‌های مشکوک به بیماری و دارای علائم زردی و خشکی برگ‌ها و ساقه‌ها و برگچه‌های پایینی بوته‌ها، پژمردگی و پوسیدگی ریشه جمع‌آوری شد. سپس جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی مشخصات ظاهری عامل مرتبط با هر نمونه در آزمایشگاه منطبق بر منابع معتبر انجام شد. آزمون بیماری‌زایی و سنجش توان بیماری‌زایی بر روی رقم حساس آرمان انجام شد. براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و توالی‌یابی دو ناحیه ژنی فاصله‌ی ترانویس شده‌ی داخلی DNA ریپوزومی (ITS) و ژن *TEF1*، در مجموع ۷۷/۴ درصد جدایه‌های قارچ فوزاریوم بیماری‌زا و ۲۲/۶ درصد جدایه‌های فوزاریوم غیر بیماری‌زا به شرح زیر جداسازی شد؛ در مجموع تعداد ۵۳ جدایه به عنوان *F. oxysporum*، ۴۳ جدایه *F. solani*، ۳۷ جدایه *F. redolans* و ۲۲ جدایه *F. falciform* شناسایی شدند. پس از شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌ها، یک جدایه از هر گونه به نمایندگی انتخاب و روابط فیلوژنتیکی آن‌ها مطالعه شد. همه جدایه‌های بیماری‌زا پس از مایه‌زنی روی رقم حساس آرمان ایجاد زردی و پژمردگی و پوسیدگی ریشه نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد مهم‌ترین گونه بیماری‌زای در مزارع نخود استان لرستان گونه *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* می‌باشد. در آزمون بیماری‌زایی دامنه میزبانی جدایه‌های *F. falciform*، در گیاهچه‌های بامیه بیماری‌زا نبود، اما این جدایه موجب پوسیدگی ریشه و زردی گیاهچه‌های ماش، عدس، گندم، جو، ذرت، لوبیا چشم بلبلی و گاودانه گردید. گونه *F. falciform* برای اولین بار از ایران روی ریشه نخود گزارش می‌گردد.

کلیدواژه: نخود، فوزاریوم، لرستان، زردی، پژمردگی

دبیر تخصصی: دکتر علی عمرانی

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L) از خانواده حبوبات، گیاهی یک ساله و گلدار می‌باشد، که یکی از حبوبات عمده زراعی در سراسر جهان است (Shafeghi et al., 2020). ایران با داشتن ۹/۳ درصد سطح زیر کشت نخود، در رده‌ی چهارم تولید، در میان کشورهای تولید کننده نخود قرار می‌گیرد (FAO, 2023). بر اساس آمار وزارت جهاد کشاورزی، سطح زیر کشت این محصول در ایران ۵۶۱۰۲۹ هکتار و با میزان تولید ۳۰۰۵۴۸ تن بوده است (Ahmadi et al., 2022). بیش‌ترین سطح زیر کشت این محصول به ترتیب متعلق به استان‌های کرمانشاه، کردستان، لرستان، آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی می‌باشد. سطح زیر کشت نخود در استان لرستان بیش از ۹۰ هزار هکتار با تولید ۴۸ تا ۵۰ هزار تن نخود می‌باشد (Shafeghi et al., 2020).

عملکرد و کیفیت نخود مانند دیگر محصولات کشاورزی تحت تاثیر برخی از آفات، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز قرار می‌گیرد. بیمارگرهای قارچی خاکزاد، جز مهم‌ترین عواملی می‌باشند که باعث کاهش تولید محصول می‌شوند. فوزاریوم یکی از مهم‌ترین قارچ‌های خاکزی است که در سراسر دنیا پراکنش داشته و در بخش کشاورزی بیماری‌های گوناگونی در اکثر گیاهان زراعی ایجاد می‌کند.

گونه *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hans. f. sp. *ciceri* (Padwick) Snyder & Hans. عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی یکی از مهم‌ترین عوامل قارچی، خاکزاد خسارت‌زا به گیاه نخود در جهان به شمار می‌رود (Mohseni, 2006). قارچ عامل بیماری به صورت کلامیدسپور در بذر و بقایای آلوده گیاهی بقا دارد (Mukherjee et al., 2020). در شرایط مساعد شامل: بارندگی شدید، رطوبت بالا، دمای نامناسب و آلودگی بذراین بیماری قادر است محصول را به طور کامل از بین ببرد (Landa et al., 2001). در ایران نیز این بیماری در اغلب مناطق کشت نخود گزارش شده است و شیوع آن سبب کاهش ۱۷ درصدی عملکرد نخود می‌شود. یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای زردی و پژمردگی نخود در استان لرستان

پوسیدگی فوزاریومی است، در شرایط مساعد تا ۶۰ درصد خسارت به محصول در استان لرستان گزارش شده است (Golpayegani et al., 2009).

عامل بیماری زردی و پژمردگی نخود قارچی خاکزاد، بذرزاد و ساپروفیت اختیاری می‌باشد (Mohseni, 2006). کلامیدسپورهای این بیمارگر در پاسخ به ترشحات ریشه گیاه میزبان جوانه زده و ریشه‌های قارچ بیمارگر به ریشه‌های میزبان حساس حمله کرده و سیستم بافت آوند چوبی را کلونیزه می‌نماید و با این عمل باعث محدود شدن دسترسی به آب توسط میزبان شده و در نتیجه منجر به کشته شدن گیاه میزبان می‌گردد (Toyoda et al., 1988; Mukherjee et al., 2020).

علائم بیماری در گیاهان آلوده در دو حالت دیده می‌شود، ابتدا به صورت عارضه پژمردگی که با علائم آویختگی سریع و خشکی برگ‌ها و ساقه‌ها و برگچه‌های پایینی بوته‌ها ظاهر شده و سپس به قسمت‌های بالاتر سرایت کرده و عارضه زردی با زردی گسترده برگ‌ها و نکروز بافت آوندی همراه است در نهایت منجر به خشکیدگی کل بوته شده است. در بعضی مواقع با خارج نمودن ریشه از خاک هیچ گونه علائمی نشان از پوسیدگی ریشه مشاهده نگردیده است، اما تغییر رنگ آوندها در تعدادی از برش‌های طولی و عرضی ساقه مشاهده می‌گردد (Trapero-Cases et al., 2015).

با توجه به بازدیدهای به عمل آمده از مزارع نخود مناطق مختلف استان لرستان علائم زردی و پژمردگی، مرگ گیاهچه، کاهش قدرت باروری و زوال در محصولات نخود مشاهده شده است. با توجه به این که استان لرستان یکی از مناطق مهم تولید حبوبات از جمله نخود به شمار می‌رود و همچنین بیماری زردی و پژمردگی نخود در این استان از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول به شمار می‌آید، لذا با توجه به اهمیت موضوع در جهت کنترل بیماری در این پژوهش؛ شناسایی گونه‌های فوزاریوم و تعیین بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا بودن آن‌ها و همچنین تعیین دامنه میزبانی گونه‌های جدید شناسایی شده روی نخود بررسی گردید و همچنین جایگاه فیلوژنی گونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این پژوهش از ابتدای فصل زراعی در بهار و تابستان ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ از مناطق عمده کشت نخود بهاره، استان لرستان شهرستان‌های دلفان، خرم‌آباد، ازنا، کوه‌دشت، الشتر و بیران شهر نمونه برداری از گیاهچه‌های ۶ تا ۱۰ برگی نخود انجام شد. از بوته‌های آلوده و یا مشکوک به آلودگی دارای علائم زردی و پژمردگی و با بررسی پوسیدگی ریشه و تغییر رنگ در ناحیه طوقه جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه، برای جداسازی گونه‌های مختلف فوزاریوم پس از شستن و ضدعفونی ریشه و طوقه گیاهان آلوده نخود (Haware, 1993)، تعداد ۴-۵ قطعه از هر نمونه به پتری حاوی محیط‌های کشت Nash-snyder و یا محیط کشت PDA^۱ حاوی مقدار ۵۰ ppm لاکتیک اسید و یا روی محیط کشت PDA با pH=4 منتقل شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Stack & McMullen, 1991). جهت خالص‌سازی جدایه‌های به دست آمده از دو روش نوک ریشه و تک اسپور استفاده شد (Taheri et al., 2011).

شناسایی گونه‌های فوزاریوم

جهت شناسایی گونه‌های جنس فوزاریوم و بررسی ویژگی‌های آن‌ها از محیط کشت PDA حاوی مقدار ۵۰ ppm لاکتیک اسید استفاده شد. براساس رنگ و شکل پرگنه، شکل ماکروکنیدیوم‌ها، میکروکنیدیوم و کلامیدوسپور شناسایی انجام گردید. لذا برای این امر از کلیدهای شناسایی (Nelson et al. (1983)، Gerlach and Nirenberg (1982)، Summerell (2019) و Crous et al (2021) و منابع شناسایی (Leslie and Summerell (2006) استفاده گردید.

آزمون بیماری‌زایی

تهیه مایه تلقیح مطابق روش تغییر یافته (Wegener (1992) انجام شد. از گیاهچه‌های نخود ۴ تا ۶ برگی جهت مایه‌زنی با جدایی‌های فوزاریوم استفاده شد. از سوسپانسیون اسپوری به

غلظت 1×10^4 اسپور در میلی‌لیتر برای مایه‌زنی استفاده شد. گلدان‌ها دو روز قبل آبیاری شدند، به نحوی که به ریشه‌ی گیاهچه‌ها آسیبی وارد نگردد، سپس گیاهچه‌ها به آرامی از بستر کشت (خاک، کود دامی و ماسه به نسبت ۱:۱:۱) خارج شدند، با فرو بردن ریشه‌ها به مدت ۱/۵ دقیقه در سوسپانسیون اسپوری مجدداً به گلدان منتقل شدند. گیاهچه‌های شاهد نیز به مدت ۱/۵ دقیقه در آب مقطر فرو برده شدند و سپس به گلدان‌های مد نظر منتقل شدند. برای مایه‌زنی گیاهچه‌های نخود با سایر جدایه‌های تشخیص داده شده، داخل هر گلدان ۳ عدد بذر ضدعفونی شده با محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد مطابق روش شرح داده شده برای نمونه‌های قبل عمل مایه‌زنی کشت شد. هر تیمار شامل ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۳ گیاه در نظر گرفته شد.

با توجه به این که در این پژوهش اولین گزارش از بیماری‌زایی جدایه‌ی *F. falciform* روی نخود می‌باشد، لذا بررسی دامنه میزبانی این جدایه بر روی گیاهان کشت غالب استان لرستان به شرح زیر: لوبیا قرمز رقم افق، لوبیا چشم بلبلی رقم شفق، عدس رقم نوژیان، ماش رقم سبز، بامیه رقم حنایی، گندم رقم سرداری، جو رقم آبی، ذرت علوفه‌ای و نخود رقم آرمان مایه‌زنی صورت گرفت (Westerlund et al., 1974). در بررسی دامنه میزبانی نیز هر تیمار شامل چهار تکرار و هر تکرار شامل ۴ گیاه در نظر گرفته شد. پس از مایه‌زنی با سوسپانسیون اسپوری به غلظت 1×10^4 اسپور در میلی‌لیتر، گلدان‌ها با بستر کشت (خاک، کود دامی و ماسه به نسبت ۱:۱:۱) به گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس جهت نگهداری منتقل شدند و روزانه جهت بروز علائم پژمردگی و زردی مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی شدت بیماری‌زایی

شاخص ارزیابی شدت بیماری روی قسمت‌های هوایی و ریشه گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های شناسایی شده، براساس شاخص ۵ درجه‌ای پیشنهاد شده مورد استفاده برای پژمردگی و پوسیدگی ریشه (فرمول ۱)، در قالب طرح کاملاً تصادفی، پس از ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند (Navas-Cortés et al., 2000).

(Geiser et al., 2004). همچنین تکثیر بخش‌هایی از DNA ریبوزومی، ناحیه ITS² در ۴ جدایه با استفاده از آغازگرهای ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و ITS4 (Wang et al., 2010) (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC) انجام شد.

مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از شرکت سیناکلون، ایران تهیه گردید. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر با دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و دمای واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه شروع شده و دمای واسرشت ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه در ۳۰ سیکل ادامه می‌یابد. در آخر واکنش با ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به پایان می‌رسد (Bethesda, 2019). قطعات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت رفت و برگشت توسط شرکت بیومجیک تهران تعیین توالی شد.

شناسایی مولکولی گونه‌های قارچی

ویرایش و مشابهت‌سازی توالی‌های برآیند از دو توالی رفت و برگشت، توالی‌های ثبت شده در بانک ژن با توالی‌های به دست آمده از بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار BioEdit 7.1 انجام شد. توالی‌های به دست آمده از مجموعه‌ی داده NCBI³ ثبت شدند (Bethesda, 2019). جهت تشخیص و تایید گونه‌های فوزاریوم و بررسی بیش‌ترین میزان شباهت ویژگی‌های ریخت‌شناختی با استفاده از توالی‌های ویرایش شده‌ی ITS و *TEFI* در مجموعه داده‌های بانک ژن در پایگاه داده NCBI انجام شد.

بررسی‌های فیلوژنتیکی داده‌ها و ترسیم تبارنمای آن‌ها

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی داده‌ها، ترسیم درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های شناسایی شده با یکدیگر و مقایسه‌ی آن‌ها با سایر جدایه‌های بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7.0 انجام شد. ابتدا هم‌ردیف‌سازی جدایه‌های منتخب مورد بررسی و توالی‌های اخذ شده از بانک ژن با

همچنین مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

$$DII = \sum ((Si \times Ni) / (Nt \times 4)) \times 100 \quad (1)$$

DII شاخص شدت بیماری، Si شدت پژمردگی، Ni تعداد گیاهان آلوده، Nt تعداد کل گیاهان مورد بررسی. سپس جهت ارزیابی شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها از مقیاس ۰-۴، هر ۱۵ روز یکبار تا ۶۰ روز پس از کاشت مطابق شرح زیر استفاده گردید (Landa et al., 2001).
۰- صفر (بدون آلودگی)، ۱- درصد ریشه‌های پوسیده یا زردی و نکروز برگ‌ها از ۱ تا ۳۳ درصد، ۲- درصد ریشه‌های پوسیده یا زردی و نکروز برگ‌ها از ۳۴ تا ۶۶ درصد، ۳- درصد ریشه‌های پوسیده یا زردی و نکروز برگ‌ها از ۶۷ تا ۱۰۰ درصد برگ‌های دارای علائم زردی یا نکروز و ۴- مرگ گیاه. در هر یک از گونه‌های قارچی، با جداسازی مجدد، اصول کخ به طور موثر برای جدایه‌های مایه‌زنی شده از بافت بیمار به کار گرفته شد. این فرآیند نه تنها به تطبیق دقیق آن‌ها با مشخصات گونه‌های مایه‌زنی شده کمک کرد، بلکه بیماری‌زایی آن‌ها نیز به وضوح اثبات گردید.

شناسایی مولکولی و بررسی فیلوژنی جدایه‌ها استخراج DNA

سه بلوک یک سانتی‌متری میسلیم از حاشیه‌ی کشت یک هفته‌ای جدایه‌های قارچ‌های منتخب روی محیط کشت PDA، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی عصاره سیب‌زمینی - دکستروز برات (PDB) منتقل شدند و به مدت یک هفته روی شیکر دوار با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری گردید، تا میسلیم‌ها رشد نمایند. سپس استخراج DNA منطبق بر روش (Doyle and Doyle, 1987) انجام شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌ها، تکثیر بخش‌هایی از DNA ژنومی ناحیه *TEFI*¹ در ۴ جدایه با استفاده از آغازگرهای EF1 (5' ATGGGTAAGGAGGACAAGAC) و EF2 (5' GGAAGTACCAGTGATCATGTT) انجام شد

3- GenBank, NCBI, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

1- Translation elongation factor 1-alpha (tef1)

2- Internal transcribed spacer region cistron

دارای علائم زردی و پژمردگی بودند و همچنین به راحتی از خاک خارج نمی شدند و دارای سیستم ریشه‌ای خوبی بوده و علائمی از پوسیدگی ریشه در آنها قابل مشاهده نبود. در آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها، تمامی آنها علائم بیماری را به وضوح در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده نشان دادند، در صورتی که در تیمار گیاهچه‌های شاهد فاقد قارچ هیچ گونه علائمی مبنی بر زردی، پژمردگی و یا مرگ گیاهچه نشان ندادند. همچنین آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های به دست آمده بر اساس اصول کخ انجام گردید و بیماری‌زایی آنها روی گیاهچه‌های نخود به اثبات رسید (شکل ۱).

در آزمون اثبات بیماری‌زایی و ارزیابی پرآزاری جدایه‌های *F. oxysporum* در مجموع از ۵۳ جدایه مورد آزمون تعداد ۴۹ جدایه درجات مختلفی از پرآزاری را نشان دادند. همچنین تعداد ۴ جدایه بیماری‌زا نبودند. ظهور علائم بیماری در گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های *F. oxysporum* پس از حدود ۳۰ روز قابل مشاهده بود. علائم ایجاد شده در قسمت‌های هوایی گیاهان به صورت ظهور زردی و پژمردگی در برگچه‌های پایینی بود که به تدریج به قسمت‌های بالایی گسترش پیدا کرده و در نهایت منجر به خشکیدگی کل بوته‌ها شد. در بررسی ریشه گیاهان آلوده، پس از خروج از خاک درجات مختلفی از پوسیدگی ریشه قابل مشاهده بود. تغییر رنگ آوندی که مشخصه اصلی جدایه‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* قارچ می‌باشد، در تعداد معدودی از گیاهان مایه‌زنی شده مشاهده گردید. اما در برخی موارد در برش‌های طولی و عرضی ساقه تغییر رنگ آوندها قابل مشاهده بود. این جدایه‌ها به عنوان *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* (Foc) تشخیص داده شدند.

ابزار Clustal X انجام شد. برای ارزیابی توالی‌ها، گروه خارجی مناسب انتخاب، از روش Neighbor-joining استفاده گردید. همچنین جهت اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در تبارنماهای حاصل، تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی^۱ با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد (Jiménez-Fernández et al., 2011).

نتایج

جداسازی، شناسایی و تعیین پراکندگی جدایه‌ها

پرگنه‌های رشد کرده از بافت‌های گیاهی شامل ریشه، ساقه و طوقه گیاهان نخود بر روی محیط PDA اسیدی، جداسازی شد و مورد شناسایی قرار گرفتند. در مجموع تعداد ۱۲۰ جدایه فوزاریوم بیماری‌زا به دست آمد. بیشترین فراوانی جدایه‌های شناسایی شده در این پژوهش متعلق به جدایه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* بودند (جدول ۱). این دو جدایه نسبت به سایر جدایه‌ها گسترش و فراوانی بیشتری در مناطق نمونه برداری استان لرستان داشتند، که اهمیت آنها را به عنوان دو بیمارگر عمده مشخص می‌نماید. این مطالعه نشان داد که در مزارع نخود استان لرستان گونه *F. oxysporum* از اهمیت بیشتری نسبت به *F. solani* برخوردار است.

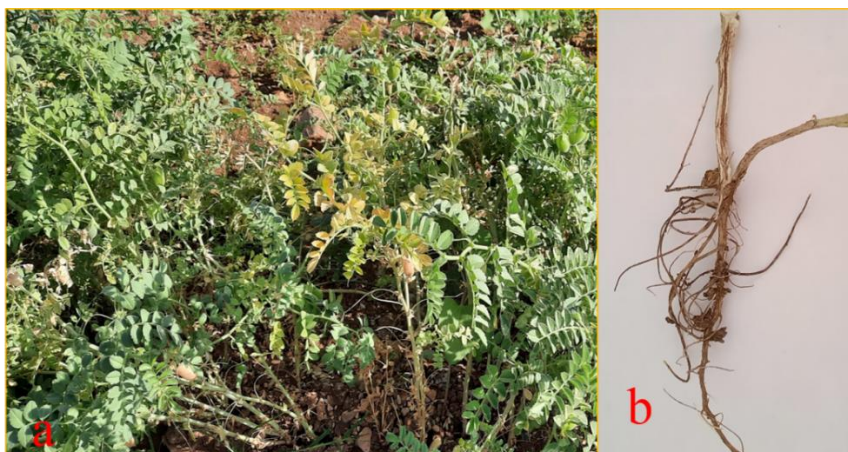
علائم بیماری و ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها

در مزارع نمونه برداری شده علائم بیماری به صورت پژمردگی، زردی و خشکیدگی بوته‌های نخود مشاهده شد. گیاهانی با داشتن پوسیدگی سیاه ریشه اغلب به صورت بوته‌های کاملاً خشک قابل مشاهده بودند که به آسانی از خاک خارج می‌شدند. علائم پوسیدگی روی ریشه و طوقه به خوبی قابل مشاهده بوده و ریشه‌های فرعی نسبتاً از بین رفته بودند. گیاهان آلوده به پژمردگی آوندی در بیشتر موارد

جدول ۱- جداسازی گونه‌های مختلف قارچ فوزاریوم (تعداد کل نمونه‌ها ۱۵۵ عدد)

Table 1 - Isolation Percentage of Different *Fusarium sp* with a total number of samples 155

Isolate	The total number of isolates	Separation percentage	The percentage of pathogenic isolates
<i>Fusarium oxysporum</i>	53	34.19	31.36
<i>Fusarium solani</i>	43	27.74	23.87
<i>Fusarium redolens</i>	37	23.87	8.31
<i>Fusarium falciforme</i>	22	14.19	13.52

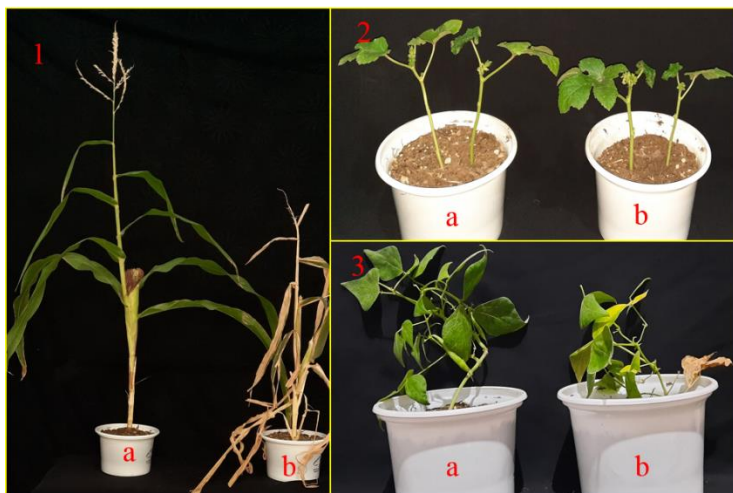


شکل ۱. a. علائم بیماری قارچ *F. oxysporum* در مزرعه نخود، b. ریشه بوته نخود مبتلا به *F. oxysporum*
 Figure 1- a. Symptoms of the disease caused by *F. oxysporum* in a chickpea field, b. Roots of a chickpea plant infected with *F. oxysporum*.

مجموع از ۳۷ جدایه *F. redolans* مورد آزمون تعداد ۲۱ جدایه علائم بیماری را نشان دادند. تعداد ۱۶ جدایه نیز بیماری‌زا نبودند (شکل ۲).

نتایج تعیین دامنه‌ی میزبانی قارچ *F. falciforme* نشان داد؛ کلنیزه شدن ریشه ذرت با شدت بیماری‌زایی ۸۴/۳۷ درصد بود، ماش با شدت بیماری‌زایی ۸۲/۸۱ درصد، پوسیدگی ریشه و پژمردگی بوته‌ها را نشان داد. گندم با شدت بیماری‌زایی ۸۱/۲۵ درصد، دارای علائم پوسیدگی ریشه و زردی بوته و در نهایت منجر به مرگ گیاهچه‌ها گردید. لویا چیتی با شدت بیماری‌زایی ۷۰/۳۱ درصد، بیش‌ترین زردی بوته و زخم روی ریشه را نشان داد. گاوآنه با شدت بیماری‌زایی ۵۹/۳۷ درصد، زردی بوته‌ها بسیار مشهود بود. عدس با شدت بیماری‌زایی ۵۳/۱۲ درصد، طیفی از پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه را نشان داد. جو با شدت بیماری‌زایی ۴۵/۳۱ درصد پوسیدگی ریشه، زردی و پژمردگی از علائم بارز بودند. روی نخود با شدت بیماری‌زایی ۳۸/۲۰ درصد و در لویا قرمز با شدت بیماری‌زایی ۲۶/۵۶ درصد کمترین کلنیزه شدن ریشه را نشان داد. در گیاهان شاهد هر گروه علائم بیماری مشاهده نشد (شکل ۲). در گیاهان بامیه مایه‌زنی شده نیز پس از گذشت ۶۰ روز علائمی مشاهده نشد و ریشه‌ها در پایان دوره با نمونه شاهد تفاوتی نشان نداد که می‌تواند بیانگر این باشد رقم کشت شده نسبت به قارچ مدنظر مقاوم محسوب می‌شده است و یا شرایط برای ایجاد بیماری‌زایی مساعد نبوده است.

در آزمون اثبات بیماری‌زایی و ارزیابی پرآزایی جدایه‌های *F. solani*، در مجموع از ۴۳ جدایه مورد آزمون تعداد ۳۷ جدایه قادر به ایجاد بیماری بودند. همچنین تعداد ۶ جدایه بیماری‌زا نبودند. پس از گذشت حدود ۲۵ روز علائم بیماری در گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های *F. solani* مشاهده شد. ابتدا علائم مشاهده شده به صورت زردی و پژمردگی برگچه‌های پایینی بوته‌ها ظاهر شده و در قسمت‌های بالایی گسترش یافته و در نهایت باعث خشکیدگی کل بوته‌ها شد. بروز علائم پوسیدگی سیاه ریشه‌ها و کاهش تعداد ریشه‌های فرعی بر روی قسمت‌های ریشه و طوقه قابل مشاهده بود. این جدایه‌ها به عنوان *F. solani* شناسایی گردیدند. علائم ایجاد شده در قسمت‌های هوایی گیاهان به صورت ظهور زردی و پژمردگی در برگچه‌های پایینی بود که به تدریج به قسمت‌های بالایی گسترش پیدا کرد. روی ریشه‌ها پس از خروج از خاک علائم پوسیدگی ریشه قابل مشاهده بود. همچنین در برخی موارد در برش‌های طولی و عرضی ساقه تغییر رنگ آوندها قابل مشاهده بود. این جدایه به عنوان *F. falciforme* شناسایی گردیدند. در مجموع از ۲۲ جدایه مورد آزمون که به‌عنوان *F. falciforme* شناسایی شدند، تعداد ۱۳ جدایه علائم بیماری را بروز دادند. همچنین تعداد ۹ جدایه بیماری‌زا نبودند. علائم بیماری در گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های *F. redolans* به‌صورت ایجاد زردی و پژمردگی و بدون تغییر رنگ بافت‌های آوندی قابل مشاهده بوده و از قسمت‌های بالای ساقه نخود جداسازی گردید. در



شکل ۲. نتایج بررسی دامنه میزبانی قارچ *F. falciforme* روی گیاهان به ترتیب ۱- ذرت، ۲- بامیه و ۳- لوبیا a. شاهد سالم، b. شاهد آلوده

Figure 2- The results of the study on the host range of the fungus *Fusarium falciforme* on plants are as follows: 1- Corn, 2- Okra, and 3- Bean a. Healthy control, b. Infected control.

پس از خروج از خاک علائمی نشان دهنده پوسیدگی ریشه قابل مشاهده بود و همچنین در برخی موارد در برش های طولی و عرضی ساقه تغییر رنگ آوندها قابل مشاهده بود (شکل ۳).

شناسایی مولکولی جدایه ها و بررسی های فیلوژنتیکی گونه های *Fusarium*

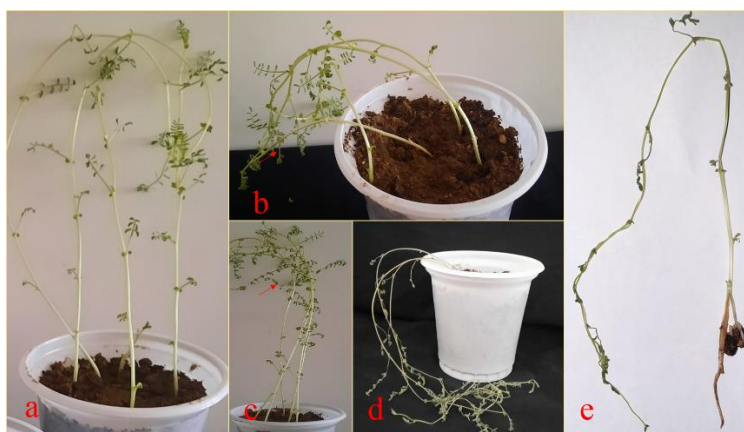
نتایج تکثیر قطعات DNA توسط آزمون PCR با جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 و EF2/ EF1 به ترتیب باندهای ۵۹۰ و ۱۲۰۰ جفت بازی را در ۴ جدایه منتخب *Fusarium* spp. نشان داد. تکثیر قطعات در نمونه شاهد (آب مقطر استریل) منفی بود. جدایه هایی که به عنوان *F. oxysporum* شناسایی شدند (جدول ۲)، مشخصات ریخت شناسی به شرح زیر داشتند: رنگ سطح زیرین پرگنه روی محیط کشت PDA از سفید تا بنفش تیره، بسیار متنوع بود. در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بعد از ۱۰ روز میزان رشد پرگنه روی محیط PDA حدود ۷-۸ سانتی متر بود. با میسلیم هوایی فراوان، به صورت پنبه ای، به رنگ سفید تا سفید مایل به بنفش که در برخی جدایه ها در مرکز به صورت سفید مایل به بنفش و قابل مشاهده بود. کنیدیوفورها معمولاً به صورت منوفالید ساده، منشعب و کوتاه می باشند. میکروکنیدیوم ها به وفور به صورت تک سلولی، تخم مرغی، بیضوی و قلوه ای شکل، در سرهای دروغین تشکیل می شوند. ماکروکنیدیوم ها سیلندری شکل، کمی خمیده و نوک تیز به وفور در اسپوردوخیوم های نارنجی

بررسی شدت بیماری زایی

در گیاهان مایه زنی شده با جدایه های *F. oxysporum* بخش های هوایی گیاهان از نظر زردی و پژمردگی مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاصل از شدت بیماری زایی جدایه های *F. oxysporum* و *F. solani* روی گیاهان مایه زنی شده، نشان داد از نظر بیماری زایی جدایه ها تفاوت معنی داری وجود دارد. نتایج آزمون بیماری زایی و ارزیابی شدت بیماری نشانگر این بود که جدایه های *F. oxysporum* با شدت بیماری زایی ۹۷/۷ درصد و فراوانی ۳۴/۱ درصد و جدایه های *F. solani* با شدت بیماری زایی ۸۷/۳ درصد و فراوانی ۲۷/۷ درصد از شدت بیماری زایی بیش تری برخوردار بوده و عوامل اصلی زردی و پژمردگی و بوته میری نخود در استان لرستان محسوب می شوند. همچنین جدایه های *F. redolans* با شدت بیماری زایی ۶۴/۲۴ درصد و فراوانی ۲۳/۸ درصد و جدایه های *F. falciforme* با شدت بیماری زایی ۳۸/۲ درصد و فراوانی ۱۴/۲ درصد در رتبه های بعدی بیماری زایی قرار دارند. ظهور علائم *F. oxysporum* و *F. redolans* در اندام های هوایی ارقام نخود مشابه و شامل زردی و پژمردگی قسمت های هوایی گیاه بود. علائم آزمون بیماری زایی، تعدادی از جدایه های *F. falciforme* در قسمت های هوایی گیاهان به صورت ظهور زردی و پژمردگی در برگچه های پایینی بوده که به تدریج به قسمت های بالایی گسترش پیدا کرد. روی ریشه ها

سفيد می‌باشد. کنیدیوفورها به صورت منوفالید ساده یا منشعب، میکروکنیدیوم‌ها به فراوانی در سرهای دروغین روی میسلیم هوایی تشکیل می‌شوند. ماکروکنیدیوم‌ها داسی شکل، اغلب ۳-۵ دیواره ضخیم دارند، یک سوم ابتدایی عریض‌تر بوده و سلول انتهایی قلاب مانند با سلول پایه پاشنه‌ای شکل و به فراوانی در اسپوردوخیوم کرم رنگ تا قهوه‌ای روشن تشکیل می‌گردند. میکروکنیدیوم‌ها یک یا دو سلولی، تخم‌مرغی شکل، قلوهای و استوانه‌ای شکل می‌باشد. کلامیدوسپورها به فراوانی به شکل تکی، دوتایی و یا زنجیره‌های کوتاه با دیواره صاف، انتهایی یا بینایی یا داخل کنیدیوم تشکیل می‌گردند. مشخصات ریخت‌شناسی، گونه‌هایی که به عنوان *F. falciforme* شناسایی شدند، به این شرح می‌باشد: دارای میسلیم هوایی سفید، زرد تا کرمی است. رنگ پشت پرگنه زرد می‌باشد. میزان رشد پرگنه روی محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بعد از ۷ روز حدود ۸/۵-۷ سانتی‌متر است. ماکروکنیدیوم‌ها بر روی اسپوردوخیوم، قایقی شکل دارای ۳-۵ دیواره، سلول پایه دارای کمی فرورفتگی با سلول‌های انتهایی نوک تیز می‌باشند. کنیدیوفورها کم و بیش صاف و بدون انشعاب روی میسلیم‌ها هوایی فراوان می‌باشند. میکروکنیدی تخم‌مرغی تا لوبیایی شکل و کلامیدوسپورها تکی، دوتایی و توده‌ای می‌باشند (شکل ۴).

رنگ تشکیل می‌گردند. سلول انتهایی در ماکروکنیدیوم‌ها غالباً سه بندی و گاهی ۴-۵ بندی، مقداری خمیده و کمی نوک تیز و سلول پایه پاشنه‌ای شکل و نسبتاً ساقه‌دار می‌باشد. کلامیدوسپورها کنیدیومی و ریشه‌ای به فراوانی روی محیط کشت CLA و PDA به صورت منفرد، جفتی و گاهی زنجیره‌های کوتاه و توده‌ای با سطح صاف تشکیل می‌گردد. مشخصات ریخت‌شناسی گونه *F. solani*، به شرح زیر می‌باشد: رنگ سطح زیرین پرگنه روی محیط کشت PDA کرم تا بنفش است. دارای میسلیم هوایی کم تا زیاد می‌باشد. میزان رشد پرگنه روی محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از گذشت ۱۴ روز حدود ۸-۷/۵ سانتی‌متر است. کنیدیوفورها به صورت منوفالید ساده نسبتاً بلند یا منشعب معمولاً کوتاه، میکروکنیدیوم‌ها کم و معمولاً ۱-۲ سلولی، ماکروکنیدیوم‌ها اغلب سه بندی می‌باشند. کلامیدوسپورها به فراوانی روی محیط کشت CLA و PDA به صورت منفرد، جفتی تشکیل می‌گردند. جدایه‌هایی که به عنوان *F. redolens*، از مناطق نخودکاری استان لرستان جمع‌آوری و شناسایی شد. با مشخصات ریخت‌شناسی؛ میزان رشد پرگنه روی محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بعد از ۷ روز حدود ۸-۶ سانتی‌متر است. رنگ سطح زیرین پرگنه روی محیط کشت PDA صورتی و در برخی موارد به رنگ قهوه‌ای روشن است. دارای میسلیم هوایی فراوان و



شکل ۳. a. شاهد سالم، b. و c. مشاهده علائم زردی در بوته آلوده به *F. falciforme*، d. پژمردگی و مرگ گیاهچه مایه‌زنی شده با عنوان *F. falciforme*، e. پوسیدگی ریشه و قهوه‌ای شدن بوته‌های آلوده به *F. falciforme*.

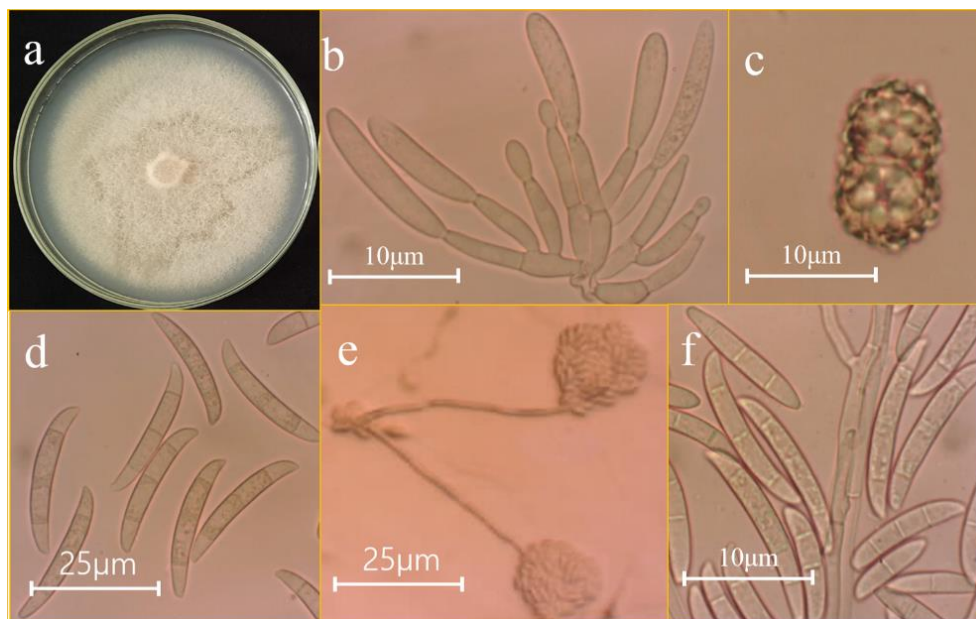
Figure 3- a. Healthy control, b. and c. Observing yellowing symptoms in a plant infected with *F. falciforme*, d. Wilting and death of a seedling inoculated with *F. falciforme*, e. Root rot and browning of the vascular tissues in a plant infected with *F. falciforme*.

redolens با شباهت ۹۶ درصد در گروه‌های خواهری قرار گرفتند (شکل ۵).

بحث

شناسایی گونه‌های فوزاریوم بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، بر تعداد محدودی ویژگی‌های تاکسونومیک با تفاوت‌های جزئی در ریخت‌شناسی و اهمیت تفاوت در گونه‌های مختلف فوزاریوم متکی می‌باشد (Leslie et al., 2001). لذا، استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای غلبه بر ماهیت محدود ویژگی‌های ریخت‌شناسی لازم می‌باشد. بنابراین در جهت برآوردن این نیاز، این مطالعه ارائه توصیفی از گونه‌های فوزاریوم مرتبط با بیماری زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود استان لرستان بر اساس خصوصیات بیماری‌زایی، شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی همراه با تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ترکیب توالی‌های مناطق ژنی فاکتور طول‌سازی ترجمه ۱-آلفا (*TEFI*) و همچنین تکثیر بخش‌هایی از DNA ریبوزومی، ناحیه ITS بر روی مجموعه‌ای از جدایه‌های *Fusarium spp.* جمع‌آوری شده از مزارع مناطق عمده کشت نخود استان لرستان می‌باشد.

در رسم درخت فیلوژنتیکی، گونه‌های به‌دست آمده با حمایت زیاد از یکدیگر تفکیک شدند و در کنار جدایه‌های اخذ شده از بانک ژن قرار گرفتند و نتایج حاصل از شناسایی مورفولوژیکی انجام شده را تایید نمودند. بنابراین بر این اساس گونه‌های مختلف فوزاریوم جدا شده از ریشه نخود مناطق نمونه‌برداری شناسایی شدند. جدایه‌های مورد مطالعه در چهار خوشه قرار گرفتند. جدایه‌ی شناسایی شده PQ093783 در خوشه اول با سایر جدایه‌های *F. oxysporum* با درصد تشابه ۱۰۰ درصد قرار گرفت، با توجه به ماتریس داده‌ها جدایه PQ093784 با سایر جدایه‌های در خوشه‌ی *F. redolens* با درصد تشابه ۱۰۰ درصد قرار گرفتند. همچنین جدایه PQ093782 با سایر جدایه‌های *F. falciforme* با درصد تشابه ۹۹ درصد و جدایه PQ093785 در خوشه جدایه‌های *F. solani* با درصد تشابه ۹۷ درصد را نشان داد. *Glomerella acutata* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد. جدایه‌های گروه *F. solani* با جدایه‌های گروه *F. falciforme* با شباهت ۹۹ درصد در گروه‌های خواهری قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های گروه *F. oxysporum* با جدایه‌های گروه *F.*

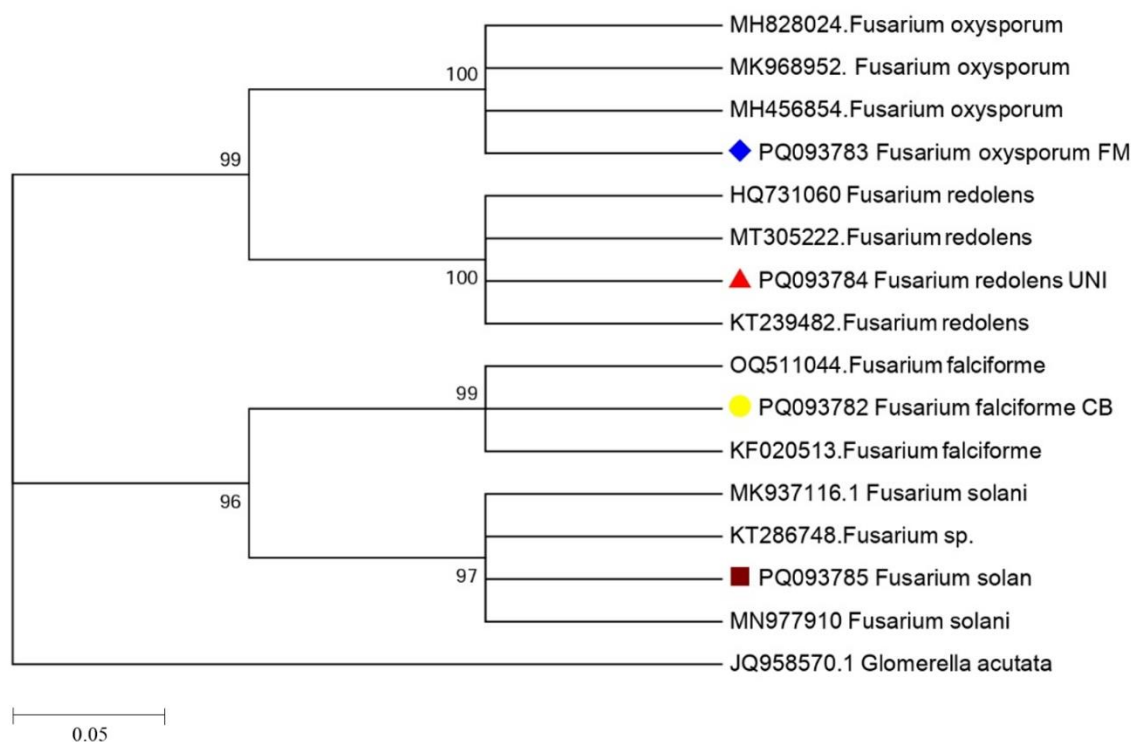


شکل ۴. A. پتری *F. falciforme* پس از ۷ روز در ۲۵ درجه سلسیوس روی محیط کشت PDA، B. فیالید، C. کلایدوسپور، D. ماکروکنیدی‌ها، E, F. سرهای دروغین ماکروکنیدی‌ها، میکروکنیدی‌ها و فیالید *F. falciforme* جدایه CB112
Figure 4- *Fusarium falciforme*: A Petri dish containing *F. falciforme* after 7 days of incubation at 25°C on PDA culture medium, **B.** Phialide, **C.** Chlamidospores, **D.** Macroconidia, **E, F.** Isolate CB112 *F. falciforme* false heads of Macroconidia, Microconidia and Phialides.

جدول ۲- جدایه‌های توالی‌یابی شده در این مطالعه و شماره دسترسی اخذ شده آن‌ها از بانک ژن

Table 2. The sequenced Isolates utilized in this study and their accession number in the GenBank database

Species	Isolate	<i>efl-a</i>	ITS
<i>Fusarium oxysporum</i>	FM18	PQ093783	PQ181487
<i>Fusarium solani</i>	FA48	PQ093785	PQ181502
<i>Fusarium redolens</i>	UN145	PQ093784	PQ181489
<i>Fusarium falciforme</i>	CB112	PQ181463	PQ093782



شکل ۵. درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های *Fusarium spp.* که در تجزیه و تحلیل بیشینه درست‌نمایی بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های ناحیه‌ی ژنی *efl-a* با مقادیر بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار در نقطه‌ی انشعاب ترسیم شده است. جدایه‌های منتخب در این پژوهش از استان لرستان با نشان مشخص شده‌اند.

Fig. 5. Phylogenetic tree constructed from a maximum likelihood analysis based on a concatenated alignment from *efl-a* sequences from *Fusarium spp.* isolates with 1000 bootstrap replicates at the branch points. The representative isolates from Lorestan Province marked with accordingly.

گونه‌های مرکب فوزاریوم *F. solani* و *F. oxysporum* از جمله قارچ‌هایی می‌باشند که در اغلب شرایط آب و هوایی فعالیت دارند (Leslie & Summerell, 2006). لذا دور از انتظار نیست که در استان لرستان که از تنوع اقلیمی متنوعی برخوردار است، گونه‌های مرکب فوزاریوم مشاهده شوند. در مطالعه ما هر دو گونه از شهرستان‌های سلسله و بیرانشهر و ازنا و دلفان که دارای اقلیم سردسیر می‌باشند، مشاهده شدند. همچنین در مناطق دیگر استان که اقلیم گرم‌تری دارند مانند خرم‌آباد و کوهدشت نیز مشاهده شدند.

در این پژوهش در مجموع ۱۲۰ جدایه فوزاریوم بیماری‌زا و ۳۵ جدایه فوزاریوم غیر بیماری‌زا از ۱۵۵ نمونه بوته‌های آلوده نخود از مزارع استان لرستان جمع‌آوری شد. با توجه به نتایج به دست آمده بیش‌ترین فراوانی متعلق به جدایه‌های *F. oxysporum* و جدایه *F. solani* بودند که با مطالعات سایر محققین تطبیق داشت. به گونه‌ای که مهم‌ترین و رایج‌ترین عوامل ایجاد بیماری‌های ریشه و طوقه در نخود می‌باشند (Westerlund et al., 1974; Mohammadi & Banihashemi, 2005; Nene et al., 2012; Jiménez-Díaz et al., 2015).

تعداد جدایه‌های بیمارگر نسبت به سایر گونه‌ها کمتر بود و میزان پراکنش آن نیز در سطح استان محدودتر بود، به نظر می‌رسد که گونه‌ی مذکور در گیاهچه نخود بیمارگر کم اهمیتی محسوب می‌گردد. بیماری‌زا بودن این گونه روی عدس نیز قبلاً توسط موسوی و زرین‌نیا در سال ۱۳۸۸ توسط به اثبات رسیده است. اما تا پیش از این جداسازی و شناسایی از ریشه نخود، یا گزارشی مبنی بر بیمارگری این گونه از ایران گزارش نشده است، لذا این اولین گزارش از بیماری‌زایی این گونه روی نخود می‌باشد.

از آنجا که *F. falciforme* بیمارگر ریشه‌ی غلات محسوب می‌گردند. با توجه به گستره‌ی وسیع کشت غلات در استان لرستان و تناوب بین کشت غلات با کشت نخود، فراوانی این گونه‌ها در خاک‌های مزارع استان نمی‌تواند دور از انتظار باشد. با توجه به آزمون تعیین دامنه‌ی میزبانی این گونه در این پژوهش نتایج زیر حاصل گردید. جهت تعیین دامنه‌ی میزبانی قارچ *F. falciforme* شاخص ارزیابی در گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های *F. falciforme* قسمت‌های درون خاک و بخش‌های هوایی گیاهان از نظر زردی و پژمردگی بررسی شدند. در این مطالعه نتایج نشان داد که بیش‌ترین کلنیزه شدن ریشه روی ذرت دیده شد، ماش پوسیدگی ریشه و پژمردگی بوته‌ها را نشان داد. گندم دارای علائم پوسیدگی ریشه و زردی بوته و در نهایت منجر به مرگ گیاهچه‌ها گردید. یکی از دلایل بالا بودن شدت بیماری‌زایی در گندم و ذرت می‌تواند ناشی از دامنه‌ی میزبانی این قارچ باشد؛ با توجه به وجود تناوب کشتی گسترده بین غلات و حبوبات و گستره‌ی وسیع دامنه‌ی میزبانی قارچ فوزاریوم امکان حضور در خاک و بقایای گیاهی عامل بیماری‌زا؛ می‌تواند دلیل اصلی شناسایی و جداسازی این قارچ از نخود باشد. قارچ عامل بیماری بصورت کلامیدسپور در بذر و بقایای آلوده گیاهی مانده و قادر است بیش از ۵ سال در خاک بقای خود را حفظ کند (Haware, 1993; Mukherjee et al., 2020). با توجه به جداسازی *F. falciforme* از ریشه گندم گمان‌زنی در مورد بروز آلودگی در مزرعه و انتقال از بقایای آلوده محصولی به محصول دیگر را افزایش می‌دهد. با توجه به اهمیت کشت گندمیان در حوزه زاگرس، تخصیص کشت مکرر اکثر مزارع

در آزمون بیماری‌زایی که انجام شد، برخی از جدایه‌های منتخب *F. oxysporum*، در گیاهچه‌های نخود قادر به ایجاد بیماری نبودند، که این ناتوانی برخی از جدایه‌ها ممکن است ناشی از شرایط آزمون بیماری‌زایی یا به دلیل غیربیماری‌زایی و ناتوانی ذاتی جدایه‌های مذکور باشد (Kaur et al., 2011). نشانه‌های بیماری در گیاهچه‌های نخود مایه‌زنی شده با *F. oxysporum* متغیر بوده و درجات مختلفی از زردی، پژمردگی، بافت مردگی و به ندرت ریزش برگچه‌ها مورد آزمایش مشاهده شد. ریشه گیاهان آلوده درجات مختلفی از پوسیدگی ریشه را نشان دادند. همچنین در برخی از جدایه‌ها *F. oxysporum* پوسیدگی ریشه نیز مشاهده شد. که با پژوهش انجام شده قبلی مطابقت داشت (Younesi et al., 2011). نشانه‌های بیماری ناشی از اغلب جدایه‌های گونه‌ی مرکب *F. oxysporum* در این پژوهش، در مقایسه با نشانه‌های بیماری ناشی از گونه‌ی *F. redolens* مطابقت داشت. براساس نشانه‌های بیماری و توالی‌یابی DNA نیز جدایه‌های گروه *F. oxysporum* با جدایه‌های گروه *F. redolens* با شباهت ۹۶ درصد در گروه‌های خواهری قرار گرفتند. لازم به ذکر است که، شناسایی دقیق این جدایه‌ها مستلزم ترکیبی از مطالعات مولکولی و بررسی‌های دقیق ریخت‌شناسی می‌باشد (Mazen et al., 2008). لذا با توجه به مرکب بودن گونه *F. oxysporum*، تنها اتکا به ویژگی ریخت‌شناسی منجر به شناسایی اشتباه بیمارگر می‌گردد. برای مدیریت صحیح و کارآمد بیماری شناسایی دقیق بیمارگر بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

جدایه‌های گروه *F. solani* با جدایه‌های گروه *F. falciforme* با شباهت ۹۹ درصد در گروه‌های خواهری قرار گرفتند. در آزمون بیماری‌زایی، تعدادی از جدایه‌های *F. falciforme* علائم در قسمت‌های هوایی گیاهان به صورت ظهور زردی و پژمردگی در برگچه‌های پایینی بوده که به تدریج به قسمت‌های بالایی گسترش پیدا کرد. همچنین در برخی موارد در برش‌های طولی و عرضی ساقه تغییر رنگ آوندها قابل مشاهده بود. با این وجود میانگین آلودگی ریشه در این گونه در مقایسه با جدایه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* از شدت کمتری برخوردار بود، با توجه به این که

بر اساس فراوانی جدایه‌ها، به نظر می‌رسد *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* عامل اصلی بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود در غرب ایران باشد. لذا این بیمارگر باید هم‌چنان به عنوان اولین اولویت در راستای مدیریت بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود در نظر گرفته شود. وقوع *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در گیاهان نخود آلوده از ایران قبلاً گزارش شده است (Shokri et al., 2020). اخیراً قارچ *F. redolens* از ساقه گیاهان نخود با علائم زردی و پژمردگی، در گیاهان آلوده نخود را از خاک و ریشه نخود آلوده با علائم پوسیدگی ریشه سیاه، در مناطق غربی ایران گزارش شده است (Saeedi & Jamali, 2021). در مطالعات ما مشابه مطالعات قبلی نشان داد، که علائم این بیماری شامل زردی و نکروز در قسمت‌های پایینی گیاه است که در حدود ۲ هفته پس از کاشت ظاهر می‌شود. همه‌ی جدایه‌های *F. redolens* در آزمون بیماری‌زایی علائمی مشابه آنچه که قبلاً برای *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* ذکر شده بود، بدون تغییر رنگ بافت آوندی ایجاد کردند. با توجه به این که بیماری پوسیدگی سیاه ریشه، یک بیماری موضعی می‌باشد و تمایز بین این بیماری و بیماری‌های سیستمیک مانند پژمردگی از دیدگاه آسیب‌شناسی گیاهی مهم است (Burgess et al., 1988). بنابراین، بر اساس نتایج بررسی حاضر، ارتباط *F. redolens* با علائم زردی و پژمردگی نخود که قبلاً برای اولین بار از ایران گزارش شده بود مطابقت داشت (Younesi et al., 2021). از نظر ویژگی‌های فیلوژنتیکی، *F. redolans* بیش‌ترین ارتباط را با *F. oxysporum* داشت و می‌توان این دو گونه را بر اساس تفاوت در توالی ژن‌های *TEF1-α* از یکدیگر تشخیص داد (Leslie & Summerell, 2008). همچنین *F. redolans* با *F. oxysporum* کلاد جداگانه‌ای ما بین کمپلکس‌های *F. solani* و *F. falciforme* ایجاد می‌کنند. که مطابق بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی DNA می‌باشد (Baayen et al., 2001; Bouregghda & Bouznad, 2009). یکی از دلایل ثبات بیماری در این مناطق، استفاده از محصول کشت شده کشاورزان به عنوان بذر از سالی به سال دیگر می‌باشد. یکی دیگر از دلایل آلودگی بالا و ماندگاری این قارچ در طی سالیان متمادی در خاک، خاک‌زاد بودن عامل بیماری می‌باشد (Sarapele & Banhashemi, 2000). نتایج اولین گزارش بررسی تنوع

این مناطق به گیاهان این خانواده، مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا از میان میکروارگانیسم‌های مختلف، گونه‌های قارچ فوزاریوم در این محصولات می‌باشند. همان‌طور که نخستین گزارش *F. falciforme* از ریشه گندم در ایران توسط Siahposh et al. (2018) می‌باشد. در لویا چیتی بیش‌ترین زردی بوته و زخم روی ریشه را نشان داد. در گاودانه زردی بوته‌ها بسیار مشهود بود. عدس طیفی از پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه را نشان داد. جو زردی و پژمردگی از علائم بارز بودند. شدت بیماری‌زایی در نخود ۳۸/۲ درصد شامل زردی و پژمردگی قسمت‌های هوایی گیاه بود. لویا قرمز کمترین کلنیزه شدن ریشه را نشان داد. در گیاهان شاهد هر گروه علائم بیماری مشاهده نشد. در گیاه بامیه مایه‌زنی شده نیز پس از گذشت ۶۰ روز علائمی مشاهده نشد و ریشه‌ها در پایان دوره با نمونه شاهد تفاوتی نشان نداد که می‌تواند بیانگر این باشد شرایط برای بیماری‌زایی مساعد نبوده یا این که رقم کشت شده نسبت به قارچ مدنظر مقاوم محسوب می‌شده است و یا ممکن است قارچ به صورت فرم مخصوص عمل نماید (Leslie et al., 2001).

نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیک بدست آمده از ترکیب توالی ژن‌های مذکور، با نتایج بررسی ریخت‌شناختی و استفاده از پروتکل‌های آغازگرهای اختصاصی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مطابقت داشت. بر اساس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک مطالعه ما، جدایه‌های فوزاریوم مناطق مختلف استان لرستان به چهار گونه مختلف تعلق داشتند *F. oxysporum* و *F. solani*، *F. redolens* بیش‌ترین فراوانی را در اکثر مناطق نمونه‌برداری داشتند و *F. falciforme* کم‌ترین فراوانی را داشتند. نتایج این بررسی‌ها کارآمدی مطالعات فیلوژنتیک بر اساس تجزیه و تحلیل توالی‌های دو جایگاه ژنی *TEF1-α* و ITS را در مطالعه و شناسایی مولکولی جدایه‌های *Fusarium* spp. تأیید نمود. نتایج ما منطبق بر یافته‌های دیگران بود که با صلاحیت و قدرت فیلوژنی گونه‌ها به خوبی شرح داده شده است (Taylor et al., 2000).

با توجه به نتایج کلی این مطالعه و سایر مطالعات مشابه، یک کمپلکس بیماری در اثر بیش از یک گونه بیمارگر می‌تواند عامل پژمردگی فوزاریومی نخود در مناطق غربی ایران باشد.

سپاس‌گزاری

نگارندگان این مقاله بابت حمایت‌های معنوی و فراهم‌سازی امکانات آزمایشگاهی توسط دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی لرستان از تمامی مسئولین و عزیزانی که یارگر این پروژه بودند، کمال تشکر و سپاس دارند.

ژنتیکی و ساختار جمعیتی جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *circeris* نشان داد، که بیش‌ترین تنوع ژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی ناشی از تفاوت درون‌گروهی جدایه‌ها بوده و همچنین میزان جریان ژنی در این بررسی بالا بوده که نشان از جابجایی عامل بیماری بین مناطق آلوده می‌باشد (Younesi et al., 2021).

References

- Ahmadi, K., Ebadzade, H., Hatami, F., Abdshah, H., Kazemian, A., & Avarrafie, M (2022). Agricultural statistics. Crops of the Ministry of Jihad Agriculture. *Bureau of Statistics and Information Technology*, 1, 45-49. (In Farsi)
- Baayen, RP., O'Donnell, K., Breeuwsma, S., Geiser, DM., & Waalwijk, C. (2001). Molecular relationships of fungi with in the *Fusarium redolens*- *F. hostae* clade. *Phytopathology*, 91, 37-44
- Bethesda, N. (2019). National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Bouregghda, H. & Bouznad, Z. (2009). Biological control of *Fusarium* wilt of chickpea using isolates of *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum*. *Acta Phytopathologica ET Entomologica Hungarica*, 44, 25-38.
- Burgess, L.W.L., Summerell, C.M., & Brett, A. (1988). Laboratory Manual for *Fusarium* Research. *University of Sydney*, 65, 352- 378.
- Campbell, C.L., & Madden, L.V. (1990). Introduction to plant disease epidemiology. *John Wiley and Sons, New Yourk*, 17, 134-167.
- Crous, P.W. Saim, G., Rab, W., & Whahey, S. (2021). *Fusarium*: more than a node or a foot shaped basal cell. *Studies in Mycology*, 98, 100-116.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- FAO. (2023). FAO STAT, Statistical Database of the United Nation Food and Agriculture Organization (FAO) Statistical Division. Rome, Italy, Available at, <http://www.fao.org/faostat>.
- Geiser, D.M., Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., & O'donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 473-479.
- Gerlach, W., & Nirenberg, H. (1982). The genus *Fusarium* pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fur Land-und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*, 22, 209-215.
- Golpayegani, S., Zafari, D., Khodakaramian, Gh. (2009). The Biological Control of Important *Faba* Bean Root Rot Agents Caused by Rhizospheric Antagonist Bacteria. Faculty of Agriculture. *Buali Sina University*, 1, 112-125.

- Haware, M. P. (1993). *Fusarium* diseases of crop in india. *Indian Phytopathology*, 46, 101–109.
- Jiménez-Díaz, R.M., Castillo, P., Del Mar Jiménez-Gasco, M., Landa, B.B., & Navas-Cortés, J.A. (2015). *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Protection*, 73, 16-27.
- Jiménez-Fernández, D., .Navas-Cortés, J.A., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R.M., & Landa, B.B. (2011). Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of *Fusarium* yellows in chickpea. *Plant Disease*, 95, 860-870.
- Kaur, R., Kaur, J., & Singh, R.S. (2011). Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. *Plant Pathology Journal*, 9, 79-91.
- Landa, B. B., Hervàs, A., Bettioli, W., & Jiménez-Díaz, R. M., (1997). Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*, 25, 305-318.
- Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Hervàs, A., & Jiménez-Díaz, R. M. (2001). Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of *Fusarium* wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology*, 91, 807-816.
- Leslie, J.F., Zeller, K.A., & Summerell, B.A. (2001). Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59, 107-117.
- Leslie, J.F., & Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. *Plant Pathology*, 78, 145- 176.
- Leslie, J.F., & Summerell, B.A. (2008). *The Fusarium laboratory manual*. *John Wiley Sons*, 18, 198- 216.
- Mazen, M. M., El-Btanony, N., El-Monium, M. M., & Massoud, O. N. (2008). Cultural filtrate of *Rhizobium spp.* and *Arbuscular Mycorrhiza* are potential biological control agents against root rot fungal disease of *Faba bean*. *G. J. Biotechnol. Biochemist*, 3, 11-18.
- Mohammadi, H., & Banihashemi, Z. (2005). Distribution, pathogenicity and survival of *Fusarium* spp. The causal agents of chickpea wilt and root rot in the Fars province of Iran. *Iranian Journal of plant pathology*, 41, 688-708.
- Mohseni, M. (2006). Evaluation of resistance of different chickpea cultivars to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causes wilting and yellowing of chickpea plants. *The first legume conference of Ferdowsi University of Mashhad*, 3, 447-486.
- Mousavi, M. & Zarinnia, V. (2009). Identification of *Fusarium* species causing wilting, seedling death and lentil root rot in Fars province and comparison of their pathogenicity. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 4, 63-87.
- Mukherjee, A., Singh, B. K., & Verma, J. P. (2020). Harnessing chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed endophytes for enhancing plant growth attributes and bio-controlling against *Fusarium* sp. *Microbiological Research*, 237, 126-134.
- Navas-Cortés, J.A., Alcalá-Jiménez, A.R., Hau, B., & Jiménez-Díaz, R.M. (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, 135-46.

- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania state university press. *University Park*, 51, 692-710.
- Nene, Y., Sheila, V., & Sharma, S. (2012). A world list of chickpea and pigeonpea pathogens. *International Crops Research Institute for the Semi-arid Tropics: Andhra Pradesh, India*, 5, 165-178.
- Saeedi, S., & Jamali, S. (2021). Molecular characterization and distribution of *Fusarium* isolates from uncultivated soils and chickpea plants in Iran with special reference to *Fusarium redolens*. *Journal of Plant Pathology*, 103, 167-83.
- Sarapele, A., & Banihashemi, Z. (2000). Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* races in Iran and other *Fusarium oxysporum* isolates from virgin and agricultural lands of Maharloi region of Fars. *Plant Diseases*, 36, 15-30.
- Siahpoush, S., & Darvishnia, M. (2018). Identification of *Fusarium* Species in Lorestan Province by Internal Transcribed Spacer Intergenic Area. *Biotechnology in Agriculture (Agricultural Research)*, 17, 61-67. SID. <https://sid.ir/paper/366380/fa>
- Shafeghi, F., Montakhebi, K., Shahraeein, N., Veysi, M., Ashtari, S., & Alipanahi, H. (2020). Handbook of chickpea herbal medicine, 1, 67-98.
- Shokri, J., Javan-Nikkhah, M., Rezaei, S., Zamanizadeh, H.R., & 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 Phytopathology*, 88, 11-22.
- Stack, R. W., & McMullen, M. P. (1991). Effect of fungicidal seed treatments on common root rot of spring wheat and barley. *North Dakota Farm Research*, 49, 13-16.
- Summerell, B. A. (2019). Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 323-339.
- Taheri, N., Falahati Rastegar, M., Jafarpoor, B., Bagheri, A.R., and Jahanbaghsh, V. (2011). Investigation resistance genotypes of lentil against isolates of *Fusarium* wilt isolated from North and Razavi Khorasan Province, *Plant Production Research*, 18: 118 -105. (In Farsi).
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., & Geiser, D.M. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 21-32.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D.G. (1997). The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiply sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-4882.
- Toyoda, H., Hashimoto, H., Utsumi, R., Kobayashi, H., & Ouchi, S. (1988). Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of *Fusarium* wilt in tomato. *Phytopathology*, 73, 1548-1553.
- Trapero-Cases, A., Hervàs, A., & Jiménez-Díaz, R. M. (2015). Fungal wilt and root rot disease of chickpea in southern Spain. *Phytopathology*, 75, 1146-1151.
- Wang, X., Liu, W., Chen, X., Tang, C., Done, Y., Ma, J., Huang, X., Wei, G., Han, Q., & Huang, L. (2010). Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. *BMC plant biology*, 10, 94-123.

Wegener, M. (1992). Optimierung von saatgutpillierungen mit mikrobiellen antagonisten zur biologischen biologischen bekämpfung von *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc. In weizen. *Diplomarbeit, Georg -August -Universitaet Göttingen, Göttingen, Germany, 89, 42 - 56*.

Westerlund, F., Campbell, R., & Kimble, K. (1974). Fungal root rots and wilt of chickpea in California. *Phytopathology, 64, 432-436*.

Younesi, H., Bazgir, A., Darvishnia, M., & Chehri, Kh. (2021). Study on biological controlling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, causal agent of chickpea *fusarium* wilt, using indigenous *Trichoderma* spp. isolates of Kermanshah provience and development of *Trichoderma* sp. based formulations. College of Agriculture and Natural Resources. *Department of Plant Protection, 1, 94-65*.



© 2024 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).