

تولید لاین نخود مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریوم (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*) به روش تلاقی برگشتی مبتنی بر نشانگر

حمید حسینیان خوشرو^{۱*}، زهرا سادات شبر^۲، حمید رضا پورعلی بابا^۱، جهاد سورنی^۲، لیلا پورهنگ^۲

- ۱- موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران.
- ۲- پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

چکیده مبسوط

مقدمه: بیماری پژمردگی فوزاریومی (*Fusarium oxysporum*) از بیماری‌های مهم نخود بوده که در اکثر مناطق کشت محصول در کشور حضور داشته و ضمن کاهش کیفیت، در مواردی باعث خسارت ۱۰٪ مزارع نخود می‌شود. تکنیک تلاقی برگشتی پیوسته با نشانگر یکی از روش‌های موثر و دقیق در انتقال ژن‌های خاص مانند ژن‌های مقاومت به بیماری در زمان کوتاه در گیاهان خودگشن می‌باشد. رقم نخود هاشم از ارقام با عملکرد بالا، دارای تیپ ایستاده و پابلند بوده که به دلیل حساسیت به بیماری پژمردگی فوزاریوم، کشت آن با محدودیت مواجه شده است. لذا این تحقیق به منظور انتقال صفت مقاومت به فوزاریوم از رقم مقاوم آنا به رقم مطلوب نخود هاشم به روش تلاقی برگشتی مبتنی بر نشانگر انجام شد.

روش‌شناسی: این تحقیق طی پنج سال زراعی (۴۰۲-۱۳۹۷) انجام شد. بین والدین انتخابی رقم نخود آنا (به‌عنوان والد بخشنده) و رقم نخود هاشم (به‌عنوان والد گیرنده) تلاقی انجام شده و نتاج F_1 جهت تولید نسل BC_1F_1 با رقم هاشم تلاقی برگشتی داده شد. عملیات تلاقی برگشتی تا حصول نتاج BC_3F_1 (سه مرتبه تلاقی برگشتی) ادامه داشت. سپس نتاج حاصل یک مرتبه خودگشن و نتاج BC_3F_2 حاصل شد. برای تشخیص و غربال نمودن نتاج حاوی آل‌های مقاومت به بیماری پژمردگی نخود در هر نسل از چهار آغازگر پیوسته با ژن‌های مقاومت و برای شناسایی نتاج با بیشترین تشابه ژنتیکی با والد گیرنده از ۱۶ نشانگر SSR استفاده گردید. در نهایت لاین‌های انتخابی نسل BC_3F_2 از لحاظ مقاومت به بیماری فوزاریوم ارزیابی فنوتیپی شدند. همچنین برای ترسیم QTLها روی نقشه مرجع و فراتحلیل QTLها از نرم‌افزار BioMercator استفاده شد.

یافته‌های تحقیق: از تلاقی والدین، ۲۰ هیبرید F_1 واقعی به‌دست آمد که جهت تولید نسل BC_1F_1 با والد هاشم اولین تلاقی برگشتی انجام شد. بر اساس نتایج پویش ژنومی نتاج BC_1F_1 به‌وسیله چهار نشانگر پیوسته با ژن‌های مقاومت به فوزاریوم (TA59, TA96, TR19, CaM1402)، ۶ ژنوتیپ BC_1F_1 حاوی آل‌های مقاوم بودند که جهت تولید نسل BC_2F_1 با رقم هاشم تلاقی برگشتی داده شدند. از مجموع ۵۲ نتاج BC_2F_1 ، ۱۲ ژنوتیپ BC_2F_1 حاوی ۴ آل مقاوم بوده از بین آنها براساس نتایج پویش ژنومی به‌وسیله ۱۶ نشانگر SSR، ۵ ژنوتیپ دارای بیشترین تشابه ژنتیکی با والد گیرنده بود که جهت تولید نسل BC_3F_1 با رقم هاشم تلاقی برگشتی داده شدند. ۱۲ نتاج BC_3F_1 حاوی آل‌های مقاوم و دارای بیشترین تشابه ژنتیکی به والد گیرنده، جهت تثبیت زمینه ژنتیکی و به‌دست آوردن

* نگارنده مسئول: h.hosnian@areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲



یک جمعیت هموزیگوت خودگشن شده و نتاج BC₃F₂ حاصل شد که ارزیابی‌های فنوتیپی مقاومت به بیماری این نتاج، حاکی از وجود سه لاین مقاوم با خصوصیات زراعی مناسب و بیشترین تشابه ژنتیکی با والد گیرنده بود. همچنین در این پژوهش به کمک فراتحلیل مطالعات QTL، نواحی مرتبط با مقاومت ژنتیکی به نژادهای مختلف این بیماری روی کروموزوم‌های ۲، ۴، ۵ و ۶ شناسایی شد.

کلمات کلیدی: پژمردگی فوزاریوم، تلاقی برگشتی، گزینش، نخود، نشانگر مولکولی

مقدمه

که از این هشت نژاد، نژاد ۱ و ۳ در ایران بیشترین خسارت را نسبت به سایر نژادها به محصول نخود وارد می‌کنند (Kavousi *et al.*, 2014). از آنجایی که این بیماری خاک‌زاد است، لذا کنترل از طریق روش‌های زراعی کارایی چندانی ندارد و بنابراین تولید ارقام مقاوم به نژادهای خاص بیماری یکی از کارآمدترین راهکارهای مقابله با این بیماری است (Arvayo-Ortiz *et al.*, 2012). اصلاح مولکولی به کمک نشانگرهای مولکولی یکی از بهترین راه‌های کاهش زمان و هزینه برای اصلاح صفات مرتبط با کیفیت و مقاومت به آفات و بیماری‌های گیاهی در برخی گیاهان زراعی و به خصوص نخود مطرح شده است. زیرا نشانگرهای DNA با کارآمدی بسیار بهتر و در زمان کمتر راندمان انتخاب صفات زراعی مهم را در برنامه‌های اصلاحی افزایش داده و تنوع آلی را در بین رقم‌های مختلف بررسی می‌نماید. از جمله این نشانگرها می‌توان به نشانگرهای مقاومت به پژمردگی فوزاریوم و برق‌زدگی نخود (Tatte *et al.*, 2018)، نشانگرهای پیوسته با صفات ارتفاع، اندازه بذر، کیفیت بذر و غیره (Taran *et al.*, 2014) اشاره کرد. یک مزیت ویژه اصلاح مبتنی بر نشانگر، هرم سازی ژن‌های مقاومت است، زیرا ممکن است یک ژن هم مقاومت را حاصل کند اما این مقاومت به زودی شکسته شود (Breseghello *et al.*, 2013). تکنیک تلاقی برگشتی پیوسته با نشانگر (MABC) یکی از روش‌های موثر و دقیق در انتقال ژن‌های خاص مانند ژن‌های مقاومت به بیماری در زمان کوتاه در گیاهان خودگشن می‌باشد (Varshney *et*

نخود (*Cicer arietinum* L.) گیاهی خودگشن و دیپلوئید ($2n=2x=16$) می‌باشد که دارای ژنومی نسبتاً کوچکی با اندازه ۷۴۰ مگا باز است (Arumuganathan and Earle, 1991). کشور ایران با سطح زیر کشت حدود ۵۵۰ هزار هکتار و میانگین عملکرد (۵۳۶ کیلوگرم در هکتار) و میزان تولید ۳۱۰۰۰۰ تن (FAO, 2020)، پنجمین کشور دنیا از لحاظ تولید نخود بعد از کشورهای هندوستان، پاکستان، ترکیه و استرالیا می‌باشد. ۹۸ درصد سطح زیر کشت نخود در ایران در شرایط دیم کشت می‌شود. عملکرد گیاه نخود در واحد سطح ۴۴ درصد کمتر از میانگین عملکرد دانه نخود در جهان (۹۶۸ کیلوگرم در هکتار) می‌باشد و نسبت به میانگین عملکرد کشورهای مهم تولید کننده نخود، عملکرد این گیاه در ایران بسیار پایین می‌باشد (FAO, 2020). عوامل مختلفی در پایین بودن عملکرد گیاه نخود موثر می‌باشد که از جمله می‌توان خسارت تنش خشکی، بیماری برق‌زدگی و پژمردگی فوزاریوم به مزارع نخود و همچنین پتانسیل پایین عملکرد دانه ارقام و توده‌های محلی را نام برد. یکی از محدودیت‌های اصلی تولید نخود، تنش حاصل از بیماری پژمردگی فوزاریوم (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*) است که سالانه ۱۰ تا ۱۵ درصد و در شرایط مناسب رشد بیماری، تا ۱۰۰ درصد به محصول نخود خسارت می‌زند. تاکنون تعداد هشت نژاد بیماری‌زا برای فوزاریوم در نخود شناسایی شده

ژنوتیپ‌های حساس و نیمه حساس مشاهده نشد. همچنین نشانگر TA-96 سه آلل با اندازه‌های ۲۴۰، ۲۵۰ و ۲۶۵ تولید می‌کند که آلل ۲۶۵ در ژنوتیپ‌های مقاوم مشاهده شد. نشانگر TR-19 تعداد پنج آلل با اندازه‌های ۲۱۵، ۲۲۷، ۲۴۵، ۲۵۵ و ۲۹۰ تولید نمود که آلل ۲۷۷ در تمام ژنوتیپ‌های متحمل شناسایی شد. مایر و همکاران (Mayer et al., 1997)، پادالیا و همکاران (Padaliya et al., 2013) و رانی و همکاران (Rani et al., 2020) گزارش کردند که نشانگر CS-27 با حساسیت به فوزاریوم پیوسته است. رقم نخود هاشم از جمله ارقام نخود ایرانی می‌باشد که دارای عملکرد بالا، ارتفاع و تیپ بوته ایستاده و مناسب برای برداشت مکانیزه می‌باشد که در سال‌های اخیر به دلیل شکسته شدن مقاومت آن به بیماری پژمردگی فوزاریوم، کشت این رقم با محدودیت روبرو شده است. هدف این پروژه انتقال صفت مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریوم (*Fusarium oxysporum*) از رقم *f.sp. ciceris* مقاوم آن‌ها به رقم پر عملکرد و بازارپسند هاشم از طریق تکنیک تلاقی برگشتی مبتنی بر نشانگر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت والدین انتخابی و انجام تلاقی: این پروژه طی پنج سال زراعی (۱۴۰۲-۱۳۹۷) انجام شد. در سال اول (۹۷-۱۳۹۶) والدین انتخابی رقم نخود آن‌ها (به‌عنوان والد بخشنده) و رقم نخود هاشم (به‌عنوان والد گیرنده) در بلوک‌های تلاقی واقع در گلخانه تحقیقاتی موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور کشت شدند (جدول ۱). در زمان گلدهی با شناسایی گل‌های آماده و مناسب تلاقی، عملیات اخته کردن و گرده افشانی مصنوعی انجام شد. بذور حاصل از تلاقی (F_1) نتاج نسل اول به همراه والدین کشت شده و از نظر صحت دورگ‌گیری و عدم خودگشتی والدین مورد بررسی قرار گرفتند. در سال بعد نتاج نسل اول F_1

(al. 2014). گزارش شده که ژن‌های مقاومت به نژادهای ۱، ۳، ۴ و ۵ (*foc1 and foc3, foc4 and foc5*) در دو گروه ژنی پیوسته به هم روی گروه لینکاژی دوم LGII که معمولاً آن را معادل کروموزوم دوم نخود می‌دانند، قرار دارند. گزارشات نشان می‌دهد که اکثر نژادهای بیماری‌زا با یک یا چند ژن خاص کنترل می‌شوند (Winter et al. 2000; Sharma & Muehlbauer 2007; Cobos et al. 2009; Gowda et al. 2009; Halila et al. 2009). در مجموع، گزارشات مختلف بسیاری وجود دارد که نشانگرهای پیوسته با این صفت را ذکر کرده‌اند. اما جدیدترین مطالعه (Garg et al., 2018) نشان می‌دهد که عمده نشانگرها به صورت یک کلاستر روی کروموزوم ۲ نخود قرار دارند که بین ناحیه ۱۵/۴۵ تا ۲۷/۱۸ مگابازی این کروموزوم واقع شده‌اند. تاکنون کارهای موفق در زمینه استفاده از نشانگرهای مولکولی به منظور گزینش مبتنی بر نشانگر در جهت تایید انتقال ژن‌های مقاومت به فوزاریوم از ارقام نخود مقاوم به ارقام حساس صورت گرفته است. تات و همکاران (Tatte et al., 2018) از نشانگر پیوسته با حساسیت به فوزاریوم (CS-27) و نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت به فوزاریوم (TA-59, TA-96, TR-19) در سه جمعیت نخود استفاده نمودند و در رقم متحمل تمام نشانگرها مشاهده شده و بالعکس در رقم حساس، مشاهده نشدند. از طرفی نشانگر CS-27F/R فقط در رقم حساس مشاهده شد. وینتر و همکاران (Winter et al., 2000) سه نشانگر TA-59، TA-96 و TR-19 را در یک گروه پیوستگی که ژن‌های مقاومت در آن حضور داشتند، نقشه‌یابی کردند. گورج و همکاران (Garg et al., 2018) گزارش کردند که TR19 یک نشانگر مشترک برای مقاومت به نژادهای ۱ و ۳ فوزاریوم در نخود است. مایسورا و همکاران (Mausuria et al., 2017) گزارش کردند که نشانگر TA-59 مجموعاً چهار آلل با اندازه‌های ۲۴۵، ۲۵۸، ۲۷۰ و ۲۸۲ تولید می‌کند که آلل ۲۵۸ در ژنوتیپ‌های مقاوم و نیمه مقاوم مشاهده شد اما در

(هیبریدهای درست) جهت تولید نسل BC₁F₁ با رقم هاشم تلاقی برگشتی داده شد. عملیات تلاقی برگشتی تا حصول نتاج BC₃F₁ (سه مرتبه تلاقی برگشتی) ادامه داشت. جهت تثبیت ژن‌های انتقالی و به دست آمدن یک جمعیت هموزیگوس نتاج BC₃F₁ به دست یک مرتبه خودگشن شده و نسل BC₃F₂ به دست آمد.

منا آنالیز QTL: اطلاعات QTL از تعداد ۹ مقاله منتشر شده از سال ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۸ انجام شده روی نقشه‌یابی QTL برای مقاومت در برابر فوزاریوم جمع‌آوری شد و از ۲۹ QTL اولیه برای شناسایی نواحی منا QTL استفاده گردید. ترسیم QTL‌ها روی نقشه مرجع (Hiremath *et al.*, 2012) و فراتحلیل QTL‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioMercator نسخه ۴/۲ انجام شد (Arcade *et al.* 2004). گروه‌های پیوستگی و QTL توسط نرم‌افزار Map Chart نسخه ۲/۳۲ ترسیم شد.

شناسایی نتاج حاوی ژن‌های مقاومت در هر نسل (FGS^۱): برای تشخیص و غربال نمودن لاین‌های حاوی آلل‌های مقاومت به بیماری پژمردگی نخود از آغازگرهای پیوسته با آلل (ASAP^۲) استفاده شد. به همین منظور تمامی مقالات مرتبط با نشانگرهای پیوسته با بیماری فوزاریوم در گیاه نخود مورد بررسی دقیق قرار گرفت و نهایتاً ۱۶ نشانگر انتخاب گردید. به منظور شناسایی بهترین نشانگری که روی ژل آگارز دارای چندشکلی بوده و به راحتی قابل تفکیک در دو ژنوتیپ مقاوم (آنا) و حساس (هاشم) باشد، تمامی ۱۶ آغازگر روی دو ژنوتیپ مذکور آزمایش شد و در نهایت چهار نشانگر (TA59, TA96, TR19, CaM1402) که طبق مطالعات انجام شده (Rani *et al.* 2020, Maisuria *et al.* 2017) با

ژن‌های مقاومت پیوستگی بسیار بالایی داشتند و در نواحی منا QTL واقع شده بودند، انتخاب گردیدند.

شناسایی نتاج دارای بیشتری تشابه ژنتیکی با

والد گیرنده در هر نسل (BGS^۳): برای شناسایی نتاج با بیشترین تشابه ژنتیکی با والد گیرنده (ژنوتیپ‌هایی که بیشترین زمینه ژنتیکی والد گیرنده را بازیابی کرده بودند) از ۱۶ نشانگر SSR استفاده گردید. نشانگرهای مذکور از ۴۲ نشانگر SSR نخود (Halila *et al.* 2009, Varshney *et al.*, 2013) که بیشترین چندشکلی را در والدین از خود نشان داده بودند انتخاب شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

PCR: به منظور استخراج DNA اقدام به کشت تمامی ژنوتیپ‌های مورد آزمایش در هر نسل شد و سپس از اندام هوایی جهت استخراج DNA به روش CTAB نمونه‌گیری شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۱۵ میکرولیتر انجام و محصول حاصل بر روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد تفکیک و ارزیابی شدند. عملیات استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام شد.

ارزیابی فنوتیپی: لاین‌های انتخابی نسل BC₃F₂ از

لحاظ مقاومت به بیماری فوزاریوم ارزیابی فنوتیپی شدند. ارزیابی فنوتیپی در محیط اتافک رشد انجام شد. بدین منظور پس از کشت بذور و ظهور برگ‌های حقیقی، نوک ریشه‌ی گیاهچه در مرحله ۴ تا ۶ برگی بریده شده و در سوسپانسیون اسپور حاوی قارچ عامل بیماریزایی پژمردگی فوزاریوم فرو برده شد و سپس مجدداً در گلدان‌های حاوی پرلیت کشت گردیدند. علائم بیماری به تدریج از هفته دوم پس از تلقیح در گیاهان حساس ظاهر شد، یادداشت برداری از درصد مرگ و میر دو بار در هفته سوم و چهارم (برای

- 1 . Foreground Selection
- 2 . Allele-specific associated polymorphism
- 3 . Background selection

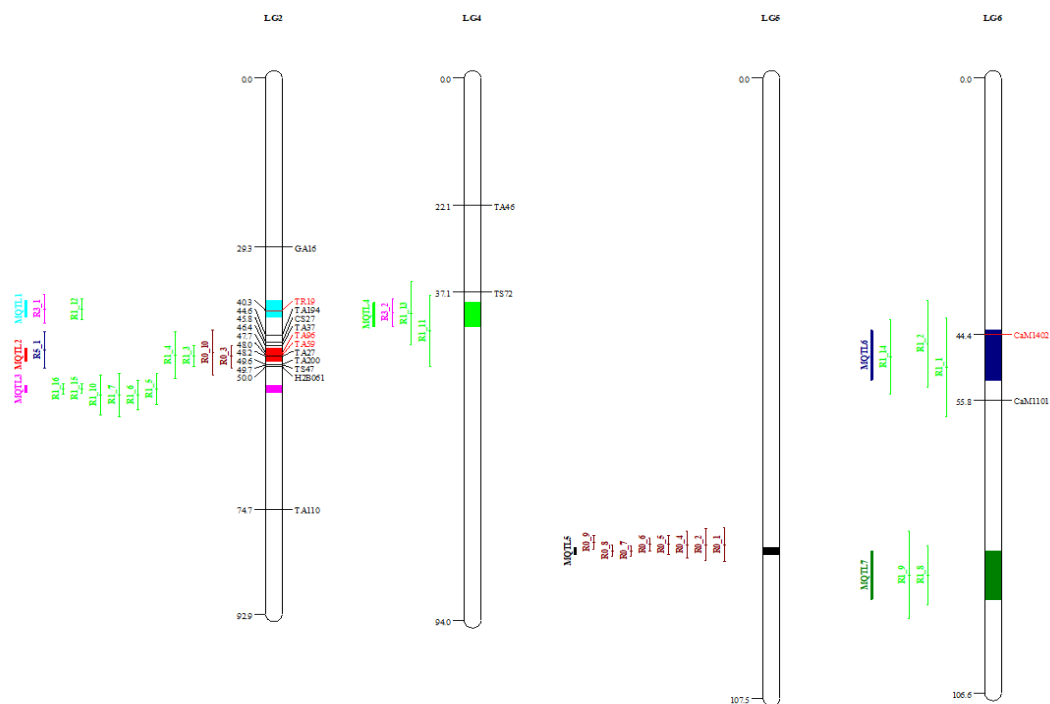
و نهایتاً یادداشت برداری دوم به عنوان واکنش نهایی در نظر گرفته شد.

نژادهای مولد پژمردگی) و پنجم و ششم (برای نژاد مولد زردی) پس از تلقیح براساس روش پیشنهادی شارما و همکاران (Sharma *et al.* 2005) انجام گرفت

جدول - مشخصات والدین شرکت کننده در تلاقی برگشتی

Table 1. List of parental material and their attributes used in the backcross

متوسط عملکرد دانه Seed yield (kg/ha)	وزن ۱۰۰ دانه 100-Seed weight (gr)	تحمل به فوزاریوم Fusarium tolerant	ارتفاع بوته Plant Height (cm)	نام والد Parental name
1200	35	حساس Susceptible	45	هاشم (والد گیرنده) Hashem (recurrent parent)
1100	36	متحمل Tolerant	37	آنا (والد بخشنده) Ana (donor parent)



شکل ۱- نواحی شناسایی شده متا QTL به همراه نشانگرهای SSR مورد استفاده در بخش پویس ژنومی. نشانگرهای مورد استفاده در شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم در این آزمایش به رنگ قرمز نشان داده شده‌اند.

Fig 1. Meta-QTL identification regions along with SSR markers used in genomic scanning. The markers used in the identification of resistant genotypes in this experiment are shown in red.

نتایج و بحث

آنالیز متا-QTL: نتایج آنالیز متا QTL مرتبط با مقاومت به بیماری فوزاریوم نشان داد (جدول ۲ و شکل ۱) که بیشترین تعداد QTL های اولیه، نقشه‌یابی شده روی کروموزوم‌های نخود (13 QTL) روی کروموزوم ۲ قرار گرفتند. علاوه بر این، نژاد ۱ بیشترین QTL ها (QTL16) را دارا بود. ترسیم QTL و فراتحلیل نقشه‌یابی QTL29 روی نقشه ژنتیکی مرجع، تعداد هفت متا QTL را روی چهار کروموزوم ۲، ۴، ۵ و ۶ نخود نشان داد (شکل ۱). MQTL های ۱ الی ۷ به ترتیب شامل دو، پنج، شش، سه، هشت، سه و دو QTL اولیه بودند. اولیه MQTL1 مربوط به نژاد ۱ و ۳ فوزاریوم بودند. QTL های اصلی در MQTL2 مربوط به نژادهای مقاومت ۰، ۱ و ۵ فوزاریوم بود. MQTL3، MQTL6 و MQTL7 فقط شامل QTL هایی بودند که کنترل نژاد ۱ بیماری را بر عهده داشتند. MQTL4 در گروه پیوستگی ۴ (LG4) نخود قرار داشت و شامل QTL هایی بود که مقاومت در برابر

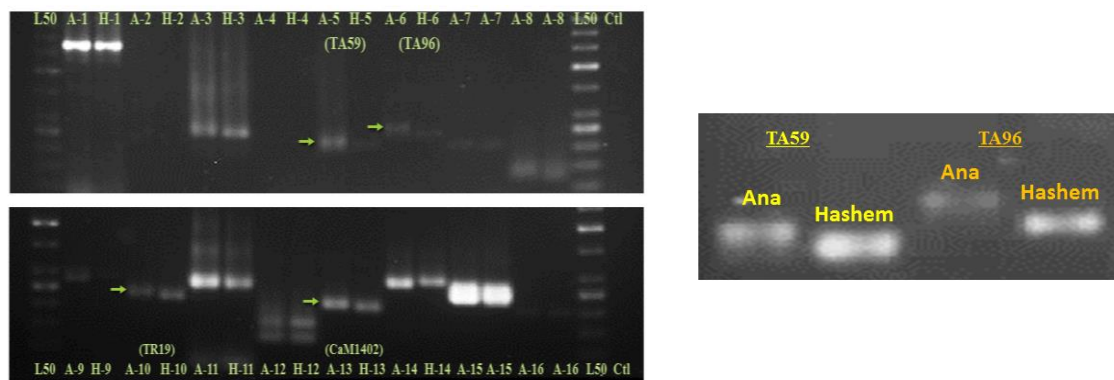
نژادهای ۱ و ۳ را کنترل می‌کنند. از طرفی، MQTL5 که در گروه پیوستگی ۵ (LG5) قرار داشت، شامل QTL هایی است که نژاد صفر را کنترل می‌کنند.

کروموزوم شماره ۲ نخود (LG2) دارای سه MQTL (۱، ۲ و ۳) بود که به ترتیب در محل‌های ۴۰/۰۱، ۴۸/۰۶ و ۵۳/۹۹ سانتی‌مورگان با طول ۲/۳۴، ۲/۸۷ و ۱/۱۵ سانتی‌مورگان قرار داشتند. در هر یک از LG4 و LG5 یک MQTL وجود داشت که طول آن روی نقشه ژنتیکی برابر با ۲/۶۰ و ۰/۹۱ سانتی‌مورگان بود. همچنین، دو MQTL بر روی LG6 در ژنوم نخود به نام MQTL6 و MQTL7 با طول ۹/۲۶ و ۸/۴۶ سانتی‌مورگان پیدا شد که مربوط به مقاومت نژاد ۱ فوزاریوم بودند. اندازه بزرگ این MQTL ها به دلیل نوع جمعیت یا میزان R2 در QTL های اولیه بود. در مجموع، نواحی ژنومی کاندید در این مطالعه می‌تواند توسط نقشه‌یابی دقیق به منظور شناسایی ژن‌های کاندید خاص هر نژاد مورد استفاده قرار گیرد و همچنین منتج به معرفی نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن‌های مذکور جهت انتخاب به کمک نشانگر و هرمی کردن ژن‌ها گردد.

جدول ۲- نتایج فراتحلیل QTL های کنترل کننده مقاومت به فوزاریوم در نخود

Table 2. Results of meta-analysis of QTLs controlling resistance to Fusarium in chickpea

L G	MQTL	ارزش	موقعیت	فاصله	فاصله	تعداد	میانگی	نشانگر	موقعیت	موقعیت	موقعیت
		AIC	روی	اطمینان	ژنتیکی	QTL ها	R ² ن	سمت چپ	سمت	چپ	سمت راست
		AIC Value	Map position (cM)	Confidence Interval (cM)	Genetic distance (cM)	Number of initial QTLs	Mean R ² %	L-marker	L-marker position (cM)	R-marker	R-marker position (cM)
2	MQTL 1		40.01	38.57-41.44	2.87	2	21.04	CKaM1436	38.27	CKaM1537	41.42
	MQTL 2	51.47	48.06	46.89-49.23	2.34	5	24.50	TA37	46.35	H2B061	49.99
	MQTL 3		53.99	53.41-54.56	1.15	6	36.02	CKaM0759	53.13	CKaM1333	54.59
4	MQTL 4	11.36	44.91	43.61-46.21	2.60	3	16.31	TOG906662	43.63	CKaM0244	46.29
5	MQTL 5	18.60	80.99	80.54-81.45	0.91	8	58.90	TA179	80.33	ICCM0076	81.79
6	MQTL 6	29.8	45.17	40.90-49.45	9.26	3	11.94	CGMM020	40.37	TC79726	50.21
	MQTL 7	1	86.11	81.88-90.34	8.46	2	10.69	TOG908356	81.82	TOG899657	90.51



شکل ۲- نتایج پویش ژنومی دو والد حساس (هاشم: H) و متحمل (آنا: A) به وسیله ۱۶ نشانگر و انتخاب چهار نشانگر با تفکیک قابل قبول بین والدین (TA59, TA96, TR19, CaM1402)

Fig 2. The results of genomic scanning of two sensitive (Hashem: H) and tolerant (Ana: A) parents using 16 markers and selecting four markers with acceptable separation between parents (TA59, TA96, TR19, CaM1402)

(Pratap *et al.*, 2014) و پرتاب و همکاران *et al.*, 2017) و مانور و همکاران (Mannur *et al.*, 2019) نیز از این نشانگرها برای تولید لاین‌های مقاوم به نژادهای ۱، ۲، ۳ و ۴ استفاده شده و نتایج موفقیت آمیزی به دست آمده است.

انتخاب نشانگرها برای انتخاب پیش زمینه (Background Selection): به منظور انتخاب نشانگرهایی جهت انتخاب نتاج با بیشترین تشابه ژنتیکی با والد گیرنده (یا نتاجی که بیشترین زمینه ژنتیکی والد گیرنده را باز یابی کرده بودند) در هر نسل، ۴۲ نشانگر SSR گیاه نخود از پژوهش‌های مایر و همکاران (Mayer *et al.*, 1997)، پادالیا و همکاران (Padaliya *et al.*, 2013) و رانی و همکاران (Rani *et al.*, 2020) انتخاب گردیدند. بر اساس پویش ژنومی دو والد توسط این نشانگرها، ۱۶ نشانگر داری چند شکلی قابل قبولی بین دو والد داشته و جهت انتخاب پیش زمینه BGS انتخاب شدند (شکل ۳).

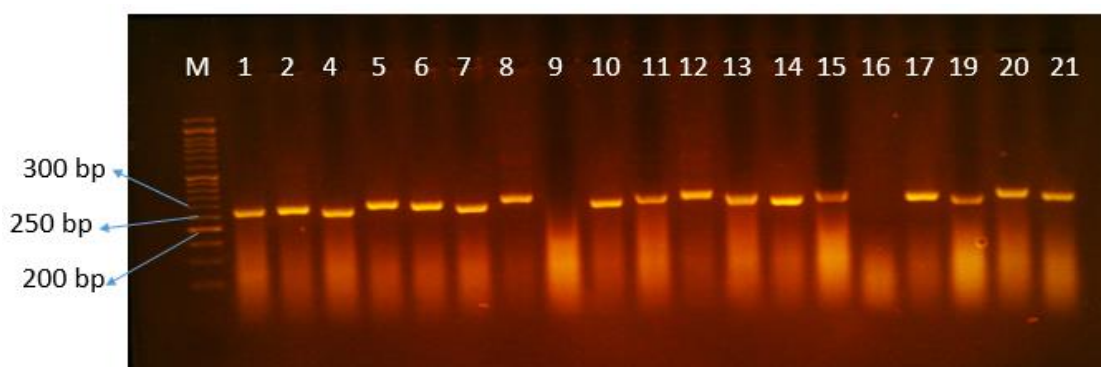
تلاقی برگشتی مبتنی بر نشانگر (Marker-Assisted Backcrossing): جهت تولید نسل اول F₁ از تلاقی بین دو والد آنا (به‌عنوان والد بخشنده) و هاشم (به‌عنوان والد گیرنده)، بر روی

انتخاب نشانگرها برای انتخاب پس زمینه (Foreground Selection): به منظور انتخاب نشانگرهایی برای رد یابی و انتخاب ژنوتیپ‌های حاوی ژن‌های مقاومت، پایگاه داده‌های مولکولی و تمامی مقالات مرتبط با نشانگرهای پیوسته با بیماری فوزاریوم در گیاه نخود مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت ۱۶ نشانگر پیوسته با ژنهای مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریوم که در مطالعات کاربردی و تولید لاین‌های مقاوم موفق بوده‌اند، انتخاب گردیدند. به منظور شناسایی بهترین نشانگرهای دارای چند شکلی بالا و تفکیک دهنده دو والد مقاوم و حساس از هم، ۱۶ نشانگر انتخابی بر روی دو والد مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت چهار نشانگر (TA59, TA96, TR19, CaM1402) انتخاب گردیدند (شکل ۲) که در نواحی متا QTL واقع شده بودند (شکل ۱). طبق بررسی‌های صورت گرفته، نشانگر CaM1402 روی گروه پیوستگی CaLG04 قرار دارد و سه نشانگر دیگر بر روی گروه پیوستگی CaLG02 قرار داشته و با ژنهای مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریوم پیوستگی بسیار نزدیکی دارند (Varshney *et al.*, 2014). در مطالعه وارشنی و همکاران (Varshney

نتایج پویش ژنومی نتاج BC_2F_1 به وسیله چهار نشانگر فوق نشان داد که ۱۲ ژنوتیپ دارای هر ۴ آلل مقاوم می‌باشند. این ژنوتیپ‌ها جهت ارزیابی میزان تشابه با والد گیرنده (درصد بازیابی زمینه ژنتیکی والد گیرنده) توسط ۱۶ نشانگر SSR (مرحله BGS) مورد ارزیابی قرار گرفتند نتایج این مرحله نشان داد که ۵ ژنوتیپ BC_2F_1 حدود ۸۶-۹۵ درصد از زمینه ژنتیکی والد گیرنده را بازیابی کرده و بیشترین تشابه را با والد گیرنده داشتند (جدول ۳). در نهایت این نتایج جهت تولید نسل BC_3F_1 با رقم هاشم در دور سوم تلاقی برگشتی شرکت داده شدند. در این مرحله در مجموع از ۴۲۰ تلاقی صورت گرفته بین ۵ ژنوتیپ BC_2F_1 ، با والد تکراری هاشم در گلخانه و مزرعه، ۱۵۰ بذر حاصل گردید که ۶۵ عدد از آنها هیبرید واقعی تشخیص داده شده و به‌عنوان نتاج BC_3F_1 در نظر گرفته شدند. نتایج پویش ژنومی نتاج BC_3F_1 به وسیله چهار نشانگر FGS نشان داد که ۱۱ ژنوتیپ دارای هر ۴ آلل مقاوم می‌باشند. ارزیابی میزان تشابه ژنوتیپ‌های مذکور با والد گیرنده توسط ۱۶ نشانگر SSR (مرحله BGS) نشان داد که ۶ ژنوتیپ نسل BC_3F_1 حاوی آلل‌های مقاوم و دارای بیشترین تشابه ژنتیکی به والد گیرنده (با بازیابی حدود ۸۹-۹۷ درصد زمینه ژنتیکی والد گیرنده) می‌باشند.

حدود ۱۲۰ گل عملیات دورگ‌گیری صورت گرفت (شکل ۴) که منجر به تولید ۵۰ بذر شد که از بین آنها حدود ۲۰ بوته F_1 حاصل از هیبرید واقعی (نه حاصل از خودگشنی) تشخیص داده شد و جهت تلاقی برگشتی با والد‌ها شم و تولید نسل BC_1F_1 به کار گرفته شدند. در دور اول تلاقی برگشتی از مجموع ۲۱۰ تلاقی صورت گرفته در گلخانه و مزرعه ۹۸ بذر حاصل گردید که ۳۵ شماره از آنها هیبرید واقعی تشخیص داده شدند.

به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌های حاوی ژن‌های مقاومت به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌های حاوی ژن‌های مقاومت ۳۵ نتاج نسل BC_1F_1 توسط چهار نشانگر مرحله FGS مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج پویش ژنومی نتاج BC_1F_1 به وسیله چهار نشانگر مذکور نشان داد که ۶ ژنوتیپ دارای هر ۴ آلل مقاوم می‌باشند که این نتایج جهت تولید نسل BC_2F_1 انتخاب گردیدند (جدول ۳). در دور دوم تلاقی برگشتی در مجموع از ۴۰۰ تلاقی صورت گرفته ۶ ژنوتیپ BC_1F_1 ، حاوی ۴ آلل مقاوم، با والد تکراری هاشم در گلخانه و مزرعه، ۱۲۰ بذر حاصل گردید که ۵۲ عدد از آنها هیبرید واقعی تشخیص داده شده و به‌عنوان نتاج BC_2F_1 در نظر گرفته شدند. برای شناسایی نتاج حامل ژن/آلل مقاوم در نسل BC_2F_1 ، از چهار جفت آغازگر (TA59, TA96, TR19, CaM1402) که تفکیک خوبی بین دو والد حساس و متحمل روی ژل آگارز نشان دادند استفاده شد.



شکل ۳- نمونه‌ای از نتایج پویش ژنومی نتاج و والدین بوسیله نشانگرهای SSR به منظور انتخاب نشانگرهای مناسب جهت انتخاب پیش زمینه BGS

Fig 3. An image of the results of progeny and parent genomic scanning using SSR markers in order to select suitable markers for background selection (BGS)



شکل ۴- بلوک تلاقی بین والد بخشنده (رقم آنا) و والد گیرنده (رقم هاشم)

Fig 4. Crossing block between donor (cv. Ana) and recurrent parent (cv. Hashem)

فنوتیپی مقاومت به بیماری این لاین‌ها در جدول ۴ و شکل ۵ آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود سه لاین حاصل از برنامه تلاقی برگشتی مبتنی بر نشانگر با متوسط شاخص ۲۰-۰ درصد دارای کمترین علائم بیماری و بیشترین مقاومت می‌باشند. به طور کلی نتایج حاصل حاکی از وجود سه لاین بسیار مقاوم (BC₃F₂-1FWR, BC₃F₂-2FWR, BC₃F₂-3FWR) با خصوصیات زراعی مناسب می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش مشابه نتایج پژوهش‌های دیگر بود. در پژوهشی مشابه پراتب و همکاران (Pratap *et al.*, 2017) ژن مقاومت به بیماری فوزاریوم نژاد ۲ را از ژنوتیپ مقاوم Vijay به رقم حساس Pusa256 از طریق روش تلاقی برگشتی مبتنی بر نشانگر، انتقال دادند حاصل نتایج آنها تولید سه لاین مقاوم به بیماری فوزاریوم نژاد ۲ بود. در پژوهشی دیگر وارشنی و همکاران (Varshney *et al.*, 2014) همزمان ژن مقاومت به بیماری فوزاریوم نژاد ۱ را از ژنوتیپ مقاوم WR315 و ژن‌های مقاومت به بیماری برق‌زدگی (ABQTL-I و ABQTL-II) را از ژنوتیپ مقاوم ILC3279 به رقم حساس C214 از طریق روش تلاقی برگشتی مبتنی بر نشانگر، انتقال دادند حاصل نتایج آنها تولید به ترتیب سه لاین مقاوم به بیماری فوزاریوم نژاد ۱ و هفت لاین مقاوم به بیماری برق‌زدگی بود.

شش ژنوتیپ نسل BC₃F₁ جهت تثبیت زمینه ژنتیکی و تولید جمعیت هموزیگوت یک نسل خودگشن شده و ۱۴۲ عدد بذر از نتاج BC₃F₂ حاصل شد. جهت شناسایی ژنوتیپ‌های حاوی ژن‌های مقاومت و هموزیگوت برای جایگاه‌های ژنی مورد نظر توسط چهار نشانگر FGS ژنوتیپ‌های نسل BC₃F₂ مورد ارزیابی قرار گرفتند نتایج این مرحله نشان داد که تنها ۱۲ ژنوتیپ بطور همزمان برای هر چهار مکان ژنی هموزیگوت می‌باشند. این ژنوتیپ‌ها جهت ارزیابی میزان تشابه با والد گیرنده توسط ۱۶ نشانگر SSR (مرحله BGS) مورد ارزیابی قرار گرفتند نتایج این مرحله نشان داد که ۳ ژنوتیپ BC₃F₂ حدود ۹۶-۹۰ درصد از زمینه ژنتیکی والد گیرنده را بازیابی کرده و بیشترین تشابه را با والد گیرنده داشتند (جدول ۳).

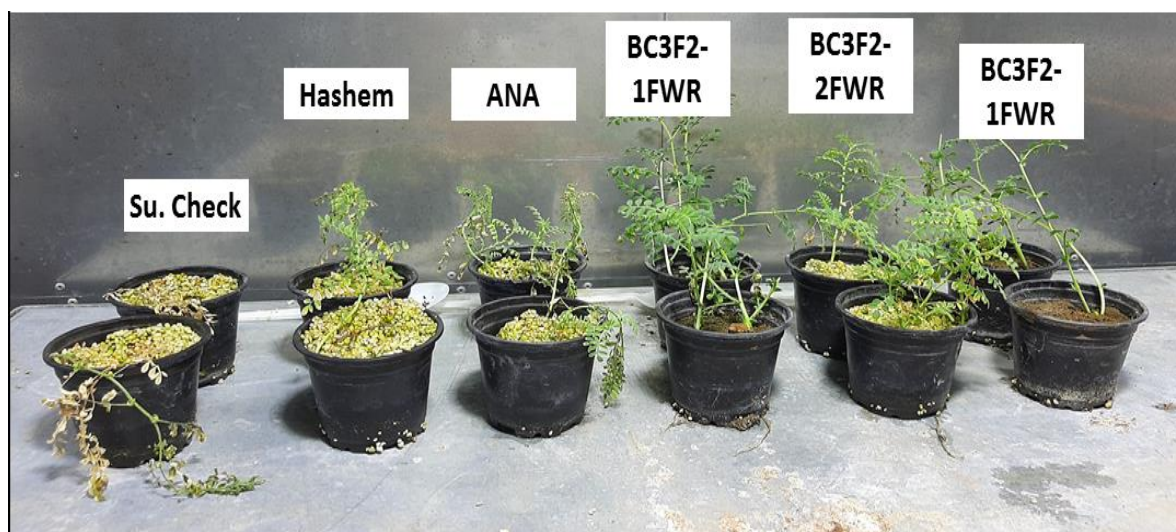
ارزیابی واکنش ظاهری (فنوتیپی) لاین‌ها به عامل بیماریزا: جهت اطمینان از وجود و بیان ژن‌های مقاومت در زمینه ژنتیکی لاین‌های BC₃F₂ به دست آمده، لاین‌های حاصل از نظر مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی در محیط کنترل شده (اتاقک رشد) از نظر ظاهری نیز بر اساس روش پیشنهادی شارما و همکاران (Sharma *et al.* 2005) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج ارزیابی‌های

جدول ۳- شرح جزئیات تلاقی برگشتی، پویش ژنومی، انتخاب پس (FGS*) و پیش (BGS**) زمینه در برنامه تلاقی برگشتی مبتنی بر نشانگر برای اصلاح مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریوم (آنا×هاشم)

Table 3. Details on genotyping, selection (foreground, FGS; and background, BGS), and crossing of lines in different generations during marker-assisted backcrossing for introgressing resistance to Fusarium disease in ANA×Hashem.

نشانگرهای مورد استفاده در BGS و FGS و تعداد گیاهان انتخابی در نسل‌های مختلف Markers used in FGS, BGS and plants selected during different generation	BC1F1			BC2F1			BC3F1			BC3F2		
	باندهای قابل			باندهای قابل			باندهای قابل			باندهای قابل		
	تعداد نمونه‌های اسکوردهی بررسی شده Analysed	تعداد نمونه‌های اسکوردهی قابل Scorable bands	تعداد نمونه‌های هتروزایگوت Heterozygotes	تعداد نمونه‌های اسکوردهی بررسی شده Analysed	تعداد نمونه‌های اسکوردهی قابل Scorable bands	تعداد نمونه‌های هتروزایگوت Heterozygotes	تعداد نمونه‌های اسکوردهی بررسی شده Analysed	تعداد نمونه‌های اسکوردهی قابل Scorable bands	تعداد نمونه‌های هتروزایگوت Heterozygotes	تعداد نمونه‌های اسکوردهی بررسی شده Analysed	تعداد نمونه‌های اسکوردهی قابل Scorable bands	تعداد نمونه‌های هتروزایگوت Heterozygotes
TA59	35	34	9	52	50	24	65	60	17	140	130	59
TA96	35	35	13	52	48	32	65	59	21	140	125	45
TR19	35	31	18	52	46	21	65	63	31	140	134	48
CaM1402	35	32	8	52	51	18	65	61	22	140	129	38
تعداد نمونه‌های هتروزایگوت برای همه نشانگرها (برای FGS) Common heterozygotes for all four markers (for FGS)			6		12				11			12
تعداد نشانگرهای استفاده شده برای BGS Number of SSR markers used for BGS			No	16					16			16
تعداد گیاهان انتخاب شده با بیشترین بازبازی ژنوم والد گیرنده No. of plants after background selection (with % recurrent parent genome recovery)			No		5(86- 95%)				6 (89-97%)			3 (90-96%)

* FGS: Foreground Selection; ** BGS: Background Selection



شکل ۵- واکنش لاین‌های BC_3F_2 نسبت به عامل بیماریزای پژمردگی فوزاریوم تحت شرایط کنترل شده در کنار ارقام والدین (آنا و هاشم) و شاهد بسیار حساس (Su. Check)

Fig 5. The reaction of BC_3F_2 lines towards Fusarium wilt pathogen under controlled conditions along with the parental (Ana and Hashem) and the highly sensitive control (Su. Check).

نتیجه گیری

خواهند شد. همچنین بر اساس فراتحلیل مطالعات QTL، نواحی مرتبط با مقاومت ژنتیکی به نژادهای مختلف بیماری پژمردگی فوزاریوم روی کروموزوم‌های ۲، ۴، ۵ و ۶ شناسایی شد که می‌تواند به منظور شناسایی نشانگرهای اختصاصی مرتبط با مقاومت ژنتیکی به نژادهای مختلف بیماری پژمردگی مورد استفاده قرار گیرند.

به‌طور کلی نتایج پویس ژنومی و ارزیابی فنوتیپی واکنش لاین‌های نخود به عامل بیماریزای پژمردگی فوزاریوم حاکی از وجود سه لاین بسیار مقاوم (BC_3F_2 -1FWR, BC_3F_2 -2FWR, BC_3F_2 -3FWR) با خصوصیات زراعی مناسب می‌باشد. لاین‌های حاصل جهت ارزیابی سازگاری و پایداری عملکرد وارد آزمایشات مقایسه عملکرد چند محیطی

منابع

- Arcade A, Aymeric L, Matthieu F, Brigitte M, Fabien C, Alain C, Joets J. 2004. BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* 20 (14): 2324-2326
- Arumuganathan K, Earle ED. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208-218
- Arvayo-Ortiz RM, Esqueda M, Acedo-Felix E, Gonzalez-Rios H, Vargas-Rosales G. 2012. New lines of chickpea against *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceris wilt. *American Journal of Applied Sciences* 9(5): 686-693
- Breseghele F, Coelho ASG. 2013. Traditional and Modern Plant Breeding Methods with Examples in Rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 61, 35, 8277-8286
- Cobos MJ, Winter P, Kharrat M, Cubero JI, Gil J, Millan T, Rubio J. 2009. Genetic analysis of agronomic traits in a wide cross of chickpea. *Field Crops Research* 111: 130-136
- FAOSTAT. 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. Database available at <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

- Garg T, Mallikarjuna BP, Thudi M. 2018. Identification of QTLs for resistance to Fusarium wilt and Ascochyta blight in a recombinant inbred population of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica* 214: 45
- Gowda SJM, Radhika P, Kadoo NY, Mhase LB, Gupta VS. 2009. Molecular mapping of wilt resistance genes in chickpea. *Mol. Breeding* 24: 177–183
- Halila I, Cobos MJ, Rubio J, Millán T, Kharrat M, Marrakchi M, Gil J. 2009. Tagging and mapping a second resistance gene for Fusarium wilt race 0 in chickpea. *European Journal of Plant Pathology* 124: 87-92
- Hiremath PJ, Kumar A, Penmetsa RV, Farmer A, Schlueter JA, Chamarthi SK, Whaley AM, Carrasquilla Garcia N, Gaur PM, Upadhyaya HD, Kavi Kishor PB. 2012. Largescale development of cost effective SNP marker assays for diversity assessment and genetic mapping in chickpea and comparative mapping in legumes. *Plant biotechnology journal* 10(6): 716-732
- Kavousi H, Mozafari J, Marashi S, Bagheri A. 2014. Reaction of Desi and Kaboli Chickpea Genotypes to Race 3 and 6 of *Ascochyta rabiei*. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 28(2): 242-249. doi: 10.22067/jpp.v28i2.40001
- Maisuria HJ, Patel RM, Suthar KP. 2017. Assessment of genetic diversity among chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes using seed storage protein profiling and RAPD markers. *Applied Biological Research* 19(3): 248-256
- Mannur DM, Babbar A, Thudi M. 2019. Super Annigeri 1 and improved JG 74: two Fusarium wilt-resistant introgression lines developed using marker-assisted backcrossing approach in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol Breeding* 39: 2.
- Mayer MS, Tullu A, Simon CJ, Kumar J, Kaiser WJ, Kraft JM, Muehlbauer FJ. 1997. Development of a DNA marker for Fusarium wilt resistance in chickpea. *Crop Science* 37: 1625–1629
- Padaliya RV, Suthar KP, Singh D, Mahatma MK, Patil VR. 2013. Marker assisted characterization of chickpea genotypes for wilt resistance. *African Journal of Biotechnology* 12(50):6907
- Pratap A, Chaturvedi SK, Tomar R, Rajan N, Malviya N, Thudi M, Saabale PR, Prajapati U, Varshney RK, Singh NP. 2017. Marker-assisted introgression of resistance to fusarium wilt race 2 in Pusa 256, an elite cultivar of desi chickpea. *Mol Genet Genomics* 292(6):1237-1245
- Rani A, Devi P, Jha UC, Sharma KD, Siddique KH, Nayyar H. 2020. Developing climate-resilient chickpea involving physiological and molecular approaches with a focus on temperature and drought stresses. *Frontiers in plant science* 10: 1759.
- Sharma KD, Muehlbauer FJ. 2007. Fusarium wilt of chickpea: physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica* 157: 1-14
- 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: 385–390
- Taran B, Warkentin TD, Vandenberg A. 2013. Fast track genetic improvement of ascochyta blight resistance and double podding in chickpea by marker-assisted backcrossing. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 126(6): 1639-1647.
- Tatte R, Mane SS, Snehal J, Pravin J, Nandanwar RS, Patil AN. 2018. Marker Assisted Selection for Mapping Population against Chickpea Wilt. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Science* 7(6): 2480-2486
- Varshney RK, Mohan SM, Gaur PM, Chamarthi SK, Singh VK, Srinivasan S, Swapna N, Sharma M, Pande S, Singh S, Kaur L. 2014. Marker-assisted backcrossing to introgress resistance to fusarium wilt race 1 and Ascochyta blight in C 214, an elite cultivar of

chickpea. The plant genome 7: 1–11

- Varshney RK, Mohan SM, Gaur PM, Gangarao NVPR, Pandey MK, Bohra A, Sawargaonkar SL, Chitikineni A, Kimurto PK, Janila P, Saxena KB, Fikre A, Sharma M, Rathore A, Pratap A, Tripathi S, Datta S, Chaturvedi SK, Mallikarjuna N, Anuradha G, Babbar A, Choudhary AK, Mhase MB, Bhardwaj CH, Mannur DM, Harer PN, Guo B, Liang X, Nadrajan N, Gowda CLL. 2013. Achievements and prospects of genomics-assisted breeding in three legume crops of the semi-arid tropics. *Biotechnology Advances* 31(8): 1120–1134
- Winter P, Benko-Iseppon AM, Hüttel B, Ratnaparkhe M, Tullu A, Sonnante G, Pfaff T, Tekeoglu M, Santra D, Sant VJ, Rajesh PN, Kahl G, Muehlbauer FJ. 2000. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* × *C. reticulatum* cross: Localization of resistance genes for Fusarium wilt races 4 and 5. *Theoretical And Applied Genetics* 101: 1155– 1163



Producing chickpea resistant line against Fusarium Wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*), using Marker-Assisted Backcrossing

Hamid Hassaneian Khoshro^{1*}, Zahra-Sadat Shobar², Hamid Reza Pouralibaba³, Jahad Somi², Leila Pourhang²

1- Dryland Agricultural Research Institute (DARI), Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran.

2- Molecular Physiology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), AREEO, Karaj, Iran.

Extended Abstract

Introduction: Fusarium wilt (FW) caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* causes extensive damage to chickpea in many parts of the Iran. The technique of Marker-assisted backcrossing (MABC) is one of the effective and accurate methods in transferring specific genes such as disease resistance genes in a short time in self-pollination plants. Hashem is one of Iranian chickpea cultivars with high yield, plant height and tall stems which its cultivation is limited due to susceptibility to the fusarium wilt. Therefore, Purpose of this study was to introgression resistance to fusarium wilt from Ana cultivar, as a donor, to Hashem as a recurrent and susceptible cultivar using molecular marker-assisted backcrossing.

Methodology: This research was conducted during five cropping seasons (2018-2023). Crossing was done between the selected parents of chickpea cultivar Ana (as a donor parent) and Hashem (as a recurrent parent) and the F₁ progeny was backcrossed with Hashem to produce the BC₁F₁ generation. By using three backcrosses and one rounds of selfing, BC₃F₂ progeny was obtained. Foreground selection (FGS) was conducted with four markers (TA59, TA96, TR19, and CaM1402) linked to FW resistance genes. Background selection (BGS) was employed with evenly distributed 16 (Ana × Hashem) SSR markers in the chickpea genome to select plant(s) with higher recurrent parent genome (RPG) recovery. Finally, the selected lines of BC₃F₂ generation were phenotypically evaluated in terms of Fusarium disease resistance.

Research findings: In first year, from the crossing of two parents, 20 real F₁ plants were obtained and backcrossed with Hashem to produce BC₁F₁ plants. Based on results of foreground selection (FGS), was undertaken using four markers (TA59, TA96, TR19, and CaM1402) linked to resistance genes, 6 BC₁F₁ plants contained 4 resistant alleles and participated in the second backcrossing to produce BC₂F₁ plants. In the following, from a total of 52 BC₂F₁ plants 12 BC₂F₁ plants contained 4 resistant alleles, for background selection (BGS) to observe the recovery of recurrent parent genome using 16 SSRs. At this stage based on the BGS results 5 plant, with the highest background recovery, selected and backcrossed with recurrent parent to produce BC₃F₁ plants. Followed by cycles of, 6 plants in BC₃F₁ containing resistant genes and most similar to the recurrent parent were selected. The identified plants were selfed to obtain 6 BC₃F₂ lines which were screened phenotypically for resistance to fusarium wilt. Finally, 12 BC₃F₂ lines were obtained which led to identification of 3 highly resistant lines of Hashem with FWR gene introgressed in them. Also, in this study using Meta-QTL analysis region associated with genetic resistance to different race of fusarium wilt were identified on chromosomes 2, 4, 5 and 6.

Key words: Backcrossing, Chickpea, Fusarium wilt, Molecular marker, Selection

* Corresponding author: h.hosnian@areeo.ac.ir

Submit date: 2023/09/30 Accept date: 2024/03/02

