



شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/idadj.2025.364848.424

بررسی و شناسایی گونه‌های فوزاریوم مرتبط با پوسیدگی ریشه، طوقه و پژمردگی نخود دیم در مناطق معتدل کشور

فرشید محمودی^{۱*}، جواد اشرفی^۲، معصومه خیرگو^۳

- ۱- معاونت موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور (سرارود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.
- ۲- بخش گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایلام، ایران.
- ۳- بخش گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.

چکیده مبسوط

مقدمه: نخود در بیشتر از ۵۰ کشور کشت می‌گردد و در مقیاس جهانی، پس از لوبیا و نخودفرنگی، مقام سوم را از لحاظ تولید و سطح زیر کشت به خود اختصاص داده است. گیاه نخود توسط عوامل بیماری‌زای متعددی از قبیل قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و نماتدها مورد حمله قرار می‌گیرد که بیماری پژمردگی و بوته زردی با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* و پوسیدگی سیاه ریشه با عامل *Fusarium solani* از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی این گیاه محسوب می‌شوند. گونه‌های فوزاریوم همراه ریشه و طوقه نخود هم به‌عنوان ساپروفیت و غیر بیماری‌زا و هم به شکل مهاجم و بیماری‌زا روی نخود گزارش شده‌اند. شناسایی و بررسی تنوع میان گونه‌ها امکان برنامه‌ریزی بهتر برای مدیریت بیماری و همچنین جایگاه درست طبقه‌بندی این قارچ را فراهم می‌سازد؛ لذا این تحقیق با هدف شناسایی گونه‌های قارچ فوزاریوم مرتبط با پژمردگی و پوسیدگی ریشه و طوقه نخود از مزارع کشت نخود در استان‌های کرمانشاه، ایلام و گلستان انجام گرفت.

روش شناسی پژوهش: نمونه‌برداری از گیاهان دارای علائم بیماری پژمردگی و پوسیدگی ریشه و طوقه از مزارع نخود استان‌های کرمانشاه، ایلام و گلستان صورت گرفت. قطعات بافت‌های آلوده پس از ضدعفونی سطحی به مدت سه دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۵٪، با آب مقطر سترون شستشو شده و پس از خشک کردن با حوله کاغذی سترون، روی محیط کشت Potato Dexterous Agar (PDA) کشت داده شدند و تشک‌های پتری برای مدت ۱۰-۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از کشت و خالص‌سازی جدایه‌ها، اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های فوزاریوم روی رقم نخود حساس به بیماری (ILC 1929) انجام شد. استخراج DNA جدایه‌ها به روش Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) انجام شد. ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA در پایگاه اطلاعاتی NCBI با نرم‌افزار BLAST با ترادف‌های موجود در بانک ژن مقایسه و ثبت شد. فیلوگرام بر اساس تطابق ترادف نوکلئوتیدی با استفاده از روش حداکثر درستی به‌وسیله نرم‌افزار MEGA6.0 و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap) رسم گردید.



* نگارنده مسئول: f.m3162@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۶

یافته‌های پژوهش: بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و داده‌های مولکولی حاصل از تکثیر ITS-rDNA گونه‌های *Fusarium spp.* و *F. oxysporum f. sp. ciceris*، *F. equiseti*، *F. acuminatum* و *F. solani* مورد شناسایی قرار گرفتند که در بین آنها *F. oxysporum* غالب‌ترین و شایع‌ترین گونه بوده و از بیشترین فراوانی برخوردار بود. گونه‌های *F. acuminatum* و *F. equiseti* بیشتر از گیاهان بالغ جداسازی شدند، در حالی که گونه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* در تمامی مراحل رشد، از گیاهچه تا غلاف‌دهی قابل جداسازی بودند. درخت فیلوژنتیکی بر اساس مقایسه توالی نواحی ITS-rDNA، گونه‌های شناسایی شده فوزاریوم را در چهار گروه فیلوژنتیکی طبقه‌بندی کرد. نتایج نشان داد که استفاده از توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA می‌تواند به‌عنوان یک روش مکمل مناسب برای شناسایی گونه‌های مختلف فوزاریوم به کار گرفته شود.

کلمات کلیدی: بیمارگر، بوته میری، ITS-rDNA، بیماری‌زایی، پوسیدگی سیاه

مقدمه

خاک‌های آلوده، حتی در غیاب میزبان گیاهی، برای سال‌های متمادی زنده می‌ماند. استفاده از ارقام مقاوم نخود، اقتصادی‌ترین و مطمئن‌ترین روش در مدیریت بیماری‌های خاکزاد محسوب می‌شود. محققان و اصلاح‌گران نخود در سراسر جهان، تلاش خود را بر توسعه ارقام مقاوم به بیماری متمرکز کرده‌اند. با این حال، اصلاح مقاومت ارقام نخود با چالش‌های زیادی روبه‌رو است، زیرا جدایه‌های بیمارگر از نظر بیماری-زایی تنوع بالایی دارند و ماهست ژنتیکی آن‌ها به طور مداوم در حال تغییر است (Haware et al., 1996). جنس فوزاریوم از مهم‌ترین قارچ‌های هیفومیست خاکزی به‌شمار می‌رود. گونه‌های این جنس از گسترده‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند که دامنه وسیعی از گیاهان را آلوده می‌کنند (Nelson et al., 1983; Steinkellner et al., 2005). گونه‌های مختلف فوزاریوم علایم گوناگونی از جمله پوسیدگی و پژمردگی ریشه، شانکر و پوسیدگی ساقه، انسداد آوندها، لکه برگ، پوسیدگی‌های انباری و پوسیدگی میوه پس از برداشت را در گیاهان ایجاد می‌کنند و با کاهش کمی و کیفی محصولات، خسارت اقتصادی قابل توجهی به بار می‌آورند (Trane, 1990; Vakalounakis, 1996). علاوه بر این بسیاری از گونه‌های فوزاریوم قادر به تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه، از جمله توکسین‌ها، هستند که

نخود از لحاظ اهمیت، میزان سطح زیر کشت و تولید، سومین رتبه را در میان حبوبات جهان دارا است. سطح زیر کشت، میزان تولید و عملکرد جهانی نخود به ترتیب ۱۴/۸۴۲ میلیون هکتار، ۱۵/۰۸۴ میلیون تن و ۱۰۱۶ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است. در ایران، سطح زیر کشت و میانگین عملکرد نخود به ترتیب ۵۱۴۰۰۰ هکتار و ۴۴۰ کیلوگرم در هکتار است (FAO, 2020). تا کنون بیش از ۵۰ بیمارگر از نقاط مختلف جهان روی نخود گزارش شده است، اگرچه تنها تعداد محدودی از جمله *Ascochyta blight (Ascochyta rabiei)*، *Fusarium wilt (F. oxysporum f. sp. ciceris)*، *black root rot (F. solani)*، *collar rot (Sclerotium rolfsii)*، *wet root rot (Rhizoctonia solani)*، *Phytophthora root rot (Phytophthora megasperma)*، *Pythium root and seed rot (Pythium ultimum)*، *foot rot (Operculella padwickii)*، and *stem rot (Sclerotinia sclerotiorum)* باعث خسارات اقتصادی جدی در مناطق تولید نخود می‌شوند (Nene and Reddy, 1987).

در میان بیمارگرهای عامل پژمردگی و پوسیدگی ریشه، قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* در اغلب نواحی کشت نخود در جهان شیوع دارد و خساراتی بین ۴۰-۱۰ درصد به این مناطق وارد می‌کند (Nene et al., 1984; Kaiser et al., 1994). کنترل این بیماری دشوار است؛ زیرا این قارچ در

استان‌های کرمانشاه، ایلام و گلستان انجام شد. در مجموع، ۴۵ نمونه گیاهی برای جداسازی قارچ-ها مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا اندام‌های گیاهی (طوقه، ریشه و ساقه) به قطعاتی به طول ۱-۰/۵ سانتی‌متر برش داده شدند و سپس بسته به ظرافت بافت، با به مدت ۱-۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl) یک درصد به منظور ضدعفونی سطحی قرار داده شدند. پس از آن، قطعات گیاهی سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند (هر بار به مدت ۱-۳ دقیقه). سپس قطعات گیاهی پی از خشک‌شدن روی کاغذ صافی سترون، به پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (Potato Dextrose Agar; PDA) منتقل شدند و در اتاقک رشد (انکوباتور) با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳-۵ روز نگهداری شدند.

برای خالص‌سازی جدایه‌ها، از روش نوک ریشه و تک اسپور کردن (Nelson *et al.*, 1983) استفاده شد. ریخت‌شناسی: برای تشخیص گونه‌های فوزاریوم، جدایه‌های خالص شده روی محیط کشت‌های مختلف از جمله سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA)، برگ میخک-آگار (CLA) و آب‌آگار (WA) کشت داده شدند (Nelson *et al.*, 1983). پس از نگهداری در شرایط نوری و دمایی مناسب، شناسایی آن‌ها با استفاده از کلیدهای تشخیصی معتبر، مقالات علمی و چارت رنگ، انجام شد (Rayner 1970, Booth, 1971, Gerlach and Irenberg, 1982; Nelson *et al.*, 1983, Pascoe, 1990; Burgess *et al.*, 1994, Seifert, 1996; Nirenberg and O'Donnell, 1998; Summerell *et al.*, 2003; O'Donnell *et al.*, 2004; Leslie and Summerell, 2006).

برای سلامتی انسان و حیوانات مضر محسوب می‌شوند (Withanage *et al.*, 2001).

شناسایی گونه‌های فوزاریوم به طور سنتی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی انجام می‌شود، اما بسیاری از گونه‌ها از نظر تیپ میسلیم، ماکروکنیدی و میکروکنیدی تفاوت محسوسی ندارند. به همین دلیل، امروزه از تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر آنالیزهای فیلوژنتیکی و بررسی ژن‌های اختصاصی برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌شود (O'Donnell *et al.*, 2012). در ایران، گونه‌های فوزاریوم عامل فوزاریوز در نخود به‌ندرت کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. تاکسونومی این قارچ‌ها بسیار پیچیده و مورد بحث است که عمدتاً به دلیل استفاده از سیستم‌های تاکسونومیک متفاوت و تنوع ریخت-شناسی بالای گونه‌ها است. دانش محدودی درباره گونه‌های فوزاریوم در کشاورزی ایران در دسترس است.

شناسایی دقیق گونه‌های فوزاریوم نقش مهمی در مدیریت بیماری‌های ناشی از این قارچ‌ها ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه، شناسایی گونه‌های فوزاریوم مرتبط با پژمردگی و پوسیدگی ریشه و طوقه نخود، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی بود. همچنین، روابط ژنتیکی و فیلوژنتیکی گونه‌های فوزاریوم نخود مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی قارچ:

نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی از گیاهان دارای علائم بوته‌میری، پژمردگی، زردی و پوسیدگی در ناحیه ریشه و طوقه از مزارع نخود دیم در



شکل ۱- پراکنش نقاط نمونه‌برداری از گیاهان دارای علائم بیماری پژمردگی و پوسیدگی ریشه و طوقه در مزارع نخود استان‌های کرمانشاه، ایلام و گلستان.

Figure 1. Spatial distribution of chickpea plants showing wilt and yellowing symptoms from different chickpea growing regions of Kermanshah, Ilam and Golestan provinces.

تاریکی) و دمای اتاق نگهداری شدند. پس از رشد کامل، جدایه‌ها برای مایه‌زنی آماده گردیدند. برای تهیه مایه سایر جدایه‌ها، از روش وسترونلد و همکاران (Westerlund *et al.*, 1974) از طریق مایه‌زنی بذور گندم با قارچ استفاده شد. در این روش از فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. در هر فلاسک مقدار مشخصی بذر گندم ریخته شد، به طوری که ۸-۵ سانتیمتر آب روی بذر را بپوشاند. پس از یک شب خیساندن، آب تخلیه شد و درب هر فلاسک با پنبه پوشانده شد. سپس فلاسک‌ها سه مرتبه (به صورت یک روز در میان) و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱ اتمسفر در اتوکلاو استرون شدند. در ادامه از هر جدایه ۴-۵ بلوک میسلیمی در تشتک‌های پتری حاوی PDA کشت داده شد. سپس، بر روی هر محیط مقدار مناسبی بذر گندم استرون اضافه گردید، به گونه‌ای که سطح محیط به طور کامل با بذر پوشانده شود. برای رشد قارچ و کلنیزه شدن بذور گندم، تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه به مدت دو تا سه هفته نگهداری شدند.

آزمون بیماری‌زایی: بذور نخود به مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی شده و سپس سه بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر شسته شدند. پس از این مرحله، بذور به مدت یک شب در ظروف یک بار مصرف حاوی آب مقطر نگهداری شدند. پس از سپری شدن این مدت، آب ظرف‌ها تخلیه شد و پارچه‌ای مرطوب روی بذور کشیده شد. سپس، ظروف برای جوانه‌زنی بذر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۲-۳ روز، بذور جوانه‌زده به سینی‌های حاوی ماسه سترون شده (جهت مایه زنی با *F. oxysporum*) منتقل شدند یا به طور مستقیم در گلدان (جهت مایه‌زنی با *F. solani* و سایر گونه‌ها) کشت شده و در گلخانه نگهداری گردیدند.

تهیه زادمایه قارچ بیمارگر: برای تولید زادمایه *F. oxysporum*، جدایه‌ها در لوله‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA کشت داده شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از رشد اولیه هر جدایه، لوله‌ها به مدت یک هفته در تناوب نور - تاریکی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت

استخراج DNA: استخراج DNA جدایه‌ها به روش تالبوت (Talbot, 2001) و با استفاده از Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) انجام شد. به این منظور، میسلیموم جدایه‌های قارچی که در محیط کشت مایع عصاره سیب‌زمینی دکستروز (Potato Dextrose Broth=PDB) کشت داده شده بودند، به مدت ۴ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه تکثیر گردیدند. پس از تکثیر، با استفاده از پمپ خلأ، قیف بوختر و کاغذ صافی سترون، میسلیموم خالص از محیط مایع جدا شد و با آب مقطر سترون شستشو داده شد. سپس، پس از خشک کردن کامل زیر هود استریل، با استفاده از کاغذ صافی و نیتروژن مایع پودر گردید. میسلیموم پودر شده در ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (CTAB 10%, NaCl 5 M, EDTA 0.5 M, Tris-Cl 1 M, β -Mercaptoethanol 0.2% and H₂O) به صورت سوسپانسیون درآمده و ۵ ثانیه ورتکس شد. سوسپانسیون در میکروتیوب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، سوسپانسیون به مدت ۶ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن، هم حجم فاز مایع، مخلوط کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) به هر نمونه اضافه و ورتکس شد. سپس به مدت ۷ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتی‌فیوژ گردید. در مرحله بعد، هم حجم فاز بالایی میکروتیوب‌ها ایزوپروپانول سرد جهت رسوب دادن DNA اضافه گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آن، سانتی‌فیوژ در ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۷ دقیقه انجام شد تا DNA ته‌نشین گردد. رسوب DNA حاصل با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد، سپس زیر هود استریل خشک شده و در نهایت در بافر TE یا آب مقطر دو بار سترون شده حل گردید. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مطالعات بیشتر ذخیره و نگهداری شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ۵ میکرولیتر از DNA در ژل آگاروز ۵٪ در بافر و تراکم

مایه‌زنی گیاهان: برای مایه‌زنی با جدایه‌های *F. oxysporum* از گیاهچه‌های نخود در مرحله ۳-۴ برگی استفاده شد. شمارش اسپور با هموسیتومتر انجام گرفت و از سوسپانسیونی با غلظت 1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر برای مایه‌زنی استفاده شد (Banhashemi, 1968). گیاهچه‌ها به آرامی از بستر ماسه خارج شدند، به طوری که آسیبی به ریشه‌ها وارد نشود. سپس، ریشه‌ها به مدت ۱/۵ دقیقه در سوسپانسیون اسپور قارچ قرار داده شده و پس از آن در گلدان‌هایی که ۲ روز قبل آبیاری شده بودند نشا شدند. ریشه گیاهچه‌های شاهد نیز به مدت ۲ دقیقه در آب مقطر فروربرده شده و در گلدان‌های مشابه کشت شدند. گیاهان در گلخانه، تحت دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و علائم پژمردگی و زردی به صورت روزانه بررسی گردید.

برای مایه‌زنی گیاهان نخود با جدایه‌های *F. solani* سایر گونه‌های شناسایی شده، در هر گلدان ۵ عدد بذر نخود، پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم، کشت داده شد. پس از رشد گیاهچه‌ها و یک روز قبل از مایه‌زنی، گلدان‌ها آبیاری شدند تا فرآیند مایه‌زنی تسهیل گردد. برای این منظور، خاک اطراف هر بوته کنار زده شده و در اطراف طوقه هر گیاه، ۵ عدد بذر گندم کلنیزه‌شده با جدایه‌های قارچ بیمارگر قرار گرفت. سپس خاک‌های برداشته شده مجدداً در اطراف طوقه و روی بذر ریخته شد. هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل ۵ گیاه بود. گلدان‌های مایه‌زنی شده در گلخانه و در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و روزانه از نظر بروز علائم پژمردگی مورد بررسی قرار گرفت.

جداسازی مجدد پاتوژن از میزبان: قطعاتی از برگ‌های دارای علائم بیماری، از حدفاصل بافت سالم و آلوده جدا شدند. پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه، قطعات در محیط کشت PDA کشت داده شدند. پتری‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تحت نور ممتد نگهداری شدند.

بانک ژن (GenBank) مقایسه و ثبت شد. مقایسه هم ردیف‌سازی چندگانه توالی نوکلئوتیدی بین جدایه‌ها با استفاده از برنامه ClustalW انجام شد. فیلوگرام این جدایه‌ها بر اساس تطابق توالی نوکلئوتیدی با استفاده از روش Maximum-Likelihood به وسیله نرم‌افزار MEGA6.0 و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap) رسم گردید (Tamura et al., 2013).

نتایج و بحث

داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی ناشی از تکثیر ITS-rDNA جدایه‌های قارچ فوزاریوم از نخودهای دارای علائم بیماری در گونه‌های *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. solani* و *Fusarium spp.* قرارداد. تعداد جدایه‌ها برای هر گونه از ۳ تا ۱۳ متغیر بود که در بین آن‌ها *F. oxysporum* غالب‌ترین و شایع‌ترین گونه بوده و از بیشترین فراوانی برخوردار بود (جدول ۱). گونه‌های *F. equiseti* و *F. acuminatum* بالغ، درحالی‌که گونه‌های *F. oxysporum* و *Fusarium solani* در تمام مراحل رویشی از گیاهچه تا غلاف‌دهی قابل‌جداسازی بودند. خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی گونه‌های فوزاریوم در جدول ۲ آمده است.

شناسایی مورفولوژیکی این گونه‌ها با توصیف‌های ارائه شده توسط نلسون و همکاران (Nelson et al., 1983), برجس و همکاران (Burgess et al., 1994) و لزی و سامرل (Leslie and Summerell, 2006) مطابقت داشت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از جفت آغازگرهای ITS5/ITS4 ناحیه ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 هر یک از جدایه‌ها، یک باند ژنی با وزن مولکولی حدود ۵۷۰ bp جفت باز را تکثیر نمود.

باند با استفاده از نشانگر استاندارد تعیین و برآورد گردید.

واکنش PCR و توالی‌یابی DNA ریبوزومی

(rDNA): نواحی DNA ریبوزومی (rDNA) جدایه‌های گونه‌های مختلف فوزاریوم با استفاده از آغازگرهای ITS5 و ITS4 تکثیر داده شدند. آغازگرها توسط نمایندگی شرکت First Base ساخته شدند. واکنش و تکثیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل بافر PCR(10X), ۲ میلی‌مول MgCl₂, ۰/۲ میلی‌مول از هر یک از dNTPها، ۰/۵ میلی‌مول از هر آغازگر، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۱۰ نانوگرم از DNA الگو انجام گرفت. مواد شیمیایی و آنزیمی از نمایندگی شرکت Axon Scientific تهیه شد. واکنش زنجیره-ای PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل BioRad iCycler انجام گرفت. چرخه دمایی برای واکنش PCR و تکثیر قطعات DNA به صورت: یک چرخه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد؛ ۳۵ چرخه به مدت ۵۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد؛ یک چرخه به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه سانتیگراد؛ یک چرخه به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و یک چرخه به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد تنظیم گردید. پس از انجام واکنش، محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد. برای مشاهده محصول PCR پس از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید باندها در زیر اشعه ماورا بنفش مشاهده و عکس‌برداری با دستگاه Photo-document انجام گرفت. محصول PCR، توسط کیت خالص‌سازی مطابق با دستورالعمل پیوستی شرکت سازنده کیت Prima Scientific Co. (تایلند) خالص‌سازی و جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت First Base ارسال گردید. توالی به دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با نرم‌افزار BLAST با توالی‌های موجود در

جدول ۱ - درصد فراوانی گونه‌های فوزاریوم جدا شده از ریشه و طوقه‌ی نخود

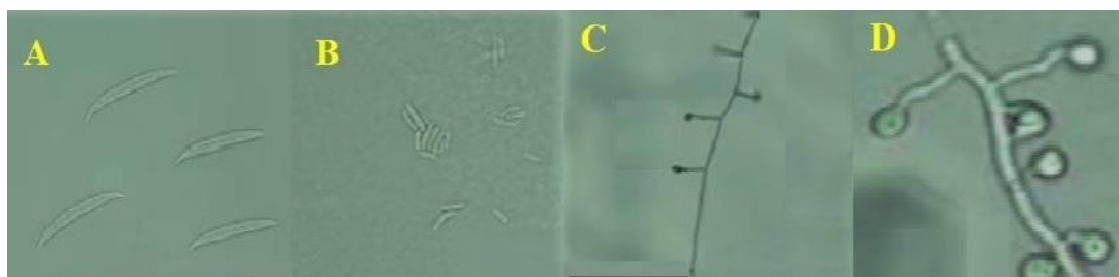
Table 1. Isolation frequency % of *Fusarium* species isolated from symptomatic chickpea roots and crowns

Frequency%	Isolate No.	Species
درصد فراوانی	تعداد جدایه	گونه
۴۳/۳	۱۳	<i>F. oxysporum</i>
۲۳/۳	۷	<i>F. solani</i>
۱۳/۳	۴	<i>F. equiseti</i>
۱۰	۳	<i>F. acuminatum</i>
۱۰	۳	<i>Fusarium</i> spp.

جدول ۲ - گونه‌های فوزاریوم جدا شده از ریشه و طوقه نخود و خصوصیات مرفولوژیکی گونه‌ها.

Table 2. List of *Fusarium* species recovered from root and crown of chickpea and morphological characteristics of the species.

	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>F. acuminatum</i>
Colony color رنگ کلنی	سفید تا کرم رنگ	سفید تا صورتی و بنفش مایل به ارغوانی	سفید تا زرد مایل به قهوه‌ای در سطح زیرین قرمز	سفید تا کرم قهوه‌ای و گاهی قرمز تا زعفرانی
Conidiophor کنیدیوفور	مونو فیالید	مونو فیالید	مونو فیالید	مونو فیالید
Microconidia میکروکنیدی	فراوان روی پرگنه، تک سلولی و بندرت دوسلولی، بیضی تا تخم مرغی شکل ۸-۱۸*۳-۶ میکرومتر	فراوان روی پرگنه، تک سلولی و گاهی دوسلولی بیضی تا تخم مرغی شکل ۶-۱۴*۲-۴ میکرومتر	تک سلولی و بندرت دوسلولی بیضی تا تخم مرغی بندرت تشکیل می‌گردد	نادر و معمولاً بیضی تا تخم مرغی شکل
Macroconidia ماکروکنیدی	فراوان بروی اسپوردوکیوم دارای ۴-۵ دیواره عرضی، خمیده و دارای سلول انتهایی گرد و پاشنه دار ۴-۶*۳۵-۴۵ میکرومتر	فراوان بروی اسپوردوکیوم نارنجی رنگ، دارای ۳-۴ دیواره عرضی، داسی شکل و خمیده و در دو انتها بتدریج باریک می‌گردد و دارای سلول انتهایی قلاب مانند ۳-۵*۳۰-۴۰ میکرومتر	فراوان بروی اسپوردوکیوم، زرد تا نارنجی رنگ، دارای ۵-۶ دیواره عرضی، داسی، سلول پایه پاشنه‌ای کشیده و سلول انتهایی مخروطی و بلند	زیاد بروی اسپوردوکیوم نارنجی کم رنگ، دارای ۴-۶ دیواره عرضی، داسی، سلول پایه پاشنه‌ای و سلول انتهایی باریک و دراز ۳-۴*۳۰-۴۵ میکرومتر



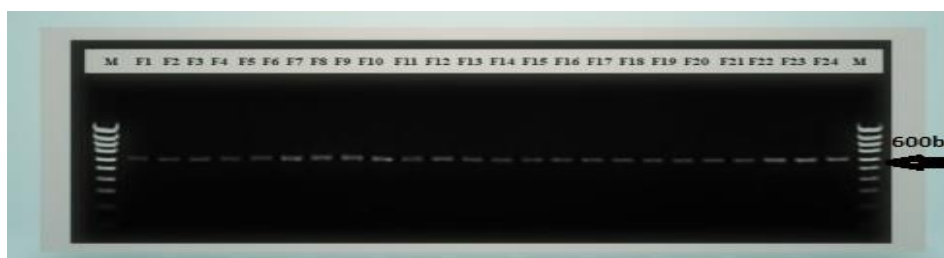
شکل ۲- ریخت شناسی ماکروکنیدیوم (A)، میکروکنیدیوم (B)، فیالید (C) و کلامیدوسپور در جدایه های *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOIF18) (خط مقیاس= ۱۰ میکرومتر).

Figure 2. Morphology of macroconidium (A), microconidium (B), phialide (C) and chlamidospore (D) in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOIF18) (Bar = 10 μ m).



شکل ۳- ریخت شناسی میکروکنیدیوم (A)، ماکروکنیدیوم (B)، فیالید (C) و کلآمیدوسپور در جدایه های *Fusarium solani* (FSIF5) (خط مقیاس=۱۰ میکرومتر).

Figure 3. Morphology of microconidium (A), macroconidium (B), phialide (C) and chlamidospore (D) in *Fusarium solani* (FSIF5) (Bar = 10 μ m).



شکل ۴ - الگوی باندهای محصول PCR جدایه های *Fusarium* ریشه و طوقه نخود با استفاده از جفت آغازگرهای ITS5/ITS4 (کدهای F1-F10 جدایه های F.o.c، کدهای F11-F14 جدایه های *F. solani*، کدهای F15-F18 جدایه های *F. equesti*، کدهای F19-21 جدایه های *F. acuminatum*، کدهای F22-24 مربوط به *Fusarium* sp. و M نشانگر اندازه DNA).

Figure 4. Electrophoresis patterns of *Fusarium* isolates using ITS4/ITS5 primers, F.o.c isolates (F1-F10), *F. solani* isolates (F11-F14), *F. equesti* isolates (F15-F18), *F. acuminatum* isolates (F19-21), nopathogenic *fusarium* (F22-24) and M marker for DNA size.

در شرایط گلخانه‌ای، مایه‌زنی ریشه‌ها و خاک با استفاده از تمام گونه‌ها منجر به ظهور پوسیدگی ریشه، تغییر رنگ طوقه و علایم برگ‌ریزی بیماری در نخود شد، هر چند که علایم ایجاد شده در ریشه و طوقه و اندام‌های هوایی نخود برای هر یک از گونه‌ها متفاوت بود. پس از کاشت بخش‌های آلوده گیاهان تلقیح شده، عامل بیماری مجدداً جداسازی شد؛ بنابراین برای تمامی گونه‌ها، اصول کخ تکمیل گردید و بیماری‌زایی آن‌ها روی نخود به اثبات رسید. در گیاهان شاهد، علایمی از بیماری مشاهده نشد. درخت فیلوژنتیکی بر اساس مقایسه توالی نواحی ITS- rDNA، چهار گروه فیلوژنتیکی مجزا برای گونه‌های *Fusarium* شناسایی شده ایجاد کرد که هر گروه مختص یک گونه مستقل بود، به این معنی که

ترادف ناحیه ITS-rDNA در بانک ژن پس از بلاست شدن، چهار گونه مختلف فوزاریوم را شناسایی نمود که پس از ویرایش به‌وسیله برنامه BioEdit در ژن بانک ثبت شدند (جدول ۳). نتایج نشان داد جدایه‌های فوزاریوم به‌خوبی از طریق ITS-rDNA قابل‌شناسایی هستند. روش مولکولی با استفاده از نرم‌افزار BLASTn نشان داد که شباهت توالی نوکلئوتیدی rDNA جدایه‌های گونه‌های مختلف فوزاریوم با توالی نوکلئوتیدی‌های به اشتراک‌گذاری شده در ژن بانک را حدود ۹۹-۱۰۰٪ بود که این موضوع تأییدکننده شناسایی گونه‌های مختلف فوزاریوم بر اساس ویژگی‌های کشت و مرفولوژیکی بود. با استفاده از نرم‌افزارهای CLUSTAL W و GeneCodone، پس از تطابق توالی نوکلئوتیدی ناحیه rDNA، سایت‌های پلی‌مورفیک در گونه‌های مختلف مشاهده گردید.

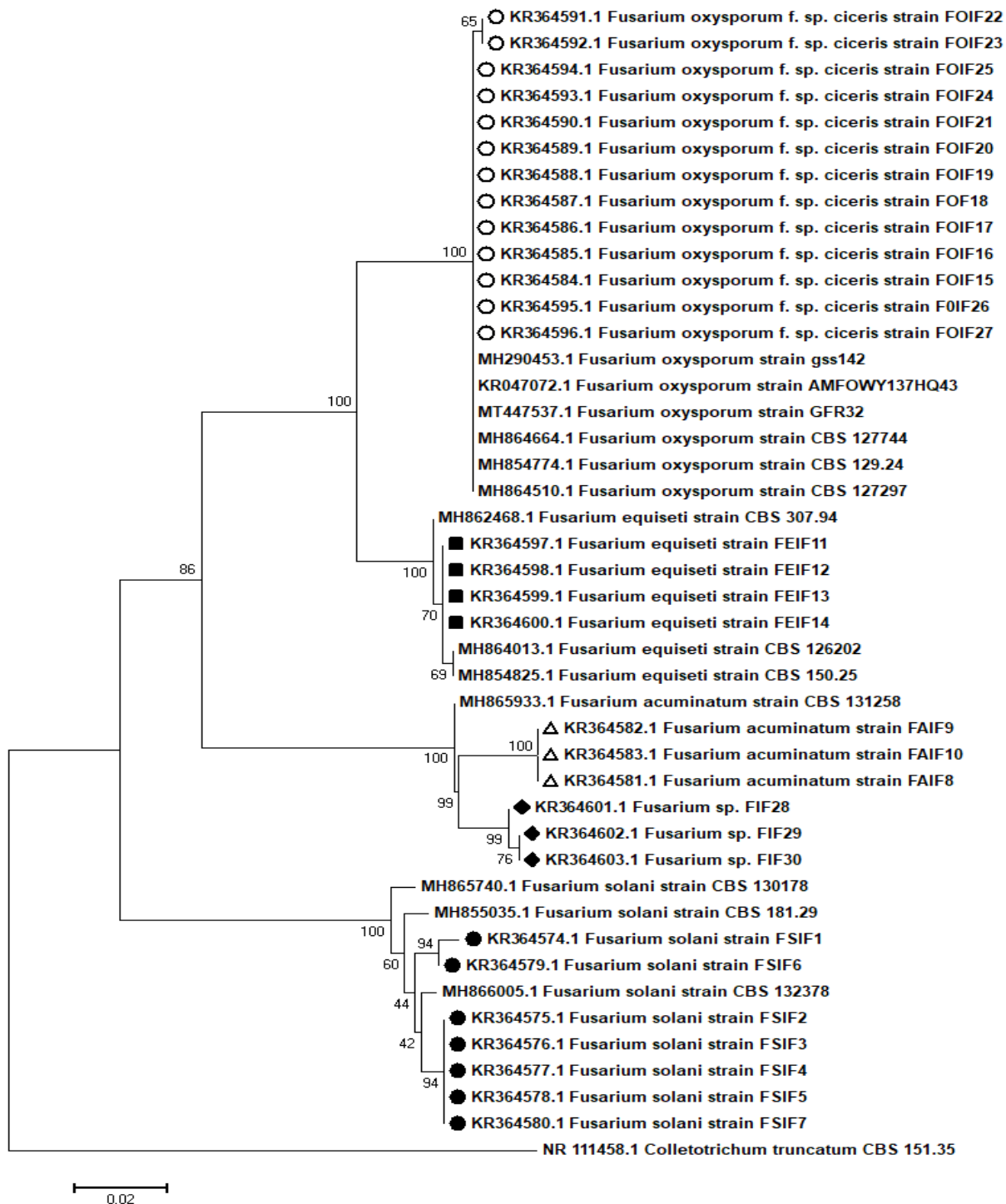
جدول ۳ - مشخصات جدایه‌های قارچی فوزاریوم (کد جدایه، مناطق جغرافیایی و شماره دسترسی در ژن بانک NCBI)

Table 3. Characteristics and GenBank Accession numbers (ITS-rDNA) of *Fusarium* species isolated from root and crown of chickpea

Geographical region	Accession Number	Isolate code	Species	Isolate Number	Geographical region	Accession Number	Isolate code	Species	Isolate Number
kermanshah	KR364585	FOIF16	<i>F. oxysporum</i>	16	Ilam	KR364574	FSIF1	<i>F. solani</i>	1
kermanshah	KR364586	FOIF17	<i>F. oxysporum</i>	17	kermanshah	KR364575	FSIF2	<i>F. solan</i>	2
kermanshah	KR364587	FOIF18	<i>F. oxysporum</i>	18	kermanshah	KR364576	FSIF3	<i>F. solani</i>	3
kermanshah	KR364588	FOIF19	<i>F. oxysporum</i>	19	kermanshah	KR364577	FSIF4	<i>F. solan</i>	4
kermanshah	KR364589	FOIF20	<i>F. oxysporum</i>	20	Ilam	KR364578	FSIF5	<i>F. solan</i>	5
kermanshah	KR364590	FOIF21	<i>F. oxysporum</i>	21	Golestan	KR364579	FSIF6	<i>F. solan</i>	6
Golestan	KR364589	FOIF22	<i>F. oxysporum</i>	22	Golestan	KR364580	FSIF7	<i>F. solan</i>	7
Golestan	KR364588	FOIF23	<i>F. oxysporum</i>	23	kermanshah	KR364581	FAIF8	<i>F. acuminatum</i>	8
Ilam	KR364587	FOIF24	<i>F. oxysporum</i>	24	kermanshah	KR364582	FAIF9	<i>F. acuminatum</i>	9
Ilam	KR364586	FOIF25	<i>F. oxysporum</i>	25	kermanshah	KR364583	FAIF10	<i>F. acuminatum</i>	10
Ilam	KR364585	FOIF26	<i>F. oxysporum</i>	26	kermanshah	KR364597	FEIF11	<i>F. equiseti</i>	11
Ilam	KR364584	FOIF27	<i>F. oxysporum</i>	27	Ilam	KR364598	FEIF12	<i>F. equiseti</i>	12
Ilam	KR364601	FIF28	<i>Fusariu sp.</i>	28	kermanshah	KR364599	FEIF13	<i>F. equiseti</i>	13
kermanshah	KR364602	FIF29	<i>Fusariu sp.</i>	29	kermanshah	KR364600	FEIF14	<i>F. equiseti</i>	14
kermanshah	KR364603	FIF30	<i>Fusariu sp.</i>	30	kermanshah	KR364584	FOIF15	<i>F. oxysporum</i>	15

داده‌اند که در اغلب نقاط جهان این بیماری توسط آلودگی هم‌زمان گیاه با چندین عامل قارچی ایجاد می‌گردد که عمدتاً شامل گونه‌های مختلف *Fusarium* هستند (Jimenez-Diaz et al., 2015). حضور گونه‌های *F. solani* و *F. oxysporum* از گیاهان نخود مناطق مورد مطالعه قبلاً نیز گزارش شده بود، منتهی گونه‌های قارچی *F. acuminatum* و *F. equiseti* برای اولین بار گزارش می‌شوند. همچنین محمدی و بنی‌هاشمی (Mohamadi and Banihashemi, 1384) را به عنوان گونه اصلی در برخی مزارع نخود استان فارس گزارش کرده‌اند. با توجه به فراوانی گونه‌ها، *F. oxysporum* با فراوانی حدود ۴۴ درصد از جمعیت فوزاریوم‌های ریشه، پرجمعیت‌ترین گونه در مزارع بود که این نتیجه با گزارش کارهای قبلی در این زمینه مطابقت دارد (Mohamadi and Banihashemi, 1384). گونه‌های قارچی *F. oxysporum* و *F. solani* به عنوان گروه‌های کمپلکس از گونه‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته‌اند که فقط با مشخصات مورفولوژیکی قابل تشخیص نیستند (Lievens et al., 2008; O'Donnell et al., 2004). بنابراین، مطالعات مولکولی به عنوان مکملی برای شناسایی دقیق‌تر گونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

تمامی جدایه‌های متعلق به یک‌گونه خاص، همراه با جدایه‌های استحصال از ژن بانک، در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. به این ترتیب، نتایج مطالعات ریخت‌شناسی نیز تأیید شد و گونه‌های نزدیک به یکدیگر شناسایی شدند (شکل ۴). بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و داده‌های مولکولی ناشی از تکثیر ITS-rDNA، جدایه‌های قارچ *Fusarium* که از گیاهان نخود دارای علایم بیماری جداسازی و خالص‌سازی گردیدند، متعلق به گونه‌های *F. equiseti*، *F. acuminatum*، *F. oxysporum* و *F. solani* بودند. گونه *Fusarium spp.* و *solani* غالب‌ترین و شایع‌ترین گونه بود و از بیشترین فراوانی برخوردار بود. گونه‌های *F. acuminatum* و *F. equiseti* بیشتر از گیاهان بالغ جدا شدند، در حالی که گونه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* در تمام مراحل رویشی از گیاهچه تا غلاف-دهی قابل جداسازی بودند. شناسایی مورفولوژیکی این گونه‌ها با توصیف‌های ارائه شده توسط نلسون و همکاران (Nelson et al., 1983)، برجس و همکاران (Burgess et al., 1994) و لزی و سامرل (Leslie and Summerell, 2006) مطابقت داشت. پوسیدگی‌های فوزاریومی ریشه نخود از بیماری‌های مهم این محصول به شمار می‌روند. تحقیقات نشان



شکل ۵- فیلوگرام ناحیه ITS-rDNA جدایه‌های فوزاریوم با استفاده از روش اتصال همسایگی (NJ) و *Colletotrichum truncatum* به عنوان Out group در نظر گرفته شده‌است. درجه اعتبار سنجی ۱۰۰۰ تکرار در هر گره است.

Figure 5. A maximum parsimony consensus phylogeny using MEGA X with 1000 bootstrap replications inferred from concatenated DNA sequences of ITS-rDNA gene of *Fusarium* spp. isolates obtained from chickpea infected plants and reference isolate *Colletotrichum truncatum* obtained from GenBank was treated as the out-group.

F. equiseti در دیگر بقولات در ایران وجود دارد. *F. equiseti semitectum* از *F. equiseti* از باقلا، گزارش شده‌اند (Azimi et al., 2005; Heidarian and Ershad, 2002).

در شرایط گلخانه‌ای، مایه زنی ریشه‌ها و خاک توسط تمام گونه‌ها منجر به ظهور پوسیدگی ریشه یا تغییر رنگ طوقه و علائم برگ‌گی بیماری در نخود شد. هر چند که علائم ایجاد شده در ریشه و طوقه و اندام‌های هوایی نخود برای همه گونه‌ها یکسان نبود. در گیاهان شاهد علائمی از بیماری مشاهده نگردید. علائم نکره‌ای ایجاد شده در ریشه و طوقه گیاهان برای همه گونه‌ها یکسان نبوده و تفاوت‌هایی بین گونه‌های مختلف مشاهده گردید. با این حال، برای برخی گونه‌ها علائم مشابه در ریشه و اندام‌های هوایی مشاهده شد. در ایران و سایر نقاط جهان، دو گونه *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* و *F. solani* به ترتیب به عنوان عوامل پژمردگی و پوسیدگی طوقه و ریشه نخود شناخته شده‌اند و گونه‌های دیگر همچون *F. culmorum*، *Fusarium eacuminatum equisti* و دیگر گونه‌ها در نقاط مختلف جهان به عنوان عوامل همراه یا بیماریزا از ریشه یا طوقه نخود گزارش شده‌اند. در ایران، در مجموع شش گونه قارچ فوزاریوم شامل *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. equiseti*، *F. scripi* و *F. sambucinum proliferatum*، ریشه، طوقه و ساقه نخود و ریشه علف‌های هرز مزارع نخود جداسازی و شناسایی گردیده‌اند (Mohamadi and Banhashemi, 1384).

فیلوگرام حاصل از ناحیه ITS-rDNA، جدایه‌های فوزاریوم را در چهار گروه مجزا قرار داد که هر کدام خاص یک گونه مستقل بود، بدین معنی که تمام جدایه‌های متعلق به یک گونه خاص، همراه با جدایه‌های استحصال از ژن بانک در یک گروه مجزا قرار گرفتند و این امر نشان داد که افتراق میان گونه‌های مرتبط نزدیک بهم با استفاده از توالی نوکلئوتیدی و رسم درخت فیلوژنیک امکان پذیر می‌باشد. این نتایج

در بسیاری از منابع، ناحیه rDNA به عنوان یک منبع اساسی و مفید در سیستماتیک مولکولی در سطح گونه و زیر گونه معرفی شده است (White et al., 2004, Sherriff et al., 1994, Sachse, 1990). در مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی DNA ریپوزومی جدایه‌های گونه‌های مختلف فوزاریوم و تطبیق آن با داده‌های موجود در ژن بانک، به ویژه گونه‌های Epitype، شناسایی گونه‌ها با اطمینان ۹۹-۱۰۰٪ تأیید شد. با استفاده از نرم افزارهای CLUSTAL W و GeneCodone، پس از تطابق توالی نوکلئوتیدی ناحیه rDNA، سایت‌های پلی-مورفیک در خصوص گونه‌های مختلف مشاهده گردید. در تمام گونه‌های قارچی مورد مطالعه، طول ناحیه تکثیری rDNA با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 حدود ۵۷۰ bp جفت نوکلئوتید بود. پلی مورفیسم در ناحیه ITS1 بیشتر از ناحیه ITS2 بود، و ناحیه ITS2 متغیرتر از ناحیه 5.8S بود. توالی نوکلئوتیدی ناحیه 5.8S از rDNA بسیار با ثبات‌تر از نواحی دیگر بود که با نتایج بدست آمده در دیگر منابع علمی مطابقت داشت (Sherriff et al., 1994, Cannon et al., 2012).

مطالعات معدودی در رابطه با گونه‌های مختلف *Fusarium* روی نخود انجام شده است و در اغلب این تحقیقات، جدایه‌های مربوط به یک گونه با هم مقایسه شده‌اند. در اغلب نواحی کشت نخود، دو گونه *F. solani* و *F. oxysporum* به عنوان عوامل پوسیدگی ریشه و پژمردگی بوته‌های نخود گزارش شده‌اند و گزارش‌های معدودی از دیگر گونه‌های *Fusarium* در این نواحی وجود دارد. در تحقیقات انجام شده توسط دیگر محققان، نوع، تعداد و درصد فراوانی گونه‌ها متفاوت بوده و این اختلاف می‌تواند مربوط به تفاوت در روش نمونه برداری و یا زمان مختلف نمونه برداری باشد که بر فراوانی نسبی گونه‌ها در دوره‌های زمانی مختلف تاثیرگذار خواهد بود (Bridge and Spooner, 2001; Costa, 2016). گزارش‌های متعددی از وجود *F. semitectum* و *F.*

بودند، به طوریکه اکثر گیاهان آلوده دارای آلودگی هم‌زمان بودند. به عنوان مثال، از یک گیاه آلوده سه گونه *F. oxysporum*، *F. equiseti* و *F. acuminatum* جداسازی شدند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور و مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور به‌خاطر حمایت مالی این تحقیق در قالب پروژه شماره مصوب ۹۳۱۴۰-۱۵-۱۵-۰ و شماره فروست ۵۵۶۵۲ تشکر می‌نمایند.

با تحقیقات سایر محققان مطابقت دارد و نشان می‌دهد توالی نوکلئوتیدی rDNA می‌تواند برای تعیین روابط فیلوژنتیکی بین جدایه‌ها و گونه‌های مرتبط به هم بسیار مفید واقع شوند (DeBruijn et al., 1996). هر چند که باتوجه به فیلوگرام، روابط ژنتیکی بین دو گونه *F. oxysporum* و *F. equiseti* بیشتر از سایر گونه‌های فوزاریوم بود.

در حال حاضر گونه‌های فوزاریوم نخود در تمام نقاط جهان وجود دارند و هر ساله خسارت فراوانی به تولیدکنندگان نخود وارد می‌آورند. روش‌های مختلف و یا تلفیقی از چند روش جهت مدیریت این بیماری در جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. برخی بوته‌های نخود نمونه‌برداری شده در این تحقیق، به طور هم‌زمان توسط دو یا سه گونه مختلف فوزاریوم آلوده

منابع

- Azimi S, Farokhinezhad R, Mousavi JA. 2005. Identification and pathogenicity of fusarium species associated with crown and root rots of faba bean in Khozestan Province. The scientific journal of agriculture 28: 149-164 (in Persian)
- Banihashemi Z. 1968. The biology and ecology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in soil and the root zones of host and non-host plants. Ph.D. Thesis, Michigan State University. 114p.
- Booth C. 1971. Fusarium: Laboratory Guide to the Identification of the Major Species. The Common Wealth Mycological Institute, Kew, 237 p.
- Bridge PD, Spooner B. 2001. Soil fungi: diversity and detection. Plant Soil 32:147-154.
- Burgess T, Malajczuk N, Delt B. 1994. Variation in *Pisolithus* based on basidiocarp and basidiosporic morphology, culture characteristics and polypeptide analysis using ID-SDS PAGE. Mycological Research (in the press)
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS. 2012. *Colletotrichum* current status and future directions. Studies in Mycology 73: 181-213
- Costa SS, Matos KS, Tessmann DJ, Seixas CDS, Pfenning LH. 2016. *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. Fungal Biology 120: 51-60
- FAO. 2020. Production Statistics. Rome: Food and Agriculture Organization.
- Gerlach W, Nirenberg H. I. 1982. The genus *Fusarium*: a pictorial atlas. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Germany
- Haware MP, Nene YL, Natarajan M. 1996. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in the soil in the absence of chickpea. Phytopathological Mediterranean 35: 9-12
- Heidarian A, Ershad J. 2002. Identification of fungal species associated with crown and root rots of pinto bean in Chaharmahal and Bakhtiari province. Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress, Razi University, Kermanshah, Iran. Page 156 (in Persian)

- Jimenez-Diaz RM, Castillo P, del Mar Jimenez-Gasco M, Landa BB, Navas-Cortes JA. 2015. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Protection* 73: 16–27
- Kaiser WJ, Alcalá-Jiménez AR, Hervás-Vargas A, Trapero-Casas JL, Jimenez-Díaz R M. 1994. Screening of wild *Cicer* species for resistance to race 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease* 78: 962- 967
- Lievens B, Rep M, Thomma BPH. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science* 64: 781–788
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell, 388 pp
- Mohamadi H, Banihashemi Z. 1384. Distribution, pathogenicity and survival of *Fusarium* spp. the causal agents of chickpea wilt and root rot in Fars province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41: 687-708 (in Persian)
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. 1983. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. University Park: The Pennsylvania State University Press.
- Nene YL, Reddy MV. 1987. Chickpea diseases and their control, pp 233–270. In: MC Saxena, and KB Singh (Eds.). “The chickpea”, CAB International, Wallingford, Oxon
- Nene YL, Sheila VK, Sharma SB. 1984. A world list of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) pathogens. *ICRISAT Pulse Pathology ProgressReport* 32: pp. 19
- Nirenberg HI, O'Donnell K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 434-458
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Magnon KC, Cox PA, Revankar SG, Sanche S, Geiser DM, Juba JH, van Burik JAH, Padhye AA, Anaissie EJ, Francesconi A, Walsh TJ, Robinson JS. 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5109–5120.
- O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N, Geiser DM. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 2477–2490
- O'Donnell K, Humber RA, Geiser DM, Kang S, Park B, Robert VAR. 2012. Phylogenetic diversity of *insecticolous fusaria* inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. *Mycologia*, 104: 427–445
- Pascoe LG. 1990. *Fusarium* morphology: Identification and characterization of third conidial type, the mesoconidium *MycoTaxon* 37: 121-160
- Summerell BA, Salleh B, Leslie JF. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87(2): 117 -118
- Rayner RW. 1970. *A mycological colour chart*. CMI and British Mycological Society, Kew, Surrey, UK.
- Sachse K. 2004. Specificity and performance of PCR detection assays for Microbial pathogens. *Molecular Biotechnology* 26:61-79
- Seifert K. 1996. *Fuskey-Fusarium interactive key*. Agriculture and AgriFood, Canada.
- Sherriff C, Whelan MJ, Arnold GM, Lafay JF, Brygoo Y, Bailey JA. 1994. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology* 18: 121-138
- Steinkellner S, Mammeler R, Vierheilig H. 2005. Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates. *Journal of Plant Interactions* 1(1): 23–30

- Talbot NJ. 2001. Nucleic acid isolation and analysis. pp. 23-26. In: NJ. Talbot (Eds.). Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi, Oxford: Oxford University Press.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular biology and evolution 24: 1596-1509
- Trane U. 1990. Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. Journal of Microbiological Methods 12: 23-39
- Vakalounakis DJ. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. Journal of Plant Disease 81: 313-316
- Westerlund FV, JrCampbell RN, Kimble KA. 1974. Fungal root rots and wilt of chickpea in California. Phytopathology 64(4): 432-436
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (Eds.). PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, USA.
- Withanage GS, Murata H, Koyama T, Ishiwata I. 2001. Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines. Vet. Hum. Toxicology 43: 6-10

Identification of *Fusarium* species associated with crown, root rots and wilting of chickpea in moderate regions of Iran

Farshid Mahmodi^{1*}, Javad Ashrafi², Masumeh Kheirgoo³

1- Sararood deputy, Dryland Agricultural Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran.

2- Agricultural and Natural Resource Research and Education Center, Ilam, Agriculture Research, Education and Extension Organization, Ilam, Iran.

3- Agricultural and Natural Resource Research and Education Center, Golestan, Agriculture Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran.

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: The chickpea (*Cicer arietinum* L.) is grown in more than 50 countries and is the third most important food legume in the world after beans and peas in terms of both cultivated area and total production. Chickpea is affected by a wide range of fungal and viral diseases that can cause economic losses. Among these diseases, fusarium wilts and root rot, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris* and *F. solani*, respectively Are the most important soil-brone pathogens affecting chickpea. These assays will provide plant pathologists a valuable tool to refine the control and management of diseases caused by *Fusarium* species in chickpea. The present study aimed to identify the *Fusarium* species associated with root rots and wilting of chickpea, as well as the pathogenic strains affecting the crop.

Methodology: *Fusarium* species were isolated from roots of chickpea plants showing wilt and yellowing symptoms in different chickpea-growing regions of Kermanshah, Illam and Golstan provinces. Plant samples were cut into small pieces, washed under running water for 20 mins, sterilized with 5% sodium hypochlorite for 3 minutes, rinsed in sterile distilled water, and then placed on filter papers. Afterward, the pieces were transferred to petri dish containing potato dextrose agar media (PDA). All the plates were incubated at 25° C for 5-10 days. To determine pathogenicity, purified isolates of *Fusarium* species were used. Total DNA was extracted using a modified protocol previously described by Talbot *et al.* Each fungal species was characterized morphologically and molecularly based on DNA sequence data for ITS-rDNA. The PCR sequencing products of the tested isolates were aligned with Clustal (ver. 2). The MEGA6 program was used for phylogenetic analysis. Aligned sequences were checked for quality and compared with deposited sequences in Gene-Bank, NCBI, using BLAST.

Research findings: Based on morphological and molecular charactertions, *Fusarium* species, including *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. acuminatum* and *F. equisti* were identified. *Fusarium oxysporum* was the most commonly isolated species from all the samples, followed by *F. solani*. *Fusarium acuminatum* and *F. equisti* were isolated at both vegetative and mature stages of plants growth. The results showed that morphological approach fails to detect many biological factors, whereas molecular and phylogenetic approaches can be useful in identifying these factors.

Keywords: *Cicer arietinum*, ITS-rDNA, Fusarium wilt, Phylogenetic analysis

* Corresponding author: f.m3162@yahoo.com

Submit date: 2024/02/20 Accept date: 2025/3/16

