علوم و تحقیقات بذر ایران
سال یازدهم/ شماره چهارم/ ۱۴۰۳ (۱۹ - ۱)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2024.8795

جداسازی و شناسایی قارچ‌های بذرزاد ماشک‌های علوفه‌ای و بررسی تأثیر آن‌ها روی برخی ویژگی‌های جوانه‌زنی

نیما خالدی[1*]، محمد رحمانی[2]، فرشید حسنی[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۲

چکیده

عوامل بیماری‌زای قارچی یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر رشد و میزان عملکرد محصول ماشک‌های علوفه‌ای می‌باشند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی قارچ‌های بذرزاد از نمونه‌های بذری ماشک‌های علوفه‌ای، ارزیابی میزان تأثیر آلودگی بذر روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی و همچنین بررسی روند انتقال آلودگی از بذر به گیاه نسل بعد بود. به منظور ردیابی آلودگی‌های قارچی در نمونه‌های بذری، از ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای در مزارع استان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، اردبیل، ایلام، کرمانشاه و کردستان نمونه‌برداری شد. در مجموع بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و آغازگرهای اختصاصی گونه، نه جدایه متعلق به گونه‌های *Alternaria alternata* (هفت جدایه، ۷۷/۸ درصد) و *Fusarium oxysporum* (دو جدایه، ۲۲/۲ درصد) شناسایی شدند. نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که تمامی جدایه‌های *F. oxysporum* (دو جدایه) و حدود ۴۲/۸ درصد جدایه‌های *A. alternata* (سه جدایه) غیربیماری‌زا یا اندوفیت بوده و این در حالی است که بقیه جدایه‌های *A. alternata* (چهار جدایه، ۵۷/۲ درصد) جداسازی شده از بذر توانستند درجات مختلفی از شاخص بیماری را روی گیاهچه‌ی ماشک‌ها ایجاد نمایند. نتایج حاصل از بررسی میزان انتقال بیماری سوختگی آلترناریایی از بذر به گیاه نسل بعد نشان داد که میزان بروز بیماری ناشی از قارچ *A. alternata* در شرایط آلودگی طبیعی بذر در محدوده‌ی ۰/۳۵ تا ۲/۱۷ درصد و در شرایط مایه‌کوبی مصنوعی در محدوده‌ی ۱/۰۹ تا ۳/۲۲ درصد می‌باشد. نتایج آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که در میان نمونه‌های بذری ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری از نظر شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی وجود دارد. آلودگی بذر به جدایه‌های اندوفیت و غیربیماری‌زا قارچ‌های *A. alternata* و *F. oxysporum* تأثیری روی شاخص‌های مرتبط با ویژگی‌های جوانه‌زنی نداشته، درحالی‌که جدایه‌های بیماری‌زا و یا کم‌بیماری‌زای قارچ *A. alternata* با توجه به میزان بیماری‌زای آن‌ها می‌توانند روی درصد جوانه‌زنی و کیفیت گیاهچه تأثیرگذار باشند.

واژه‌های کلیدی: انتقال بیماری، بذرزاد، بیماری‌زایی، سلامت بذر، گیاهان علوفه‌ای

۱- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. n_khaledi@areeo.ac.ir
۲- محقق، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. m.rahmani.f@gmail.com
۳- دانشیار پژوهش، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. farshid.shz@gmail.com
*نویسنده مسئول: n_khaledi@areeo.ac.ir

مقدمه

ماشک‌ها (*Vicia* spp.) از خانواده بقولات (Fabaceae) به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای نقش مهمی را در کشاورزی پایدار دارند. ماشک‌ها از تنوع گونه‌ای بالایی برخوردار بوده و تا کنون بیش از ۲۰۰ گونه‌ی مختلف ماشک شناسایی شده است (Bosmali *et al*., 2022). ماشک‌ها به عنوان مالچ زنده و یا کود سبز ضمن بهبود ساختمان و بافت خاک با تثبیت نیتروژن موجب افزایش مواد آلی و حاصلخیزی خاک می‌شوند (Ibañez *et al*., 2020). همچنین به عنوان علوفه سبز و خشک برای خوراک دام‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Heidarpour *et al*., 2021). در ایران، مهم‌ترین گونه‌های ماشک علوفه‌ای کشت شده شامل معمولی (*Vicia sativa* L.)، مجاری پانونیکا (*Vicia pannonica* L.) و گل خوشه‌ای (*Vicia villosa* Roth. و *Vicia dasycarpa* Ten.) است. بر اساس آخرین آمار سازمان خوار و بار کشاورزی ملل متحد در سال ۲۰۲۲، سطح زیر کشت و میزان تولید جهانی انواع ماشک به ترتیب حدود ۳۲۲/۷ هزار هکتار و ۶۸۴ هزار تن بوده است (FAOSTAT, 2023). در ایران، آمار دقیقی از سطح زیر کشت و میزان تولید انواع ماشک علوفه‌ای ثبت نشده است.

روند رو به رشد جمعیت جهان و عدم دسترسی به منابع طبیعی موجب محدودیت سطح زیر کشت شده است، بنابراین توجه ویژه به افزایش عملکرد در واحد سطح و دستیابی به پتانسیل واقعی عملکرد ژنوتیپ گیاهی برای تأمین منابع غذایی حائز اهمیت می‌باشد. استفاده از بذر سالم و با کیفیت به‌عنوان مهم‌ترین و مؤثرترین مؤلفه‌ی دستیابی به حداکثر پتانسیل عملکرد کمی و کیفی ژنوتیپ گیاهی محسوب می‌شود (Khaledi and Hassani, 2021). عملکرد و کیفیت ماشک‌ها مانند دیگر محصولات کشاورزی تحت تأثیر انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرند. بیماری‌های گیاهی یکی از مهم‌ترین عوامل تنش‌زای زیستی به‌شمار می‌آیند که می‌توانند روی مراحل مختلف رشد و نمو گیاهان علوفه‌ای تأثیر گذاشته و در نهایت موجب کاهش عملکرد و کیفیت علوفه و بذر تولیدی شوند (Aleme and Mengistu, 2024).

میزان عملکرد و کیفیت ماشک‌های علوفه‌ای همواره تحت تأثیر بیماری‌های قارچی قرار دارد. بیماری‌های سفیدک پودری، زنگ، آنتراکنوز و پوسیدگی خاکستری از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی گزارش شده روی ماشک معمولی (*V. sativa*) می‌باشد (Renzi and Cantamutto, 2013). تاکنون، قارچ‌های *Ascochyta viciae-pannonicae*، *Erysiphe pisi* var. *pisi*، *polygoni* *Peronospora mayorii*، *P. viciae*، *Ramularia sphaeroidea* و *Uromyces viciae-fabae* از گیاه میزبان *V. pannonica*، قارچ‌های *E. polygoni*، *P. viciae* و *Phytophthora cryptogea* از گیاه میزبان *V. dasycarpa*، قارچ‌های *Alternaria tenuis*، *Ascochyta pinodes*، *A. pisi*، *A. viciae*، *A. viciae-pannonicae*، *A. viciae-villosae*، *Botrytis cinerea*، *B. fabae*، *Cercospora* sp.، *Colletotrichum trifolii*، *Didymella lethalis*، *Erysiphe pisi*، *E. polygoni*، *Fusarium oxysporum*، *F. roseum*، *Leveillula taurica*، *Microsphaera baeumleri*، *Peronospora viciae*، *Pseudopeziza medicaginis*، *R. sphaeroidea*، *Septoria pisi*، *Stemphylium vesicarium*، *U. fabae* و *U. viciae-fabae* از گیاه میزبان *V. villosa*، قارچ‌های *Ascochyta fabae*، *A. pisi*، *A. viciae*، *Aspergillus glaucus*، *B. cinerea*، *B. fabae*، *Colletotrichum lentis*، *C. spinaciae*، *E. pisi* var. *pisi*، *E. polygoni*، *F. avenaceum*، *F. roseum*، *L. taurica*، *P. mayorii*، *P. viciae*، *Phytophthora cryptogea*، *R. sphaeroidea*، *Rhizoctonia solani*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Septoria viciicola*، *Stemphylium botryosum*، *U. fabae* و *U. viciae-fabae* از گیاه میزبان *V. sativa* به عنوان مهم‌ترین عوامل قارچی جداسازی، شناسایی و در نقاط مختلف جهان گزارش شده است (USDA Fungal Databases, 2024). برخی از این عوامل قارچی به صورت بذرزاد و یا همراه بذر، در مرحله جوانه‌زنی روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی تأثیر گذاشته و موجب کاهش و یا عدم استقرار گیاه می‌شوند. این عوامل بیماری‌زا می‌توانند گیاهچه‌ها را قبل از خروج از خاک و پس از آن مورد حمله قرار داده و موجب پوسیدگی بذر، سوختگی و پژمردگی گیاهچه و در نهایت مرگ گیاهچه شوند (Martín *et al*., 2022).

گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که صفات مرتبط با جوانه‌زنی در گیاهان مختلف از جمله شاخص‌های بنیه و

جوانه‌زنی با افزایش میزان آلودگی بذر به قارچ‌های بذرزاد کاهش می‌یابد (Al-Askar *et al*., 2014; Gaur *et al*., 2020; Wang *et al*., 2022; Bibi *et al*., 2023). بنابراین انجام آزمون‌های سلامت بذر به منظور شناسایی عوامل بیماری‌زا و تعیین اهمیت آنها می‌تواند در انتخاب راهکارهای مؤثر مدیریتی برای کاهش اثرات مخرب بیماری‌های ناشی از آنها در مزرعه و افزایش میزان کمیت و کیفیت علوفه‌ی تولیدی مؤثر باشد (Etebu *et al*., 2017).

با وجود اهمیت ماشک‌ها در تولید علوفه و تأثیر آن‌ها در حاصلخیزی خاک‌های اراضی، اطلاعات ما در مورد بیماری‌های ناشی از قارچ‌های بذرزاد این گیاهان در ایران بسیار محدود است. بنابراین هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی قارچ‌های بذرزاد در نمونه‌های بذری ماشک‌های علوفه‌ای، بررسی تأثیر آلودگی بذر روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی، ارزیابی میزان بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی جداسازی شده و ارزیابی میزان انتقال بیماری‌ها از بذر به گیاه نسل بعد بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از نمونه‌های بذری ارقام داخلی مراغه (شکل 1a)، گل سفید (شکل 1b)، گلشن (شکل 1c)، طلوع (شکل 1d) و لامعی (شکل 1e) طی سال‌های زراعی ۱۴۰۳-۱۴۰۲ و ۱۴۰۲-۱۴۰۱ در استان‌های اردبیل (گرمی)، آذربایجان شرقی (کلیبر و خداآفرین)، ایلام (ایوان)، آذربایجان غربی (ارومیه)، کردستان (سنندج) و کرمانشاه (سرارود) بر اساس دستورالعمل انجمن بین‌المللی آزمون بذر (Anonymous, 2017) نمونه‌برداری و نمونه‌ها پس از ثبت مشخصات در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه سلامت بذر مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل شدند (جدول ۲).

آزمون سلامت بذر: سطح بذور جهت ردیابی آلودگی به عوامل قارچی با استفاده محلول رقیق‌شده هیپوکلریت سدیم (حاوی یک درصد کلر فعال) به مدت هفت دقیقه ضدعفونی شد و بذور پس از سه بار شستشو با آب مقطر سترون، برای خشک شدن روی کاغذ صافی در شرایط سترون قرار داده شدند. سپس تعداد ۴۰۰ عدد بذر (چهار تکرار شامل ۱۰۰ عدد بذر) از هر نمونه در سطح تشتک‌های پتری (به قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت عمومی سیب‌زمینی دکستروز آگار (عصاره‌ی ۳۰۰ گرم سیب‌زمینی پس از افزودن ۲۰ گرم دکستروز و ۱۵ گرم آگار با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.) کشت و در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی نگه‌داری و بدین ترتیب آلودگی‌های قارچی جداسازی شدند. جدایه‌های قارچی با استفاده از روش تک اسپور کردن و یا نوک ریسه روی محیط کشت آب آگار دو درصد خالص‌سازی شدند (Booth, 1977).

ریخت‌شناختی و شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی: ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی بر اساس ویژگی های ظاهری و میکروسکوپی ذکر شده در منابع و کلیدهای شناسایی معتبر انجام گرفت (Barnett and Hunter, 1998; Mathur and Kongsdal, 2003; Leslie and Summerell, 2006; Simmons, 2007; Crous *et al*., 2021). برای تأیید گونه‌های قارچی شناسایی‌شده بر اساس مشخصات ریخت‌شناختی، از آغازگرهای اختصاصی گونه که در جدول ۱ ارائه شده‌اند، استفاده شد (Mulè *et al*., 2003; Kordalewska *et al*., 2015). اختصاصی بودن هر آغازگر به وسیله انجام تجزیه و تحلیل BLAST در NCBI مورد تأیید قرار گرفت. برای تهیه میسلیوم مورد نیاز جهت استخراج DNA، هر جدایه‌ی قارچی در ظروف ارلن مایر محتوی محیط کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی دکستروز (عصاره‌ی ۳۰۰ گرم سیب‌زمینی پس از افزودن ۲۰ گرم دکستروز با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.) به مدت ۱۰ روز در داخل دستگاه انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. توده میسلیومی رشد یافته با پمپ خلاء، قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن سترون جمع‌آوری و با آب مقطر سترون شستشو شد. پس از آبگیری کامل، توده‌ی میسلیومی به درون میکروتیوب‌های سترون ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. میکروتیوب‌های حاوی میسلیوم تا مرحله استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه داری شدند. برای استخراج DNA از کیت Genomic DNA isolation kit ساخت شرکت Pishgam Biotech ایران با توجه به شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز دو درصد و روش طیف سنجی با دستگاه نانودراب اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی، اندازه محصول و شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده برای شناسایی گونه‌های قارچی جداسازی شده در نمونه‌های بذری ماشک‌های علوفه‌ای

Table 1. Sequence of specific primers, product sizes and polymerase chain reaction conditions used for detection of fungal species isolated in vetches seed samples

گونه Species	آغازگر Primer	توالی آغازگر (۳'→۵') Sequences (5'→3')	اندازه قطعه Product size (bp)	شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Polymerase chain reaction conditions	منبع Reference
Alternaria alternata	AaltFor	GTGCCTTCCCCCAAGGTCTCCG	184	94 ˚C for 3 min, 35 cycles at 94 ˚C for 30 s; 58 ˚C for 60 s; 72 ˚C for 60 s, 72 ˚C for 8 min	Kordalewska *et al*. (2015)
	AaltRev	CGGAAACGAGGTGGTTCAGGT			
Fusarium oxysporum	CLOX1	CAGCAAAGCATCAGACCACTATAACTC	534	94 ˚C for 5 min, 35 cycles at 94 ˚C for 60 s; 57 ˚C for 60 s; 72 ˚C for 50 s, 72 ˚C for 7 min	Mulè *et al*. (2003)
	CLOX2	CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT			

اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۱۲/۵ میکرولیتر 2X PCR Master Mix (Pishgam, Iran)، ۳ میکرولیتر DNA الگو با غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم و یک میکرولیتر از آغازگر روبه‌جلو و آغازگر برگشتی که در نهایت با افزودن آب دیونیزه (عاری از نوکلئاز) به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. هر آزمایش شامل شاهد منفی (یک واکنش PCR بدون DNA) و شاهد مثبت (DNA یک جدایه شناخته‌شده) بود. در نهایت محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و از طریق الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۷۰ ولت عبور داده شد. ردیابی نوارهای DNA با استفاده از رنگ آمیزی با رنگ فلورسنت GelRed® و سپس عکس‌برداری از ژل انجام شد.

مواد گیاهی: برای ارزیابی میزان بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی جداسازی شده، بذر هر رقمی که جدایه‌ی قارچی از آن جداسازی شده بود مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج پیش آزمون سلامت، بذرهای سالم ارقام گلشن، طلوع، گل سفید و مراغه که فاقد هر گونه آلودگی طبیعی بودند، از مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تهیه شدند. بذرها پس از ضدعفونی سطحی و پیش تیمار سرمادهی بذور همان‌طور که پیش از این اشاره شد، روی کاغذ صافی سترون مرطوب در اتاقک رشد در دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس تا زمان جوانه‌زنی قرار گرفتند. پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی (قطر ۱۰ سانتی‌متر) حاوی بستر کشت غنی شده (کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس با نسبت حجمی ۲:۱:۲) و سترون منتقل و در شرایط دمایی ۲±۲۶ درجه سلسیوس با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

آماده‌سازی مایه تلقیح: مایه تلقیح جدایه‌های *Fusarium* و *Alternaria* با استفاده از روش شرح داده شده توسط مولر و همکاران (Müller *et al*., 2012) تهیه شد. سوسپانسیون اسپور جدایه‌های قارچی در غلظت 10^5 ×۱ اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ با استفاده از روش سری رقت سریالی تهیه و برای مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون‌های بیماری‌زایی

ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی *Fusarium* و *Alternaria* روی گیاهچه‌ها به‌ترتیب با استفاده از غوطه‌ورسازی ریشه‌های بریده بر اساس روش شرح داده‌شده توسط لابد و همکاران (Labed *et al*., 2024) و روش اسپورپاشی بر اساس روش شرح داده‌شده توسط شی و همکاران (Shi *et al*., 2016) انجام شد. در روش غوطه‌ورسازی ریشه‌های بریده، پس از قطع نوک ریشه‌های گیاهچه‌های ۱۰ روزه با تیغ ضدعفونی شده، ریشه‌ها با غوطه‌ورسازی به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون اسپور مایه‌زنی شدند. گیاهان شاهد به همین ترتیب تیمار و در آب مقطر سترون غوطه‌ور شدند. سپس گیاهان در گلدان‌های جداگانه حاوی بستر کشت سترون کاشته شدند. در روش اسپورپاشی، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور روی هر گیاهچه افشانه شد. گیاهان شاهد نیز با آب مقطر سترون تیمار شدند. پس از مایه‌زنی، گیاهان به مدت ۴۸ ساعت در محفظه‌ای با رطوبت ۸۰ تا ۸۵ درصد نگهداری و سپس به همان اتاقک رشد منتقل شدند. پس از چهارده روز علایم آلودگی ناشی از *Fusarium* به صورت کلروز برگی و پژمردگی ظاهر و تا چهل روز پس از آلودگی تا مرگ

گیاهچه‌ها ادامه داشت. بنابراین شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium* روی گیاهچه، بر اساس نسبت میزان کلروز برگ و پژمردگی با استفاده از مقیاس ۴-۰ (۰ = بدون علایم بیماری و گیاهچه سالم، ۱ = علایم کلروز برگی در اندام هوایی، ۲ = علایم کلروز برگی و کمی پژمردگی، ۳ = پژمردگی شدید، ۴ = مرگ گیاهچه)، به روش شرح داده شده توسط سولها و همکاران (Soleha *et al*., 2022) درجه‌بندی شد. پس از پنج روز علایم آلودگی ناشی از *Alternaria* به صورت نکروز در برگ و ساقه ظاهر شد، بنابراین شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی گیاهچه، بر اساس نسبت میزان لکه برگی با استفاده از مقیاس ۵-۰ (۰ = بدون علایم لکه برگی، ۱ = کم‌تر از ۲۰ درصد، ۲ = بین ۲۱ تا ۴۰ درصد، ۳ = بین ۴۱ تا ۶۰ درصد، ۴ = بین ۶۱ تا ۸۰ درصد، ۵ = بیش از ۸۱ درصد علایم لکه برگی در سطح برگ)، به روش شرح داده شده توسط مانگوئن و همکاران (Mangwende *et al*., 2018) درجه‌بندی شد. سپس میزان بروز بیماری‌ها[1] (رابطه ۱) و شاخص شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium*[2] (رابطه ۲) و *Alternaria*[3] (رابطه ۳) با استفاده از رابطه‌های ذیل محاسبه شد (Zhang and Nan, 2014; Zhao *et al*., 2014). آزمون شامل چهار تکرار برای هر جدایه بود و آزمایش حداقل دو بار تکرار شد.

رابطه (۱)
$$\mathrm{DI} = \frac{NDP}{\mathrm{NTP}} \times 100$$

رابطه (۲)
$$DSI - F = \frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{4\mathrm{N}} \times 100$$

رابطه (۳)
$$DSI - A = \frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5}{5\mathrm{N}} \times 100$$

DI: درصد بروز بیماری
NDP: تعداد گیاهان دارای علایم بیماری
NTP: تعداد کل گیاهان مورد ارزیابی
DSI-F: درصد شاخص بیماری ناشی از جدایه‌های *Fusarium*
DSI-A: درصد شاخص بیماری ناشی از جدایه‌های *Alternaria*
N: تعداد کل گیاهچه‌ها
n_0: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۰ آلودگی
n_1: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۱ آلودگی
n_2: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۲ آلودگی
n_3: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۳ آلودگی
n_4: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۴ آلودگی
n_5: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۵ آلودگی

مایه‌کوبی مصنوعی بذر: به‌منظور تسریع در فرآیند جوانه‌زنی، ابتدا بذرهای سالم و فاقد هر گونه آلودگی طبیعی به مدت ۱۰ روز در دمای ۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند (Samarah *et al*., 2004). بذرهای هر رقم به صورت مصنوعی با هر یک از جدایه‌های قارچی جداسازی شده با استفاده از روش شرح داده شده توسط کخ و همکاران (Koch *et al*., 2020) مایه‌کوبی شدند. برای این منظور، بذرهای ضدعفونی شده در سوسپانسیون حاصل از هر یک از جدایه‌های قارچی در غلظت ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر همانطور که پیش از این اشاره شد، به نسبت ۵۰ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ عدد بذر در داخل ارلن مایر مخلوط و روی شیکر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس تکان داده شدند تا پوشش مناسب روی بذر ایجاد شود. به منظور چسبیدن اسپورهای قارچ به سطح بذر در سوسپانسیون اسپور مقدار یک درصد کربوکسی متیل سلولز افزوده شد. بذرهای تیمار شده روی کاغذهای سترون در زیر هود لامینار فلو خشک شدند. در تیمارهای شاهد، بذرها با آب مقطر سترون به همراه یک درصد کربوکسی متیل سلولز تیمار شدند. برای ارزیابی میزان آغشتگی اسپورها به بذر با قرار دادن تصادفی ۱۰ عدد بذر تیمار شده از هر جدایه در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حاوی توین ۲۰ و سپس با استفاده از روش سری رقت سریالی و شمارش روی لام هموسیتومتر به طور متوسط میزان اسپور روی سطح بذر محاسبه شد. برای اندازه گیری میزان زنده‌مانی اسپورهای قارچ روی سطح بذر، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون را برداشته و روی محیط کشت آب - آگار در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس قرار داده و پس از ۲۴ ساعت تعداد اسپورها جوانه زده شمارش شدند (Harman, 2008). بذرهای

[1]Disease incidence
[2]Disease severity index of *Fusarium*
[3]Disease severity index of *Alternaria*

تیمارشده برای ارزیابی شاخص‌های مرتبط با ویژگی‌های جوانه‌زنی مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی تأثیر آلودگی با زادمایه عوامل قارچی بذرزاد روی برخی شاخص‌های مرتبط با برخی ویژگی‌های جوانه‌زنی: برای انجام آزمون جوانه‌زنی استاندارد، تعداد ۴۰۰ بذر (چهار تکرار شامل ۱۰۰ عدد بذر) از هر نمونه‌ی بذری تیمار شده به صورت تصادفی انتخاب و درون ظرف پلاستیکی درپوش‌دار بین دو لایه کاغذ مرطوب قرار داده و به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از ۱۴ روز، میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته، میانگین درصد جوانه‌زنی[1] (رابطه ۴)، میانگین ارتفاع ساقه‌چه و ریشه‌چه و میانگین وزن خشک اندازه‌گیری شدند. وزن خشک هر گیاهچه با قرار دادن در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سلسیوس و توزین با ترازوی دقیق با دقت ۰/۰۰۱ ± گرم اندازه‌گیری شد. همچنین تعداد ۱۰ گیاهچه‌ی عادی به طور تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب و شاخص‌های طولی[2] (رابطه ۵) و وزنی بنیه گیاهچه [3] (رابطه ۶) با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (Taghvaei *et al*., 2023):

$$GP = \frac{n}{N} \times 100$$ رابطه (۴)

$$SLVI = GR \times (SL + RL)$$ رابطه (۵)

$$SWVI = GR \times SW$$ رابطه (۶)

GP: درصد جوانه‌زنی

n: تعداد بذر جوانه زده

N: تعداد کل بذرهای کاشته شده

SLVI: شاخص طولی بنیه گیاهچه

SL: میانگین طول ساقه‌چه

RL: میانگین طول ریشه‌چه

SW: وزن خشک گیاهچه

SWVI: شاخص وزنی بنیه گیاهچه

ارزیابی میزان انتقال بیماری از بذر به گیاه نسل بعد و بروز بیماری‌ها: نمونه‌های بذری ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای که دارای سطوح مختلف آلودگی بودند، همراه با نمونه‌های بذری از همان رقم که بر اساس نتایج آزمون سلامت فاقد هر گونه آلودگی بذرزاد قارچی بودند به عنوان شاهد، برای ارزیابی میزان انتقال بیماری از بذر به گیاه نسل بعد و بروز بیماری‌ها بر اساس روش شرح داده شده توسط کوشکونتونا و اوزر (Coşkuntuna and Özer, 2004) مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال اجرا شد. هر کرت شامل چهار خط کشت به طول یک متر با فاصله پشته ۵۰ سانتی متر بود. در هر کرت، تعداد ۱۰۰ عدد بذر از هر نمونه در چهار تکرار (در مجموع ۴۰۰ بذر از هر نمونه)، به‌صورت دستی به فاصله ۴ سانتی متر از هم با رعایت عمق کاشت یکنواخت کشت شدند. عملیات زراعی تهیه زمین شامل شخم و کوددهی قبل از کاشت بر اساس آزمون خاک انجام شد. آبیاری با استفاده از تیپ و به‌صورت قطره‌ای صورت گرفت. بازدید و یاداشت‌برداری در مراحل مختلف رشدی گیاه انجام و درصد بوته‌های سالم و بیمار ثبت و درصد بروز بیماری‌ها در مزرعه با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (El Gamal *et al*., 2022):

$$\text{درصد بروز بیماری} = \frac{\text{تعداد گیاهان بیمار}}{\text{تعداد کل گیاهان ارزیابی شده}} \times 100$$ رابطه (۷)

سپس نوع و میزان آلودگی بذر با عوامل قارچی با درصد بروز بیماری‌ها مقایسه و روند انتقال بیماری‌ها از بذر به گیاه نسل بعد تعیین شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

واکاوی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (SAS version 9.4) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) انجام شد. نمودارها مربوطه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 رسم گردید.

[1]Germination percentage; GP
[2]Seedling length vigor index; SLVI
[3]Seedling weight vigor index; SWVI

نتایج و بحث

ریخت‌شناختی و شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی

بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و میکروسکوپی در مجموع نه جدایه از نمونه‌های مختلف بذری ماشک‌های علوفه‌ای مورد بررسی در این پژوهش جداسازی شدند که متعلق به جنس‌های *Fusarium* و *Alternaria* بودند (جدول ۲). در نمونه‌های بذری رقم لامعی از استان آذربایجان غربی و همچنین ارقام طلوع و گل سفید از استان آذربایجان شرقی هیچ‌گونه آلودگی قارچی بذرزادی مشاهده نشد (شکل ۱f و جدول ۲).

جدول ۲- مشخصات نمونه‌های بذری ماشک‌های علوفه‌ای بر اساس محل و زمان نمونه‌برداری، نوع و میزان آلودگی به جدایه‌های قارچی شناسایی شده بر اساس مشخصات ریخت‌شناختی

Table 2. Characteristics of vetches seed samples based on sampling site and time, type and level of infection by fungal isolates identified based on morphological characteristics

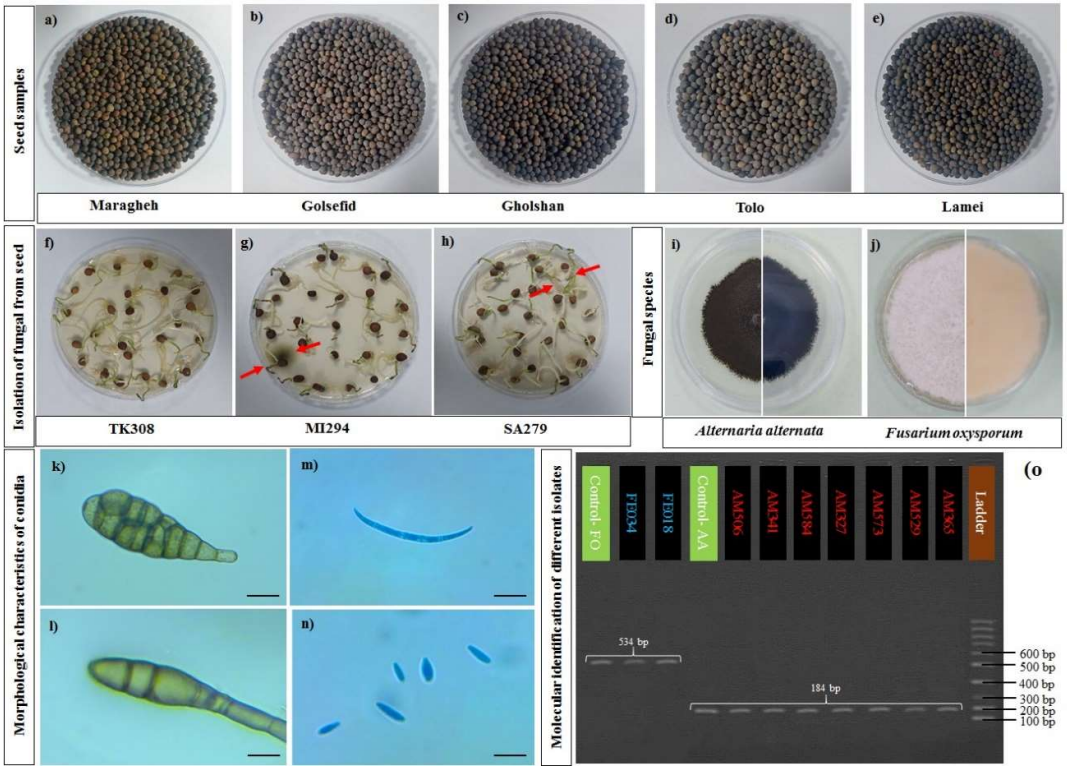
کد نمونه Sample code	نام رقم Cultivar name	نام علمی Scientific name	محل نمونه‌برداری Sampling site	زمان نمونه برداری (سال زراعی) Sampling time (Crop year of sampling)	میزان آلودگی بذر (درصد) Level of infection of seed (%)	نوع آلودگی (درصد) Type of infection (%)	
						Fusarium spp.	*Alternaria* spp.
GK207	گلشن Gholshan	*Vicia villosa* Roth.	کردستان - سنندج Kurdistan - Sanandaj	۱۴۰۱-۱۴۰۲ 2022-2023	2	ND*	2
TK245	طلوع Tolo	*Vicia sativa* L.	کرمانشاه - سرارود Kermanshah - Sararood	۱۴۰۱-۱۴۰۲ 2022-2023	1	1	ND*
TK308	طلوع Tolo	*Vicia sativa* L.	آذربایجان شرقی - کلیبر East Azerbaijan - Kaleybar	۱۴۰۲-۱۴۰۳ 2023-2024	ND*	ND*	ND*
SA279	گل سفید Golsefid	*Vicia pannonica* L.	اردبیل - گرمی Ardabil - Germi	۱۴۰۱-۱۴۰۲ 2022-2023	1	1	ND*
SK331	گل سفید Golsefid	*Vicia pannonica* L.	آذربایجان شرقی - خداآفرین East Azerbaijan - Khoda Afarin	۱۴۰۲-۱۴۰۳ 2023-2024	ND*	ND*	ND*
LA253	لامعی Lamei	*Vicia pannonica* L.	آذربایجان غربی - ارومیه West Azerbaijan - Urmia	۱۴۰۱-۱۴۰۲ 2022-2023	ND*	ND*	ND*
MI294	مراغه Maragheh	*Vicia dasycarpa* Ten.	ایلام - ایوان Ilam - Eyvan	۱۴۰۱-۱۴۰۲ 2022-2023	5	ND*	5

*ND: ردیابی نشد.

*ND: Not detected

بنابراین، بر اساس ویژگی‌های ظاهری و میکروسکوپی ذکر شده در منابع و کلیدهای شناسایی معتبر، هفت جدایه متعلق به *A. alternata* و دو جدایه متعلق به *F. oxysporum* شناسایی شدند. مشخصات جدایه‌های گونه‌ی *A. alternata* جداسازی شده بـه شرح زیر است: رنگ پرگنه قارچ از سبز زیتونی تیره تا قهوه‌ای تا سیاه متغیر بود (شکل ۱i). کنیدیوم‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره، مخروطی یا تخم مرغی شکل، فاقد نوک یا با نوکی کوتاه، دارای ۱ تا ۵ دیواره عرضی، فاقد یا دارای ۱ تا ۴ دیواره طولی به ابعاد ۱۵-۶ × ۵۵-۱۸ میکرومتر بودند (شکل ۱k). کنیدیوم‌برها قهوه‌ای روشن تا سبز زیتونی، راست یا خمیده و دارای دیواره بودند (شکل ۱l). نتایج به دست آمده از واکاوی مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AaltFor/AaltRev نشان داد که هفت جدایه‌ی شناسایی‌شده بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی به عنوان گونه‌ی *A. alternata* مورد تأیید است (شکل ۱o). این گونه از نمونه‌های بذری جمع آوری شده از رقم گلشن در استان کردستان (۲ جدایه) و رقم مراغه در استان ایلام (۵ جدایه) جداسازی و شناسایی شدند (شکل ۱g). مشخصات جدایه‌های گونه‌ی *F. oxysporum* جداسازی شده بـه

شرح زیر است: رنگ پرگنه قارچ از سفید تا صورتی کمرنگ متغیر بود (شکل ۱j). ماکروکنیدیوم به ابعاد ۵/۷-۳/۱ × ۵۶-۳۲ میکرومتر معمولاً با ۳ دیواره عرضی بوده که سلول پایه به شکل پا با پاشنه و سلول انتهایی به صورت خمیده تا مخلوطی بود (شکل ۱m). میکروکنیدیوم‌ها یک‌سلولی، تخم مرغی تا بیضی شکل و روی مونوفیالیدهای کوتاه در سرهای دروغین تشکیل شدند (شکل ۱n). نتایج به دست آمده از واکاوی مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی CLOX1/CLOX2 نشان داد که دو جدایه‌ی شناسایی‌شده بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی به عنوان گونه‌ی *F. oxysporum* مورد تأیید است (شکل ۱o). این گونه از نمونه‌های بذری جمع آوری شده از رقم طلوع در استان کرمانشاه (۱ جدایه) و رقم گل سفید در اردبیل (۱ جدایه) جداسازی و شناسایی شدند (شکل ۱h).



شکل ۱- نمونه‌های بذری ارقام مختلف ماشک‌ها (a-e)، جداسازی (f-h)، رنگ پرگنه‌ها و ویژگی‌های ریخت‌شناختی (i-n) و شناسایی مولکولی (o) جدایه‌های قارچی جداسازی شده از بذر.

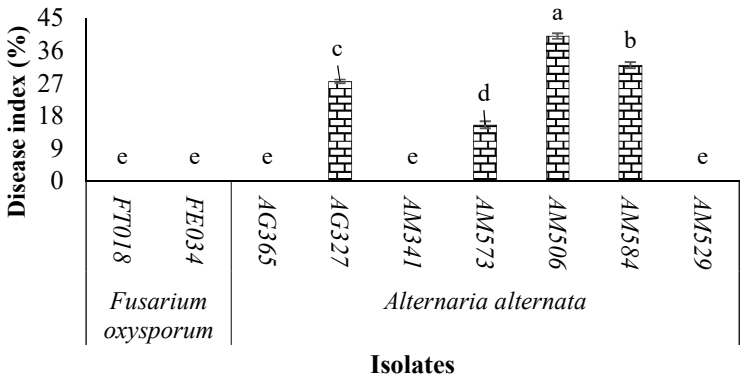
ارقام ماشک علوفه‌ای شامل (a) مراغه، (b) گل سفید، (c) گلشن، (d) طلوع، (e) لامعی؛ جداسازی از (f) نمونه‌ی کد TK308، (g) نمونه‌ی کد MI294، (h) نمونه‌ی کد SA279؛ (i) پرگنه‌ی *Alternaria alternata*، (j) پرگنه‌ی *Fusarium oxysporum*؛ (k) کنیدیوم‌های بالغ جدایه‌ی AM506 و (l) تشکیل کنیدیوم جدایه‌ی AG365 قارچ *A. alternata*، (m) ماکروکنیدیوم جدایه‌ی FT018 و (n) میکروکنیدیوم جدایه‌ی FE034 قارچ *F. oxysporum*، رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو. (o) نوارها به ترتیب AM365، AM529، AM573، AM327، AM584، AM341 و AM506 متعلق به *A. alternata* با آغازگر AaltFor/AaltRev، Control-AA شاهد مثبت *A. alternata*، FT018 و FE034 متعلق به *F. oxysporum* با آغازگر CLOX1/CLOX2، Control-FO شاهد مثبت *F. oxysporum*. نشانگر ۱۰۰ جفت بازی.

Figure 1. Seed samples of different vetches cultivars (a-e), isolation (f-h), colony color and morphological characteristics (i-n), and molecular identification (o) of fungal isolates isolated from seeds.

Forage vetches cultivars including (a) Maragheh, (b) Golsefid, (c) Gholshan, (d) Tolo, (e) Lamei; isolation from seed (f) sample code of TK308, (g) sample code of MI294, (h) seed sample code of SA279; (i) *Alternaria alternata* colony, (j) *Fusarium oxysporum* colony; (k) mature conidia isolate AM506 and (l) conidia-forming isolate AG365 of *A. alternata*, (m) macroconidia isolate FT018 and (n) microconidia isolate FE034 of *F. oxysporum*, staining with lactophenol cotton blue. (o) The bands of lanes AM365, AM529, AM573, AM327, AM584, AM341 and AM506 belonging to A. *A. alternata* amplified with AaltFor/AaltRev primers, Control-AA positive control of *A. alternata*, FT018 and FE034 belongs to *F. oxysporum* amplified with CLOX1/CLOX2 primers, positive control of *F. oxysporum*, respectively. Ladder 100 bp Fermentas.

نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچی جداسازی شده از بذر نشان داد که تمامی جدایه‌های قارچ شناسایی شده قادر به بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های حاصل از ماشک‌های علوفه‌ای نبودند. نتایج حاصل از ارزیابی میزان

بیماری‌زایی جدایه‌های *F. oxysporum* نشان داد که این جدایه‌ها بیماری‌زا نبوده و قادر به ایجاد علایم بیماری روی گیاهچه‌های ماشک نمی‌باشند (شکل ۲). مقایسه داده‌های به دست آمده از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های شناسایی شده به عنوان *A. alternata* نشان داد که حدود ۲۸ درصد (۲ جدایه) از جدایه‌ها بیماری‌زا نبوده و بقیه جدایه‌ها (۵ جدایه) قادر به ایجاد لکه‌های برگی روی ماشک‌ها می‌باشند (شکل ۲). آزمون بیماری‌زایی نشان داد که شاخص بیماری برای جدایه‌های بیماری‌زا گونه *A. alternata* از ۰/۹۶ ± ۱۵/۵۰ تا ۰/۸۲ ± ۴۰/۰۰ درصد متغیر بود. تفاوت‌های معنی‌داری در میزان بیماری‌زایی جدایه‌های متفاوت *A. alternata* روی گیاهچه‌های ماشک‌ها مشاهده شد (شکل ۲). همچنین بیش‌ترین و کم‌ترین شاخص بیماری جدایه‌های بیماری‌زای قارچ *A. alternata* روی گیاهچه‌های ماشک‌ها به ترتیب مربوط به جدایه‌های AM506 و AM573 می‌باشند (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه‌ی شاخص بیماری‌زایی (میانگین ± خطای استاندارد) جدایه‌های مختلف قارچی جداسازی شده روی گیاهچه‌های ماشک‌های علوفه‌ای، اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند.

Figure 2. A comparison of disease index (mean ± standard error) of different fungal isolates isolated on vetches seedlings; means within a column indicated by the same letters were not significantly different according to the least significant difference (LSD) test at the level $P \leq 0.05$.

پس از کشت ۴۰۰ عدد بذر از نمونه‌های بذری مختلف، نتایج حاصل از ارزیابی میزان انتقال بیماری‌ها به گیاه نسل بعد نشان داد که در نمونه‌های بذری آلوده به قارچ *A. alternata* با کدهای GK207 و MI294 به ترتیب ۲ (از ۳۷۷ گیاهچه شمارش شده) و ۸ (از ۳۷۲ گیاهچه شمارش شده) گیاهچه دارای علایم لکه برگی بودند (جدول ۳). همچنین هیچگونه علایم بیماری ناشی از قارچ *F. oxysporum* در گیاهچه‌های حاصل از نمونه‌های بذری کدهای TK245 و SA279 مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم انتقال آلودگی از بذر به گیاهچه حاصل در نسل بعد می‌باشد (جدول ۳). میزان بروز بیماری ناشی از قارچ *A. alternata* در گیاهچه‌های حاصل از نمونه‌های بذری کدهای MI294 و GK207 به ترتیب ۲/۱۷ درصد و ۰/۵۳ درصد بود (جدول ۳).

نتایج درصد جوانه‌زنی نمونه‌های بذری ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای در آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذر در نمونه‌ها از ۹۱/۵۰ تا ۹۵/۲۵ درصد متغیر بود (جدول ۴). میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته و غیرعادی در نمونه‌ها کم‌تر از ۰/۷۵ درصد بود. میانگین طول ریشه‌چه از ۱۷/۲۵ تا ۲۵/۵۰ سانتی‌متر و طول ساقه‌چه از ۱۴/۵۰ تا ۲۳/۰۰ سانتی‌متر متغیر بود. همچنین وزن‌تر گیاهچه از ۰/۲۷۲ تا ۰/۳۵۲ گرم و وزن خشک از ۰/۰۲۲ تا ۰/۰۳۲ گرم متغیر بود (جدول ۴). نتایج حاصل از آزمون استاندارد جوانه‌زنی نشان داد که شاخص بنیه گیاهچه از جمله شاخص وزنی از ۲/۰۹ تا ۳/۰۶ و شاخص طولی از ۲۹۱۱/۲۵ تا ۴۶۱۹/۵۰ متغیر بود (جدول ۴).

با توجه به آنکه ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای با نوع و میزان آلودگی متفاوتی ردیابی شده‌اند، امکان تفسیر و تعیین میزان تأثیر هر نوع آلودگی قارچی روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه وجود ندارد. بنابراین، ابتدا هر کدام از جدایه‌های قارچی روی رقمی که از آن جداسازی شده و

جدول ۳- مقایسه میزان آلودگی ردیابی شده در نمونه‌های بذری ماشک‌ها به قارچ‌های بذرزاد با میزان بروز بیماری‌های ناشی از آنها در مزرعه

Table 3. Comparison of the levels of infestation detected in vetches seed samples to seed-borne fungi with the disease incidence caused by them in the field

کد نمونه Sample code	آزمون سلامت بذر Seed health test			کل گیاهان (تعداد) Total plants (number)					ارزیابی مزرعه‌ای Field assessment درصد بروز بیماری‌ها The percentage of diseases incidence (PDI)					
	میزان آلودگی بذر (درصد) Level of infection of seed (%)	نوع آلودگی (درصد) Type of infection (%)		تکرار ۱ Repeat 1	تکرار ۲ Repeat 2	تکرار ۳ Repeat 3	تکرار ۴ Repeat 4	مجموع Total	تکرار ۱ Repeat 1	تکرار ۲ Repeat 2	تکرار ۳ Repeat 3	تکرار ۴ Repeat 4	میانگین Average
		Fusarium oxysporum	*Alternaria alternata*										
GK207	2	ND*	2	94	95	94	94	377	0	1.06	0	1.06	0.53
TK245	1	ND*	ND*	94	95	95	95	379	0	0	0	0	0
TK308	ND*	ND*	ND*	96	97	95	97	385	0	0	0	0	0
SA279	1	ND*	1	96	93	96	96	381	0	0	0	0	0
SK331	ND*	ND*	ND*	95	95	97	96	383	0	0	0	0	0
LA253	ND*	ND*	ND*	93	92	93	94	372	0	0	0	0	0
MI294	5	ND*	5	92	92	93	92	369	2.17	3.22	1.09	2.17	2.17

*ND: ردیابی نشد.

*ND: Not detected

**در مجموع ۴۰۰ بذر از هر نمونه در شرایط محیطی یکسان کشت و ارزیابی شدند.

**A total of 400 seeds from each sample were cultivated and evaluated under the same environmental conditions.

جدول ۴- مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه در نمونه‌های بذری ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای تحت تأثیر آلودگی طبیعی بذرزاد قارچی

Table 4. Means comparison of germination and vigor indices as affected by natural seed-borne fungal infection in vetches seed samples

کد نمونه Sample code	NFI	GP	DS	SD	SL	RL	FW	DW	SLVI	SWVI
GK207	2	93.50 ab	0.25 ab	93.25 ab	14.25 b	17.00 c	0.277 b	0.024 bc	2921.50 c	2.23 bc
TK245	1	94.00 ab	0 b	94.00 ab	22.25 a	24.75 a	0.345 a	0.031 a	4418.00 a	2.97 a
TK308	ND	95.25 a	0 b	95.25 a	23.00 a	25.50 a	0.352 a	0.032 a	4619.50 a	3.06 a
SA279	1	94.50 a	0 b	94.50 a	16.50 b	19.50 bc	0.292 b	0.026 b	3402.00 bc	2.48 b
SK331	ND	94.75 a	0 b	94.75 a	16.75 b	19.75 b	0.295 b	0.027 b	3459.25 b	2.52 b
LA253	ND	92.50 bc	0 b	92.50 bc	21.50 a	24.50 a	0.337 a	0.032 a	4249.25 a	2.99 a
MI294	5	91.50 c	0.75 a	90.75 c	14.50 b	17.25 bc	0.272 b	0.022 c	2911.25 c	2.09 c
LSD (0.05)		1.90	0.60	2.09	2.99	2.51	0.03	0.003	-	-

NFI: تعداد جدایه‌های قارچی، GP: درصد جوانه‌زنی، DS: میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته، SV: درصد قوه نامیه، SL: میانگین طول ساقه‌چه (سانتی‌متر)، RL: میانگین طول ریشه‌چه (سانتی‌متر)، FW: وزن‌تر (گرم)، DE: وزن خشک (گرم)، SLVI: شاخص طولی بنیه گیاهچه، SWVI: شاخص وزنی بنیه گیاهچه. اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌دار داشتند. هر آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد.

NFI: number of fungal isolates, GP: Germination percentage, DS: the average percentage of deformed seedlings, SV: Seed viability, SL: the average shoot length (cm), RL: average root length (cm), FW: fresh weight (g), DW: dry weight (g), SLVI: seedling length vigor index, SWVI: seedling weight vigor index. Different letters indicate significant differences according to least significant difference (LSD) test at the level $P \leq 0.05$. Each experiment was repeated two times with similar results.

فاقد هر گونه آلودگی طبیعی بود، به صورت مصنوعی مایه‌کوبی شدند. سپس با استفاده آزمون جوانه‌زنی استاندارد، میزان تأثیر هر کدام از جدایه‌های قارچی جداسازی شده روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بین ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای بدون و یا با آلودگی از نظر برخی از شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۵).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه در تیمارهای بذری ماشک رقم گلشن مایه‌کوبی شده با جدایه‌های قارچی AG327 (*A. alternata*) و AG365 (*A. alternata*) به همراه تیمار شاهد نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر میزان شاخص‌های جوانه‌زنی، وزنی و طولی بنیه در گیاهچه‌های حاصل از تیمار بذری جدایه‌ی قارچی AG327 در مقایسه با تیمارهای شاهد و مایه‌کوبی

شده با جدایه AG365 وجود داشته و میزان این شاخص‌ها و عوامل مؤثر بر آنها کاهش یافته بود (جدول ۵). همچنین، میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته و غیرعادی در تیمار بذری با جدایه‌ی AG327 بیش از تیمارهای شاهد و مایه‌کوبی شده با جدایه AG365 می‌باشد. در مقایسه‌ی تیمارهای شاهد با تیمارهای بذر رقم طلوع مایه‌کوبی شده با جدایه‌ی قارچی FT018 (*F. oxysporum*) و رقم گل سفید مایه‌کوبی شده با جدایه‌ی قارچی FE034 (*F. oxysporum*) تفاوت معنی‌داری از نظر درصد قوه نامیه، تعداد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته، شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه مشاهده نشد (جدول ۵).

نتایج حاصل از ارزیابی تأثیر جدایه‌های AM341، AM573، AM584، AM529 و AM506 قارچ *A. alternata* روی رقم مراغه نشان داد که تیمارها در گروه آماری مختلف قرار گرفتند و از لحاظ آماری بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند (جدول ۵). همچنین در تیمار شاهد رقم مراغه و تیمارهای مایه‌کوبی شده با جدایه‌های AM341 و AM529 تفاوت معنی‌داری از نظر درصد قوه نامیه، تعداد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته، شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه مشاهده نشد. میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته و غیرعادی در تیمارهای مایه‌کوبی شده با جدایه های AM573، AM584 و AM506 بیش‌تر از تیمار شاهد رقم مراغه و تیمارهای مایه‌کوبی شده با جدایه‌های AM341 و AM529 بوده و از لحاظ آماری بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۵).

در میان تیمارهای بذری مایه‌کوبی شده با جدایه‌های قارچ *A. alternata* اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های بنیه، جوانه‌زنی، قوه نامیه، طول گیاهچه، وزن‌تر و خشک مورد ارزیابی مشاهده شد. در آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که درصد جوانه‌زنی در تیمارهای بذری مایه‌کوبی شده با جدایه‌های قارچی جداسازی شده از رقم مراغه از ۸۵/۲۵ تا ۹۱/۷۵ درصد و درصد قوه نامیه از ۸۴/۲۵ تا ۹۱/۷۵ درصد متغیر بود. میزان درصد جوانه‌زنی، شاخص‌های وزنی و طولی بنیه در تیمار شاهد رقم مراغه به ترتیب ۹۲/۰۰، ۲۸۹۸/۰۰ و ۱/۸۷ بود (جدول ۵). میزان شاخص وزنی بنیه در تیمارهای بذری مایه‌کوبی شده نیز از ۱/۶۳ تا ۱/۸۵ و شاخص طولی بنیه از ۲۰۶۷/۵۰ تا ۲۷۹۸/۲۵ متغیر بود. میانگین طول و وزن گیاهچه در تیمارهای مایه‌کوبی شده با جدایه‌های AM573، AM584 و AM506 کم‌تر از تیمارهای شاهد و مایه‌کوبی شده با جدایه‌های AM341 و AM529 بود. میانگین طول ساقه‌چه در تیمارهای مایه‌کوبی شده با جدایه‌های AM573، AM584 و AM506 از ۱۰/۵۰ تا ۱۱/۷۵ سانتی‌متر و میانگین طول ریشه‌چه از ۱۳/۷۵ تا ۱۵/۲۵ سانتی‌متر متغیر بود. میانگین طول ساقه‌چه در تیمارهای مایه‌کوبی شده با جدایه‌های AM341 و AM529 به ترتیب ۱۶/۷۵ و ۱۶/۵۰ سانتی‌متر و میانگین طول ریشه‌چه به ترتیب ۱۳/۷۵ و ۱۴/۰۰ سانتی‌متر بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد رقم مراغه (طول ساقه‌چه و ریشه‌چه به ترتیب ۱۴/۲۵ و ۱۷/۲۵ سانتی‌متر) نداشت (جدول ۵). میانگین وزن‌تر گیاهچه‌های حاصل از بذرهای مایه‌کوبی شده با جدایه‌های AM573، AM584 و AM506 از ۰/۲۲ تا ۰/۲۴ گرم و وزن خشک از ۰/۰۱۹۱ تا ۰/۰۱۹۸ گرم متغیر بود. میانگین وزن‌تر در تیمارهای مایه‌کوبی شده با جدایه‌های AM341 و AM529 به ترتیب ۰/۲۶ و ۰/۲۶ گرم و میانگین وزن خشک به ترتیب ۰/۰۲۰۲ و ۰/۰۲۰۱ گرم بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد رقم مراغه (میانگین وزن‌تر و خشک به ترتیب ۰/۲۶ و ۰/۰۲۰۳ گرم) نداشت (جدول ۵). کم‌ترین شاخص جوانه‌زنی و بنیه در تیمارهای بذری مایه‌کوبی شده مربوط به بذر مایه‌کوبی شده با جدایه AM506 (*A. alternata*) بود.

در این پژوهش به بررسی وضعیت سلامت ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای به آلودگی‌های بذرزاد قارچی، ارزیابی ارتباط بین نوع و میزان آلودگی ناشی از بذر با میزان بروز بیماری‌ها و همچنین تأثیر آلودگی بذر روی برخی از صفات مرتبط با جوانه‌زنی پرداخته شد. نتایج این پژوهش نشان داد که در بیش از ۴۲ درصد از نمونه‌های بذری ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای جمع آوری شده از مزارع ایران، هیچ‌گونه آلودگی قارچی بذرزادی مشاهده نشده است. همچنین بیش‌ترین میزان فراوانی جدایه‌های قارچی جداسازی شده به ترتیب مربوط به نمونه‌های بذری جمع آوری شده در سال زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ از ارقام مراغه از ایوان (پنج جدایه)، گلشن از سنندج (دو جدایه)، طلوع از سرارود (یک جدایه) و گل سفید از گرمی (یک جدایه) بود. در نمونه‌های بذری ارقام لامعی (ارومیه) جمع‌آوری شده در سال زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ و ارقام طلوع (کلیبر) و گل سفید

جدول ۵- مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه در تیمارهای بذری ماشک‌های علوفه‌ای مایه‌کوبی شده با جدایه‌های قارچی بذرزاد

Table 5. Means comparison of germination and vigor indices in seed treatments of vetches inoculated with seed-borne fungal isolates

Treatmeants تیمارها	GP	DS	SD	SL	RL	FW	DW	SLVI	SWVI
شاهد - گلشن Control - Gholshan	93.75 a	0 a	93.75 a	15.00 a	17.50 a	0.282 a	0.0241 a	3047.25 a	2.26 a
AG365	93.75 a	0 a	93.75 a	14.75 a	17.25 a	0.280 a	0.0241 a	3000.50 a	2.26 a
AG327	91.50 b	0.75 b	90.75 b	13.75 b	16.25 b	0.265 a	0.0236 b	2745.25 b	2.15 b
LSD (0.05)	1.35	0.46	1.33	0.99	0.84	0.01	0.0004	-	-
شاهد - طلوع Control - Tolo	95.25 a	0 a	95.25 a	23.00 a	25.25 a	0.36 a	0.032 a	4630.50 a	3.04 a
FT018	95.00 a	0 a	95.00 a	22.50 a	24.75 a	0.35 a	0.031 a	4489.00 a	3.03 a
LSD (0.05)	1.53	0	1.53	1.22	1.69	0.01	0.0007	-	-
شاهد - گل سفید Control - Golsefid	95.50 a	0 a	95.50 a	16.75 a	20.00 a	0.30 a	0.0265 a	3509.50 a	2.53 a
FE034	94.75 a	0 a	94.75 a	16.50 a	19.50 a	0.29 a	0.0263 a	3411.25 a	2.49 a
LSD (0.05)	0.93	0	0.93	0.93	1.22	0.01	0.0007	-	-
شاهد - مراغه Control - Maragheh	92.00 a	0 c	92.00 a	14.25 a	17.25 a	0.26 a	0.0203 a	2898.00 a	1.87 a
AM341	91.50 a	0 c	91.50 a	13.75 a	16.75 a	0.26 a	0.0202 a	2791.50 a	1.84 a
AM584	87.50 c	0.75 ab	86.75 c	11.25 b	14.50 bc	0.24 b	0.0194 c	2253.00 c	1.70 c
AM506	85.25 d	1.00 a	84.25 d	10.50 c	13.75 c	0.22 c	0.0191 d	2067.50 d	1.63 d
AM573	90.00 b	0.50 b	89.50 b	11.75 b	15.25 b	0.24 b	0.0198 b	2430.00 b	1.78 b
AM529	91.75 a	0 c	91.75 a	14.00 a	16.50 a	0.26 a	0.0201 a	2798.25 a	1.85 a
LSD (0.05)	1.19	0.46	1.22	0.70	0.78	0.01	0.0002	-	-

GP: درصد جوانه‌زنی، DS: میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته، SV: درصد قوه نامیه، SL: میانگین طول ساقه‌چه (سانتی‌متر)، RL: میانگین طول ریشه‌چه (سانتی‌متر)، FW: وزن‌تر (گرم)، DE: وزن خشک (گرم)، SLVI: شاخص طولی بنیه گیاهچه، SWVI: شاخص وزنی بنیه گیاهچه. اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌دار داشتند. هر آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد.

GP: Germination percentage, DS: the average percentage of deformed seedlings, SV: Seed viability, SL: the average shoot length (cm), RL: average root length (cm), FW: fresh weight (g), DW: dry weight (g), SLVI: seedling length vigor index, SWVI: seedling weight vigor index. Different letters indicate significant differences according to least significant difference (LSD) test at the level $P \leq 0.05$. Each experiment was repeated two times with similar results.

(خداآفرین) جمع‌آوری شده در سال زراعی ۱۴۰۳-۱۴۰۲ هیچ‌گونه آلودگی قارچی بذرزادی مشاهده نشد.

نتایج حاصل از شناسایی نوع و میزان آلودگی نمونه‌های بذری ماشک‌های علوفه‌ای به قارچ‌های بذرزاد در این پژوهش نشان داد که در مجموع نه جدایه‌ی جداسازی شده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و اطلاعات مولکولی ناشی از تکثیر قطعه‌ی موردنظر بر اساس آغازگرهای اختصاصی گونه، متعلق به گونه‌های *A. alternata* و *F. oxysporum* بودند. این مشاهدات با گزارش‌های سایر محققان در ترکیه (Coşkuntuna and Özer, 2004)، چین (Shan and Yan-Zhong, 2016) و الجزایر (Labed *et al*., 2024) مطابقت داشت. بر اساس نتایج این پژوهش، بیش‌ترین فراوانی جدایه‌های قارچی شناسایی شده به ترتیب متعلق به گونه‌های *A. alternata* (هفت جدایه، ۷۸ درصد) و *F. oxysporum* (دو جدایه، ۲۲ درصد) بود. قارچ‌های *A. alternata* و *F. oxysporum* به ترتیب به عنوان عامل بیماری‌های لکه برگی و پژمردگی در ایران روی میزبان‌های مختلف لگوم‌ها گزارش شده‌اند (Ershad, 2009).

این اولین گزارش در مورد جداسازی و شناسایی قارچ‌های بذرزاد در نمونه‌های بذری ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای در ایران می‌باشد. گونه‌های *A. alternata* و *F. oxysporum* از روی بذر ماشک مجاری پانونیکا (*V. pannonica*) از ایران و جهان، گونه‌ی *F. oxysporum* از روی بذر ماشک معمولی (*V. sativa*) از ایران، گونه‌های *A. alternata*، *F. oxysporum* از روی بذر ماشک گل خوشه‌ای (*V. villosa*) از ایران و گونه‌های *A. alternata*، *F. oxysporum* از روی بذر ماشک گل خوشه‌ای (*V. dasycarpa*) از ایران و جهان برای اولین بار به عنوان قارچ‌های بذرزاد ماشک‌های علوفه‌ای جداسازی و گزارش می‌شوند. قارچ *Fusarium* spp. از روی گیاه *V. villosa* در سوئیس (Benitez *et al*., 2016) و ایالات متحده آمریکا (Walder *et al*., 2017) گزارش شده است. نتایج این پژوهش نشان داد که بیش‌ترین میزان فراوانی

جدایه‌های قارچی جداسازی شده به ترتیب مربوط به نمونه‌های جمع آوری شده از گونه‌های *V. dasycarpa* (پنج جدایه)، *V. pannonica* (چهار جدایه)، *V. villosa* (دو جدایه) و *V. sativa* (یک جدایه) بود. به نظر می‌رسد وجود آلودگی بالا در نمونه‌ی بذری مراغه به قارچ بذرزاد را می‌توان به حساسیت رقم، شرایط محیطی و عدم رعایت تناوب زراعی و عدم ضدعفونی بذر با قارچ‌کش مناسب نسبت داد.

نتایج حاصل از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ *A. alternata* نشان داد که حدود ۵۷/۲ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا و یا کم‌بیماری‌زا و حدود ۴۲/۸ درصد جدایه‌های بیماری‌زا نبودند. بر اساس نتایج حاصل از واکاوی آماری اطلاعات مربوط شاخص بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ *A. alternata* مشاهده شد که این جدایه‌ها از نظر شاخص بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های ارقام گلشن و مراغه دارای اختلاف معنی‌داری بودند. مشاهدات این پژوهش مشابه با نتایج گزارش‌شده توسط سایر محققان در برهم‌کنش *A. alternata* با گیاهان مختلف از جمله پیکان (Achilonu *et al*., 2023)، کنجد (Nayyar *et al*., 2017)، زیره سبز (Khaledi *et al*., 2021)، گشنیز (Mangwende *et al*., 2018) و سیب زمینی (Baltzakis *et al*., 2024) است. با توجه به نتایج به دست آمده، بیش‌ترین پیشرفت بیماری در میان تمام جدایه‌های بیماری‌زا و کم بیماری‌زا قارچ *A. alternata* مربوط به جدایه AM506 به میزان ۰/۸۲ ± ۴۰/۰۰ درصد بود که اولین علایم بیماری ۱۲۶ ساعت پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های نکروز در برگ و ساقه مشاهده شد. بنابراین جدایه‌های قارچ *A. alternata* جداسازی شده در این پژوهش به گروه‌های بیماری‌زا، کم‌بیماری‌زا و غیربیماری‌زا دسته‌بندی شدند. قارچ *A. alternata* به عنوان یک گونه غالب در اغلب مناطق دنیا از جمله ایران دارای دامنه‌ی میزبانی وسیعی می‌باشد که به دو حالت بیماری‌زا و اندوفیت زندگی می‌کند (DeMers, 2022). قارچ‌های اندوفیت بخشی یا کل چرخه زندگی خود را در بافت‌های گیاه میزبان بدون بروز علایم می‌گذرانند و در اغلب موارد اثرات مثبتی روی میزبان خود دارند (Akram *et al*., 2023). کوشکونتونا و اوزر (Coşkuntuna and Özer, 2004) گزارش کردند که قارچ *A. alternata* جداسازی شده از بذر ماشک مجاری پانونیکا (*V. pannonica*) قادر بروز بیماری در گیاه نسل بعد نمی‌باشد که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد.

با توجه به نتایج به دست آمده، هیچکدام از جدایه‌های *F. oxysporum* جداسازی و شناسایی شده روی گیاهچه‌های ارقام طلوع و گل سفید بیماری‌زا نبودند. مشاهدات این پژوهش مشابه با نتایج گزارش‌شده توسط سایر محققان در خصوص عدم بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* جداسازی شده از گیاهان مختلف از جمله نخل روغنی (Kinge *et al*., 2023)، میخک (Zaker Batson *et al*., 2021)، اسفناج (Tavallaie *et al*., 2022) و گوجه‌فرنگی (Joshi *et al*., 2013) مطابقت دارد.

ارزیابی گیاهچه‌های حاصل از بذرهایی که به طور طبیعی آلوده به قارچ‌های بذرزاد (*A. alternata* و *F. oxysporum*) بودند و یا به صورت مایه‌کوبی مصنوعی به هرکدام از جدایه‌های قارچی جداسازی شده مایه‌کوبی شده بودند نشان داد که قارچ *F. oxysporum* قابلیت انتقال به گیاه نسل بعد را نداشته و علایم بیماری بروز نکرده است. میزان بروز بیماری ناشی از قارچ *A. alternata* در شرایط آلودگی طبیعی بذر در نمونه‌ی بذر MI294 به میزان ۲/۱۷ درصد و در شرایط مایه‌کوبی مصنوعی در محدوده‌ی ۱/۰۹ تا ۳/۲۲ درصد بود. همچنین میزان بروز بیماری ناشی از قارچ *A. alternata* در شرایط آلودگی طبیعی بذر در نمونه‌ی بذر GK207 به میزان ۰/۵۳ درصد و در شرایط مایه‌کوبی مصنوعی در محدوده‌ی صفر تا ۱/۰۶ درصد بود. واچوفسکا و همکاران (Wachowska *et al*., 2021) گزارش کردند که آلودگی بذرزاد ناشی از قارچ *A. alternata* از بذر به گیاه نسل بعد منتقل شده و میزان بروز بیماری ۵/۰۱ درصد می‌باشد. کائور و دوتا (Kaur and Dutta, 2024) گزارش کردند که مایه‌کوبی مصنوعی بذر با قارچ *Alternaria brassicicola* موجب انتقال بیماری از بذر به گیاهچه‌های نسل بعد می‌شود. همچنین آنها گزارش کردند که میزان انتقال جدایه‌های قارچی به میزان بیماری‌زایی و تهاجمی بودن جدایه‌های قارچی وابسته نیست (Kaur and Dutta, 2024). بنابراین می‌توان پیش‌بینی نمود که با توجه به آنکه برخی از جدایه‌های قارچی جداسازی شده در این پژوهش به صورت غیربیماری‌زا و اندوفیت بودند، امکان انتقال این عواملی قارچی به گیاه نسل بعد نیز وجود داشته باشد.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین صفات جوانه‌زنی نشان داد که در میان نمونه‌های بذری ماشک‌های علوفه‌ای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی وجود دارد. با توجه به آنکه نمونه‌های بذری از ارقام مختلف ماشک‌های علوفه‌ای می‌باشند، به نظر می‌رسد بخشی از تفاوت مشاهده شده در شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی مربوط به تنوع ژنتیکی موجود در ارقام مورد بررسی در این پژوهش می‌باشد. همچنین آلودگی‌های طبیعی بذر به عوامل بیماری‌زای بذرزاد به ویژه قارچ‌ها به‌طور قابل‌توجهی می تواند روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه تأثیر گذاشته و موجب کاهش شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های حاصل شوند. ووژاکوویچ و همکاران (Vujaković *et al*., 2011) گزارش کردند که اختلاف معنی‌داری در میزان جوانه‌زنی و شاخص‌های رشد گیاهچه‌های ماشک معمولی (*V. sativa*)، مجاری پانونیکا (*V. pannonica*) و گل خوشه‌ای (*V. villosa*) وجود دارد که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. همچنین تیریاکی و ایسیدوگرو (Tiryaki and Isidogru, 2022) گزارش کردند که اختلاف معنی داری در میزان جوانه‌زنی پانزده رقم مختلف ماشک معمولی (*V. sativa*) وجود دارد.

نتایج آزمون جوانه‌زنی حاصل از تیمار بذر ماشک‌های علوفه‌ای با جدایه‌های اندوفیت قارچ *A. alternata* و جدایه‌های غیربیماری‌زای قارچ *F. oxysporum* جداسازی شده از بذر ارقام گل سفید، طلوع و گلشن در مقایسه با تیمارهای شاهد همان ارقام نشان داد، اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه از جمله میزان جوانه‌زنی، درصد قوه نامیه، طول گیاهچه، شاخص‌های طولی و وزنی بنیه، درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته و ریشه‌چه، وزن‌تر و خشک گیاهچه وجود ندارد. نونیز-کانو و همکاران (Núñez-Cano *et al*., 2023) گزارش کردند که تفاوت معنی‌داری از نظر وزن‌تر اندام‌های هوایی و زیرزمینی گیاه برنج تیمار شده با جدایه غیربیماری‌زای FO12 قارچ *F. oxysporum* با شاهد وجود نداشت. الدرج و همکاران (Eldredge *et al*., 2016) گزارش کردند که تیمار بذر گون (*Astragalus utahensis* (Torr.) Torr. & A.Gray) با قارچ‌های *Alternaria* spp. و *Aspergillus* spp. نه تنها موجب کاهش میزان جوانه‌زنی بذر نشده، بلکه موجب بهبود سرعت جوانه‌زنی بذر و ظهور گیاهچه می‌شود. لی و همکاران (Li *et al*., 2019) گزارش کردند که پاسخ بذر به اثرات قارچ‌های همراه آن به طور قابل توجه‌ای بین جدایه‌های مختلف متفاوت بوده و برخی از جدایه‌های قارچی موجب کاهش و برخی نیز موجب بهبود صفات مرتبط با جوانه‌زنی بذر می‌شوند که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. نتایج این پژوهش در خصوص بذرهای ماشک‌های علوفه‌ای تیمار شده با جدایه‌های بیماری‌زا و یا کم‌بیماری‌زای *A. alternata* نشان داد که میزان شاخص‌های طولی و وزنی بنیه، میزان جوانه‌زنی، درصد قوه نامیه، میانگین طول ساقه‌چه و ریشه‌چه، وزن‌تر و خشک گیاهچه‌های با افزایش میزان بیماری‌زایی جدایه‌های *A. alternata* به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. تارین و همکاران (Tareen *et al*., 2014) گزارش کردند که مایه‌کوبی مصنوعی بذر توسط قارچ *A. alternata* جداسازی شده از بذر موجب کاهش جوانه‌زنی بذر و افزایش میزان درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته می‌شود که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. قارچ‌های بیماری‌زای بذرزاد به ویژه برخی از جدایه‌های *A. alternata* به‌دلیل پوسیدگی در بذر باعث تأخیر در جوانه‌زنی و کاهش بنیه می‌شوند (Wachowska *et al*., 2021; Wang *et al*., 2022; Khan *et al*., 2023). ضعیف بودن بنیه‌ی موجب ایجاد گیاهچه‌ی ضعیف و کوچکی می‌شود که توانایی تحمل تنش‌های زنده و غیر زنده را ندارد. مشاهدات این پژوهش مشابه با نتایج گزارش‌شده توسط سایر محققان در خصوص تأثیر آلودگی بذر به قارچ *Alternaria* spp. روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی بذر گیاهان مختلف از کلم بروکلی (Kaur and Dutta, 2024)، کنجد (Pravallika *et al*., 2023; Bibi *et al*., 2023)، نخودفرنگی (Noureen *et al*., 2021)، کلزا (Soomro *et al*., 2020)، گشنیز (Mangwende *et al*., 2018) و رازیانه (Gama *et al*., 2014) است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که آلودگی بذر توسط قارچ‌های بذرزاد بیماری‌زا می‌تواند روی کمیت و کیفیت بذر تولید شده با کاهش جوانه‌زنی، پوسیدگی ریشه-ی گیاهچه، کاهش بنیه از طریق تضعیف رشد اولیه گیاه و همچنین ورود بیماری به منطقه جدید و گسترش آن تأثیرگذار باشد. بررسی‌های انجام شده در این پژوهش نشان داد که آلودگی بذر به قارچ‌های بذرزاد به‌ویژه *A. alternata*

به عنوان یکی از عوامل مؤثر در کاهش شاخص‌های بنیه موجب کاهش کیفیت گیاهچه‌های حاصل از ماشک‌های علوفه‌ای می‌شود. نکته قابل تأمل در این پژوهش آن است که ردیابی قارچ *A. alternata* نمی‌تواند تعیین کننده وضعیت کیفیت و سلامت نمونه‌ی بذری باشد، زیرا امکان دارد بسیاری از جدایه‌های قارچی جداسازی شده اندوفیت بوده و تأثیری روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی نداشته باشند. اگرچه نمونه‌های جمع آوری شده از مزارع تولید بذر ماشک علوفه‌ای در کشور از نظر میزان آلودگی به عوامل بیماری‌زای بذرزاد قارچی در سطح قابل قبولی قرار دارند، اما توجه ویژه به موضوع بهبود سطح کیفیت بذرهای تولیدی در توسعه کشاورزی پایدار بسیار حائز اهمیت است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که میزان و نوع آلودگی بذرزاد قارچی، میزان بیماری‌زایی جدایه‌ها، اثر متقابل هر کدام از این جدایه‌ها روی یکدیگر و همچنین واکنش ارقام نسبت به آن‌ها می‌تواند موجب تغییر شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی شود. به‌طور کلی، پیش‌بینی دقیق میزان بروز بیماری‌های بذرزاد به علت عدم اطلاع از میزان بیماری‌زایی عامل بیماری‌ها، حساسیت ارقام و تأثیر شرایط شرایط آب و هوایی به آسانی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، ضدعفونی بذر با قارچکش‌های شیمیایی توصیه شده قبل از کاشت و استفاده از بذر گواهی شده به عنوان یکی از مهم‌ترین راهکارهای مؤثر مدیریتی توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای حمایت مالی از این پژوهش با کد مصوب ۰۳۰۲۸۱-۰۰۲-۰۸-۰۸-۲ تشکر و قدرانی می‌نمایند.

منابع

Achilonu, C.C., Marais, G.J., Ghosh, S. and Gryzenhout, M. 2023. Multigene phylogeny and pathogenicity trials revealed *Alternaria alternata* as the causal agent of black spot disease and seedling wilt of Pecan (*Carya illinoinensis*) in South Africa. Pathogens, 12(5): 672. https//:doi.org/10.3390/pathogens12050672 **(Journal)**

Akram, S., Ahmed, A., He, P., He, P., Liu, Y., Wu, Y., Munir, S. and He, Y. 2023. Uniting the role of endophytic fungi against plant pathogens and their interaction. Journal of Fungi, 9(1): 72. https://doi.org/10.3390/jof9010072 **(Journal)**

Al-Askar, A.A., Ghoneem, K.M., Rashad, Y.M., Abdulkhair, W.M., Hafez, E.E., Shabana, Y.M. and Baka, Z.A. 2014. Occurrence and distribution of tomato seed-borne mycoflora in Saudi Arabia and its correlation with the climatic variables. Microbial Biotechnology, 7: 556-569. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12137 **(Journal)**

Aleme, M. and Mengistu, G. 2024. Impacts of diseases and pests on forage crop production and management systems: a review. International Journal of Ecotoxicology and Ecobiology, 9(3): 104-111. https://doi.org/10.11648/j.ijee.20240903.12 **(Journal)**

Anonymous, 2017. International Seed Testing Association (ISTA); International Rules for Seed Testing. Proceedings of the international seed testing association. In Bassersdorf. Switzerland: Seed Science and Technology, 333 pp. **(Book)**

Baltzakis, I., Nindya, S., Rahmayani, R., Thomas, J.E., van der Werf, W. and Struik, P.C. 2024. Pathogenicity of single and combined inoculations of *Alternaria* spp. on potato. Potato Research, https://doi.org/10.1007/s11540-024-09739-8 **(Journal)**

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of Imperfect fungi. 4th edition. APS Press. 218 pp. **(Book)**

Batson, A.M., Fokkens, L., Rep, M. and du Toit, L.J. 2021. Putative effector genes distinguish two pathogenicity groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 34(2): 141-156. https://doi.org/10.1094/MPMI-06-20-0145-R **(Journal)**

Benitez, M.S., Taheri, W.I., and Lehman, R.M. 2016. Selection of fungi by candidate cover crops. Applied Soil Ecology, 103: 72-82. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.03.016 **(Journal)**

Bibi, G., Nayyar, B.G., Ajmal, M., Mehak, A., Seerat W., Shahbaz, M., Mukhtar, T. and Akram, A. 2023. Effect of culture filtrates of *Alternaria alternata* on seed germination and seedling growth of sesame. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 56(02): 1-11. https://doi.org/10.1080/03235408.2023.2212417 **(Journal)**

Booth, C. 1977. Fusarium laboratory guide to identification of major species. Common wealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 55 pp. **(Book)**

Bosmali, I., Lagiotis, G., Haider, N., Osathanunkul, M., Biliaderis, C. and Madesis, P. 2022. DNA-based identification of Eurasian *Vicia* species using chloroplast and nuclear DNA barcodes. Plants, 11: 947. https://doi.org/10.3390/plants11070947 **(Journal)**

Coşkuntuna, A. and Özer, N. 2004. Seedborne fungi in Hungarian vetch and their transmission to the crop. Plant Pathology Journal, 3(1): 5-8. https://doi.org/10.3923/ppj.2004.5.8 **(Journal)**

Crous, P., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K., Schroers, H., Chaverri, P., Gené, J., Guarro, J., Hirooka, Y., Bensch, K., Kema, G., Lamprecht, S., Cai, L., Rossman, A., Stadler, M., Summerbell, R., Taylor, J., Ploch, S., Visagie, C., Yilmaz, N., … and Thines, M. 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. Studies in Mycology, 98: 1-184. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116 **(Journal)**

DeMers, M. 2022. *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen. Microbiology, 168(3): 001153. https://doi.org/10.1099/mic.0.001153 **(Journal)**

Eldredge, S.D., Geary, B. and Jensen, S. L. 2016. Seed isolates of *Alternaria* and *Aspergillus* fungi increase germination of *Astragalus utahensis*. Native Plants Journal, 17(2): 89-94. https://doi.org/10.3368/npj.17.2.89 **(Journal)**

Ershad, J. 2009. Fungi of Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection Press, Iran, 531 pp. **(Book)**

Etebu, E. and Nwauzoma, A. Barth. 2017. A mini-review on the development and emerging perspectives of seed pathology. Microbiology Research International, 5(14): 1-7. https://doi.org/ 10.30918/MRI.51.16.020 **(Journal)**

FAOSTAT, 2023. FAOSTAT Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. Retrieved April 20, 2024. From https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCinfo

Gama, J.S.N., Araujo Neto, A.C., Bruno, R.L.A., Pereira Junior, L.R. and Medeiros, J.G.F. 2014. Thermotherapy in treating fennel seeds (*Foeniculum vulgare* Mill.): effects on health and physiological quality. Revista Ciência Agronômica, 45(4): 842-849. https://doi.org/ 10.1590/S1806-66902014000400023 **(Journal)**

Gaur, A., Kumar, A., Kiran, R. and Kumari, P. 2020. "Importance of seed-borne diseases of agricultural crops: Economic losses and impact on society," in Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management. Eds. Kumar R., Gupta A. (Springer Nature Pte Ltd, Singapore), 3-23. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9046-4_1 **(Journal)**

Harman, G.E., Björkman, T., Ondik, K. and Shoresh, M. 2008. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outlooks on Pest Management*, 19: 24-9. https://doi.org/10.1564/19feb08 **(Journal)**

Heidarpour, N., Namdari, A. and Baghbani-Arani, A. 2021. The response of vetch (*Vicia sativa*) growth and yield to planting density and starter nitrogen under conservation and conventional conditions. Iranian Journal of Field Crop Science, 52: 167-176. https://doi.org/10.22059/ijfcs.2020.289784.654645 **(Journal)**

Ibañez, S., Medina, M.I. and Agostini, E. 2020. *Vicia*: A green bridge to clean up polluted environments. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 104: 13-21. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10222-5 **(Journal)**

Joshi, M., Srivastava, R., Sharma A.K. and Prakash, A. 2013. Isolation and characterization of *Fusarium oxysporum*, a wilt causing fungus, for its pathogenic and non-pathogenic nature in tomato (*Solanum lycopersicum*). Journal of Applied and Natural Science, 5: 108-117. https://doi.org/10.31018/jans.v5i1.290 **(Journal)**

Kaur, N. and Dutta, B. 2024. Characterization of seed-to-seedling transmission of *Alternaria brassicicola* in Broccoli. Plant Disease, 108 (7): 2046-2052. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-23-2002-RE **(Journal)**

Khaledi, N. and Hassani, F. 2021. Effect of seed-borne *Fusarium* species on constituents of essential oils from seeds of black cumin populations. Journal of Plant Protection Research, 61(3): 229-242. https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137945 **(Journal)**

Khaledi, N., Dehshiri, A. and Hassani, F. 2021. Effect of seed-borne fungi on seed health of native populations of Iranian cumin (*Cuminum cyminum* L.). Indian Phytopathology, 74: 659-668. https://doi.org/10.1007/s42360-021-00350-2 **(Journal)**

Khan, A.M., Khan, M., Salman, H.M., Ghazali, H.M.Z.U., Ali, R.I., Hussain, M., Yousaf, M.M., Hafeez, Z., Khawja, M.S., Alharbi, S.A., Alfarraj, S., Arif, M. and Nabeel, M. 2023. Detection of seed-borne fungal pathogens associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds collected from farmer fields and grain market. Journal of King Saud University, 35(4): 102590. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102590 **(Journal)**

Kinge, R.T., Zemenjuh, L.M., Bi, E.M., Ntsomboh-Ntsefong, G., Annih, G.M. and Bechem, E.E.T. 2023. Molecular phylogeny and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* isolates from oil palm plantations in Cameroon. Journal of Plant Protection Research, 63(1): 122-136. https://doi.org/10.24425/jppr.2023.144509 **(Journal)**

Koch, E., Zink, P., Pfeiffer, T., von Galen, A., Linkies, A., Drechsel, J. and Birr, T. 2020. Artificial inoculation methods for testing microorganisms as control agents of seed- and soil-borne *Fusarium*-seedling blight of maize. Journal of Plant Diseases and Protection, 127: 883-893. https://doi.org/10.1007/s41348-020-00350-w **(Journal)**

Kordalewska, M., Brillowska-Dąbrowska, A., Jagielski, T. and Dworecka-Kaszak, B. 2015. PCR and real-time PCR assays to detect fungi of *Alternaria alternata* species. Acta Biochimica Polonica, 62: 707-712. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1112 **(Journal**

Labed, I., Moustafa, B., Barboucha, G., Belkouicem, D., Boushaba, K., Boumegoura, A. and Zarouri, B. 2024. First report of *Fusarium redolens* causing Fusarium wilt on Vetch (*Vicia sativa*). Research Square, 1-7. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4823777/v1 **(Journal)**

Leslie, J.F. and Summerell, A.B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ames: Blackwell Publishing Professional. 388 pp. **(Book)**

Li, Y.M., Shaffer, J.P., Hall, B. and Ko, H. 2019. Soil-borne fungi influence seed germination and mortality, with implications for coexistence of desert winter annual plants. PLoS ONE, 14(10): e0224417. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224417 **(Journal)**

Mangwende, E., Kritzinger, Q., Truter, M. and Aveling, T.A.S. 2018. *Alternaria alternata*: A new seed-transmitted disease of coriander in South Africa. European Journal of Plant Pathology, 152: 409-416. https://doi.org/10.1007/s10658-018-1484-x **(Journal)**

Martín, I., Gálvez, L., Guasch, L., Palmero, D. 2022. Fungal pathogens and seed storage in the dry state. Plants (Basel), 11(22): 3167. https://doi.org/10.3390/plants11223167 **(Journal)**

Mathur, B.S. and Kongsdal, O. 2003. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA), 425 pp. **(Book)**

Mulè, G., Susca, A., Stea, G. and Moretti, A. 2003. Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from Asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. FEMS Microbiology Letters, 230: 235-240. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00926-1 **(Journal)**

Müller, M.E.H., Steier, I., Köppen, R., Siegel, D., Proske, M., Korn, U. and Koch, M. 2012. Cocultivation of phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* strains affects fungal growth and mycotoxin production. Journal of Applied Microbiology, 113: 874-887. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05388.x **(Journal)**

Taghvaei, M., Maleki, H., Najafi, S., Hassani, H.S., Danesh, Y.R., Farda, B. and Pace, L. 2023. Using using chromosomal abnormalities and germination traits for the assessment of tritipyrum amphiploid lines under seed-aging and germination priming treatments. Sustainability, 15(12): 9505. https://doi.org/10.3390/su15129505 **(Journal)**

Nayyar, B.G., Woodward, S., Mur, L.A.J., Akram, A., Arshad, M., Saqlan Naqvi, S.M. and Akhund, S. 2017. The incidence of *Alternaria* species associated with infected *Sesamum indicum* L. seeds from fields of the Punjab, Pakistan. The Plant Pathology Journal, 33(6): 543-553. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0081 **(Journal)**

Noureen, K., Jabeen, K., Iqbal, S., Jahan, S. and Javad, S. 2021. Effect of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. on the physiology of Pea (*Pisum sativum* L.). Revista de la Facultad de Agronomia de la Universidad del Zulia, 38(3): 462-479. https://doi.org/10.47280//RevFacAgron(LUZ).v38.n3.01 **(Journal)**

Núñez-Cano, J., Romera, F.J., Prieto, P., García, M.J., Sevillano-Caño, J., Agustí-Brisach, C., Pérez-Vicente, R., Ramos, J. and Lucena, C. 2023. Effect of the nonpathogenic strain *Fusarium oxysporum* FO12 on Fe acquisition in Rice (*Oryza sativa* L.) plants. Plants, 12(17): 3145. https://doi.org/10.3390/plants12173145 **(Journal)**

Pravallika, L.P., Bhattiprolu S.L., Radhika, K. and Raghavendra, M. 2023. Effect of *Alternaria sesami* on germination and seedling growth of Sesame. Indian Journal of Agricultural Research, 57(4): 543-547. https://doi.org/10.18805/IJARe.A-5601 **(Journal)**

Renzi, J. and Cantamutto, M. 2013. Vicias: Bases Agronómicas Para el Manejo en la Región Pampeana; Ediciones INTA, Ed.; Ediciones INTA: Buenos Aires, Argentina, 299 pp. **(Book)**

Samarah, N.H., Allataifeh, N., Turk, M.A. and Tawaha, A.M. 2004. Seed germination and dormancy of fresh and air-dried seeds of common vetch (*Vicia sativa* L.) harvested at different stages of maturity. Seed Science and Technology, 32: 11-19. https://doi.org/10.15258/sst.2004.32.1.03 **(Journal)**

Shan, X.U. and Yan-Zhong, L. 2016. Research advances on fungal diseases of *Vicia sativa*. Acta Prataculturae Sinica, 25(7): 203-214. https://doi.org/10.11686/cyxb2015478 **(Journal)**

Shi, Y.X., Wang, Y.Y., Wang, H.J., Chai, A.L. and Li, B.J. 2016. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot of fennel (*Foeniculum vulgare*) in China. Plant Disease, 100: 2173-2173. https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1479-PDN **(Journal)**

Simmons, E.G. 2007. *Alternaria*: An identification manual. CBS biodiversity series 6, CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. 775 pp. **(Book)**

Soleha, S., Muslim, A., Suwandi, S., Kadir, S. and Pratama, R. 2022. The identification and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* causing acacia seedling wilt disease. Journal of Forestry Research, 33: 711-719. https://doi.org/10.1007/s11676-021-01355-3 **(Journal)**

Soomro, T.A., Ismail, M., Anwar, S.A., Memon, R.M. and Nizamani, Z.A. 2020. Effect of *Alternaria* sp. on seed germination in rapeseed, and its control with seed treatment. Journal of Cereals and Oilseeds, 11: 1-6. https://doi.org/10.5897/JCO2017.0178 **(Journal)**

Tareen, H.U., Rauf, C.A., Qadir, G. and Bhutta, A.R. 2014. Biological studies on seed borne mycoflora of exotic tomato seed. Pakistan Journal of Phytopathology, 26 (02): 271-279

Tiryaki, I. and Isidogru, N. 2022. Determination of salt tolerance levels and genetic relationships of *Vicia sativa* cultivars using gene targeted functional markers. Acta Botanica Croatica, 81(1): 80-88. https://doi.org/88.10.37427/botcro-2022-005 **(Journal)**

USDA Fungal Databases. 2024. Retrieved May 13, 2024. from https://fungi.ars.usda.gov/

Vujaković, M., Jovičić, D., Karagić, Đ., Mikić, A., Nikolić, Z., Petrović, D. and Taški-Ajduković, K. 2011. Indicators of winter vetch (*Vicia* spp.) seed vigor. Ratarstvo i povrtarstvo, 48(1): 131-https://doi.org/136.10.5937/ratpov1101131V **(Journal)**

Wachowska, U., Kwiatkowska, E. and Pluskota, W. 2021. *Alternaria alternata* as a seed-transmitted pathogen of *Sida hermaphrodita* (Malvaceae) and its suppression b *Aureobasidium pullulans*. Agriculture, 11: 1264. https://doi.org/10.3390/agriculture11121264 **(Journal)**

Walder, F., Schlaeppi, K., Wittwer, R., Held, A.Y., Vogelgsang, S. and van der Heijden, M.G.A. 2017. Community profiling of Fusarium in combination with other plant-associated fungi in different crop species using SMRT sequencing. Frontiers in Plant Science, 8: 1-17. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02019 **(Journal)**

Wang, J., Zhou, Y., Xue, L., Wei, X., White, J.F., Chen, T. and Li, C. 2022. Seed-borne fungi associated with oat seeds and their effect on seed germination and seedling growth. Journal of Plant Pathology, 105: 225-236. https://doi.org/10.1007/s42161-022-012 0-4 **(Journal)**

Zaker Tavallaie, F., Shahbazi, S. and Daroodi, Z. 2022. Effective biological control of carnation *Fusarium* wilt using a new combination of *Trichoderma* mutant isolates. Journal of Agricultural Science and Technology, 24 (6): 1501-1517. https://doi.org/10.52547/jast.24.6.1501 **(Journal)**

El Gamal, A.Y., Tohamy, M.R., Abou-Zaid, M.I., Atia, M.M., El Sayed, T. and Farroh, K.Y. 2022. Silver nanoparticles as a viricidal agent to inhibit plant-infecting viruses and disrupt their acquisition and transmission by their aphid vector. Archives of Virology, 167: 85-97. https://doi.org/10.1007/s00705-021-05280-y **(Journal)**

Zhang, Z. and Nan, Z. 2014. *Erwinia persicina*, a possible new necrosis and wilt threat to forage or grain legumes production. European Journal of Plant Pathology, 139: 349-358. https://doi.org/10.1007/s10658-014-0390-0 **(Journal)**

Zhao, B., Yan, J., Zhang, S., Liu, X. and Gao, Z. 2014. Phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from greenhouse melon soil in Liaoning Province. Saudi Journal of Biological Sciences, 21: 374-379. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.10.004 **(Journal)**

Isolation and identification of seed-borne fungi of forage vetches and investigation of their effect on some germination characteristics

Nima Khaledi[1*], Mohamad Rahmani[2], Farshid Hassani[3]

Received: November 29, 2024 Accepted: January 31, 2025

Abstract

Fungal pathogens are one of the most important factors affecting the growth, yield, and production rate of forage vetches. The aim of this research was the isolation and identification of the seed-borne fungi from forage vetches seed samples, to evaluate the effect of seed infection on vigor and germination indices, and also to investigate the process of infection transmission from seed to the next generation plant. In order to detect fungal infections in seed samples, different cultivars of forage vetches produced in fields of West Azerbaijan, East Azerbaijan, Ardabil, Ilam, Kermanshah, and Kurdistan provinces were sampled. A total of 9 isolates were identified based on morphological characteristics and species-specific primers belonging to species, *Alternaria alternata* (7 isolates, 78.8%) and *Fusarium oxysporum* (2 isolates, 22.2%). The results of pathogenicity test showed that all *F. oxysporum* isolates and about 42.8% of *A. alternata* isolates (3 isolates) were endophyte and non-pathogenic, while the remaining *A. alternata* isolates (4 isolates, 57.2%) isolated from seeds could cause the different levels of disease index on vetch seedlings. The results of the study of the transmission rate of Alternaria blight disease from seed to the next generation plant showed that the disease incidence caused by the fungus *A. alternata* was in the range of 0.35% to 2.17% under natural seed infection condition and in the range of 1.09% to 3.22% under artificial inoculation condition. The results of the standard germination test showed that there was a significant difference among the seed samples of different forage vetches cultivars studied in the vigor and germination indices. Seed infection by endophytic and non-pathogenic isolates of *A. alternata* and *F. oxysporum* fungi did not affect the indicators related to the germination characteristics, while pathogenic and/or less pathogenic isolates of *A. alternata* can affect the germination percentage and seedling quality, depending on their level of pathogenicity.

Keywords: Disease transmission; Seed-borne; Pathogenicity; Seed health; Forage plants

How to cite this article
Khaledi, N., Rahmani, M., and Hassani, F. 2025. Isolation and identification of seed-borne fungi of forage vetches and investigation of their effect on some germination characteristics. Iranian Journal of Seed Science and Research, 11(4): 1-19. (In Persian)**(Journal)**
DOI: 10.22124/jms.2024.8795

COPYRIGHTS
Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research
The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Research Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. n_khaledi@areeo.ac.ir
2. Researcher, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. m.rahmani.f@gmail.com
3. Associate professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. farshid.shz@gmail.com
*Corresponding author: n_khaledi@areeo.ac.ir