علوم و تحقیقات بذر ایران
سال دوازدهم/ شماره اول/ ۱۴۰۴ (۴۳ - ۲۷)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2025.8803

ارزیابی شاخص‌های کیفی جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه‌ی نخودفرنگی علوفه‌ای در پاسخ به قارچ عامل بیماری پژمردگی آوندی

نیما خالدی[1*]، محمد رحمانی[2]، فرشید حسنی[3]، لیلا زارع[4]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۱

چکیده

آلودگی بذر به قارچ *Fusarium* spp. یکی از مهمترین تهدیدهای عمده برای کیفیت بذر و عملکرد محصولات کشاورزی از جمله نخودفرنگی علوفه‌ای است. هدف از این پژوهش، شناسایی عامل قارچی بذرزاد پژمردگی آوندی فوزاریومی در نمونه‌های بذری نخودفرنگی علوفه‌ای، ارزیابی میزان تأثیر آلودگی طبیعی بذر روی برخی صفات مرتبط با جوانه‌زنی بذر و رشد اولیه‌ی گیاهچه‌ها و هم‌چنین بررسی روند انتقال آلودگی و بروز بیماری در گیاهان نسل بعد می‌باشد. به منظور تشخیص آلودگی، از بذور ارقام مختلف نخودفرنگی علوفه‌ای وارداتی و تولید شده در مزارع استان آذربایجان شرقی (منطقه کلیبر) بر اساس ضوابط انجمن بین المللی آزمون بذر نمونه‌برداری شد. جدایه‌های قارچی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و آغازگرهای اختصاصی گونه شناسایی شدند. در مجموع بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و آغازگرهای اختصاصی گونه، هفت جدایه‌ی قارچی متعلق به *Fusarium oxysporum* شناسایی شدند. میزان شاخص بیماری ناشی از جدایه‌های بیماری‌زا و کم‌بیماری‌زا روی گیاهچه‌های نخودفرنگی علوفه‌ای از ۲/۰۲ ± ۵۳/۵۰ درصد تا ۰/۷۵ ± ۹/۲۵ درصد متغیر بود. نتایج حاصل از بررسی میزان انتقال آلودگی ناشی از قارچ *F. oxysporum* از بذر به گیاه نسل بعد نشان داد که میزان بروز بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی در محدوده‌ی صفر تا ۲/۱۷ درصد متغیر بود. نتایج این پژوهش نشان داد که پیش‌بینی دقیق میزان بروز بیماری بذرزاد به علت عدم اطلاع از میزان بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی و سطح حساسیت متفاوت ارقام به آسانی امکان‌پذیر نیست. وجود یا عدم وجود آلودگی در بذر نمی‌تواند تعیین کننده سطح کیفیت بذر و سلامت گیاهچه‌های نخودفرنگی علوفه‌ای باشد، بلکه این میزان بیماری‌زایی است که روی صفات مرتبط با ویژگی‌های جوانه‌زنی و رشد اولیه‌ی گیاهچه‌ها تأثیرگذار است.

واژه‌های کلیدی: بروز بیماری، بیماری‌زایی، پژمردگی آوندی، فوزاریوم، شاخص بیماری، شناسایی

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
۴ - محقق، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. zare_l@yahoo.com
* نویسنده مسئول: n_khaledi@areeo.ac.ir

مقدمه

نخودفرنگی با نام علمی *Pisum sativum* L. به دو زیر گونه *sativum* به عنوان نخودفرنگی خوراکی با گل‌های سفید و *arvense* به عنوان نخودفرنگی علوفه‌ای با گل‌های بنفش تقسیم بندی می‌شود (Ozyazici and Acikbas, 2021). نخودفرنگی علوفه‌ای با نام علمی *Pisum sativum* ssp. *arvense* (L.) Poir. گیاهی یکساله از خانواده بقولات[1] و سرمادوست است (Lal *et al*., 2018). این گیاه به عنوان علوفه برای خوراک دام‌ها، گیاه پوششی و کود سبز با تثبیت نیتروژن موجب حاصلخیزی خاک شده و به‌دلیل طول دوره رشد و مصرف کم آب، نقش مهمی در کشاورزی پایدار دارد (Williamson-Benavides *et al*., 2020). نخودفرنگی علوفه‌ای در تناوب کشت کوتاه مدت و کشت مخلوط با سایر گیاهان غیرحبوبات مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر اساس آخرین آمار سازمان خوار و بار کشاورزی ملل متحد در سال ۲۰۲۲، میزان تولید جهانی انواع نخودفرنگی حدود ۲۱ میلیون تن و سطح زیر کشت آن ۲/۶ میلیون هکتار بوده است (FAOSTAT, 2023). در ایران، آمار دقیقی از سطح زیر کشت و میزان تولید نخودفرنگی علوفه‌ای به صورت مجزا ثبت نشده است، اما بر اساس آمار سازمان خوار و بار کشاورزی ملل متحد در سال ۲۰۲۲، سطح زیر کشت و میزان تولید به ترتیب حدود ۲/۶ هزار هکتار و ۱۶/۶ هزار تن بوده است (FAOSTAT, 2023).

به منظور افزایش بهره‌وری نخودفرنگی، بهبود سطح کیفی بذر ضروری است (Miljaković *et al*., 2024). بذر سالم پیش نیاز اصلی تولید محصول بوده و اثرات مستقیم و غیرمستقیم روی امنیت غذایی می‌گذارد، زیرا بیمارگرهای بذرزاد و یا همراه بذر می‌توانند کمیت و کیفیت عملکرد را کاهش دهند (Moumni *et al*., 2023). انواع متعددی از عوامل قارچی، باکتریایی، نماتدی و ویروسی می‌توانند روی مراحل مختلف رشد، نمو و بقای نخودفرنگی علوفه‌ای تأثیر گذار باشند (Zakaria, 2023). میزان عملکرد و کیفیت علوفه و بذر تولیدی نخودفرنگی همواره تحت تأثیر عوامل بیماری‌زای قارچی قرار داشته و بیش‌ترین ضررهای اقتصادی ناشی از این عوامل بیماری‌زا می‌باشد. آلودگی بذر به عوامل بیماری‌زای قارچی باعث کاهش قوه نامیه بذر و افزایش تعداد گیاهچه‌های غیرعادی و تغییر شکل یافته می‌شود (Selcuk *et al*., 2008). بنابراین، وجود یا عدم وجود عوامل بیماری‌زای قارچی در بذر یکی از جنبه‌های مهم کیفیت بذر است (Milošević *et al*., 2023). بیماری‌های سفیدک داخلی، سفیدک سطحی، برق زدگی، پژمردگی آوندی فوزاریومی و پوسیدگی ریشه از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی گزارش شده روی نخودفرنگی علوفه‌ای می‌باشند (Cousin, 1997). تاکنون، قارچ‌های *Acremonium alternatum*، *Acremoniella atra*، *Alternaria alternata*، *Aspergillus flavus*، *A. nidulans*، *A. niger*، *A. ustus*، *Botrytis cinerea*، *Cladosporium herbarum*، *C. cladosporioides*، *Curvularia lunata*، *Cylindrocarpon didymum*، *Epicoccum nigrum*، *Fusarium acuminatum*، *F. anguioides*، *F. avenaceum*، *F. culmorum*، *F. equiseti*، *F. graminearum*، *F. lateritium*، *F. oxysporum*، *F. poae*، *F. redolens*، *F. sporotrichioides*، *F. tricinctum*، *F. verticillioides*، *Penicillium granulatum*، *P. simplicissimum*، *P. frequentans*، *P. lilacinum*، *P. notatum*، *Stemphylium botryosum*، *Trichoderma viride* و *Trichothecium roseum* از گیاه میزبان *Pisum sativum* ssp. *sativum* شناسایی و گزارش شده است (USDA Fungal Databases, 2024).

در میان بیماری‌های مختلف، بیماری پژمردگی آوندی ناشی از قارچ *Fusarium* spp. یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید نخودفرنگی به شمار می‌رود (Fernandez *et al*., 2022). میزان ارزش اقتصادی محصول نخودفرنگی بر اساس شدت آلودگی ناشی از قارچ *Fusarium* spp. می‌تواند از ۳۰ تا ۴۰ درصد کاهش یابد (Rubiales *et al*., 2015). میزان آلودگی بذرهای نخودفرنگی به قارچ *Fusarium* spp. تا ۱۰ درصد گزارش شده است (Milošević *et al*., 2023). قارچ *Fusarium* spp. ضمن ایجاد پوسیدگی و تغییر رنگ بذر می‌تواند به طور مستقیم و یا غیرمستقیم روی جوانه زنی بذر تأثیر گذار باشد. علاوه بر این، عامل بیماری می‌تواند در تمام مراحل رشد آسیب‌های جدی ایجاد نموده و عملکرد محصول را در

[1] Fabaceae

مزارع کاهش دهد (Miljaković *et al*., 2024). تاثیری که گونه‌های مختلف بذرزاد قارچ *Fusarium* spp. روی خصوصیات جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه‌ی نخودفرنگی ایجاد می‌کند، نامشخص است (Ivic, 2014). بنابراین شناسایی و تعیین اهمیت گونه‌های قارچی بیماری‌زا بذرزاد نخودفرنگی برای انتخاب راهکارهای مدیریتی مناسب ضروری است. قارچ *Fusarium* spp. به عنوان قارچی خاکزاد و بذرزاد به صورت پوده‌رُست و یا به انگل قابلیت زیست را دارند (Blanco and Aveling, 2018). برخی از جدایه‌های این قارچ به‌صورت اندوفیت بخشی یا کل چرخه زندگی خود را در بافت‌های گیاه میزبان بدون بروز علایم می‌گذرانند (Akram *et al*., 2023). عوامل بذرزاد می‌توانند به صورت عمودی از بذر به گیاه نسل بعد منتقل شوند (Nelson, 2018). از تأثیر عوامل بیماری‌زای قارچی بذرزاد روی صفات مرتبط با جوانه‌زنی بذر و در نهایت اهمیت آن‌ها در میزان کیفیت و عملکرد محصول گزارش متعددی ارائه شده است (Wang *et al*., 2022; Al-Askar *et al*., 2014). با وجود اهمیت اقتصادی نخودفرنگی در تولید علوفه‌ی غنی از پروتئین در تغذیه دام، اطلاعات ما در مورد بیماری‌های ناشی از قارچ‌های بذرزاد این گیاه در ایران بسیار محدود است.

بنابراین، هدف از این پژوهش (الف) جداسازی و شناسایی عامل سبزردی و پژمردگی آوندی فوزاریومی در نمونه‌های بذری ارقام مختلف وارداتی و تولید داخل نخودفرنگی علوفه‌ای، (ب) بررسی تأثیر آلودگی بذر روی رشد اولیه‌ی گیاهچه‌ها و برخی از صفات مرتبط با جوانه‌زنی و از جمله شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی، متوسط جوانه‌زنی روزانه و زمان لازم برای جوانه‌زنی، ضریب و سرعت جوانه‌زنی و (ج) ارزیابی شدت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی *Fusarium* spp. جداسازی شده، و (د) ارزیابی میزان بروز و انتقال عامل بیماری از بذر به گیاه نسل بعد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: از نمونه‌های بذری وارداتی ارقام برن[۲]، تاشکند[۳]، آردا[۴]، زرّه[۵] و گاپ پمبسی[۶] و هم‌چنین از بذر ارقام گاپ پمبسی، تاشکند، آردا، مراز[۷]، کرازلی[۸] و المپوس[۹] تولید شده طی سال‌های زراعی ۱۴۰۳-۱۴۰۲ در مزارع استان آذربایجان شرقی منطقه کلیبر براساس دستورالعمل انجمن بین المللی آزمون بذر (Anonymous, 2017) نمونه‌برداری و پس از ثبت مشخصات در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه سلامت بذر موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل شد (شکل ۱ و جدول ۱).

شکل ۱- نمونه‌های بذری ارقام مختلف نخودفرنگی علوفه‌ای

(a) کرازلی، (b) آردا، (c) برن، (d) زرّه، (e) مراز، (f) تاشکند، (g) المپوس و (h) گاپ پمبسی

Figure 1. Seed samples of different forage pea cultivars

(a) Kirazli, (b) Arda, (c) Beren, (d) Zerre, (e) Mraz, (f) Tashkent, (g) Olympus and (h) Gap pembesi

[2]Beren
[3]Tashkent
[4]Arda
[5]Zerre
[6]Gap pembesi
[7]Mraz
[8]Kirazli
[9]Olympus

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی

برای ردیابی آلودگی به عوامل قارچی بذرزاد، تعداد ۴۰۰ عدد بذر (چهار تکرار شامل ۱۰۰ عدد بذر) از هر نمونه پس از ضدعفونی سطحی با محلول رقیق‌شده هیپوکلریت سدیم (حاوی یک درصد کلر فعال) به مدت پنج دقیقه و شستشو با آب مقطر سترون روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز - آگار (Potato Dextrose Agar, Ibresco, Iran) حاوی ۰/۲۵ گرم در لیتر آنتی بیوتیک استرپتومایسین و پنی‌سیلین کشت و در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی نگه‌داری شدند. خالص‌سازی جدایه‌های قارچی با استفاده از روش تک اسپور کردن و یا نوک ریسه روی محیط کشت آب آگار دو درصد (Agar, Ibresco, Iran) انجام شدند (Booth, 1977). جدایه‌های خالص شده برای شناسایی در سطح گونه به محیط کشت‌های برگ میخک - آگار[10] و آگار مصنوعی فقیر از مواد غذایی[11] منتقل شدند. شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی بر اساس خصوصیاتی چون ویژگی‌های ظاهری آن‌ها از جمله شکل ظاهری و رنگ پرگنه، ویژگی‌های رشدی و هم‌چنین ویژگی‌های میکروسکوپی از جمله اندازه و شکل ماکروکنیدیوم، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم و شکل آن و وجود یا عدم وجود کلامیدوسپورها با توجه به ویژگی‌های ظاهری ذکر شده در منابع معتبر (Leslie and Summerell, 2006; Crous *et al*., 2021) و کلیدهای شناسایی معتبر (Booth, 1971; Nelson *et al*., 1983) انجام گرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی

برای تهیه میسلیوم مورد نیاز جهت استخراج DNA، هر جدایه‌ی قارچی در ظروف ارلن مایر محتوی محیط کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی دکستروز (Potato Dextrose Broth, Ibresco, Iran) به مدت ۱۰ روز در داخل دستگاه انکوباتور شیکردار در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. توده‌ی میسلیومی رشد یافته هر جدایه‌ی قارچی پس از جمع‌آوری و شستشو با آب مقطر سترون، آبگیری می‌شوند. برای استخراج DNA از کیت Genomic DNA isolation kit (Pishgam Biotech, Iran) 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. برای تأیید گونه شناسایی‌شده بر اساس مشخصات ریخت شناختی از آغازگرهای اختصاصی این گونه‌ی قارچی (Forward: 5'-CAG CAA AGC ATC AGA CCA CTA TAA CTC-3' و Reverse: 5'-CTT GTC AGT AAC TGG ACG TTG GTA CT-3') استفاده شد (Mulè *et al*., 2003). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ چرخه در مرحله واسرشت ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال ۶۰ ثانیه در ۵۷ درجه سلسیوس و مرحله گسترش در ۵۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۳ میکرولیتر DNA الگو با غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم، ۱۲/۵ میکرولیتر 2X PCR Master Mix (Pishgam, Iran)، 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.

آزمون بیماری‌زایی

برای ارزیابی میزان بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی جداسازی شده، بذر ارقام آردا و گاپ پمبسی که جدایه‌های قارچی از آن جداسازی شده بود مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج پیش آزمون سلامت، بذرهای سالم این ارقام که فاقد هر گونه آلودگی طبیعی بودند، پس از ضدعفونی سطحی، روی کاغذ صافی سترون مرطوب در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی (قطر ۱۰ سانتی‌متر) حاوی بستر

[10]Carnation leaf aga (CLA)

[11]Synthetic nutrient-poor agar (SNA)

کشت غنی شده با پیت ماس، پرلیت و کوکوپیت با نسبت حجمی ۲:۱:۲ منتقل و در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سلسیوس با دوره نوری متناوب (۱۲ ساعته روشنایی - تاریکی) نگه‌داری شد. سوسپانسیون اسپور جدایه‌های *F. oxysporum* با استفاده از روش شرح داده شده توسط توسط مولر و همکاران (Müller *et al*., 2012) در غلظت $۱۰^{۴}$ ×۲/۵ اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ تهیه و برای مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور ارزیابی بیماری‌زایی، جدایه‌های قارچی *F. oxysporum* روی گیاهچه‌ها بر اساس روش شرح داده‌شده توسط شی و همکاران (Shi *et al*., 2016) مایه‌زنی شدند. پس از سه هفته از ظهور گیاهچه‌ها، میزان ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور به بستر کشت افزوده 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 سبزرد برگی و پژمردگی آوندی ظاهر و تا چهل روز پس از آلودگی تا مرگ گیاهچه‌ها ادامه داشت. شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی گیاهچه، بر اساس نسبت میزان سبزرد برگ و پژمردگی آوندی با استفاده از مقیاس ۴-۰ (۰ = بدون علایم بیماری و سالم، ۱ = کم‌تر از ۲۵ درصد دارای علایم سبزرد برگی و پژمردگی آوندی، ۲ = ۵۰-۲۵ درصد دارای علایم سبزرد برگی و پژمردگی آوندی، ۳ = ۷۵-۵۱ درصد دارای علایم پژمردگی آوندی شدید، ۴ = بیش از ۷۵ درصد پژمرده و یا دچار مرگ گیاهچه)، به روش شرح داده شده توسط سولها و همکاران (Hua *et al*., 2019) درجه‌بندی و شاخص بیماری‌زایی جدایه‌ها با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد:

(رابطه ۱) درصد شاخص بیماری‌زایی

$$= \frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{4N} \times ۱۰۰$$

n_0: تعداد گیاهچه‌ها با درجه صفر آلودگی، n_1: تعداد گیاهچه‌ها با درجه یک آلودگی، n_2: تعداد گیاهچه‌ها با درجه دو آلودگی؛ n_3: تعداد گیاهچه‌ها با درجه سه آلودگی؛ n_4: تعداد گیاهچه‌ها با درجه چهار آلودگی؛ N: تعداد کل گیاهچه‌ها. آزمون شامل چهار تکرار (یک‌صد گیاهچه) برای هر جدایه بود و آزمایش حداقل دو بار تکرار شد. در پایان این آزمایش گیاهان از بستر کشت خارج و ضمن بررسی وضعیت علایم بیماری، از آن‌ها کشت مجدد به منظور اثبات اصول کخ انجام گرفت.

ارزیابی آلودگی طبیعی روی برخی شاخص‌های مرتبط با ویژگی‌های جوانه‌زنی و رشد اولیه‌ی گیاهچه‌ها

برای انجام آزمون جوانه‌زنی استاندارد، تعداد ۴۰۰ بذر (چهار تکرار شامل ۱۰۰ عدد بذر) از هر نمونه‌ی بذری به صورت تصادفی انتخاب و در بستر بین دو لایه کاغذ مرطوب درون ظرف پلاستیکی در پوشدار کاشته شده و به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از هشت روز، درصد جوانه‌زنی[12] (رابطه ۲)، میانگین ارتفاع گیاهچه، میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته و میانگین وزن خشک اندازه گیری شد. معیار جوانه زنی خروج ریشه‌چه به اندازه ۲ میلی‌متر و وزن خشک گیاهچه نیز با قرار دادن در آون با دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت و توزین اندازه‌گیری شد. در پایان آزمون جوانه‌زنی استاندارد، تعداد گیاهچه‌های عادی به‌عنوان قابلیت جوانه‌زنی تعیین شد. سپس صفات مرتبط با جوانه‌زنی و رشدی شامل متوسط زمان لازم برای جوانه‌زنی[13] (رابطه ۲)، متوسط جوانه‌زنی روزانه[14] (رابطه ۴)، سرعت جوانه‌زنی روزانه [15] (رابطه ۵) و ضریب سرعت جوانه‌زنی[16] (رابطه ۶) مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین تعداد ۱۰ گیاهچه‌ی عادی به طور تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب و شاخص‌های طولی [17] (رابطه ۷) و وزنی بنیه گیاهچه[18] (رابطه ۸) با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (Miljaković *et al*., 2024):

[12]Germination percentage; GP
[13]Mean times germination; MTG
[14]Mean daily germination; MDG
[15]Daily germination speed; DGS
[16]Coefficient of velocity of germination; CVG
[17]Seedling weight vigor index; SWVI
[18]Seedling length vigor index; SLVI

(رابطه ۲) $$GP=(\frac{n}{N}) \times 100$$

(رابطه ۳) $$MTG = \frac{\sum(nd)}{\sum n}$$

(رابطه ۴) $$MDG = \frac{FGP}{TD}$$

(رابطه ۵) $$DGS = \frac{1}{MDG}$$

(رابطه۶) $$CVG=\frac{G_1 + G_2 + G_3 + \ldots + G_n}{(1 \times G_1) + (2 \times G_2) + (3 \times G_3) + \ldots + (n \times G_n)}$$

(رابطه ۷) $$SLVI=GR \times (SL + RL)$$

(رابطه ۸) $$SWVI=GR \times SW$$

که در آن‌ها به‌ترتب: n: تعداد بذر جوانه زده درطی روز

d: تعداد روزها از ابتدای جوانه‌زنی

$\sum n$: کل تعداد بذرهای جوانه زده

FGP: درصد جوانه‌زنی نهایی

SL: میانگین طول گیاهچه

SW: وزن خشک گیاهچه

G_1: تعداد بذر جوانه زده در روز نخست

G_n: تعداد بذر جوانه زده در روز n

n: تعداد کل بذرهای جوانه زده

N: تعداد کل بذرهای کاشته شده

GR: درصد گیاهچه‌های عادی (قابلیت جوانه‌زنی)

TD: تعداد روز تا رسیدن به حداکثر جوانه‌زنی نهایی

ارزیابی میزان بروز و انتقال بیماری به گیاه نسل بعد

نمونه‌های بذری ارقام مختلف نخودفرنگی علوفه‌ای، برای ارزیابی میزان انتقال بیماری از بذر به گیاه نسل بعد و بروز بیماری بر اساس روش شرح داده شده توسط کوشکونتونا و اوزر (Coşkuntuna and Özer, 2004) مورد کشت قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مزرعه تحقیقاتی موسسه 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 سانتی‌متر 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 بیماری در مزرعه با استفاده از رابطه ۹ محاسبه گردید:

(رابطه ۹) $$\text{درصد بروز بیماری} = \frac{\text{تعداد گیاهان دارای علایم بیماری}}{\text{تعداد کل گیاهان ارزیابی شده}} \times ۱۰۰$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

واکاوی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (version 9.4) SAS 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.

نتایج و بحث

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌های قارچی

در این پژوهش بر اساس مشاهدات انجام شده فقط در چهار نمونه از ۱۱ نمونه‌ی بذری مورد بررسی آلودگی مشاهده شد که این آلودگی‌ها در نمونه‌های بذری ارقام وارداتی آردا و گاپ پمبسی و نمونه‌های بذری ارقام آردا و گاپ پمبسی جمع‌آوری شده از منطقه کلیبر متعلق به استان آذربایجان شرقی آلودگی ردیابی شده است (جدول ۱). آلودگی در نمونه‌های بذری رقم وارداتی گاپ پمبسی با کد TG23 به میزان سه درصد، رقم وارداتی آردا با کد TA18 به میزان یک درصد و هم‌چنین رقم آردا با کد IA38 و گاپ پمبسی با کد IG33 نمونه‌برداری شده از منطقه کلیبر به ترتیب به میزان یک درصد و دو درصد مشاهده شد.

براساس خصوصیات ریخت‌شناختی و میکروسکوپی در مجموع هفت جدایه از نمونه‌های مختلف بذری نخودفرنگی علوفه‌ای مورد بررسی در این پژوهش شامل ارقام وارداتی آردا (۱ جدایه) و گاپ پمبسی (۳ جدایه) و هم‌چنین در نمونه‌های بذری ارقام گاپ پمبسی (۲ جدایه) و آردا (۱ جدایه) جمع‌آوری شده از منطقه کلیبر جداسازی شدند که متعلق به جنس *Fusarium* بودند (جدول ۱). در نمونه‌های بذری ارقام وارداتی برن، تاشکند و زرّه و هم‌چنین در

نمونه‌های بذری ارقام تاشکند، مراز، کرازلی و المپوس تولید شده در منطقه کلیبر متعلق به استان آذربایجان شرقی هیچ‌گونه آلودگی قارچی بذرزادی به قارچ *Fusarium* مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های بذری نخودفرنگی علوفه‌ای بر اساس منشای جغرافیایی و محل نمونه‌برداری، میزان آلودگی بذر به *Fusarium oxysporum*

Table 1. Characteristics of forage pea seed samples based on geographic origin and sampling site, the level of seed infection by *Fusarium oxysporum*

کد نمونه Sample code	نام رقم Cultivar name	منشای جغرافیایی و محل نمونه‌برداری Geographic origin and Sample site	میزان آلودگی بذر به فوزاریوم اکسی اسپوروم (درصد) Level of seed infection by *Fusarium oxysporum* (%)
TT12	تاشکند Tashkent	ترکیه – وارداتی Turkey - Imported	ND*
IT32	تاشکند Tashkent	ترکیه - آذربایجان شرقی (کلیبر) Turkey - East Azerbaijan (Kaleybar)	ND*
TA18	آردا Arda	ترکیه – وارداتی Turkey - Imported	1
IA38	آردا Arda	ترکیه - آذربایجان شرقی (کلیبر) Turkey - East Azerbaijan (Kaleybar)	1
TG23	گاپ پمبسی Gap pembesi	ترکیه – وارداتی Turkey - Imported	3
IG33	گاپ پمبسی Gap pembesi	ترکیه - آذربایجان شرقی (کلیبر) Turkey - East Azerbaijan (Kaleybar)	2
TZ29	زرّه Zerre	ترکیه – وارداتی Turkey - Imported	ND*
TB15	برن Beren	ترکیه – وارداتی Turkey - Imported	ND*
IK36	کرازلی Kirazli	ترکیه - آذربایجان شرقی (کلیبر) Turkey - East Azerbaijan (Kaleybar)	ND*
IO34	المپوس Olympus	ترکیه - آذربایجان شرقی (کلیبر) Turkey - East Azerbaijan (Kaleybar)	ND*
IM37	مراز Mraz	ترکیه - آذربایجان شرقی (کلیبر) Turkey - East Azerbaijan (Kaleybar)	ND*

*ND: Not detected

*ND: ردیابی نشد.

تشخیص گونه‌ی جداسازی شده بر اساس ویژگی‌های ظاهری و میکروسکوپی ذکر شده در منابع و کلیدهای شناسایی معتبر و هم‌چنین تأیید گونه‌ی *F. oxysporum* شناسایی شده بر اساس نتایج به دست آمده از واکاوی مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه انجام شد. مشخصات جدایه‌های گونه‌ی *F. oxysporum* جداسازی شده در جدول ۲ ارائه شده است.

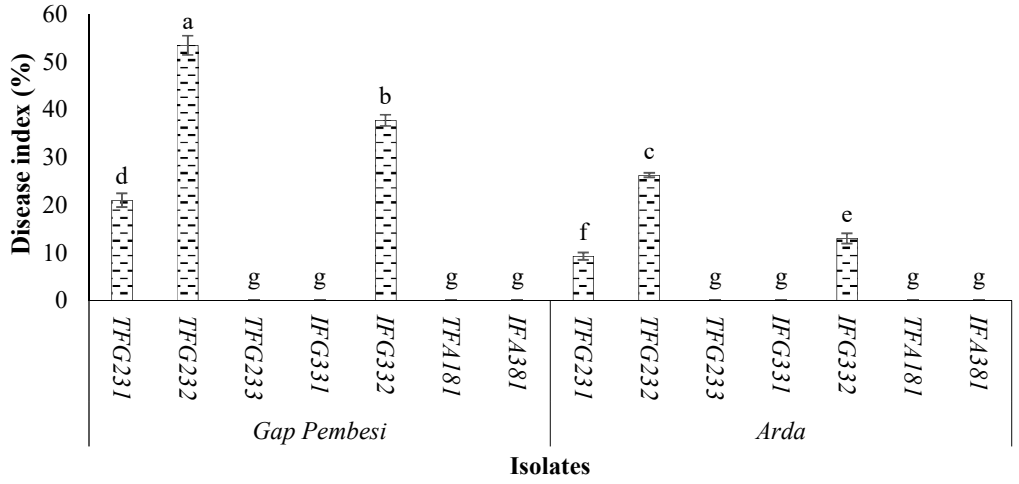
نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی نشان داد که تمامی جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* جداسازی شده از بذر قادر به بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های حاصل از ارقام آردا و گاپ پمبسی نخودفرنگی علوفه‌ای نبودند. نتایج حاصل از ارزیابی میزان بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *F. oxysporum* نشان داد که حدود ۵۷ درصد (۴ جدایه) جدایه‌ها غیربیماری‌زا و ۴۳ درصد (۳ جدایه) جدایه‌های بیماری‌زا و یا کم‌بیماری‌زا بودند که قادر به ایجاد علایم سبزرد برگی و پژمردگی آوندی روی نخودفرنگی علوفه‌ای می‌باشند. آزمون بیماری‌زایی نشان داد که شاخص بیماری برای جدایه‌های بیماری‌زا قارچ *F. oxysporum* روی رقم گاپ پمبسی از ۲/۰۲ ± ۵۳/۵۰ درصد تا ۱/۴۷ ± ۲۱/۰۰ درصد و روی رقم آردا از ۰/۴۸ ± ۲۶/۲۵ درصد تا ۰/۷۵ ± ۹/۲۵ درصد متغیر بود. تفاوت‌های معنی‌داری در میزان بیماری‌زایی جدایه‌های متفاوت *F. oxysporum* روی گیاهچه‌های نخودفرنگی علوفه‌ای ارقام آردا و گاپ پمبسی مشاهده شد (شکل ۲). هم‌چنین بیش‌ترین و کم‌ترین شاخص بیماری جدایه‌های بیماری‌زا قارچ *F. oxysporum* روی گیاهچه‌های ارقام آردا و گاپ پمبسی نخودفرنگی علوفه‌ای به ترتیب مربوط به جدایه‌های TFG232 و TFG231 می‌باشند (شکل ۲).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین برخی شاخص‌های مرتبط با ویژگی‌های جوانه‌زنی در نمونه‌های بذری ارقام مختلف نخودفرنگی علوفه‌ای نشان داد که تفاوت معنی داری از نظر میزان صفات مورد ارزیابی از جمله درصد جوانه‌زنی، قوه نامیه، متوسط زمان لازم برای جوانه‌زنی، متوسط جوانه‌زنی روزانه، سرعت جوانه‌زنی روزانه، ضریب سرعت جوانه‌زنی، درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته،

جدول ۲- ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* جداسازی از نمونه‌های بذری نخودفرنگی علوفه‌ای

Table 2. Morphological characters of *Fusarium oxysporum* isolates isolated from forage pea seed samples

نام جدایه‌ها Name of isolates	رنگ پرگنه Pigmentation	کلامیدوسپور Chlamydospore		میکروکنیدیوم Microconidium			ماکروکنیدیوم Macroconidium		
		موقعیت روی میسلیوم Location in mycelium	اندازه (µm) size (µm)	شکل Shape	اندازه (µm) size (µm)	تعداد دیواره Number of septa	سلول انتهایی Apical cell	سلول پایه Basal cell	اندازه (µm) size (µm)
TFG231	سفید white	انتها یا بینابین Terminal or intercalary تکی یا جفتی Single or pair	7.1±1.5	بیضی شکل Oval shaped	6.2±1.8×2.6±0.3	3	منحنی curved	شکل پا یا پاشنه foot shaped to pointed	33.9±3.1×3.9±0.6
TFG232	سفید تا بنفش کمرنگ white to pale violet	بینابین Intercalary تکی یا جفتی Single or pair	6.5±0.9	بیضی شکل Oval shaped	7.5±2.1×2.9±0.4	3-4	منحنی curved	شکل پا یا پاشنه foot shaped to pointed	38.1±2.5×3.7±0.5
TFG233	سفید تا صورتی تیره white to dark pink	انتها یا بینابین Terminal or intercalary تکی یا جفتی Single or pair	7.3±0.6	شبه بیضی شکل Oval-ellipse shaped	8.1±1.7×2.5±0.4	3	مخروطی Tapered	شکل پا یا پاشنه foot shaped to pointed	37.5±4.2×4.3±0.3
IFG331	سفید تا صورتی تیره white to dark pink	انتها یا بینابین Terminal or intercalary تکی یا جفتی Single or pair	7.9±1.2	بیضی خمیده شکل allantoid-Oval shaped	8.5±2.1×2.5±0.5	3-4	مخروطی Tapered	شکل پا یا پاشنه foot shaped to pointed	38.7±5.5×4.1±0.4
IFG332	سفید تا بنفش white to violet	بینابین Intercalary تکی یا جفتی Single or pair	7.2±0.7	بیضی خمیده شکل allantoid-Oval shaped	8.9±2.8×2.9±0.5	3-4	منحنی curved	شکل پا یا پاشنه foot shaped to pointed	36.9±4.9×3.8±0.3
TFA181	سفید تا بنفش white to violet	انتها یا بینابین Terminal or intercalary تکی Single	7.5±1.3	قلوه ای شکل Kidney shaped	7.2±1.5×1.9±0.3	3	منحنی curved	شکل پا یا پاشنه foot shaped to pointed	37.2±4.8×3.9±0.4
IFA381	سفید تا بنفش کمرنگ white to pale violet	انتها یا بینابین Terminal or intercalary تکی یا جفتی Single or pair	6.6±0.4	شبه بیضی شکل Oval-ellipse shaped	7.7±1.9×3.1±0.3	3-4	منحنی curved	شکل پا یا پاشنه foot shaped to pointed	37.5±4.2×4.2±0.4



شکل ۲- مقایسه‌ی شاخص بیماری‌زایی (میانگین ± خطای استاندارد) جدایه‌های مختلف *Fusarium oxysporum* جداسازی شده روی گیاهچه‌های ارقام آردا و گاپ پمبسی نخودفرنگی 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 *Fusarium oxysporum* isolates isolated on forage pea seedlings of Arda and Gap pembesi cultivars

Means within a column indicated by the same letters were not significantly different according to the least significant difference (LSD) test at the level $P \leq 0.05$.

طول گیاهچه، وزن خشک، شاخص‌های طولی و وزنی بنیه در گیاهچه‌های حاصل وجود داشته و میزان این شاخص‌ها با توجه به رقم و میزان آلودگی متغیر بود (جدول ۳). نتایج درصد جوانه‌زنی نمونه‌های بذری ارقام مختلف نخودفرنگی علوفه‌ای در آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که جوانه‌زنی بذر از ۹۱/۵۰ تا ۹۵/۷۵ درصد و قوه نامیه ز ۹۰/۷۵ تا ۹۵/۵۰ درصد متغیر بود (جدول ۳). میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته و غیرعادی در نمونه‌ها کم‌تر از ۰/۷۵ درصد بود. میانگین طول گیاهچه از ۲۷/۵۰ تا ۳۶/۲۵ سانتی‌متر و هم‌چنین وزن خشک گیاهچه از ۰/۳۵۱ تا ۰/۳۹۹ گرم متغیر بود (جدول ۳). نتایج حاصل از آزمون استاندارد جوانه‌زنی نشان داد که شاخص بنیه گیاهچه از جمله شاخص طولی از ۲۵۱۸/۵۰ تا ۳۴۶۱/۷۵ و شاخص وزنی از ۳۱/۸۳ تا ۳۸/۱۸ متغیر بود (جدول ۳). متوسط زمان لازم برای جوانه‌زنی از ۲/۹۴ تا ۴/۰۷، متوسط جوانه‌زنی روزانه از ۱۲/۴۲ تا ۱۷/۳۰، سرعت جوانه‌زنی روزانه از ۰/۰۵۷ تا ۰/۰۸۰، ضریب سرعت جوانه‌زنی از ۰/۲۳۴ تا ۰/۳۳۹ متغیر بود (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه در نمونه‌های بذری ارقام مختلف نخودفرنگی علوفه‌ای تحت تأثیر آلودگی طبیعی بذرزاد به قارچ *Fusarium oxysporum*

Table 3. Means comparison of germination and vigor indices as affected by natural seed-borne fungal infection with *Fusarium oxysporum* in forage pea seed samples

کد نمونه Sample code	LSIFO	GP	DS	SV	L	SLVI	DW	SWVI	MTG	DGS	MDG	CVG
TT12	ND	94.50 b	0 b	94.50 b	32.75 c	3095.00 c	0.385 c	36.43 c	2.98 h	0.057 f	17.30 a	0.335 a
IT32	ND	94.25 b	0 b	94.25 b	32.25 c	3039.50 c	0.384 c	36.26 c	2.94 h	0.058 f	17.20 a	0.339 a
TA18	1	95.75 a	0.25 b	95.50 a	35.25 b	3366.25 b	0.395 b	37.77 b	3.48 f	0.060 e	16.55 b	0.286 c
IA38	1	95.75 a	0.25 b	95.50 a	35.00 b	3342.25 b	0.395 b	37.75 b	3.48 f	0.061 e	16.45 b	0.287 c
TG23	3	91.50 e	0.75 a	90.75 e	27.75 g	2518.50 g	0.351 h	31.83 g	4.07 a	0.080 a	12.42 e	0.234 g
IG33	2	92.25 de	0 b	92.25 d	28.75 f	2652.25 f	0.353 fg	32.61 f	3.97 b	0.073 b	13.75 d	0.251 f
TZ29	ND	93.25 c	0 b	93.25 c	30.75 d	2867.75 d	0.379 d	35.41 d	3.72 d	0.068 d	14.62 c	0.269 e
TB15	ND	95.50 a	0 b	95.50 a	36.25 a	3461.75 a	0.399 a	38.17 a	3.42 g	0.060 e	16.60 b	0.292 b
IK36	ND	93.00 cd	0.25 b	92.75 cd	28.50 fg	2643.25 f	0.353 g	32.74 f	3.54 e	0.071 c	14.00 d	0.282 d
IO34	ND	92.75 cd	0.25 b	92.50 cd	28.75 f	2659.50 f	0.355 f	32.84 f	3.78 c	0.072 bc	13.83 d	0.264 e
IM37	ND	93.25 c	0 b	93.25 c	29.75 e	2774.00 e	0.366 e	34.15 e	3.38 g	0.061 e	16.35 b	0.295 b
LSD (0.05)	-	0.87	0.48	0.77	0.93	-	0.002	-	0.04	0.001	0.25	0.005

LSIF: میزان آلودگی بذر به *Fusarium oxysporum* (درصد)، GP: درصد جوانه‌زنی، DS: میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته، SV: درصد قوه نامیه، L: میانگین طول گیاهچه (سانتی‌متر)، SLVI: شاخص طولی بنیه گیاهچه، DW: وزن خشک (گرم)، SWVI: شاخص وزنی بنیه گیاهچه، MTG: متوسط زمان لازم برای جوانه‌زنی، DGS: سرعت جوانه‌زنی روزانه، MDG: متوسط جوانه‌زنی روزانه، CVG: ضریب سرعت جوانه‌زنی و ND: ردیابی نشد. اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون حداقل اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌دار داشتند. هر آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد.

LSIF: Level of seed infection by *Fusarium oxysporum* (%), GP: Germination percentage, DS: the average percentage of deformed seedlings, SV: Seed viability, L: the average seedling length (cm), SLVI: seedling length vigor index, DW: dry weight (g), SWVI: seedling weight vigor index, MTG: Mean times germination, DGS: Daily germination speed, MDG: Mean daily germination, CVG: Coefficient of velocity of germination and ND: Not detected. 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.

پس از کشت ۴۰۰ عدد بذر از نمونه‌های بذری مختلف (شامل چهار تکرار ۱۰۰ عددی بذر)، نتایج حاصل از ارزیابی میزان انتقال بیماری از بذر به گیاه نسل بعد نشان داد که فقط در نمونه‌ی بذری رقم وارداتی گاپ پمبسی با کد TG23 تعداد ۳ گیاهچه (از ۳۷۷ گیاهچه شمارش شده) دارای علایم لکه برگی می‌باشند (شکل ۳ و جدول ۴). هم‌چنین هیچ‌گونه علایم بیماری ناشی از قارچ *F. oxysporum* در گیاهچه‌های حاصل از نمونه‌های بذری آلوده رقم وارداتی آردا با کد TA18 و هم‌چنین رقم آردا با کد IA38 جمع‌آوری شده از منطقه کلیبر مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم انتقال آلودگی از بذر به گیاهچه حاصل در نسل بعد می‌باشد (جدول ۴).

میزان بروز بیماری ناشی از قارچ *F. oxysporum* در گیاهچه‌های حاصل از نمونه‌ی بذری رقم وارداتی گاپ پمبسی با کد TG23 به میزان ۱/۳۷ درصد و نمونه‌ی بذری رقم گاپ پمبسی با کد IG33 جمع‌آوری شده از منطقه کلیبر به میزان ۰/۵۴ درصد می‌باشد (جدول ۴).

شکل ۳- بروز بیماری پژمردگی آوندی فورزاریومی در مزرعه و انتقال بیماری از بذر به گیاه حاصل از آن در نسل بعد

Figure 3. Incidence of Fusarium wilt disease in the field and transmission of disease from seed to the resulting plant in the next generation

جدول ۴- مقایسه میزان آلودگی ردیابی شده در نمونه‌های بذری نخودفرنگی علوفه‌ای به قارچ بذرزاد (*Fusarium oxysporum*) با میزان بروز بیماری پژمردگی آوندی فورزاریومی در مزرعه

Table 4. Comparison of the levels of infestation detected in forage pea seed samples to seed-borne fungal (*Fusarium oxysporum*) with the incidence of Fusarium wilt disease in the field

آزمون سلامت بذر Seed health test		ارزیابی مزرعه‌ای Field assessment									
کد نمونه Sample code	میزان آلودگی بذر به فوزاریوم اکسی اسپوروم (درصد) Level of seed infection by *Fusarium oxysporum* (%)	کل گیاهان (تعداد) Total plants (number)					درصد بروز بیماری The percentage of disease incidence (PDI)				
		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
TT12	ND*	96	95	95	94	380	0	0	0	0	0
IT32	ND*	96	96	95	94	381	0	0	0	0	0
TA18	1	95	96	96	95	382	0	0	0	0	0
IA38	1	96	96	96	96	384	0	0	0	0	0
TG23	3	92	91	92	91	366	1.08	1.09	2.17	1.09	1.37
IG33	2	93	92	92	92	369	1.07	0	1.09	0	0.54
TZ29	ND*	93	94	95	93	375	0	0	0	0	0
TB15	ND*	96	95	94	95	380	0	0	0	0	0
IK36	ND*	92	91	92	93	368	0	0	0	0	0
IO34	ND*	93	93	92	93	371	0	0	0	0	0
IM37	ND*	93	94	93	94	374	0	0	0	0	0

*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.

از بذر به گیاه نسل بعد پرداخته شد. نتایج این پژوهش نشان داد که دو نمونه از پنج نمونه وارداتی دارای آلودگی بذری به قارچ .*Fusarium* spp در سطح ۳-۱ درصد بودند. هم‌چنین دو نمونه از شش نمونه‌ی بذر جمع‌آوری شده از مزارع استان آذربایجان شرقی دارای آلودگی بذری به قارچ .*Fusarium* spp در محدوده‌ی ۲-۱ درصد می‌باشد. هیچ‌گونه آلودگی .*Fusarium* spp بذرزادی در نمونه‌های بذری ارقام تاشکند، مراز، کرازلی و المپوس نخودفرنگی علوفه‌ای جمع‌آوری شده از مزارع منطقه کلیبر و هم‌چنین نمونه‌های بذری ارقام وارداتی برن، تاشکند و زرّه ردیابی نشد.

نتایج حاصل از شناسایی نوع و میزان آلودگی نمونه‌های بذری نخودفرنگی علوفه‌ای به قارچ *Fusarium* spp. بذرزاد در این پژوهش نشان داد که در مجموع هفت جدایه‌ی قارچ *Fusarium* spp. جداسازی شده است که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و نتایج به دست آمده از واکاوی مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه متعلق به *F. oxysporum* می‌باشد. نتایج این پژوهش با مشاهدات سایر محققان در خصوص گزارش جداسازی و شناسایی قارچ F.*oxysporum* به عنوان عامل بیماری سبزردی و پژمردگی آوندی نخودفرنگی در صربستان (Milošević *et al*., 2023)، اتیوپی (Ali *et al*., 2021)، هند (Kripalini *et al*., 2019)، مصر (Youssef *et al*., 2018)، آمریکای شمالی (Chittem *et al*., 2015)، کرواسی (Ivic, 2014; Ivic *et al*., 2009)، بلژیک (Cousin, 1997) و هلند (Oyarzun *et al*., 1993) مطابقت دارد. قارچ *Fusarium* spp. به عنوان عامل اصلی بذرزاد بیماری سبزردی، پژمردگی آوندی، پوسیدگی بذر، ریشه، طوقه و گیاهچه‌ی نخودفرنگی گزارش شده است (Fernandez *et al*., 2022). بر اساس نتایج این پژوهش، بیش‌ترین میزان فراوانی جدایه‌های *F. oxysporum* جداسازی شده به ترتیب مربوط به نمونه‌های بذری رقم وارداتی گاپ پمبسی (سه جدایه، ۴۲/۸ درصد)، رقم گاپ پمبسی تولیدی داخل (دو جدایه، ۲۸/۶ درصد)، رقم وارداتی آردا (یک جدایه، ۱۴/۳ درصد) و رقم آردا تولیدی داخل (یک جدایه، ۱۴/۳ درصد) بود. به نظر می‌رسد وجود آلودگی در نمونه‌ی بذری گاپ پمبسی به قارچ بذرزاد را می‌توان به حساسیت رقم و هم‌چنین علت بروز بیماری در مزرعه را به دلیل وجود مایه-ی تلقیح، ضدعفونی بذر با قارچکش نامناسب و وجود شرایط مناسب محیطی نسبت داد. قارچ *F. oxysporum* و *F. solani* به عنوان گونه‌های غالب همراه بذر رقم آراکا نخودفرنگی علوفه‌ای از ترکیه جداسازی و گزارش شده است (Ozgonen and Gulcu, 2011). قارچ *F. oxysporum* به ترتیب به عنوان عامل بیماری زردی و پژمردگی آوندی فوزاریومی در ایران روی میزبان‌های مختلف لگوم‌ها گزارش شده است (Ershad, 2009). این اولین گزارش در مورد جداسازی و شناسایی قارچ *F. oxysporum* در نمونه‌های بذری ارقام مختلف نخودفرنگی علوفه‌ای وارداتی و تولیدشده در مزارع منطقه کلیبر می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ *F. oxysporum* نشان داد که حدود ۴۳ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا و یا کم‌بیماری‌زا و حدود ۵۷ درصد جدایه‌های بیماری‌زا نبودند. بر اساس نتایج حاصل از واکاوی آماری اطلاعات مربوط شاخص بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ *F. oxysporum* مشاهده شد که این جدایه‌های از نظر شاخص بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های ارقام آردا و گاپ پمبسی دارای اختلاف معنی‌داری هستند. مشاهدات این پژوهش با گزارش‌های دیگر محققان در مورد تفاوت بیماری‌زای جدایه‌های مختلف *F. oxysporum* در برهمکنش با گیاهان مختلف از جمله نخودفرنگی (Bani *et al*., 2014)، گوجه‌فرنگی (Yang *et al*., 2024)، سویا (Olszak-Przybyś *et al*., 2023) و اقاقیا (Soleha *et al*., 2022) مطابقت دارد. با توجه به نتایج به دست آمده، بیش‌ترین پیشرفت بیماری در میان تمام جدایه‌های بیماری‌زا و کم‌بیماری‌زا قارچ *F. oxysporum* مربوط به جدایه TFG232 به میزان ۲/۰۲ ± ۵۳/۵۰ درصد روی گیاهچه‌های رقم گاپ پمبسی و به میزان ۰/۴۸ ± ۲۶/۲۵ درصد روی گیاهچه‌های رقم آردا بود. اولین علایم بیماری ۱۰۸ ساعت پس از مایه‌زنی روی گیاهچه‌های رقم گاپ پمبسی و ۱۷۴ پس از مایه‌زنی روی گیاهچه‌های رقم آردا به صورت لکه‌های سبزرد در برگ و پژمردگی آوندی مشاهده شد. میزان شاخص بیماری جدایه‌های *F. oxysporum* روی ارقام گاپ پمبسی و آردا متفاوت است که این امر نشاندهنده واکنش و حساسیت متفاوت ارقام نسبت قارچ عامل بیماری می‌باشد. علایم بیماری ناشی از قارچ *F. oxysporum* در نخودفرنگی معمولاً به صورت زرد شدن برگ‌ها، توقف رشد، پژمردگی آوندی و در نهایت مرگ گیاه همراه است (Blanco and Aveling, 2018)، که با علایم بیماری مشاهده شده از جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* جداسازی شده از بذر روی ارقام آردا و گاپ پمبسی نخودفرنگی علوفه‌ای در این پژوهش مطابقت دارد. جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* مایه‌کوبی شده به صورت مصنوعی از گیاهان بیمار جداسازی شد و اصول کخ تکمیل و ثابت گردید.

با توجه به نتایج به دست آمده، جدایه‌های *F. oxysporum* جداسازی از بذر آردا و هم‌چنین دو جدایه‌ی جداسازی شده از بذر گاپ پمبسی روی گیاهچه‌های ارقام آردا و گاپ پمبسی بیماری‌زا نبودند. نجفی‌نیا و همکاران

(Najafiniya *et al*., 2018) گزارش کردند که میزان بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *F. oxysporum* جداسازی شده از خیار متفاوت بوده و ۳ جدایه از ۴۵ جدایه‌ی قارچ جداسازی شده بیماری‌زا نبود. هم‌چنین میزان شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *F. oxysporum* روی هر رقم مورد مطالعه نیز متفاوت است. جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* جداسازی شده در این پژوهش را بر اساس میزان بیماری‌زایی می‌توان در سه گروه بیماری‌زا، کم‌بیماری‌زا و غیربیماری‌زا دسته‌بندی نمود که با مشاهدات گزارش شده توسط نعیم آبادی و همکاران (Naeim abadi, 2022) در مورد دسته‌بندی میزان بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* روی نخود مطابقت دارد. میزان بروز بیماری در نمونه‌های بذر رقم گاپ پمبسی با کدهای TG23 و IG33 که آلوده به جدایه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا بودن به‌ترتیب در ۱/۳۷ درصد و ۰/۵۴ درصد متغیر می‌باشد. میزان انتقال جدایه‌های قارچی به میزان بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی وابسته نیست (Kaur and Dutta, 2024) که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. ساوت‌وود و همکاران (Southwood *et al*., 2015) گزارش کردند که آلودگی بذرزاد ناشی از قارچ *F. oxysporum* از بذر به گیاه نسل بعد منتقل شده و میزان بروز بیماری ۴/۲ درصد می‌باشد. میزان انتقال قارچ *F. udum* عامل بیماری پژمردگی آوندی نخود کفتری از بذر به گیاه نسل در محدوده‌ی صفر تا ۴/۵ درصد متغیر بود (Haware and Kannaiyan, 1992). هم‌چنین میزان انتقال این بیماری در ارقام مختلف از بذر به گیاه نسل در محدوده‌ی ۲/۷۵ تا ۱۶/۵ درصد متغیر بود (Ashitha *et al*., 2016). بنابراین بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان پیشنهاد نمود که ارتباطی بین میزان آلودگی و بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* با امکان بروز بیماری در گیاه حاصل از نسل بعد وجود دارد.

به نظر می‌رسد جدایه‌های غیربیماری‌زا می‌توانند به عنوان قارچ اندوفیت در بافت‌های سالم گیاه بدون ایجاد علایم ظاهری بیماری، زنده بمانند (Ramesh *et al*., 2021). جدایه‌های پوده‌رُست قارچ *F. oxysporum* به صورت اندوفیت بدون تأثیر روی زندگی میزبان قابلیت زیست را دارند (De Lamo and Takken, 2020). نمونه‌های بذری رقم آردا با کدهای TA18 و IA38 آلوده به جدایه‌های قارچی غیربیماری‌زا می‌باشند، در گیاهچه‌های حاصل از بذر آلوده هیچ‌گونه علایم بیماری مشاهده نشد. اندوفیت‌ها با نفوذ و کلونیزاسیون در بافت‌های داخلی گیاهان، بدون هیچ‌گونه علایم بیماری قادر به زندگی با گیاه میزبان هستند که این مورد از طریق مایه‌کوبی مصنوعی و جداسازی مجدد آن‌ها از گیاهچه‌های ارقام آردا و گاپ پمبسی نخودفرنگی علوفه‌ای ثابت شد. نتایج این پژوهش با مشاهدات موهوراکیه و همکاران (Muhorakeye *et al*., 2024) مطابقت داد. ارزیابی گیاهچه‌های حاصل از بذرهایی که به طور طبیعی آلوده به قارچ بذرزاد *F. oxysporum* بودند نشان داد که جدایه‌های قارچی بیماری‌زا و غیربیماری‌زای قارچ *F. oxysporum* قابلیت انتقال به گیاه نسل بعد را دارند. سایتوو همکاران (Saito *et al*., 2021) گزارش کردند که جدایه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زای قارچ *Fusarium* spp. به صورت عمودی از طریق بذر به گیاه نسل بعدی منتقل شده و قادر به ایجاد و یا عدم ایجاد بیماری در میزبان می‌شوند که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. قارچ بیماری‌زای *F. oxysporum* در طول آلودگی میزبان قادر به ترشح پروتئین‌های افکتوری هستند که محصول مجموعه ژن‌هایی به نام SIX[19] می‌باشند. بر اساس نتایج پژوهش چیزلوفسکی و همکاران (Czislowski *et al*., 2021) این مجموعه‌ای ژنی که نقش مهمی در بیماری‌زایی دارند، در جدایه‌های غیربیماری‌زا *F. oxysporum* شناسایی نشده است. نونیز-کانو و همکاران (Núñez-Cano *et al*., 2023) گزارش کردند که تفاوت معنی داری از نظر شاخص‌های رشدی گیاه برنج تیمار شده با جدایه غیربیماری‌زای قارچ *F. oxysporum* با شاهد وجود ندارد.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین صفات جوانه‌زنی نشان داد که در میان نمونه‌های بذری نخودفرنگی علوفه‌ای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی وجود دارد. با توجه به آنکه نمونه‌های بذری از ارقام مختلف نخودفرنگی 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. اوکوموش و همکاران (Okumuş *et al*., 2024)

[19]Secreted in xylem

گزارش کردند که از نظر میزان جوانه زنی، وزن خشک و تر، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه اختلاف معنی داری در ارقام آردا، تاشکند، اوزکاینک و توره نخودفرنگی علوفه‌ای وجود دارد که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. هم‌چنین تامینجیچ و همکاران (Tamindžić *et al*., 2023) گزارش کردند که اختلاف معنی داری در میزان جوانه‌زنی و شاخص‌های رشد گیاهچه‌های ارقام مختلف نخودفرنگی وجود دارد. کیفیت نمونه‌های بذر نخودفرنگی تولید شده در سیستم‌های بذر رسمی و غیررسمی از نظر خلوص فیزیکی، شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری وجود داشت (Ali *et al*., 2021).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به آنکه در نظام‌های کشاورزی پایدار کیفیت محصول تولیدی به میزان کمیت آن دارای اهمیت است، بررسی سلامت بذر بسیار حائز اهمیت است. آلودگی بذر توسط قارچ بذرزاد بیماری‌زای *F. oxysporum* به عنوان یکی از عوامل بذرزاد می‌تواند روی عملکرد محصول نیز تاثیرگذار باشد. نکته قابل تأمل در این پژوهش آن است که ردیابی قارچ *F. oxysporum* نمی‌تواند تعیین کننده وضعیت کیفیت و سلامت نمونه‌ی بذری باشد زیرا امکان دارد بسیاری از جدایه‌های قارچی جداسازی شده غیربیماری‌زا بوده و تاثیری قابل توجه‌ای روی شاخص‌های کیفی جوانه‌زنی بذر نداشته باشند. بنابراین، تشخیص و تمایز جدایه‌های بیماری‌زا از جدایه‌های غیربیماری‌زا برای جلوگیری از اشتباه و نتایج مثبت کاذب از عدم کیفیت سلامت بذر و هم‌چنین تعیین حدآستانه آلودگی در بذر ضروری است. بررسی‌های انجام شده در این پژوهش نشان داد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع تولید بذر نخودفرنگی علوفه‌ای در کشور از نظر میزان آلودگی به عوامل بیماری‌زای بذرزاد قارچی در سطح قابل قبولی قرار دارند. بنابراین می‌توان با استفاده از کشت بذرهای گواهی شده و ارقام جدید پرمحصول وارداتی به همراه بازرسی و ارزیابی مزارع بذری بر اساس اصول علمی و فنی و رعایت دستورالعمل‌ها کنترل آفات و بیماری‌ها زمینه را برای ارتقای میزان عملکرد محصول و بهبود سطح کیفی بذرهای تولیدی فراهم نمود. پیش‌بینی دقیق میزان بروز بیماری بذرزاد به علت عدم اطلاع از میزان بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی، حساسیت ارقام و تأثیر متفاوت شرایط آب و هوایی به آسانی امکان‌پذیر نیست.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از موسسه 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

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)**

Ali, Y., Mekibib, F. and Bishaw, Z. 2021. Seed Quality Analysis of Field Pea (*Pisum Sativum* L.) from formal and informal sources in Enarj Enawuga and Yilmana Densa districts, West Amhara Region, Ethiopia. International Journal of Agricultural Science and Food Technology, 7(1), 1-13. https://doi.org/10.17352/2455-815X.000081 **(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)**

Ashitha, S.G., Ramappa, H.K., Byre gowda, M. and Gowri, R. 2016. Seed transmissibility of *Fusarium udum* Butler. in Pigeonpea. Journal of Food Legumes, 29(2): 156-160. https://doi.org/10.59797/journaloffoodlegumes.v29i2.535 **(Journal)**

Bani, M., Rispail, N., Evidente, A., Rubiales, D. and Cimmino, A. 2014. Identification of the main toxins isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2 and their relation with isolates' pathogenicity.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62: 2574-2580. https://doi.org/10.1021/jf405530g **(Journal)**

Blanco, R. and Aveling, T.A.S. 2018. Seed-borne *Fusarium* pathogens in agricultural crops. Acta Horticulturae, 1204: 161-170. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1204.21 **(Journal)**

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. CAB International; Kew, Surrey, England, 237 pp. **(Book)**

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

Chittem, K., Mathew, F.M., Gregoire, M., Lamppa, R.S., Chang, Y.W., Markell, S.G., Bradley, C.A., Barasubiye, T., and Goswami, R.S. 2015. Identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with root rots of field pea in North Dakota. European Journal of Plant Pathology, 143: 641-649. https://doi.org/10.1007/s10658-015-0714-8 **(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)**

Cousin, R. 1997. Peas (*Pisum sativum* L.). Field Crops Research, 53: 111-130. https://doi.org/10.1016/s0378-4290(97)00026-9 **(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)**

Czislowski, E., Zeil-Rolfe, I. and Aitken, E.A.B. 2021. Effector profiles of endophytic Fusarium associated with asymptomatic banana (*Musa* sp.) hosts. International Journal of Molecular Sciences, 22: 2508. https://doi.org/10.3390/ijms22052508 **(Journal)**

De Lamo, F.J. and Takken, F.L. 2020. Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance. Frontiers in Plant Science, 11: 37. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00037 **(Journal)**

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

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

Fernandez, M.R., Abdellatif, L., Lokuruge, P., Schellenberg, M.P. and Lupwayi, N.Z. 2022. Root disease and fungal populations in organic crops under different tillage-cropping systems. Crop Science. 62: 1288-1304. https://doi.org/10.1002/csc2.20663 **(Journal)**

Haware, M.P. and Kannaiyan, J. 1992. Seed transmission of *Fusarium udum* in Pigeonpea and its control by seed-treatment fungicides. Seed Science Technology, 20: 597-601. **(Journal)**

Hua, G.K.H., Timper, P., Ji, P., 2019. Meloidogyne incognita intensifies the severity of Fusarium wilt on watermelon caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Canadian Journal of Plant Pathology, 41: 261-269. https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1564939 **(Journal)**

Ivic, D. 2014. Pathogenicity and potential toxigenicity of seed-borne *Fusarium* species on soybean and pea. Journal of Plant Pathology. 96: 541-551. **(Journal)**

Ivic, D., Domijan, A.M., Peraica, M., Milicevic, T. and Cvjetkovic, B. 2009. *Fusarium* spp. contamination of wheat, maize, soybean and pea in Croatia. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 60: 435-442. https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1963 **(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)**

Kripalini, N., Biswas, M.K., Devi, S. and Sinha, B. 2019. Studies on survey of Fusarium wilt of Pea (*Pisum sativum* L.) and its management by native *Trichoderma* isolates and commercial trichoderma under pot condition in manipur. International Journal of Bio-resource and Stress Management, 10: 001-008. https://doi.org/10.23910/IJBSM/2019.10.1.1927 **(Journal)**

Lal, K., Kumar, R., Shrivastav, S.P., Kumar, A. and Singh, Y. 2018. Genetic variability, character association and path analysis of seed yield and its contributing traits in field pea (*Pisum sativum* L. var. *arvense*). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7(6): 1815-1820. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.216 **(Journal)**

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

Miljaković, D., Marinković, J., Tamindžić, G., Milošević, D., Ignjatov, M., Karačić, V. and Jakšić, S. 2024. Bio-Priming with *Bacillus* Isolates suppresses seed infection and improves the germination of garden peas in the presence of *Fusarium* strains. Journal of Fungi, 10(5): 358. https://doi.org/10.3390/jof10050358 **(Journal)**

Milošević, D., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Tamindžić, G., Miljaković, D., Marinković, J. and Červenski, J. 2023. Molecular characterization of *Fusarium proliferatum* and *F. equiseti* of *Pisum sativum* seed. Legume Research, 46: 233-237. https://doi.org/10.18805/LRF-695 **(Journal)**

Moumni, M., Brodal, G. and Romanazzi, G. 2023. Recent innovative seed treatment methods in the management of seedborne pathogens. Food security, 15: 1365-1382. https://doi.org/10.1007/s12571-023-01384-2 **(Journal)**

Muhorakeye, M.C., Namikoye, E.S., Khamis, F.M., Wanjohi, W. and Akutse, K.S. 2024. Biostimulant and antagonistic potential of endophytic fungi against fusarium wilt pathogen of tomato *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Scientific Reports, 14: 15365. https://doi.org/10.1038/s41598-024-66101-1 **(Journal)**

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)**

Naeim abadi, T., Tajick Ghanbary, M.A., Abbasi Moghaddam, Babaeizad, V., Hashemi, M. 2022. Variation among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates causing chickpea root and crown rot from Kurdistan province. Mycologia Iranica, 9: 85-95 https://doi.org/10.22043/MI.2023.359141.1239 **(Journal)**

Najafiniya, M., Shahabi, I. and Rezaee, S. 2018. Study isolates of Fusarium stem and root rot disease of greenhouse cucumber using pathogenicity tests, vegetative compatibility groups and molecular marker. Journal of Plant Protection, 32(1): 49-57 https://doi.org/10.22067/jpp.v32i1.59637 **(Journal)**

Nelson, E.B. 2018. The seed microbiome: origins, interactions, and impacts. Plant and Soil, 422: 7-34. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7 **(Journal)**

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species, An Illustrated Mannual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 pp. **(Book)**

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)**

Okumuş, O., Say, A., Eren, B., Demirel, F., Uzun, S., Yaman, M. and Aydın, A. 2024. Using machine learning algorithms to investigate the impact of temperature treatment and salt stress on four forage peas (*Pisum sativum* var. *arvense* L.). Horticulturae, 10(6): 656. https://doi.org/10.3390/horticulturae10060656 **(Journal)**

Olszak-Przybyś, H., Korbecka-Glinka, G. and Patkowska, E. 2023. Identification and pathogenicity of *Fusarium* isolated from soybean in Poland. Pathogens 12, 1162. https://doi.org/10.3390/pathogens12091162 **(Journal)**

Oyarzun, P., Gerlagh, M. and Hoogland, A.E. 1993. Pathogenic fungi involved in root rot of peas in the Netherlands and their physiological specialization. Netherlands Journal of Plant Pathology, 99: 23-33. https://doi.org/10.1007/BF01974782 **(Journal)**

Ozgonen, H. and Gulcu, M. 2011. Determination of mycoflora of pea (*Pisum sativum*) seeds and the effects of *Rhizobium leguminosorum* on fungal pathogens of peas. African Journal of Biotechnology, 10(33): 6235-6240. https://doi.org/10.5897/AJB10.2691 **(Journal)**

Ozyazici, M.A. and Acikbas, S. 2021. Forage pea (*Pisum sativum* ssp. *arvense* (L.) Poir.). In: Kökten, K. and Seydoşoğlu, S. (Eds.) Legumes processing and potential. Publisher: Iksad Publications, Turkey. pp: 73-100.

Ramesh, N.K., Rezaee, S., Naeimi, S. and Fotouhifar, K. 2021. Evaluation of rice fungal endophytes for biological control of blast disease. BioControl in Plant Protection, 8(2): 1-17. https://doi.org/10.22092/bcpp.2021.124382 **(Journal)**

Rubiales, D., Fondevilla, S., Chen, W., Gentzbittel, L., Higgins, T.J., Castillejo, M.A,. Singh, K.B. and Rispail, N., 2015. Achievements and challenges in legume breeding for pest and disease resistance. Critical Reviews in Plant Sciences. 34, 195-236. https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898445 **(Journal)**

Saito, H., Sasaki, M., Nonaka, Y., Tanaka, J., Tokunaga, T., Kato, A., Thuy, T.T.T., Vang, L.V., Tuong, L.M., Kanematsu, S., Suzuki, T., Kurauchi, K., Fujita, N., Teraoka, T., Komatsu, K. and Arie, T. 2021. Spray application of nonpathogenic fusaria onto rice flowers controls bakanae disease (caused by *Fusarium fujikuroi*) in the next plant generation. Applied and Environmental Microbiology, 87: e01959-20. https://doi.org/10.1128/AEM.01959-20 **(Journal)**

Selcuk, M., Oksuz, L. and Basaran, P. 2008. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillum* spp. by cold plasma treatment. Bioresource Technology, 99: 5104-5109. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.076 **(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)**

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)**

Southwood, M.J., Viljoen, A. and McLeod, A. 2015. Inoculum sources of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* on onion in the Western Cape province of South Africa. Crop Protection, 75: 88-95. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.05.014. **(Journal)**

Tamindžić, G., Azizbekian, S., Miljaković, D., Turan, J., Nikolić, Z., Ignjatov, M., Milošević, D., and Vasiljević, S. 2023. Comprehensive metal-based nanopriming for improving seed germination and initial growth of field pea (*Pisum sativum* L.). Agronomy, 13(12): 2932. https://doi.org/10.3390/agronomy13122932 **(Journal)**

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

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)**

Williamson-Benavides, B.A., Sharpe, R.M., Nelson, G., Bodah, E.T., Porter, L.D. and Dhingra, A. 2020. Identification of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Fsp) Responsive Genes in *Pisum sativum*. Frontiers in Genetics. 11: 950. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00950 **(Journal)**

Yang, Y., Wang, Y., Gao, J., Shi, Z., Chen, W., Huangfu, H., Li, Z. and Liu, Y. 2024. Characterisation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in infected tomatoes in Inner Mongolia, China. Journal of Fungi, 10: 622. https//:doi.org/10.3390/jof10090622 **(Journal)**

Youssef, M.A., Aly, A., Tohamy, M. and Ghonim, M. 2018. Studies on fungi associated with pea seeds and their effect on germination and some seed characters. Zagazig Journal of Agricultural Research, 45(4): 1291-1308. https://doi.org/10.21608/zjar.2018.48574 **(Journal)**

Zakaria, L. 2023. *Fusarium* species associated with diseases of major tropical fruit crops. Horticulturae, 9: 322. https://doi.org/10.3390/horticulturae9030322 **(Journal)**

Assessment of quality indicators of germination and early growth of forage pea seedling in response to the fungus causing Fusarium vascular wilt disease

Nima Khaledi[1*], Mohamad Rahmani[2], Farshid Hassani[3], Leila Zare[4]

Received: December 21, 2024 Accepted: April 21, 2025

Abstract

Seeds infection by *Fusarium* spp. fungus is one of the most important threats to seed quality and yield of agricultural crops, including forage pea. The aim of this research was to identify the seed-borne fungal agents of Fusarium vascular wilt from forage pea seed samples, to evaluate the effect of naturally infected seeds on some traits related to seed germination and early seedlings growth, and also investigate the process of infection transmission and the disease incidence in the next generation plant. In order to diagnose infection, from seed of different forage pea cultivars imported and produced in fields of the Kaleybar region of East Azerbaijan province were sampled according to the International Seed Testing Association rules (ISTA). Fungal isolates were identified based on morphological characteristics and species-specific primers. In total, seven fungal isolates were identified based on morphological characteristics and species-specific primers belonging to *Fusarium oxysporum*. The disease index level by pathogenic and low pathogenic isolates on forage pea seedlings were varied ranged from 53.50 ± 2.02% to 25.9 ± 0.75%. The results of the study of the infection transmission rate caused by the fungus *F. oxysporum* from seed to the next generation plant showed that the incidence of Fusarium vascular wilt disease were varied ranged from 0 and 2.17%. The results of this research showed that accurate prediction of the incidence of seed-borne disease is not easily possible due to lack of information about the pathogenicity level of fungal isolates and different levels of sensitivity of cultivars. The presence or absence of infection in the seed cannot determine the level of seed quality and seedlings health of forage pea, but rather it is the level of pathogenicity that affects the traits related to germination characteristics and early seedlings growth.

Keywords: Disease incidence; Pathogenicity; Vascular wilt; Fusarium; Disease index; Identification

How to cite this article

Khaledi, N., Rahmani, M., Hassani, F. and Zare, L. 2025. Assessment of quality indicators of germination and early growth of forage pea seedling in response to the fungus causing Fusarium vascular wilt disease. Iranian Journal of Seed Science and Research, 12(1): 27-43. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2025.8803

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. Researcher Associate Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. farshid.shz@gmail.com
4. Researcher, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. zare_l@yahoo.com
*Corresponding author: n_khaledi@areeo.ac.ir