تنــوع بیماری‌زایی قارچ *Didymella rabiei* عامل بیمــاری برق‌زدگی نخــود در استان کرمانشاه

Pathogenic variability of *Didymella rabiei* the agent of ascochyta blight of chickpea in Kermanshah province

الهه پایمرد[۱]، محمد ترابی[۲] و داریوش شهریاری[۳]

دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۲۰

چکیده

بیماری برق‌زدگی نخود در اثر قارچ *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.، مهم‌ترین بیماری نخود معمولی در دنیا و ایران می‌باشد که در شرایط مساعد آب و هوایی سبب خسارت‌های هنگفتی به مزارع نخود می‌گردد. آگاهی از تنوع ژنتیکی و نژادهای عامل بیماری در هر منطقه برای دستیابی به ارقام مقاوم ضروری است. در این تحقیق نژادهای فیـزیولـوژیک ۲۸جـدایـه *A. rabiei* که در سال‌های ۹۳-۱۳۹۱ از پنـج ناحیـه استـان کرمانشاه جمـع‌آوری و خالص‌سازی شـده بودند، با استفـاده ازهفـت رقـم افتـراقـی نخـود (ILC-72، ILC-1929، ILC-194، ICC-3996، ILC-5928، ILC-1929 و ILC-202) تعیین شد. تمام جدایه‌ها در شش نژاد قیزیولوژیک طبقه‌بندی شدند. از کل جدایه‌های مطالعه شده در این بررسی هفت جدایه (۲۵٪) متعلق به نژاد ۱، پنج جدایه (۱۷/۸٪) متعلق به نژاد ۲، هفت جدایه (۲۵٪) متعلق به نژاد ۳، چهار جدایه (۱۴/۴٪) متعلق به نژاد ۴، دو جدایه (۷/۲٪) متعلق به نژاد ۵ و سه جدایه (۱۰/۶٪) متعلق به نژاد ۶ بودند. نژادهای۱، ۲، ۳ و ۴ با ۲۳جدایه (۸۲/۱٪) در تمامی نواحی استان پراکنده بودند. در حالی که نژاد ۶ با قدرت بیماری‌زایی بالا فقط در یک ناحیه کرمانشاه (سرارود) مشاهده شد. در بررسی خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌ها روی محیط CSA(Chickpea Sucrose Agar)، تفاوت‌های مشخصی در قطر، رنگ و شکل کلنی، تراکم پیکنیدیوم و اندازه پیکنیدیوم جدایه‌ها وجود داشت ولی از نظر اندازه پیکنیدیوسپور اختلافی دیده نشد.

واژگان کلیدی: بیماری سوختگی اسکوکیتائی، نخود، نژاد، تنوع، ارقام افتراقی.

۱ و ۲- به ترتیب دانشجـوی سابق کارشنـاسی ارشد و استاد، دانشگاه آزاد اسـلامی، واحـد ورامین-پیشوا، دانشکده کشـاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین

۳- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، ورامین

نویسنده مسئول مکاتبات: m_torabi28@yahoo.com

مقدمه

سوختـگی اسکوکیتائی نخـود در برخی سال‌ها با مسـاعد شدن رطـوبت و حـرارت ، قادر است زیان‌های جبـران‌ناپذیری به کشاورزان وارد کند. یکی از موثرترین روش‌های کنترل بیماری استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. هرچند ارقام با مقاومت طولانی مدت بسیار نادر است، اما استفاده از ارقام مقاوم نخود، همچنان اقتصادی‌ترین و بهترین شیوه در استراتژی مدیریت کنترل این بیماری محسوب می‌گردد (Peever *et al*., 2004). اصلاح ارقام مقاوم نخود علیه بیماری برق‌زدگی نخود به واسطه تغییرات در بیماری‌زایی *A. rabiei* بسیار مشکل است (Singh, 1990). بدین جهت ابتدا بایستی شناخت دقیقی از تنوع ژنتیکی بیمارگر، بیوتیپ‌ها و نژادهای آن در مناطق آلوده پیدا نمود. سپس با شناسـائی نژادهای غالب، ارقـام مختلف را از نظـر مقـاومت به بیماری ارزیابی نمود و رقـم مناسب هر منطقه را معرفـی کـرد. تنـوع در بیمـاری‌زائی *A. rabiei* اولیـن بار در سـال ۱۹۶۹ از هنـد گـزارش شـده است (Katiyar and Sood, 1985) و سپس ویروگروال (Vir and Grewal, 1974) دو نژاد (نژاد ۱ و ۲) و یک بیوتیپ از نژاد ۲ را در هندگزارش کردند. ردی و کبابه (Reddy and Kabbabeh, 1985) شش نژاد فیزیولوژیک *A. rabiei* از سوریه و لبنان را با استفاده از شش لاین افتراقی نخود گزارش کردند. جان و وایز (Jan and Wiese, 1991) یازده پاتوتیپ *A. rabiei* در مناطق کشت نخود در امریکا را شناسایی نمودند.

ردی و سینگ (Reddy and Singh, 1993) با استـفـاده از سـه لاین افتـراقی شش نژاد در سـوریه را گـزارش کـردند و یودوپـا و ویـگانـد (Udupa and Weigand, 1998) جدایه‌های *A. rabiei* را براساس قدرت تهـاجم به سه بیوتیپ I، II و III طبقه‌بندی کرد. ناواس کورتس و همـکاران (Navas-cortes *et al*., 1998) یازده پاتوتیپ در هند، پاکستان، اسپانیا و امریکا شناسایی کردند. چونگو و همکاران (Chongo *et al*., 2004) چهارده پاتوتیپ در کانادا را گزارش کردند. از شانزده جدایه به دست آمده از منطقه شمال غربی الجزیره با استفاده از هفت رقم افتراقی نخود سه پاتوتیپ و شش نژاد فیزیولوژیک براساس قدرت تهاجم بیمارگر شناسایی شدند (Benzohra *et al*., 2011). تورکان و دولر (Turkkan and Dolar, 2009) از ۶۴ جدایه *A. rabiei* به دست آمده از پنـج ناحیه ترکیـه با استفـاده از هفت رقم افتراقی، شش نژاد فیزیولوژیک و سه بیوتیپ براساس قدرت تهاجم جدایه‌ها شناسایی کردند. در این بررسی پاتوتیپ I و III هر کدام به ترتیب با ۳۶ و ۲۳ جدایه در پنج ناحیه ترکیه شامل مدیترانه، آگان، جنوب شرقی آناتولی، آناتولی مرکزی و ناحیه دریای سیاه ولی پاتوتیپ II با تعـداد سه جـدایه فقط در مدیترانه و ناحیـه دریای سیاه پیـدا شدند. شهریاری و ایزدیار (۱۳۷۹) اختلاف بیماری‌زای جدایه‌های مختلف *A. rabiei* را روی چهار رقم بیونیج، جم، هاشم و ILC-482 گزارش کردند. گروهی دیگر از محققین دوازده گروه بیماری‌زا از استان کرمانشاه گزارش نمودند (یونسی و همکاران، ۱۳۸۲). در سال ۱۳۸۳، چهار گروه بیماری‌زا روی ده رقم افتراقی نخود از استان فارس گزارش گردید (محمودی و بنی‌هاشمی، ۱۳۸۳). بررسی‌های انجـام شده روی سی جـدایه از پنـج استان غرب کشـور از جملـه کرمانشـاه شانزده گروه بیماری‌زا در قالب شـش نژاد فیـزیـولوژیک معـرفی شدند (غیائی و همـکاران، ۱۳۹۰). شکل جنسـی این قارچ *Didymella rabiei* (Kovatsch) در آسکومیست‌های هتروتالیک قرار دارد که برای تولید جنسی نیاز به جفت سازگار (MAT-1 و MAT-2) دارد که در تمام مراحل کشت نخود وجود دارد (Kaiser, 1997). وجود مرحله جنسی در سیکل زندگی قارچ سبب تولید جمعیت‌های هتروزیگوت و در نتیجه ترکیبات جدیدی با ژن‌های ویرولانت می‌گردد که منجـر به ایجـاد بیوتیپ‌های جـدیدی از *A. rabiei* می‌شود (Basandrai *et al*., 2005). کورشـی و عالـم (Qureshi and Alam., 1984) با مطالعه اثر متقابل بین هشت رقم افتراقی و هشت جدایه از پاکستان پنج گروه بیماری‌زا تعیین نمودند. چن و همکاران (Chen *et al*., 2004) با انجام آزمایش‌هایی روی ۴۴ جدایه قارچ *A. rabiei* و ۴۸ لاین نخود (شامل ۳۲ لاین افتراقی) اثبات کردند که نژادهای یک تا پنج می‌توانند متعلق به یک پاتوتیپ اصلی (پاتوتیپ I) و نژاد شش به طور منفرد متعلق به پاتوتیپ دیگری (پاتوتیپ II) بر مبنای شدت آلودگی و فاکتور درصد برگ آلوده باشند. به علاوه آن‌ها نشان دادند که مکانیسم مقاومت برای پاتوتیپ I به صورت ژن‌های اصلی و برای پاتوتیپ II به صـورت ژن‌های خـرد با اثرهای افزایشـی است. اخیـراً در پاکستـان بیماری‌زائی ده جـدایه قارچ *A. rabiei* را روی ۱۹ رقم نخود بررسی و بر اساس نتایج این

تحقیق، رقم Venhar مقاومت بالایی نسبت به اکثر جدایه‌ها نشان داد (Rashad Ali *et al.*, 2009). در سال ۱۳۸۷به منظور پی بردن به وقوع پاتوتیپ‌های مختلف از دو سری ارقام افتراقی نخود رایج در جهان استفاده شد، نتایج بررسی مذکور نشان داد که پاتوتیپ I در سرارود، گرگان، ایلام و گچساران، پاتوتیپ III در کلیبر و پاتوتیپ II در ایلام و گچساران به تناوب در سال‌های مختلف تظاهر می‌یابند (پورعلی بابا و همکاران، ۱۳۸۷). اولین گزارش از مقاومت به سوختگی اسکوکیتایی در سال ۱۹۳۱ در منابع مقاومت نخود توسط سینک و همکاران دیده شد (Singh *et al.*, 1984). در ایکاردا (ICARDA) بیش از ۱۳۰۰ ژرم پلاسم نسبت به بیماری برق‌زدگی نخود غربال شدند و تنها چند لاین مقاوم شناسایی شدند (Reddy and Singh, 1984). در یک ارزیابی بین المللی در لاین‌های مقاوم نخود واکنش‌های متفاوتی در نواحی مختلف دیده شد. تحقیقات سینک تنوع بیمارگر را در کشورهای مختلف اثبات می‌کند (Singh *et al*, 1981). با استناد به منابع ذکر شده داشتن اطلاعات به روز در مورد پاتوتیپ‌ها و نژادهای غالب هر منطقه ضروری است بنابراین لازم است در مناطق آلوده به این بیماری در ایران نیز هر چند سال یک بار الگوی پاتو تیپ‌ها یا نژادها در مناطق آلوده بررسی شوند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، کشت، خالص‌سازی و نگهداری نمونه‌ها

نمونه‌های ساقه، شاخه، برگ و غلاف آلوده گیاه نخود از پنج ناحیه استان کرمانشاه، جمع‌آوری گردید. پس از ضدعفونی سطحی قطعات آلوده در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، به مدت یک الی دو دقیقه، ضدعفونی گردیدند ، تعداد چهار تا پنج قطعه از هر نمونه درتشتک پتری حاوی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت و در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد و دوره تناوب ۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی نگهداری گردید. پس از ۱۴ روز جدایه‌های رشد یافته، به روش تک اسپور خالص‌سازی و به ظروف پتری حاوی محیط آب-آگار (WA) منتقل گردیدند. تعداد ۲۸ جدایه خالص شده جهت مطالعات بیش‌تر در محیط کشت مورب حاوی WA، در شرایط تاریکی و دمای پنج درجه سلسیوس نگهداری شدند (غیائی وهمکاران، ۱۳۹۰).

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی جدا یه‌ها

از کشت هفت روزه جدایه‌ها دیسک‌هائی به قطر پنج میلی‌متر با چوب پنبه سوراخ‌کن تهیه گردید و در وسط تشتک پتری حاوی محیط CSA (Chickpea Sucrose Agar)، قرار داده شدند. برای هر جدایه سه تکرار (سه تشتک پتری) در نظر گرفته شد و در حرارت ۲۲-۲۱ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت نور قرار داده شدند. قطر کلنی جدایه‌ها بعد از سه هفته با خط‌کش اندازه‌گیری شدند و همچنین شکل و رنگ کلنی ثبت گردید. بعد از ظهور پیکنیدیوم در شرایط حرارتی و نور ذکر شده اقدام به اندازه‌گیری طول و عرض پیکنیدیوم (۲۵ شمارش) و طول و عرض پیکنیدیوسپور (۱۰۰ شمارش) با استفاده از عدسی مدرج گردید. برای تعیین تراکم پیکنیدیوم اسلاید میکروسکوپی از کشت ۱۴ روزه قارچ تهیه شده و در میدان دید لنز ۱۰x میکروسکوپ Olympus CH2 در پنج تکرار شمارش شدند و در چهار گروه با تراکم خیلی زیاد (++++)، زیاد (+++)، متوسط (++) وکم (+) طبقه‌بندی شدند (Basandrai *et al.*, 2005). برای صفات کمی مثل قطر کلنی، طول و عرض پیکنید و پیکنیدسپور، تجزیه واریانس با نرم‌افزار SPSS انجام شد و میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح یک درصد مقایسه شدند.

بررسی تفاوت‌های بیماری‌زائی جدایه‌های قارچ *A. rabiei*

خصوصیات بیماری‌زائی جدایه‌های *A. rabiei* به روش مایه‌زنی روی هفت رقم افتراقی نخود (ILC-72، ILC-1929، ILC-202، ILC-5928، ILC-194، PCH15 و ICC-3996) تهیه شده از کلکسیون رژم پلاسم ICARDA و ICRISAT انجام شد. در این آزمایش از هر رقم نخود، بذرهائی با اندازه مشابه در گلدان حاوی ماسه کشت شدند. بعد از ظهور گیاه از هر رقم چهار گیاهچه با اندازه یکسان در گلدان‌هائی با قطر دهانه ۱۱ سانتی‌متر حاوی مخلوط

خاک، ماسه و کود (۱:۱: ۰/۵) منتقل (نشاءکاری) شدند. گلدان‌ها در دمای $^{\circ}$C ۲±۲۲ با ۱۲ ساعت نور برای ۱۴ روز نگهداری شدند. این آزمایش در سه تکرار صورت گرفت. همزمان از حاشیه کشت جدایه‌های *A. rabiei* به دست آمده از مناطق مختلف استان (۲۸ جدایه) قطعاتی به قطر ۵ میلی‌متر جدا و در لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته ، تکان داده شد تا سوسپانسیون یکنواخت از جدایه‌های مذکور به دست آید. سپس مقدار یک میلی‌لیتر سوسپانسیون در سطح تشتک پتری حاوی محیط کشت CSA پخش گردید و به مدت ۱۴ روز در دمای $^{\circ}$C ۱±۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از مدت مذکور پیکنیدیوم‌های قارچ، به فراوانی روی محیط کشت به صورت یک لایه سیاه رنگ تشکیل گردید. سوسپانسیون اسپور قارچ با افزودن آب مقطر سترون و مالش آرام اسکالپل سترون برروی سطح محیط کشت تهیه شد و با استفاده از لام گلبول شمار (Hemacytometer) سوسپانسیون با رقت ۵×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد. سری گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های دو هفته‌ای مجموعه ارقام افتراقی نخود با استفاده از پاشش دستی سوسپانسیون هر یک از جدایه‌های قارچ به طور یکنواخت تا مرحله ریزش اولین قطره از سطح برگ (run-off) اسپورپاشی شد. پس از اسپورپاشی گلدان‌ها در محفظه پلاستیکی در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت نور و رطوبت نسبی ٪۱۰۰-۹۵ قرار داده شدند (Turkkan and Dolar, 2009).

ارزیابی واکنش ارقام افتراقی نخود مایه‌زنی شده با جدایه‌های *A. rabiei*

بررسی واکنش هفت رقم افتراقی نخود مقابل ۲۸ جدایه قارچ *A. rabiei*، ۱۴ روز پس از مایه‌زنی گیاهچه‌ها، هنگامی‌که ۹۰ درصد گیاهچه‌های رقم حساس (ILC-1929) مرگ کامل را نشان دادند، صورت گرفت (جدول ۱). ارزیابی شدت بیماری براساس تیپ‌های آلودگی یک تا نه (Reddy and Singh, 1984) اصلاح شده توسط بنزوهارا و همکاران ثبت گردید (Benzohara *et al*., 2011).

جـدول ۱- تیـپ‌های آلـودگـی برای ارزیـابـی واکـنش نخـود در مقابل جـدایه‌های مختـلف قـارچ *Ascochyta rabiei* (Reddy and Singh, 1984)

Table 1. Infection types used for assessment of chickpea response against *Ascochyta rabiei* (Reddy and Singh, 1984)

تیپ آلودگی Infection type	علائم	Symptoms
1	هیچ گونه لکه‌ای روی گیاه دیده نمی‌شود.	No lesion is visible on the whole plants.
3	لکه‌ها واضح یا در کم‌تر از ۱۰٪ گیاهان، روی ساقه نیست	Visible lesions on less than 10% of the plants, the stems are not reached.
5	لکه‌ها در ۲۵٪ از گیاهان با تخریب تقریبا ۱۰٪ ساقه‌ها	Lesions on 25% of the plants, with damage on approximately 10% of the stems.
7	لکه‌ها روی تمام گیاهان، تقریبا در ۵۰٪ ساقه‌ها است.در نتیجه مرگ گیاهان به واسطه تخریب شدید	Lesions on all the plants, approximately 50% of the stems are reached, which results in the death of certain plants because of serious damage.
9	لکه در تمام گیاه منتشر شده و به بیش از ۵۰٪ از ساقه رسیده و مرگ اکثریت گیاهان	Lesion diffused on all the plants, the stems are reached in proportions higher than 50% with the death of the majority of the plants.

گروه‌بندی بیماری‌زائی جدایه‌ها

واکنش قابل مشاهده میزبان– عامل بیماری براساس تیپ آلودگی پنج نقطه‌ای (۹-۱) پیشنهاد شده توسط (Turkkan and Dolar, 2009) انجام شد. در این شیوه تیپ‌های آلودگی ۱ تا ۴/۹ به عنوان مقاوم (R) و تیپ‌های ۵ تا ۹ به عنوان حساس (S) در نظر گرفته شد و در نهایت پس از تطبیق نتایج با الگوی تعیین نژاد *A.rabiei* پیشنهاد شده توسط (Reddy and Kabbeh, 1985) نسبت به شناسایی نژادهای فیزیولوژیک جدایه‌ها اقدام گردید.

تجزیه خوشه‌ای و خوشه‌بندی جدایه‌ها

بدین منظور واکنش ۲۸ جدایه *A. rabiei* روی هفت رقم افتراقی نخود در مرحله گیاهچه به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام و دندروگرام مربوط به روش Ward با محاسبه مربع فاصله اقلیدسی به عنوان معیار تشابه رسم شدند. تبدیل داده‌های کیفی به کمی برای تجزیه آماری و کلاستربندی بشرح ذیل انجام شد. داده‌های شاخص بیماری با اعمال ضرایب تصحیح جهت نرم افزار SPSS مورد بهره‌برداری قرار گرفتند.

برای تیپ آلودگی R ضریب یک و برای تیپ آلودگی S ضریب صفر در نظر گرفته شد و با حاصل ضرب این ضرایب در شاخص بیماری برای هر واکنش عددی ثابت حاصل شد که از آن در محاسبات تجزیه خوشه‌ای استفاده شد.

نتایج

مشخصات مناطق نمونه‌برداری وخصوصیات مورفولوژیک جدایه‌ها

طی دو بازدید از مزارع نخودکاری استان کرمانشاه در ماه‌های اردیبهشت و خرداد درپنج ناحیه با فاصله حداقل ۱۵ کیلومتر جمعا از ۲۸ مزرعه آلوده نخود از شاخه و ساقه‌های دارای علایم بیماری نمونه‌برداری به عمل آمد و در جدول شامل محل جمع‌آوری و تاریخ با کد KR ثبت گردید (جدول ۲). بررسی خصوصیات رشدی جدایه‌ها و ابعاد پیکنیدیوم و پیکنیدیوسپور روی محیط CSA در طـول سه هفتـه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد نشان داد که، جدایه‌ها از نظر اندازه کلنی (رشد شعاعی کلنی) از۲۸/۳ میلی‌متر در جدایه KR46 تا ۶۴/۳ میلی‌متر در جدایه KR32 متفاوت بودند.

انواع رنگ کلنی شامل خاکستری و سبز با حاشیه روشن، کاملا تیره، سبز روشن، سبز تیره، قهوه‌ای روشن با حاشیه روشن و تیره مشاهده گردید و از نظر تراکم پیکنیدیوم نیز از تراکم خیلی زیاد با پنج جدایه (۱۷/۸٪)، تراکم زیاد با ده جدایه (۳۵/۶٪)، تراکم متوسط با نه جدایه (۳۲/۱٪) و تراکم کم با چهار جدایه (۱۴/۴٪)، جدایه‌ها با هم اختلاف داشتند و همچنین ازنظر اندازه پیکنیدیوم هم از ۱۸۹×۱۶۴/۷ تا ۱۷۷/۳ × ۳۲۳/۳ میکرومتر با هم اختلاف داشتند، ولی از نظر طول و عرض پیکنیدیوسپور اختلاف دیده نشد و اغلب مشابه بودند (جدول ۳).

واکنش ارقام افتراقی نخود نسبت به جدایه‌های *A. rabiei*

علائم بیماری یک هفته بعد از مایه‌زنی در گیاهچه‌های رقم حساس ILC-1929 ظاهر شد و یادداشت‌برداری از اثر متقابل هفت رقم افتراقی نخود با ۲۸ جدایه *A. rabiei* منجر به تشکیل شش نژاد فیزیولوژیک *A. rabiei* گردید (جدول ۴). نژادهای ۱و ۳ با چهارده جدایه (۵۰٪) بیش‌ترین فراوانی و پراکنش را داشت و سپس نژادهای ۲ و۴ با نه جدایه (۳۲/۱٪) و نژادهای ۶ و ۵ به ترتیب با تعداد سه جدایه (۱۰/۶٪) و دو جدایه (۷/۲٪)کم‌ترین جمعیت و فراوانی در استان را داشتند. در این بررسی مشخص شد نژاد ۶ که با کد KR14، KR20 و KR29 شناخته شده است، در منطقه سرارود کرمانشاه در ناحیه محدودی مشاهده و در دیگر نواحی استان کرمانشاه دیده نشد. نژادهای ۱،۲ و ۳ با فراوانی ۲۳ جدایه (۶۷/۸٪)، پراکنش وسیعی در استان کرمانشاه داشتند (جدول‌های ۴ و ۵).

جدول ۲– نام، سال و محل جمع‌آوری جدایه‌های *Ascochyta rabiei* در استان کرمانشاه

Table 2. Name, year and collection sites of *Ascochyta rabiei* isolates in Kermanshah province

نام جدایه Isolate name	شهرستان City		سال Year
KR3	Sare pole zahab	سرپل ذهاب	2014
KR4	Mian darband	میان دربند	2012
KR5	Kermanshah	کرمانشاه	2012
KR7	Shademan	شادمان	2012
KR8	Kermanshah	کرمانشاه	2012
KR9	Islam Abad	اسلام آباد	2014
KR10	Islam Abad	اسلام آباد	2014
KR11	Sarab Niloofar	سراب نیلوفر	2014
KR12	Sarab Niloofar	سراب نیلوفر	2014
KR14	Kermanshah(Sararood)	کرمانشاه(سرارود)	2014
KR15	Sahneh	صحنه	2014
KR18	Kangavar	کنگاور	2014
KR19	Sahneh	صحنه	2012
KR20	Kermanshah(Sararood)	کرمانشاه(سرارود)	2014
KR22	Islam Abad	اسلام آباد	2012
KR24	Islam Abad	اسلام آباد	2014
KR24	Islam Abad	اسلام آباد	2014
KR26	Islam Abad	اسلام آباد	2014
KR28	Sare Firooz Abad	سرفیروز آباد	2014
KR29	Kermanshah(Sararood)	کرمانشاه(سرارود)	2014
KR32	Kerend	کرند	2014
KR33	Ravansar	روانسر	2014
KR36	Kermanshah	کرمانشاه	2014
KR42	Mahidasht	ماهیدشت	2014
KR43	Mahidasht	ماهیدشت	2014
KR46	Kerend	کرند	2012
KR62	Kerend	کرند	2014
KR65	Kerend	کرند	2014

جدول ۳- خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های *Ascochyta rabiei* استان کرمانشاه

Table 3. Morpholigical characteristics of *Ascochyta rabiei* solates of Kermanshah province

نام جدایه Isolate name	قطر کلنی Colony diameter (mm)	رنگ کلنی Colony color	تراکم پیکنیدیوم Pycnid density	پیکنیدیوم Pycnidium		پیکنیدسپور Pycnidiospore	
				طول Length (cm)	عرض Width (cm)	طول Length (cm)	عرض Width (cm)
KR3	35.7k	سبز تیره Dark green	++++	198.7k	176.3hfg	11.5a	4.5a
KR4	41.0i	سبز تیره Dark green	++	196.lk	165.7lm	12.0a	4.4a
KR5	42.3h	سبز تیره Dark green	++++	189.0m	164.7nm	11.5a	4.5a
KR7	33.3i	سبز تیره با مرکز روشن Dark green with light center	+++	227.7cd	176.0fg	12.0a	4.2a
KR8	46.7f	سبز تیره با مرکز روشن Dark green with light center	++	225.7de	171.7kj	11.2a	4.2a
KR9	37.7j	خاکستری روشن بامرکز تیره light gray with dark center	+	224.0f	177.0fg	12.0a	4.5a
KR10	47.3f	سبز تیره Dark green	+++	231.3ab	194.0ab	12.1a	4.2a
KR11	37.7j	سبز تیره باحاشیه قهوه ای Dark green with brown margin	++	200.0jk	178.0f	11.2a	4.2a
KR12	37.7j	سبز تیره Dark green	++	209.3h	167.3l	10.7a	4.2a
KR14	37.3j	سیاه روشن با مرکز قهوای Black light with browm center	+	203.7i	170.0k	10.5a	5.0a
KR15	46.7f	سبز تیره با حاشیه روشن Dark green with light margin	++++	233.3a	177.3fg	11.5a	4.5a
KR18	51.3d	سیاه با حاشیه روشن Black with light margin	+++	197.3k	160.0p	11.5a	4.5a
KR19	44.7g	سیاه با حاشیه روشن Black with light margin	++	215.7g	190.0d	11.0a	4.2a
KR20	42.7h	خاکستری با مرکز قهوای Gray with browm center	++	204.0j	195.3a	10.7a	4.5a
KR22	47.3f	سیاه با حاشیه سبز Black with green margin	+++	223.0f	174.7hi	10.2a	4.0a
KR24	38.7j	خاکستری باحاشیه تیره Gray with dark margin	+++	223.3ef	170.3k	10.7a	5.2a
KR25	50.7d	سیاه با حاشیه روشن Black with light margin	++	196.lk	181.7e	10.2a	4.0a
KR26	31.3m	سیاه با حاشیه خاکستری	+++	222.7f	191.7cd	11.8a	5.2a

Table 3. Continued

ادامه جدول ۳

نام جدایه Isolate name	قطر کلنی Colony diameter (mm)	رنگ کلنی Colony color	تراکم پیکنیدیوم Pycnid density	پیکنیدیوم Pycnidium		پیکنیدسپور Pycnidiospore	
				طول Length (cm)	عرض Width (cm)	طول Length (cm)	عرض Width (cm)
KR28	3j.38	سبز روشن Light green	+++	199.7k	162.7o	12.2a	5.0a
KR29	7gh.43	سبز تیره با مرکز قهوای Dark greenwith brown center	++	199۰k	173.0ij	11.0a	4.5a
KR32	3a.64	قهوه ای روشن با حاشیه تیره Light brownwith dark margin	++++	200.0jk	163.3no	9.7a	4.1a
KR33	7m.31	سیاه با حاشیه روشن Black with light margin	+++	204.0i	177.3fg	10.7a	4.0a
KR36	3b.59	سبز با حاشیه روشن green with light margin	+++	200.0jk	164.7nm	11.5a	4.5a
KR42	7e.49	سیاه با حاشیه روشن Black with light margin	+++	200.0jk	157.0q	11.2a	4.2a
KR43	7d.51	سیاه با حاشیه سفید Black with withe margin	+	202.3ij	166.lm	10.5a	4.5a
KR46	3n.28	سیاه با حاشیه روشن Black with light margin	++++	217.0g	175.7hg	11.0a	4.2a
KR62	3c.53	سبز تیره Dark green	+	229.0bc	191.7cd	10.7a	4.5a
KR65	7g.44	سیاه با حاشیه سفید Black with withe margin	++	225.0ef	192.7cb	11.8a	4.5a

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

Mean with similar letters in each column are not significantly different.

Pycnid densities: تراکم پیکنید:

Very high density:++++ تراکم خیلی زیاد: ++++

High density: +++ تراکم زیاد:+++

Medium density: ++ تراکم متوسط:++

Low density: + تراکم کم:+

جدول ۴- واکنش ارقام افتراقی نخود به جدایه‌های مختلف *Ascochyta rabiei* و نژادهای تعیین شده برای آن‌ها

Table 4. Response of chickpea differential cuffivars to different isolates of *Ascochyta rabiei* and races determined for them

جدایه‌ها	Differential cultivars		ارقام استاندارد افتراقی					نژاد
Isolates	Pch-15	ILC-194	ICC-3996	ILC-72	ILC-202	ILC-5928	ILC-1929	Race
KR3	S	S	S	S	R	R	S	5
KR4	S	R	R	R	R	R	S	2
KR5	R	R	R	R	R	R	S	1
KR7	R	R	R	R	R	R	S	1
KR8	R	R	R	R	R	R	S	1
KR9	S	R	R	R	R	R	S	2
KR10	S	S	S	R	R	R	S	4
KR11	S	S	S	S	R	R	S	5
KR12	R	R	R	R	R	R	S	1
KR14	S	S	S	S	S	R	S	6
KR15	S	R	R	R	R	R	S	2
KR18	S	S	R	R	R	S	S	3
KR19	R	R	R	R	R	R	S	1
KR20	S	S	S	S	S	R	S	6
KR22	S	S	S	R	R	R	S	4
KR24	R	R	R	R	R	R	S	1
KR25	S	S	R	R	R	S	S	3
KR26	S	S	S	R	R	R	S	4
KR28	S	R	R	R	R	R	S	2
KR29	S	S	S	S	S	R	S	6
KR32	S	S	R	R	R	S	S	3
KR33	R	R	R	R	R	R	S	1
KR36	S	S	R	R	R	S	S	3
KR42	S	S	R	R	R	S	S	3
KR43	S	S	R	R	R	S	S	3
KR46	S	R	R	R	R	R	S	2
KR62	S	S	R	R	R	S	S	3
KR65	S	S	S	R	R	R	S	4

تیپ‌های آلودگی ۱ تا ۴ به عنوان مقاوم (R) و تیپ‌های آلودگی ۵ تا ۹ به عنوان حساس (S) در نظر گرفته شده‌اند.

Infection types 1 to 4 have been considered as resistant (R) and infection types 5 to 9 as susceptible(S).

جدول ۵- واکنش ارقام افتراقی نخود به نژادهای تعیین شده *Ascochyta rabiei*، تعداد و فراوانی آن‌ها در استان کرمانشاه

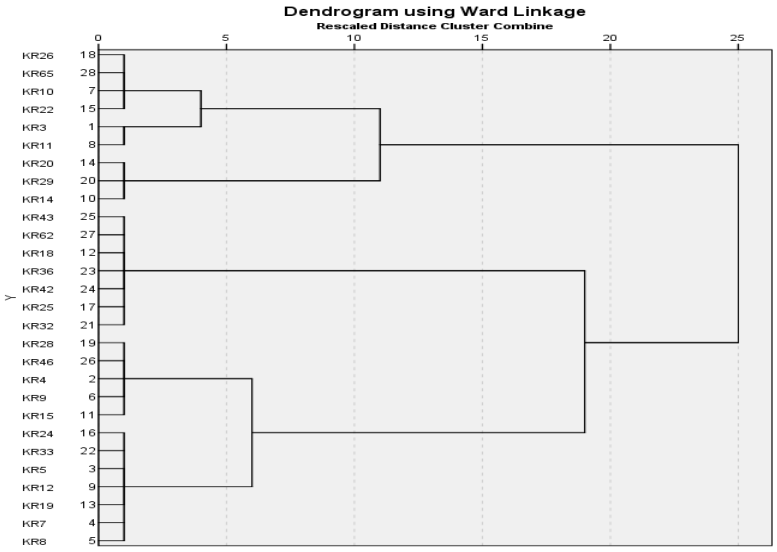
Table 5. Response of chickpea differential cultivars to determined races of *Ascochyta rabiei*, their number and frequency in Kermanshah province

نژاد	Differential cultivars ارقام استاندارد افتراقی							تعداد جدایه	درصدجدایه
Race	Pch-15	ILC-194	ICC-3996	ILC-72	ILC-202	ILC-5928	ILC-1929	Number of isolates	Frequency (%)
1	R	R	R	R	R	R	S	7	25.00
2	S	R	R	R	R	R	S	5	17.85
3	S	S	R	R	R	S	S	7	25.00
4	S	S	S	R	R	R	S	4	14.40
5	S	S	S	S	R	R	S	2	7.20
6	S	S	S	S	S	R	S	3	10.00

R: Resistant مقاوم

S: Susceptible حساس

بر اساس تجزیه و تحلیل آماری اثر متقابل شاخص بیماری جدایه‌های قارچ روی ارقام افتراقی صورت پذیرفت. ماتریس تشابه بیماری‌زائی جفت جدایه‌ها مربع اقلیدسی به روش مینیمم واریانس Ward محاسبه شد و دندروگرام مربوط به این ماتریس ترسیم گردید. با بهره‌گیری از روش تجزیه واریانس چند متغیره و ملاحظه لاندای معنی‌دار هنگامی که دندروگرام از فاصله ۴ برش داده می‌شود، تعداد شش گروه بیماری‌زا با شش نژاد تعیین شده روی ارقام افتراقی در این تحقیق مطابقت داشت (شکل ۱).



شکل ۱- گروه بندی جدایه‌های *Ascochyta rabiei* بر اساس آلودگی آن‌ها روی ارقام افتراقی نخود با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward

Fig. 1. Classification of *Ascochyta rabiei* isolates based on their infection types on differential cultivar of chickpea using Ward´s claster analysis method

بحث

بیماری برق‌زدگی نخود یکی از عوامل خسارت‌زای این محصول به ویژه در شرایط مساعد محیطی (رطوبت بالا و دمای پایین) است و هر چند سال یک بار اپیدمی شده و خسارت قابل توجهی به مزارع نخود وارد می‌کند. در حال حاضر از بین تمامی راه‌های مختلفی که برای کنترل این بیماری به کار رفته است، استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل یکی از مطمئن‌ترین و اقتصادی‌ترین روش‌های مبارزه با بیماری برق‌زدگی نخود گزارش شده است. هر چند از آغاز دهه ۶۰ میلادی برای مقابله با این بیماری از ارقام مقاوم مختلفی استفاده شده است، ولی نبود اطلاعات کامل از تنوع قارچ، همواره برنامه به نژادی را با مشکل مواجه کرده است، به گونه‌ای که مقاومت ارقام اصلاح شده، پس از مدتی شکسته شده و از سوی دیگر به دلیل تفاوت تنوع این بیمارگر در مناطق مختلف، واکنش ارقام مقاوم در تمام مناطق یکسان نبوده است (Porta Puglia *et al*., 1997). در این تحقیق تلاش شد تا با استفاده از هفت رقم افتراقی و یک رقم حساس محلی به عنوان شاهد، جدایه‌های مربوط به استان کرمانشاه ازنظر بیماری‌زائی تفکیک گردد و نژادهای موجود در مناطق مذکور شناسائی شوند. در این بررسی ۲۸ جدایه قارچ *A. rabiei* جمع‌آوری شده از استان کرمانشاه، بر اساس واکنش هفت رقم افتراقی نخود در مقابل آن‌ها تعیین نژاد شدند و در نهایت شش نژاد مختلف شناسائی شدند. ارقام افتراقی نخود مورد استفاده در این تحقیق همان ارقام افتراقی معرفی شده توسط Singh (1990) بودند که همچنان به عنوان ارقام افتراقی رایج در جهان به کار می‌روند. نتایج این تحقیق، با شش نژاد معرفی شده توسط سینگ (۱۹۹۰) مطابقت داشت. شهریاری و ایزدیار (۱۳۷۹) وجود شش نژاد با دامنه گسترش زیاد از مناطق شمال غرب کشور را گزارش کردند. همچنین وجود نژاد شش نیز اخیراً از گچساران گزارش شده است (پورعلی بابا و همکاران، ۱۳۸۷). طی بررسی دیگری روی پاتوتیپ ۶ (نژاد ۶)، دلیل بالا بودن شدت بیماری‌زایی این پاتوتیپ را به وجود توکسین سولانوپیرون A نسبت داده‌اند (شهبازی و همکاران، ۱۳۸۳). در این بررسی، نژاد ۱به عنوان نژادی با قدرت بیماری‌زائی ضعیف شناسائی شد که با تحقیقات سینگ (۱۹۹۰) که آن را به عنوان کم بیماری‌زاترین نژاد معرفی کرده مطابقت دارد. در این تحقیق، جدایه‌های KR14، KR 29 و KR20 منطقه سرارود با نام نژاد ۶ و به عنوان بیماری‌زاترین جدایه استان شناسائی گردید. این نژاد فقط در منطقه سرارود وجود داشت. نتایج بررسی خصوصیات مورفولوژیک ورشدی جدایه‌ها فوق روی محیط‌های مختلف نشان داد جدایه‌ها از نظر قطر کلنی، شکل، رنگ و تراکم پیکنیدیوم متفاوت بودند. نتیجه این تحقیق با کارهای شهریاری وایزدیار (۱۳۷۹)که خصوصیات مورفولوژیک ۱۱۷ جدایه جمع‌آوری شده از سراسر کشور را بررسی کردند مطابقت دارد. باساندرای و همکاران (Basandrai *et al*., 2005). در هند ۱۶ جدایه *A. rabiei* را از نظر رشد روی محیط Chickpea Dextros Agar و همچنین شکل، رنگ، تراکم پیکنیدیوم و قطر پیکنیدیوم بعد از ده روز مطالعه کردند و نتیجه گرفتند جدایه‌ها از نظر خصوصیات ذکر شده متفاوت می‌باشند ولی در اندازه پیکنیدیوسپور اختلافی ندارند. بشیر و همکاران (Bashir *et al*., 1986). تفاوت جدایه‌های *A. rabiei* را از نظر قطر کلنی، رنگ کلنی و تراکم پیکنیدیوم روی محیط کشت‌های مختلف گزارش کردند.

به نظر می‌رسد که وجود شرایط مساعد، سبب سازگاری این بیمارگر شده است و در نتیجه احتمال بروز فرم جنسی این قارچ و وجود آسکوسپورهای هوازاد را که می‌توانند نقش مهمی در افزایش شدت بیماری‌زایی داشته باشند، قوت می‌بخشد. گرچه وجود تولید مثل جنسی تا به حال از برخی نقاط کشور مانند استان‌های مشهد و کرمانشاه (Kaiser and Okhovat, 1996) و همچنین استان فارس (محمودی و بنی‌هاشمی، ۱۳۸۳) گزارش شده است، اما نقش فرم جنسی در انتشار و تنوع این بیمارگر در ایران هنوز مبهم می‌باشد و نیاز به بررسی دارد. از جدایه‌های با قدرت بیماری‌زائی بالا می‌توان در اصلاح ارقام مختلف نخود برای مقاومت به بیماری برق‌زدگی نخود استفاده نمود.

منابع **References**

پورعلی بابا، ح.ر.، محمودی، ف.، کشاورز، ک. و نورالهی، خ. ۱۳۸۷. تعیین تنوع بیماری‌زایی عامل بیماری برق‌زدگی نخود با استفاده از خزانه‌های تله در نقاط مختلف ایران. بیماری‌های گیاهی ۴۴(۲): ۱۷۵-۱۷۰.

شهبازی، س.، مظفری، ج. و علیزاده، ع. ۱۳۸۳. استخراج سولانوپیرون C، B، A از جدایه‌های ایرانی قارچ *Ascochyta rabiei* با استفاده ازHPLC. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تبریز، تبریز. صفحه ۱۷۲.

شهریاری، د. و ایزدیار، م. ۱۳۷۹. گروه‌های ویرولانس فرم *Ascochyta rabiei* روی نخود در ایران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان. صفحه ۸۲.

غیائی، س.، رضوی، م. و شهریاری، د.۱۳۹۰. بررسی اختلافات بیماری‌زایی و مولکولی در تعدادی از جدایه‌های *Ascochyta rabiei* عامل بیماری برق‌زدگی نخود در ایران. آفات و بیماری‌های گیاهی ۷۹ (۲): ۲۱۸-۱۹۹.

محمودی، ف. و بنی هاشمی، ض. ۱۳۸۳. تشکیل فرم جنسی، پراکندگی تیپ‌های سازگاری جنسی و تنوع ژنتیکی در جدایه‌های *Didymella rabiei* عامل برق‌زدگی نخود در استان فارس. بیماری‌های گیاهی ۴۰(۲): ۳۰-۱۵.

یونسی، ح.، اخوت، م.، حجارود، ق.، زاد، ج.، طالعی، ع. و زمانی، م. ۱۳۸۲. تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های *Ascochyta rabiei* روی ارقام نخود در استان کرمانشاه. بیماری‌های گیاهی ۳۹(۲): ۲۳۰-۲۱۳.

Basandrai, S.P., Kishore, G.K., Crouch, J.H. and Basandrai, D. 2005. Cultural, morphological and pathological variation in Indian isolates of *Ascochyta rabiei* the chickpea blight pathogen. Plant Pathology Journal 21(3): 207-213.

Bashir, M., Hawar, M.P., Kebbabe, S. and Malhotra, **R.S. 1986**. An improved agar growth medium for *Ascochyta rabiei*. International Chickpea Newsletter 14: 27-29.

Benzohra, I.E., Baubekeur, S.B.,Labdi, M. and Mokhtar, Y.B. **2011**. Identification of pathotypes and physiological races in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.,the agent of ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum*) in Algeria.Word Applied Science Journal 15 (7): 978-984.

Chen, W., Coyne, C. J., Peever, T. L. and Muehlbaur, F. J. 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei.* Plant Pathology 53: 759-76.

Chongo, G., Gossen, B.D., Buchwaldt, L., Adhikari , T. and Rimmer, S.R. 2004. Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. Plant Disease 88: 4-10.

Jan, H. and Wiese, M. W. 1991. Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting chickpea in the Palouse. Plant Disease 75: 904-906.

Kaiser, W. J. 1997. Telemorph of *Ascochyta rabiei* and its significance in breeding chickpea. pp. 3-21. In: DNA Markers and Breading for Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea. Proceedings of the Symposium on 'Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker Assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas.'(S. M. Udupa and F. Weigand, eds.). 11-12 April 1994, ICARDA, Aleppo, Syria.

Kaiser, W. J. and Okhovat, M. 1996. Distribution of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 32: 158-162 (in Persian).

Katiyar, R.P. and Sood, O.P. 1985. Screening chickpea for resistanse to ascochyta blight. International Chickpea Newsletter13: 19-20.

Navas-Cortes, J.A., Peres-Artes, E., Jimenes-Diaz, R.M., Llobbel, A., Bainbridge, BW. and Heale, J.B. 1998. Mating type, pathotype and RAPDs analysis in *Didymella rabiei*, the agent of Ascochyta blight of chickpea. Phytoparasitica 26(3): 199-212.

Peever, T.L., Salimath, S.S., Su, G., Kaiser, W.J. and Muehlbaur, J. 2004. Historical and contemporary multi locus population structure of *Ascochyta rabiei* (Telemorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. Molecular Ecology 13: 291-309.

Porta-Puglia, A., Inantino, A., Crino, P., Angelini, R. and Venora, G. **1997**.Ascochyta blight of chickpea: present status and prospects. Pakistan Journal of Phytopathology 9: 9-18.

Qureshi, S. H. and Alam, S. S. 1984. Pathogenic behavior of *Ascochyta rabiei* solates on different cultivars of chickpea in Pakistan. International Chickpea Newsletter 11: 29-30.

Rashad Ali, S., Iqbal, M., Iqbal, U., Ghafoor, A. and Akram, A. 2009. Pathogenic diversity in *Ascochyta rabiei*(Pass.) Lib. of chickpea. Pakistan Journal of Botany 41(1): 413-419.

Reddy, M.V. and Kabbabeh, S. 1985. Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. in Syria and Lebanon. Phytopathologia Mediterranea 24: 265-266.

Reddy, M. V. and Singh, K. B. 1984. Evaluation of a world collection of chickpea germ plasm accessions for resistance to Ascochyta blight. Plant Disease 68: 900-901.

Reddy, M. V. and Singh, K. B. 1993. Rate-reducing resistance to *Ascochyta rabiei* in chickpeas. Plant Disease 77: 231-233.

Singh, G., 1990. Identification and designation of physiological races of *Ascochyta rabiei* in India. Indian Phytopathology 43: 48-52.

Singh, K.B., Hawatin, G.C., Nene, Y.I. and Reddy, M.V. 1981. Resistance in chickpeas to *Ascochyta rabiei*. Plant Disease.65: 586-587.

Singh, K.B. and Reddy, M.V.**1990** .Patterns of resistance and suscepibility to races of *Ascochyta rabiei* among germplasm accessions and breeding lines of chickpea. Plant Disease 74: 127-129.

Singh, K.B., Reddy, M.V. and Nene, Y. I. 1984. International testing of chickpeas for resistance to *Ascochyta rabiei*. Plant Disease 68:782-784.

Türkkan, M. and Dolar, F.S. 2009. Determination opathogenic variability of *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea in Turkey. Turkish Journal of agriculture and Forestry 33: 585-591.

Udupa, S.M. and Weigand, **F. 1997**. Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates of Syria. DNA markers and breeding for resistance to ascochyta blight in chickpea. Proceedings of the Symposium on Application of DNA Fingerprinting for CropImprovement: Marker Assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in The Dry Areas (S.M. Udupa and F. Weigand, eds.). ICARDA. 11-12 April 1994, Aleppo, Syria.

Vir, S. and Grewal, J.S. 1974. Physiologic specialization in *Ascochyta rabiei*, the causal organism of gram blight. Indian Phytopathology 27: 355-360.