پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۰ (۳): ۷۱-۶۳ (۱۴۰۰) - مقاله پژوهشی

Journal of Applied Research in Plant Protection 10(3): 63-71 (2021)-Research Article

DOI: https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.13262

اثر پرآزاری و غلظت اسپور جدایه‌های *Didymella rabiei* بر واکنش ژنوتیپ‌های نخود به بیماری برق‌زدگی

سمانه جمشیدی پور[۱]، سید حسین وفائی[۲]✉

[۱] *گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.* [۲] *گروه بیماری‌شناسی گیاهی، واحد خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم آباد، ایران.* ✉Vafaei_h1353@yahoo.com

دریافت: ۹۹/۹/۸ بازنگری: ۹۹/۱۲/۲۱ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۶

چکیده

گیاه نخود سومین لگوم غذایی مهم جهان است. برق‌زدگی مخربترین بیماری نخود است که توسط قارچ *Didymella rabiei* ایجاد می‌شود. شناسایی منابع مقاومت در ژرم‌پلاسم نخود جهت برنامه‌های به‌نژادی و مدیریت بیماری ضروری است. به منظور بررسی تأثیر غلظت اسپور و شدت پرآزاری جدایه بر واکنش ژنوتیپ‌های نخود به بیماری برق‌زدگی، آزمایش فاکتوریلی در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. اثر دو جدایه (A3: با پرآزاری متوسط و A6: با پرآزاری شدید) و غلظت اسپور ($۱۰^۵$، $۱۰^۵ \times ۲$، $۱۰^۵ \times ۵$ اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر) بر شاخص و شدت بیماری در ۲۰ ژنوتیپ نخود مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شاخص بیماری و شدت آن تحت تأثیر غلظت اسپور، پرآزاری جدایه‌ها و ژنوتیپ‌های نخود قرار گرفت و بین ژنوتیپ‌ها، جدایه‌ها و غلظت‌های اسپور تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. شدت بیماری با افزایش غلظت اسپور از $۱۰^۵ \times ۲$ به $۱۰^۵ \times ۵$ اسپور در هر میلی‌لیتر برای ارقام مقاوم ILC 202، ILC72، ILC3279، ICC3996 و ICC12004 افزایش یافت، در حالی که شدت بیماری ژنوتیپ‌های حساس تحت تأثیر همه غلظت‌های اسپور بود. ارقام افتراقی نخود از جمله ILC202، ILC72، ILC3279، ICC3996 و ICC12004 در برابر تمام غلظت‌های اسپور جدایه A3 مقاوم بودند، در حالیکه به غلظت $۱۰^۵ \times ۲$ اسپور جدایه A6 حساس بودند. غلظت اسپور $۱۰^۵ \times ۲$ با جدایه A3 بیشترین تفاوت را میان ژنوتیپ‌های نخود بر اساس میانگین شاخص بیماری ایجاد کرد. اطلاعات به‌دست آمده از این تحقیق می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی ارقام نخود و مطالعات بررسی تنوع بیماری‌زایی جمعیت قارچ مورد استفاده قرارگیرد.

کلمات کلیدی: ارقام افتراقی، بیوه‌نیج، پرآزاری، شاخص بیماری، مقاومت

Impact of the virulence and spore concentration of *Didymella rabiei* isolates on the reaction of chickpea genotypes to ascochyta blight

Samaneh Jamshidipoor [1], Seyyed Hossein Vafaei [2]✉

[1]*Department of Plant Pathology, Varamin Pishva Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.* [2]*Department of Plant Pathology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.* ✉Vafaei_h1353@yahoo.com.

Received: 28 Nov 2020 Revised: 11 Mar 2021 Accepted: 16 Mar 2021

Abstract

Chickpea is the third most important food legume in the world. Ascochyta blight is the most destructive disease of chickpea caused by the fungus *Didymella rabiei*. Identification of resistance sources in germplasm of chickpea is essential for breeding programmes and management of disease. In order to investigate the effects of spore concentration and virulence severity of isolate on intensity of ascochyta blight in chickpea genotypes, a factorial experiment was conducted based on completely randomized design with three replications. Effect of two isolates (A3: moderately virulent & A6: highly virulent) and different spore concentrations (10^5, 2×10^5, 5×10^5 spores ml^{-1}) were investigated on disease rate of 20 genotypes. Results showed that disease scale and its severity were affected by spore concentration, virulence severity of isolates and chickpea genotypes and there was significant difference between genotypes, isolates and spore concentrations. The disease severity increased with spore concentration from 2×10^5 to 5×10^5 spores ml^{-1} for resistant lines including, ILC 202, ILC72, ILC3279, ICC3996 and ICC12004, while the susceptible lines were affected by all of the conidial concentrations. The chickpea differential lines including ILC202, ILC72, ILC3279, ICC3996 and ICC12004 were resistant to all of the conidial concentrations of A3 (moderately virulent) while were susceptible to 2×10^5 spores ml^{-1} of A6 (highly virulent). The spore concentration of 2×10^5 spores ml^{-1} with A3 isolate developed the most discrimination between chickpea genotypes on the basis of mean disease scale. The obtained information can be used in breeding programmes of chickpea and pathogenic diversity studies.

Keywords: Differential lines, Bivenij, Disease scale, Resistance, Virulence

How to cite:
Jamshidipoor S, Vafaei SH, 2021. Impact of the virulence and spore concentration of *Didymella rabiei* isolates on the reaction of chickpea genotypes to ascochyta blight. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (3):63–71.

مقدمه

گیاه نخود بعد از لوبیا و نخودفرنگی سومین لگوم مهم جهان است که در سطح وسیع کشت می‌شود. نخود یک منبع غذایی مهم از کلسیم، منیزیم، پتاسیم، فسفر، آهن، روی و منگنز است. در کشاورزی پایدار از طریق تثبیت نیتروژن هوا و در تناوب با غلات، مزیت اضافه‌ای برای محصول بعدی با اضافه‌کردن ماده آلی مورد نیاز به خاک دارد که سلامت خاک، حاصلخیزی طولانی مدت و پایداری اکوسیستم را به دنبال دارد (Gan *et al*. 2006). عملکرد محصول نخود از پتانسیل عملکرد این محصول (حدود پنج تن در هکتار) فاصله زیادی دارد و دلیل آن تنش‌های زیستی و غیرزیستی متعددی است که نخود با آنها روبه‌رو است. در میان تنش‌های زیستی، بیماری برق‌زدگی نخود (Ascochyta Blight) یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید نخود در بیشتر مناطق دنیا است. این بیماری توسط قارچ *Didymella rabiei* (Kovachevski) von Arx (anamorph: *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) ایجاد می‌شود. خسارت اقتصادی این بیماری در بسیاری از مناطق دنیا از جمله پاکستان، هندوستان، استرالیا، کانادا، اروپا، شمال آفریقا و غرب آسیا قابل توجه است (Pande *et al*. 2013). در ایران بیماری در برخی استان‌ها شامل گلستان، کرمانشاه، ایلام، لرستان و فارس خسارت بالایی به محصول نخود وارد می‌کند (Shokouhifar *et al*. 2003; Nourollahi *et al*. 2009; Ghiai *et al*. 2012). استفاده از کولتیوارهای مقاوم نخود به عنوان یک استراتژی اقتصادی و مؤثر در مدیریت بیماری از زمان وقوع بیماری مورد توجه بوده است و در بسیاری از مناطق دنیا، مطالعات غربالگری و به‌نژادی ژنوتیپ‌های نخود جهت شناسایی و تهیه ارقام مقاوم در حال اجرا و تقویت هستند (Chen *et al*. 2004; Ahmad *et al*. 2013; Pande *et al*. 2013; Kimurto *et al*. 2013). اغلب نتایج متفاوتی از تواتر نمونه‌های مقاوم و سطح مقاومت در این نمونه‌ها و همچنین تخمین اساس ژنتیکی مقاومت به برق‌زدگی در بیشتر مطالعات گزارش شده است که مهم‌ترین دلیل آن تفاوت در روش بررسی از جمله استفاده از جدایه‌های قارچی با سطح پرآزاری متفاوت، ژنوتیپ‌های متفاوت نخود، روش مایه‌زنی، غلظت زادمایه و حتی شرایط محیطی زمان بررسی است (Labdi *et al*. 2013). به دلیل در دسترس نبودن روش‌های یکنواخت برای تعیین نژاد و عدم وجود اطلاعات کافی در مورد برهمکنش بین بیمارگر و میزبان، در مورد معرفی نژاد در این قارچ اتفاق نظر وجود ندارد و محققین از واژه‌های مختلفی (نژاد، پاتوتیپ، فرم یا گروه بیماری‌زا) جهت بیان تنوع بیماری‌زایی جمعیت قارچ استفاده کرده‌اند (Chen *et al*. 2004; Vail & Banniza 2008; Atik *et al*. 2013). مطالعات اخیر نیز توارث‌پذیری مقاومت بصورت کمی و دخالت ژن‌های متعددی را نشان داده‌اند و مشخص شده است که سطح مقاومت در نمونه‌های نخود، ناقص (کمی) است اگرچه در بیشتر ژرم‌پلاسم‌های غربالگری شده تعداد ژن‌ها و نحوه عمل آنها مشخص نشده است (Hamwieh *et al*. 2013; Li *et al*. 2017). با توجه به اثر غلظت زادمایه و تفاوت بیماری‌زایی جدایه قارچ بر نتایج غربالگری ارقام نخود، هدف اصلی این تحقیق بررسی اثر غلظت اسپور و شدت پرآزاری جدایه قارچ بر شدت و شاخص بیماری برق‌زدگی و واکنش ژنوتیپ‌های نخود بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و آماده‌سازی آنها

در این تحقیق، ۲۰ ژنوتیپ نخود شامل ۹ ژنوتیپ بومی منتخب از بانک ژن گیاهی ایران (غربالگری اولیه شده برای مقاومت به قارچ)، هفت رقم افتراقی، دو کولتیوار اصلاح شده و دو توده محلی استفاده شد (جدول ۱). از هر رقم ۱۰ عدد بذر یکسان انتخاب و پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت‌سدیم (۵٪ کلر فعال) و شستشو با آب مقطر استریل در سینی‌های پلاستیکی با ابعاد ۸ × ۲۵ × ۳۵ سانتی‌متر (طول ۳۵، عرض ۲۵ و عمق ۸ سانتی‌متر) حاوی مخلوط خاک، ماسه، کود به نسبت ۱:۳:۱ به صورت خطی کشت شدند. گیاهان در گلخانه‌ای با دمای ۲۵^{o} C-۱۸ و شرایط نور طبیعی نگهداری شدند تا به رشد لازم (۱۴ روزه) جهت مایه‌زنی رسیدند.

تهیه جدایه‌های قارچی و آماده سازی سوسپانسیون اسپور

از دوجدایه با پرآزاری متوسط (A3) و پرآزاری شدید (A6) تهیه شده از کلکسیون قارچ‌شناسی بانک ژن مؤسسه تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج استفاده شد. سوسپانسیون اسپور از کشت‌های ۱۴ روزه با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر ظرف پتری محیط‌کشت قارچ و خراش سطحی آن با کمک تیغه اسکالپل فراهم گردید. سپس غلظت‌های $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۵}$ × ۲ و $۱۰^{۵}$ × ۵ اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون با استفاده از لام گلبول‌شمار (Haemocytometer) تنظیم گردید.

جدول ۱. مشخصات ژنوتیپ‌های نخود مورد استفاده در آزمایشات.

Table 1. Characteristics of chickpea genotypes used in experiments.

Genotype Name	Genotype Type	Genotype Name	Genotype Type
ICC12004	Differential line	KC216074	Germplasm accession
ILC202	Differential line	KC216261	Germplasm accession
ICC3996	Differential line	KC216305	Germplasm accession
ILC3279	Differential line	KC216306	Germplasm accession
ILC72	Differential line	TN-41-4320	Germplasm accession
ILC482	Differential line	TN-41-4990	Germplasm accession
ILC1929	Differential line	Hashem	Breeding line
KC215128	Germplasm accession	Arman	Breeding line
KC215143	Germplasm accession	Bivenij	Local accession
KC215039	Germplasm accession	Greet	Local accession

آلوده‌سازی گیاهان

گیاهچه‌های ۱۴ روزه به مدت یک روز در شرایط کاملا کنترل شده در یک اتاقک رشد (فیتوترون، شرکت نور صنعت فردوس،کرج، ایران) با دمای $۲۱ \pm ۱^{o}C$ و تناوب نوری ۱۲ ساعت نگهداری شدند تا به شرایط موجود سازگار شوند. سپس گیاهچه‌ها با سوسپانسیون اسپور قارچ در سه غلظت تعیین شده با آبفشان دستی تا ریزش اولین قطرات از سطح گیاه مایه‌زنی گردیدند. گیاهان به مدت نیم ساعت در هوای آزاد برای جلوگیری از جمع شدن و ریزش قطرات سوسپانسیون اسپور نگهداری شدند. پس از آن داخل فیتوترون با شرایط دمایی $۲۱ \pm {}^{o}۱C$ و رطوبت نسبی بالای ۹۵ ٪ به مدت ۹۶ ساعت نگهداری شدند. پس از گذشت این زمان رطوبت فیتوترون تا پایان آزمایش روی ۷۵ ٪ تنظیم گردید.

ارزیابی واکنش گیاهان در برابر بیماری

به‌منظور ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها در برابر بیماریزایی جدایه‌ها و غلظت زادمایه، دو هفته بعد از مایه‌زنی و پس از آلودگی کامل ژنوتیپ‌های حساس، واکنش ژنوتیپ‌ها ابتدا براساس شاخص ۹ درجه‌ای (Pande *et al*. 2013) و به صورت زیر تعیین گردید:

۱: بدون علایم، ۲: زخم‌های جزئی و فقط روی بخش انتهایی گیاه، ۳: زخم‌ها به اندازه ۵ mm و شروع خمیدگی جوانه انتهایی، ۴: زخم‌ها واضح و بیشتر از ۵ mm و خمیدگی واضح جوانه انتهایی، ۵: زخم‌ها روی همه بخش‌های گیاه، شروع برگ‌ریزی، شکستگی و خشک‌شدن شاخه‌ها خفیف تا متوسط، ۶: شبیه ۵ ولی شکستگی شاخه‌ها عمومی و مرگ برخی گیاهان ۷: زخم‌ها روی همه بخش‌های گیاه، برگ‌ریزی، شکستگی و خشک شدن عمومی شاخه‌ها، مرگ ۲۵ درصد گیاهان، ۸: علایم شبیه ۷ و مرگ ۵۰ درصد گیاهان، ۹: علایم شبیه ۷ و مرگ ۱۰۰ درصد گیاهان.

شدت بیماری نیز براساس درجه بیماری ثبت شده برای هر ژنوتیپ و به روش ردی و سینگ (Reddy & Singh 1984) محاسبه گردید. واکنش ژنوتیپ‌ها نیز به صورت ۱: کاملا مقاوم، ۳-۱/۱: مقاوم، ۵-۳/۱: متحمل (نسبتاً مقاوم)، ۷-۵/۱: حساس، ۹-۷/۱: خیلی‌حساس تعیین‌گردید.

طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل شامل فاکتورهای رقم (۲۰ ژنوتیپ)، جدایه قارچ (دو سطح) و غلظت اسپور (در سه سطح) در طبقات جداگانه اتاقک رشد در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. پس از تجزیه واریانس داده‌ها، مقایسه میانگین-ها با استفاده از آزمون دانکن انجام گردید. همچنین با استفاده از تجزیه مدل خطی واریانس (General linear model analysis of variance) اثرات متقابل جدایه‌ها و سطوح غلظت زادمایه بر میانگین شاخص و شدت بیماری ژنوتیپ‌ها و واکنش آنها محاسبه گردید. محاسبات و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS19 انجام‌گرفت.

نتایج و بحث

مشاهدات عینی (شکل ۱) و نتایج تجزیه واریانس بررسی اثر غلظت اسپور و پرآزاری جدایه قارچ بر شاخص و شدت بیماری نشان داد که اثر ساده ژنوتیپ‌ها، جدایه‌ها و غلظت اسپور و همچنین اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌دار نشان داد و شدت

بیماری تحت تاثیر غلظت اسپور، پرآزاری جدایه قارچ و نوع ژنوتیپ بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نیز نشان داد که واریانت با پرآزاری شدید (A6) بیشترین نمره بیماری و شدت بیماری را در همه ارقام در مقایسه با واریانت متوسط (A3) ایجاد کرد (جدول ۳). در غلظت‌های مساوی اسپور، واکنش ژنوتیپ‌ها به دو جدایه نشان داد که در حالت استفاده از جدایه با پرآزاری شدید (A6)، هیچ ژنوتیپ مقاومی وجود نداشت. ارقام افتراقی ILC202، ILC72، ILC3279، ICC3996 و ICC12004 به همه غلظت‌های جدایه A3 مقاومت نشان دادند. در حالیکه با استفاده از جدایه A6 و غلظت ۵۰۰ هزار اسپور این ارقام نیز حساسیت نشان دادند (شکل ۱). مقایسه بین ژنوتیپ‌ها براساس میانگین شاخص بیماری نشان داد که سه رقم ILC202، ICC3996 و ICC12004 براساس نوع واکنش در یک گروه قرار گرفتند. همچنین در برخی ژنوتیپ‌ها پس از مایه‌زنی با جدایه A3 و غلظت پایین زادمایه (10^5) میانگین نمره بیماریزایی پایین (کمتر از ۵) بود که نشان دهنده سطح تحمل این نمونه‌ها به برق‌زدگی بود (جدول ۳). Kanouni *et al.* (2011) این مسئله را ناشی از وجود برخی ژن‌های کوچک اثر در مقاومت به بیماری برق‌زدگی می‌دانند که می‌توان از آنها در تجمیع ژن‌ها در منابع مقاومت و در برنامه‌های به‌نژادی نخود استفاده‌کرد. در بیشتر مطالعات گذشته ارقام ILC202، ICC3996 و ICC12004 به بیشتر نژادها یا پاتوتیپ‌های قارچ، مقاوم گزارش شده‌اند و فقط در مقابل نژاد ۶ یا پاتوتیپ ۴ به عنوان حساس گزارش شده‌اند (Chen *et al*. 2004; Imtiaz *et al*. 2015). بررسی اثر غلظت اسپور در مطالعات قبلی نشان داد که غلظت زادمایه فاکتور مهمی در بررسی کیفیت واکنش ارقام نخود است (Trapero-Casas & Kaiser 1992; Kanouni *et al*. 2011; Kavousi *et al*. 2014).

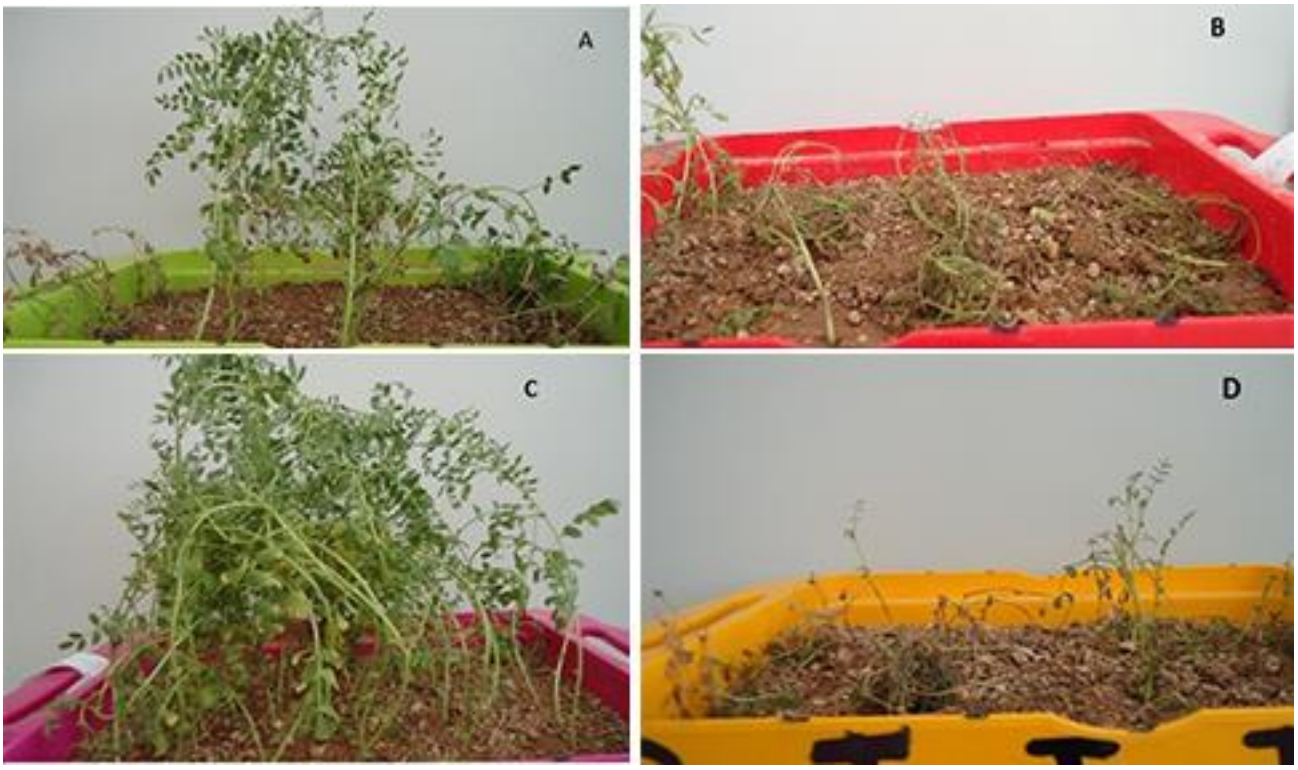
با توجه به کمی بودن سطوح فاکتور غلظت اسپور، رگرسیون ساده به تفکیک هر جدایه برای این فاکتور انجام گردید. همانطور که مشاهده می‌شود رگرسیون غلظت اسپور با جدایه معنی‌دار بود و به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت اسپور، شدت بیماری نیز افزایش یافت (جدول۴). همچنین با توجه به اینکه نتایج غربالگری ژرم‌پلاسم نخود تحت تأثیر شرایط محیطی، جدایه قارچ و غلظت زادمایه است، با فرض ثابت نگه‌داشتن شرایط محیطی در مدت زمان اجرای این آزمایش با استفاده از فیتوترون، جهت بررسی اثر متقابل تیمارهای مختلف جدایه و غلظت زادمایه بر میانگین شدت بیماری و واکنش ژنوتیپ‌ها، تجزیه و تحلیل واریانس مدل خطی (General linear model analysis of variance) نشان داد که بیشترین تغییرپذیری در میانگین شاخص و شدت بیماری ژنوتیپ‌ها در اثر متقابل جدایه A3 و غلظت زادمایه ۲۰۰ هزار اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر مشاهده شد و در تمایز سطوح مختلف میانگین شاخص بیماری ژنوتیپ‌ها مناسب‌تر از بقیه تیمارها بود (جدول ۵)، اگرچه در کیفیت واکنش ارقام (خیلی‌حساس تا مقاوم) در مقایسه با سایر تیمارها تفاوتی مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر غلظت اسپور، شدت پرآزاری جدایه قارچ و ژنوتیپ بر شاخص و شدت بیماری برق‌زدگی.

Table 2. Analysis of variance the effect of spore concentration, virulence severity of isolate and genotype on disease scale and severity of ascochyta blight.

Source of variation	df	Mean of squares	
		Disease scale	Disease severity
Isolate	1	241.73 **	51984.10 **
Spore concentration	2	127.21 **	31845.83 **
Isolate × Spore concentration	2	14.55**	5891.90 **
Genotype	19	34.63 **	5383.47 **
Genotype × Isolate	19	2.49 **	391.23 **
Genotype× Spore concentration	38	0.67 **	256.16 *
Genotype × Spore con. × Isolate	38	1.02 **	252.13 *
Error	240	0.39	166.74
CV		11.94%	33.32%

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels respectively.



شکل ۱. مقایسه اثر شدت پرآزاری جدایه و غلظت اسپور قارچ *Didymella rabiei* بر واکنش ژنوتیپ‌های افتراقی نخود (ILC 202، ILC72، ILC3279، ICC3996، ICC12004) دو هفته بعد از مایه‌زنی. **A**. جدایه A3 و غلظت$۱۰^{۵}$ × ۲، **B**. جدایه A3 و غلظت $۱۰^{۵}$ × ۵، **C**. جدایه A6 و غلظت $۱۰^{۵}$، **D**. جدایه A6 و غلظت$۱۰^{۵}$ × ۵.

Figure 1. Comparison effect of virulence severity and spore concentration of *Didymella rabiei* on reaction of chickpea differential genotypes (ILC202, ILC72, ILC3279, ICC3996 & ICC12004) two weeks after inoculation. **A.** A3 isolate and 2 × 10^5, **B.** A3 isolate and 5 × 10^5, **C.** A6 isolate and 10^5, **D.** A6 isolate and 5 × 10^5.

جهت گروه‌بندی بهتر، تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها براساس میانگین شاخص ۹ درجه‌ای و شدت بیماری انجام و ژنوتیپ‌ها در حداقل چهار کلاستر متمایز قرار گرفتند که تفاوت سطح واکنش نمونه‌های منتخب بانک ژن و توده‌های‌محلی را با ارقام افتراقی نخود مشخص کرد (شکل ۲). براساس نتایج مطالعات گذشته و همچنین نظر برخی محققین، تا زمانی که کیفیت واکنش یک رقم براساس نرخی از شاخص بیماری بالاتر یا پایین‌تر از یک نرخ اختیاری (مثلاً ۴ یا ۵ از مقیاس ۹ درجه‌ای) تعریف شود، نتایج غربالگری ژرم‌پلاسم نخود و تعریف سطوح بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ به نژاد یا پاتوتیپ متناقض خواهد بود (Peever *et al*. 2012; Labdi *et al*. 2013). به عبارتی بهتر در صورت تغییر دامنه عددی شاخص بیماری جهت تعیین واکنش ژنوتیپ‌ها، تعریف حساسیت و مقاومت نیز تغییر خواهد کرد. بنابراین گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس هم کیفیت واکنش (حساس یا مقاوم) و هم میانگین شاخص بیماری (از دامنه ۹-۱) شبیه آنچه در جدول ۳ آمده‌است، منجر به قضاوت و نتیجه‌گیری بهتری خواهد شد.

گزارشات متعددی غلظت $۱۰^{۵}$ × ۵ اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر را به عنوان غلظت پایه در مطالعات بررسی تنوع بیماریزایی جدایه‌ها استفاده کرده‌اند (Turkkan & Dolar 2009). در ایکاردا (International Center for Agricultural Research in Dry Areas) و ایکرسات (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) غلظت‌های حداقل $۱۰^{۴}$ × ۵ و حداکثر $۱۰^{۵}$ × ۲ اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر جهت غربالگری ژرم‌پلاسم نخود استفاده شده‌است (Singh & Reddy 1990; Pande *et al*. 2005). Kanouni *et al*. (2011) در مطالعه‌ای گزارش نمودند که غلظت ۲۰۰ هزار اسپور در هر میلی‌لیتر آب

مقطر بیشترین تمایز را از نظر کیفیت واکنش به بیماری در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش نشان داد.

جدول ۳. واکنش ژنوتیپ‌های نخود به جدایه‌های *Didymella rabiei* در غلظت‌های مختلف اسپور براساس میانگین شاخص بیماری.

Table 3. Reaction of chickpea genotypes to isolates of *Didymella rabiei* in different spore concentrations based on mean disease scale.

Genotype	Moderately virulent (A3)			Highly virulent (A6)		
	10^5	2×10^5	5×10^5	10^5	2×10^5	5×10^5
ICC12004	1.33 R	1.33 R	2.33 R	2.33 R	3.33 MR	5.33 S
ICC3996	1.33 R	1.66 R	2.33 R	2.33 R	4.33 MR	5.33 S
ILC202	1.33 R	1.33 R	2.33 R	2.33 R	4.33 MR	5.33 S
ILC72	1.33 R	2.33 R	3.33 MR	3.33 MR	5.66 S	6.66 S
ILC3279	2.33 R	2.66 R	3.33 MR	3.33 MR	5.33 S	6.66 S
ILC482	2.66 R	3.33 MR	3.66 MR	3.66 MR	5.66 S	6.66 S
ILC1929	5.33 S	6.33 S	6.66 S	6.66 S	7.33 HS	8.33 HS
Hashem	3.66 MR	4.33 MR	5.33 S	4.33 MR	6.33 S	7.66 HS
Arman	3.66 MR	4.33 MR	5.33 S	4.66 MR	6.33 S	7.66 HS
KC215143	3.66 MR	4.33 MR	5.33 S	5.66 S	6.33 S	7.66 HS
KC215128	3.66 MR	4.33 MR	5.33 S	5.66 S	6.33 S	7.66 HS
TN-41-4990	4.33 MR	4.66 MR	5.33 S	5.66 S	6.33 S	7.66 HS
TN-41-4320	4.33 MR	4.66 MR	5.33 S	5.66 S	6.33 S	7.66 HS
KC216261	4.33 MR	5.33 S	6.33 S	6.66 S	6.66 S	7.66 HS
KC216305	4.33 MR	5.66 S	6.33 S	6.66 S	6.66 S	7.66 HS
KC216306	5.33 S	6.33 S	6.66 S	6.66 S	7.33 HS	8.33 HS
KC216074	5.33 S	6.33 S	6.66 S	6.66 S	7.33 HS	8.33 HS
KC215039	5.33 S	6.33 S	6.66 S	6.66 S	7.33 HS	8.33 HS
Greet	5.33 S	6.33 S	6.66 S	6.66 S	7.33 HS	8.33 HS
Bivenij	5.33 S	6.33 S	6.66 S	6.66 S	7.33 HS	8.33 HS

R: Resistance, MR: Moderately Resistance, S: Susceptible, HS: Highly Susceptible

جدول ۴. آزمون رگرسیون اثر غلظت اسپور جدایه‌های *Didymella rabiei* بر شدت بیماری برق زدگی.

Table 4. Regression analysis the effect of spore concentration of *Didymella rabiei* isolates on disease severity of ascochyta blight.

Factor	R	R^2	ADJ. R^2
A3 (Moderately virulent)	0.464	0.215	0.213
A6 (Highly virulent)	0.647	0.417	0.415

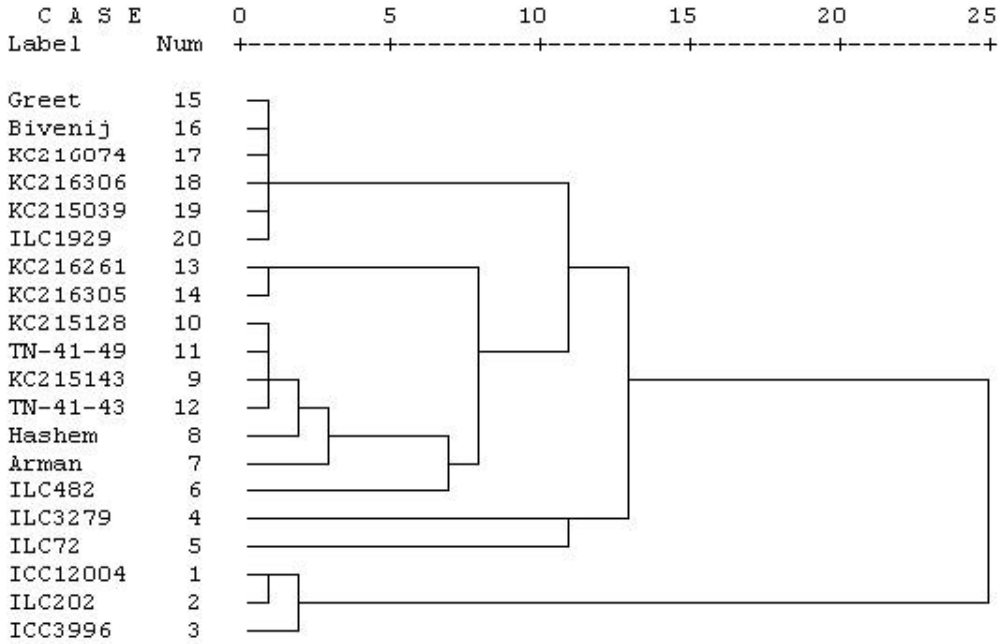
همچنین Kavousi *et al.* (2014) غلظت ۲۰۰ هزار اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر را به عنوان غلظت مناسبی جهت تفکیک سطوح مقاومت در نخود معرفی کرده‌اند. شدت پرآزاری جدایه قارچ بکارگرفته شده، در مطالعات غربالگری و سرعت بخشیدن به توسعه ارقام مقاوم نقش مهمی دارد. جمعیت قارچ عامل بیماری برق‌زدگی در اکثر مناطق بررسی شده از نظر بیماریزایی متنوع است و یکی از دلایل اصلی ناکارآمدی برخی کولتیوارهای مقاوم در مدیریت بیماری تغییر پذیری بیماریزایی قارچ است (Atik *et al.* 2013; Kimurto *et al.* 2013). برخی مطالعات به تفکیک جمعیت قارچ به نژاد اعتقادی ندارند و تفاوت بیماریزایی جدایه‌ها را سطوح مختلف پرآزاری تعریف کرده‌اند (Vail & Banniza 2008; Elliott *et al.* 2011). در تحقیقی براساس تفاوت شدت بیماریزایی جدایه‌ها، چهار سطح پرآزاری شامل: سطح اول کمترین پرآزاری (Least virulent) یا پاتوتیپ I، سطح دوم نسبتاً پرآزار (Moderately virulent) یا پاتوتیپ II، سطح سوم پرآزار (Virulent) یا پاتوتیپ III و سطح چهارم شدیداً پرآزار (Highly virulent) یا پاتوتیپ IV تعریف شده‌است. هیچ ژنوتیپی از گیاه نخود به سطح چهارم مقاوم نیست (Imtiaz *et al.* 2015). در بررسی توارث مقاومت به بیماری برق‌زدگی در نخود، مقاومت‌ها از نوع کمی (ناقص) گزارش شده‌اند. برخی بررسی‌ها از دخالت یک ژن غالب در توارث مقاومت به برق‌زدگی نخود گزارش دادند (Hafiz & Ashraf 1953). برخی مطالعات

نیز از دخالت یک تا دو ژن کوچک اثر در بروز مقاومت گزارش دادند. مطالعات اخیر بر کمی بودن واکنش و دخالت چند ناحیه ژنومی در بروز مقاومت دلالت دارند (Bhardwaj *et al*. 2010; Hamwieh *et al*. 2013; Li *et al*. 2017).

جدول ۵. واریانس اثر متقابل غلظت اسپور و شدت پرآزاری جدایه قارچ *Didymella rabiei* برمیانگین شاخص بیماری ژنوتیپ‌های نخود.

Table 5. Variance of the interaction spore concentration and virulence severity of *Didymella rabiei* on the mean disease scale of chickpea genotypes.

Isolate	Spore concentration	Mean	Variation (%)	S. E. of Mean
Moderately virulent (A3)	10^5	3.63	15.40	0.18
	2×10^5	4.52	25.60	0.28
	5×10^5	5.60	12.85	0.21
Highly virulent (A6)	10^5	5.80	17.95	0.01
	2×10^5	6.40	17.95	0.13
	5×10^5	7.60	10.25	0.06



شکل۲. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های نخود بر اساس میانگین شاخص و شدت بیماری برای هر دو جدایه قارچ *Didymella rabiei* در سه سطح زادمایه با استفاده از روش UPGMA.

Figure 2. Cluster analysis of chickpea genotypes based on the mean of disease scale and severity for two isolates of *Didymella rabiei* in three level of inoculum using the UPGMA method.

غربالگری با جدایه‌های با پرآزاری شدید به دلیل فقدان مقاومت کامل در ژرم‌پلاسم نخود، باعث حذف نمونه‌های نخود با ژن‌های کوچک اثر می‌شود. این مسئله در تجمیع ژن‌ها و ایجاد ارقام مقاوم نخود به بیماری مهم است. غربالگری با استفاده از جدایه‌های قارچ با پرآزاری پایین (سطح اول) نیز گمراه کننده خواهد بود و بسیاری از ژنوتیپ‌های انتخاب شده در غربالگری با جدایه‌های کم‌آزار در صورت معرفی و ورود به مناطق کاشت و مواجهه با جدایه‌های با پرآزاری بیشتر ارزش خود را از دست می‌دهند (Vail & Banniza 2008). برخی محققین در غربالگری ژرم‌پلاسم نخود پیشنهاد دادند با توجه به کمی بودن مقاومت، از جدایه‌های با پرآزاری متوسط (نسبتاً پرآزار تا پرآزار) استفاده شود تا مقاومت‌های جزئی ژنوتیپ‌ها دیده‌شود و این نمونه‌ها جهت تجمیع ژن‌ها و توسعه و اصلاح مقاومت نخود گزینش شوند (Vail & Banniza 2008). این مسئله زمانی اهمیت

بیشتری خواهد داشت که در غیاب ژنوتیپ‌های کاملاً مقاوم، ژنوتیپ‌های با مقاومت متوسط یک مزیت نسبی برای کاهش خسارت بیماری محسوب می‌شوند. بیماری برق‌زدگی نخود مهمترین چالش تولید محصول نخود به ویژه در کشت‌های زمستانه است. تلاش‌های گسترده جهت غربالگری ژرم‌پلاسم‌های نخود در مناطق مختلف جهت شناسایی منابع‌مقاومت انجام شده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که شدت پرآزاری جدایه قارچ و غلظت اسپور تأثیر مهمی روی نتایج غربالگری داشت و هیچ کدام از ژنوتیپ‌های مورد بررسی به جدایه A6 (پرآزاری شدید) مقاومت کافی نشان ندادند. برخی ژنوتیپ‌های بانک ژن در برابر جدایه‌ی A3 مقاومت بیشتری در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها از جمله توده‌های محلی بیوه‌نیج و گریت نشان دادند که بیانگر وجود ژنهای کوچک اثر در این ژنوتیپ‌ها است. با توجه به مقاومت نسبی برخی ژنوتیپ‌های نخود منتخب بانک ژن در برابر بیماری برق‌زدگی، پتانسیل استفاده از این ژنها جهت تجمیع در منابع مقاومت به بیماری در برنامه به‌نژادی نخود وجود دارد مخصوصاً برای مناطقی که نژاد ۳ و یا جدایه‌های با پرآزاری پایین شایع هستند. همچنین باتوجه به اینکه ارقام افتراقی مورد استفاده در این تحقیق، در بیشتر مطالعات بررسی تنوع بیماری‌زایی جمعیت قارچ در کشورهای مختلف استفاده شده‌اند، نتایج واکنش ارقام افتراقی در غلظت‌های مختلف اسپور به شدت پرآزاری جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق، امکان تمایز بهتر سطوح مختلف پرآزاری جمعیت قارچ در مناطق مختلف را در آینده فراهم می‌کند.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد جهت فراهم نمودن گلخانه و اطاقک رشد، تشکر و قدردانی می گردد.

References

Ahmad S, Khan MA, Sahi ST, Ahmad R, 2013. Evaluation of Chickpea Germ plasm against *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab. *Journal of Animal & Plant Sciences* 23(2): 440–443.

Atik O, Seid A, Mathew MA, Muhammad I, Aladdin H, *et al*., 2013. Pathogenic and genetic diversity of *Didymella rabiei* affecting chickpea in Syria. *Crop Protection* 46: 70–79.

Bhardwaj R, Sandhu JS, Kaur L, Gupta SK, Gaur PM, Varshney R, 2010. Genetics of ascochyta blight resistance in chickpea. *Euphytica* 171: 337–343.

Chen W, Coyne CJ, Peever TL, Muehlbaur FJ, 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant Pathology* 53: 759–769.

Elliott VL, Taylor PWJ, Ford R, 2011. Pathogenic variation within the 2009 Australian *Ascochyta rabiei* population and implications for future disease management strategy. *Australasian Plant Pathology* 40: 568–574.

Gan YT, Siddique KHM, MacLeod WJ, Jayakumar P, 2006. Management options of minimizing the damage by ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research* 97: 121–134.

Ghiai S, Razavi M, Shahriyari D, 2012. Study on pathogenic and molecular variability in some isolates of *Ascochyta rabiei* causal agent of Ascochyta blight of chickpea in Iran. *Journal of Applied Entomology and Phytopathology* 79: 199–218 (In Persian with English abstract).

Hafiz A, Ashraf M, 1953. Studies on the inheritance of resistance to Mycosphaerella blight in gram. *Phytopathology* 43: 580–581.

Hamwieh A, Imtiaz M, Hobson K, Kemal SA, 2013. Genetic diversity of microsatellite alleles located at quantitative resistance loci for Ascochyta blight resistance in a global collection of chickpea germ plasm. *Phytopathologia Mediterranea* 52(1): 183–191.

Imtiaz M, Abang, MM, Malhotra RS, Ahmed S, Bayaa B, *et al*., 2015. Pathotype IV a new and highly virulent pathotype of *Didymella rabiei*, causing ascochyta blight in chickpea in Syria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 48: 921–930.

Kanouni H, Talei A, Peyghambari SA, Okhovat SM, Abang M, 2011. Impact concentrations on Ascochyta blight incidence in two chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 13(2): 368–379 (In Persian with English abstract).

Kavousi HR, Mozafari J, Marashi SH, Bagheri AR, 2014. Reaction of desi and kabuli chickpea genotypes against ascochyta blight. *Journal of Plant Protection* 48(2): 242–249 (In Persian with English abstract).

Kimurto PK, Towetti BK, Mulwa RS, Njogui N, Jeptanui L, *et al*., 2013. Evaluation of chickpea genotypes for resistance to ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) disease in the dry highlands of Kenya. *Phytopathologia Mediterranea* 52(1): 212–221.

Labdi M, Malhotra R, Benzohra I, Imtiaz M, 2013. Inheritance of resistance to *Ascochyta rabiei* in 15 chickpea germplasm accessions. *Plant Breeding* 132: 197–199.

Li Y, Ruperao P, Batley J, Edwards D, Davidson J, et al., 2017. Genome analysis identified novel candidate genes for ascochyta blight resistance in chickpea using whole genome re-sequencing data. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–13.

Nourollahi K, Javannikkhah M, Naghavi MR, Okhovat SM, 2009. Pathogenic diversity in *Didymella rabiei* from Iranian Ilam and Kermanshah provinces. *Journal of Plant Protection* 23(2): 56–65 (In Persian with English abstract).

Pande S, Siddique KHM, Kishor GK, Bayaa B, Gaur PM, *et al*., 2005. Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenecity, and disease management. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 317–332.

Pande S, Sharma M, Gaur PM, Basandrai AK, Kaur L, *et al*., 2013. Biplot analysis of genotype × environment interactions and identification of stable sources of resistance to Ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Australasian Plant Pathology* 42: 561–571.

Peever TL, Chen W, Abdo Z, Kaiser WJ, 2012. Genetics of virulence in *Ascochyta rabiei. Plant Pathology* 61: 754–760.

Reddy MV, Singh KB, 1984. Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to ascochyta blight. *Plant Disease* 68: 900–901.

Singh KB, Reddy MV, 1990. Patterns of resistance and susceptibility to races of *Ascochyta rabiei* among germ plasm accessions and breeding lines of chickpea. *Plant Disease* 74: 127–129.

Shokouhifar F, Bagheri A, Falahati Rastegar M, Malekzadeh S, 2003. Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates in Iran. *Journal of Agriculture Sciences and Natural Resources* 10(1): 217–232 (In Persian with English abstract).

Trapero-Casas A, Kaiser WJ, 1992. Influence of temperature, wetness period, plant age and inoculum concentration on infection and development of ascochyta blight. *Phytopathology* 82: 589–596.

Turkkan M, Dolar FS, 2009. Determination of pathogenic variability of *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 33: 585–591.

Vail S, Banniza S, 2008. Structure and pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* populations on chickpea in the Canadian prairies. *Plant Pathology* 57: 665–673.

This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)