

## مقاله پژوهشی

شناسایی مولکولی نژادهای قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* عامل پژمردگی نخود در استان‌های غربی و شمال غربی ایرانجعفر شکری<sup>۱</sup>، محمد جوان نیکخواه<sup>۲</sup>✉، سعید رضائی<sup>۳</sup>، حمیدرضا زمانی‌زاده<sup>۳</sup>، خشنود نوراللهی<sup>۴</sup>

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و

تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ ۲- استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران،

کرج، ایران؛ ۴- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

(تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۹)

## چکیده

استان‌های غربی و شمال غربی ایران دارای بیشترین پتانسیل برای کشت نخود در ایران هستند. پژمردگی آوندی که توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC) ایجاد می‌شود یکی از بیماری‌های مهم نخود است که در کشت‌های نخود این استان‌ها انتشار دارد. این پژوهش باهدف شناسایی نژادهای بیماری‌زای قارچ FOC در استان‌های غربی و شمال غربی کشور انجام شد. نمونه‌برداری از سه کانون آلودگی در استان‌های فوق انجام و پس از جداسازی، شناسایی جدایه‌های قارچ با به‌کارگیری آغازگرهای اختصاصی FOC به روش PCR انجام شد. از بین ۱۱۶ جدایه شناسایی شده، ۹۴ جدایه متعلق به سه کانون، برای شناسایی نژاد انتخاب شدند. پنج نژاد R0، R1A، R1B/C، R6 و R5 به ترتیب بالاترین فراوانی در مناطق مورد مطالعه را داشتند. حضور پنج نژاد در استان‌های غربی و شمال غربی ایران از بین هشت نژاد شناسایی شده این قارچ در دنیا، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای قارچ در کشور است. پراکنش نژادهای این قارچ مستقل از شرایط محیطی است. واژه‌های کلیدی: آغازگر، پراکنش، پی سی آر، تنوع ژنتیکی

**Molecular identification of the races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of chickpea wilt in western and north western provinces of Iran**

J. SHOKRI<sup>1</sup>, M. JAVAN-NIKKHAH<sup>2</sup>✉, S. REZAAE<sup>3</sup>, H. R. ZAMANIZADEH<sup>3</sup>, KH. NOUROLLAHI<sup>4</sup>

1,3. Ph. D. student, Assistant Professor and Professor respectively; Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran; 2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran; 4. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

## Abstract

Western and north western provinces of Iran have the highest potential for chickpea cultivation in Iran. Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC) is one of the most important diseases of this crop which distributed in chickpea cultivation areas of these provinces. The purpose of this study was to identify the pathogenic races of FOC in the western and north western provinces. Sampling was conducted on three infected locations. After isolation of the fungal isolates, identification was performed using FOC specific primers by PCR method. Out of 116 isolates identified, 94 isolates belonging to three locations were selected to recognize the fungal races. Five races including R0, R1B/C, R1A, R6 and R5 showed the highest abundance in the studied areas, respectively. Presence of five races from the eight identified races of FOC in the world in western and north western provinces of Iran indicates the high genetic diversity of this fungus in the country and distribution of the races of this fungus is independent of environmental factors.

**Keywords:** Distribution, genetic diversity, polymerase chain reaction (PCR), primer

## مقدمه

نخود (*Cicer aritinum* L.) در شرایط اقلیمی استان‌های غربی و شمال غربی کشور (لرستان، کرمانشاه، کردستان و آذربایجان غربی) بیشتر در اواخر زمستان و اوایل بهار کشت می‌شود. این گیاه در دمای ۲ تا ۴ درجه سلسیوس جوانه می‌زند (باقری، ۱۳۷۶). نخود در ایران با اختصاص سطح ۴۶۳ هزار هکتار، معادل ۴/۰۷ درصد از کل محصولات زراعی و حدود ۶۵ درصد از کل سطح حبوبات را به خود اختصاص داده است. از این سطح حدود ۹۸/۴۳ درصد در اراضی دیم و بقیه در اراضی آبی کشت می‌شود. پنج استان یادشده جمعاً ۸۶/۸۱ درصد از برداشت اراضی نخود در کشور را دارا هستند (Anonymous, 2016).

قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* (FOC) عامل پژمردگی آوندی نخود معمولی (نخود ایرانی) می‌باشد. این قارچ به سرعت به ریشه گیاه حمله و با انسداد آوندهای چوبی، سبب کلروز و نکروز نخود می‌شود (Di Pietro *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2009).

قارچ FOC دارای دو پاتوتیپ زردی و پژمردگی است. اولین علائم زردی در برگ‌ها و آوندهای برگ‌ها به صورت تغییر رنگ ظاهر می‌شود و ۴۰ روز بعد از آلودگی، مرگ بوته اتفاق می‌افتد. درحالی‌که در پژمردگی، کلروز شدید، سستی و افتادگی اندام‌های هوایی بروز کرده و مرگ گیاهچه بعد از ۲۰ روز رخ می‌دهد (Jimenez-Gasco & Jimenez-Diaz, 2003). برای دو پاتوتیپ این قارچ، هشت نژاد بیماری‌زا (R0, R1A, R1B/C, R2, R3, R4, R5, R6) گزارش شده است که دارای انتشار جغرافیایی وسیعی در دنیا می‌باشند (Nene *et al.*, 1988) و هریک از آن‌ها به یکی از دو پاتوتیپ زردی و پژمردگی تعلق دارند. پاتوتیپ زردی شامل نژادهای R0 و R1B/C و پاتوتیپ پژمردگی شامل نژادهای R1A, R2, R3, R4, R5, R6 است (Trapero-Casas & Jiménez-Diaz, 1985). نژادهای R0, R1A, R1B/C, R5 و R6 از مدیترانه و کالیفرنیا (Halila & Strange, 1996; Jimenez-Diaz *et al.*, 1993; Jimenez-Gasco *et al.*,

2001)، نژادهای R1A, R2, R3 و R4 از هندوستان (Haware & Shehabu *et al.*, 1982)، نژادهای R2 و R3 از اتیوپی (Nene, 1982) و ترکیه (Bayraktar & Dolar, 2012) و نژاد R4 از اتیوپی (Shehabu *et al.*, 2008) گزارش شده‌اند. در پژوهش انجام‌شده توسط یونسی (۲۰۰۴) برای تعیین نژادهای قارچ *F.oxysporum f. sp. ciceris* در چند استان غربی کشور، گروه بیماری‌زای (۱) عکس‌العمل‌های یکسانی با نژاد (۱) معرفی شده توسط هاوار و نن (۱۹۸۱) را روی کلیه ارقام افتراقی نخود مورد استفاده نشان داد که نژاد R1B/C می‌باشد. این گروه شامل یک جدایه است که از استان لرستان جداسازی شده است؛ بنابراین، وجود نژاد R1B/C در استان لرستان محرز می‌باشد (یونسی، ۲۰۰۴). تلاش‌های زیادی برای مدیریت این بیماری از جمله تغییر تاریخ کشت، استفاده از ارقام مقاوم و ضد عفونی بذر نخود انجام شده است (Padilla-Valenzuela *et al.*, 2008). از میان فاکتورهای که به توسعه قارچ FOC کمک می‌کنند می‌توان به رطوبت بیش از حد خاک، خاک‌های با بافت رسی، زهکشی ضعیف به همراه کمبود پتاسیم و زیادی سدیم و دمای ۲۵-۲۸ درجه سلسیوس اشاره کرد (Bhatti & Kraft, 1992).

هدف از این پژوهش، شناسایی نژادهای بیماری‌زا FOC در مناطق عمده کشت نخود ایرانی در ایران با استفاده از آغازگرهای اختصاصی است.

## روش بررسی

## نمونه برداری

در این پژوهش نمونه برداری و تهیه جدایه‌های قارچ FOC در استان‌های غربی کشور (لرستان، کرمانشاه، کردستان و آذربایجان غربی) انجام شد. برای این منظور، از استان لرستان تا آذربایجان غربی، سه کانون نمونه برداری بر مبنای موانع طبیعی و صعب‌العبور مانند رشته‌کوه‌ها و نظایر آن انتخاب شد. هر کانون با شعاع حدود ۶۰ کیلومتر و فاصله حداقل ۱۲۰ کیلومتر از کانون دیگر انتخاب شد (شکل ۱). همچنین،

### جداسازی و نگهداری جدایه‌ها

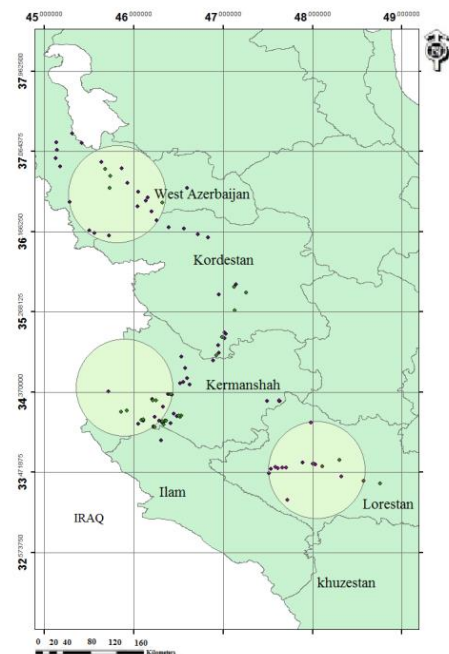
برای جداسازی قارچ، از ناحیه طوقه و ابتدای ساقه هر نمونه، قطعات حدود ۵ میلی‌متر تهیه گردید. پس از ضدعفونی سطحی به مدت یک دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده (یک درصد ماده فعال) به مدت ۴۵ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شده و سه بار با آب مقطر سترون شستشو شدند (Nourollahi *et al.*, 2016). رطوبت آن‌ها توسط کاغذ صافی سترون گرفته شد و قطعات در محیط اختصاصی PPA (۱۵ گرم پیتون، ۱ گرم  $KH_2PO_4$ ، ۰/۵ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۲۰ گرم آگار، ۱۰۰۰ ppm سولفات استرپتومایسین، ۱۲۰ ppm سولفات نئومایسین، ۱ گرم PCNB (75% Wettable powder) در یک لیتر آب مقطر) و محیط عمومی PDA (مرک آلمان) درون تشتک پتری کشت و به مدت ۵-۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس درون انکوباتور قرار داده شدند (Nelson *et al.*, 1983).

از پرگنه‌های رشد کرده با ویژگی‌های *Fusarium* که احتمال داده می‌شد متعلق به *F. oxysporum* باشند، به روش تک‌کنیدوم جدایه خالص به دست آمد. از آن‌جایی که *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* قارچی خاکزی است، برای نگهداری طولانی مدت آن می‌توان از ماسه‌بادی یا کشت بر روی نوارهای کاغذ صافی سترون شده استفاده نمود. برای این منظور، قطعاتی از نوار کاغذی سترون شده به مدت دو الی سه روز در محیط کشت PDA حاوی جدایه قارچ قرار داده شد. سپس قطعات کاغذی آلوده به قارچ را در زیر هود استریل در درون پاکت‌های کاغذی سترون شده منتقل و برای خشک شدن در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس قطعات کاغذی آلوده به قارچ به درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری برای نگهداری طولانی مدت به دمای ۲۰- درجه سلسیوس انتقال یافتند (Fisher *et al.*, 1982).

### شناسایی ریخت شناختی جدایه‌ها

برای شناسایی ریخت شناختی هر جدایه، ویژگی‌های ماکروسکوپی همانند رنگ، شکل ظاهری و نرخ رشد پرگنه پس از دو هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری

در مزارع خارج از سه کانون و در حفاصل کانون‌ها چندین نمونه بوته نخود مشکوک به آلودگی (دارای نشانه‌های زردی یا سبزخشکی) به صورت تصادفی تهیه شد. نمونه‌برداری از گیاهانی انجام شد که به طور شاخص علائم بیماری را نشان می‌دادند. در سطح هر مزرعه (بیش از یک هکتار) به صورت زیگزاکتی حرکت کرده و به طور تصادفی ۵-۶ بوته مشکوک به بیماری برداشته شد. هر نمونه درون پاکت کاغذی به آزمایشگاه منتقل گردید. در مجموع ۱۸۰ نمونه گیاه نخود با نشانه‌های آلودگی به این بیماری جمع‌آوری شد. نمونه‌ها (تا ۱۰ سانتی متری بالای طوقه) در زیر جریان آب روان به مدت ۲۰ الی ۳۰ دقیقه شستشو و بعد از خشک شدن در دمای ۲۵-۲۸ درجه سلسیوس، جداگانه درون پاکت کاغذی قرار داده و روی آن کد شناسایی ثبت شد.



شکل ۱- کانون‌های آلودگی بیماری پژمردگی نخود معمولی در استان‌های غربی و شمال غربی ایران که برای نمونه‌برداری انتخاب شدند. کانون‌ها با دایره آبی روشن در روی نقشه نشان داده شده‌اند.

**Fig. 1.** Infection locations of chickpea wilt in western and north western provinces of Iran selected for sampling. The locations are shown in pale blue circles on the map.

### شناسایی مولکولی نژادهای FOC

براساس منابع و پژوهش‌های قبلی در کشورهای هندوستان، اسپانیا و مکزیک، برای تعیین نژادهای قارچ FOC، از ۱۲ جفت آغازگر اختصاصی در این پژوهش استفاده شد (Arvaio-Ortiz *et al.*, 2011; Jiménez-Gasco *et al.*, 2001). آغازگرها توسط شرکت متابیون آلمان (Metabion international AG) ساخته شدند و پس از رقیق کردن، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر در مخلوط شامل (۱۲/۵ میکرولیتر 2X PCR Master Mix، ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر تریقی، ۱ میکرولیتر (۱۰ pmol/ml) آغازگر F اختصاصی هر نژاد، ۱ میکرولیتر (۱۰ pmol/ml) آغازگر R اختصاصی هر نژاد، ۲۰ نانوگرم DNA قارچ) در دستگاه ترموسایکلر (Biorad T100) ساخت کشور سنگاپور انجام گردید. برنامه حرارتی برای واکنش PCR شامل یک چرخه واسرشت اولیه دردمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۳۶ چرخه با واسرشت در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای متناسب با آغازگر (جدول ۱) به مدت ۱ دقیقه و بسط دردمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه با یک بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود.

محصول PCR در دستگاه الکتروفورز از ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TBE IX در ولتاژ ۱۱۰ به مدت ۶۰ دقیقه عبور داده شد. از نشانگر اندازه DNA بانام SM0323 در ژل به کار گرفته شد که قطعاتی با اندازه ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز را نشان می‌داد. عکس برداری از ژل با دستگاه UVITEC ساخت کشور انگلیس انجام شد.

ارزیابی ارتباط پراکنش نژادهای بیماری‌زا با فاکتورهای غیرزنده با استفاده از دستگاه GPS در هنگام نمونه برداری، مشخصات جغرافیایی هر محل نمونه برداری شامل طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا مشخص گردید. به استناد آمار ایستگاه‌های هواشناسی، میزان متوسط دما و بارندگی مناطق نمونه برداری تعیین گردید (Castellanos *et al.*, 2000).

(۱۲ ساعت نوری معمولی و ۱۲ ساعت نوری Near-UV) روی محیط کشت PDA و ویژگی‌های میکروسکوپی همانند، رنگ اسپورودوکيوم، وضعیت فیالیدها، شکل و اندازه ماکروکنیدیوم‌ها، میکروکنیدیوم‌ها و کلامیدوسپورها روی محیط کشت CLA و SNA ارزیابی شد (Gerlach & Nirenberg, 1982). شناسایی جدایه‌ها با استفاده از کلیدها و منابع شناسایی گونه‌های فوزاریوم (Nelson *et al.*, 1983; Leslie & Summerell, 2006) انجام گردید.

### شناسایی مولکولی FOC

از جفت آغازگر FOC-f(5'-GGCGTTTCGCAGCCTTACAATGAAG-3') و FOC-r(5'-GACTCCTTTTCCCGAGGTAGGTCAGAT-3') برای تکثیر قطعه DNA به درازای ۱۵۰۰ جفت باز جهت تشخیص مولکولی این فرم اختصاصی (Arvaio-Ortiz *et al.*, 2011) در روش PCR استفاده گردید. استخراج DNA برای هر جدایه به روش CTAB انجام شد (Doyle & Doyle, 1987). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر در مخلوطی شامل (۱۲/۵ میکرولیتر 2X PCR Master Mix، ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر تریقی، ۱ میکرولیتر (۱۰ pmol/ml) آغازگر اختصاصی F، ۱ میکرولیتر (۱۰ pmol/ml) آغازگر اختصاصی R، ۲۰ نانوگرم DNA قارچ) در دستگاه ترموسایکلر (Biorad T100) ساخت کشور سنگاپور انجام گردید. برنامه حرارتی برای واکنش PCR شامل یک چرخه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه با یک بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. محصول PCR در دستگاه الکتروفورز از ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TBE IX در ولتاژ ۱۱۰ به مدت ۶۰ دقیقه عبور داده شد. از نشانگر اندازه DNA بانام تجاری SM0323 در ژل استفاده شد که قطعاتی با اندازه ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز را نشان می‌داد. عکس برداری از ژل با دستگاه UVITEC ساخت کشور انگلیس انجام شد.

اختلاف، میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی (Tukey) در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند. تمام آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS18 انجام شد.

آنالیز و تحلیل آماری: مقایسه داده‌های به‌دست‌آمده در مناطق مختلف نمونه‌برداری با آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام شد. در صورت معنی‌دار بودن

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده برای شناسایی مولکولی نژادهای بیماری‌زای قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Arvaio-Ortiz et al., 2011; Jiménez-Gasco et al., 2001).

**Table 1.** Primers used for molecular identification of pathogenic races of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Arvaio-Ortiz et al., 2011; Jiménez-Gasco et al., 2001).

Primers	Primer sequence (5' to 3')	Melting Point (°C)	Race	Amplicon size (Kbp)
FOC-0f	GGAGAGCAGGACAGCAAAGACTA	65	R0	0.9
FOC-0r	GGAGAGCAGCTACCCTAGATACACC	69		
FOC-1B/Cf	GAGAGCAGGGTCAGCGTAGATAG	66	R1B/C	0.5
FOC-1B/Cr	GCAGCAGAAGAGGAAGAAAATGTA	62		
FOC-5f	GGAAGCTTGGCATGACATAC	58	R5	0.9
FOC-5r	AAGCTTGGGCACCCTCTT	56		
FOC-6f	GAGCAGTCAATGGCAATGG	57	R6	1.0
FOC-6r	AGAGCAGGGTCAGCGTAGATA	61		
OPF-12	ACGGTACCA	32	R1B/C R0 R2	1.1 0.39 0.9
OPF-06	GGGAATTCGG	32	R1B/C R3	1.9 2
OPF-10	GGAAGCTTGG	32	R1B/C R4 R5	0.51 0.95 0.9
OPL-01	ACCTGGACAC	32	R1A R0 R1B/C	1 1.2 2.7

• آغازگرهای دکامر (RAPD): OPF-12, OPF-06, OPF-10 و OPL-01

## نتایج

### جدایه‌های FOC

فیوروق، شاهین‌دژ، حیدرلو و قیام ولدیان) به‌دست آمد که در مجموع ۹۴ جدایه را شامل می‌شد. سایر جدایه‌های FOC به‌صورت پراکنده در حدفاصل کانون‌های آلودگی به‌دست آمدند (شکل ۱).

#### شناسایی نژادهای FOC

برای ۹۴ جدایه متعلق به سه کانون آلودگی (شکل ۱) شناسایی نژادها به روش مولکولی انجام شد. پنج نژاد بیماری‌زای R0, R6, R1A, R1B/C و R5 در بین جدایه‌ها شناسایی شدند (شکل ۳).

استفاده از آغازگر R0 برای تعیین نژاد R0: از ۹۴ جدایه به‌دست‌آمده در سه کانون نمونه‌برداری، ۳۰ جدایه با این آغازگر باندی به درازای ۹۰۰ جفت باز تولید کردند که متعلق

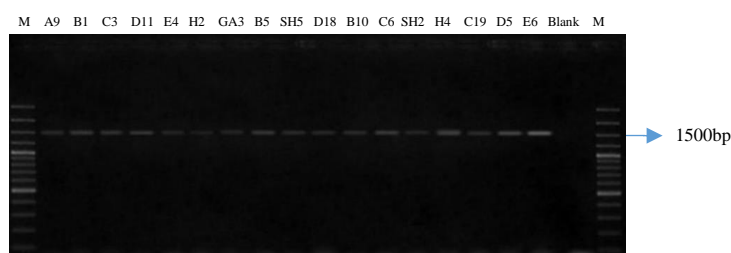
ازهر کانون نمونه‌برداری ۴۰-۳۰ جدایه قارچ FOC به‌دست آمد. از بین ۲۵۵ جدایه به‌دست‌آمده از نمونه‌های گیاهی، ۲۳۵ جدایه متعلق به جنس *Fusarium* بودند. از بین آن‌ها، ۱۱۶ جدایه پس از تکثیر اختصاصی باند DNA به درازای ۱۵۰۰ جفت باز، FOC تشخیص داده شدند (شکل ۲). از بین ۱۱۶ جدایه، ۳۱ جدایه در کانون آلودگی اول (پل‌دختر، کوه‌دشت، ازنا، گریت، بساط آباد، الشتر و خرم‌آباد)، ۴۰ جدایه در کانون آلودگی دوم (گیلان غرب، اسلام‌آباد، تازه‌آباد، کرند غرب، ماهی‌دشت، کوزران، جوانرود، روانسر، هرسین و کامیاران) و ۲۳ جدایه در کانون آلودگی سوم (سقز، زرینه آب‌تو، دهگلان، هزارکانیان، اشنویه، سردشت، بانه، بوکان،

استفاده از آغازگر R5 برای تعیین نژاد R5 از ۳۹ جدایه که با دو آغازگر R0 و R1B/C بانندی تکثیر نکرده بودند، ۱۰ جدایه با این آغازگر بانندی به درازای ۹۰۰ جفت باز تولید کردند که متعلق به نژاد R5 می‌باشند. از ۱۰ جدایه نژاد R5، ۴، ۶ و صفر جدایه به ترتیب متعلق به کانون اول، دوم و سوم نمونه‌برداری بودند.

استفاده از آغازگر R6 برای تعیین نژاد R6 از ۲۹ جدایه باقی‌مانده در سه کانون نمونه‌برداری که با

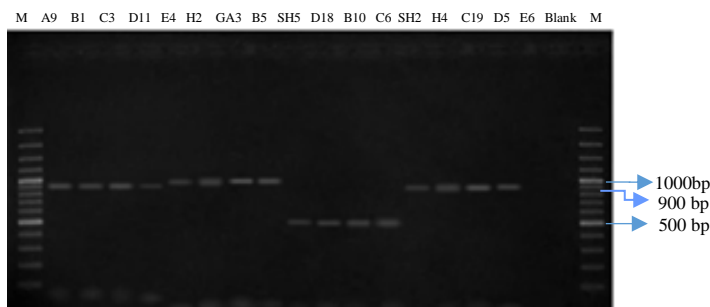
به نژاد R0 می‌باشند. از ۳۰ جدایه نژاد R0، ۹، ۱۲ و ۹ جدایه به ترتیب متعلق به کانون اول، دوم و سوم نمونه‌برداری بودند.

استفاده از آغازگر R1B/C برای تعیین نژاد R1B/C از ۶۴ جدایه باقی‌مانده در سه کانون نمونه‌برداری، ۲۵ جدایه با این آغازگر بانندی به درازای ۵۰۰ جفت باز تولید کردند که متعلق به نژاد R1B/C می‌باشند. از ۲۵ جدایه نژاد R1B/C، ۹، ۷ و ۹ جدایه به ترتیب متعلق به کانون اول، دوم و سوم نمونه‌برداری بودند.



شکل ۲- باندهای DNA به درازای ۱۵۰۰ جفت باز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر FOC-f و FOC-r برای تشخیص اختصاصی جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* به دست آمده از نمونه‌های نخود ایرانی دارای نشانه‌های پژمردگی در استان‌های غربی و شمال غربی ایران. بالای شکل: کد جدایه‌های مختلف قارچ. M: نشانگر اندازه DNA.

**Fig. 2.** DNA band of 1500 bp in agarose gel 0.8% amplified using FOC-f and FOC-r primer pairs for specific detection of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* obtained from Iranian chickpea specimens with symptoms of wilt in the western and north western provinces of Iran. Above picture: Different isolate codes of the fungus. M: Marker for DNA size.



شکل ۳- باندهای DNA روی ژل آگارز ۰/۸ درصد برای تشخیص اختصاصی نژادهای قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* به دست آمده از نمونه‌های نخود ایرانی دارای نشانه‌های پژمردگی در استان‌های غربی و شمال غربی ایران. از چپ به راست: باندهای DNA به اندازه ۹۰۰ جفت باز برای چهار جدایه (H2-SH5-B10-C4) متعلق به نژاد R0، باندهای DNA به اندازه ۱۰۰۰ جفت باز برای دو جدایه (E4-A8) متعلق به نژاد R6، باندهای DNA به اندازه ۱۰۰۰ جفت باز برای دو جدایه (D14-B12) متعلق به نژاد R1A، باندهای DNA به اندازه ۵۰۰ جفت باز برای چهار جدایه (M2-C19-B20-A4) متعلق به نژاد R1B/C، باندهای DNA به اندازه ۹۰۰ جفت باز برای چهار جدایه (B3-D12-A11-C17) متعلق به نژاد R5. M: نشانگر اندازه DNA.

**Fig. 2.** DNA bands on agarose gel 0.8% for detection of the races of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* obtained from Iranian chickpea specimens with symptoms of wilt in western and north western provinces of Iran. from left to right: DNA bands of 900 bp for four isolates (H2-SH5-B10-C4) belonging to Race 0, DNA bands of 1000 bp for two isolates (E4-A8) belonging to Race 6, DNA bands of 1000 bp for two isolates (D14-B12) belonging to Race 1A, DNA bands of 500 bp for four isolates (M2-C19-B20-A4) belonging to Race 1B/C, DNA bands of 900 bp for four isolates (B3-D12-A11-C17) belonging to Race 5. M: Marker for DNA size.

گیاهچه نخود، به‌عنوان فاکتورهای غیرزنده مؤثر در نحوه پراکنش نژادهای قارچ بررسی شد (جدول ۲).

ارتفاع از سطح دریا از ۲۴۱۵ متری (هزارکانیان کردستان) تا ۷۸۹ متری (گیلان غرب کرمانشاه) متغیر بود. متوسط دمایی ماه‌های اسفند و فروردین ماه که مصادف با مرحله رشدی اولیه نخود می‌باشد از ۴/۴ درجه سلسیوس (زیرینه آباتو کردستان) تا ۱۸/۵ درجه سلسیوس (پل دختر لرستان) متغیر بود. همچنین متوسط بارندگی ماه‌های اسفند و فروردین ماه از ۵۳ میلی‌متر (الشر لستان) تا ۱۵۷/۳ میلی‌متری (جوانرود کرمانشاه) متفاوت بود.

جدول ۲- ارتفاع از سطح دریا، متوسط دما و متوسط بارندگی مناطق نمونه برداری قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*، در استان های لرستان، کرمانشاه، کردستان و آذربایجان غربی.

**Table 2.** Altitude from sea level, average temperature and average rainfall of sampling regions of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* the causal agent of vascular wilting of chickpeain in Lorestan, Kermanshah, Kordestan and West Azarbaijan provinces, Iran.

Sampling region	Sea level (m)	Average temperature (°C)	Average rainfall (mm)
Pol-e Dokhtar	1056	18.5	76.9
Kuhdasht	1266	13	63.25
Azna	1589	10.2	55.45
Gerit	1815	17.25	103.25
Basatabad	1518	9.95	95.5
Aleshtar	1719	9.9	53
Khorramabad	1219	13.65	59.35
Gilan-e- Garb	789	15.5	127.35
Islamabad-e Garb	1376	10.2	124.1
Tazehabad	1802	12.2	122.25
Kerend-e Gharb	1549	12	74.95
Mahidasht	1313	12.5	125.25
Kuzaran	1375	11.9	120.2
Javanrud	1511	11.55	157.3
Ravansar	1406	11.15	130.35
Harsin	1440	11.8	79.5
Kamyanaran	1328	10.7	111.5
Saqqez	1594	8.45	58.7
Zarrineh	2068	4.4	65.5
Dehgolan	1626	10.7	78.55
Hezar Kanian	2415	6.3	84.3
Ghiam-e Waldian	1765	9.05	102.9
Sardasht	1196	9	133.5
Baneh	1363	8.7	105.65
Bukan	1405	10.95	54.65

سه آغازگر قبلی تکثیر باند نکردند، ۱۱ جدایه با این آغازگر باندی به درازای ۱۰۰۰ جفت باز تولید کردند که متعلق به نژاد R6 می‌باشند. از ۱۱ جدایه نژاد R6، ۳، ۶ و ۲ جدایه به ترتیب متعلق به کانون اول، دوم و سوم نمونه‌برداری بودند.

#### استفاده از آغازگر RIA برای تعیین نژاد RIA

از ۱۸ جدایه به دست آمده در سه کانون نمونه‌برداری که با هیچ‌یک از آغازگرهای اختصاصی نژاد تکثیر باند نکرده بودند با آغازگر RIA، باندی به درازای ۱۰۰۰ جفت باز تولید کردند که متعلق به نژاد RIA می‌باشند. از ۱۸ جدایه نژاد RIA، ۶، ۷ و ۵ جدایه به ترتیب متعلق به کانون اول، دوم و سوم نمونه‌برداری بودند.

از نظر فراوانی، نژاد R0 با ۲۹/۰۳ درصد در کانون آلودگی اول، ۳۹ درصد در کانون آلودگی دوم، ۳۹/۲ درصد در کانون آلودگی سوم و با میانگین ۳۱/۹۱ درصد در مجموع سه کانون آلودگی، فراوان‌ترین نژاد محسوب می‌شود. نژاد R1B/C با ۲۹/۰۳ درصد در کانون آلودگی اول، ۲۲/۵ درصد در کانون آلودگی دوم، ۳۰/۴ درصد در کانون آلودگی سوم و با ۲۶/۶ درصد در مجموع سه کانون آلودگی، دومین نژاد فراوان است. نژاد RIA با ۱۹/۳۴ درصد در کانون آلودگی اول، ۱۷/۵ درصد در کانون آلودگی دوم، ۲۱/۸ درصد در کانون آلودگی سوم و با میانگین ۱۹/۱۵ درصد در مجموع سه کانون آلودگی، نژاد R6 با ۹/۷ درصد در کانون آلودگی اول، ۱۵ درصد در کانون آلودگی دوم، ۸/۶ درصد در کانون آلودگی سوم و با میانگین ۱۱/۷ درصد در مجموع سه کانون آلودگی، نژاد R5 با ۱۲/۹ درصد در کانون آلودگی اول، ۱۵ درصد در کانون آلودگی دوم، صفر درصد در کانون آلودگی سوم و با میانگین ۱۰/۶۴ درصد در مجموع سه کانون آلودگی، به ترتیب در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند.

#### ارتباط پراکنش نژادها با فاکتور محیطی

ارتفاع از سطح دریا در مناطق نمونه‌برداری همراه با متوسط دمایی و متوسط میزان بارندگی در مرحله ابتدایی رشد

کانون‌های نمونه‌برداری انجام شد. در مجموع برای ۹۴ جدایه تعیین نژاد شده در سه کانون رگرسیون بین نژاد با سه فاکتور محیطی بررسی شد. از آنجایی که رگرسیون بین نژاد با ارتفاع، ۰/۲۹۷، دما ۰/۶۶۲ و رطوبت ۰/۸۲۳ می‌باشد و همگی از ۰/۰۵ بیشتر است، پس بین نژاد و سه فاکتور محیطی از لحاظ آماری همبستگی وجود ندارد.

در کانون‌های آلودگی بین دما و بارش با پراکنش نژاد از لحاظ آماری همبستگی وجود نداشت. تأثیر ارتفاع در پراکنش نژادها در کانون‌های آلودگی لرستان و کرمانشاه، به صورت یکنواخت و در کردستان و آذربایجان غربی، تصادفی بود.

جدول ۳- رگرسیون بین نژاد و فاکتورهای محیطی جدایه‌های قارچ FOC به دست آمده از استان‌های غربی و شمال غربی کشور (لرستان، کرمانشاه و کردستان-آذربایجان غربی).

**Table 3.** Regression between ethnicity and environmental factors of FOC isolates obtained from western and northwestern provinces of Iran (Lorestan, Kermanshah and Kordestan-West Azerbaijan).

	rainfall	temperature	Sea level	Race
<b>Pearson correlation</b>	0.023	0.046	-0.109	1
<b>Sig (p value)*</b>	0.823	0.662	0.297	-
<b>Total</b>	94	94	94	94

\*p value ≤ ۰/۰۵: پراکنش نژادها مستقل از فاکتورهای محیطی است.  
0.05 ≤ p value: Racial distribution is independent of environmental factors.\*

آنالیز آماری دما، رطوبت و ارتفاع از سطح دریا به عنوان سه فاکتور در پراکنش نژادهای بیماری‌زای این قارچ در

جدول ۴- پراکنش نژادهای قارچ FOC بر اساس فاکتورهای محیطی.

**Table 4.** Distribution of FOC races based on environmental factors.

infected locations	Statistical distribution	X2	(P*) Race -Sea level	Statistical correlation at the level 0.05	(P*) Race-rainfall	Statistical correlation at the level 0.05	(P*) Race - temperature
<b>First Location</b>	X2>15.560	20.07	15.560	P ≥ 0.05	0.743	P ≥ 0.05	0.868
<b>Second Location</b>	X2>15.980	21.66	15.980	P ≥ 0.05	0.455	P ≥ 0.05	0.161
<b>Third Location</b>	35.17X2<13.09	13.09 ، 35.17	15.640	P ≥ 0.05	0.577	P ≥ 0.05	0.36

p\*=p value

P ≥ 0.05: The lack of statistical correlation and distribution of races is uniform

X2>ID: Zero assumption is rejected and the distribution of races is uniform

ID2<X2>ID1: Zero assumption is not rejected and race distribution is random

رادارند، اشتباه شود. در بررسی تأثیر عوامل محیطی در پراکنش نژادها، ارتفاع از سطح دریا در مناطق رشد نخود در نواحی غربی و شمال غربی کشور بین ۲۴۱۵-۷۸۹ متر متغیر است. متوسط دما در مراحل اولیه رشد نخود در این نواحی بین ۱۸/۵-۴/۴ درجه سلسیوس و متوسط بارندگی بین ۱۵۷/۳-۵۳ میلی‌متر متفاوت بود. حدود ۹۸ درصد سطح زیر کشت نخود در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران با میزان بارندگی ۶۰۰-۲۰۰ میلی‌متر می‌باشد (Anonymous, 2016). در کانادا دمای منفی ۱۷-۵/۷- و حداکثر ۲۷-۲۴ درجه سلسیوس

عدم همبستگی آماری و توزیع نژادها بصورت یکنواخت است  $P \geq 0/05$

فرض صفر رد می‌شود و توزیع نژادها بصورت یکنواخت است  $X2 > ID$

فرض صفر رد نمی‌شود و توزیع نژادها بصورت تصادفی است  $ID2 < X2 > ID1$

## بحث

در این پژوهش جهت تعیین نژادهای بیماری‌زای قارچ عامل بیماری پژمردگی نخود از مزارع نخود استان‌های لرستان، کرمانشاه، کردستان و آذربایجان غربی نمونه‌برداری شد. گیاهان با نشانه‌های آلودگی به بیماری پژمردگی آوندی که علائم شاخص را داشتند، فقط قارچ FOC از آن‌ها جدا شد، ۶۴ درصد کل بوته‌های آلوده در سه کانون را تشکیل دادند. با این حال، این بیماری ممکن است با دیگر بیماری‌های نخود (بیماری ویروسی نخود) که علائم مشابه با این بیماری



هفتاد و شش جدایه FOC در شش منطقه مختلف سودان به همراه ۱۴ جدایه FOC از سوریه و لبنان با استفاده از مارکرهای RAPD، SSR و SCAR مطالعه شده اند. بر مبنای ضریب تشابه، جدایه‌ها در دو کلاستر بزرگ به همراه هفت گروه قرار گرفتند. کلاستر اول شامل جدایه‌های سودان که متعلق به نژاد R0 و R2 و کلاستر دوم جدایه‌های سوریه و لبنان به ترتیب متعلق به نژادهای R1B/C و R6 قرار گرفتند. این پژوهش وجود نژاد جدید R0 در سودان را نشان داد (Elmahi Mohamed *et al.*, 2015).

هفتاد جدایه FOC از ۱۳ ایالت مختلف و چهار منطقه کوهستانی هندوستان به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین نژاد مطالعه شده اند. با مایه زنی عامل بیماری روی ارقام افتراقی C1040، JG74، CPS1، BG212، WR315، KWR108، DCP92-3 و JG62 تعیین نژاد شدند و با استفاده از مارکرهای ISSR، SSR و RAPD آنالیز مولکولی شدند. تمامی نشانگرها چندشکلی ۱۰۰ درصد داشتند. جدایه‌ها در هشت گروه، با تشابه ژنتیکی بین جدایه‌ها ۲۷-۴۰ درصد قرار گرفتند. جدایه‌های این هشت گروه تا اندازه‌ای از لحاظ منشأ جغرافیایی و شدت بیماری‌زایی باهم مرتبط بودند (Dubey *et al.*, 2012). در پژوهشی، جدایه‌های FOC در هشت استان واقع در چهار منطقه متفاوت ترکیه به منظور تعیین نژاد بررسی شد. تمام جدایه‌ها روی ۱۰ رقم افتراقی نخود، JG 62، C 104، JG 850 و L 550، Chafa، Annigeri، WR 315، BG 212، CPS 1، 74 3/2 آزمون شدند. بر اساس عکس‌العمل ارقام افتراقی به جدایه‌های FOC، سه نژاد R0، R2 و R3 شناسایی شد (Bayraktar *et al.*, 2012).

نژادهای R0، R1B/C، R5 و R6 قارچ FOC با استفاده از مارکر SSR در مکزیک تعیین نژاد شدند (Arvaio-Ortiz *et al.*, 2011) در پژوهشی که برای تعیین نژاد و تنوع ژنتیکی قارچ FOC در هندوستان انجام گرفت از ۴۳ جدایه در نه منطقه مختلف هندوستان با استفاده از مارکرهای RAPD و AFLP استفاده

برای توسعه قارچ *F. oxysporum* ثبت شده است (Vujanovic *et al.*, 2006). عوامل محیطی از جمله ارتفاع از سطح دریا، دما، رطوبت، بافت خاک، pH خاک، EC خاک و میزان سدیم و پتاسیم خاک در توسعه بیماری اهمیت دارند (Landa *et al.*, 2006). پژوهش حاضر، نشان داد که بین پراکنش نژادهای FOC و دما، رطوبت و ارتفاع از سطح دریا تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و پراکنش نژادها به صورت یکنواخت می‌باشد. به جز در کانون سوم (کردستان-آذربایجان غربی) در ارتباط با پراکنش نژادها و ارتفاع از سطح دریا که فرض صفر رد نمی‌شود و پراکنش نژادها به صورت تصادفی می‌باشد. قارچ FOC عامل پژمردگی آوندی نخود معمولی (نخود ایرانی) می‌باشد. این قارچ به سرعت به ریشه گیاه حمله نموده و با انسداد آوندهای چوبی، سبب کلروز و نکروز نخود می‌شود. (Di Pietro *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2009)

قارچ FOC دارای دو پاتوتیپ زردی و پژمردگی است. اولین علائم زردی در برگ‌ها و آوندهای برگ‌ها به صورت تغییر رنگ برگ‌ها ظاهر می‌شود و ۴۰ روز بعد از آلودگی، مرگ بوته اتفاق می‌افتد. درحالی‌که در پژمردگی، کلروز شدید، سستی، افتادگی اندام‌های هوایی بروز کرده و مرگ گیاهچه بعد از ۲۰ روز رخ می‌دهد (Jimenez-Gasco & Jimenez-Diaz, 2003). علاوه بر دو پاتوتیپ، برای این قارچ هشت نژاد بیماری‌زا (R0، R1A، R1B/C، R2، R3، R4، R5 و R6) گزارش شده که دارای انتشار جغرافیایی وسیعی در دنیا می‌باشند (Nene *et al.*, 1988). نژادهای قارچ FOC از لحاظ مناطق جغرافیایی محدود هستند، به طوری که نژادهای R0، R1A، R1B/C، R5 و R6 از مدیترانه و کالیفرنیا (Halila & Strange, 1996; Jimenez-Diaz *et al.*, 1993; Jimenez-Gasco *et al.*, 2001)، نژادهای R2، R3، R4 از هندوستان (Haware & Nene, 1982)، نژادهای R2 و R3 از ایتالیایی (Shehabu *et al.*, 2008) و ترکیه (Bayraktar & Dolar, 2012) و نژاد R4 از ایتالیایی (Shehabu *et al.*, 2008) گزارش شده‌اند.

این پژوهش که با آغازگرهای اختصاصی شناسایی نشدند، ممکن است که متعلق به سایر نژادها و حتی نژادهای ناشناخته باشند که آغازگری برای شناسایی اختصاصی آن‌ها طراحی نشده و یا خارج از محدوده هشت نژاد شناسایی شده در دنیا برای قارچ باشد (Vujanovic et al., 2006).

فراوانی علائم بیماری پژمردگی آوندی نخود که توسط قارچ FOC ایجاد می‌گردد در سطح مزارع نمونه‌برداری در نواحی غربی و شمال غربی کشور بالا بود و می‌توان گفت که یکی از بیماری‌های مهم این محصول در کشور به حساب می‌آید. وجود پنج نژاد از هشت نژاد شناسایی شده این قارچ در سطح مزارع نخود نشان از تنوع بالای نژادی این قارچ در ایران دارد. پراکنش این نژادها به صورت یکنواخت بوده و از لحاظ آماری جز در کانون سوم و در ارتباط با پراکنش نژادها و ارتفاع از سطح دریا، وابسته به فاکتورهای محیطی نمی‌باشد. این اولین گزارش از نژادهای این قارچ بر اساس روش مولکولی است که در سطح وسیع در نواحی غربی و شمال غربی کشور انجام گرفته است. ممکن است نژادهای دیگر این قارچ هم در کشور موجود باشد که با توجه به جمعیت کم آن‌ها، در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده قرار نگرفته باشند.

شد. جدایه‌ها شامل چهار نژاد (R1، R2، R3 و R4) بودند. آنالیز بر مبنای مختصات محور اصلی و بر اساس شاخص تشابه ژنتیکی جدایه‌ها، سه کلاستر بزرگ ایجاد گردید. دو تا از این سه کلاستر واجد نژادهای R1 و R2 و در کلاستر سوم نژادهای R3 و R4 قرار گرفتند (Sivaramakrishnan et al., 2002). در پژوهشی برای تعیین نژادهای قارچ FOC در چند استان غربی کشور، گروه بیماری‌زای (۱) عکس‌العمل‌های یکسانی با نژاد (۱) معرفی شده توسط هاوار و نن (Haware & Nene, 1982) را روی کلیه ارقام افتراقی نخود مورداستفاده نشان داد که نژاد R1B/C می‌باشد. این گروه شامل یک جدایه است که از استان لرستان جداسازی شده است؛ بنابراین، وجود نژاد R1B/C در استان لرستان محرز می‌باشد (یونسی، ۲۰۰۴). در این پژوهش در چهار استان غربی و شمال غربی کشور که بیشترین سطح زیر کشت نخود را دارند، پنج نژاد (R0، R1A، R1B/C، R5 و R6) از هشت نژاد (R0، R1A، R1B/C، R2، R3، R4، R5 و R6) این قارچ جداسازی و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، تأیید مولکولی شدند. ولی این احتمال وجود دارد که نژادهای دیگری از این قارچ در کشور وجود داشته باشند. سایر جدایه‌های به دست آمده در

## References

- ANONYMOUS., 2016. Agricultural Statistics. Ministry of Agriculture, Planning and Economic Deputy, Office of Statistics and Information Technology, 514 pp.
- ARVAIO-ORTIZ, M., M. ESQUEDA, E. ACEDO-FELIX, A. SANCHEZ and A. GUTIERREZ, 2011. Morphological variability and races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* associated with chickpea (*Cicer arietinum*) crops. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6: 114-121.
- BAGHERI, A., A. NEZAMI, A. GANEALI and M. PARSA, 1997. The chickpea. Publications University of Mashhad, 444 pp.
- BAYRAKTAR, H., and F. S. DOLAR, 2012. Pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates from chickpea in Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 44: 821-823.
- BHATTI, M. A. and J. M. KRAFT, 1992. Effects of inoculums density and temperature on root rot and wilt of chickpea. *Plant Disease*, 76: 809-810.
- CASTELLANOS, J. Z., J. X. UVALLA and A. AGUILAR, 2000. Soil and Water Analysis Interpretation Manual. 2 Edn, INCAPA, Mexico, 226pp.
- DI PIETRO, A., F. I. GARCIA-MACEIRA, E. MEGLECZ and M. I. RONCERO, 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is

- essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39: 1140-1142.
- DOYLE, J. J. and J. L. DOYLE, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- DUBEY, S. C., K. PRIYANKA, V. SINGH and B. SINGH, 2012. Race Profiling and Molecular Diversity Analysis of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Causing Wilt in Chickpea. *Phytopathology*, 160: 576-587.
- ELMAHI MOHAMED, O., A. HAMWIEH, S. AHMED and N. ELMAHI MOHAMED, 2015. Genetic Variability of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Population Affecting Chickpea in the Sudan. *Phytopathology*, 163: 941-946.
- FISHER, N. L., W. BURGESS, T. A. TOUSSOUN and P. E. NELSON, 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72: 151-153.
- GUPTA, S., D. CHAKRABORTI, R. K. RANGI, D. BASU and S. DAS, 2009. A molecular insight into the early events of chickpea (*Cicer arietinum*) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Race 1) interaction through cDNA-AFLP analysis. *Phytopathology*, 99: 1245-1267.
- HALILA, H. M. and R. STRANGE, 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 67-74.
- HAWARE, M. P., and Y. L. NENE, 1982. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant Disease*, 66: 809-810.
- JIMENEZ-DIAZ, R. M., A. R. ALCALAI-JIMENEZ, A. HERVAS and J. L. TRAPERO-CASAS, 1993. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem. In: E. Arseniuk and T. Goral (Eds). *Proceedings of the 3rd European Seminar on Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance* (pp. 87-94). *Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzików, Poland*.
- JIMENEZ-GASCO, M. M. and R. M. JIMENEZ-DIAZ 2003. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology*, 93: 200-209.
- JIMENEZ-GASCO, M. M., E. PEREZ-ARTES and R. M. JIMENEZ-DIAZ, 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *European Journal of Plant Pathology*, 107: 237-248.
- JIMENEZ-GASCO, M. M., M. G. MILGROOM, and R. R. M. JIMENEZ-DIAZ, 2003. Stepwise evolution of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences. *Phytopathology*, 94: 228-235.
- LESLIE, J. F. and B. A. SUMMERELLA, 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Professional, USA, 388pp.
- LANDA, B. B., O. V. MAVRODI, K. L. SCHROEDER, R. ALLENDE-MOLA and D. M. WELLER, 2006. Enrichment and genotypic diversity of pHID-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *Microbiology Ecology*, 55: 351-368.
- NELSON, P. E., T. A. TOUSSOUNA and W. F. O. MARASAS, 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press University Park 193 pp.
- NENE, Y. L., 1988. Multiple-disease resistance in grain legumes. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 203-217.
- NOGALES-MONCADA, A. M., R. M. JIMENEZ-DIAZ and E. PEREZ-ARTES, 2009. Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and *F. oxysporum* non-pathogenic to chickpea. *Journal of Phytopathology*, 157: 729-735.
- NOUROLLAHI, K., A. ALIARAN and H. YONESSI, 2016. Genetic diversity of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates causal agent of wilt chickpea in

- Kermanshah province using microsatellite markers. *Modern Genetics Journal*, 11:605-615.
- PADILLA-VALENZUELA, I., R. I. VALENZUELA-VALENZUELA, C. M. ARMENTA-CASTRO, R. A. SALINAS-PEREZ and E. SANCHEZ-SANCHEZ, 2008. Agronomic behavior of chickpea genotypes in delayed sowing at the Mayo Valley, Sonora, Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31: 43-49.
- SHEHABU, M., S. AHMED and K. SAKHUJA, 2008. Pathogenic variability in Ethiopian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and reaction of chickpea improved varieties to the isolates. *International Journal of Pest Management*, 54: 143–149.
- SIVARAMAKRISHNAN, S., S. KANNAN and S.D. SINGH, 2002. Genetic variability of *Fusarium* wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers. *Mycopathologia*, 155: 171-178.
- TRAPERO-CASAS, A. and R. M. JIMENEZ-DIAZ, 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology*, 75: 1146–1151.
- VUJANOVIC, V., C. HAMEL, E. YERGEAU and M. ST-ARNAUD, 2006. Biodiversity and biogeography of *Fusarium* species from northeastern North American asparagus fields based on microbiological and molecular approaches. *Microbial Ecology*, 51:242-255.
- YOUNESI, H., 2004. Identification of the physiologic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in some west provinces of Iran. Summary of Articles in the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz.