



Identification of fungal agents causing tomato root and crown rot in Hormozgan province

Pedram Rahimipour¹ | Amirreza Amirmijani^{2✉} | Azadeh Goudarzi^{3✉}

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. E-mail: keshavarzidehghan@gmail.com

2. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. E-mail: ar.amirmijani@ujiroft.ac.ir

3. Corresponding Author, Department of Plant Protection Research, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, BandarAbbas, Iran. E-mail: a.goudarzi6061@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	Root and crown rot is a common tomato disease in the major production areas of Hormozgan province. The present study was conducted to isolate, identify, and determine the frequency of fungal agents associated with tomato root and crown rot in Hormozgan province. In total, 984 fungal isolates were obtained from tomato plants with yellowing, wilting, and root and crown rot symptoms. Identification of the isolates was done based on the morphological characteristics and the comparison of the obtained sequences of the ribosomal internal transcribed spacer region (ITS-rDNA) and parts of the translation elongation factor-1 alpha (<i>tef1-α</i>) gene with relevant sequences available in GenBank. According to the results, the highest frequency belonged to <i>Fusarium oxysporum</i> isolates (73%), and afterward to <i>Rhizoctonia solani</i> and <i>F. acutatum</i> species with eight and one percent frequencies, respectively. The results of the pathogenicity tests of the fungal species on tomato seedlings hybrid Sunseed 6189 at the stage of four true-leaves revealed that all three species were pathogenic on tomato seedlings and caused root and crown rot, yellowing, and death of the plant aerial tissues. Pathogenic isolates of <i>F. oxysporum</i> were identified as <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> using sprl-specific primers. To the best of our knowledge, this is the first report of <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> on tomato in Hormozgan province, and the first report of <i>F. acutatum</i> as tomato root and crown rot agent in the world.
Article history: Received: 23 January 2024 Revised: 19 February 2024 Accepted: 20 February 2024 Published online: 19 March 2024	
Keywords: <i>forma specialis</i> , <i>fungus species</i> , <i>tomato diseases</i> , <i>wilting</i> , <i>yellowing</i> .	

Cite this article: Rahimipour, P., Amirmijani, A. R., & Goudarzi, A. (2024). Identification of fungal agents causing tomato root and crown rot in Hormozgan province. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 54 (2), 207-225. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.371499.1007051>



© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.371499.1007051>

Extended Abstract

Introduction

Tomato root and crown rot constitute a prevalent and devastating disease in the primary tomato-producing regions of Hormozgan province. Afflicting tomato plants from their initial seedling stage through to maturity, the disease exhibits various symptoms, including root and crown necrosis, loss of hairy roots, discoloration in the vascular system of the crown and basal stem, wilting, yellowing, necrosis of older leaves and petioles, reduced fruit quantity and quality, and eventual plant death. In Iran, a variety of fungal and oomycota species, such as *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. proliferatum*, *F. laterinum*, *F. semitectum*, *F. pseudoanthophilum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora capsici*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae*, and *P. aphanidermatum*, have been identified as agents responsible for causing tomato root and crown rot. This study aims to isolate, identify, and determine

the prevalence of fungal agents contributing to tomato root and crown rot in Hormozgan province, located in southern Iran.

Materials and Methods

During the years 2021 and 2022, tomato plants displaying symptoms such as yellowing, wilting, and root and crown rot were systematically collected from eight distinct regions within Hormozgan province—Isin, Dargir, Kahurestan, Parsian, Hashtbandi, Rudan, Rezvan, and Ghazi Qala. Subsequently, root and crown tissue pieces underwent surface disinfection, were transferred onto a PDA medium, and were incubated at 25 ± 1 °C for 10 days. Identification of the fungal isolates relied on morphological characteristics and the comparative analysis of the nucleotide sequence of the ribosomal internal transcribed spacer region (ITS-rDNA) and segments of the translation elongation factor-1 alpha (*tefl- α*) gene. To fulfill Koch's postulates, the pathogenicity of selected isolates was tested on tomato seedlings (hybrid Sunseed 6189) at the four true leaves stage, under greenhouse conditions.

Results and Discussion

A total of 813 fungal isolates were obtained from symptomatic tomato plants. The predominant frequency was attributed to *F. oxysporum* isolates (73%), with *R. solani* and *F. acutatum* species being isolated at frequencies of eight and one percent, respectively. Pathogenicity tests confirmed the ability of all species to induce root and crown rot, yellowing, and eventual plant death in tomato seedlings. *F. oxysporum* pathogenic isolates were specifically identified as *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* using sprl-specific primers. This study represents the initial documentation of *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomatoes in Hormozgan province and the first-ever report of *F. acutatum* as a causative agent of tomato root and crown rot globally.

Conclusion

The findings of this investigation, involving the isolation of fungal species from the root and crown of symptomatic tomato plants and the confirmation of their pathogenicity, underscore the role of soil-borne fungi, particularly *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, in the initiation of root and crown rot on tomato in Hormozgan province. Recommendations for disease management in affected areas include the adoption of resistant cultivars, the cultivation of disease-free seedlings, optimal irrigation and nutrition practices, and effective environmental stress management. Future studies are proposed to assess the resistance of prevalent tomato cultivars in these regions against *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.



شناسایی عوامل قارچی بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در استان هرمزگان

پدرام رحیمی پور^۱ | امیررضا امیرمیجانی^۲ | آزاده گودرزی^۳

۱. گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: keshavarzidehghan@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: ar.amirmijani@ujiroft.ac.ir

۳. نویسنده مسئول، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، بندرعباس، ایران. رایانامه: a.goudarzi6061@gmail.com

چکیده

اطلاعات مقاله

پوسیدگی ریشه و طوقه از بیماری‌های شایع گوجه‌فرنگی در مناطق عمده تولید این محصول در استان هرمزگان به شمار می‌رود. مطالعه حاضر با هدف جداسازی، شناسایی و تعیین فراوانی عوامل قارچی مرتبط با پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در استان هرمزگان انجام شد. در مجموع، ۹۸۴ جدایه قارچی از گیاهان گوجه‌فرنگی با علائم زردی، پژمردگی و پوسیدگی ریشه و طوقه جداسازی شد. شناسایی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مقایسه توالی‌های به دست آمده از ناحیه ریپوزومی فاصله‌انداز رونویسی شونده داخلی (ITS-rDNA) و بخشی از ژن فاکتور طول‌سازی ترجمه-۱ آلفا (*tef1-α*) با توالی‌های معتبر موجود در بانک ژن انجام شد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، بیشترین فراوانی (۷۳٪) به جدایه‌های *Fusarium oxysporum* تعلق داشت و گونه‌های *Rhizoctonia solani* و *F. acutatum* به ترتیب با فراوانی هشت و یک درصد جداسازی شدند. نتایج بیماری‌زایی گونه‌های قارچی روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی هیبرید سانسید ۶۱۸۹ در مرحله چهار برگ حقیقی نشان داد که هر سه گونه روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی بیماری‌زا بوده و سبب ایجاد پوسیدگی ریشه و طوقه و زردی و بافت‌مردگی اندام‌های هوایی می‌شوند. جدایه‌های بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* به عنوان *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* از *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* تشخیص داده شدند. این مطالعه، نخستین گزارش از *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* از مزارع گوجه‌فرنگی استان هرمزگان و نخستین گزارش از *F. acutatum* به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در دنیا است.

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۲/۲۹

کلیدواژه‌ها:

بیماری‌های گوجه‌فرنگی، پژمردگی، زردی، فرم اختصاصی، گونه‌های قارچی.

استناد: رحیمی پور، پدرام؛ امیرمیجانی، امیررضا؛ و گودرزی، آزاده (۱۴۰۲). شناسایی عوامل قارچی بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در استان هرمزگان. نشریه

دانش گیاهپزشکی ایران، ۵۴ (۲)، ۲۰۷-۲۲۵. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.371499.1007051>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.371499.1007051>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

پوسیدگی ریشه و طوقه، به ویژه پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه از شایع‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری‌های خاک‌زاد گوجه‌فرنگی در سراسر دنیا به شمار می‌رود (Davis & Paulus, 2014). وقوع این بیماری در سیستم‌های کشت فضای باز و حفاظت شده سبب وارد شدن زیان اقتصادی قابل توجهی به عملکرد محصول تجاری می‌شود. در سیستم‌های کشت فضای باز، میانگین کاهش عملکرد محصول گوجه‌فرنگی ناشی از پوسیدگی ریشه و طوقه در مناطق مختلف دنیا بین ۲۰ تا ۴۰ درصد گزارش شده است (Davis & Paulus, 2014). با این حال، زیان اقتصادی ناشی از این بیماری در گلخانه‌ها بسیار بیشتر و تا ۶۵ درصد تخمین زده شده است (Davis & Paulus, 2014). گیاهان گوجه‌فرنگی از مرحله گیاهچه تا بلوغ ممکن است به پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه مبتلا شوند. در ابتدای وقوع بیماری، معمولاً هیچ تغییر ظاهری در بخش هوایی گیاهان مشاهده نمی‌شود، اما با پیشرفت آلودگی، علائم بیماری عمدتاً به صورت بافت‌مرده شدن ریشه و طوقه، از بین رفتن ریشه‌های موئین، تغییر رنگ سیستم آوندی طوقه و قاعده ساقه، پژمردگی، زردی و بافت‌مرده شدن برگ‌های مسن و دم‌برگ‌ها، کاهش کمیت و کیفیت میوه‌ها و مرگ گیاه قابل مشاهده است (Yezli et al., 2019).

ایران در بین کشورهای تولیدکننده گوجه‌فرنگی در دنیا در جایگاه ششم قرار دارد. گوجه‌فرنگی از نظر سطح زیر کشت در کشور، ارزش اقتصادی و میزان تولید و مصرف، پس از سیب‌زمینی به عنوان مهم‌ترین محصول از گروه سبزی‌ها در نظر گرفته می‌شود. سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی در ایران حدود ۶۴ هزار هکتار و میزان تولید سالانه آن بیش از سه میلیون تن تخمین زده شده است (Mohammadnia Afrouzi et al., 2022). استان هرمزگان رتبه نخست تولید گوجه‌فرنگی در شش ماهه دوم سال را در کشور دارد و کشت گوجه‌فرنگی در این استان، نقش بسیار عمده‌ای در اقتصاد و معیشت کشاورزان این منطقه ایفاء می‌کند. در این استان، حدود ۱۲ هزار هکتار از زمین‌های کشاورزی زیر کشت گوجه‌فرنگی قرار دارد و از این میزان سطح زیر کشت، بیش از شش هزار تن محصول برداشت می‌شود (Mohammadnia Afrouzi et al., 2022). با توجه به این که استان هرمزگان سهم قابل توجهی را در تأمین گوجه‌فرنگی در بین استان‌های تولیدکننده این محصول در کشور به خود اختصاص داده است و پوسیدگی ریشه و طوقه نیز از بیماری‌های شایع و خسارت‌زای گوجه‌فرنگی در این استان به شمار می‌رود، تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی عوامل قارچی مولد پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در هشت منطقه مختلف از استان هرمزگان و تعیین فراوانی گونه‌های قارچی در مناطق مورد بررسی انجام شد.

پیشینه پژوهش

پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی توسط قارچ *F. oxysporum* Schltdl. f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker (FORL) ایجاد می‌شود (Yue et al., 2022). این بیمارگر ابتدا در سال ۱۹۷۴ به عنوان نژاد جدیدی از *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) عامل پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی، در نظر گرفته شد، هرچند که در سال ۱۹۷۸ بر اساس ویژگی‌هایی از جمله نوع علائم بیماری، دامنه میزبانی و دمای بهینه برای فعالیت عامل بیماری، به عنوان فرم اختصاصی جدیدی از *F. oxysporum* معرفی شد (Cabral et al., 2020). بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی نخستین بار در سال ۱۹۶۹ از ژاپن و در دهه ۱۹۷۰ از کانادا، مکزیک، تگزاس و مناطق مختلف ایالات متحده شامل انتاریو، اوهایو، نیوهمپشایر، کالیفرنیا و فلوریدا گزارش شده است. در حال حاضر، این بیماری دارای پراکنش جهانی است و به عنوان یک تهدید جدی برای تولید گوجه‌فرنگی در اغلب کشورهای تولیدکننده این محصول به شمار می‌رود (Yue et al., 2022). علاوه بر FORL، گونه‌های دیگری از جنس *Fusarium* شامل *F. moniliforme*، *F. solani* (Mart.) Sacc.، *F. redolens*، *F. commune* K. Skovg., O'Donnell & Nirenberg، *F. culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc.، J. Sheld.، *F. lateritium*، *F. semitectum* Berk. & Ravenel، *F. chlamyosporum* Wollenw. & Reinking، Wollenw.، *F. equiseti* (Corda) Sacc. و *F. acuminatum* Ellis & Everh. نیز به عنوان عوامل بیماری پوسیدگی ریشه و

طوقه گوجه‌فرنگی از مناطق مختلف کشت این محصول در دنیا گزارش شده‌اند (Hamini-Kadar *et al.*, 2010; Rozlianah & Sariah, 2010; Yezli *et al.*, 2019; Zebboudj *et al.*, 2020).

بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه گوجه‌فرنگی با عامل *Rhizoctonia solani* J.G. Kuhn نیز دارای پراکنش جهانی است و به عنوان یکی از عوامل محدودکننده کشت گوجه‌فرنگی در دنیا شناخته شده است (Jones *et al.*, 1991). این گونه قارچی علاوه بر گوجه‌فرنگی، دامنه وسیعی از محصولات کشاورزی از جمله برنج، لوبیا، فلفل، سیب‌زمینی، یونجه، پنبه و چای را آلوده می‌کند و علائم معمول ناشی از آن، شامل پوسیدگی ریشه و طوقه و مرگ گیاهچه است (Woodhall *et al.*, 2022). در ایران، پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه گوجه‌فرنگی نخستین بار در سال ۱۳۶۲ از مزارع گوجه‌فرنگی قائمشهر، ساری و بهشهر در استان مازندران (Rahimian, 1989) و پس از آن، از استان‌های سمنان و خراسان شمالی گزارش شده است (Iraqi *et al.*, 2009; Sadravi & Setayeshmehr, 2009). علاوه بر بیمارگرهای قارچی، گونه‌های *Phytophthora capsici* Leonian، *P. drechsleri* Tucker، *P. parasitica* Dastur و *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. نیز از عوامل بیماری پوسیدگی ریشه گوجه‌فرنگی در مناطق مختلف دنیا به شمار می‌روند (Jones *et al.*, 1991). در ایران، گونه‌های قارچی و شبه‌قارچی مختلفی به عنوان عوامل مولد پوسیدگی‌های ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی گزارش شده‌اند. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات مختلف، *Fusarium solani* در استان خوزستان (Parvin & Farokhinejad, 2013)، *F. solani* و *R. solani* در استان خراسان شمالی (Sadravi & Setayeshmehr, 2009)، *F. solani*، *F. oxysporum* و *R. solani* در استان سمنان (Ommati & Ershad, 2004)، *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. equiseti*، *F. acuminatum*، *Verticillium dahliae*، *R. solani*، *F. semitectum*، *F. laterinum proliferatum* (Matsush.) Nirenberg، *P. capsici*، *P. drechsleri* و *P. nicotianae* Breda & Haan در استان آذربایجان شرقی (Shekari *et al.*, 2006; Viani *et al.*, 2008)، *R. solani* در استان مازندران (Rahimian, 1989) و *F. solani*، *F. oxysporum*، *P. aphanidermatum*، *F. equiseti pseudoanthophilum* Nirenberg، O'Donnell & Mubat.، *R. solani*، *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. و *P. nicotianae* در مرودشت استان فارس (Amini *et al.*, 2013; Sharzei *et al.*, 2013) در وقوع پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی نقش دارند.

روش‌شناسی پژوهش

ارزیابی وقوع بیماری در مزارع گوجه‌فرنگی

در سال‌های زراعی ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰، طی بررسی‌های انجام شده در مزارع گوجه‌فرنگی در هشت منطقه مختلف استان هرمزگان شامل ایسین، درگیر، کهورستان، پارسیان، هشتبندی، رودان، رضوان و قلعه قاضی، گیاهان گوجه‌فرنگی با علائم زردی، پژمردگی و پوسیدگی ریشه و طوقه مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). برای نمونه برداری در هر منطقه، پنج مکان با الگوی W در مساحتی به وسعت ۱۰ هکتار در نظر گرفته شد و در هر مکان، ۲۰ گیاه به طور تصادفی انتخاب شدند. به منظور ارزیابی درصد وقوع بیماری، گیاهان منتخب به طور کامل از خاک خارج شدند و در هر منطقه، درصد گیاهان دارای علائم پوسیدگی ریشه و طوقه نسبت به کل گیاهان نمونه‌برداری شده محاسبه شد.



شکل ۱. مناطق مختلف استان هرمزگان که نمونه برداری از گیاهان گوجه‌فرنگی با علائم زردی، پژمردگی و پوسیدگی ریشه و طوقه در آنها انجام شده است. هر منطقه نمونه برداری روی نقشه با مستطیل سبزرنگ نشان داده شده است.

جداسازی، شناسایی و تعیین فراوانی قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه و طوقه

گیاهان گوجه‌فرنگی با علائم پوسیدگی ریشه و طوقه، به صورت جداگانه در پاکت‌های کاغذی همراه با درج مشخصات مربوط به رقم، منطقه و تاریخ جمع‌آوری قرار داده شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه در یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور جداسازی قارچ‌ها، از فاصله بین بافت‌های سالم و آلوده ریشه و طوقه، قطعاتی به ابعاد تقریبی ۵×۵ میلی‌متر برش داده شد و ضد عفونی بافت‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت پنج دقیقه انجام شد. قطعات ریشه و طوقه سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شده و روی حوله کاغذی سترون خشک شدند و پس از انتقال به محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) به مدت ۱۰ روز در انکوباتور با دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس نگهداری شدند. جدایه‌های رشد یافته در اطراف قطعات ریشه و طوقه به روش نوک ریشه و یا تک اسپور با تهیه سری رقت خالص‌سازی شدند. شناسایی اولیه جدایه‌های قارچی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی میکروسکوپی (رنگ و بافت پرگنه) و میکروسکوپی (نوع کنیدیوفور و ابعاد آن، مشخصات سلول‌های کنیدیوم‌زا، شکل، رنگ و ابعاد کنیدیوم) انجام شد. به منظور بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی میکروسکوپی، از هر یک از جدایه‌ها اسلایدهای میکروسکوپی در محلول اسید لاکتیک ۵۰ درصد و گلیسرین تهیه شد و شناسایی جدایه‌ها بر اساس منابع علمی معتبر انجام شد (Leslie & Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1983; Rayner, 1970; Sivanesan, 1987; Sneh *et al.*, 1991). فراوانی هر یک از گونه‌های قارچی شناسایی شده در مناطق مورد بررسی، بر اساس تعداد جدایه‌های رشد یافته اطراف قطعات گیاهی کشت شده روی محیط کشت PDA با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

$$F = \frac{a}{b} \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

a: تعداد جدایه‌های رشد یافته اطراف قطعات گیاهی، b: تعداد قطعات گیاهی کشت شده

شناسایی مولکولی قارچ‌ها

به منظور استخراج DNA ژنومی، ابتدا هر یک از جدایه‌های قارچی روی محیط کشت PDA کشت داده شدند و به مدت ۱۰ روز در انکوباتور با دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس نگهداری شدند. حدود ۲۰۰ میلی‌گرم از میسلیوم قارچی با استفاده از یک اسپاتول سترون از سطح محیط کشت جمع‌آوری شد و استخراج DNA ژنومی به روش ژانگ و استفنسن (Zhong & Steffenson, 2001) انجام شد. شناسایی جدایه‌ها در سطح گونه بر اساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی ناحیه ریوزومی فاصله‌انداز رونویسی شونده داخلی (ITS-rDNA) و بخشی از ژن فاکتور طول‌سازی ترجمه ۱-آلفا (*tefl-α*) به ترتیب با استفاده از جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 و EF1/EF2 انجام شد (O'Donnell et al., 1998; White et al., 1990). به منظور تشخیص فرم‌های اختصاصی جدایه‌های *F. oxysporum*، از سه جفت آغازگر اختصاصی sp13 (مختص نژاد ۱ و ۳ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*)، sp23 (مختص نژاد ۲ و ۳ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) و sp1 (مختص *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) استفاده شد (Hirano & Arie, 2006). اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر نواحی ژنومی هدف در قارچ‌های عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی جهت شناسایی مولکولی.

نام آغازگر	ناحیه/ژن هدف	توالی (۵'→۳')	منبع
ITS1	ITS	TCCGTAGTTGGACCTGCGG	White et al. 1990
ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. 1990
EF1	EF1-α	ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC	O'Donnell et al. 1998
EF2		GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT	O'Donnell et al. 1998
sp13-F	pgx4	GTCAGTCCATTGGCTCTCTC	Hirano & Arie 2006
sp13-R		TCCTTGACACCATCACAGAG	Hirano & Arie 2006
sp23-F	pg1	CCTCTGTCTTTGTCTCACGA	Hirano & Arie 2006
sp23-R		GCAACAGGTCGTGGGGAAAA	Hirano & Arie 2006

مخلوطی حاوی ۵۰ نانوگرم از DNA قالب، یک میکرومول از هر یک از آغازگرهای پیشرو و معکوس و ۱۸ میکرولیتر PCR Master Mix (شرکت Ampliqon) برای واکنش‌های ۳۵ میکرولیتری تهیه شد. برنامه حرارتی مورد استفاده برای انجام واکنش‌ها با توجه به نوع آغازگر تعیین شد. محصولات واکنش PCR از طریق شرکت ایرانی توپاز ژن کاوش برای تعیین توالی نواحی تکثیر شده به شرکت Microsynth سوئیس ارسال شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده، با استفاده از نرم افزار BioEdit (Hall, 1999) ویرایش شدند و توالی‌های اجماع از توالی‌های پیشرو و معکوس برای هر ناحیه با استفاده از نرم‌افزار MEGA v. 6.0 (Tamura et al., 2013) ایجاد شدند. این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) با توالی‌های موجود در بانک داده‌های ژن NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مقایسه شدند و توالی‌های با درصد مشابهت بالا از بانک ژن دریافت گردیدند. توالی‌های مربوط به جدایه‌های *Fusarium* با توالی جدایه‌های موجود در بانک ژن (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)، FUSARIUM-ID (<https://www.fusarium.org>) و Fusarium MLST (<https://fusarium.mycobank.org>) مورد مقایسه قرار گرفتند. جدایه‌های قارچی از طریق انطباق ویژگی‌های ریخت‌شناختی ماکروسکوپی و میکروسکوپی و داده‌های مربوط به توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA و بخشی از ژن *tefl-α* برای جدایه‌های *Fusarium*، در سطح گونه شناسایی شدند.

آزمون‌های بیماری‌زایی

برای انجام آزمون‌های بیماری‌زایی از گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی هیبرید سانسید ۶۱۸۹ با چهار برگ حقیقی در شرایط گلخانه استفاده شد. بذور گوجه‌فرنگی در سینی‌های نشاء و در بستر پیت، پرلیت و ورمی‌کولایت سترون با نسبت حجمی ۱:۱:۲ کشت

شدند. پنج هفته پس از کشت، گیاهچه‌های رشد یافته به گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۵ سانتی‌متر حاوی پرلیت سترون در یک سوم تحتانی و بستر خاک آماده کشت سترون شامل ترکیبی از پرلیت، کوکوپیت، ورمی کمپوست، خاک برگ، پیت ماس، خاک رس و ماسه (شرکت گیلدا) انتقال داده شدند. از هر یک از گونه‌های قارچی، دو جدایه به صورت تصادفی انتخاب شد. برای تهیه زامایه *F. acutatum* و *F. oxysporum*، جدایه‌های مورد نظر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند و به مدت هفت روز در انکوباتور با دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس نگهداری شدند. سطح تشتک‌های پتری با آب مقطر سترون شستشو داده شد و به منظور حذف ریشه‌ها، سوسپانسیون‌های کنیدیوم از چهار لایه گاز سترون عبور داده شدند. غلظت هر سوسپانسیون با استفاده از لام هماسیتومتر به غلظت 2×10^6 کنیدیوم بر میلی‌لیتر آب مقطر سترون رسانده شد. برای انجام مایه‌زنی، با استفاده از یک میله شیشه‌ای سترون، چهار حفره به طول ۱۰ سانتی‌متر در فواصل پنج سانتی‌متری از طوقه ایجاد شد و به ازای هر کیلوگرم خاک، ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کنیدیوم مربوط به هر جدایه به صورت یکنواخت در حفره‌ها ریخته شد. مایه‌زنی گیاهچه‌های شاهد با آب مقطر سترون انجام شد (Kurt et al., 2020).

برای تهیه زامایه جدایه‌های *R. solani* از دانه‌های گندم استفاده شد. دانه‌ها با جریان آب شستشو داده شدند و دو مرتبه در دستگاه اتوکلاو سترون شدند. از حاشیه پرگنه‌های هفت روزه هر یک از جدایه‌ها روی محیط کشت PDA، ۱۰ قرص به قطر پنج میلی‌متر برداشته شد و به طور جداگانه به ظروف شیشه‌ای حاوی دانه‌های گندم اضافه شد. دانه‌های گندم مایه‌زنی شده به مدت دو هفته در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و به منظور کلونیزه شدن یکنواخت دانه‌ها، شیشه‌ها به صورت روزانه تکان داده شدند. برای مایه‌زنی گیاهچه‌ها، خاک اطراف گیاهچه‌ها تا عمق پنج سانتی‌متری کنار زده شد. در هر گلدان، ۱۰ عدد بذر گندم مایه‌زنی شده در مجاورت ریشه‌ها قرار داده شد و خاک مجدداً روی سطح ریشه‌ها برگردانده شد. مایه‌زنی گیاهچه‌های شاهد با استفاده از دانه‌های گندم مایه‌زنی شده با قرص‌های محیط کشت PDA بدون قارچ انجام شد (Muyolo et al., 1993).

آزمون‌های بیماری‌زایی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد. گیاهچه‌ها پس از مایه‌زنی به مدت چهار هفته در گلخانه با دمای ۳۰-۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵ درصد نگهداری شدند و ظهور علائم بیماری به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفت. برای پوشش گلخانه از توری سبز با تراکم ۸۰ درصد استفاده شد. پانزده روز پس از مایه‌زنی، شدت بیماری بر اساس مقیاس نمره‌دهی ترتیبی ذکر شده در جدول ۲ ارزیابی شد (Ye et al., 2020).

جدول ۲. مقیاس نمره‌دهی پوسیدگی ریشه و طوقه در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با جدایه‌های قارچی (Ye et al., 2020).

نمره	علائم بیماری
صفر	بدون علائم بیماری
۱	زخم‌های قهوه‌ای تا قهوه‌ای روشن روی ریشه اصلی و ریشه‌های جانبی، بدون ایجاد پوسیدگی
۲	پوسیدگی خفیف تا متوسط ریشه اصلی، بدون علائم بیماری روی برگ‌ها
۳	پژمردگی خفیف تا متوسط برگ‌ها، کاهش رشد عمومی، پوسیدگی شدید ریشه اصلی و ریشه‌های جانبی، پوسیدگی طوقه، تغییر رنگ آوندهای ساقه
۴	باریک شدن قاعده ساقه، از بین رفتن گیاهچه‌ها

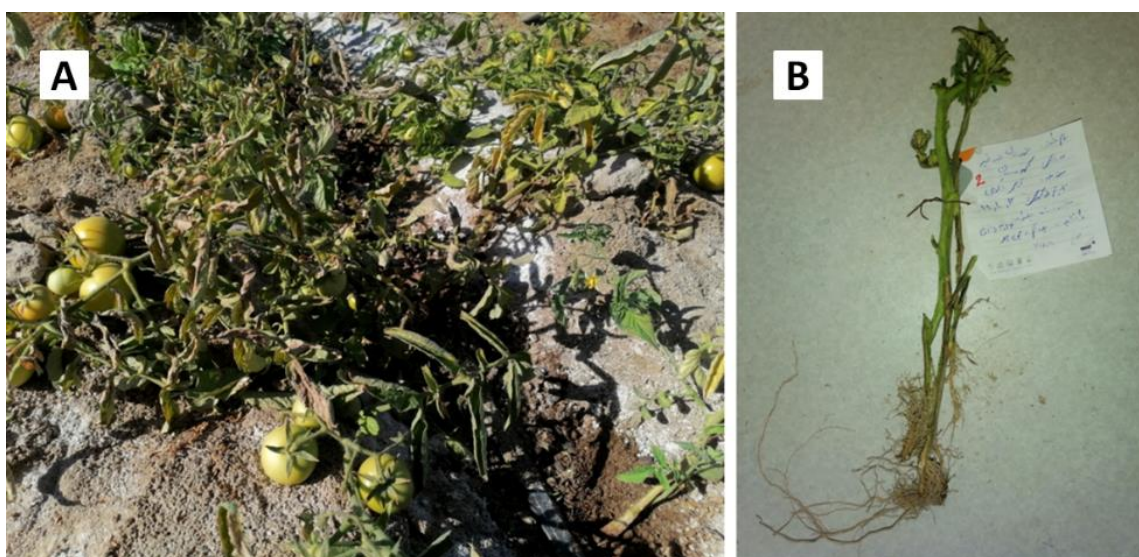
همچنین، شاخص بیماری (DI) با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد (Sharma et al., 2018).

$$DSI(\%) = \frac{\sum(Class\ frequency \times score\ of\ rating\ class)}{(total\ number\ of\ observations) \times (maximal\ disease\ index)} \times 100 \quad (رابطه\ ۲)$$

یافته‌های پژوهش

وقوع بیماری در مزارع گوجه‌فرنگی

طی انجام بررسی‌های میدانی در مناطق مورد بررسی، درجات مختلفی از زردی، پژمردگی و بافت‌مردگی اندام‌های هوایی و پوسیدگی ریشه و طوقه در گیاهان گوجه‌فرنگی مشاهده شد. به طور معمول، گیاهان آلوده دارای کاهش رشد عمومی بودند. در گیاهان بالغ، نخستین علائم بیماری به صورت زرد شدن حاشیه برگ‌های مسن به ویژه در زمان رسیدن میوه‌ها و پس از آن و همچنین بافت‌مردگی برگ‌ها و دمبرگ‌ها پدیدار شد. این علائم به تدریج به سمت برگ‌های جوان پیشروی نمود و گیاهان آلوده، زرد، پژمرده و خشک شدند (شکل ۲a). با این حال، برخی از گیاهان حتی تا پایان دوره برداشت محصول نیز به طور کامل از بین نرفتند. تعداد میوه‌های تولید شده در گیاهان آلوده در مقایسه با گیاهان سالم کمتر بود و به علاوه، این میوه‌ها اندازه کوچک‌تری داشتند. علائم بیماری روی ریشه‌ها و بافت‌های گیاهی مجاور سطح خاک به صورت زخم‌های خشک به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره مشاهده شد و در گیاهان دارای آلودگی‌های شدید، پیشروی زخم‌ها در بافت‌های آوندی طوقه و قاعده ساقه در برش طولی نیز مشاهده شد. بافت‌مردگی و تغییر رنگ آوندها تا ارتفاع ۲۰-۱۵ سانتی‌متری از سطح خاک مشاهده شد. به علاوه، در این گیاهان کاهش حجم ریشه‌ها و از بین رفتن بخش قابل توجهی از ریشه‌های موئین به وضوح قابل رؤیت بود (شکل ۲b). وقوع پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در مزارع با مدیریت مناسب، ۳-۵ درصد و در مزارع با مدیریت متوسط، ۱۸-۱۲ درصد تعیین شد.



شکل ۲. علائم بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی. A: زردی، پژمردگی و بافت‌مردگی اندام‌های هوایی گیاهان گوجه‌فرنگی مبتلا به پوسیدگی ریشه و طوقه، B: زخم‌های خشک به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره روی ریشه و بافت‌های گیاهی مجاور سطح خاک.

شناسایی و تعیین فراوانی قارچ‌های عامل بیماری

در مجموع، ۹۸۴ جدایه قارچی از گیاهان گوجه‌فرنگی با علائم زردی، پژمردگی و پوسیدگی ریشه و طوقه در مناطق مختلف استان هرمزگان جداسازی شد. جدایه‌های به دست آمده، بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی ماکروسکوپی و میکروسکوپی در چهار جنس *Fusarium*، *Exserohilum*، *Alternaria* و *Rhizoctonia* دسته‌بندی شدند. در مجموع، ۷۳۲ جدایه از تمام مناطق مورد بررسی به جنس *Fusarium* تعلق داشت (۷۴/۳۸ درصد). از این تعداد، ۷۲۰ جدایه از مناطق ایسین، درگیر، کهورستان، پارسیان، هشتبندی، رودان، رضوان و قلعه قاضی به *F. oxysporum* (۷۳/۱۷ درصد) و ۱۲ جدایه از مناطق ایسین،

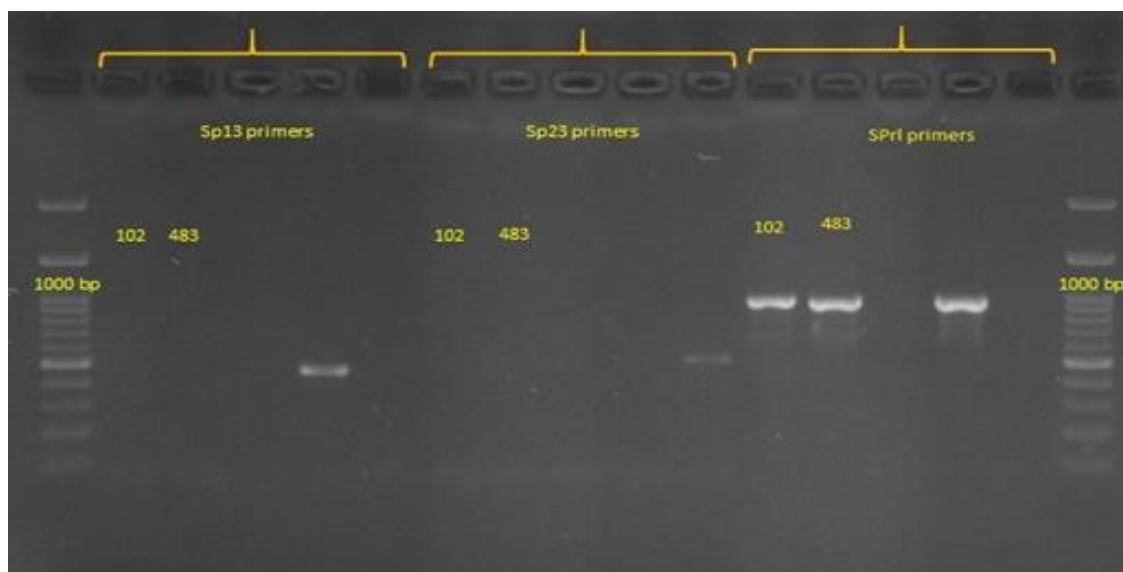
هشتبندی و رودان به *F. acutatum* Nirenberg & O'Donnell (۱/۲۱ درصد) مربوط بود. صد و شش جدایه از جنس *Alternaria* از مناطق ایسین، درگیر، کهورستان و رودان جداسازی شدند (۱۰/۷۷ درصد) و ۸۱ جدایه از *Rhizoctonia* از مناطق پارسیان و هشتبندی به دست آمدند (۸/۲۳ درصد). به علاوه، ۶۵ جدایه به جنس *Exserohilum* تعلق داشت که از مناطق هشتبندی، رضوان و قلعه قاضی جداسازی شدند (۶/۶۰ درصد) (جدول ۳).

جدول ۳. فراوانی گونه‌های قارچی جداسازی شده از ریشه و طوقه گیاهان گوجه‌فرنگی در مناطق مختلف استان هرمزگان.

نام گونه	منطقه	تعداد جدایه	فراوانی (%)
<i>Fusarium oxysporum</i>	ایسین، درگیر، کهورستان، پارسیان، هشتبندی، رودان، رضوان، قلعه قاضی	۷۲۰	۷۳/۱۷
<i>Alternaria alternata</i>	ایسین، درگیر، کهورستان و رودان	۱۰۶	۱۰/۷۷
<i>Rhizoctonia solani</i>	پارسیان، هشتبندی	۸۱	۸/۲۳
<i>Exserohilum rostratum</i>	هشتبندی، رضوان و قلعه قاضی	۶۵	۶/۶۰
<i>Fusarium acutatum</i>	هشتبندی، رودان	۱۲	۱/۲۱
مجموع		۹۸۴	۱۰۰

شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی

بر اساس نتایج مطالعه ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌ها و آزمون‌های بیماری‌زایی مقدماتی روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی، سه جدایه UJFCC1918، UJFCC1919 و UJFCC1920 برای انجام آزمون‌های مولکولی انتخاب شدند. شناسایی جدایه‌ها در سطح مولکولی از طریق تکثیر و توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA و بخشی از ژن *tefl-a* (برای جدایه‌های *Fusarium*) انجام شد. با استفاده از جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 و EF1/EF2 به ترتیب قطعاتی به طول حدود ۵۰۰ و ۴۰۰-۵۰۰ جفت باز تکثیر شدند. بر اساس جستجوی BLASTn، توالی ناحیه ژنی *tefl-a* جدایه‌های UJFCC1918 و UJFCC1919 دارای شباهت ۹۹ درصدی با توالی معتبر جدایه *F. oxysporum* CBS144134 با کد دسترسی MH485044 بود. با توجه به داده‌های حاصل از مطالعه ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی، این جدایه‌ها به عنوان *F. oxysporum* شناسایی شدند. به علاوه، توالی ناحیه ژنی *tefl-a* جدایه UJFCC1920 شباهت ۹۹/۷۱ درصدی با توالی معتبر جدایه *F. acutatum* CBS 402.97 با کد دسترسی MT010989 داشت و این جدایه به عنوان *F. acutatum* شناسایی شد. دو جدایه منتخب *F. oxysporum* که بر اساس نتایج آزمون بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی بیماری‌زا بودند، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی sprIF/spr1R به عنوان *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* تشخیص داده شدند. با استفاده از این آغازگرها، قطعه‌ای به طول ۹۵۰ جفت باز تکثیر شد و با جفت آغازگرهای sp13F/sp13R و sp23F/sp23R هیچ بانندی تکثیر نشد (شکل ۳). مشخصات و شماره دسترسی بانک ژن برخی از جدایه‌های قارچی به دست آمده در تحقیق حاضر در جدول ۴ نشان داده شده است.



شکل ۳. قطعات DNA تکثیر شده (۹۵۰ جفت باز) توسط آغازگر اختصاصی فرم ویژه *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, شماره‌های ۱۰۲ و ۴۸۳ به ترتیب متعلق به جدایه‌های UJFCC1918 و UJFCC1919 هستند.

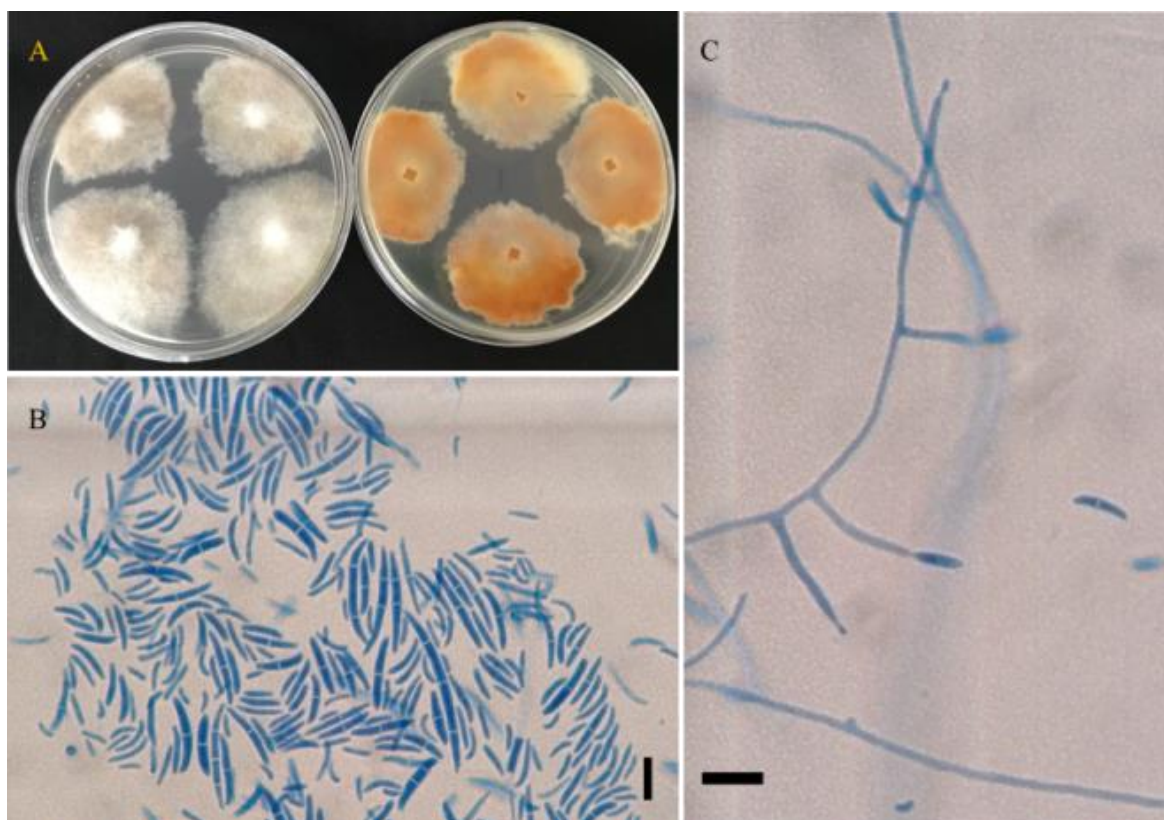
جدول ۴. مشخصات و شماره دسترسی بانک ژن برخی جدایه‌های قارچی به دست آمده در تحقیق حاضر

نام گونه	شماره جدایه	میزبان	منطقه	شماره دسترسی بانک ژن	تفلی-ا
<i>Fusarium acutatum</i>	UJFCC1920	ریشه گوجه‌فرنگی	ایسین	-	ITS-rDNA
<i>Fusarium oxysporum</i> (102)	UJFCC1919	ریشه گوجه‌فرنگی	پارسیان	OQ862572	<i>tefl-a</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> (483)	UJFCC1918	ریشه گوجه‌فرنگی	کهورستان	OQ862573	

ویژگی‌های ریخت‌شناسی قارچ‌های بیمارگر

Fusarium acutatum Nirenberg & O'Donnell, Mycologia 90 (3): 435 (1998)

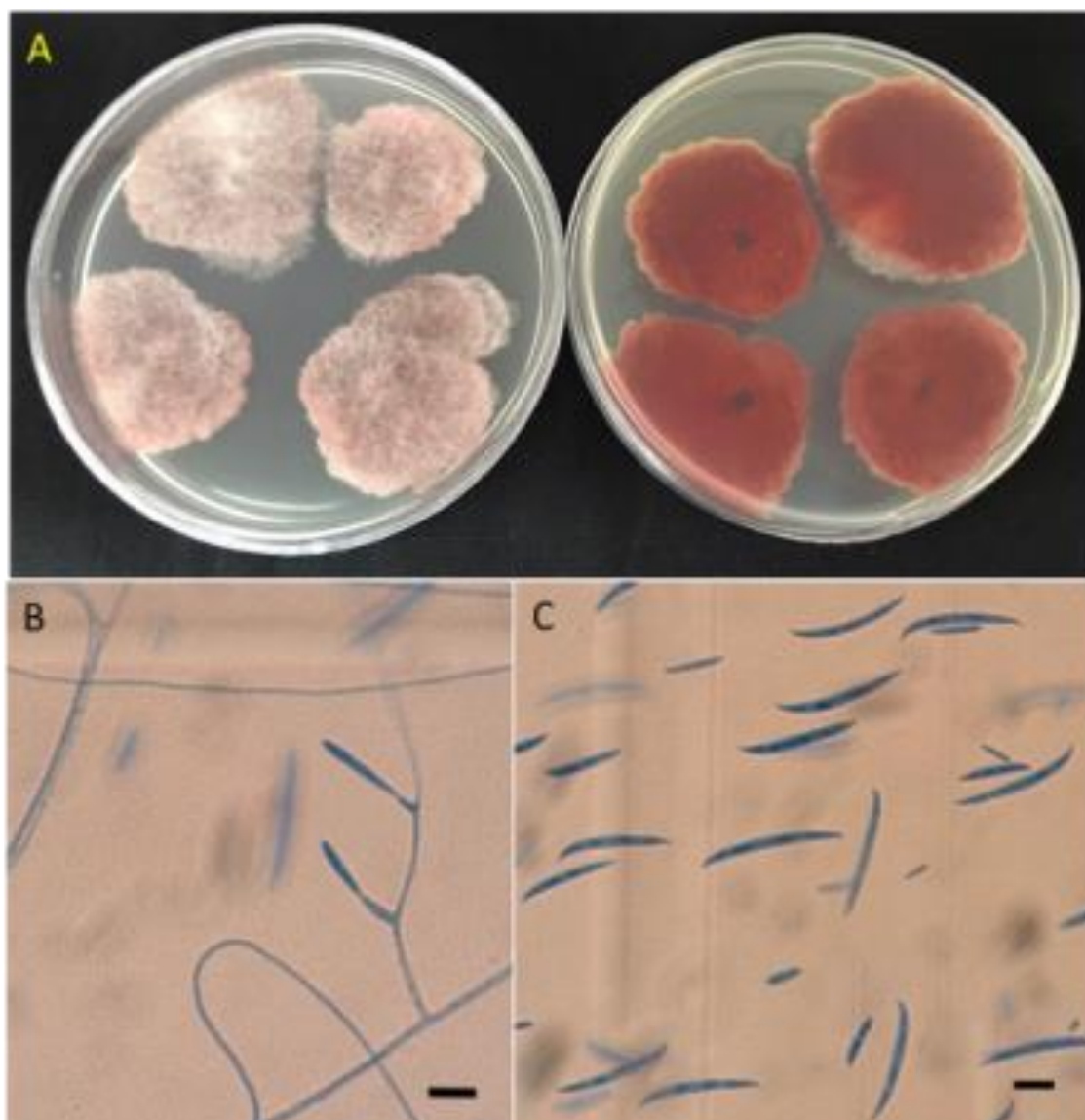
قطر پرگنه‌ها روی محیط کشت PDA پس از هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به هشت سانتی‌متر می‌رسد. میسلیوم‌های هوایی بسیار اندک و به رنگ سفید هستند. رنگ پرگنه‌ها با گذشت زمان، کمی تیره می‌شود. در برخی از جدایه‌ها، رنگدانه‌های متمایل به زرد تا نارنجی در سطح زیرین پرگنه تشکیل می‌شود. ماکروکنیدیوم‌ها هلالی شکل، دارای تا سه دیواره عرضی و به ابعاد ۳۵-۴۰ (۳۰-) × ۳-۴ میکرومتر هستند. میکروکنیدیوم‌ها سوسپسی و کلیه‌ای شکل و به ابعاد ۹-۶ × ۳/۵-۳ میکرومتر روی مونوفیالیدها به صورت سر دروغین تشکیل می‌شوند. کلامیدوسپورها به شکل گرد تا بیضوی و با دیواره صاف و فراوان روی ریشه‌ها تشکیل می‌شوند (شکل ۴).



شکل ۴. گونه *Fusarium acutatum* (جدایه UJFCC1920). A: پرگنه، سطح بالایی (چپ) و زیری (راست) روی محیط کشت PDA پس از هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، B: ماکروکنیدیومها، C: مونوفیالید و میکروکنیدیومها، مقیاس ۱۰ میکرومتر.

Fusarium oxysporum Schldl., Flora Berolinensis, Pars secunda: Cryptogamia: 106 (1824)

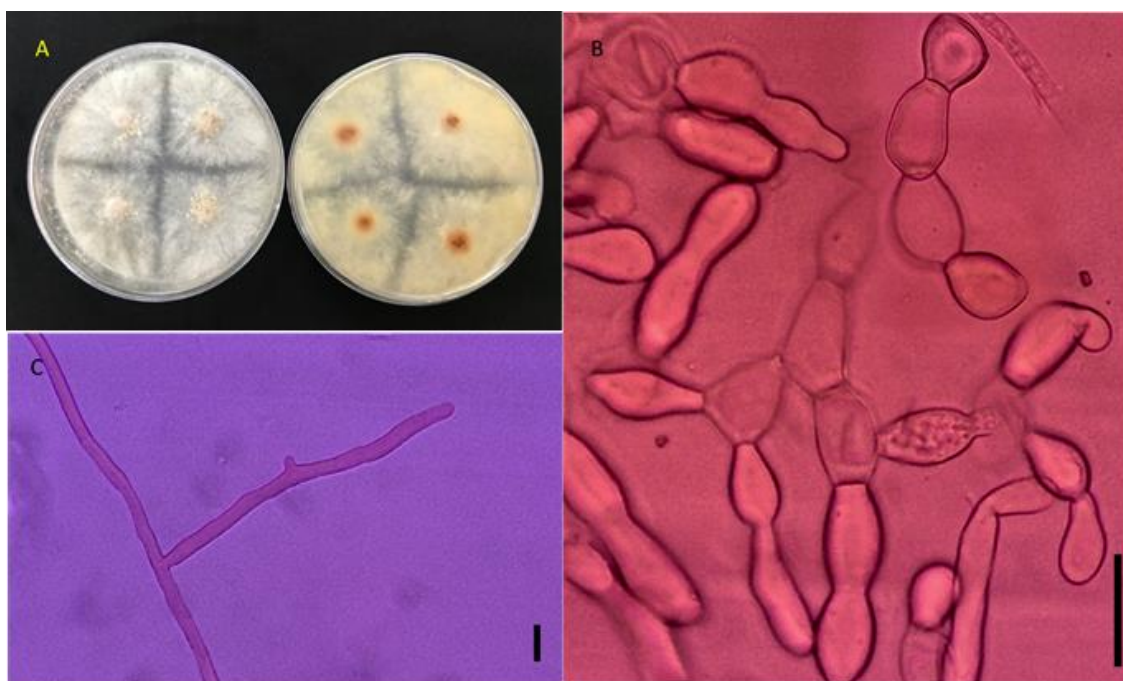
قطر پرگنه‌ها روی محیط کشت PDA پس از هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به حدود هشت سانتی متر می‌رسد. میسلیم‌های هوایی بسیار متراکم در سطح پرگنه مشاهده می‌شوند. رنگ مرکز پرگنه با گذشت زمان به ارغوانی تا بنفش تغییر می‌یابد. ماکروکنیدیومها راست تا کمی کشیده و دارای سه دیواره عرضی به ابعاد $۳۵-۲۵$ ($۲۰-۲۵$) \times $۴-۳$ ($۵-۴$) میکرومتر هستند. میکروکنیدیومها به شکل‌های تخم‌مرغی، بیضوی یا کلیه‌ای شکل روی مونوفیالیدها و غالباً به صورت سرهای دروغین تشکیل می‌شوند. میکروکنیدیومها معمولاً بدون دیواره عرضی و یا یک دیواره عرضی به ندرت در برخی میکروکنیدیومها مشاهده می‌شود. میکروکنیدیومها به ابعاد $۱۰-۴$ ($۱۲-۱۰$) \times $۳-۱/۵$ ($۱-۱$) هستند. سلول‌های کنیدیومزا مونوفیالید، کوتاه و اغلب غیرمنشعب هستند (شکل ۵).



شکل ۵. گونه *Fusarium oxysporum* (جدایه UJFCC1919). A: پرگنه، سطح بالایی (چپ) و زیری (راست) روی محیط کشت PDA پس از هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، B: مونوفیالید، C: ماکروکنیدیوم‌ها و میکروکنیدیوم‌ها، مقیاس ۱۰ میکرومتر.

Rhizoctonia solani J.G. Kühn, Die Krankheiten der Kulturgewächse, ihre Ursachen und Verbreitung: 224 (1858)

پرگنه‌ها روی محیط کشت PDA در ابتدا بی‌رنگ هستند و با گذشت زمان رنگ آنها به سفید تغییر می‌یابد. سختینه‌ها در مرکز و اطراف پرگنه‌ها تولید می‌شوند. رنگ سختینه‌ها در ابتدا سفید است و به تدریج به تیره تغییر می‌یابد. سطح زیرین پرگنه‌ها در محل تشکیل سختینه کمی تیره است. سلول‌های جوان ریشه دراز و سلول‌های مسن، کوتاه‌تر دیده می‌شوند. سلول‌های ریشه به عرض ۶-۹ میکرومتر هستند. سلول‌های ریشه در محل تولید سختینه تمایز می‌یابند و سلول‌های دانه تسبیحی (Monilioid cells) به ابعاد $(12-)$ $10-8$ $(5-)$ $3-4$ میکرومتر تشکیل می‌دهند. در برخی ریشه‌ها انشعاب قائمه وجود دارد و در محل انشعاب کمی فرورفتگی دارند. پرگنه‌ها فاقد کنیدیوم هستند (شکل ۶).



شکل ۶. گونه *Rhizoctonia solani* (جدایه UJFCC1922). A: پرگنه روی محیط کشت PDA پس از هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، B: سلول‌های تنسیجی، C: انشعابات قائمه روی ریشه، مقیاس ۱۰ میکرومتر.

آزمون‌های بیماری‌زایی

در این تحقیق، از هر یک از گونه‌های *F. acutatum*، *F. oxysporum* و *R. solani* که از گیاهان گوجه‌فرنگی با علائم پوسیدگی ریشه و طوقه به دست آمده بودند، دو جدایه به طور تصادفی انتخاب شدند و بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی هیبرید سانسید ۶۱۸۹ با چهار برگ حقیقی مورد آزمون قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های بیماری‌زایی، تمام جدایه‌های مورد بررسی روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی بیماری‌زا بودند. به طور کلی، علائم ناشی از این جدایه‌ها شامل زردی، پژمردگی، خشک و بافت مرده شدن اندام هوایی، پوسیدگی و تغییر رنگ ریشه و طوقه، کاهش حجم ریشه، کاهش رشد عمومی و مرگ گیاه بود. با این حال، زمان ظهور علائم بیماری و سرعت پیشروی علائم ناشی از هر یک از گونه‌ها تا حدودی با یکدیگر تفاوت داشت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که بین گونه‌های قارچی مختلف از نظر شدت بیماری در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف آماری معنی‌دار در سطح یک درصد وجود دارد (جدول ۵). پانزده روز پس از مایه‌زنی، بیشترین و کمترین میانگین شدت بیماری در مقایسه با تیمار شاهد، به ترتیب به گونه‌های *R. solani* (۹۹/۹۳ درصد) و *F. acutatum* (۷۵/۲۱ درصد) تعلق داشت. به علاوه، میانگین شدت پوسیدگی ریشه و طوقه در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با گونه *F. oxysporum*، ۹۲/۶۵ درصد محاسبه شد (جدول ۶).

جدول ۵. تجزیه واریانس شدت بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با گونه‌های قارچی

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار (جدایه‌های قارچی)	۳	۶۳۰۳/۷۷۴۱۴**
خطا	۸	۲/۲۶۶۳۹
ضریب تغییر (%)	۲/۲۴	

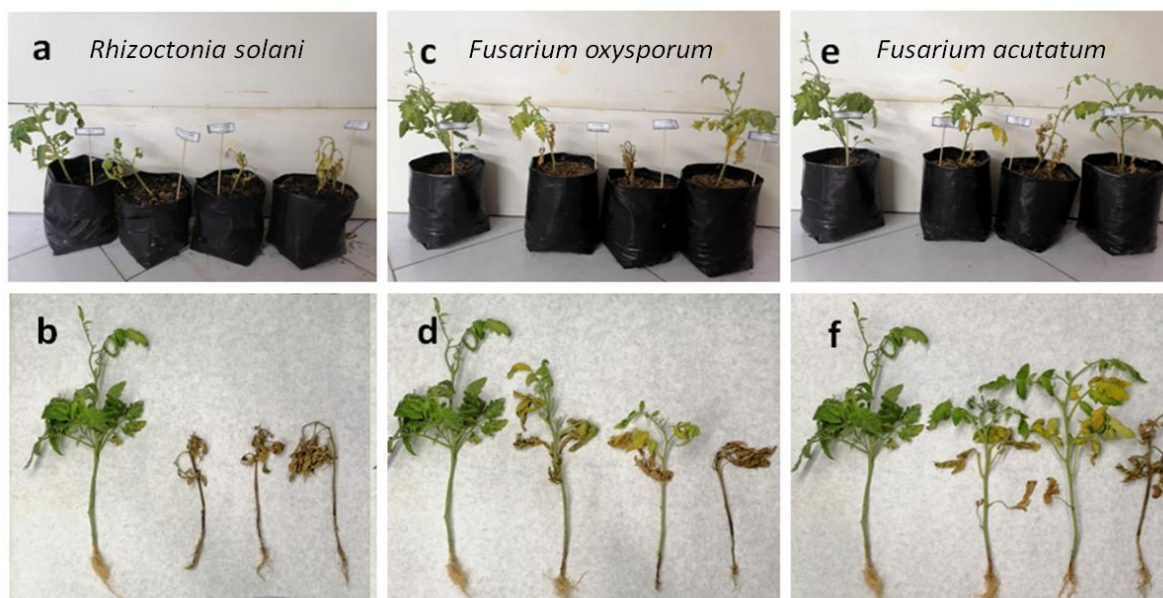
**معنی‌دار در سطح احتمال آماری یک درصد

جدول ۶. مقایسه میانگین شدت بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی، ۱۵ روز پس از مایه‌زنی با جدایه‌های قارچی

نام گونه	شدت بیماری (%)
<i>Rhizoctonia solani</i>	۹۹/۹۳ ^a
<i>Fusarium oxysporum</i>	۹۲/۶۵ ^b
<i>Fusarium acutatum</i>	۷۵/۲۱ ^c
شاهد	صفر ^d

نخستین علائم بیماری در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های *R. solani*، پنج روز پس از مایه‌زنی به صورت زرد شدن برگ‌ها و پژمردگی بخش هوایی گیاهچه‌ها پدیدار شد. هفت روز پس از مایه‌زنی، زخم‌هایی به رنگ قهوه‌ای تیره روی ریشه و طوقه مشاهده شد و حدود ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، گیاهچه‌ها به طور کامل از بین رفتند (شکل Ya-b). پس از کشت قطعات ریشه و طوقه آلوده روی محیط‌کشت PDA، جدایه‌های *R. solani* از قطعات مربوطه جداسازی شدند.

دو جدایه مورد بررسی از هر یک از گونه‌های *F. oxysporum* و *F. acutatum* روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی بیماری‌زا بودند. نخستین علائم ناشی از جدایه‌های *F. oxysporum*، پنج روز پس از مایه‌زنی به صورت زرد شدن برگ‌های پایینی گیاهچه‌ها پدیدار شد که با پیشروی آلودگی، زردی به تدریج به سمت برگ‌های بالاتر توسعه یافت. ده روز پس از مایه‌زنی، بخش هوایی گیاهچه‌ها پژمرده و خشک شدند و حدود ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، تعدادی از گیاهچه‌ها از بین رفتند. علائم آلودگی روی ریشه‌ها به صورت کاهش حجم ریشه، ایجاد زخم‌های بافت‌مرده روی ریشه‌های مویین و طوقه و تغییر رنگ این بافت‌ها به قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره مشاهده شد که با علائم ناشی از وقوع آلودگی‌های طبیعی در مزارع مورد بررسی مشابه بود (شکل Yc-d). الگوی ظهور و پیشروی علائم ناشی از جدایه‌های *F. acutatum* روی گیاهچه‌ها با علائم جدایه‌های *F. oxysporum* مشابه بود. علائم ایجاد شده به وسیله *F. acutatum* حدود پنج روز پس از مایه‌زنی پدیدار شد. با این حال، گیاهچه‌ها در مدت طولانی‌تر و حدود ۲۵ روز پس از مایه‌زنی از بین رفتند (شکل Ye-f). پس از کشت قطعات ریشه و طوقه آلوده روی محیط‌کشت PDA، جدایه‌های *F. acutatum* و *F. oxysporum* از قطعات مربوطه جداسازی شدند.



شکل ۷. آزمون بیماری‌زایی گونه‌های قارچی جداسازی شده از گیاهان گوجه‌فرنگی در مناطق مختلف استان هرمزگان روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی هیبرید سانسید ۶۱۸۹ با چهار برگ حقیقی، پانزده روز پس از مایه‌زنی (راست) و گیاهچه شاهد (چپ). a-b: *Rhizoctonia solani*، c-d: *Fusarium oxysporum* و e-f: *Fusarium acutatum*

بحث

پوسیدگی ریشه و طوقه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گوجه‌فرنگی در استان هرمزگان به شمار می‌رود. در مزارعی که راهبردهای مدیریت بیماری به صورت صحیح اعمال نمی‌شوند، سالیانه بخش قابل‌توجهی از محصول گوجه‌فرنگی به دلیل خسارت ناشی از این بیماری از بین می‌رود. بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، گونه *F. oxysporum* با مجموع فراوانی ۷۳/۱۷ درصد، از ریشه و طوقه گیاهان گوجه‌فرنگی با علائم زردی، پژمردگی و پوسیدگی ریشه و طوقه از تمام مزارع نمونه-برداری شده جداسازی شد و در مقایسه با سایر گونه‌های به دست آمده از بیشترین فراوانی و پراکنش در مناطق مورد بررسی برخوردار بود. نتایج آزمون بیماری‌زایی دو جدایه از *F. oxysporum* نشان داد که این جدایه‌ها سبب بافت‌مرده شدن ریشه و طوقه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی، بدون تغییر رنگ بافت‌های آوندی گیاه می‌شوند و بر این اساس، به عنوان *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* شناسایی شدند. جدایه‌های FOL و FORL از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی روی محیط‌کشت‌های مصنوعی کاملاً با یکدیگر مشابه هستند و به همین دلیل، تفکیک این دو بیمارگر تنها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی امکان‌پذیر نیست (Leslie & Summerell, 2006). تمایز اولیه FOL و FORL در شرایط مزرعه عمدتاً از طریق تشخیص علائم اختصاصی بیماری انجام می‌شود. این علائم شامل پژمردگی آوندی برای FOL و پوسیدگی ریشه و طوقه برای FORL است. یکی دیگر از تفاوت‌های قابل‌توجه بین FOL و FORL، محدوده دمایی مناسب برای رشد و فعالیت این دو بیمارگر است. FOL در شرایط گرم و دماهای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس فعالیت بیشتری دارد، در حالی که دمای بهینه برای فعالیت FORL، ۲۰-۱۵ درجه سلسیوس است که از دمای بهینه برای FOL کمتر است. با وجود تفاوت‌های ذکر شده، استفاده از روش‌های مولکولی برای تأیید شناسایی این دو فرم اختصاصی امری ضروری است (Degani & Kalman, 2021). در حال حاضر، FORL دارای پراکنش جهانی است و از مناطق عمده تولید گوجه‌فرنگی در دنیا گزارش شده است (Cabral et al., 2020). تا کنون گزارشی از FORL از مزارع گوجه‌فرنگی استان هرمزگان در دسترس نبود و این فرم اختصاصی به عنوان یک بیمارگر قرنطینه‌ای برای این استان در نظر گرفته می‌شد. در تحقیق حاضر، انجام آزمون PCR با استفاده از مجموعه‌ای از آغازگرهای اختصاصی، شناسایی اولیه جدایه‌های *F. oxysporum* و وقوع فرم اختصاصی FORL را در استان هرمزگان مورد تأیید قرار داد. یکی از روش‌های رایج پراکنش بیماری به مناطق جدید، انتشار عامل بیماری از طریق بذر، نشاء و خاک آلوده است. بر این اساس، حضور FORL در مناطق متعدد و متمایز از نظر جغرافیایی را می‌توان به انتشار این بیمارگر از طریق خاک و مواد گیاهی آلوده نسبت داد. در بررسی حاضر، هر دو جدایه مورد بررسی *F. oxysporum* روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی بیماری‌زا بودند و حدود ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، علائمی مشابه با علائم مشاهده شده در مزارع، روی این گیاهچه‌ها پدیدار شد. با توجه به جداسازی *F. oxysporum* از تمام مزارع مورد بررسی و همچنین نتایج به دست آمده از آزمون‌های بیماری‌زایی، می‌توان این گونه قارچی را عامل اصلی مولد پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در استان هرمزگان به شمار آورد. هرچند که تعیین فراوانی جدایه‌های FOL و FORL در مناطق مورد بررسی، مستلزم انجام آزمون‌های مولکولی با تعداد بیشتری از جدایه‌های *F. oxysporum* است. در این مطالعه، گونه *F. acutatum* نیز از ریشه و طوقه گیاهان گوجه‌فرنگی جداسازی شد، هرچند که کمترین فراوانی در بین گونه‌های قارچی شناسایی شده به این گونه تعلق داشت. در دو مطالعه دیگر نیز گونه *F. acutatum* به عنوان عامل پژمردگی گوجه‌فرنگی و پوسیدگی طوقه پیاز گزارش شده است (Degani & Kalman, 2021; Khamas et al., 2021). در تحقیق حاضر، مجموع فراوانی جدایه‌های *R. solani* در مناطق مورد بررسی ۸/۲۳ درصد بود و تنها ۸۱ جدایه از این بیمارگر از دو منطقه پارسیان و هشتبندی جداسازی شد. با این حال، این گونه در مقایسه با سایر گونه‌های مورد بررسی، به عنوان پرازاترین بیمارگر روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی شناخته شد. گونه *R. solani* عمدتاً به عنوان عامل بیماری مرگ گیاهچه شناخته می‌شود. این بیمارگر، میزبان‌های گیاهی را عمدتاً در مراحل اولیه رشد مورد حمله قرار می‌دهد و گیاهان بالغ در مقایسه با گیاهچه‌ها نسبت به این بیمارگر مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. بر این اساس، حضور بسیار اندک جدایه‌های *R. solani* در مزارع مورد بررسی در استان هرمزگان را می‌توان به مقاومت گیاهان

گوجه‌فرنگی بالغ نسبت به این گونه قارچی نسبت داد. بر اساس اطلاعات موجود، این مطالعه، نخستین گزارش از *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* از مزارع گوجه‌فرنگی استان هرمزگان و نخستین گزارش از *F. acutatum* به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در دنیا است.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر، شامل جداسازی گونه‌های قارچی از ریشه و طوقه گیاهان گوجه‌فرنگی با علائم زردی و پژمردگی و اثبات بیماری‌زایی آنها، بیانگر نقش قارچ‌های خاک‌زاد به ویژه *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* در وقوع پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در استان هرمزگان است. اقداماتی نظیر استفاده از ارقام مقاوم به بیماری، کاشت گیاهچه‌های عاری از بیماری، مدیریت تغذیه و آبیاری و پیشگیری از وارد شدن هرگونه تنش به گیاهان از جمله راه‌کارهای مدیریت پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی به شمار می‌روند. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی، مقاومت ارقام رایج گوجه‌فرنگی در مناطق ذکر شده نسبت به *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشگاه جیرفت جهت حمایت مالی و مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان جهت مساعدت برای انجام برخی آزمایشات این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- امتی، فرخنده و ارشاد، جعفر (۱۳۸۳، شهریور). شناسایی عوامل قارچی پژمردگی گوجه‌فرنگی از نهالستان‌ها و مزارع استان سمنان. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. تبریز، ایران.
- امینی، جهانشیر؛ کاظمی، مرضیه؛ عبدالله‌زاده، جعفر و درویش نیا، مصطفی (۱۳۹۲). شناسایی و بیماری‌زایی گونه‌های فوزاریوم مرتبط با ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در منطقه مرودشت. دانش گیاهپزشکی ایران، ۴۴ (۱)، ۷۱-۸۰.
- پروین، محمدرضا و فرخی نژاد، رضا (۱۳۹۰). تعیین تنوع ژنتیکی *Fusarium solani* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی. تحقیقات بیماری‌های گیاهی، ۱ (۲)، ۵۹-۶۸.
- رحیمیان، حشمت‌اله (۱۳۶۷). گروه آناستوموزی *Rhizoctonia solani* عامل پوسیدگی ریزوکتونیایی میوه گوجه‌فرنگی در مازندران. بیماری‌های گیاهی، ۲۴، ۹-۱۱.
- شرزای، عباس؛ حیدری، سارا و رئوفی، فریبا (۱۳۹۲). شناسایی قارچ‌های بیماری‌زای ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در شهرستان مرودشت، استان فارس، ایران. تحقیقات بیماری‌های گیاهی، ۱ (۳)، ۵۷-۶۴.
- شکاری، اعظم؛ میرابوالفتحی، منصوره؛ محمدی پور، محمد؛ زاد، جواد و اخوت، سید محمود (۱۳۸۵). پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه و طوقه تعدادی از گیاهان زراعی، صیفی و جالیز در استان آذربایجان شرقی. بیماری‌های گیاهی، ۴۲ (۲)، ۲۹۳-۳۰۸.
- صدری، مهدی و ستایش مهر، فاطمه (۱۳۸۷). بیماری‌های قارچی گوجه‌فرنگی در استان خراسان شمالی و واکنش چهار رقم تجاری نسبت به آنها. بیماری‌های گیاهی، ۴۴ (۴)، ۳۵۵-۳۶۱.
- عراقی، میرمعصوم؛ رهنما، کامران و تقی نسب، میثم (۱۳۸۸). بررسی بیوکنترل عامل بوته‌میری گوجه‌فرنگی (*Rhizoctonia solani* Kuhn) توسط *Bacillus subtilis*. پژوهش‌های تولید گیاهی، ۱۶ (۳)، ۱۸۷-۱۹۱.
- فکری کهن، سپیده و مستوفی‌زاده قلمفرسا، رضا (۱۳۹۹). تاکسونومی، فیلوژنی و بیماری‌زایی برخی گونه‌های *Bipolaris* و *Curvularia* همراه با تعدادی از گندمیان در جنوب ایران. بیماری‌های گیاهی، ۵۶ (۲)، ۱۲۵-۱۵۲.
- محمدنیا افروزی، شهریار؛ اسفندیاری پور، الهام؛ حاتمی، فرشاد؛ عبادزاده، حمیدرضا؛ عباس طاقانی، رضا و احمدی، کریم (۱۴۰۰). آمارنامه کشاورزی سال ۹۹-۱۳۹۸. تهران: مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات وزارت جهاد کشاورزی.

- Amini, J., Kazemi, M., Abdollahzadeh, J., & Darvishnia, M. (2013). Identification of *Fusarium* spp. and their pathogenicity associated with root rot of tomato, Marvdasht. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 44(1), 71-80 (in Persian).
- Mohammadnia Afrouzi, S., Esfandyari pour, E., Hatami, F., Ebadzadeh, H. R., Abbas Taghani, R., & Ahmadi, K. (2022). Agricultural statistics 2018-2019. Tehran: Information and Communication Technology Center of the Ministry of Agricultural Jihad (in Persian).
- Cabral, C. S., Gonçalves, A. M., Fonseca, M. E. N., Urben, A. F., Costa, H., Lourenco, V., Boiteux, L. S., & Reis, A. (2020). First detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* across major tomato-producing regions in Brazil. *Phytoparasitica*, 48(4), 545-553.
- Davis, R. M., & Paulus, A. O. (2014). *Fusarium* crown and root rot. In J. B. Jones, T. A. Zitter, T. M. Momol, & S. A. Miller (Eds.), *Compendium of tomato diseases and pests* (pp. 25-27). USA: APS Press.
- Degani, O., & Kalman, B. (2021). Assessment of commercial fungicides against Onion (*Allium cepa*) basal rot disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and *Fusarium acutatum*. *Journal of Fungi*, 7(3), 235.
- El-Marzoky, H. A., Abdalla, M. E., Abdel-Sattar, M. A., & Abid, M. A. (2018). Management of crown and root rot diseases in strawberry commercial fields in Egypt. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 9(7), 399-404.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41, 95-98.
- Hamini-Kadar, N., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., & Steinberg, C. (2010). First report of *Fusarium commune* and *Fusarium redolens* causing crown and root rot on tomato in Algeria. *New Disease Reports*, 22(1), 3.
- Hirano, Y., & Arie, T. (2006). PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology*, 72, 273-283.
- Iraqi, M. M., Rahnema, K., & Taghinasab, M. (2009). A survey on biocontrol of *Rhizoctonia solani* Kuhn damping-off of tomato with *Bacillus subtilis*. *Journal of Plant Production*, 16(3), 187-191 (in Persian).
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., & Zitter, T. A. (1991). *Compendium of tomato diseases*. USA: APS Press.
- Khamas, A. D., Nasir, A. A. M., & Ameen, M. K. M. (2021). *Fusarium brachygibbosum* and *Fusarium acutatum* were first recorded as wilting agents on tomato plants in Basra. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(4), 11356-11362.
- Kurt, S., Uysal, A., Soylu, E. M., Kara, M., & Soylu, S. (2020). Characterization and pathogenicity of *Fusarium solani* associated with dry root rot of citrus in the eastern Mediterranean region of Turkey. *Journal of general plant pathology*, 86, 326-332.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. USA: Blackwell.
- Muyolo, N. G., & Schmitthenner, A. F. (1993). Reactions of dry bean, lima bean, and soybean cultivars to *Rhizoctonia* root and hypocotyl rot and web blight. *Plant Disease*, 77, 234-238.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species, an illustrated manual for identification*. USA: Pennsylvania State University Press.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Casper, H. H. (1998). Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genetics and Biology*, 23(1), 57-67.
- Ommati, F., & Ershad, J. (2004, August). *Identification of fungal agents of tomato wilting from nurseries and fields of Semnan province*. Paper presented at the 16th Iranian Plant Protection Congress. Tabriz, Iran (in Persian).
- Parvin, M. R., & Farokhi-Nejad, R. (2013). Genetic diversity of *Fusarium solani* the causal agent of tomato root and crown rot using VCGs. *Research in Plant Pathology*, 1(2), 59-68 (in Persian).
- Rahimian, H. (1988). Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* causing soil rot of tomato fruit in Mazandaran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 24, 9-11 (in Persian).

- Rayner, R.W. (1970). *A mycological color chart*. UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Rozlianah, F. S., & Sariah, M. (2010). Characterization of Malaysian isolates of *Fusarium* from tomato and pathogenicity testing. *Research Journal of Microbiology*, 5(9), 266-272.
- Sadravi, M., & Setayesh Mehr, F. (2009). Fungal diseases of tomato in North Khorasan province and the reaction of four commercial cultivars to their pathogens. *Iranian Journal of Plant Pathology* 44(4), 355-361 (in Persian).
- Sharzei, A., Heidary, S., & Raufi, F. (2013). Identification of tomato root and crown pathogenic fungi in Marvdasht region, Iran. *Research in Plant Pathology*, 1(3), 57-64 (in Persian).
- Sharma, A., Sharma, N. K., Srivastava, A., Kataria, A., Dubey, S., Sharma, S., & Kundu, B. (2018). Clove and lemongrass oil based non-ionic nanoemulsion for suppressing the growth of plant pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Industrial crops and products*, 123, 353-362.
- Shekari, A., Mirabolfathi, M., Mohammadi-Pour, M., Zad, J., & Okhovvat, S. M. (2006). Phytophthora root and crown rot of several field and vegetable crops in East Azarbaijan Province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 42(2), 293-308 (in Persian).
- Sivanesan, A. (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers*, 158, 1-261.
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia species*. USA: APS press.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 30(12), 2725-2729.
- Viani, A., Alizadeh, A., Babadoust, M., & Peighami, E. (2008). Investigation on *Fusarium* diseases of tomatoes in East Azerbaijan. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources*, 14, 192-206.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315-322). USA: Academic Press.
- Woodhall, J. W., Brown, L., Harrington, M., Murdock, M., Pizolotto, C. A., Wharton, P. S., & Duellman, K. (2022). Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* associated with potatoes in Idaho. *Plant Disease*, 106(12), 3127-3132.
- Ye, Q., Wang, R., Ruan, M., Yao, Z., Cheng, Y., Wan, H., Li, Z., Yang, Y., & Zhou, G. (2020). Genetic diversity and identification of wilt and root rot pathogens of tomato in China. *Plant disease*, 104(6), 1715-1724.
- Yezli, W., Hamini-Kadar, N., Zebboudj, N., Blondin, L., Tharreau, D., & Kihal, M. (2019). First report of crown and root rot of tomato caused by *Fusarium equiseti* in Algeria. *Journal of Plant Pathology*, 101, 1249.
- Yue, Z. L., Tian, Z. J., Zhang, J. W., Zhang, S. W., Li, Y. D., & Wu, Z. M. (2022). Overexpression of lectin receptor-like kinase 1 in tomato confers resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 836269.
- Zebboudj, N., Yezli, W., Hamini-Kadar, N., & Kihal, M. (2020). Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Fusarium* species responsible for tomato crown and root rots. *Environmental and Experimental Botany*, 18, 7-13.
- Zhong, S., & Steffenson, B. J. (2001). Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*, 91(5), 469-476.