Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 52, No 1, Spring and Summer 2021 (149-159)
DOI: 10.22059/ijpps.2021.308465.1006956

دانش گیاهپزشکی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۰ (۱۵۹ص-۱۴۹)

جدا سازی، شناسایی و پراکنش گونه‌های *Fusarium* آلوده کننده خاک در دو اقلیم مختلف افغانستان

حبیب الله بهلولزاده[۱]، حسین صارمی[۲]*، محمد جوان نیکخواه[۳]، سید محمدباقر حسینی[۴] و مریم فلاحی[۵]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد،گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲ , ۳. استاد، گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۴. استاد یار، گروه اگرانومی، دانشکده زراعت، دانشگاه بامیان، افغانستان
۵. دانش آموخته دکتری گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۲۷- تاریخ پذیرش:۹۹/۱۲/۱۷)

چکیده

اعضای جنس *Fusarium* از بیمارگرهای مهم خاکزاد می‌باشند که سبب بروز خسارت جدی در تولید محصولات زراعی و باغی در دنیا می‌گردند. به‌منظور شناسایی و بررسی پراکنش گونه‌های *Fusarium* آلوده کننده خاک‌های زراعی در مناطق بامیان و دایکندی با اقلیم نیمه صحرایی و مناطق قندهار و هلمند با اقلیم صحرایی افغانستان، نمونه برداری در سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ صورت گرفت. برای جداسازی جدایه‌های *Fusarium* از نمونه های خاک، محیط کشت اختصاصی PPA (Pepton PCNB Agar) استفاده شد. همچنین جهت شناسایی اولیه جدایه‌ها از ویژگی‌های ریخت شناختی براساس کشت جدایه ها روی محیط‌های کشت CLA (Carnation Leaf-piece Agar)، SNA (Synthetic Nutrient Agar) و PDA (Potato Dextrose Agar) استفاده شد. به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌ها، توالی یابی بر اساس ناحیه ی ژنی *tef-1α* صورت گرفت. توالی های بدست آمده با استفاده از ابزار جستجوی BLAST با توالی های موجود در بانک‌های اطلاعاتی ژنتیکی معتبر (FUSARIUM ID و NCBI) مقایسه شدند و درخت فیلوژنتیکی در نرم افزار MEGA6.0 نصب شد. در مجموع ۱۳۴ جدایه *Fusarium* جداسازی گردید که در ۱۱ گونه مختلف قرار گرفتند. به‌طوریکه حضور گونه‌های *F. incarnatum-equiseti* species complex (FIESC) (۲۸٪)، *F. solani* (۱۶٪)، *F. acuminatum* (۶٪)، *F. verticillioides* (۵٪)، *F. oxysporum* (۳٪)، *F. coeruleum* (۱٪) و *F. compactum* (۱٪) با فراوانی متفاوت در هر دو اقلیم مورد نمونه برداری ردیابی شد. گونه *F. sambucinum* (۱٪) در مناطقی که زمستان فوق العاده سرد و تابستان خشک داشتند و دارای اقلیم نیمه صحرایی بودند (استان‌های بامیان و دایکندی) جداسازی گردید. درحالی‌که گونه‌های *F. proliferatum* (۱۸٪)، *F. culmorum* (۱۳٪) و *F. pseudograminearum* (۱٪) در مناطقی که زمستان معتدل و تابستان فوق العاده گرم داشتند و دارای اقلیم صحرایی بودند (استان‌های هلمند و قندهار) جداسازی و شناسایی شدند. نتایج بدست آمده در این تحقیق در رابطه با شناسایی و پراکنش جغرافیایی گونه‌های مختلف *Fusarium* در افغانستان، اطلاعات مفیدی برای مدیریت بهتر این بیمارگرهای خاکزاد در مزرعه در اختیار قرار می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *Fusarium*، اقلیم صحرایی، اقلیم نیمه صحرایی، شناسایی ریخت شناختی، *tef-1α* .

Isolation, identification and dissemination of *Fusarium* species from soil of two different climates in Afghanistan

Habibullah bahlolzada[1], Hossein Saremi[*2], Mohammad Javan-Nikkhah[3], , Seyed Muhammad Baqer Hussaini[4] and Maryam Fallahi[5]

1. M.Sc. graduated, department of plant protection, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2, 3. Professor, Department of plant protection, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Associate Professor, College of Agriculture, University of Bamyan, Afghanistan
5. Ph.D. graduated, Department of plant protection, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: October 18, 2020 - Accepted: March 7, 2021)

ABSTRACT

The members of *Fusarium* is one of the important causal agent of soil borne diseases which cause serious damage in the agricultural and horticultural crops in the world. To investigate on dissemination of *Fusarium* species, sampling of agricultural soils was taken in the Bamyan and Daikundi with semi desert climates, and Kandahar and Helmand with desert climates of Afghanistan in 2018-2019. The PPA medium (Pepton PCNB Agar) was used for isolation of *Fusarium* sp.. Morphological characteristics of *Fusarium* isolates were studied by transferring of their pure cultures to CLA (Carnation Leaf-piece Agar), SNA (Synthetic Nutrient Agar) and PDA (Potato Dextrose Agar) mediums. In order to molecular identification, amplified *tef-1α* regions in genomic DNA of the isolates were sequenced and were compared with valid genetic databases (FUSARIUM ID and NCBI) using BLAST search tool and phylogenetic tree was inferred by MEGA6.0 software. Totally 134 *Fusarium* isolates were obtained and grouped in 11 different species. The presence of *F. incarnatum-equiseti* species complex (FIESC) (28%), *F. solani* (16%), *F. acuminatum* (6%), *F.verticillioides* (5%), *F. oxysporum* (3%), *F. coeruleum* (1%) and *F. compactum* (1%) with different frequency were detected in both regions of the sampling areas. *F. sambucinum* (1%) was detected in semi-desert climates (Bamyan and Daikundi provinces), while *F. proliferatum* (18%), *F. culmorum* (13%) and *F. pseudograminearum* (1%) were isolated and identified in areas with desert climates (Helmand and Kandahar provinces). The results of this study around geographical distribution of various species of *Fusarium* in Afghanistan, can provide useful informations about management of these soil borne pathogens.

Key words: *Fusarium*, Desert climate, Semi desert climate, Morphological identification, *tef-1α* .

* Corresponding author E-mail: hsn.saremi@ut.ac.ir

مقدمه

اعضای جنس *Fusarium* گسترش وسیعی در خاک های زراعی و غیر زراعی دارند و باعث ایجاد دامنه گسترده‌ای از بیماری‌های گیاهی می‌شوند (Marasas & WFO, 1988; Jiang *et al.*, 2019). اعضای این جنس با تولید مایکوتوکسین‌های متعدد تأثیرات مخربی بر سلامت انسان و دام دارند (Summerell *et al.*, 2010; Morettie, 2009). دانستن الگوی انتشار اعضای این جنس در مناطق مختلف جغرافیایی می‌تواند اطلاعات مفیدی درباره شرایط رشد و نمو آنها ارائه نماید (Burgess, 1981). مطالعات متعدد در بخش‌های مختلف در دنیا نشان داده که تقسیمات جغرافیایی و فاکتورهای اقلیمی مانند حرارت و بارندگی تأثیر قابل ملاحظه‌ای در انتشار و فراوانی گونه‌های *Fusarium* دارند (Saremi *et al.*, 1999; Leslie *et al.*, 1990; Burgess *et al.* 1994). گونه-هایی هستند که گسترش جهانی دارند (*F. chlamydosporum*، *F. equiseti*، *F. verticillioides*، *F. oxysporum*، *F. poae*، *F. semitectum*، *F. solani* و *F. tricinctum*) (Burgess *et al.* 1994; Kosiak *et al.*, 2003)، برخی گونه‌ها محدود به مناطق معتدل هستند (*F. acuminatum*، *F. avenaceum*، *F. crookwellense*، *F. graminearum*، *F. sambucinum*، *F. sporotrichioides* و *F. culmorum*) (Burgess *et al.* 1994; Kosiak *et al.*, 2003) و همچنین گونه‌هایی که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می‌شوند (*F. beomiforme*، *F. longipes*، *F. compactum* و *F. decemcellulare*) (Burgess *et al.* 1994; Kosiak *et al.*, 2003). *F. verticillioides* و *F. semitectum* نمونه هایی از *Fusarium* spp. هستند که هم مشخصات گونه‌های خاک‌زاد و هم هوازاد را دارند. عمده گونه‌هایی که گیاهان را آلوده می‌کنند خاک‌زاد هستند (Burgess, 1981). گونه‌های غالب جدا شده از نمونه‌های خاک در بیشتر مطالعات گونه‌های *F. culmorum*، *F. oxysporum*، *F. redolens*، *F. avenaceum*، *F. equiseti*، *F. flocciferum* و *F. dimerum* می‌باشند (Kosiak *et al.*, 2003). بررسی محدوده‌های اقلیمی و جغرافیایی پراکنش گونه‌های *F. graminearum*، *F. asiaticum* و *F. boothii* روی گندم با استفاده از مدل BIOCLIM در دنیا نشان داده است که اکثر پارامترهای آب و هوایی مورد استفاده در مدل سازی، اختلاف معنی داری در رابطه با پراکنش این گونه‌ها نشان می‌دهند (Backhouse, 2014). نتایج مطالعه ذکر شده مشخص کرد که *F. graminearum* در مناطق مرتفع دیم کاری تمام قاره ها به جز قطب جنوب گسترش دارد. به نظر می‌رسد محدودیت‌های اقلیمی کمی در پراکنش *F. graminearum* بر روی گندم تاثیر دارند (Backhouse, 2014). توزیع *F. asiaticum* عمدتا به شرق آسیا محدود می‌شود، تجزیه و تحلیل BIOCLIM، پراکنش *F. asiaticum* را در مناطقی نشان می‌دهد که گرمترین دمای آن ۲۲°c است و مقدار بارندگی آن به بیشتر از ۳۲۰ میلی متر می‌رسد. *F. boothii* در مناطق نسبتاً محدود، بیشتر در آفریقا و مکزیک گسترش دارد که دارای آب و هوای گرم و نسبتا خشک است (Backhouse, 2014). همچنین مطالعه گسترش گونه‌های *F. graminearum* (*Gibberella zeae*)، *F. pseudograminearum* و *F. culmorum* در مزارع غلات با استفاده از سیستم BIOCLIM در استرالیا مشخص کرد که *F. graminearum*بیشتر در مناطق معتدل گرم و نیمه گرمسیری با بارندگی متوسط تا زیاد در تابستان شایع است. جایی‌که میانگین دما بالاتر از°c ۱۸,۷ و میزان باران به بیش از ۱۹۵ میلی‌متر می‌رسد (Backhouse & Burgess, 2002). همچنین بررسی‌ها نشان داده است که گسترش *F. culmorum* روی غلات نسبت به *F. pseudograminearum* در مناطقی که که دارای بارندگی بیشتری هستند (بیش از ۵۰۰ میلی‌متر) رخ می‌دهد (Backhouse & Burgess, 2002; Poole *et al.*, 2013). مطالعات جهانی در رابطه با گشترش جغرافیایی گونه *Fusarium circinatum* نشان داد است که این گونه از ۱۴ کشور جهان گزارش شده است (برزیل، شیلی، کلمبیا، فرانسه ، هائیتی، ایتالیا، ژاپن، کره جنوبی، مکزیک، پرتغال، اسپانیا، آفریقای

جنوبی، اروگوئه و ایالات متحده آمریکا) (Drenkhan *et al.*, 2020). این بیمارگر تنها از نهالستان‌های برزیل، شیلی و اروگوئه جداسازی شده است و هنوز در درختان بالغ مشاهده نشده است (Drenkhan *et al.*, 2020). بررسی تنوع گونه‌های *Fusarium* درمناطق مرتفع و گرمسیری و معتدل مالزی نشان داده است که از بین ۲۰ گونه شناسایی شده در مناطق مرتفع مالزی بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به گونه‌های *F. solani*، *F. graminearum*، *F. oxysporum*، *F. semitectum*، *F. lutinans* و *F. proliferatum* می‌باشد (Manshor *et al.*, 2012).

همان‌گونه که اشاره شد گونه‌های *Fusarium* بیمارگر دامنه وسیعی از محصولات کشاورزی هستند (Saremi, 2005) و موجب بروز بیماری‌های متعددی نظیر پوسیدگی اندام‌های مختلف (ریشه، طوقه، ساقه، غده و خوشه)، پژمردگی آوندی و گاهاً مرگ کامل گیاه می‌شوند (Agriose, 2005). برای مدیریت گونه‌های *Fusarium* و سایر بیمارگرهای خاک‌زاد رویکردهای متنوعی توسعه پیدا کرده است. باتوجه به اهمیت اعضای این جنس گسترش جغرافیای آن در دنیا مورد مقایسه قرار گرفته است (Manshor *et al.*, 2012; Vujanovi *et al.*, 2006; Backhouse, 2014; Backhouse & Burgess, 2002).

ولی مطالعات جامعی در مورد این جنس در مزارع افغانستان صورت نگرفته است و در زمینه شناسایی گونه‌های *Fusarium* در افغانستان اطلاعات محدودی موجود می‌باشد (Saremi *et al.*, 2018; Mathur, 1977). با توجه به تنوع اقلیمی در افغانستان و توانایی گونه‌های *Fusarium* در ایجاد خسارت در محصولات مختلف زراعی و باغی، مطالعه اکولوژیکی جمعیت و گسترش این قارچ در خاک افغانستان مفید خواهد بود. لذا هدف اصلی این مطالعه شناسایی و بررسی انتشار گونه های *Fusarium* در خاک دو منطقه اقلیمی متفاوت در افغانستان است. برای این منظور نقاط مرکزی تا جنوب غربی افغانستان مدنظر قرار گرفته است که هر کدام بیانگر یک منطقه اقلیمی زراعی مشخص می‌باشند (مناطق نیمه صحرایی و صحرایی). هدف دیگر این مطالعه بررسی فراوانی گونه‌های شناسایی شده است که می‌تواند اطلاعات مفیدی برای اتخاذ برنامه‌های مدیریتی این بیمارگرهای خاک‌زاد در اختیار ما قرار دهد.

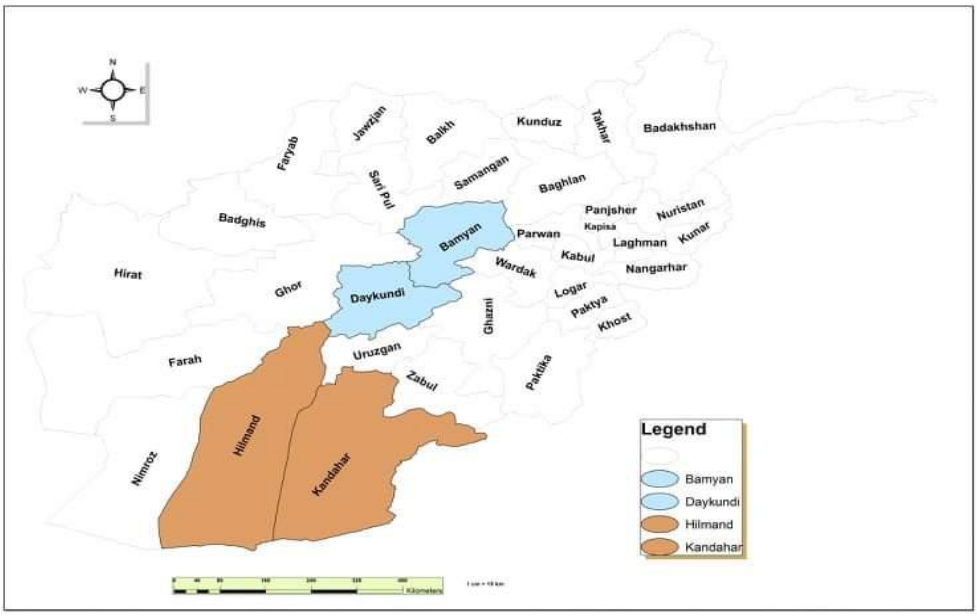
مواد و روش ها

نمونه‌برداری

در این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف *Fusarium* آلوده کننده خاک در دو منطقه اقلیمی متفاوت افغانستان، نمونه برداری در سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ صورت گرفت (شکل ۱). دو منطقه مختلف بر اساس طبقه بندی اکولوژیکی نقشه محیط زیستی افغانستان NEPA (National Environmetal Protection Agency) انتخاب شدند (NEPA, 2017). از نقطه مرکزی به طرف جنوب و جنوب غربی، دو منطقه بامیان و دایکندی با اقلیم نیمه صحرایی و با حداقل درجه حرارت ۴۹°c - در زمستان انتخاب شدند که عمدتاً گیاهان بوته ای و جنگلی در آنها رویش دارند (UNEP & NEPA, 2009). همچنین هلمند و قندهار که مناطقی با اقلیم خشک و صحرایی هستند و بالاترین درجه حرارت در تابستان در آنجا به ۵۱°c می‌رسد، مورد نمونه برداری قرار گرفتند (UNEP & NEPA, 2009). میزان بارندگی سالانه در مناطق گرمسیر ۱۱۶ میلی متر می‌باشد، در حالیکه میزان بارندگی سالانه در مناطق سردسیر به ۳۳۲ میلی متر می‌رسد (Aich *et al.*, 2017). ابتدا از هر استان ۱۲ مزرعه بصورت تصادفی و با فواصل بین ۲۰ تا ۵۰ کیلومتر انتخاب شدند و از هر مزرعه سه نمونه ۲۰۰ گرمی خاک از عمق ۱۰ سانتی متری جمع آوری شد، پس از آن نمونه های هر مزرعه باهم مخلوط شده و یک نمونه ترکیبی برای هر مزرعه ساخته شد.

نمونه‌ها در داخل پاکت‌های کاغذی با ثبت مشخصات (تاریخ و محل نمونه‌برداری) به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌های خاک پس از خشک شدن در شرایط ازمایشگاه از غربال ۸۰۰ میکرومتری عبور داده شدند. در نهایت یک گرم خاک غربال شده از هر

نمونه نهایی برای جداسازی گونه های *Fusarium* استفاده شد.



شکل۱. مناطق نمونه برداری شده از خاک‌های زراعی افغانستان (بامیان، دایکندی، هلمند و قندهار) در سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸.
Figure 1. Sampling areas from agricultural soil in Afghanistan (Bamyan, Daikundi, Helmand and Kandahar) in 2018 and 2019.

روش رقیق سازی خاک

برای رقیق سازی خاک، ابتدا ۱ گرم خاک غربال شده به محلول آب-آگار (Water Agar) ۰/۰۵ ٪ درصد اتوکلاو شده، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در شیکر بصورت رفت و برگشتی با ۹۰ دور در دقیقه مخلوط شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه به حالت سکون نگه داشته شد تا فاز جامد رسوب نماید، و سوسپانسیون خاک با رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} و 10^{-3} از فاز رویی تهیه شد (Burgess *et al.*, 1994). در ادامه یک میلی لیتر از سوسپانسیون به صورت یکنواخت روی محیط PPA (دربرگیرنده پپتون ۱۵گرم، KH_2PO_4 ۱گرم، $MgSO_4.7H_2O$ نیم گرم، PCNB یک گرم و آگار ۱۵ گرم) پخش گردید (Nash & Snyder, 1962). نمونه‌های کشت داده شده در داخل انکوباتور در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند.

جداسازی و شناسایی *Fusarium*

قارچهای رشد کرده به روش تک اسپور روی محیط آب-آگار (WA) دو درصد خالص‌سازی شدند و به محیط کشت PDA انتقال داده شدند. به‌منظور شناسایی جدایه‌های بدست آمده در این پژوهش ویژگی‌های مختلف ریخت شناختی از قبیل صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. صفات ماکروسکوپی مختلف از قبیل چگونگی رشد، سرعت رشد، قطر پرگنه قارچ پس از سه روز و رنگ پرگنه پس از یک هفته در شرایط تاریکی و دمای °C ۲۵ روی محیط غذایی PDA (۲۰۰ گرم سیب زمینی، ۲۰ گرم دکستروز و ۲۰ گرم آگار) بررسی شدند. همچنین مشخصات ریخت‌شناختی ماکروکنیدیوم‌ها و وجود یا عدم وجود اسپورودشیوم جدایه‌های مورد نظر روی محیط کشت CLA (۲۰ گرم آگار در هر لیتر آب و قطعات برگ میخک) بررسی شدند. به این منظور محیط کشت‌های CLA حاوی جدایه‌های مورد نظر به مدت دو هفته در شرایط ۱۲ ساعت نور فلورسنت و UV با دمای °C ۲۶ و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۲°C قرار گرفتند. برای بررسی سایر صفات میکروسکوپی نظیر وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم، شکل و نحوه کنیدی‌زایی جدایه‌های مورد نظر، از

محیط کشت SNA (KH_2PO_4 یک گرم، KNO_3 یک گرم، $MgSO_4.7H_2O$ نیم گرم، KCL نیم گرم، گلوکز ۰/۲ گرم، سکروز ۰/۲ گرم و آگار ۲۰ گرم در لیتر) استفاده شد. تشتک های حاوی این محیط، به مدت ۱۴-۱۰ روز در شرایط تاریکی با دمای°c ۲۲-۲۴ قرار گرفتند. به منظور عکس برداری از ویژگی‌های جدایه‌های مورد نظر از میکروسکوپ نوری زایس مجهز به دوربین کانون مدل B-52 استفاده شد. برای شناسایی از کلیدهای معتبر موجود نظیر لزلی و سامرل (۲۰۰۶)، نلسون (۱۹۸۳) و بوث (۱۹۷۱) استفاده گردید.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

به‌منظور تأیید شناسایی ریخت شناختی از روش تکثیر و توالی یابی ناحیه ژنی *tef-1α* استفاده شد. برای این منظور توالی ژنی ۱۶ جدایه نماینده از گروه های مورفولوژیکی شناسایی شده مورد بررسی قرار گرفتند. به منظوراستخراج DNA ژنومی قارچ، از روش ژانگ و استفنسون (۲۰۰۱) استفاده شد. همچنین جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA از روش الکتروفورز در ژل آگاروز ۱٪ استفاده شد. برای تهیه ۲۵µL مخلوط نهایی واکنش: $MgCl_2$ 2X (۱,۵ mM) با حجم ۱۰µL، DNA ژنومی الگو (۱۰ng) ۳ µL، آغازگر tef-1 (pM ۱۰) با حجم۱µL، آغازگر tef-2 (pM ۱۰) با حجم۱µL و آب دیونیزه استریل با حجم ۱۰ µL در میکروتیوب‌های مخصوص PCR باهم مخلوط شدند. تمامی مراحل تهیه مخلوط واکنش PCR روی یخ صورت گرفت. پس از سانتریفیوژ با g ۴۱۲۱ به مدت چند ثانیه، میکروتیوب‌ها درون دستگاه ترموسایکلر مدل MJ–PTC 200 (Peltier thermal cycler) قرارداده شدند. برنامه حرارتی شامل واسرشت سازی اولیه با چرخه دمایی ۹۵°c به مدت ۵ دقیقه یک چرخه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی با دمای ۹۴°c به مدت ۵۰ ثانیه؛ مرحله اتصال آغازگر با دمای ۵۸°c به مدت ۴۰ ثانیه؛ مرحله بسط با دمای ۷۲°c به مدت ۵۰ ثانیه صورت گرفت. مرحله بسط نهایی با دمای ۷۲°c به مدت ۵ دقیقه در یک چرخه تنظیم گردید.

جهت تشخیص قطعات تکثیر یافته حاصل از واکنش PCR، از الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. عکس برداری از ژل با دستگاه Gel Documentation مدل ImaGo 500-MZ 230VAC/1A صورت گرفت. خالص سازی و تعیین توالی توسط شرکت BMG واقع در کشور چین انجام شد. برای اطمینان از درستی توالی ها و تأیید شناسایی ریخت شناختی هریک از گونه های *Fusarium*، توالی ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (Biological LocalAlignmet Search Tool) (Altschut *et al.*, 1997) با توالی های موجود در بانک‌های ژن (FUSARIUM ID و NCBI) مقایسه شدند (O'Donnell *et al.*, 2012). به منظور رسم درخت فیلوژنتیکی، هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها در نرم افزار MEGA6.0 با استفاده از الگوریتم CLUSTALW صورت گرفت. سپس درخت فیلوژنتیکی با استفاده از مدل Tamura-Nei و روشMaximum likelihood (ML) (Tamura & Nei, 1993) در نرم افزار MEGA6.0 رسم گردید. گونه *Microdochium nivale* در این پژوهش به عنوان گروه خارجی که نزدیکترین خویشاوند به گروه داخلی می‌باشد انتخاب شد.

نتایج

انتشار گونه‌ای *Fusarium*

در نتیجه نمونه برداری و جداسازی گونه‌های *Fusarium* از دو اقلیم مختلف افغانستان، درمجموع ۱۳۴ جدایه *Fusarium* بدست آمد که در ۱۱ گونه با فراوانی متفاوت قرار گرفتند، که در ادامه درصد فراوانی نسبی هر گونه داخل پرانتز گزارش شده است. گونه‌ها شامل *F. incarnatum-equiseti* species (FIESC) complex (۲۸٪)، *F. proliferatum* (۱۸٪)، *F. solani* (۱۶٪)، *F. culmorum* (۱۳٪)، *F. acuminatum* (۶٪)، *F. verticillioides* (۵٪)، *F. oxysporum* (۳٪)، *F.coeruleum* (۱٪)، *F. compactum* (۱٪)، *F. pseudograminearum* (۱٪) و *F. sambucinum* (۱٪) بودند. نتایج نشان داد که گونه‌های *F. verticillioides*، *F. solani*، *F.*

oxysporum، *F. compactum*، FIESC و *F. coeruleum* در هر دو منطقه گسترش دارند (جدول ۱). گونه *F. sambucinum* در مناطق سردسیر (بامیان و دایکندی که زمستان فوق العاده سرد همراه با تابستان خشک دارند و مناطقی نمیه صحرای هستند) شناسایی شد. درحالیکه گونه‌های *F. culmorum*، *F. pseudograminearum* و *F. proliferatum* از مناطق گرم سیر که زمستان سرد و خشک همراه با تابستان فوق العاده گرم و خشک دارند و بخشی از مناطق صحرایی می باشند جداسازی و شناسایی گردیدند.

جدول۱ .فراوانی گونه‌های *Fusarium* بدست آمده از خاک زمین‌های زراعی استان‌های بامیان و دایکندی (با اقلیم نیمه صحرایی) و هلمند و قندهار (با اقلیم خشک و صحرایی) در افغانستان.

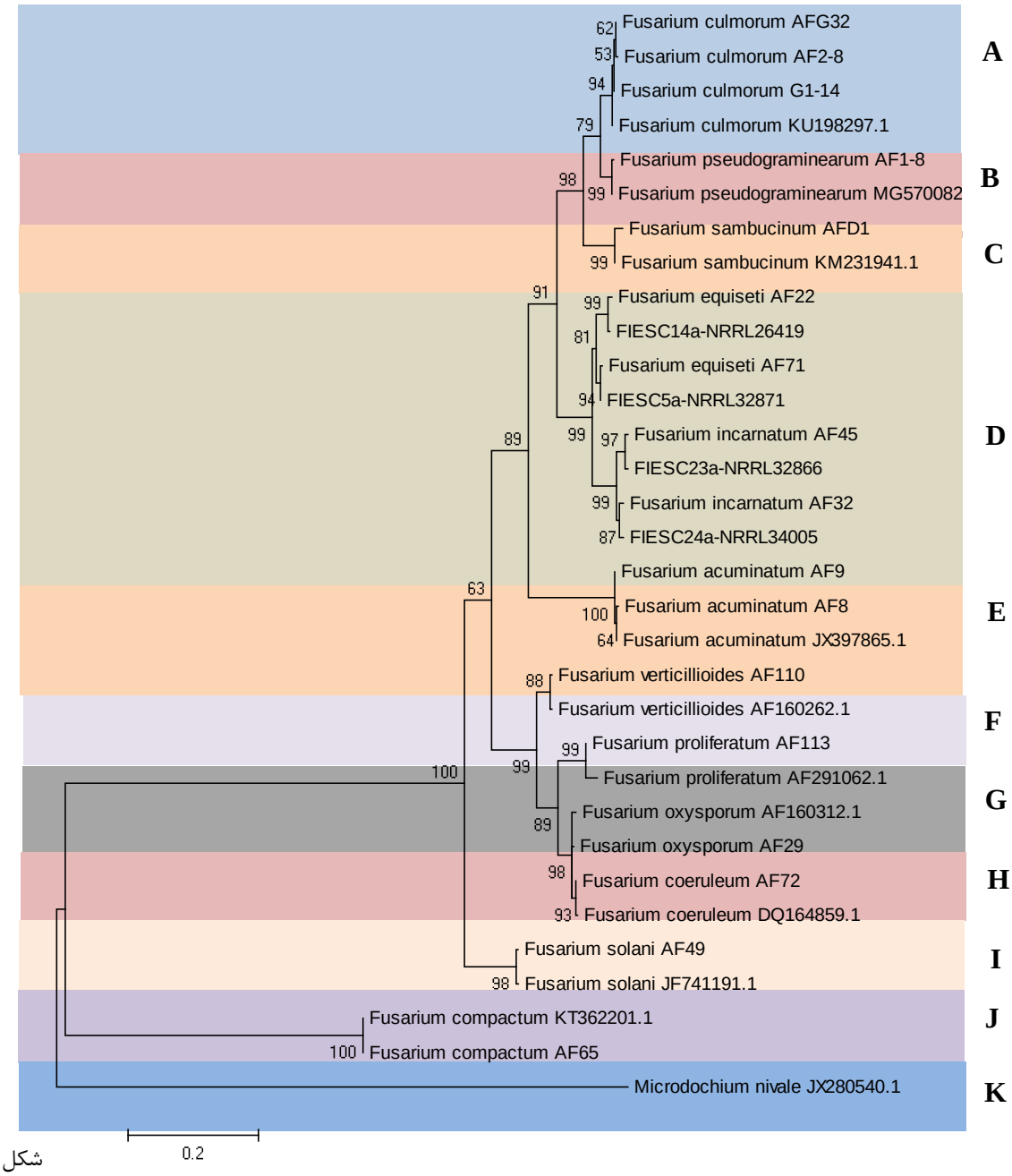
Table 1. Frequency of *Fusarium* species obtained from the soil of agricultural lands of Bamyan and Daikundi (with semi desert climates) and Kandahar and Helmand (with desert climates) of Afghanistan

Province	**Species frequency**										
	F. solani	*F. oxysporum*	*FIESC*	*F. acuminatum*	*F. proliferatum*	*F. culmorum*	*F. pseudograminearum*	*F. compactum*	*F. coeruleum*	*F. sambucinum*	***F. verticillioides***
Bamyan	5	2	8	2	0	0	0	0	1	2	**1**
Daikundi	3	0	8	1	0	0	0	1	1	1	**2**
Helmand	7	2	12	3	10	9	2	1	0	0	**3**
Kandahar	6	1	10	3	14	8	1	1	1	0	**2**
Total	21	5	38	9	24	17	3	3	3	3	**8**

شناسایی مولکولی جدایه ها

به منظور شناسایی مولکولی جدایه ها تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی در نتیجه تکثیر ناحیه ژنی *tef-1α* با طول ۶۰۰-۷۰۰ جفت باز صورت گرفت. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده ۱۶ جدایه نماینده مورد بررسی در ۱۱ گونه مجزا قرار گرفتند، که برای مشخص شدن جایگاه آن‌ها ۱۱ گروه (A-K) در درخت مشخص شد (شکل ۲). جدایه‌های G1-14، AFG32 و AF2-8 مربوط به گروه A در کنار توالی مرجع *F. culmorum* گروه بندی شدند. جدایه AF1-8 مربوط به گروه B با درجه اعتبار سنجی بالا در کنار جدایه مرجع *F. pseudograminearum* از بانک ژن قرار گرفته است. همچنین گروه C مربوط به جدایه AFDI است که در کنار توالی *F. sambucinum* اخذ شده از بانک ژن گروه بندی شده است. گروه D مربوط به جدایه‌های گونه مرکب FIESC می باشد. در این مطالعه جدایه‌های AF71 و AF22 در کنار توالی‌های مرجع کلاد equiseti و جدایه های AF32 و AF45 با درجه اعتبار سنجی بالا در کنار توالی‌های مرجع کلاد incarnatum از این گونه مرکب قرار گرفته‌اند. جدایه-های AF8 و AF9 در کنار توالی مرجع *F. acuminatum* در گروه E گروهبندی شده اند. جدایه AF110 در گروه F در کنار توالی مرجع گونه *F. verticillioides* از گونه مرکب *F. fujikuroi* قرار گرفته است و از گونه *F. proliferatum* (جدایه AF113 در گروه G) در این گونه مرکب تفکیک شده است. گروه H مربوط به اعضای گونه مرکب *F. oxysporum* می‌باشد، که جدایه AF29 در این گروه در کنار توالی اخذ شده از بانک ژن قرار گرفته است. جدایه AF72 در گروه I بر اساس خصوصیات ریخت شناختی بسیار شبیه به گونه *F. oxysporum* است ولی در درخت ترسیم شده در کنار توالی مرجع گونه *F. coeruleum*

قرار گرفته است، همچنین در بلاست توالی این جدایه در باتک ژن با ۹۹ درصد تشابه در کنار توالی ثبت شده از این گونه قرار گرفت. جدایه AF49 از گروه J در کنار توالی مرجع مربوط به گونه *F. solani* در درخت فیلوژنتیکی قرار گرفته است. همچنین جدایه AF65 مربوط به گروه K با درجه اعتبار سنجی بالایی در کنار جدایه مرجع *F. compactum* قرار گرفته است.



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش Maximum Likelihood و بر اساس مدل Tamura-Nei. توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *tef-1α* برای۱۶ جدایه *Fusarium*، ۱۹ جدایه مرجع، یک جدایه *Microdochium nivale* به عنوان برون گروه مورد آنالیز قرار گرفت. تجزیه و تحلیل تکاملی با نرم افزار MEGA6.0 انجام شد.

Figure 2. *The phylogenetic tree* was constructed with the *maximum likelihood* (ML) method *based* on the Tamura-Nei model. *tef*-1α gene regionfor 16 *Fusarium* isolates, 19 reference isolates and one *Microdochium nivale* as outgroup were analyzed. Evolutionary analysis was performed with MEGA6.0 software.

بحث

گونه‌های *Fusarium* عمدتاً همه جازی هستند و در تمامی اقلیم‌ها گسترش دارند، از طرفی دیگر برخی از اعضای این جنس محدود به مناطق اقلیمی مشخص می‌باشند (Saremi & Saremi, 2013; Backhouse & Burgess, 2002). در این پژوهش شش گونه *F. oxysporum*، *F. verticillioides*، *F. compactum*، *F. solani*، *F. acuminatum* و *F. coeruleum* و یک گونه مرکبFIESC از هر دو منطقه " بامیان و دایکندی (اقلیم نیمه صحرایی)" و "هلمند و قندهار (اقلیم خشک و صحرایی)" با فراوانی متفاوت جداسازی شدند. اعضای گونه مرکب *F. incarnatum-equiseti* (با ۲۸ درصد فراوانی) و اعضای گونه مرکب *F. solani* (با ۱۶ درصد فراوانی) به عنوان گونه‌های غالب در دو منطقه نمونه برداری شده شناسایی گردیدند. تا کنون ۳۱ گونه فیلوژنتیکی در گونه مرکب FIESC شناسایی شده است که در دو کلاد equiseti (گونه های فیلوژنتیکی FIESC 1 تا FIESC 15 و FIESC 31) و incarnatum (FIESC 16 تا FIESC 30) قرار می گیرند و گسترش جهانی دارند. اعضای این گونه مرکب اگرچه بیمارگرهای مهمی روی میزبان های گیاهی خود نیستند ولی از نظر تولید مایکوتوکسین های خطرناک دارای اهمیت می باشند (Villani *et al.*, 2016; O'donnell *et al.*, 2012/ 2009; Fallahi *et al.*, 2019). در آنالیز فیلوژنتیکی انجام شده در این تحقیق چهار جدایه نماینده از اعضای FIESC در چهار گونه فیلوژنتیکی مجزا (FIESC 24a -FIESC 23a- FIESC 14a- FIESC 5a) قرار گرفتند که در دو کلاد مجزا گروهبندی شدند. گونه *F. solani* species complex که بعنوان دومین گونه غالب در این مطالعه معرفی شد، به عنوان بیمارگر دامنه وسیعی از گیاهان از قبیل سبزیجات، درختان میوه، گیاهان زینتی و زراعی و همچنین، به عنوان عامل فوزاریوز در انسان و حیوان گزارش شده است. این گونه ریخت شناختی در برگیرنده حداقل ۶۰ گونه مجزای فیلوژنتیکی می‌باشد (Nalim *et al.*, 2011). گونه *F. coeruleum* در گونه مرکب *F. solani* قرار دارد ولی در درخت ترسیم شده این گونه با فاصله از گونه *F. solani* (جدایه AF49 گروه J) و در مجاورت *F. oxysporum* قرار گرفته است که نتایج این بخش با پژوهش رومبرگ و دیویس (۲۰۰۷) مطابقت داشت، در پژوهش این محققان نیز جدایه‌های *F. coeruleum* در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی جایگاه مجزایی از سایر اعضای گونه مرکب *F. solani* داشتند.

مناطق نمونه برداری شده در این تحقیق از نظر دمایی اختلاف قابل ملاحظه ای باهم دارند، بطوریکه پایین ترین میزان درجه حرارت زمستان در بامیان تا ۴۹°C- میرسد و بالاترین دمای تابستان در قندهار ۵۱°C ثبت گردیده است (UNEP & NEPA, 2009). گونه‌های شناسایی شده در این پژوهش در دامنه اقلیمی وسیعی در دنیا توسط محققانی نظیر سامرال و همکاران (۱۹۹۳) نیز گزارش شده اند که فرصت بروز خسارت در گیاهان مختلف را دارا می‌باشند (Summerell *et al.*, 2011; Chehri *et al.*, 2011). به عنوان مثال *F. compactum* از مناطق دارای اقلیم گرم و خشک گزارش گردیده است (Saremi *et al.*, 1999; Saremi & Saremi, 2013). گسترش جغرافیایی گونه‌های *Fusarium* در پنج منطقه اکولوژیکی در شرق کانادا مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج بدست آمده نشان داده است که *F. oxysporum* و *F. proliferatum* در هر پنج منطقه گسترش دارند و *F. acuminatum*و *F. avenaceum* در مناطق شمالی متداول هستند (Vujanovi *et al.*, 2006). همچنین مطالعات مشابه در مناطق مرتفع و گرمسیری مالزی نشان داده که در بین گونه های مختلف، گونه *F. solani* در این مناطق بیشترین فراوانی را دارد (Manshor *et al.*, 2012). در تحقیق حاضر گونه *F. sambucinum* از مناطق سردسیر افغانستان جداسازی شد. صارمی و همکاران (۲۰۱۳) و رهجو و همکاران (۲۰۰۸) حضور گونه *F. sambucinum* را از مناطق معتدل ایران گزارش نمودند. همچنین در تحقیق حاضر گونه‌های *F. culmorum*، *F. pseudograminearum*و *F. proliferatum* از مناطق گرمسیر افغانستان جداسازی و شناسایی شدند. در

سایر تحقیقات نظیر تحقیق باخوث و برجس (۱۹۹۵) شیوع گونه‌های *F. pseudograminearum*، *F. acuminatum* و *F. sambucinum* در مناطق گرم و خشک استرالیا گزارش شده است. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فراوانی گونه‌های *F. culmorum*، *F. pseudograminearum*، *F. compactum*، *F. verticillioides*، FIESC، *F. acuminatum*، *F. proliferatum* و *F. solani* در خاک‌های مناطق گرمسیر نسبت به مناطق سردسیر بیشتر است. مطالعات متعددی در رابطه با گسترش جغرافیایی گونه‌های *Fusarium* در استرالیا، افریقا، اروپا، شمال امریکا و آسیای میانه صورت گرفته است (Summerell *et al.*, 2011; Kvas *et al.*, 2009)، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. همچنان تاثیر شرایط اقلیمی مختلف روی نحوه‌ی گسترش گونه‌های مختلف *Fusarium* توسط محقیقین مختلف در مطالعات متعددی ثابت شده است (Marasas & Saremi & Saremi, 2013; WFO, 1988). مقایسه وضعیت‌های اقلیمی مختلف در افغانستان و حضور گونه‌های مختلف *Fusarium* در این مناطق می‌تواند جهت شناخت رابطه بین حرارت و توزیع این گونه ها کمک نماید. با توجه به نتایج پژوهش های مربوط به تاثیر فاکتورهای اقلیمی، هرچند حرارت یک فاکتور کلیدی و تاثیر گذار در رابطه با توزیع گونه‌های *Fusarium* است ولی سایر عوامل از قبیل نوع پوشش گیاهی، عملیات زراعی، رطوبت، بارندگی و نوع خاک نیز از عوامل تاثیر گذار دیگری می‌باشند که نیاز به مطالعه و بررسی‌های بیشتری دارند.

نتیجه گیری کلی

این مطالعه با هدف تعیین نحوه گسترش گونه‌های مختلف *Fusarium* در دو منطقه اقلیمی صحرایی و نیمه صحرایی افغانستان انجام شد و نتایج نشان داد که گونه‌های *Fusarium* دارای الگوی انتشار متفاوتی در دو منطقه هستند. آگاهی از نوع میزبان و اقلیم مناسب برای پراکنش اعضای جنس *Fusarium* به درک بهتر فراوانی و پیش آگاهی از نحوه گسترش گونه‌ها کمک می‌نماید. این اطلاعات در جهت مدیریت بهتر این بیمارگرهای خاکزاد در مزرعه مفید می باشد و به ما در اتخاذ روش های مناسب کنترل بیماری کمک می‌نماید.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پایانامه کارشناسی ارشد نویسنده اول بوده که با حمایت مالی گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران صورت گرفته است. لذا مراتب سپاس و قدردانی از این مجموعه به عمل می آید.

REFERENCES

1. Agriose, G.N. (2005). *Plant Pathology (Fifth Edition).* Academic press. new york. usa, 952 pp.
2. Aich, V., Akhundzadah, N. A., Knuerr, A., Khoshbeen, A. J., Hattermann, F., Paeth, H., Scalon, A., & Paton, E. N. (2017). Climate change in Afghanistan deduced from reanalysis and coordinated regional climate downscaling experiment (CORDEX)—South Asia simulations. *Climate*, 5 (2), 38.
3. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17), 3389-3402.
4. Backhouse, D. (2014). Global distribution of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. *European Journal of Plant Pathology*, 139 (1), 161-173.
5. Backhouse, D., & Burgess, L. W. (1995). Mycogegraphy of *Fusarium* climatic: analysis of the distribution within Australia of *Fusarium* species in section Gibbosum. *Mycological Research*, 99 (10), 1218-1224.
6. Backhouse, D., & Burgess, L. W. (2002). Climatic analysis of the distribution of *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum* on cereals in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31 (4), 321-327.
7. Booth, C. (1971) *The Genus Fusarium Common Wealth*. Mycological institute, kew survey. england, 237 pp.
8. Burgess, L. W. (1981). *General Ecology of The Fusaria. In 'Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy* .(Eds pe nelson, ta toussoun, rj cook), 225–235 pp.

9. Burgess, L. W., & Summerell, B. A. (1992). Mycogeography of *Fusarium*: survey of *Fusarium* species in subtropical and semi-arid grassland soils from Queensland, Australia. *Mycological Research*, 96 (9), 780-784.
10. Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., & Backhouse, D. (1994). *Laboratory Manual for Fusarium Research (3rd ed.).* Sydney: Dept. of crop sciences, university of sydney / royal botanic gardens,162 pp.
11. Chehri, K., Salleh, B., Soleimani, M. J., Reddy, K. R. N., & Zakaria, L. (2011). Occurrence of *Fusarium* spp. associated with root tissues and rhizosphere soils of forest trees and assessment of their pathogenicity on Prunus amygdalus seedlings. *Australian Journal of Botany*, 58 (8), 679-686.
12. Drenkhan, R., Ganley, B., Martín-García, J., Vahalík, P., Adamson, K., Adamčíková, K., ... & Cleary, M. (2020). Global geographic distribution and host range of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker. *forests*, *11*(7), 724
13. Fallahi, M., Saremi, H., Javan-Nikkhah, M., Somma, S., Haidukowski, M., Logrieco, A. F., & Moretti, A. (2019). Isolation, Molecular Identification and Mycotoxin Profile of *Fusarium* Species Isolated from Maize Kernels in Iran. *Toxins*, 11 (5) 297.
14. Jiang, C. X., Li, J., Zhang, J. M., Jin, X. J., Yu, B., Fang, J. G., & Wu, Q. X. (2019). Isolation, identification, and activity evaluation of chemical constituents from soil fungus *Fusarium avenaceum* SF-1502 and endophytic fungus *Fusarium proliferatum* AF-04. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (7), 1839-1846.
15. Kosiak, B., Torp, M., Skjerve, E., & Thrane, U. (2003). The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: a survey. *Acta Agriculturae Scandinavica (B)*, 53(4), 168-176.
16. Kvas, M., Marasas, W. F. O., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., & Steenkamp, E. T. (2009). Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity*, 34, 1-2
17. Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual. Iowa:* Blackwell Publishing LTD, 388 pp.
18. Leslie, J. F., Pearson, C. A.S., Nelson, P. E., & Toussoun, T. A. (1990). *Fusarium* spp. from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology*, 80 (4), 343–350.
19. Manshor, N., Rosli, H., Ismail, N. A., Salleh, B., & Zakaria, L. (2012). Diversity of *Fusarium* species from highland areas in Malaysia. *Tropical Life Sciences Research*, 23 (2), 1.
20. Marasas, D. J., & WFO, J. (1988). *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *South African Medical Journal*, 74 (3), 110-114.
21. Mathur, R. S. (1977). *Check List of Afghani Fungi And Plant Disease by*. The Iraq Natural History museum publication, 32, 3-63.
22. Moretti, A. N. (2009). Taxonomy of *Fusarium* genus: a continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke*, 117, 7-13.
23. Nalim, F. A., Samuels, G. J., Wijesundera, R. L., & Geiser, D. M. (2011). New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. *Mycologia*,103(6), 1302-1330.
24. Nash, S. M., & Snyder, W. C. (1962). Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology*, 52 (6), 567-572.
25. Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* Species: An Illustrated Guide for Identification. Penn, 206 pp.
26. NEPA & UNEP. (2009) *Afghanistan: National Capacity Needs Self- Assessment for Global Environmental Management (NCSA) AND National Adaptation Programe of Action Climate Change(NAPA).* Kabul: .National environmental protection agency and united nations environment program, 12 pp.
27. NEPA. (2017) *Second National Communication Under the United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC)*. Kabul: .National environmental protection agency, 102 pp.
28. O'Donnell, K., Humber, R. A., Geiser, D. M., Kang, S., Park, B., Robert, V. A., Cours, P.W., Johnston, P.R., Aoki, T., Rooney, A. P., & Rehner, S. A. (2012). Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. *Mycologia*, 104 (2), 427-445.
29. O'Donnell, K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 92 (5), 919-938.
30. O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Gueidan, C., Crous, P. W., & Geiser, D. M. (2009). Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (12), 3851-3861.

31. Poole, G. J., Smiley, R. W., Walker, C., Huggins, D., Rupp, R., Abatzoglou, J., & Paulitz, T. C. (2013). Effect of climate on the distribution of *Fusarium* spp. causing crown rot of wheat in the Pacific Northwest of the United States. *Phytopathology*, *103*(11), 1130-1140.
32. Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Mirzaldi Gohari, A.,Okkhovvat, S., Bihamta, M.R., Razzaghian, J., & Klemsdal, S.S. (2008). Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 90 (3), 463–468.
33. Romberg, M. K., & Davis, R. M. (2007). Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. *Plant Disease*, 91 (5), 585-592.
34. Saremi, H. (2005). *Fusarium, Biology, Ecology and Taxonomy*. Iran: Jihad daneshgahi press, university of mashhad, 152 pp.
35. Saremi, H., & Saremi, H. (2013). Isolation of the most common *Fusarium* species and the effect of soil solarisation on main pathogenic species in different climatic zones of Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 137 (3), 585-596.
36. Saremi, H., Burgess, L. W., & Backhouse, D. (1999). Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 31 (7), 941-947.
37. Saremi, H., Rostami, A. & Saremi, H. (2018). *Fusarium oxysporum* a possible agent for biological control of *Papaver somniferum* in the Middle East. *Crop Protection*, 114, 187-194.
38. Summerell, B.A., Laurence, M.H., Liew, E.C.Y., & Leslie, J.F. (2010). Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: A review. *Fungal Diversity*, 44 (1), 3–13.
39. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Liew, E. C., Laurence, M. H., Bullock, S., Petrovic, T., Bentley, A. R., Howard, Ch. G., Peterson, S. A., Walsh, J. L., & Burgess, L. W. (2011). *Fusarium* species associated with plants in Australia. *Fungal Diversity*, 46 (1), 1-27.
40. Summerell, B. A., Rugg, C. A., & Burgess, L. W. (1993). Mycogeography of *Fusarium*: survey of *Fusarium* species associated with forest and woodland communities in north Queens land, Australia. *Mycological Research*, 97 (8), 1015-1019.
41. Tamura, K.; & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10 (3), 512–526.
42. Villani, A., Moretti, A., De Saeger, S., Han, Z., Di Mavungu, J. D., Soares, C. M. G., Proctor, R. H., Venâncio, A., Lima, N., Stea, G., Paciolla, C., Logrieco, A. F., & Susca, A**.** (2016)**.** A polyphasic approach for characterization of a collection of cereal isolates of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *International Journal of Food Microbiology*, 234, 24-35.
43. Vujanovic, V., Hamel, C., Yergeau, E., & St-Arnaud, M. (2006). Biodiversity and biogeography of *Fusarium* species from northeastern North American asparagus fields based on microbiological and molecular approaches. *Microbial Ecology*, 51 (2), 242-255.
44. Zhong, S., & Steffenson, B. J. (2001). Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*, 91 (5), 469-476.