

شناسایی و بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و ژنتیکی چند جدایه‌ی فوزاریوم بیماری‌زای گیاهی از میزبان‌های مختلف

حسینعلی میرحسینی^۱✉، ولی‌اله بابایی‌زاد^۲، لیلا هاشمی^۳ و اسماعیل بساوند^۳

۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی، گروه بیماری شناسی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان؛ ۲ و ۳- به ترتیب دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران (تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۴؛ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵)

چکیده

به منظور مطالعه‌ی گونه‌های بیماری‌زای جنس *Fusarium* روی میزبان‌های مختلف نمونه‌های متعددی از استان‌های یزد، کرمان و مازندران طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۱ جمع‌آوری شد هدف از این مطالعه امکان شناخت گونه‌های بیماری‌زا بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی، مولکولی و انگشت‌نگاری ژنتیکی و فهم ارتباط بین این گونه‌ها بود. نتایج حاصل نشان داد استفاده از تکنیک rep-PCR و ترادف حاصل از ناحیه‌ی ITS-rDNA روشی مناسب برای شناسایی گونه‌های مختلف فوزاریوم است. همچنین بر اساس نتایج بدست آمده، نمونه‌های مطالعه شده به عنوان هشت گونه تشخیص داده شدند: *F. brachygibbosum*، *F. delphinoides*، *F. equiseti*، *F. globosum*، *F. graminearum*، *F. incarnatum*، *F. oxysporum* و *F. proliferatum* گونه‌های *F. brachygibbosum* عامل لکه برگ‌ی خرزهره، *F. delphinoides* عامل پوسیدگی ریشه شبدر زیتتی، *F. equiseti* عامل شانکر کرچک، *F. globosum* عامل سوختگی غلاف نی، *F. incarnatum* عامل شانکر تاج خروس، *F. oxysporum* عامل پوسیدگی برگ آلوئه ورا و *F. proliferatum* به عنوان عامل شانکر کنجد و سوختگی برگ سیکاس برای اولین بار از روی این میزبان‌ها از ایران گزارش می‌شوند. همچنین گونه‌ی *F. delphinoides* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. واژه‌های کلیدی: مطالعات مورفولوژیکی و مولکولی، ITS-rDNA، rep-PCR.

Identification and Investigation of Genotypic and Phenotypic Characteristics of Several Plant Pathogenic *Fusarium* Isolated on Different Hosts

H. A. MIRHOSSEINI¹✉, V. BABAEIZAD², L. HASHEMI³ and E. BASAVAND³

1,- PhD student of Plant Pathology, Department of Plant Pathology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran; 2, 3- Associate Professor and MSc graduate of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Abstract

To study the plant pathogen *Fusarium* species on different hosts, infected plant samples were collected from Yazd, Kerman and Mazandaran provinces during 2011-2013. Identification was conducted on the basis of morphological and molecular characteristics. Eight different species including: *F. brachygibbosum*, *F. delphinoides*, *F. equiseti*, *F. globosum*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *F. oxysporum* and *F. proliferatum* were isolated. *F. brachygibbosum* was found the causal agent of oleander leaf spot, *F. delphinoides* as kidney weed root rot agent, *F. equiseti* the causal of stem canker on castor bean, *F. globosum* the agent of giant cane sheet blight, *F. incarnatum* causal of stem canker on red root pigweed, *F. oxysporum* as aloe leaf rot and *F. proliferatum* as the causal agent of sesame canker and cycas leaf blight, which all *Fusarium* species are reported from the mentioned hosts for the first time from Iran. Also *F. delphinoides* is a new species of *Fusarium* for the mycoflora of Iran.

Key words: ITS-rDNA, Morphological and molecular studies, rep-PCR.

مقدمه

2001). فاصله‌ی ژنتیکی میان استرین‌ها از طریق تجزیه و تحلیل بیماری‌زایی، گروه‌های سازگاری رویشی، ویژگی‌های کروموزومی، rep-PCR، mt RFLP، rDNA و دیگر مارکرهای مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است (Alves-Santos *et al.*, 1999; Appel and Gordon, 1995; Healy *et al.*, 2005). استفاده از تکنیک rep-PCR در تنوع و شناسایی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی کاربرد گسترده‌ای دارد و در مطالعات ژنتیکی مربوط به قارچ‌ها کمتر مورد استفاده است. در این مورد، Edrel *et al.*, (1995) برای مقایسه‌ی استرین‌های مختلف *F. oxysporum* از تکنیک rep-PCR استفاده کردند. شروع مطالعات مولکولی روی فوزاریوم‌ها با بررسی توالی بدست آمده از نواحی زیر واحد بزرگ هسته‌ای دی‌ان‌ای ریپوزومی (Peterson and Lagrieco, 1991) و فاصله‌ی ترانویسی شده داخلی دی‌ان‌ای ریپوزومی (ITS-rDNA) انجام شد (O'Donnell, 1992). تاکنون مطالعات کمی با استفاده از روش‌های مختلف مولکولی برای شناسایی گونه‌های مختلف فوزاریوم انجام شده است و بیشتر این مطالعات محدود به برخی گونه‌های بخش لزیولا و الگانس هستند (Nakamura *et al.*, 1998; Waalwijk *et al.*, 1996). این مطالعات نشان داد که توالی نوکلئوتیدی ناحیه‌ی ITS برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم مناسب است. هدف از این مطالعه معرفی چند میزبان جدید برای گونه‌های مختلف قارچ *Fusarium* بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی است. و با توجه به اینکه تنوع تعیین شده توسط نشانگرهای DNA اکثراً تنوع خاموش می‌باشد و داده‌های مورفولوژیکی علاوه‌بر تغییرات ژنتیکی شامل تغییرات محیطی غیر قابل توارث هستند، در نتیجه، استفاده همزمان از هر دو داده، توصیف و تفسیر بهتر و جامع‌تری از تنوع بیولوژیکی را فراهم خواهد کرد. لذا در ادامه‌ی این مطالعه، ارتباط بین روش‌های مولکولی rep-PCR و ITS-rDNA و داده‌های مورفولوژیکی در شناسایی و توصیف بهتر این گونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

جنس *Fusarium* از قارچ‌های هیفومیست خاکزی بسیار مهم است. گونه‌های این جنس از گسترده‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشند که دامنه‌ی وسیعی از گیاهان را آلوده می‌کنند (Nelson *et al.*, 1983; Steinkellner *et al.*, 2008; Ingle *et al.*, 2009). گونه‌های مختلف این جنس در گیاهان علائم متفاوتی از جمله پوسیدگی و پژمردگی ریشه، پوسیدگی و شانکر ساقه، انسداد آوندها، لکه‌برگی، پوسیدگی‌های انباری و پوسیدگی میوه پس از برداشت ایجاد می‌کنند که با کاهش کمی و کیفی محصولات موجب خسارات اقتصادی زیادی می‌شوند (Trane, 1990; Vakalounakis, 1996). علاوه بر این بسیاری از گونه‌های فوزاریوم قادر به تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه از جمله توکسین‌ها هستند که برای سلامتی انسان و حیوانات مضر می‌باشند (Salleh, 1998; Withanage *et al.*, 2001). مطالعات گسترده‌ای به منظور شناسایی گونه‌های مختلف فوزاریوم در جهان صورت گرفته که بیشتر بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی بوده است. شناسایی و بررسی تنوع میان گونه‌ها و فرم‌های اختصاصی فوزاریوم امکان برنامه‌ریزی بهتری را برای مبارزه و همچنین به دست آوردن جایگاه صحیح طبقه‌بندی این قارچ، را فراهم می‌سازد. طبقه‌بندی رایج فوزاریوم‌ها بیشتر بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی بود که با توجه به اختلافات قابل ملاحظه در توصیفات ارائه شده توسط تاکسونومیست‌ها، همچنان این سیستم طبقه‌بندی را در سطح جنس و گونه، بحث‌برانگیز نشان داده است (Boutati and Anaissie, 1997; Torres and Kontoyiannis, 2003). به طوری که هنوز یک سوم تا نیمی از جدایه‌های فوزاریوم حتی در سطح گونه شناسایی نشده‌اند (O'Donnell *et al.*, 2004; Raad *et al.*, 2002). آنالیز نشانگرهای مولکولی می‌تواند در تشخیص ارتباط میان ژنوتیپ‌ها و دیگر داده‌های مربوط به جمعیت‌ها مانند مورفولوژی، بیماری‌زایی و نواحی جغرافیایی مورد استفاده قرار گیرد (Mayek-Perez *et al.*, 2004).

روش بررسی

نمونه برداری و جداسازی: در طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۱ از گیاهان مختلف در استان‌های یزد، کرمان و مازندران نمونه برداری صورت گرفت. از گیاهان دارای علائم مشکوک به بیماری‌های قارچی، نمونه‌هایی از بافت‌های آلوده جمع‌آوری و سپس به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل گردید. برای جداسازی عامل بیماری، با استفاده از اسکالپل سترون قطعاتی از مرز بافت‌های سالم و آلوده جدا گردید. قطعات جدا شده پس از

ضدعفونی سطحی با اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت سه دقیقه و در نهایت شستشو با آب مقطر سترون به مدت یک دقیقه روی محیط سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) کشت گردید. نمونه‌ها پس از کشت در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. از نمونه‌های کشت شده بعد از سه تا پنج روز پرگنه‌های قارچی رشد یافت. جدایه‌ها به روش نوک هیف خالص‌سازی و به محیط PDA منتقل شدند. منشأ و مشخصات جدایه‌ها در جدول شماره یک آمده است.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های قارچی به دست آمده از میزبان‌های مختلف

Table 1. Characteristics of fungal isolates were obtained from different hosts.

شماره جدایه Isolatenumber	میزبان Host	محل جمع‌آوری Location
P01*, P02*	پسته (<i>Pistacia vera</i>)	یزد (Yazd)
O01*, O02*, O03*	خرزهره (<i>Nerium oleander</i>)	یزد (Yazd)
Lo01, Lo02	اقاقیا (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	یزد (Yazd)
Cb01*, Cb02*, Cb03*	کرچک (<i>Ricinus communis</i>)	یزد (Yazd)
Op01*	نخل (<i>Phoenix dactylifera</i>)	یزد (Yazd)
Op02*, Op03*, Op04*, Op05*	نخل (<i>Phoenix dactylifera</i>)	کرمان (Kerman)
P01, P02	بادام (<i>Prunus dulcis</i>)	کرمان (Kerman)
Sa01*	بید (<i>Salix sp.</i>)	کرمان (Kerman)
L01, L02, L03, L04	ازگیل (<i>Eriobotrya japonica</i>)	مازندران (Mazandaran)
Kw01*, Kw05*, Kw08*	شیدر زینتی (<i>Dichondra repens</i>)	مازندران (Mazandaran)
Av01*, Av02*, Av03*, Av04*	آلوئه ورا (<i>Aloevera</i>)	مازندران (Mazandaran)
Ag01, Ag02, Ag03, Ag04	آگاو (<i>Agavea mericana</i>)	مازندران (Mazandaran)
G01, G02, G03, G04, G05	ژینکو (<i>Ginkgo biloba</i>)	مازندران (Mazandaran)
Gr03*, Gr06*, Gr07*	نی (<i>Arundo donax</i>)	مازندران (Mazandaran)
S04*, S05*	کنجد (<i>Sesamum indicum</i>)	مازندران (Mazandaran)
A01*, A02*	تاج خروس (<i>Amaranthus retroflexus</i>)	مازندران (Mazandaran)
B01, B02, B03, B04, B05, B06	تمشک (<i>Rubus fruticosus</i>)	مازندران (Mazandaran)
W04*, W05*, W06*, W08*	گندم (<i>Triticum aestivum</i>)	مازندران (Mazandaran)
Lo03*, Lo04*	اقاقیا (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	مازندران (Mazandaran)
Cw01, Cw02	صنوبر (<i>Populus deltoides</i>)	مازندران (Mazandaran)
Jc01, Jc02, Jc03	گیلاس زینتی (<i>Solanum pseudocapsicum</i>)	مازندران (Mazandaran)
C04*	سیکاس (<i>Cycas revoluta</i>)	مازندران (Mazandaran)

* *Fusarium* spp. isolates

* جدایه‌های فوزاریوم

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها: شناسایی اولیه

تعداد ۶۳ جدایه‌ی جمع‌آوری شده از میزبان‌های مختلف بر اساس مشخصات میکروسکوپی انجام شد و جدایه‌های مشکوک به جنس فوزاریوم به منظور مطالعات بعدی انتخاب شدند. نهایتاً تعداد ۳۵ جدایه مختلف فوزاریوم بر اساس خصوصیات ریخت شناسی و میکروسکوپی با استفاده از کلیدهای معتبر و مقالات منتشر شده در سطح گونه شناسایی شدند (Burgess *et al.*, 1994; Leslie and Summerell, 2006; Mirhosseini *et al.*, 2014 Schroers *et al.*, 2009).

اثبات بیماری‌زایی: آزمایش بیماری‌زایی جدایه‌های

مشکوک به فوزاریوم روی بافت‌های جدا شده گیاه سالم انجام شد. مایه‌زنی عوامل جدا شده با علائم لکه‌برگی و شانکر، با قرار دادن قرص آگار از کشت هفت روزه با ایجاد زخم سطحی انجام شد. همچنین بیماری‌زایی عوامل همراه پوسیدگی و پژمردگی ریشه، ساقه و میوه با سوسپانسیون اسپور به غلظت 10^7 کنیدیوم در میلی‌لیتر صورت گرفت. گیاهان مایه‌زنی شده ۷ تا ۱۴ روز پس از مایه زنی بررسی شد. برای تایید اصول کخ بافت‌های مایه‌زنی شده مجدداً روی محیط PDA کشت شدند. برای کنترل گیاهان مایه‌زنی شده، شاهد نیز در نظر گرفته شد.

استخراج DNA: تهیه توده‌ی میسیلیومی جدایه‌ها در

محیط کشت مایع PDB (عصاره‌ی ۲۰۰ گرم سیب زمینی به همراه ۱۵ گرم دکستروز در یک لیتر آب مقطر) صورت گرفت. به این منظور دو تا سه قرص پنج میلی‌متری از میسیلیوم پنج تا هفت روزه قارچ به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط PDB منتقل گردید. نمونه‌ها سه تا پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی شیکر دورانی (۱۲۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند. سپس محتوی هرکدام از ارلن‌ها از کاغذ صافی واتمن عبور داده شدند. میسیلیوم‌ها بعد از برداشت در فویل آلومینیومی سترون قرار داده شدند و تا مرحله‌ی استخراج DNA در دمای ۴۰- درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. استخراج DNA با اندکی تغییر به روش CTAB انجام شد

(Groppe and Boller, 1997). ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم میسیلیوم در هاون سترون حاوی ازت مایع بخوبی هموژن شده و به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شدند. با اضافه کردن ۶۵۰ میکرولیتر بافر CTAB (سدیم کلرید یک مولار، یک مولار Tris-HCl، نیم مولار EDTA و PVP دو درصد در PH=۸) نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام ماری قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد ۶۵۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. با برداشتن ۴۰۰ میکرولیتر از فاز رویی و با افزودن ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. سپس با حذف کل محتوی لوله‌ها، ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد سرد به آن اضافه شد و پنج دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ صورت گرفت. در نهایت با حذف دوباره محتویات و خشک شدن لوله‌ها، رسوب DNA در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آزمون rep-PCR و آنالیز داده‌ها: از DNA ژنومی

استخراج شده ده جدایه نماینده که بیماری‌زایی آن‌ها تأیید شده بود، به عنوان DNA الگو در واکنش rep-PCR با سه آغازگر اختصاصی REP 1R/REP 2I، ERIC 1R/ERIC2 و BOX A1R (Versalovic *et al.*, 1991; Versalovic *et al.*, 1994) استفاده شد. واکنش rep-PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystem (سنگاپور) صورت پذیرفت. مقدار کل هر واکنش ۲۵ میکرولیتر و شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10x PCR، ۶ MgCl₂ میلی مولار، ۱/۲۵ میلی مولار dNTP، ۰/۳ میکرولیتر از *Taq* پلیمرز (شرکت سینازن تهران) و ۱۰۰ نانوگرم از هر آغازگر بود. چرخه‌های دمایی مورد استفاده برای انجام واکنش rep-PCR شامل پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه با دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، ۴۰ درجه سلسیوس برای آغازگر REP، ۵۳ درجه سلسیوس برای آغازگر BOX و ۵۲ درجه سلسیوس برای آغازگر ERIC به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه و

PCR در ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت‌سازی ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال ۶۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و مرحله بسط ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس بود. در نهایت نمونه‌ها برای مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از الکتروفورز و مشاهده باند در ناحیه‌ی مورد انتظار، ۲۵ میکرولیتر از محصول PCR، به همراه ۱۵ میکرولیتر از آغازگر رفت، به شرکت Bioneer کره‌جنوبی ارسال و تعیین ترادف گردید. ترادف بدست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با نرم افزار BLAST با ترادف‌های موجود در بانک ژن (GenBank) مقایسه و ثبت شد. مقایسه هم‌ردیف سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی بین جدایه‌ها با استفاده از برنامه ClustalX 2.1 انجام شد. فیلوگرام این جدایه‌ها برحسب تطابق ترادف نوکلئوتیدی با استفاده از روش Maximum-Likelihood به وسیله نرم افزار MEGA 6.0 و براساس ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap)، رسم گردید (Tamura *et al.*, 2013).

نتیجه و بحث

طی بازدیدهای به عمل آمده از مناطق مختلف یزد، کرمان و مازندران علائم قارچی شامل لکه برگ، شانکر، پوسیدگی و پژمردگی ریشه و پوسیدگی میوه از گیاهان مختلف مشاهده شد. شناسایی گونه‌های فوزاریومی، با مطالعه‌ی ویژگی‌های ریخت شناختی و مطابقت با کلیدهای معتبر و مقالات منتشر شده انجام و تأیید شد. از بین ۳۵ جدایه منتخب به عنوان فوزاریوم، تعداد ۲۱ جدایه شامل هشت گونه مختلف قابلیت بیماری‌زایی در ۱۰ میزبان مختلف داشتند که از لحاظ خصوصیات ریخت شناسی و مولکولی بررسی شدند. هر جدایه با در نظر گرفتن این که از چه میزبانی جدا شده بود روی همان میزبان مایه‌زنی شد. علائم بیماری توسط تمامی جدایه‌های مایه‌زنی شده شبیه علائم موجود روی گیاه در طبیعت بود و با دوباره جدا شدن قارچ مورد نظر اصول کخ اثبات شد. در گیاهان شاهد علائمی از بیماری مشاهده نشد.

واکنش انتهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام شد.

محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE (۱۰/۸ گرم تریس، ۵/۵ گرم اسید بوریک، و ۰/۷۳ گرم EDTA در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر) بارگذاری شد (Sambrook *et al.*, 1989). پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه UV Trans-illuminator باندها مشاهده و به وسیله دستگاه Gel documentation از ژل عکسبرداری شد. برای تعیین اندازه قطعات از مارکر Standard Molecular Marker 250bp DNA Ladder (فرمتاس، آمریکا) استفاده شد. برای تعیین فاصله‌ی ژنتیکی جدایه‌ها با کمک مارکر rep-PCR از نرم افزار (NTSYS version 2.02) استفاده شد (Rohlf, 2000). فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد بر اساس مارکرهای مولکولی، به صورت وجود یا عدم وجود باند در ژل تعیین شد. تجزیه‌ی خوشه‌ای بر اساس روش مراتبی (Technique of Hierarchical) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش (UPGMA) و ضریب تشابه جاکارد استفاده گردید. خصوصیات ژنوتیپی به صورت کدهای یک و صفر در این نرم افزار تعریف گردید. دندروگرام مربوط به ۱۰ جدایه مورد بررسی بر پایه‌ی خصوصیات ژنوتیپی داده شده به نرم افزار رسم شد. درصد تشابه بین جدایه‌های موجود در گروه‌ها بر اساس خصوصیات ژنوتیپی محاسبه گردید.

تکثیر و آنالیز ناحیه ITS-rDNA: واکنش زنجیره‌ای

پلیمرز به منظور تکثیر ناحیه ترانویسی شده داخلی دی ان ای ریوزومی، با جفت آغازگرهای عمومی ITS1 و ITS4 انجام شد (White *et al.*, 1990). آزمون PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانو گرم از DNA، هریک از آغازگرها به غلظت یک میکرومولار، هریک از چهار داکسی نوکلئوتید تری فسفات ۲۰۰ میکرومولار، MgCl₂ ۱/۵ میلی مولار و پنج واحد Taq پلی مرز انجام گرفت. واسرشته سازی اولیه نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس انجام گرفت. واکنش

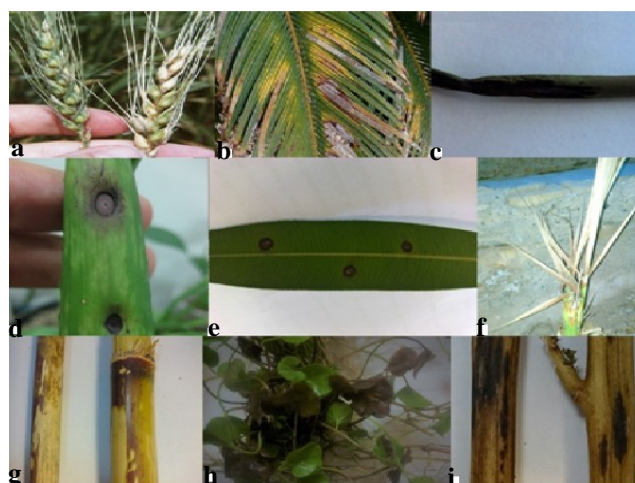
نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی، در نهایت منتج به اولین گزارش از حضور *F. brachygibbosum* Padwick به عنوان عامل لکه‌برگی خرزهره، *F. delphinoides* Schroers، Summerb., O'Donnell & Lampr. عامل پوسیدگی ریشه شبدر زینتی، *F. equiseti* (Corda) Saccardo عامل شانکر کرچک، *F. globosum* Rheeder, Marasas & Nelson عامل سوختگی غلاف نی، *F. incarnatum* (Desm.) Sacc. عامل شانکر تاج خروس، *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen عامل پوسیدگی برگ آلوئه‌ورا و *F. proliferatum*

(Matsushima) Nirenberg عامل شانکر کنجد، سوختگی برگ سیکاس در ایران شد. همچنین *F. delphinoides* یک گونه جدید برای میکوبیوتای ایران می‌باشد. در گذشته پوسیدگی برگ آلوئه‌ورا با عامل *F. oxysporum* در کشور اندونزی گزارش شده بود (Kawuri et al., 2012). علائم مربوط به جدایه‌های مورد مطالعه و عکس‌های مربوط به بیماریزایی به طور جداگانه به ترتیب در جدول شماره‌ی دو و شکل شماره یک مشخص شده است (جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۲- علائم بیماری توسط جدایه‌های مورد مطالعه

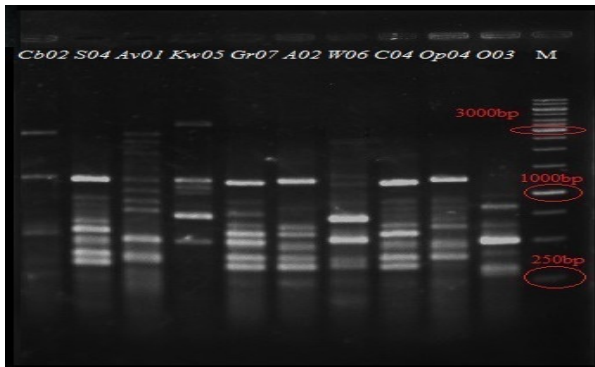
Table 2. Symptoms associated with *Fusarium* spp. on different studied plants

Isolate number	Disease type	Symptoms
Kw05	Root rot	Decay, discolored and roots dwarfing and, leaf yellow
Cb02	Stem canker	2-4 cm -brown sunken lesions on the stems
A02	Stem canker	Dark-brown to black sunken lesions on the stems resulted in decay
S04	Stem canker	2-3 cm- black lesions on the stems
Op04	Vascular wilt	Yellowing and wilt of leaves, and vascular discoloration
Gr07	Sheet blight	Longitudinal necrotic spots on the stems and sheath blight with brown margin
Av01	Leaf rot	Terminal leaf rot
C04	Leaf spot	1-2 cm -light brown leaf spots with darker margin
O03	Leaf spot	1-2 cm -circular or ellipsoid dark brown to black leaf spots
W06	Head blight	Root, crown and stem rot and decline of spikes



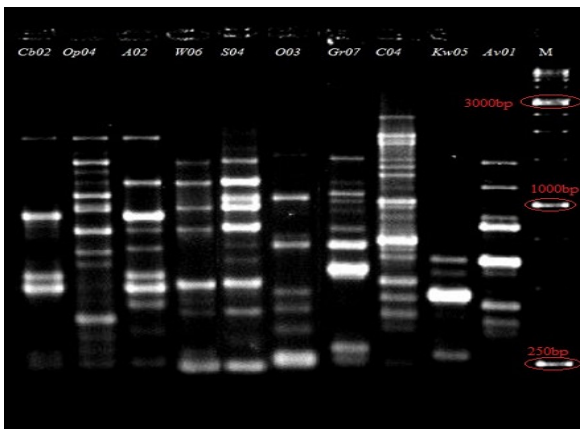
شکل ۱- a- فوزاریوز گندم، b- سوختگی برگ سیکاس، c- شانکر ساقه کرچک، d- پوسیدگی برگ آلوئه‌ورا (لکه برگی ایجاد شده بعد از آزمون بیماریزایی)، e- لکه برگی خرزهره، f- پژمردگی آوندی نخل، g- سوختگی غلاف نی، h- پوسیدگی ریشه شبدر زینتی و i- شانکر تاج خروس.

Fig. 1. a. Wheat head scab, b. Cycas leaf blight, c. Castor bean stem canker, d. Aloe leaf rot (leaf spot due to pathogenicity test), e. Oleander leaf spot, f. Date palm vascular wilt, g. Giant cane sheet blight, h. Kidney weed root rot and i. Redroot pigweed stem canker



شکل ۲- انگشت‌نگاری ژنتیکی ERIC-PCR جدایه‌های فوزاریوم از میزبان‌های مختلف (M=نشانه‌گر). Av01 جدایه *Fusarium oxysporum*، A02 جدایه *F. incarnatum*، Cb02 جدایه *F. equiseti*، O03 جدایه *F. brachygibbosum*، S04، C04 و Op04 جدایه‌های *F. proliferatum*، Kw05 جدایه *F. delphinoides*، W06 جدایه *F. graminearum* و Gr07 جدایه *F. globosum*.

Fig. 2. ERIC-PCR fingerprint of *Fusarium* isolated from different hosts. M: 250-bp DNA ladder. Av01 (*Fusarium oxysporum*), A02 (*F. incarnatum*), Cb02 (*F. equiseti*), O03 (*F. brachygibbosum*), S04, C04 and Op04 (*F. proliferatum*), Kw05 (*F. delphinoides*), W06 (*F. graminearum*) and Gr07 (*F. globosum*).



شکل ۳- انگشت‌نگاری ژنتیکی REP-PCR جدایه‌های فوزاریوم از میزبان‌های مختلف (M=نشانه‌گر). Av01 جدایه *Fusarium oxysporum*، A02 جدایه *F. incarnatum*، Cb02 جدایه *F. equiseti*، O03 جدایه *F. brachygibbosum*، S04، C04 و Op04 جدایه‌های *F. proliferatum*، Kw05 جدایه *F. delphinoides*، W06 جدایه *F. graminearum* و Gr07 جدایه *F. globosum*.

Fig. 3. REP-PCR fingerprint of *Fusarium* isolated from different hosts. M: 250-bp DNA ladder. Av01 (*Fusarium oxysporum*), A02 (*F. incarnatum*), Cb02 (*F. equiseti*), O03 (*F. brachygibbosum*), S04, C04 and Op04 (*F. proliferatum*), Kw05 (*F. delphinoides*), W06 (*F. graminearum*) and Gr07 (*F. globosum*).

در آزمون rep-PCR جدایه‌های منتخب (Av01, A02, آغازگر اختصاصی REP 1R/REP 2I، ERIC 1R/ERIC2 و BOX A1R قطعات متفاوتی از لحاظ اندازه تولید کردند (شکل ۲، ۳ و ۴). بر اساس دندروگرام رسم شده برای نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC2 1R/ERIC2 با شباهت ۵۰ درصد، جدایه‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. جدایه‌ی Kw05 در یک گروه مجزا بیشترین اختلاف را با دیگر گروه‌ها نشان داد. جدایه‌های S04، C04، Op04 در سطح ۸۷ درصد در یک گروه قرار گرفتند. تعداد باندهای تکثیر شده با این روش بین ۷ تا ۱۴ باند با اندازه‌ی تقریبی ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود. همچنین دندروگرام رسم شده برای نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با استفاده از آغازگر REP 1R/REP 2I در سطح شباهت ۳۸ درصد، جدایه‌ها به چهار گروه تفکیک شدند. جدایه‌های C04 و Op04 با بالاترین درصد تشابه در سطح ۷۵ درصد نسبت به سایر جدایه‌ها در یک گروه قرار گرفتند. جدایه‌ی Kw05 بیشترین اختلاف با دیگر جدایه‌ها را نشان داد و یک گروه مجزا را تا سطح ۱۴ درصد تشکیل داد. تعداد باندهای تکثیر شده با این روش بین ۴ تا ۱۸ باند با اندازه‌ی تقریبی ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود. بعلاوه دندروگرام رسم شده برای نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX A1R، نماینده‌ها در چهار گروه با تشابه ۴۶ درصد بین اعضا جدا شدند که سه جدایه‌ی Op04، C04 و S04 با بیشترین تشابه در سطح ۸۴ درصد، در یک گروه مستقل قرار گرفتند. تعداد باندهای تکثیر شده با این روش بین ۴ تا ۸ باند با اندازه‌ی تقریبی ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود. تلفیق داده‌های به دست آمده از واکنش rep-PCR با هر سه آغازگر قید شده نیز چهار گروه با تشابه ۴۳ درصد را نشان داد، که در اینجا نیز سه جدایه‌ی S04، C04 و Op04 بیشترین تشابه را در سطح بالای ۷۵ درصد با یکدیگر نشان دادند و جدایه‌ی Kw05 به صورت یک شاخه‌ی مستقل کمترین تشابه را نسبت به سایر گروه‌ها تا سطح ۲۹ درصد نشان داد (شکل ۵).

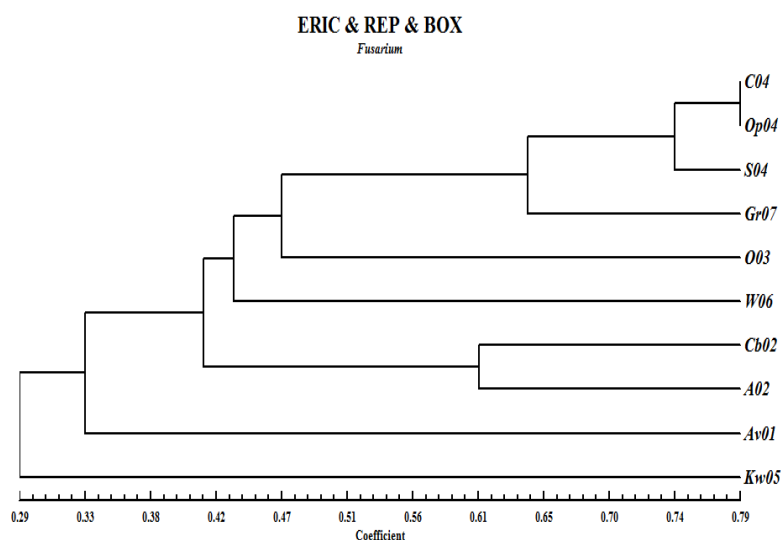
جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 ناحیه‌ی ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 باند ژنی با وزن مولکولی ۴۷۵ جفت باز را در تمامی ۱۰ جدایه تکثیر نمود. مترادف ناحیه‌ی ITS-rDNA در بانک ژن پس از بلاست شدن هشت گونه مختلف از جنس فوزاریوم را شناسایی کرد، که پس از ویرایش با نرم افزار BioEdit version 7.1.9، در بانک ژن ثبت شدند. نتایج حاصل نشان داد که جدایه‌های فوزاریوم به وسیله‌ی ITS به خوبی قابل شناسایی هستند (Amicucci et al., 1996; Datta et al., 2011). این گونه‌ها شامل *F. equiseti*, *F. delphinoides*, *F. brachygibbosum*, *F. oxysporum*, *F. incarnatum*, *F. graminearum*, *F. globosum* و *F. proliferatum* بودند (جدول ۳).

درخت فیلوژنتیکی حاصل از این جدایه‌ها چهار گروه مجزا را نشان داد که جدایه‌های Kw05 و O03 دو گروه مجزا را نسبت به دیگر جدایه‌ها تشکیل دادند و جدایه Kw05 بیشترین اختلاف را با جدایه‌های دیگر گروه‌ها نشان داد (شکل ۶).



شکل ۴- انگشت‌نگاری ژنتیکی BOX-PCR جدایه‌های فوزاریوم از میزبان‌های مختلف (M=نشانگر). جدایه Av01 (*Fusarium oxysporum*), A02 (*F. incarnatum*), Cb02 (*F. equiseti*), O03 (*F. brachygibbosum*), S04, C04 and Op04 (*F. proliferatum*), Kw05 (*F. delphinoides*), W06 (*F. graminearum*) and Gr07 (*F. globosum*) جدایه

Fig. 4. BOX-PCR fingerprint of *Fusarium* isolated from different hosts. M: 250-bp DNA ladder. Av01 (*Fusarium oxysporum*), A02 (*F. incarnatum*), Cb02 (*F. equiseti*), O03 (*F. brachygibbosum*), S04, C04 and Op04 (*F. proliferatum*), Kw05 (*F. delphinoides*), W06 (*F. graminearum*) and Gr07 (*F. globosum*).



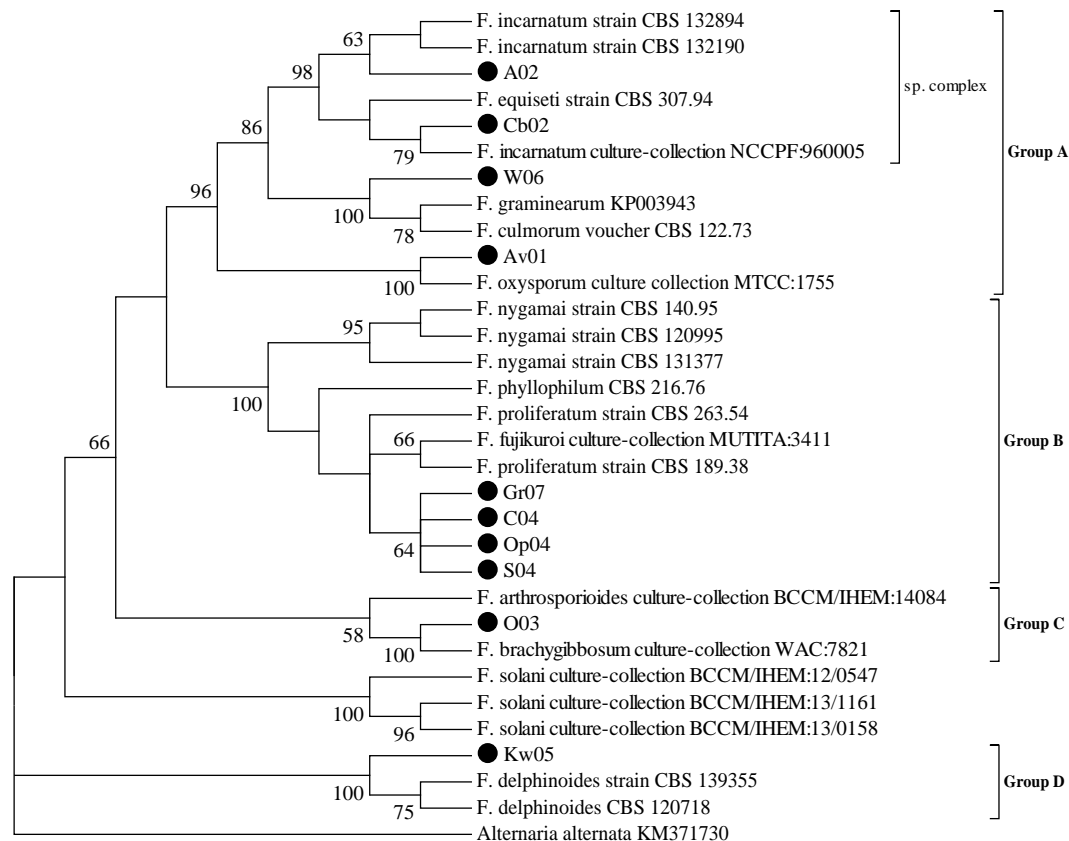
شکل ۵- دندروگرام ترکیبی انگشت‌نگاری جدایه‌های فوزاریوم بدست آمده از میزبان‌های مختلف براساس نقوش قطعات حاصل از REP-ERIC-PCR و PCR و BOX-PCR در ژل آگارز، تشابه جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است. جدایه Av01 (*Fusarium oxysporum*), A02 (*F. incarnatum*), Cb02 (*F. equiseti*), O03 (*F. brachygibbosum*), S04, C04 and Op04 (*F. proliferatum*), Kw05 (*F. delphinoides*), W06 (*F. graminearum*) and Gr07 (*F. globosum*) جدایه

Fig. 5. Combined dendrogram based on the ERIC, REP and BOX-PCR similarity matrix. Jaccard's coefficients for pairs of isolates and UPGMA clustering method with NTSYS (version 2.1) program. Av01 (*Fusarium oxysporum*), A02 (*F. incarnatum*), Cb02 (*F. equiseti*), O03 (*F. brachygibbosum*), S04, C04 and Op04 (*F. proliferatum*), Kw05 (*F. delphinoides*), W06 (*F. graminearum*) and Gr07 (*F. globosum*).

جدول ۳- مشخصات جدایه‌های فوزاریومی به دست آمده در این مطالعه

Table 3. Characteristics of *Fusarium* isolates were obtained in this study

Isolate number شماره جدایه	Host/Location	Fungal isolate نام جدایه	Accession Number رس شماره
O03	Oleander/Yazd	<i>F. brachygibbosum</i>	KP691019
Kw05	Kidney weed/Mazandaran	<i>F. delphinoides</i>	KP691020
A02	Redroot pigweed/Mazandaran	<i>F. incarnatum</i>	KP691021
Cb02	Castor bean/Yazd	<i>F. equiseti</i>	KP691022
Gr07	giant cane/Mazandaran	<i>F. globosum</i>	KP691023
W06	Wheat/Mazandaran	<i>F. graminearum</i>	KP691024
Av01	Aloe vera/Mazandaran	<i>F. oxysporum</i>	KP691025
C04	Cycas/Mazandaran	<i>F. proliferatum</i>	KP691026
Op04	Date palm/Kerman	<i>F. proliferatum</i>	KP691027
S04	Sesame/Mazandaran	<i>F. proliferatum</i>	KP691028

شکل ۶- دندروگرام رسم شده ناحیه ITS-rDNA جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش اتصال همسایگی (NJ). *Alternaria alternata* (KM371730).

به عنوان out group در نظر گرفته شده است. درجه اعتبار سنجی ۱۰۰۰ تکرار در هر گره است.

Fig. 6. The dendrogram was constructed using the Neighbor-joining method and based on phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of ITS1, 5.8S and ITS2 rDNA. *Alternaria alternata* (KM371730) as out group. Bootstraps values (1,000 replicates) are indicated at the nodes.

که از روش rep-PCR که برای تعیین انگشت‌نگاری ژنتیکی ژنوم باکتریایی استفاده می‌شود می‌تواند برای تشخیص گونه‌های فوزاریوم نیز استفاده شود. همچنین این روش به وسیله‌ی افتراق میان گونه‌های مرتبط نزدیک به هم که با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ناحیه‌ی ITS قابل تشخیص نیستند، فراهم می‌سازد که Redondo *et al.* (2009) نیز قبلاً برای تشخیص گونه‌های *Penicillium* به این نتایج رسیده بودند.

References

- ALVES-SANTOS, F. M., E. P. BENITO, A. P. ESLAVA and J. M. DIAZ-MINGUEZ, 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied and Environmental Microbiology* No. 65: 3335-3340.
- AMICUCCI, A., I. ROSSI, L. POTENZA, A. ZAMBONELLI, D. AGOSTINI, F. PALMA and V. STOCCHI, 1996. Identification of ectomycorrhizae from tuber species by RFLP analysis of the ITS region. *Biotechnology Letters* No. 18: 821-826.
- APPEL, D. J. and T. R. GORDON, 1995. Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Experimental Mycology* No. 19: 120-128.
- BOUTATI, E. I. and E. J. ANAISSIE, 1997. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* No. 90: 999-1008.
- BURGESS, L. W., B. A. SUMMERELL, S. BULLOCK, K. P. GOTT and D. BACKHOUSE, 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. 3th ed., University of Sydney, Australia. 133 p.
- DATTA, S., R. G. CHOUDHARY, M. D. SHAMIM and V. DHAR, 2011. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA among different *Fusarium* species. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* No. 44: 558-566.
- DE-BRUIJN, F. J., J. W. RADEMAKER, M. SCHNEIDER, U. ROSSBACH and F. J. LOUWS, 1996. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria

روش‌های مبتنی بر PCR دارای ثبات و کارایی بیشتری هستند و می‌توانند برای تعیین روابط فیلوژنتیکی بین جدایه‌های میکروبی واقع در یک گروه بسیار مفید واقع شوند (DeBruijn *et al.*, 1996). همچنین تکنیک rep-PCR روشی مناسب برای تولید اثر انگشت‌نگاری ژنتیکی جدایه‌های اختصاصی و آنالیز فیلوژنتیکی در *F. culmorum* و *F. semitectum* است (Ebadi *et al.*, 2013; Gurel *et al.*, 2010). در این بررسی پس از انجام PCR با تکنیک rep-PCR اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌ها به دست آمد، آنالیز خوشه‌ای داده‌های حاصل با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد نشان داد که بین جدایه‌های متفاوت فوزاریوم از روی میزبان‌های مختلف تنوع بالایی وجود داشت. از آنجا که ضرایب "نی و لی" و جاکارد بدلیل عدم تصادفی بودن آن‌ها دارای توزیع آماری مشخص نیستند که محاسبه واریانس نمونه‌برداری و در نتیجه حدود اطمینان را در مورد این ضرایب مشکل می‌کند (Lombard *et al.*, 2000) هر چند که استفاده از تکنیک bootstrap این مشکل را برطرف خواهد کرد (Tivang *et al.*, 1994). لذا در این مطالعه از دندروگرام حاصل از ناحیه‌ی ITS-rDNA به عنوان اساس مقایسه با روش‌های مبتنی بر rep-PCR استفاده شد. در این بررسی با مقایسه دندروگرام حاصل از تکثیر ناحیه‌ی ITS با دندروگرام‌های حاصل از rep-PCR مشخص شد که اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌ها با روش‌های ERIC-PCR و REP-PCR می‌تواند به عنوان یک روش مولکولی کارا و مفید جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف فوزاریوم مورد استفاده قرار گیرد. دندروگرام ترسیم شده براساس ترکیب داده‌های به دست آمده با ERIC-PCR, REP-PCR و BOX-PCR در مقایسه با دندروگرام حاصل از تکثیر ناحیه‌ی ITS بهتر از دندروگرام‌های مربوط به هر یک از روش‌های rep-PCR به تنهایی ارزیابی شد، که نتایج حاصل با پیشنهاد Rademaker *et al.* (2000) به بهتر بودن ترکیب داده‌ها به منظور به دست آوردن خوشه بندی با ثبات‌تر، مطابقت داشت. نتایج نشان داد

- and computer-assisted phylogenetic analysis, pp. 497-502, In: S. Grey, M. Beth and M. G. Peter (Eds). *Biology of Plant-Microbe Interaction*. APS Press, USA.
- EBADI, M., H. RIAHI and R. ZARE, 2013. Genetic diversity of *Fusarium semitectum* isolates from rice, using RAPD and REP-PCR markers. *Mycologia Iranica* No. 1: 14-20.
- EDEL, V., C. STEINBERG, I. AVELANGE, G. LAGUERRE and C. ALABOUVETTE, 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* No. 85: 579-585.
- GROPPE, K. and T. BOLLER, 1997. PCR assay based on a microsatellite-containing locus for detection and quantification of *Epichloe* endophytes in grass tissue. *Applied and Environmental Microbiology* No. 63: 1543-1550.
- GUREL, F., G. ALBAYRAK, O. DIKEN, E. CEPNI and B. TUNALI, 2010. Use of rep-PCR for genetic diversity analyses in *Fusarium culmorum*. *Journal of Phytopathology* No. 158: 387-389.
- HEALY, M., K. REECE, D. WALTON, J. HUONG, S. FRYE, I. I. RAAD and D. P. KONTOYIANNIS, 2005. Use of the Diversilab System for Species and Strain Differentiation of *Fusarium* Species Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* No. 43: 5278-5280.
- INGLE, A., A. KARWA, M. K. RAI and Y. GHERBAWY, 2009. *Fusarium*: molecular detection mycotoxins and biocontrol, pp. 85-106. In: Y. Gherbawy, R. Mach and M. Rai (Eds). *Current Advances in Molecular Mycology*. Science Publishers Inc., Enfield.
- KAWURI, R., DN. SUPRAPTA, Y. NITTA and T. HOMMA, 2012. Destructive leaf rot disease caused by *Fusarium oxysporum* on *Aloe barbadensis* Miller in Bali. *Agricultural Science Research Journal* No. 2: 295 – 301.
- LESLIE, J. F. and B. A. SUMMERELL, 2006. *The Fusarium laboratory manual*. 3th ed., Blackwell Publishing Professional, Ames, 388 p.
- LOMBARD, V. C. P. BARIL, P. DUBREUIL, F. BLOUET and D. ZHANG, 2000. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: Consequences for varietal registration. *Crop Science* No. 40: 1417-1425.
- MAYEK-PEREZ, N., Z. LOPEZ-CASTANEDA, M. GONZALEZ-CHAVIRA, R. GARCIA-ESPINOSA, J. ACOSTA-GALLEGOS, O. MARTINEA-DELAVEGA and J. SIMPSON, 2001. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. *Physiological and Molecular Plant Pathology* No. 59: 257-264.
- MIRHOSSEINI, H. A., V. BABAEIZAD and L. HASHEMI, 2014. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing leaf spot on oleander in Iran. *Journal of Plant Pathology* No. 96: 431-439.
- NAKAMURA, H., A. KANEKO, S. YAMAOKA and M. KAKISHIMA, 1998. Differentiation of *Melampsora* rust species on willows in Japan using PCR-RFLP analysis of ITS regions of ribosomal DNA. *Mycoscience* No. 39: 105-113.
- NELSON, P. E., T. A. TOUSSON and W. F. O. MARASAS, 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. University Park: Pennsylvania State University Press. 193 p.
- O'DONNELL, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* 22: 213-220.
- O'DONNELL, K., D. A. SUTTON, M. G. RINALDI, K. C. MAGNON, P. A. COX, S. G. REVANKAR, S. SANCHE, D. M. GEISER, J. H. JUBA, J. A. VANBURIK, A. PADHYE, E. J. ANAISSIE, A. FRANCESCO, T. J. WALSH and J. S. ROBINSON, 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology* No. 42:5109-5120.
- PETERSON, S. W. and A. LAGRIECO, 1991. Ribosomal RNA sequence variation among inter fertile strain of some *Gibberella* species. *Mycology* No. 83: 397-402.
- RAAD, I., J. TARRAND, H. HANNA, M. ALBITAR, E. JANSSEN, M. BOKTOUR, G. BODEY, M.

- MARDANI, R. HACHEM, D. KONTOYIANNIS, E. WHIMBEY and K. RALSTON, 2002. Epidemiology, molecular mycology, and environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. *Infection Control and Hospital Epidemiology* No. 23: 532-537.
- RADEMAKER, J. W., B. HOSTE, F. J. LOUWS, K. KERSTERS, J. SWINGS, L. VAUTERINE, P. VAUTERINE and F. J. DE-BRUIJN, 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* No. 50: 665-677.
- REDONDO, C., J. CUBERO and P. MELGAREJO, 2009. Characterization of *Penicillium* species by ribosomal DNA sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR analysis. *Mycopathologia* No. 168: 11-22.
- ROHLF, F. J. 2000. NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exete software. Applied Biostatistics INC., NY, USA. 493-505.
- SALLEH, B. 1998. Mycotoxins: their implication in animal and human health. USM Academic Imprint, 155 p.
- SCHROERS, H., K. O'DONNELL, S. C. LAMPRECHT, P. L. KAMMEYER, D. A. SUTTON, M. G. RINALDI, D. M. GEISER and R. C. SUMMERBELL, 2009. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia* No. 101: 44-70.
- STEINKELLNER, S., R. MAMMERLER, and H. VIERHEILIG, 2008. Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *European Journal Plant Pathology* No. 122: 395-401.
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI and S. KUMAR, 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* No. 24: 1596-1599.
- TIVANG, G., J. NIENHUIS, and O. S. SMITH, 1994. Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. *Theoretical Applied Genetics* No. 89: 259-264.
- TORRES, H. and D. P. KONTOYIANNIS, 2003. Hyalohyphomycoses. Pp. 252-270. In: W. E. Dismukes, P. G. Pappas and J. D. Sobel (Eds). *Oxford Textbook of Clinical Mycology*. Oxford University Press, New York.
- TRANE, U. 1990. Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. *Journal of Microbiological Methods* No. 12: 23-39.
- VAKALOUNAKIS, D. J. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Journal of Plant Disease* No. 81: 313-316.
- VERSALOVIC, J., M. SCHNEIDER, F. J. DE-BRUIJN and J. R. LUPSKI, 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods of Molecular and Cellular Biology* No. 5: 25-40.
- VERSALOVIC, J., T. KOEUTH and J. R. LUPSKI, 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. *Nucleic Acid Research* No. 19: 6823-6831.
- WAALWIJK, C., R. P. BAAAYENA and W. GAMS, 1996. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia* 88: 361-368.
- WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE and J. W. TAYLOR, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (Eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, USA.
- WITHANAGE, G. S., H. MURATA, T. KOYAMA and I. ISHIWATA, 2001. Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines. *Veterinary and Human Toxicology* 43: 6-10.