

شناسایی مولکولی گونه‌های *Fusarium* همراه چمن و برخی درختان در فضای سبز اردبیل

Molecular identification of *Fusarium* species associated with turfgrass and some trees in Ardabil greenspace

مینا بیگزاده^۱، مهدی داوری^{۲*} و نعمت هدایت اوریق^۳

Mina Beigzadeh¹, Mahdi Davari² and Nemat Hedayat-Evrigh³

۱- دانشجوی بیماری‌شناسی گیاهی، ۲- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

1. Plant Pathology Student, 2. Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

3. Associate Professor of Animal Sciences, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: Mdavari@uma.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۹)

چکیده

واژه‌های کلیدی

آغازگر اختصاصی،

زردی چمن،

زوال درختان،

Fusarium

TEF-1a

در بین بیماری‌های مختلفی که گیاهان فضای سبز را تهدید می‌کنند، جنس *Fusarium* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به اینکه روش‌های ریخت‌شناختی در مورد *Fusarium* علاوه بر زمان‌بر بودن و نیاز به تخصص بالا، به‌تنهایی قادر به شناسایی دقیق و قابل اعتماد نیستند، استفاده از آغازگرهای اختصاصی روشی سریع، مقرون به‌صرفه و بدون نیاز به توالی‌یابی است که می‌تواند در شناسایی جنس و گونه *Fusarium* به‌راحتی مورد استفاده قرار گیرد. در این پژوهش، با توجه به ضرورت تایید مولکولی گونه‌های فوزاریوم همراه با زوال درختان زبان گنجشک، اقاچیا، صنوبر و زردی چمن در فضای سبز اردبیل، علاوه بر راست‌آزمایی دوباره آغازگرهای اختصاصی گونه با استفاده از جدایه‌های استاندارد، گونه جدایه‌های فوزاریومی به‌دست آمده از گیاهان فضای سبز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی شناسایی شدند. در این پژوهش، تعداد ۲۴ جدایه متعلق به گونه *F. solani* با استفاده از آغازگرهای CLOX2-R و CLOX1-F، ۱۰ جدایه متعلق به گونه *F. acuminatum* با استفاده از آغازگرهای FAC-R و FAC-F، ۸ جدایه متعلق به گونه *F. equiseti* با استفاده از آغازگرهای FER1 و FEF1 و ۸ جدایه متعلق به گونه *F. graminearum* با استفاده از آغازگرهای FgCTPSf024 و FgCTPSrR306 شناسایی شدند. این آغازگرها هیچ واکنشی با جدایه‌های متعلق به سایر گونه‌های فوزاریوم مورد بررسی نشان ندادند. ضمناً از سه جدایه منتخب توالی‌یابی شده با آغازگر EF1-fus، دو جدایه به گونه *F. solani* و یک جدایه به گونه *F. redolens* تعلق داشتند.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2, 2022

Abstract

Among the various diseases that threaten the green space plants, the *Fusarium* genus is of great importance. Due to time consuming, requiring high expertise and low reliability in the morphological methods, it would be recommended to use species-specific primers for identification of *Fusarium* species as a fast and cost-effective method without need to sequencing that could be easily used to identify the genus and species of *Fusarium*. In this study, in order to molecularly confirming of *Fusarium* isolates associated with Ash, Black locust and Populus decline, and turfgrass yellowing, in addition to verifying species-specific primers with standard isolates, *Fusarium* isolates obtained from Ardabil's green space plants were identified using these specific primers by PCR. Totally, the 24 isolates belonging to *F. solani* using fFuso1 and rFuso2, 11 isolates belonging to *F. oxysporum* species using CLOX1-F and CLOX2-R primers, 10 isolates belonging to *F. acuminatum* species with using FAC-F and FAC-R primers, 8 isolates belonging to *F. equiseti* were identified using FEF1 and FER1 primers and 8 isolates belonging to *F. graminearum* were identified using FgCTPSf024 and FgCTPSrR306 primers. These primers did not react with isolates belonging to other *Fusarium* species. Also, the sequencing and phylogenetic analysis results lead to identify 2 and 1 isolates as *F. solani* and *F. redolens*, respectively.

Keywords: *Fusarium*, Trees decline, Turfgrass yellowing, Specific primers, *TEF-1a*.

مقدمه

جنس قارچی، بیماری‌های مختلفی مانند پژمردگی آوندی، زوال و سرخشکیدگی درختان و زردی چمن را ایجاد می‌کنند (Ezrari et al., 2021). در هاوایی، قارچ *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی نهال‌های اقاچیا معرفی شده است (Gardner, 1997). در سال ۲۰۰۷ نیز گونه *F. oxysporum* به‌عنوان بیمارگر بسیار مهم در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی در خصوص درختان جنگلی آمریکا معرفی شد (James and Dumroese, 2007). در پژوهشی، سه گونه *F. oxysporum*، *F. avenaceum* و *F. merismoides* از درختان دارای زوال زبان‌گنجشک در اسلواکی گزارش شدند (Ivanova et al., 2020). در سال ۲۰۲۰ طی بررسی قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه در زبان گنجشک (*Fraxinus angustifolia*)، گونه *F. solani* به‌عنوان یکی از قارچ‌های عامل سرخشکیدگی معرفی شد (Orlović et al., 2020). همچنین Halasz در مجارستان گونه *F. solani* را به همراه گونه‌های *F. semitectum*، *F. lateritium*، *F. avenaceum* و *F. sulphureum* از درختان دارای علائم پژمردگی و شانکر پوست جداسازی کرد و نشان داد که گونه‌های *F. avenaceum* و *F. sulphureum* بدون وجود اثرهای یخبندان هم قادر به ایجاد شانکر روی ساقه و شاخه‌های کوچک می‌باشند (Halász,

امروزه فضای سبز شهری به‌عنوان یک جزء ضروری و جدایی‌ناپذیر در حیات شهرها و بهبود زندگی شهروندان به‌شمار می‌رود. نقش گیاهان به‌ویژه درختان در پالایش و کاستن آلودگی‌های مختلف هوا، صدا، نور و همچنین زیباسازی محیط زیست بسیار قابل توجه است (Kwak et al., 2020). فضاهای سبز شهری دارای ویژگی‌هایی است که آن‌ها را به فضاهای مناسبی برای ارتقای کیفیت زندگی انسان تبدیل می‌کند (Kabisch et al., 2015). شهر اردبیل با مساحت بیش از ۶۲۰۰ هکتار، دارای پارک‌ها و فضاهای سبز بسیاری است و سرانه موجود فضای سبز شهر برابر با ۵/۱ متر مربع می‌باشد (Imani et al., 2017). فضاهای سبز شهری توسط عوامل تنش‌زای مختلف زنده و غیرزنده مورد حمله قرار می‌گیرند و علائم مختلفی مانند زوال، زردی، سرخشکیدگی، شانکر و تغییر رنگ بافت چوبی را نشان می‌دهند. در نتیجه، شناخت آسیب‌ها و عوامل خسارت‌زای آن برای اتخاذ روش‌های پیشگیری و مدیریتی، امری ضروری است. گونه‌های مختلف قارچ فوزاریوم از عوامل بیماری‌زای مهم در گیاهان مختلف به‌شمار می‌روند. در گیاهان فضای سبز نیز این

ها روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) قرار گرفتند و پس از بررسی ویژگی های ماکروسکوپی شامل شکل و رنگ پرگنه، ساختار و نوع میسلیوم، نرخ رشد و تولید یا عدم تولید رنگدانه، از محیط کشت SNA (-Synthetic Nutrient Poor-) Agar)، برای بررسی خصوصیات میکروسکوپی شامل سازوکار کنیدیوم زایی، تشکیل یا عدم تشکیل کنیدیوماتا، اندازه و شکل ماکروکنیدیوم، وجود یا فقدان میکروکنیدیوم ها و شکل آن ها، نوع فیالیل (منوفیالیل یا پلی فیالیل) و حضور یا عدم حضور کلامیدوسپور استفاده شد. برای این کار از میکروسکوپ ZIESS Axiolab مجهز به خط کش میکرومتری استفاده شد. به منظور تهیه تصاویر میکروسکوپی نیز از دوربین دیجیتال Canon 450D نصب شده روی میکروسکوپ ZIESS Axiolab (آلمان) استفاده شد. در نهایت، شناسایی ریخت شناختی گونه جدایه های قارچی با استفاده از (Leslie and Summerell, 2005) دوباره انجام پذیرفت.

مطالعات مولکولی جدایه های قارچی

استخراج DNA جدایه های قارچی و کیفیت سنجی آن ها: برای به دست آوردن توده میسلیومی، جدایه های قارچی به مدت ۱۰-۷ روز روی محیط کشت PDA کشت و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از حدود یک هفته، بسته به سرعت رشد جدایه های مختلف، DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB (دستورالعمل Moller et al., 1992) استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ (مدل NanodropOne_C- AZY1706749, USA) و استفاده از ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه و آغازگر عمومی *Fusarium*: این واکنش با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (ساخت شرکت سیناکلون)، نه میکرولیتر آب دو بار تقطیر، یک میکرولیتر آغازگر مستقیم، یک میکرولیتر آغازگر معکوس و یک ونیم میکرولیتر DNA ژنومی آماده شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر BioRad طبق برنامه دمایی (جدول ۱) برای هریک از آغازگرهای اختصاصی تنظیم شد. همچنین به منظور تکثیر ناحیه ژنی *TEF-1α*

(2002). گونه های *F. sambucinum* *F. polyphialidicum* *F. semitectum* *F. crookwellense* *F. equiseti* *F. solani* و *F. culmorum* نیز به عنوان عوامل ایجادکننده زوال در شیراز معرفی شدند (Barzegar Marvasti & Banihashemi, 2011). در بررسی عوامل قارچی همراه با سرخشکیدگی و زوال درختان اقلایا در شهر اردبیل، ۱۰ گونه قارچی با استفاده از تلفیق داده های ریخت شناختی و مولکولی شناسایی و بیان شد که دو گونه *F. solani* و *F. oxysporum* با ایجاد انسداد آوندی می توانند در زوال این درختان نقش آفرینی کنند (Davari et al., 2020). هم چنین چهار گونه *F. equiseti* *F. culmorum* *F. avenaceum* و *F. graminearum* به عنوان عوامل اصلی پوسیدگی ریشه چمن در آب و هوای گرم ایران معرفی شده اند (Mirabolfathy and Ershad, 2002). در بررسی بیماری های مهم چمن در اردبیل نیز قارچ *Fusarium* به عنوان یکی از هفت جنس قارچی مهم همراه زردی چمن معرفی شد و گونه های *F. semitectum* *F. culmorum* *F. avenaceum* *F. graminearum* *F. equiseti* *F. sambucinum* *F. solani* *F. crookwellens* *F. subglutinans* *F. oxysporum* *polyphialidicum* *F. compactum* *chlamydosporum* و *F. proliferatum* از چمن مبتلا به زردی جداسازی و از روی ویژگی های ریخت شناختی شناسایی شدند (Samiee and Davari, 2021). با توجه به لزوم شناسایی دقیق گونه های فوزاریوم جداسازی شده از گیاهان بیمار فضای سبز اردبیل، این پژوهش با هدف شناسایی گونه های *Fusarium* جداسازی شده از این گیاهان با استفاده از روش های مولکولی اجرا شد.

مواد و روش ها

تهیه جدایه های قارچی و شناسایی ریخت شناختی: در این پژوهش، جدایه های متعلق به جنس *Fusarium* که در پژوهش های قبلی از گیاهان بیمار فضای سبز (زبان گنجشک، اقلایا، صنوبر، افرا و چمن) اردبیل و نمین جداسازی شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت. برای شناسایی دقیق تر ریخت شناختی، جدایه -

موجود در بانک ژن در شبکه NCBI با استفاده از ابزار جستجوی بلاست (BLAST search tool; Altschul *et al.* 1990) مقایسه و رج‌بندی توالی‌ها با استفاده از برنامه MEGA-7 انجام شد (Kumar *et al.*, 2016). بهترین مدل برای رسم درخت تبارزایی با همین نرم‌افزار تعیین شد. تبارنمای نهایی با استفاده از روش حداکثر درستنمایی (Maximum Likelihood) بر مبنای داده‌های توالی ژن *TEF-1a* مربوط به جدایه‌های فوزاریوم مورد مطالعه در این پژوهش و جدایه‌های معتبر دریافت شده از بانک ژن جهانی (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) با استفاده از نرم‌افزار MEGA-7 ترسیم شد. آزمون اعتبارسنجی به روش حداکثر درستنمایی انجام شد (Golmohamadi *et al.*, 2020). تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد. در این تبارنما، گونه *Trichoderma harzianum* به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد.

(Translation elongation factor-1alpha) در مورد سه جدایه *Fusarium* از آغازگرهای EF1-fus 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3' و EF1-fus 5'-GGAAGTACCAGTGCATCATGTT-3' (Geiser *et al.*, 2004). پس از استخراج DNA ژنومی به روش CTAB، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مطابق شرایط ذکر شده در مطالعات قبلی (Davari *et al.*, 2013b) انجام شد. کیفیت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت.

توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل جدایه‌های منتخب: محصول واکنش PCR جدایه‌های منتخب جهت خالص‌سازی و تعیین ترادف به شرکت توپازژن ارسال شد. سپس داده‌های خام توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار (DNASTAR, Madison, WI, Seqman (USA) ویرایش شد. توالی نوکلئوتیدی حاصل با توالی‌های

جدول ۱- اسامی و توالی آغازگرهای استفاده شده در PCR

Table 1. Names and Sequence of primers used in PCR

Primers	Species-Specificity	Primer Sequence	PCR program	Source
1 FAC-F FAC-R	<i>F. acuminatum</i>	5'-GGGATATCGGGCCTCA-3' 5'-GGGATATCGGCAAGATCG-3'	95°C for 3min, 38 (95°C for 30s, 56°C for 20s, 72°C for 45s), 72°C for 5 min	Williams <i>et al.</i> , 2002
2 FEF1 FER1	<i>F. equiseti</i>	5'- CATACTATAACGTTGCTCG-3' 5'- TTACCAGTAACGAGGTGTATG-3'	94°C for 1min, 25 (94°C for 1min, 58°C for 30s, 72°C for 1min), 72°C for 7min	Mishra <i>et al.</i> , 2003
3 FgCTPSf024 FgCTPSrR306	<i>F. graminearum</i>	5'-TCGGAAGAGTTTTCTGCC-3' 5'-CCTTGGTCATCCATAGAG-3'	94°C for 5 min, 35(94°C for 1min, 53°C for 1min, 72°C for 3min), 72°C for 5mi	Yang <i>et al.</i> , 2008
4 Clox1-F Clox2-R	<i>F. oxysporum</i>	5'-CAGCAAAGCATCAGACCACTATAACT-3' 5'- CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT-3'	94°C for 5min, 35(94°C for 50s, 60°C for 50s, 72°C for 1min), 72°C for 7min	Mule <i>et al.</i> , 2004
5 fFuso1 rFuso2	<i>F. solani</i>	5'-CTC TGT TAATAATGC AAC TC-3' 5'-TGG TAC TAT AGC TGG AGG A-3'	94°C for 2 min, 35 (94°C for 1min, 50°C for 1 min, 72°C for 2min), 72°C for 10min	He <i>et al.</i> , 2011
6 EF1 <i>Fusarium</i> F EF2 <i>Fusarium</i> R	<i>Fusarium</i> sp.	5'-ATGGGTAAGGAAGGACAAGAC-3' 5'-GGAGAGTACCAGTGCATCATGTT-3'	94°C for 5min, 35 (94°C for 50s, 56°C for 50s, 72°C for 1min), 72°C for 7min	Geiser <i>et al.</i> , 2004

انتخاب و گونه‌های با بیشترین فراوانی در فضای سبز مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. از این تعداد، ۱۷ جدایه مربوط به میزبان زبان گنجشک، ۱۲ جدایه مربوط به میزبان افاقیا، ۸ جدایه مربوط به میزبان چمن، ۴ جدایه مربوط به میزبان افرا، ۱ جدایه مربوط به میزبان صنوبر و ۳ جدایه مربوط به میزبان فندق بود. ۲۳

نتایج و بحث

در این تحقیق، ۶۸ جدایه متعلق به جنس *Fusarium* از گیاهان زبان گنجشک، چمن، افاقیا، صنوبر، افرا و سایر میزبان‌های گیاهی متفرقه که در پژوهش‌های قبلی جداسازی و با روش‌های ریخت-شناختی بررسی شده و بیماری‌زایی اغلب آن‌ها اثبات شده بود،

این گونه را با دمای اتصال ۵۰ درجه سلسیوس تکثیر دهد و قطعات ۳۳۰ جفت بازی ایجاد کند (شکل ۱).

جدایه از سایر میزبانهای گیاهی هم برای شناسایی جدایه یا صحت سنجی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت.

بر اساس نتایج، جفت آغازگر اختصاصی گونه *F. solani* توانست به صورت اختصاصی، DNA تمامی ۲۴ جدایه مربوط به

جدول ۲- واکنش جدایه های مورد بررسی *Fusarium* به آغازگرهای fFuso1 و rFuso2

Table 2. Reaction of *Fusarium* isolates to primers fFuso1 and rFuso2

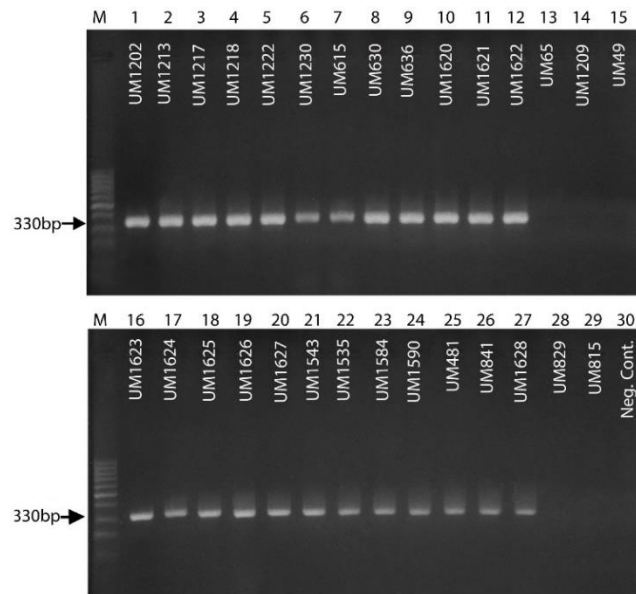
Number	Species	Isolate code	Host	Plant parts	Reaction to primer
1	<i>F. solani</i>	UM1202	<i>Fraxinus rotundifolia</i>	Root	+
2	<i>F. solani</i>	UM1213	<i>F. rotundifolia</i>	Root	+
3	<i>F. solani</i>	UM1217	<i>Fraxinus excelsior</i>	Root	+
4	<i>F. solani</i>	UM1218	<i>F. rotundifolia</i>	Root	+
5	<i>F. solani</i>	UM1222	<i>F. excelsior</i>	Root	+
6	<i>F. solani</i>	UM1230	<i>F. excelsior</i>	Root	+
7	<i>F. solani</i>	UM615	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Unknown	+
8	<i>F. solani</i>	UM630	<i>R. pseudoacacia</i>	Unknown	+
9	<i>F. solani</i>	UM636	<i>R. pseudoacacia</i>	Unknown	+
10	<i>F. solani</i>	UM1620	<i>Acer</i> sp.	Unknown	+
11	<i>F. solani</i>	UM1621	<i>Acer</i> sp.	Unknown	+
12	<i>F. solani</i>	UM1622	<i>R. pseudoacacia</i>	Unknown	+
13	<i>F. graminearum</i>	UM65 (CBS130952)	<i>Triticum aestivum</i>	Head	-
14	<i>F. oxysporum</i>	UM1209	<i>F. excelsior</i>	Stem	-
15	<i>F. venenatum</i>	UM49 (CBS458.93)	<i>T. aestivum</i> (Austria)	Unknown	-
16	<i>F. solani</i>	UM1623	<i>R. pseudoacacia</i>	Unknown	+
17	<i>F. solani</i>	UM1624	<i>Acer</i> sp.	Unknown	+
18	<i>F. solani</i>	UM1625	<i>Acer</i> sp.	Unknown	+
19	<i>F. solani</i>	UM1626	<i>R. pseudoacacia</i>	Root	+
20	<i>F. solani</i>	UM1627	<i>Populus</i> sp.	Root	+
21	<i>F. solani</i>	UM1543	<i>R. pseudoacacia</i>	Root	+
22	<i>F. solani</i>	UM1535	<i>R. pseudoacacia</i>	Root	+
23	<i>F. solani</i>	UM1584	<i>R. pseudoacacia</i>	Root	+
24	<i>F. solani</i>	UM1590	<i>R. pseudoacacia</i>	Stem	+
25	<i>F. solani</i>	UM481	<i>R. pseudoacacia</i>	Root	+
26	<i>F. solani</i>	UM841	<i>Poa</i> sp.	Root	+
27	<i>F. solani</i>	UM1628	<i>R. pseudoacacia</i>	Unknown	+
28	<i>F. equiseti</i>	UM829	<i>Poa</i> sp.	Root	-
29	<i>F. cerealis</i>	UM815	<i>Poa</i> sp.	Root	-

اختصاصی گونه *F. graminearum*، هشت جدایه این گونه را با دمای اتصال ۵۳ درجه سلسیوس تکثیر داد و قطعات ۳۱۱ جفت بازی ایجاد کرد. بدین ترتیب، از بین گونه های متعلق به این جنس، گونه *F. solani* با ۲۴ جدایه، بیشترین فراوانی را دارا بود و بعد از آن به ترتیب، گونه *F. oxysporum* با ۱۱ جدایه، گونه *F. acuminatum* با ۱۰ جدایه و گونه های *F. equiseti* و *F. graminearum* هر کدام با هشت جدایه در رتبه های بعدی قرار می گرفتند. همچنین هفت جدایه از سایر گونه های *Fusarium* (

آغازگر اختصاصی گونه *F. oxysporum* تمام ۱۱ جدایه این گونه را با دمای اتصال ۶۰ درجه سلسیوس تکثیر داد و قطعات ۵۰۰ جفت بازی ایجاد کرد (شکل ۲). ۱۰ جدایه مربوط به گونه *F. acuminatum* نیز توسط آغازگر اختصاصی این گونه، با دمای اتصال ۵۶ درجه سلسیوس قطعات ۶۰۰ جفت بازی ایجاد کرد (شکل ۳). آغازگر اختصاصی گونه *F. equiseti* هر هشت جدایه مربوط به خود را با دمای اتصال ۵۸ درجه سلسیوس تکثیر داد و قطعات ۳۳۹ جفت بازی ایجاد کرد (شکل ۴). در نهایت آغازگر

UM1218 با استفاده از توالی یابی ژن *TEF-1α* مورد بررسی قرار گرفتند. ایجاد قطعات اختصاصی ۷۰۰ جفت بازی در الکتروفورز نشان داد که آغازگرهای انتخاب شده (*EF1-fus/EF2-fus*) به خوبی این قطعات را تکثیر کرده اند (شکل ۶).

F. avenaceum، *F. verticillioides*، *F. venenatum*، *F. incarnatum*، *F. proliferatum*، *F. subglutinans* (cerealis) به عنوان جدایه های کنترل منفی آغازگرهای اختصاصی گونه مورد بررسی قرار گرفتند و هیچ بانندی مشاهده نشد. برای صحت سنجی بیشتر، سه جدایه UM1201، UM1204 و

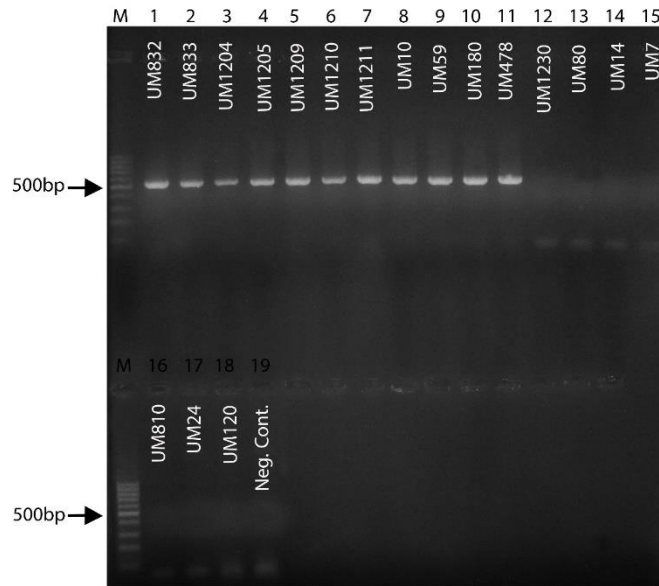


شکل ۱- تکثیر قطعه ۳۳۰ جفت بازی مربوط به گونه *F. solani* با استفاده از آغازگرهای rFuso2 و fFuso1
Fig1. Amplification of 330 Base pair of the *F. solani* using primers fFuso1 and rFuso2

جدول ۳- واکنش جدایه های مورد بررسی *Fusarium* به آغازگرهای Clox1-F و Clox2-R

Table 3. Reaction of *Fusarium* isolates to primers Clox1-F and Clox2-R

Number	Species	Isolate code	Host	Plant parts	Reaction to primer
1	<i>F. oxysporum</i>	UM832	<i>Poa</i> sp.	Root	+
2	<i>F. oxysporum</i>	UM833	<i>Poa</i> sp.	Crown	+
3	<i>F. oxysporum</i>	UM1204	<i>F. excelsior</i>	Root	+
4	<i>F. oxysporum</i>	UM1205	<i>F. excelsior</i>	Root	+
5	<i>F. oxysporum</i>	UM1209	<i>F. excelsior</i>	Trunk	+
6	<i>F. oxysporum</i>	UM1210	<i>F. excelsior</i>	Trunk	+
7	<i>F. oxysporum</i>	UM1211	<i>F. excelsior</i>	Root	+
8	<i>F. oxysporum</i>	UM10 (CBS141.95)	<i>Hedera helix</i>	Unknown	+
9	<i>F. oxysporum</i>	UM59 (FL1)	<i>Lentis esculenta</i>	Stem	+
10	<i>F. oxysporum</i>	UM180 (CBS131194)	<i>Arrhenatherum elatius</i>	Head	+
11	<i>F. oxysporum</i>	UM478 (IRAN3910C)	<i>Corylus avellana</i>	Root	+
12	<i>F. solani</i>	UM1230	<i>F. excelsior</i>	Root	-
13	<i>F. graminearum</i>	UM80 (CBS130911)	<i>T. aestivum</i>	Head	-
14	<i>F. acuminatum</i>	UM14 (CBS 334.75)	<i>Musa sapientum</i>	Unknown	-
15	<i>F. verticillioides</i>	UM7 (CBS218.79)	<i>Zea mays</i>	Unknown	-
16	<i>F. cerealis</i>	UM810	<i>Poa</i> sp.	Leaf	-
17	<i>F. equiseti</i>	UM24 (CBS394.93)	<i>Disphyma crassifolium</i>	Unknown	-
18	<i>F. avenaceum</i>	UM120 (CBS131444)	Tree	Unknown	-



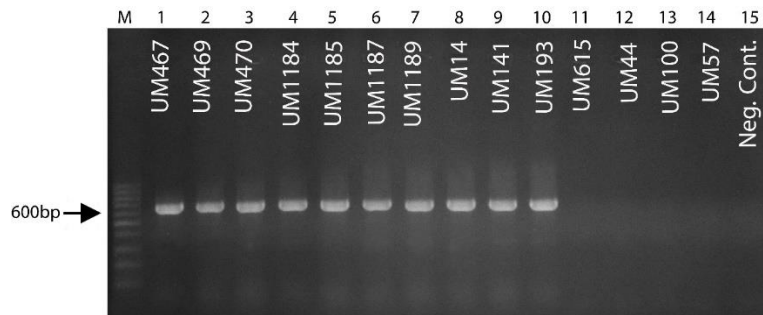
شکل ۲- تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی مربوط به گونه *F. oxysporum* با استفاده از آغازگرهای Clox1-F و Clox2-R

Fig 2. Amplification of 500 Base pair of the *F. oxysporum* using primers Clox1-F and Clox2-R

جدول ۴- واکنش جدایه‌های مورد بررسی *Fusarium* به آغازگرهای FAC-F و FAC-R

Table 4. Reaction of *Fusarium* isolates to primers FAC-F and FAC-R

Number	Species	Isolate code	Host	Plant organs	Reaction to primer
1	<i>F. acuminatum</i>	UM467	<i>C. avellana</i>	Root	+
2	<i>F. acuminatum</i>	UM469	<i>C. avellana</i>	Root	+
3	<i>F. acuminatum</i>	UM470	<i>C. avellana</i>	Root	+
4	<i>F. acuminatum</i>	UM1184	<i>F. excelsior</i>	Root	+
5	<i>F. acuminatum</i>	UM1185	<i>F. rotundifolia</i>	Root	+
6	<i>F. acuminatum</i>	UM1187	<i>F. rotundifolia</i>	Root	+
7	<i>F. acuminatum</i>	UM1189	<i>F. excelsior</i>	Root	+
8	<i>F. acuminatum</i>	UM14 (CBS 334.75)	<i>Musa sapientum</i>	Unknown	+
9	<i>F. acuminatum</i>	UM141 (CBS131074)	<i>Sorghom halepens</i>	Head	+
10	<i>F. acuminatum</i>	UM193 (CBS131257)	<i>Lolium</i> sp.	Head	+
11	<i>F. solani</i>	UM615	<i>R. pseudoacacia</i>	Root	-
12	<i>F. subglutinans</i>	UM44 (CBS535.95)	<i>Lupinus</i> sp.	Unknown	-
13	<i>F. equiseti</i>	UM100 (CBS131777)	<i>T. aestivum</i>	Head	-
14	<i>F. graminearum</i>	UM57	<i>T. aestivum</i>	Head	-

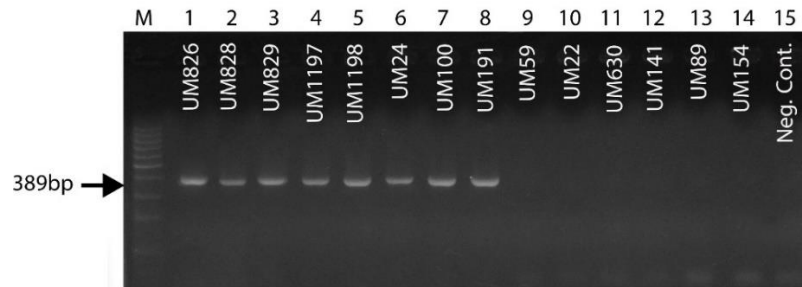


شکل ۳- تکثیر قطعه ۶۰۰ جفت بازی مربوط به گونه *F. acuminatum* با استفاده از آغازگرهای FAC-F و FAC-R

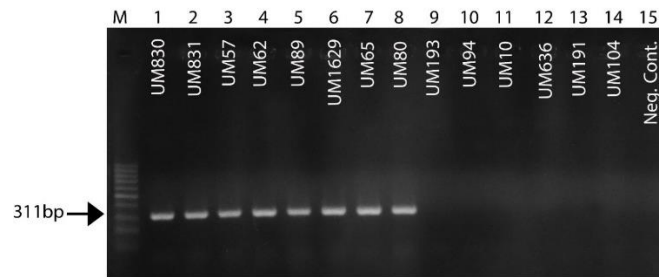
Fig 3. Amplification of 600 Base pair of the *F. acuminatum* using primers FAC-F and FAC-R

جدول ۵- واکنش جدایه‌های مورد بررسی *Fusarium* به آغازگرهای FER1 و FEF1Table 5. Reaction of *Fusarium* isolates to primers FER1 and FEF1

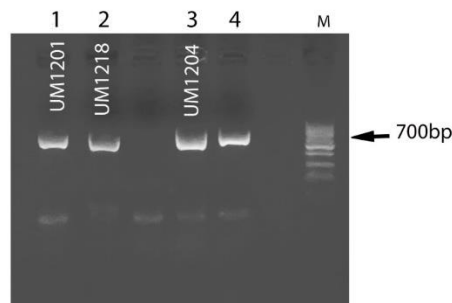
Number	Species	Isolate code	Host	Plant parts	Reaction to primer
1	<i>F. equiseti</i>	UM826	<i>Poa sp.</i>	Root	+
2	<i>F. equiseti</i>	UM828	<i>Poa sp.</i>	Unknown	+
3	<i>F. equiseti</i>	UM829	<i>Poa sp.</i>	Root	+
4	<i>F. equiseti</i>	UM1197	<i>F. excelsior</i>	Root	+
5	<i>F. equiseti</i>	UM1198	<i>F. excelsior</i>	Root	+
6	<i>F. equiseti</i>	UM24 (CBS535.95)	<i>Disphyma crassifolium</i>	Unknown	+
7	<i>F. equiseti</i>	UM100 (CBS131777)	<i>T. aestivum</i>	Head	+
8	<i>F. equiseti</i>	UM191 (CBS131255)	<i>Leucopoa sclerophylla</i>	Head	+
9	<i>F. oxysporum</i>	UM59 (FL1)	<i>Lens culinaris</i>	Unknown	-
10	<i>F. cerealis</i>	UM22 (CBS589.93)	<i>Iris hollandica</i>	Unknown	-
11	<i>F. solani</i>	UM630	<i>R. pseudoacacia</i>	Unknown	-
12	<i>F. acuminatum</i>	UM141 (CBS131074)	<i>S. halepensis</i>	Head	-
13	<i>F. graminearum</i>	UM89 (CBS131572)	<i>T. aestivum</i>	Head	-
14	<i>F. proliferatum</i>	UM154 (CBS131100)	<i>Paspalum paspaloides</i>	Head	-

شکل ۴- تکثیر قطعه ۳۸۹ جفت بازی مربوط به گونه *F. equiseti* با استفاده از آغازگرهای FER1 و FEF1Fig 4. Amplification of 389 Base pair of the *F. equiseti* using primers FER1 and FER1جدول ۶- واکنش جدایه‌های مورد بررسی *Fusarium* به آغازگرهای FgCTPSf024 و FgCTPSr306Table 6. Reaction of *Fusarium* isolates to primers FgCTPSf024 and FgCTPSr306

Number	Species	Isolate code	Host	Plant parts	Reaction to primer
1	<i>F. graminearum</i>	UM830	<i>Poa sp.</i>	Root	+
2	<i>F. graminearum</i>	UM831	<i>Poa sp.</i>	Leaf	+
3	<i>F. graminearum</i>	UM57	<i>T. aestivum</i>	Head	+
4	<i>F. graminearum</i>	UM62 (CBS130604)	<i>T. aestivum</i>	Head	+
5	<i>F. graminearum</i>	UM89 (CBS 131572)	<i>T. aestivum</i>	Head	+
6	<i>F. graminearum</i>	UM1629 (CBS131249)	<i>T. aestivum</i>	Head	+
7	<i>F. graminearum</i>	UM65 (CBS130952)	<i>T. aestivum</i>	Head	+
8	<i>F. graminearum</i>	UM80 (CBS130911)	<i>T. aestivum</i>	Head	+
9	<i>F. acuminatum</i>	UM193 (CBS131257)	<i>Lolium sp.</i>	Head	-
10	<i>F. proliferatum</i>	UM94 (CBS131574)	<i>T. aestivum</i>	Head	-
11	<i>F. oxysporum</i>	UM10 (CBS141.95)	<i>Hedera helix</i>	Unknown	-
12	<i>F. solani</i>	UM636	<i>R. pseudoacacia</i>	Unknown	-
13	<i>F. equiseti</i>	UM191	<i>T. aestivum</i>	Head	-
14	<i>F. incarnatum</i>	UM104	<i>T. aestivum</i>	Head	-



شکل ۵- تکثیر قطعه ۳۱۱ جفت بازی مربوط به گونه *F. graminearum* با استفاده از آغازگرهای FgCTPSf024 و FgCTPSr306
 Fig 5. Amplification of 311 Base pair of the *F. graminearum* using primers FgCTPSf024 and FgCTPSr306

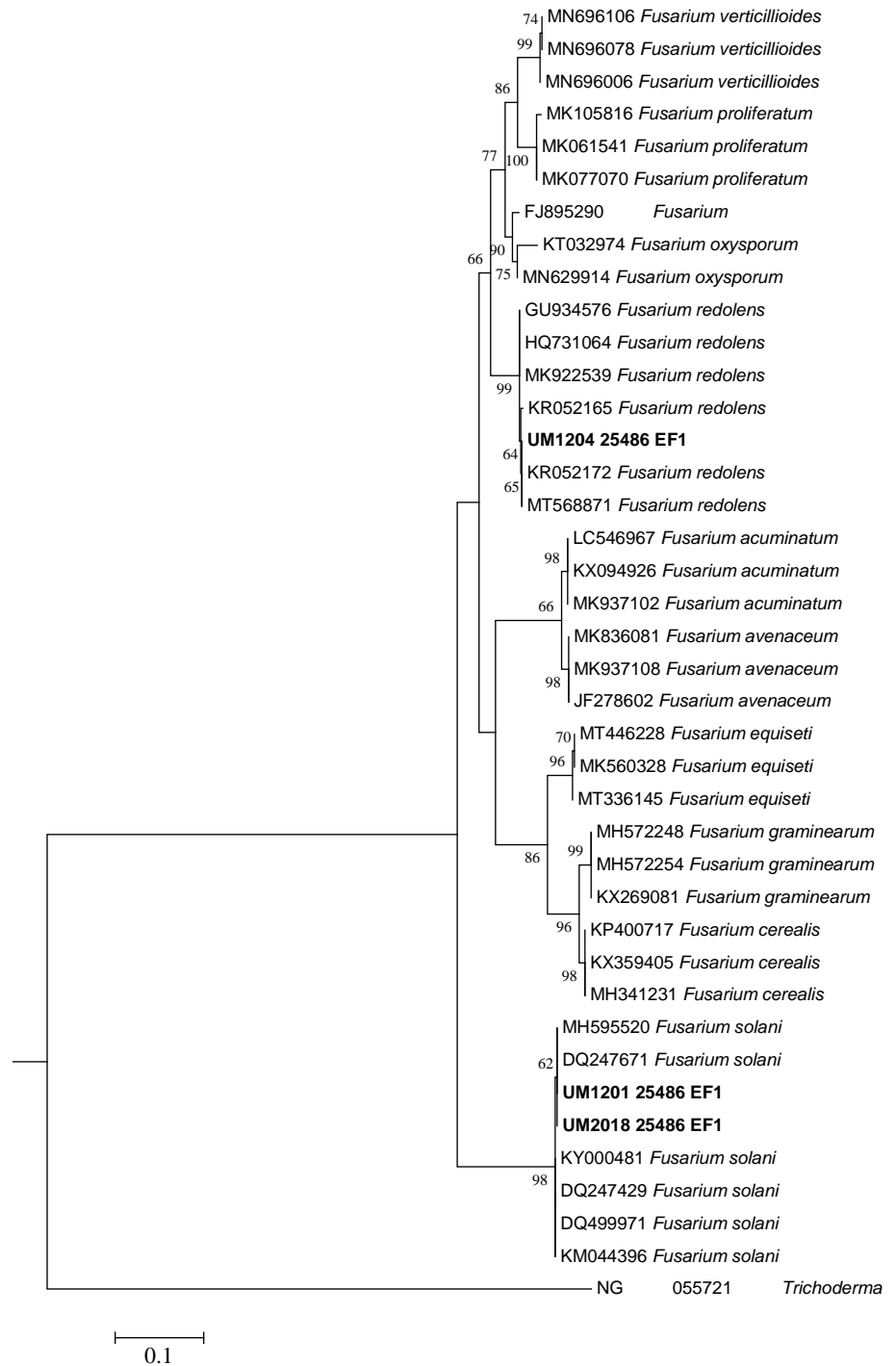


شکل ۶- تکثیر قطعه ۷۰۰ جفت بازی مربوط به آغازگرهای EF1F و EF2R
 Fig 6. Amplification of 700 Base pair of the primers EF1F and EF2R

است (Jahedi *et al.*, 2018). همچنین استفاده از آغازگرهای اختصاصی در تأیید مولکولی گونه‌های *F. proliferatum* و *F. verticillioides* جداسازی شده از ذرت در ایران نیز نتایج قابل قبولی را ارائه داده است (Rahjoo *et al.*, 2008). در پژوهشی دیگر در کانادا، شناسایی گونه‌های مختلف فوزاریوم که از گندم، جو، ذرت و چاودار جداسازی شده بودند، با آغازگرهای اختصاصی تأیید شد (Demeke *et al.*, 2005). دو گونه *F. solani* و *F. sambucinum* از غده‌های سیب‌زمینی که علائم پوسیدگی را نشان می‌دادند، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در لهستان شناسایی شدند (Lenc *et al.*, 2008). همچنین در پژوهشی، از چهار جفت‌آغازگر اختصاصی برای شناسایی گونه *F. oxysporum* f.sp. *lactuce* در ایتالیا استفاده شده است (Pasquali *et al.*, 2007). در استرالیا نیز به‌منظور مطالعه عوامل قارچی ایجادکننده پوسیدگی طوقه گندم از شش جفت‌آغازگر برای شناسایی شش گونه قارچی *F. crookwellens*، *F. acuminatum*، *F. culmorum*، *F. avenaceum* و *F. graminearum* استفاده کردند (Williams *et al.*, 2002).

همچنین نتایج توالی‌یابی با نتایج به دست آمده از تشخیص ریخت‌شناختی این جدایه‌های *Fusarium* مطابقت داشت. فایل رج‌بندی شده نهایی شامل ۴۰ آرایه از این جنس بود. در تبارنمای رسم شده، دو آرایه UM1201 و UM1218 که هر دو از میزبان زبان گنجشک انتخاب شده بود، در داخل کلاد مربوط به گونه *F. solani* با حمایت اعتبارسنجی ۹۸ درصد قرار گرفتند. همچنین آرایه UM1204 نیز که از میزبان زبان گنجشک انتخاب شده بود، در داخل کلاد مربوط به گونه *F. redolens* با حمایت اعتبارسنجی ۹۹ درصد قرار گرفت. در این تبارنما، گونه *Trichoderma harzianum* به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است (شکل ۷).

تاکنون تحقیقات متعددی برای تأیید گونه‌های مختلف قارچی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شده است. آغازگرهای اختصاصی گونه برای شناسایی مولکولی گونه‌های جنس *Fusarium* شامل *F. culmorum*، *F. avenaceum*، *F. proliferatum*، *F. redolens*، *F. subglutinans*، *crookwellens*، *F. solani* و *F. oxysporum* که از مزارع پیاز آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی جداسازی شده بودند، با موفقیت استفاده شده



شکل ۷- تبارنمای رسم شده برای جدایه‌های *Fusarium* بر اساس توالی بخشی از ناحیه *TEF-1α* به روش Maximum Likelihood با اعتبارسنجی (Bootstrap) ۱۰۰۰ تکرار. گونه *Trichoderma harzianum* به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است. در این تبارنما، جدایه‌هایی که با حالت تیره مشخص شده‌اند، مربوط به جدایه‌های شناسایی شده از درختان زبان گنجشک در این تحقیق هستند (مقیاس ۰/۱).

Fig 7. Phylogenetic tree constructed by Mega-7 based on partial *TEF-1α* sequences of *Fusarium* isolates with Maximum Likelihood method. *Trichoderma harzianum* was used as outgroup taxon. Highlighted taxa represent isolates of this study identified on ash trees (scale bar=0.1).

چین (Dongzhen et al., 2020) و نیز گزارش گونه *F. equiseti* از *F. torulosum*، *F. oxysporum*، *F. acutatum*، *F. redolens* برخی علف‌های هرز ایران (Nooralvandi et al., 2021) با تکیه بر داده‌های توالی ناحیه ژنی *TEF1- α* اشاره نمود.

تعداد قابل توجهی از گیاهان واقع در فضای سبز شهر اردبیل در چند سال گذشته، دچار بیماری شده‌اند که از آن جمله می‌توان به سرخشکیدگی و زوال برخی درختان مانند افاقیا، زبان‌گنجشک، صنوبر، افرا و زردی چمن اشاره کرد. با توجه به جداسازی و شناسایی گونه مبتنی بر ریخت‌شناختی برخی جدایه‌های فارچی متعلق به جنس *Fusarium* در تحقیقات قبلی و از آنجایی که این روش، علاوه بر زمان‌بر بودن، به‌تنهایی قادر به شناخت مطمئن در حد گونه نیست، در این پژوهش، ضمن راست‌آزمایی دوباره آغازگرهای اختصاصی گونه با جدایه‌های استاندارد که قبلاً با توالی‌یابی چند ژنی مورد شناسایی قطعی قرار گرفته بودند، جدایه‌های *Fusarium* به‌دست آمده از گیاهان فوق با استفاده از آغازگرهای اختصاصی شناسایی شدند. این تحقیق، اولین مطالعه در خصوص شناسایی گونه‌های *Fusarium* مرتبط با بیماری‌های فضای سبز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه در ایران و دنیا محسوب می‌شود. شناسایی دقیق گونه فارچ‌های همراه یا دخیل در بیماری‌های مهم فضای سبز می‌تواند در ادامه تحقیقات از جمله بررسی روش‌های پیشگیری و مدیریت این بیماری‌ها مفید واقع شود.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارایه شده به دانشگاه محقق اردبیلی است که بدینوسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه بابت تامین هزینه و امکانات لازم قدردانی می‌شود.

منابع

A Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215(3): 403-10.

در بررسی گونه‌های مولد پژمردگی خیار، پوسیدگی میوه گوجه‌فرنگی و پوسیدگی ذرت در مالزی، از ۵۰ جدایه *Fusarium*، ۲۹ جدایه مربوط به *F. proliferatum* و ۲۱ جدایه مربوط به *F. verticillioides* بود که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ProF1/ProR1 و VertF1/VertR1 شناسایی شدند (Najihah et al., 2017). در پژوهش دیگری معلوم شد که می‌توان با استفاده از تکنیک PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه به سادگی و بسیار سریع، گونه‌های *F. solani* و *oxysporum* را از هم تمایز داد (Gaviria-Rivera and Giraldo-Lopez, 2018). در تحقیقی برای تشخیص عوامل پوسیدگی ریشه سویا در ایالات متحده، از آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی ۱۱ گونه کمپلکس *F. solani* استفاده شد (Chitrampalam et al., 2018). همچنین در تحقیق حاضر، شناسایی دو گونه *F. solani* و *F. redolens* با توالی‌یابی بخشی از ناحیه *TEF-1 α* تأیید شد. این ناحیه ژنی، چند شکلی مناسبی را بین گونه‌های نزدیک به هم در جنس فوزاریوم حتی در مقایسه با ژن‌های کد کننده پروتئین مثل کالمودولین، بتاتوبولین و هیستون H3 نشان می‌دهد و کارآیی خوبی برای شناسایی گونه در این جنس فارچی دارد (Geiser et al., 2004; Davari et al., 2013a). در تحقیقی که با هدف شناسایی جدایه‌های فوزاریومی به دست آمده از سنبله گندمیان وحشی استان اردبیل با استفاده از داده‌های ریخت‌شناختی و توالی‌یابی *TEF-1 α* انجام شد، علاوه بر شناسایی گونه‌های متعلق به شش کمپلکس گونه‌ای فوزاریوم، سه گونه جدید شامل *F. brachygibbosum*، *F. torulosum* و *F. reticulatum var. negundis* برای اولین بار از ایران گزارش شد (Davari et al., 2013a). از مطالعات دیگر می‌توان به شناسایی گونه‌های *F. solani*، *F. equiseti*، *F. avenaceum*، *F. graminearum*، *F. commune* و *F. oxysporum* را از *F. proliferatum* به‌عنوان عوامل پژمردگی فوزاریومی گیاه YAM در

Barzegar Marvasti F, Banihashemi Z. 2011. Identification and pathogenicity of turfgrass-infecting fungi in Shiraz landscape, Iranian Journal of Plant Pathology, 47(4): 361-377. (In Farsi with English abstract).

- Chitrampalam P, Abraham N, Nelson BD. 2018.** A culture-independent PCR-based assay to detect the root rot pathogen *Fusarium solani* species complex 11 from soybean roots and soil. *Plant Disease*, 102(2): 327-333.
- Davari M, Babai-Ahari A, Arzanlou M, Zare R, Van Diepeningen AD, De Hoog GS. 2013a.** Morphological and molecular characterization of three new *Fusarium* species associated with inflorescence of wild grasses for Iran. *Rostaniha*, 14: 124-134. (In Farsi with English abstract).
- Davari M, Wei SH, Babai-Ahari A, Arzanlou M, Waalwijk C, Van-der-Lee TAJ, Zare R, Gerrits Van-den-Ende AHG, de-Hoog SG, Van-Diepeningen AD. 2013b.** Geographic differences in trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* in the Northwest and North of Iran. *World Mycotoxin Journal*, 6(2): 137-150.
- Davari M, Alihosseinzadeh-Moghaddam F, Narmani A. 2020.** Characterization of fungal agents associated with black locust dieback and decline in Ardabil city. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, 9(3): 47-57. (In Farsi with English abstract).
- Demeke Tigst, Randy MC, Patrick SK, Gaba D. 2005.** Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 103: 271-284.
- Dongzhen F, Xilin L, Xiaorong C, Wenwu Y, Yunlu H, Yi C, Jia C, Zhimin L, Litao G, Tuhong W, Xu J, Chunsheng G. 2020.** *Fusarium* species and *Fusarium oxysporum* species complex genotypes associated with Yam wilt in south-central China. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1-17.
- Ezrari S, Lahlali R, Radouane N, Tahiri A, Asfers A, Boughalleb-M'Hamdi N, Lazraq A. 2021.** Characterization of *Fusarium* species causing dry root rot disease of citrus trees in Morocco. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(2): 431-447.
- Gardner D E. 1980.** *Acacia Koa* seedling wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *koa* nov. *Phytopathology*, 70: 594-597.
- Gaviria-Rivera A, Giraldo-López A, Santa-Cardona C, Cano-Restrepo L. 2018.** Molecular identification of clinical isolates of *Fusarium* in Colombi. *Revista de Salud Pública*, 20(1): 94-102.
- Geiser DM, Jimenez-Gasco MDM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K. 2004.** A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473-479.
- Golmohamadi H, Arzanlou M, Rabani Nasab HA. 2020.** Identification and pathogenicity of *Cytospora* isolates associated with canker and dieback disease on pomegranate, in East Azarbaijan and Golestan Provinces. *Journal of Applied Research in Plant protection*, 10(1): 97-103. (In Farsi with English abstract).
- Halasz G. 2002.** Canker and wilt of black locust (*Robinia pseudoacacia*) caused by *Fusarium* species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 49(2-3): 249-260
- He D, Hao J, Zhang B, Yang Y, Song W, Zhang Y, Yokoyama K, Li W. 2011.** Pathogenic spectrum of fungal Kkeratitis and specific identification of *Fusarium solani*. *Immunology and Microbiology*, 52(5): 2804-2808.
- Imani B, Firoozi Majandeh E, Kanooni R. 2017.** Spatial distribution of green spaces and prioritization of land suitability for optimal site selection of park (case study: Ardebil city). *Environmental Based Territorial Planning (Amayesh)*, 10 (37): 65-97. (In Farsi with English abstract).
- Ivanova H, Malinicova L, Piknova M, Pristas P. 2020.** New Endophytic *Fusarium* spp. from *Fraxinus excelsior* Leaves in Slovakia. *Planta Medica*, 86: 1-7.
- Jahedi A, Mohammadi Goltapeh E, Safaie N. 2018.** The first report of *Fusarium culmorum* and *Fusarium subglutinans* in onion from West and East Azarbaijan provinces. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 49 (1): 1-9. (In Farsi with English abstract).
- James, Robert L.; Dumroese, R. Kasten. 2007.** Potential for using *Fusarium* to control Fusarium disease in forest nurseries.
- James RL, Dumroese RK. 2007.** Potential for using Fusarium to control Fusarium disease in forest nurseries. In: Riley LE, Dumroese RK, Landis TD. *National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations - 2006. Proceedings RMRS-P-50.* Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. p. 54-60.
- Kabisch N, Qureshi S, Haase D. 2015.** Human-environment interactions in urban green spaces-A systematic review of contemporary issues and prospects for future research. *Environmental Impact Assessment Review*, 50: 25-34.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Kwak MJ, Lee JK, Park S, Lim YJ, Kim H, Kim KN, Woo SY. 2020.** Evaluation of the importance of some East Asian tree species for refinement of air quality by estimating air pollution tolerance index, anticipated performance index, and air pollutant uptake. *Sustainability*, 12(7): 3067.
- Lenc L, Lukanowski A, Sadowski C. 2008.** The use of PCR amplification in determining the toxigenic potential of *Fusarium sambucinum* and *F. solani* isolated from potato tubers with symptoms of dry rot. *Phytopathology*, 48: 13-23.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006.** The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Asia, 399 pp.
- Mirabolfathy M, Ershad J. 2002.** Turfgrass fungal diseases in Iran. *Proceedings of 15th Iranian Plant Protection Congress*, Iran, Kermanshah, University of Razi, 65.
- Mishra PK, Fox RTV, Culham A. 2003.** Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiology Letters*, 218: 329-332.
- Moller EM, Bahnweg G, Sanderman H, Geiger HH. 1992.** A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20: 6115-6116.
- Mule G, Susca A, Stea G, Moretti A. 2004.** Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F.*

- oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. FEMS Microbiology Letters, 230: 235-240.
- Najihah A, Nurain MZ, Yong SYC, Nik MN. 2017.** Characterization of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides* based on species-specific gene and microsatellites analysis. Sains Malaysiana, 46(12): 2425–2432.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. 1983.** *Fusarium* species, An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 pp.
- Nooralvandi F, Alizadeh H, Saremi H, Salehi Jozani Gh. 2021.** Morphological and Molecular Identification of *Fusarium* spp. As Root Endophytes of Spontaneous Barley (*Hordeum spontaneum*) and Turnipweed (*Rapistrum rugosum*). Journal of Plant Protection, 35(1): 1-10. (In Farsi with English abstract).
- Orlović JK, Moro M, Diminić D. 2020.** Role of root and stem base fungi in *Fraxinus angustifolia* (Vahl) dieback in Croatian Floodplain Forests. Forests, (11): 607.
- Pasquali M, Dematheis F, Gullino ML, Garibaldi A. 2007.** Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. Phytopathology, 97(8): 987-996.
- Rahjoo V, Zad J, Javan-Nikkhah M, Mirzadi-Gohari A, Okhovvat SM, Bihamta MR, Razzaghian J, Klemsdal SS. 2008.** Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in IRAN. Journal of Plant Pathology, 90(3): 463-468.
- Samiee M, Davari M. 2021.** Important diseases of turf in Iran. Plant Pathology Science, 9(2): 119-128. (In Farsi with English abstract).
- Williams KJ, Dennis JI, Smyl C, Wallwork H. 2002.** The application of species-specific assays based on the polymerase chain reaction to analyse *Fusarium* crown rot of durum wheat. Australasian Plant Pathology, 31: 119–127.
- Yang L, Lee T, Yang X, Yu D, Waalwijk C. 2008.** *Fusarium* populations on Chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles. Phytopathology, 98(6): 719-727.