



مقاله پژوهشی

شناسایی و بیماری‌زایی گونه‌های *Fusarium* عامل پوسیدگی ریشه لوبیا با تاکید بر مطالعه فیلوژنتیکی و دامنه میزبانی گونه مرکب *Fusarium solani* در استان مرکزی*اسماعیل راه‌خدایی^{۱*}، حبیب‌اله حمزه‌زرقانی^۲، ضیال‌الدین بنی‌هاشمی^۳، رضا مستوفی‌زاده قلم‌فرسا^۳ ورضا فرخی‌نژاد^۴

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۵)

چکیده

پوسیدگی‌های فوزاریومی ریشه از بیماری‌های مهم لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) هستند. به منظور شناسایی فوزاریوم‌های عامل پوسیدگی ریشه لوبیا در استان مرکزی، در تابستان سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ از مزارع لوبیا بازدید و از بوته‌های آلوده به پوسیدگی ریشه، نمونه‌برداری شد و در آزمایشگاه جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها انجام گرفت. براساس خصوصیات ریخت‌شناختی و توالی‌یابی دو ناحیه ژنی فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی دی‌ان‌ای ریپوزومی (ITS) و عامل امتداد ترجمه‌ی یک آلفا (*EF-1α*)، ۳۷ جدایه فوزاریوم، شامل گونه‌های مرکب *Fusarium oxysporum*، *F. solani* و *F. lateritium* و همچنین گونه‌های *F. equiseti*، *F. acuminatum*، *F. redolens* و شناسایی شدند. همه‌ی جدایه‌ها پس از مایه‌زنی روی لوبیای رقم صدری، پوسیدگی ریشه ایجاد کردند. از آن‌جا که جدایه‌های *F. solani* بیشترین فراوانی را داشتند، ۱۲ جدایه از این گروه انتخاب و روابط فیلوژنتیکی آنها مطالعه شد. از سه تبار گونه‌ی مرکب *F. solani*، جدایه‌ها در تبار شماره دو و سه قرار گرفتند. تنها یک جدایه در تبار دو قرار گرفت که خصوصیات آن با مشخصات گونه *F. brasiliense* مطابقت داشت. سایر جدایه‌ها در تبار سه و در دو زیرگروه قرار گرفتند. در آزمون بیماری‌زایی دامنه میزبانی جدایه‌های *F. solani*، هیچ کدام از جدایه‌ها روی عدس و لوبیا چشم بلبلی بیماری‌زا نبودند، اما تعدادی از جدایه‌ها موجب پوسیدگی ریشه نخود، سویا، ماش و پوسیدگی غده‌ی سیب‌زمینی شدند. گونه‌های *F. lateritium*، *F. redolens* و *F. brasiliense* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شوند.

کلیدواژه: حبوبات، ریخت‌شناسی، فیلوژنی، فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی ژن آرانی ریپوزومی و عامل امتداد ترجمه‌ی یک آلفا

* بخشی از پایان نامه دکتری نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Rahkhodaei@gmail.com

۱. عضو هیات علمی موسسه تحقیقات علوم باغبانی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران.
۲. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
۳. استاد بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
۴. استاد بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز.



Research Article

Identification and pathogenicity of *Fusarium* species causing bean root rot with emphasize on phylogenetic study and host range of *Fusarium solani* species complex in Markazi province*

E. Rahkhodaei^{1**}, H. Hamzeh Zarghani², Z. Banihashemi³, R. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa³, and R. Farrokhinejad⁴

(Received: 18.12.2021; Accepted: 25.1.2021)

Abstract

Fusarium root rot is one of the most important diseases of beans (*Phaseolus vulgaris*). In order to identify Fusaria that cause bean root rot in Markazi Province (Iran), in the summer of 2018 and 2019, several bean fields were visited and infected plants with root rot were sampled and the fungi were isolated in the laboratory. Based on morphological and sequencing characteristics of internal transcribed spacers of rDNA (ITS) and translation elongation factor 1- α (*EF-1 α*) gene regions, 37 *Fusarium* isolates, including *Fusarium oxysporum* species complex, *F. solani* species complex, and *F. lateritium* species complex, as well as *F. equiseti*, *F. acuminatum* and *F. redolens* were identified. All isolates caused root rot on Sadry bean cultivar. Since *F. solani* isolates were the most common, twelve isolates of this group were selected and their phylogenetic relationships were studied. Of the three Clades of *F. solani* species complex, the isolates were placed in Clade 2 and 3. Only one isolate was found in Clade 2 whose properties matched those of *F. brasiliense*. The other isolates were classified in Clade 3 divided into two subgroups. In host range tests of *F. solani* isolates, none of the isolates was pathogenic on lentils and cowpea. A number of isolates caused root rot in chickpeas, soybeans, Mung bean and potato tubers. *F. lateritium*, *F. redolens* and *F. brasiliense* are reported for the first time from Iran.

Keywords: Beans, Morphology, Phylogeny, Internal transcribed spacers of rDNA (ITS) and Translation elongation factor 1- α (*EF-1 α*)

* A Part of PhD Thesis of the First Author.

** Corresponding author's E-mail: Rakhodaei@gmail.com

1. Faculty member of Horticultural Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
2. Associate Prof., of Plant Pathology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
3. Prof., of Plant Pathology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
4. Prof., of Plant Pathology, School of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

مقدمه

F. semitectum Berk. & *sambucinum* Fuckel
با همراه *F. crookwellense* و *F. oxysporum*, Ravenel
پوسیدگی ریشه لوبیا گزارش شده است (Safarloo &
Hemmati 2014).

قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* (Burk) Snyder &
Hans یکی از عوامل محدود کننده کشت لوبیا در جهان
است (Knodel et al. 2007). در دنیا کاهش عملکرد
محصول در اثر وقوع این بیماری بین ۶ تا ۵۳ درصد
برآورد می‌شود (Burke & Hall 1991). در ایران بیماری
اولین بار از روی لوبیا در سال ۱۳۴۷ گزارش شد و تاکنون
نیز از استان‌های لرستان، مرکزی، فارس، چهارمحال و
بختیاری، زنجان، اصفهان و آذربایجان شرقی گزارش شده
است (رک 2008 Naseri). در استان زنجان این قارچ به
طور متوسط با فراوانی ۵۴/۲ تا ۸۶ درصد به ترتیب در
سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ از مزارع لوبیا جداسازی شده
است (Naseri 2008).

قارچ *F. solani* گونه‌ی مرکبی است که در گذشته
براساس دامنه‌ی میزبانی به فرم‌های مخصوصی تقسیم‌بندی
شده است (Booth 1971). ادونل در سال ۲۰۰۰
(O'Donnell 2000) بیان کرد گونه مرکب *F. solani*
(FSSC) species complex در سه تبار اصلی یک، دو و
سه قرار می‌گیرند. لومبارد و همکاران (Lombard et al.
2015) در سال ۲۰۱۵، گونه‌های FSSC را از جنس
Fusarium جدا کرده و این گونه‌ها را به جنس
Neocosmospora محدود کردند که عده‌ای از قارچ‌شناسان
با آن موافق بودند (Sandoval-Denis et al. 2019; Crous
et al. 2021). گایزر و همکاران (Geiser et al. 2021) در
سپتامبر سال ۲۰۲۱ با حمایت دیگر قارچ‌شناسان و
فوزاریوم‌شناسان و به کمک فیلوژنی مولکولی مجدداً جنس
Neocosmospora را به *Fusarium* تغییر داد.

حبوبات (Beans) در تمام نقاط دنیا کشت می‌شود.
بیشترین سهم تولید حبوبات مربوط به آسیاست و پس از
آن آفریقا، آمریکای شمالی و آمریکای لاتین قرار دارد. لوبیا
(*Phaseolus vulgaris* L.) تقریباً ۳۷/۵ درصد از تولید
جهانی حبوبات را به خود اختصاص داده است (Josh and
Rao 2017). در ایران سطح زیر کشت لوبیا در حدود ۴۰
درصد از کل تولید حبوبات بوده و تقریباً ۱۰۶ هزار هکتار
است. استان مرکزی پس از استان لرستان دومین استان و از
مهمترین استان‌های تولید کننده لوبیا در ایران است
(Ahmadi et al. 2020).

پوسیدگی قارچی ریشه از مهم‌ترین بیماری‌های
لوبیاست. قارچ‌های *Rhizoctonia solani* J.G. Kühni
Macrophomina phaseolina *Pythium ultimum* Trow
F. oxysporum Schldl. (Tassi) Goid و *F. solani* (Mart.) Sacc.
خاک‌برد لوبیا هستند. گونه‌های دیگر *Fusarium*
همچون *F. acuminatum* Ellis & Everh. *F. avenaceum*
anthophilum (A. Braun) Wollenw. *F. culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc. (Fr.) Sacc.
F. proliferatum (Corda) *aequiseti* (Corda) Sacc.
F. crookwellense و *F. redolens* Wollenw. Sacc.
L.W. Burgess, P.E. Nelson & Toussoun نیز به عنوان
عوامل پوسیدگی ریشه لوبیا گزارش شده‌اند (Montiel-
González et al. 2005). در نبراسکا و داکوتای شمالی
ایالات متحد آمریکا مطالعات نشان داده است که کاهش
عملکرد ناشی از گونه‌های *Fusarium* تا ۸۰ درصد است
(Knodel et al. 2011; Gossen et al. 2016). از استان
زنجان گونه‌های *F. acuminatum*، *F. solani* و *F.*

کم‌رشدی و پوسیدگی ریشه و طوقه داشتند، نمونه‌هایی برداشته شد و در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شد. در هنگام نمونه‌برداری مشخصات کامل نمونه شامل محل جمع‌آوری و تاریخ ثبت گردید.

در آزمایشگاه، ریشه و طوقه‌ی نمونه‌ها به دقت با آب معمولی شسته شد و سپس از حد فاصل بافت سالم و قسمت‌های تغییر رنگ یافته‌ی ریشه و طوقه، قطعاتی به اندازه‌ی ۵-۱۰ میلی‌متر جداسازی و با مایع سفیدکننده حاوی نیم درصد ماده‌ی مؤثر هیپوکلریت سدیم گندزدایی شد. سپس نمونه‌ها در تشتک پتری حاوی محیط‌کشت عمومی سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) و محیط- کشت نش و اسنایدر (Nash and Snyder) با اندکی تغییرات، حاوی آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین بجای استرپتومایسین کشت شده و تشتک‌های پتری در 24 ± 1 درجه‌ی سلسیوس و در دوره‌ی متناوب ۱۲ ساعت تاریکی- روشنایی به مدت هفت روز در اتاقک رشد نگهداری شدند (Nash & Snyder, 1962). پس از ظهور پرگنه‌ی قارچ، جدایه‌ها فوراً به محیط کشت ضعیف SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) (Leslie & Summerell, 2006) منتقل و به تدریج خالص‌سازی جدایه‌ها، با روش تک اسپور کردن یا نوک ریشه، روی محیط‌کشت آب آگار دو درصد انجام شد.

برای شناسایی قارچ‌ها با کمک خصوصیات ریخت- شناختی، از کلیدها و منابع معتبر شناسایی گونه‌های *Fusarium* استفاده گردید (Booth 1971 Nelson et al. 1983; Aoki et al. 2003; Aoki et al. 2005; Leslie and Summerell 2006).

آزمون‌های بیماری‌زایی

زادمایه‌ی قارچ مطابق روش بیلجی و همکاران (Bilgi

برخی از گونه‌های FSSC در تبار دو بیمارگرهای مهم گیاهی هستند که باعث مرگ ناگهانی سویا (Soybean Sudden Death Syndrome) و پوسیدگی ریشه لوبیا می‌شوند (Chitrampalam & Nelson Aoki et al. 2014). تمایز ویژگی‌های ریخت‌شناختی ماکرو و میکروسکوپی گونه‌های این گروه بسیار چالش برانگیز است، زیرا همه آن‌ها رنگدانه‌های مشابه تولید می‌کنند و طول و عرض کنیدیوم‌های آن‌ها باهم همپوشانی دارد. از بین گونه‌های موجود در این گروه، *F. phaseoli*، *F. virguliforme* T. (Burkh.) T. Aoki and O'Donnell، *F. brasiliense* T. Aoki and O'Donnell، *F. cuneirostrum* T. Aoki and O'Donnell و *F. tucumaniae* T. Aoki et al. (Roth et al. 2020).

با توجه به مشاهده علایم بیماری در لوبیاکاری‌های استان مرکزی و نبود اطلاعات کافی در زمینه گونه‌های *Fusarium* عامل پوسیدگی ریشه لوبیا، این پژوهش به منظور شناسایی گونه‌های *Fusarium* همراه با پوسیدگی ریشه لوبیا در استان مرکزی بر اساس خصوصیات ریخت- شناختی و مولکولی و بررسی دامنه‌ی میزبانی و روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های منتخب گونه‌ی مرکب *F. solani* انجام گرفت.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی گونه‌های *Fusarium*

در تابستان سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸، نمونه‌برداری از مزارع لوبیا و از مناطق مختلف استان مرکزی انجام شد (جدول ۱). در مزارع از بوته‌های آلوده که علایم زردی،

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های به دست آمده از پوسیدگی فوزاریومی ریشه‌ی لوبیا در استان مرکزی و شدت بیماری‌زایی آن‌ها روی لوبیا

Table 1. Characteristics of isolates obtained from Fusarium root rot of beans in Markazi province and their pathogenicity on beans

Species	Isolate code	Disease severity (%)**	Year of Isolation	Location
<i>Fusarium solani</i> species complex				
	RB3	76.16 a	2019	Mishijan
	RB18	79.37 a	2019	Khomein
	RB19	68.25 a-e	2019	Khomein
	RB24	74.60 ab	2019	5 km of Khomein to Arak road
	RB31	80.95 a	2019	10 km of Khomein to Arak road
	RB35	73.02 abc	2019	10 km of Khomein to Arak road
	RB37	74.60 ab	2019	10 km of Khomein to Arak road
	RB39	50.79 ef	2019	10 km of Khomein to Arak road
	RB51	53.38 def	2019	Ghurchi Bashi
	RB55	76.19 a	2019	Ghurchi Bashi
	RB83	71.43 a-d	2019	3 km of Ghurchi Bashi to Khomein road
	RB94	46.03 f	2019	Feyz Abad (Ghurchi Bashi)
	RKA175	61.09 a-f	2018	Ali Abad (Khomein to Aligoodarz road)
	RKF156	71.43 a-d	2018	Farah Abad (Khomein to Aligudrz roud)
	RKG168	55.56 b-f	2018	24 km of Khomein to Aligudarz road
	RKR216	66.67 a-e	2018	Reihane Bala (Khomein)
	RSB60	73.02 abc	2018	Tahran (Shazand)
<i>F. oxysporum</i> species complex				
	RB8	55.56 b-f	2019	Mishijan
	RB10	50.79 ef	2019	Mishijan
	RB68	79.37 a	2019	Ghurchi Bashi
	RB73	53.97 c-f	2019	2 km of Ghurchi Bashi to Khomein road
	RB88	73.02 abc	2019	3 km of Ghurchi Bashi to Khomein road
<i>F. oxysporum</i> species complex (cont.)				
	RKG165	55.56 b-f	2018	24 km of Khomein to Aligudarz road
	RKN199	82.54 a	2018	Nasr Abad (Khomein to Aligudrz roud)
	RKR212	66.67 a-e	2018	Reihane Bala (Khomein)
	RSL50	63.49 a-f	2018	Alborz (Shazand)
	RSM11	76.19 a	2018	Bahman (Shazand)
	RSJ20	74.60 ab	2018	10 km of Shazand to Arak road
<i>F. lateritium</i> species complex				
	RB11	79.37 a	2019	Khomein
	RB112	80.95 a	2019	Feyz Abad (Ghurchi Bashi)
	RKA205	77.78 a	2018	35 km of Khomein to Aligudarz road
	RSL59	68.25 a-e	2018	Alborz (Shazand)
<i>F. equiseti</i>				
	RB5	69.84 a-e	2019	Mishijan
	RSL53	71.43 a-d	2018	Alborz (Shazand)
	RKG183	55.56 b-f	2018	Qaleh Ashena (Khomein to Aligudarz road)
<i>F. acuminatum</i>				
	RKR213	53.97 c-f	2018	Reihane Bala (Khomein)
	RB53	68.25 a-e	2019	Ghurchi Bashi
	<i>F. redolens</i>			
	RB50	44.44 f	2019	Ghurchi Bashi
Control		14.29 g		

مربع‌کای = ۱۸۸/۹، سطح معنی‌داری با احتمال ۱ درصد ** ($P < 0.01$) در مقایسه با شاهد

Chi-squer= 188.9, Significant level with a probability of 1% ($P < 0.01$) ** compared to the control

(et al. 2008) با اندکي تغيير (بجاي ماسه از ورمي‌کوليت استفاده شد) تهيه گرديد. براي آزمون‌هاي بيماري‌زايي از ليوان پلاستيکي با حجم ۴۰۰ ميلي‌ليتر به عنوان گلدان استفاده شد. دو سوم حجم پاييني گلدان، مخلوط خاک بکر و ماسه سترون ريخته شد و يک سوم لايه‌ي رويي از مايه قارچ مخلوط شده با ورمي‌کوليت به نسبت يک به نه پر شد. به گلدان شاهد، ورمي‌کوليت و آرد فاقد مايه‌ي قارچ اضافه شد. بذرهاي لوبيا با هيپوکولريت سدريم يک درصد به مدت سه دقيقه ضدعفوني سطحی شده و دو مرتبه با آب مقطر سترون شست‌وشو شد. در هر گلدان سه عدد بذر کشت شد و گلدان‌ها به مدت چهار هفته در گلخانه در دامنه حرارتي ۲۰ تا ۳۰ درجه سلسيوس نگه‌داري شدند. گلدان‌ها با دور سه روزه آبياري مي‌شدند و هر هفته يکبار با کود NPK (۲۰-۲۰-۲۰) (پيگما، شرکت پيروميسول، اسپانيا) به ميزان دو در هزار تغذيه و يک نوبت نيز در اواخر هفته‌ي دوم با عناصر کم‌مصرف (میکروفول کمبي، شرکت بيول کيم، ايتاليا) محلول‌پاشي شدند.

آزمون‌هاي اوليه‌ي بيماري‌زايي جدايه‌هاي *Fusarium* روی لوبيا چيتي رقم صدري انجام شد. براي بررسي بيماري‌زايي جدايه‌ها آمايش در قالب طرح کاملاً تصادفي با سه گلدان و نه بوته براي هر جدايه اجرا شد. پس از چهار هفته، بوته‌ها به دقت از گلدان‌ها خارج و ريشه و طوقه‌ي آن‌ها با آب شسته شد. براي بررسي ميزان پوسيدگي ريشه از شاخص‌هاي توصيفي/شناسايي و همکاران (Schneider et al. 2001) استفاده شد. از نمره-دهي يک تا هفت براي توصيف وضعيت ريشه و هيپوکوتيل استفاده گرديد. نمره‌ي يک= ريشه و هيپوکوتيل سالم بدون تغيير رنگ، نمره‌ي دو= وجود لکه‌هاي کوچک قرمز رنگ به طول يک تا دو ميلي‌متر روی هيپوکوتيل و ريشه، نمره‌ي سه= زخم‌هاي قرمز رنگ به طول پنج تا ۱۰

ميلي‌متر دور هيپوکوتيل و يا ۱۰ تا ۲۰ درصد تغيير رنگ ريشه‌ها، نمره‌ي چهار= افزايش زخم‌هاي روی هيپوکوتيل، کاهش ده درصدی توده ريشه و تغيير رنگ ۹۵ درصدی ريشه‌ها، نمره‌ي پنج= کاهش ۳۰ تا ۵۰ درصدی توده‌ي ريشه و تغيير رنگ ۱۰۰ درصدی ريشه‌ها، افزايش زخم-هاي روی هيپوکوتيل، نمره‌ي شش= زخم‌ها به طول دو سانتی‌متر دور تا دور هيپوکوتيل و کاهش ۵۰ تا ۸۰ درصدی توده‌ي ريشه، نمره‌ي هفت= هيپوکوتيل بشدت فرورفته و توده‌ي ريشه ۸۰ تا ۱۰۰ درصد کاهش يافته - است. از ۵۰ درصد ريشه‌ها نمونه‌گيري شد و براي تأييد بيماري‌زايي گونه‌ي *Fusarium* جداسازي شده از ريشه، اصول کخ انجام شد. با توجه به نوع داده‌هاي ناپارامتری، واکاوي آماری داده‌هاي آزمون‌هاي بيماري‌زايي، با روش آزمون کرسکال-واليس انجام شد.

شدت بيماري‌زايي هر جدايه از فرمول $DS = \{(a \times 1) + (b \times 2) + (c \times 3) + (d \times 4) + (e \times 5) + (f \times 6) + (g \times 7)\} / (i \times 7) \times 100$ محاسبه شد. در اين فرمول a تا g، تعداد نمونه در هر شاخص توصيفي، يک تا هفت، اعداد شاخص توصيفي و i، تعداد کل تکرارها است (Li et al. 2014).

آزمون‌هاي بيماري‌زايي جدايه‌هاي FSSC روی ساير حبوبات

اين آمايش روی ۱۲ جدايه منتخب FSSC انجام شد. آزمون‌هاي بيماري‌زايي جدايه‌ها روی نخود رقم هاشم، لوبيا چشم بلبلي رقم کامران، سويا رقم صبا، ماش رقم گوهر و عدس يک رقم محلي مانند آنچه روی لوبيا چيتي رقم صدري انجام شده بود انجام گرفت.

آزمون بيماري‌زايي جدايه‌هاي منتخب FSSC روی غده-هاي سيب‌زميني

براي هر جدايه چهار عدد غده‌ي سيب‌زميني رقم بامبو

فزون‌سازی و توالی‌یابی DNA

برای تکثیر قسمتی از ناحیه‌ی ژنی فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی ژن آرانی‌ی ریپوزومی (ITS) و عامل امتداد ترجمه‌ی یک آلفا ($EF-1\alpha$)، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به ترتیب از جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 (O'Donnell et al. 2000; White et al. 1990) و EF- (Carbone and Kohn, 1999) 728/EF-986 استفاده شد. نام و مترادف نوکلئوتیدی آغازگرها، دمای اتصال و اندازه‌ی قطعه‌ی مورد انتظار در جدول ۲ آمده است. قطعات تکثیرشده در PCR به صورت رفت و برگشت توسط بخش کاردیورژنتیک بیمارستان قلب شهید رجایی (تهران، ایران) توالی‌یابی شد.

شناسایی مولکولی گونه‌های قارچ عامل بیماری

توالی‌های براینده از دوتوالی رفت و برگشت با استفاده از نرم‌افزار بیوآدیت (BioEdit 7.1) ویرایش شدند. توالی‌های به‌دست آمده در مجموعه‌ی داده‌های NCBI (GenBank, NCBI, USA; [Online]) ثبت شد. جستجوی بلاست (BLAST) با استفاده از توالی‌های ویرایش شده‌ی ITS و $EF-1\alpha$ در مجموعه داده‌های بانک ژن در پایگاه NCBI، برای بررسی بیشترین شباهت با ویژگی‌های ریخت‌شناختی برای کمک در تشخیص و تأیید گونه‌های *Fusarium* انجام شد.

واکاوی‌های فیلوژنتیکی

به منظور یافتن جایگاه و روابط فیلوژنتیکی گونه‌های شناسایی شده با یکدیگر و با سایر جدایه‌های بانک ژن، درخت فیلوژنتیکی جدایه‌ها براساس آخرین تغییرات در نام‌گذاری گونه‌های جنس *Fusarium* در مقاله گایزر و

در نظر گرفته شد. غده‌ها ابتدا با آب شست‌وشو و تمیز شدند. پس از خشک شدن، غده‌ها در محلول هیپوکلریت-سدیم یک درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی و پس از دوبار شست‌وشو با آب مقطر سترون، خشک شدند. به کمک چوب‌پنبه سوراخ کن، سوراخی به قطر و عمق ۱۰ میلی‌متر در غده ایجاد و محل سوراخ با بلوک محیط‌کشت SNA حاوی کشت هفت روزه قارچ به قطر ۱۰ میلی‌متر مایه زنی شدند. در غده‌های شاهد مایه زنی فقط با محیط کشت SNA انجام شد. محل مایه زنی با پارافیلیم و چسب پوشانده شده و غده‌ها در پاکت‌های کاغذی به مدت سه هفته در دمای 24 ± 1 درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. پس از آن، غده‌ها برش خورده و میزان پوسیدگی غده‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد (Du et al. 2012).

شناسایی مولکولی و واکاوی فیلوژنتیکی جدایه‌ها

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از میسلیم تازه جدایه‌های انتخاب شده، سه بلوک از حاشیه‌ی کشت یک هفته‌ای قارچ را به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری با ۵۰ میلی‌لیتر از عصاره سیب‌زمینی - دکستروز منتقل کرده و به مدت یک هفته در دمای 24 ± 1 درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. فلاسک‌ها در روز چند بار تکان داده شدند. پس از آن، میسلیم قارچ از ظرف خارج و در آب مقطر سترون شسته شدند (Arif et al. 2015). مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از میسلیم قارچ به ریزلوله‌های یک و نیم میلی‌لیتری منتقل شد و استخراج DNA براساس روش دوویل و دوویل (Doyle and Doyle 1987) انجام شد.

جدول ۳. جدایه‌های توالی‌یابی شده در این مطالعه و رس شمار
 اخذ شده آنها از بانک ژن

Table 3. Isolates used in this study and their accession number in the GenBank database

Isolate	Species	GenBank/Accession number	
		ITS	<i>EF1-a</i>
RB5	<i>F. equiseti</i>	OL348234	OL419251
RKR212	<i>F. oxysporum</i>	OL348239	OL419256
RB50	<i>F. redolens</i>	OL348237	OL419254
RB53	<i>F. acuminatum</i>	OL348238	OL419255
RB11	<i>F. lateritium</i>	OL348235	OL419252
RB31	<i>F. brasiliense</i>	OL348236	OL419253
RB94	<i>F. solani</i>	OL348246	OL419242
RB35	<i>F. solani</i>	OL348241	OL419240
RKF156	<i>F. solani</i>	OL348248	OL419243
RKG168	<i>F. solani</i>	OL348249	OL419244
RB51	<i>F. solani</i>	OL348244	OL419250
RB55	<i>F. solani</i>	OL348245	OL419241
RB18	<i>F. solani</i>	OL348240	OL419245
RB37	<i>F. solani</i>	OL348242	OL419246
RB39	<i>F. solani</i>	OL348243	OL419249
RKA175	<i>F. solani</i>	OL348247	OL419247
RSB60	<i>F. solani</i>	OL348250	OL419248

همکاران (Geiser *et al.* 2021) با استفاده از نرم‌افزار
 MEGA 7.0 ترسیم شد (Chitrapalam and Nelson 2016).
 بدین منظور ابتدا توالی‌های جدایه‌های نماینده
 (جدول ۳) و جدایه‌های بانک ژن (جدول ۴) با ابزار
 ClustalW هم‌ردیف‌سازی شدند. درخت فیلوژنتیکی با
 ترکیب توالی‌های ITS با *EF-1α* (۶۹۰ نوکلئوتید)، به
 روش الگوریتم بیشینه‌ی درست‌نمایی (Maximum
 Likelihood) و بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد. برای
 ریشه دار کردن درخت، از یک سویه‌ی گونه‌ی *Alternaria*
solani (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout به
 عنوان آرایه گروه خارجی استفاده شد. جدول ماتریس
 تشابه برای مقایسه‌ی میزان شباهت نوکلئوتیدی بین
 جدایه‌ها با کمک نرم‌افزار MegAlign ترسیم شد (داده‌ها
 آورده نشده است).

Table 2. Primers used in this study

Primer name	Sequence 5'→3'	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	Target gene	Reference
ITS1	TCCGTAAGGTGAACCTGCGG	55	~590	Internal transcribed spacer region of rDNA (ITS)	O'Donnell <i>et al.</i> 2000; White <i>et al.</i> 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC				
EF-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	58	~300	Translation elongation factor 1 α (EF-1 α)	Carbone and Kohn 1999
EF-986R	TACTTGAAGGAACCCCTTACC				

جدول ۳. فهرست آغازگرهای به کار رفته در این مطالعه

جدول ۴. گونه‌های *Fusarium* و رس‌شمار بانک ژن آن‌ها مربوط به سایر پژوهش‌ها که در این مطالعه استفاده شده‌اند.

Table 4. *Fusarium* species and GenBank accession numbers from other research projects included in this study

Species	Substrate	Country	GenBank/Accession number	
			ITS	<i>EF1-a</i>
<i>Alternaria solani</i>	Burdock	China	MH754542	MH754545
<i>F. acuminatum</i>	Muskmelon	China	MZ057828	MZ158147
<i>F. brasiliense</i>	Soybean	USA	EF408516	EF408411
<i>F. cucurbiticola</i>	Cucurbit	USA	DQ913801	DQ913771
<i>F. cuneirostrum</i>	Soybean	USA	EF408519	EF408414
<i>F. equiseti</i>	Chickpea	Canada	MK908819	MK922530
<i>F. falciforme</i>	Tomato	India	MW911785	MW910248
<i>F. lateritium</i>	Giant dogwood	Korea	KC453998	KC453997
<i>F. martii</i>	Potato	Germany	JX435206	JX435156
<i>F. mori</i>	Mulberry	Japan	DQ094305	JF740841
<i>F. oxysporum</i>	Bean	Chile	MW092881	MW272503
<i>F. phaseoli</i>	Soybean	USA	EF408520	EF408415
<i>F. plagianthi</i>	Lacebark	New Zealand	AF178417	AF178354
<i>F. redolens</i>	Chickpea	Canada	MK908825	MK922537
<i>F. regulare</i>	Bean	USA	LR583762	LR583642
<i>F. solani</i>	Seaside gentian	China	MG183707	MG183711
<i>F. solani</i>	Peonies	China	MN461539	MN977917
<i>F. solani</i>	Alfalfa	China	KF939488	KF939494
<i>F. tucumaniae</i>	Soybean	USA	AY220235	AY220185
<i>F. vanettenii</i>	Tomato	India	MW914700	MW910247
<i>F. virguliforme</i>	Soybean	USA	MN310695	MN310696

نتایج

شدند. میکروکنیدیوم‌ها اغلب یک سلولی، تخم‌مرغی، بیضی یا قلوه‌ای شکل و به ابعاد $۲/۱-۳/۷ \times ۵/۶-۱۱/۹$ میکرومتر روی فیالیدهای کوتاه تشکیل می‌شدند. ماکروکنیدیوم‌ها اغلب چهار سلولی بوده و به ابعاد $۵/۸-۳/۴ \times ۲۲/۶-۳۱/۹$ میکرومتر روی بالشک‌های نارنجی کم رنگ تولید می‌شدند. کلامیدوسپورها به فراوانی و به قطر $۵/۱۰-۴/۱$ میکرومتر بصورت تکی یا جفتی دیده می‌شدند (شکل ۱).

Fusarium solani (Mart.) Sacc.

پرگنه‌ی قارچ روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به سرعت رشد کرده و پس از هفت روز به قطر $۶/۵ \pm ۰/۵$ سانتی‌متر می‌رسید. میسلیوم‌ها بصورت پراکنده رشد کرده، اغلب کرم مایل به خاکستری کم رنگ یا سفید بودند. میکروکنیدیوم‌ها روی فیالیدهای بلند و در

شناسایی گونه‌های *Fusarium*

تعداد ۱۵۸ نمونه ریشه گیاه لوبیا با علائم زردی، پژمردگی و پوسیدگی و نکروز ریشه مورد بررسی قرار گرفت و از ۳۷ جدایه‌ی *Fusarium* جداسازی شده، هفت گونه براساس مشخصات ریخت‌شناسی و فیلوژنتیکی شناسایی شد.

Fusarium oxysporum Schldl.

پرگنه‌ی قارچ روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به سرعت رشد کرده و پس از هفت روز به قطر $۸/۵ \pm ۰/۵$ سانتی‌متر می‌رسید. میسلیوم‌ها پنبه‌ای سفید تا سفید مایل به بنفش بوده و روی آنها میکروکنیدیوم‌ها در سرهای دروغین به فراوانی تولید می‌-



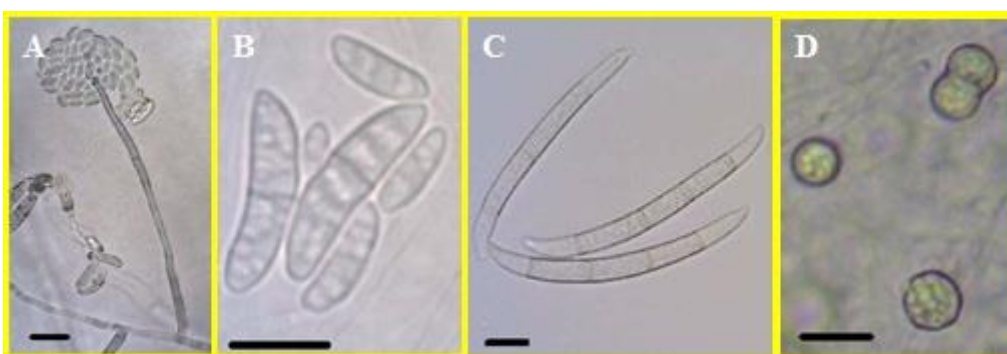
شکل ۱. ریخت‌شناسی فیالید (A)، میکروکنیدیوم (B)، ماکروکنیدیوم (C) و کلآمیدوسپور (D) در جدایه *Fusarium oxysporum* (RB8) (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. Morphology of phialide (A), microconidium (B), macroconidium (C) and chlamydospore (D) in *Fusarium oxysporum* (RB8) (Bar = 10 µm).

Fusarium brasiliense T. Aoki and O'Donnell

پرگنه قارچ روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به کندی رشد کرده و پس از هفت روز به قطر $2/0 \pm 0/2$ سانتی‌متر می‌رسید. میسلیم‌ها بصورت متراکم رشد کرده، سفید مایل به کرم رنگ بودند که در مرکز پرگنه به رنگ سبز روشن دیده می‌شد. میکروکنیدیوم‌های بیضی یا تخم‌مرغی شکل یک سلولی به ابعاد $2/1-3/6 \times$ کوتاه تشکیل می‌شدند. ماکروکنیدیوم‌ها اغلب چهار یا پنج

سرهای دروغین به فراوانی تشکیل می‌شدند. آنها معمولاً یک سلولی به ابعاد $5/1-18/6 \times 2/3-4/1$ میکرومتر یا دو سلولی به ابعاد $9/9-26/7 \times 3/5-6/8$ میکرومتر تخم‌مرغی، بیضی یا قلوه‌ای شکل بودند. ماکروکنیدیوم‌های چهار یا پنج سلولی به ابعاد $30/5-53/2 \times 4/4-7/2$ میکرومتر روی بالشک‌های سفید تا کرم رنگ تولید می‌شدند. کلآمیدوسپورها اغلب بصورت تکی یا جفتی، به فراوانی و به قطر $6/4-11/4$ میکرومتر تشکیل می‌شدند (شکل ۲).



شکل ۲. ریخت‌شناسی فیالید (A)، میکروکنیدیوم (B)، ماکروکنیدیوم (C) و کلآمیدوسپور (D) در جدایه *Fusarium solani* (RB39) (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 2. Morphology of phialide (A), microconidium (B), macroconidium (C) and chlamydospore (D) in *Fusarium solani* (RB39) (Bar = 10 µm).



شکل ۳. ریخت‌شناسی فیالید (A)، میکروکنیدیوم (B)، ماکروکنیدیوم (C) و کلامیدوسپور (D) در جداییه *Fusarium brasiliense* (RB31) (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 3. Morphology of phialide (A), microconidium (B), macroconidium (C) and chlamidospore (D) in *Fusarium brasiliense* (RB31) (Bar = 10 μ m).

سلولی و به ابعاد $۳۷/۱-۶۰/۲ \times ۴/۶-۵/۸$ میکرومتر بوده و روی فیالیدهای ساده و بدون انشعاب میسلیم‌های هوایی (شکل ۳A) و یا روی فیالیدهای بالشیکی تولید می‌شدند که از نظر شکل و اندازه هیچ تفاوتی با هم نداشتند. کلامیدوسپورها اغلب بصورت تکی، و به قطر $۵/۹-۸/۶$ میکرومتر تشکیل شدند (شکل ۳).

سلولی به ابعاد $۷/۳-۱۹/۴ \times ۳/۳-۵/۲$ میکرومتر تخم‌مرغی، بیضی یا قلوه‌ای شکل روی فیالیدهایی با اندازه‌های متفاوت و در سرهای دروغین به فراوانی تشکیل شدند. ماکروکنیدیوم‌ها اغلب چهار یا پنج سلولی به ابعاد $۶/۲-۴/۱ \times ۲۹/۲-۴۲/۹$ میکرومتر روی بالشک‌های سفید تا کرم رنگ تولید می‌شدند. کلامیدوسپورها اغلب بصورت تکی یا جفتی، به فراوانی و به قطر $۸/۱-۱۲/۹$ میکرومتر تشکیل شدند (شکل ۴).

Fusarium equiseti (Corda) Sacc.

پرگنه‌ی قارچ روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به سرعت رشد کرده و پس از هفت روز به قطر $۸/۵ \pm$ سانتی‌متر می‌رسید. میسلیم‌ها به رنگ سفید و بصورت پراکنده رشد می‌کردند. میکروکنیدیوم‌های یک

پرگنه قارچ روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به سرعت رشد کرده و پس از هفت روز به قطر $۸/۵ \pm$ سانتی‌متر می‌رسید. میسلیم‌ها به رنگ سفید و بصورت پراکنده رشد می‌کردند. میکروکنیدیوم‌های یک

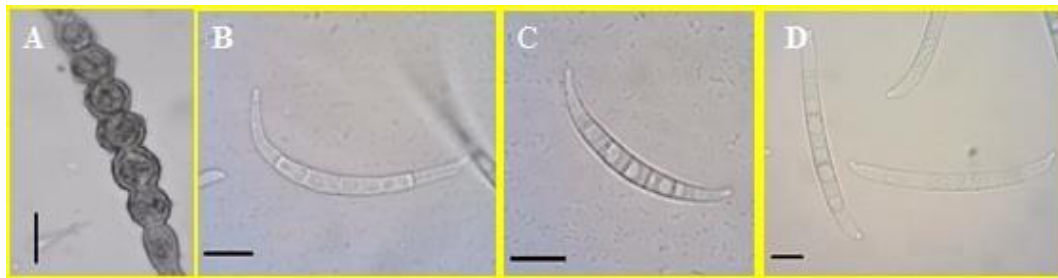
Fusarium redolens Wollenw

پرگنه قارچ روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به سرعت رشد کرده و پس از هفت روز به قطر $۸/۵ \pm$ سانتی‌متر می‌رسید. میسلیم‌ها به رنگ سفید و بصورت پراکنده رشد می‌کردند. میکروکنیدیوم‌های یک



شکل ۴. ریخت‌شناسی فیالید (A)، میکروکنیدیوم (B)، ماکروکنیدیوم (C) و کلامیدوسپور (D) در جداییه *Fusarium redolens* (RB50) (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 4. Morphology of phialide (A), microconidium (B), macroconidium (C) and chlamidospore (D) in *Fusarium redolens* (RB50) (Bar = 10 μ m).



شکل ۵. ریخت‌شناسی کلامیدوسپور (A) و ماکروکنیدیوم (B) در جدایه *Fusarium equiseti* (RB5)، ماکروکنیدیوم (C) در جدایه *Fusarium acuminatum* (RB53) و ماکروکنیدیوم (D) در جدایه *Fusarium lateritium* (RB11) (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 5. Morphology of chlamydospore (A) and macroconidium (B) in *Fusarium equiseti* (RB5), macroconidium (C) in *Fusarium acuminatum* (RB53) and macroconidium (D) in *Fusarium lateritium* (RB11) (Bar = 10 μ m).

کم و به رنگ سفید بودند. ماکروکنیدیوم‌ها پنج یا شش سلولی کشیده بوده، به ابعاد $5/5-7/5 \times 5/2-7/2 \times 5/3-5/8$ میکرومتر روی بالشک‌های پرتقالی کم‌رنگ تولید شدند (شکل ۵D). جدایه‌ها میکروکنیدیوم و کلامیدوسپوری تولید نکردند.

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها روی گیاه لوبیا

روی لوبیا چیتی رقم صدری در گلخانه پس از سه هفته از مایه‌زنی، علائم زردی و در بعضی علائم موزاییکی شدن و نکروز حاشیه‌ی برگ‌ها ظاهر شد و ظهور بیماری به ثبت رسید. در پایان هفته‌ی چهارم بوته‌ها از گلدان خارج و ریشه‌ی آن‌ها از لحاظ پوسیدگی ارزیابی شد. با توجه به نمره دهی ریشه‌ها، براساس آزمون کرسکال-والیس، از نظر آماری، تفاوت معنی‌داری در حد ۱ درصد بین جدایه‌ها و شاهد مشاهده شد و به کمک آزمون ویلکاکسون، جدایه‌ها گروه‌بندی شدند (جدول ۱). براساس این نتایج، در این تحقیق همه جدایه‌ها قادر به ایجاد پوسیدگی ریشه و طوقه در لوبیا بودند (شکل ۶A).

بر اساس گروه‌بندی ویلکاکسون، بیشترین شدت بیماری پوسیدگی ریشه در گونه‌ی FO5C و در جدایه‌ی F. RKN199 و کمترین شدت بیماری در گونه‌ی

به قطر $0/5 \pm 0/5$ سانتی‌متر می‌رسید. میسلیم‌ها پنبه‌ای و به رنگ سفید بوده که پس از مدتی به رنگ قهوه‌ای مات در آمدند. جدایه‌ها، میکروکنیدیومی تولید نکردند. ماکروکنیدیوم‌ها چهار یا پنج سلولی انحنادار بوده، به ابعاد $5/3-5/8 \times 2/8-3/8 \times 2/3-2/8$ میکرومتر روی بالشک‌های نارنجی رنگ تولید شدند. کلامیدوسپورها به فراوانی و بصورت خوشه‌ایی یا زنجیری تشکیل می‌شدند (شکل ۵A و ۵B).

Fusarium acuminatum Ellis & Everh

پرگنه‌ی قارچ روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به سرعت رشد کرده و پس از هفت روز به قطر $6 \pm 0/5$ سانتی‌متر می‌رسید. میسلیم‌ها پنبه‌ای و به رنگ سفید مایل به خاکستری بودند. جدایه‌ها میکروکنیدیوم و کلامیدوسپور تولید نکردند. ماکروکنیدیوم‌ها پنج یا شش سلولی انحنادار و به ابعاد $5/1-5/3 \times 3/3-3/5 \times 6/6-6/31$ میکرومتر روی بالشک‌های نارنجی رنگ تولید می‌شدند. (شکل ۵C).

Fusarium lateritium Nees.

پرگنه‌ی قارچ روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به کندی رشد کرده و پس از هفت روز به قطر $2 \pm 0/5$ سانتی‌متر می‌رسید. میسلیم‌ها پنبه‌ای با تراکم



شکل ۶. پوسیدگی ریشه لوبیا (A) و نخود (B) در جدایه RB35، سویا (C) در جدایه RB31 و پوسیدگی خشک غده‌های سیب‌زمینی (D) در جدایه *Fusarium solani* (RKF156)

Fig. 6. Root rot of bean (A) and chickpea (B) in isolate RB35, soybean (C) in isolate RB31 and potato dry rot (D) in isolate *Fusarium solani* (RKF156)

زردی در برگ‌های پایینی شروع و بلافاصله پس از چند روز برگ‌ها خشک شدند. پوسیدگی ریشه نخود همراه با زخم و سیاه شدن طوقه بوته‌ها بود (شکل ۶B). در مورد پوسیدگی غده سیب‌زمینی، قارچ بیماری‌زا در غده نفوذ کرده و موجب پوسیدگی خشک غده شده و توده میسلیمی قارچ در سطح محل پوسیده مشاهده می‌شد (شکل ۶D). جدایه RB39 روی سویا و جدایه RB31 هم روی سویا و هم ماش بیماری‌زا بودند. در سویا علائم بیشتر بصورت زردی در برگ‌ها و ایجاد زخم و نکروز در ریشه و طوقه بوته‌ها ثبت شد (شکل ۶C). علائم بیماری در ماش شامل زردی و پژمردگی بوته و نکروز شدید طوقه و پوسیدگی ریشه‌ها بود.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها و واکاوی فیلوژنتیکی گونه-

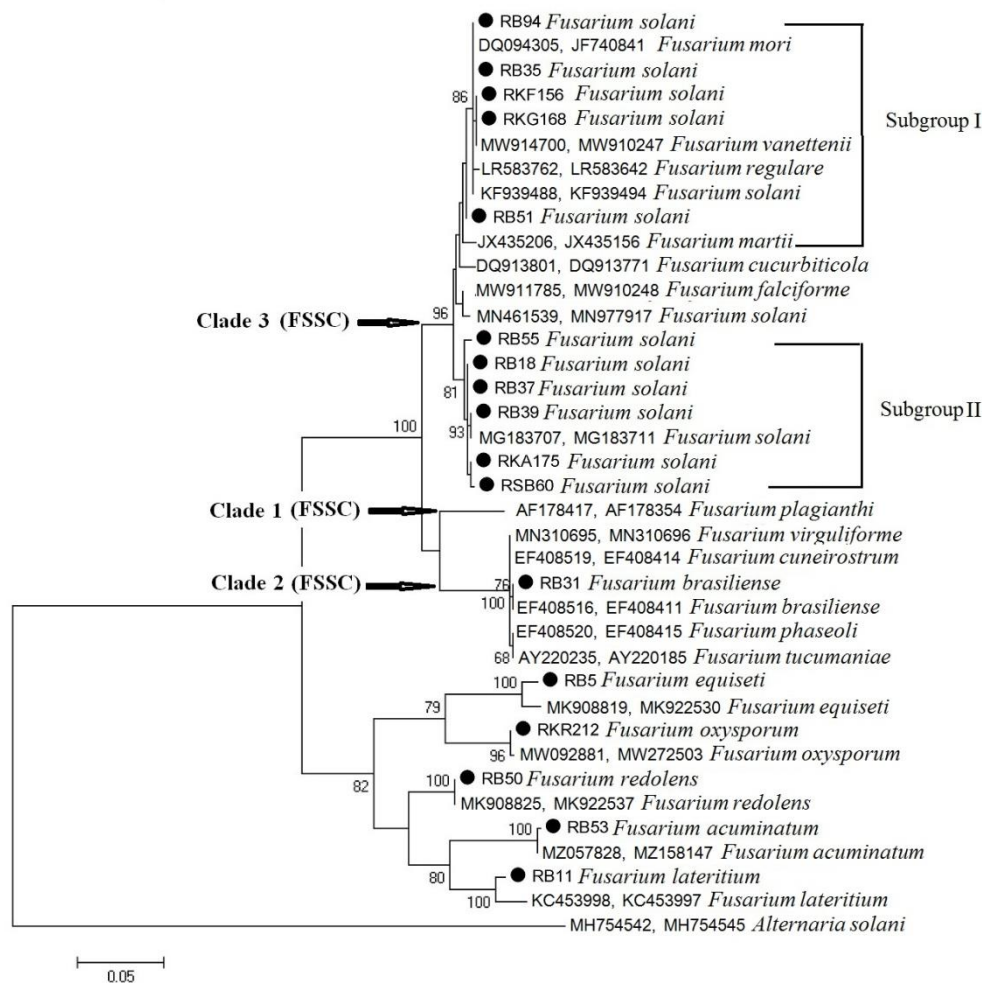
های *Fusarium*

جفت‌آغازگرهای ITS1/ITS4 و EF-728/EF-986 در آزمون PCR به ترتیب، قطعات حدود ۵۹۰ و ۳۰۰ جفت-بازی را در ۱۷ جدایه‌ی منتخب *Fusarium* spp. تکثیر

redolens و در جدایه‌ی RB50 به ثبت رسید. در گونه‌ی FSSC، شدت بیماری پوسیدگی ریشه از ۴۶/۰۳ درصد در جدایه‌ی RB94 تا ۸۰/۹۵ درصد در جدایه‌ی RB31 متغیر بود. به‌طور متوسط شدت بیماری پوسیدگی ریشه در جدایه‌های *F. lateritium* با ۷۶/۵۹ درصد نسبت به دیگر گونه‌ها بالاتر بود (جدول ۱).

آزمون‌های بیماری‌زایی جدایه‌های FSSC روی سایر حبوبات و سیب‌زمینی

پس از گذشت چهار هفته، بیماری‌زایی جدایه‌ها از نظر پوسیدگی ریشه در نخود، عدس، سویا، لوبیا چشم‌بلبلی، ماش و پوسیدگی غده‌ی سیب‌زمینی مورد ارزیابی قرار گرفت. هیچ کدام از جدایه‌ها روی لوبیا چشم‌بلبلی و عدس علائم زردی در اندام‌های هوایی و پوسیدگی ریشه را ایجاد نکرده و روی این میزبان‌ها بیماری‌زا نبودند. جدایه RB35 روی نخود و جدایه‌های RB37، RKF156، RKB60 و RKG168 هم روی نخود و هم روی غده سیب‌زمینی بیماری‌زا بودند. در نخود علائم ابتدا بصورت



شکل ۷. درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های *Fusarium spp.* که در تجزیه و تحلیل بیشینه درست‌نمایی بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های ترکیبی دو ناحیه‌ی ژنی ITS و *EF-1α* با مقادیر بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار در نقطه‌ی انشعاب ترسیم شده است. جدایه‌های منتخب در این تحقیق از استان مرکزی با دایره‌ی سیاه مشخص شده‌اند.

Fig. 7. Phylogenetic tree constructed from a maximum likelihood analysis based on a concatenated alignment from ITS and *EF-1α* sequences of *Fusarium* spp. isolates with 1000 replicates of bootstrap at the branch point. Representative isolates from Markazi Province marked with black circle.

ITS و *EF-1α* شباهت داشتند. اختلافات نوکلئوتیدی این دو ناحیه به‌خوبی، جدایه‌های FSSC را از سایر گونه‌های *Fusarium* تفکیک نمود. جدایه‌های FSSC در دو تبار اصلی دو و سه قرار گرفتند (بر اساس گروه بندی O'Donnell در سال ۲۰۰۰). در تبار دو، تنها جدایه RB31 در کنار گونه *F. brasiliense* جای گرفت. با توجه به ماتریس داده‌ها جدایه RB31 با سایر جدایه‌های FSSC در

کردند. در نمونه‌ی شاهد منفی (آب مقطر سترون) این قطعات تکثیر نشد.

در درخت فیلوژنتیکی، جدایه‌های موجود در این مطالعه در دو گروه اصلی قرار گرفتند. گروه اول شامل تمام جدایه‌های FSSC و گروه دوم شامل جدایه‌های سایر گونه‌ها بود (شکل ۷). این دو گروه بر اساس ماتریس داده‌های نوکلئوتیدی در حدود ۷۵٪ درصد در توالی‌های

حدود ۹۰ درصد شباهت داشت.

اکثر جدایه‌های FSSC در تبار سه و در دو زیر گروه (subgroup) I و II قرار گرفتند. کمترین شباهت در دو زیر گروه بین جدایه‌های RB51 و RB55 با ۹۴/۲ درصد به ثبت رسید. در زیر گروه اول، جدایه‌های RKF156 و RKG168 بر اساس ماتریس شباهت‌های نوکلوتیدی ITS و *EF-1a* ۱۰۰ درصد با هم شبیه بودند.

بحث

گونه‌های *Fusarium* از قارچ‌های مهم عامل پوسیدگی ریشه لوبیا هستند (Montiel-González et al. 2005). در این مطالعه ۳۷ جدایه از گونه‌های *Fusarium* از مزارع لوبیا در استان مرکزی جداسازی و بیماری‌زایی، ویژگی‌های ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی آن‌ها بررسی شد.

گونه‌های FOSC و FSSC از مهمترین عوامل پوسیدگی ریشه در لوبیا هستند (Aoki et al. 2014). در این تحقیق، تمام جدایه‌های FSSC موجب پوسیدگی ریشه لوبیا شده و به غیر از جدایه RB94 که کمتر از ۵۰ درصد موجب پوسیدگی ریشه لوبیا شد، اکثر جدایه‌ها به شدت باعث پوسیدگی ریشه شدند. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد گونه غالب FSSC در استان مرکزی یکی از عوامل مهم خسارت‌زای لوبیا باشد. در ایران این بیماری هر ساله خسارت قابل توجهی به لوبیاکاران وارد می‌کند و در مناطق آلوده تا ۸۵ درصد خسارت به محصول برآورد می‌شود (Ahari Mostafavi et al. 2009).

این قارچ با بیشترین فراوانی از استان‌های زنجان، قزوین، آذربایجان شرقی و لرستان به عنوان یکی از مهمترین عوامل محدودکننده و خسارت‌زننده به مزارع لوبیا معرفی شده است (Naseri 2008; Saremi et al. 2011; Dehghani et al. 2018).

ناشی از FSSC در تمام مناطق لوبیا کاری دنیا از جمله مکزیک، برزیل، کلمبیا، پرو، اکوادور، شیلی، ونزوئلا، کاستاریکا و ملاوی گزارش شده است (Kraft et al. 1981 and Goody et al. 2004). این بیماری به عنوان مهمترین بیماری لوبیا در دنیا شناخته می‌شود (Abawi 1989).

تعدادی از جدایه‌های FSSC علاوه بر لوبیا روی سایر حبوبات و غده‌سیب‌زمینی نیز بیماری‌زا بودند. در استان زنجان قارچ FSSC روی عدس، نخود، باقلا و یونجه پوسیدگی ریشه ایجاد کردند (Khodaghali et al. 2013). در آمریکای مرکزی و شمالی تعداد زیادی از جدایه‌های فرم مخصوص لوبیا و سویا قادر به بیماری‌زایی روی هر دو میزبان بودند. جدایه‌ها در این دو فرم مخصوص از نظر بیماری‌زایی به هم بسیار شبیه بودند (Aoki et al. 2014).

در این بررسی، جدایه RB31 علاوه بر لوبیا موجب پوسیدگی ریشه سویا و ماش شده و در تبار دو این گروه بندی قرار گرفت که با گونه فیلوژنتیک *F. brasiliense* مطابقت داشت، این گونه برای اولین بار در سال ۲۰۰۵، بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی به عنوان عامل مرگ ناگهانی سویا از برزیل شناسایی و توصیف شد (Aoki et al. 2005). این گونه توسط تولدمدین و همکاران (Tewoldemedhin et al. 2017) در آفریقای جنوبی از سویا گزارش شده است. به نظر ایشان خاستگاه این قارچ در آفریقای جنوبی، از بذره‌های آلوده‌ای است که احتمالاً از آمریکای جنوبی وارد شده است. در سال ۲۰۱۹، وانگ و همکاران (Wang et al. 2019) این گونه را از مزارع سویا در میشیگان جداسازی و شناسایی کردند. حضور گسترده این قارچ در مزارع کالیفرنیا و میشیگان نشان دهنده این است که قارچ *F. brasiliense* قبل از کشاورزی مدرن در این مناطق وجود داشته است. بذرها

بانک ژن شباهت داشته و خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌های این گونه تأیید شد. شدت بیماری‌زایی پوسیدگی ریشه لوبیا در بین این جدایه‌ها از ۵۳/۹۷ تا ۸۲/۵۴ درصد متغیر بود. در استان لرستان، قزوین، آذربایجان شرقی و زنجان فراوانی این گونه پس از قارچ FSSC قرار داشت (Saremi et al. 2011; Dehghani et al. 2018). در بررسی انجام شده توسط ناصری (Naseri 2008) در استان زنجان، گونه *F. oxysporum* به عنوان دومین گونه مهم پوسیدگی ریشه لوبیا معرفی شد. این قارچ در بسیاری از نواحی کشت لوبیا در سراسر دنیا از جمله آمریکای جنوبی، آفریقا، اروپا و آمریکا خسارت وارد می‌کند (Alves-Santos et al. 1999; Buruchara 2005, Schwartz et al. 2000, and Camacho).

در گونه *F. oxysporum* گنجاندن اصطلاح *radicis* در نام *forma specialis* امکان شناسایی فوری علایم پوسیدگی ریشه از پژمردگی آوندی را فراهم می‌کند (Edel-Hermann & Lecomte 2019)، بنابراین با توجه به ایجاد علایم پوسیدگی ریشه و طوقه لوبیا توسط *F. oxysporum* f. sp. مخصوص *radicis-phaseoli* برای جدایه‌های تحقیق حاضر پیشنهاد می‌شود.

در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده جدایه RB11 به عنوان نماینده با جدایه قارچ *F. lateritium* انتخابی بانک ژن مطابقت داشت و به عنوان یکی دیگر از عوامل پوسیدگی ریشه لوبیا در استان مرکزی معرفی می‌شود. جدایه‌های *F. lateritium* نقش مهمی در ایجاد پوسیدگی ریشه لوبیا در پنج ایالت مکزیک دارند. در این کشور نیز از نظر اهمیت، این گونه پس از FSSC و FOOSC قرار می‌گیرد (Montiel-González et al. 2005). گونه‌ی *F. lateritium* به عنوان بیمارگر از سایر گونه‌های گیاهی،

پتانسیل آلوده شدن با خاک آلوده را دارند که می‌توانند به طور بالقوه‌ای، حرکت و انتقال قارچ بین مناطق مختلف، کشورها و قاره‌ها را تسهیل کنند.

در تبار دو گونه مرکب *F. solani* علاوه بر *F. brasiliense* گونه‌های مهم دیگری مانند *F. phaseoli*، *F. cuneirostrum* و *F. tucumaniae*، *virguliforme* باعث پوسیدگی ریشه لوبیا می‌شوند (Aoki et al. 2014; Chitrampalam & Nelson 2016). بسیاری از گونه‌ها در این گروه از نظر اقتصادی بیمارگرهای مهمی هستند که می‌توانند در سویا و لوبیا باعث کاهش قابل توجه عملکرد شوند. آن‌ها از نظر ریخت‌شناختی بسیار شبیه به هم بوده و سرعت رشد آن‌ها کند است (Aoki et al. 2014).

در تبار سه و زیرگروه دو، جدایه‌های RKF156 و RKG168 از نظر نواحی ژنی ITS و *EF-1a* ۱۰۰ درصد شبیه بوده و علاوه بر لوبیا موجب پوسیدگی ریشه نخود نیز شدند. این جدایه‌ها با گونه *F. vanettenii* O'Donnell، Geiser, Kasson & T. Aoki در یک گروه قرار گرفتند. این گونه روی میزبان‌های زیادی از جمله لوبیا بیماری‌زاست (Porter et al. 2015). در استان زنجان نیز، جدایه‌های *F. solani* عامل پوسیدگی ریشه لوبیا موجب پوسیدگی ریشه نخود نیز شدند (Khodagholi et al. 2013). در ایالت میشیگان، اعضای FSSC جداسازی شده از ریشه سویا در دو زیر گروه قرار گرفتند که بعضی از آنها موجب پوسیدگی ریشه نخود می‌شدند (Chitrampalam and Nelson 2016).

پس از قارچ FSSC، جدایه‌های FOOSC با فراوانی ۲۷ درصد، بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌های گونه *Fusarium* داشتند. در این پژوهش، جدایه RKR212 از بین ۱۱ جدایه FOOSC به عنوان نماینده انتخاب و از نظر مولکولی در نواحی ژنی ITS و *EF-1a* با جدایه انتخابی

شناسایی گونه‌های *Fusarium* برای روشن شدن عامل یا علل بیماری‌های ریشه در حبوبات برای تدوین راهبردهای مدیریت مهار بیماری ضروری است (Zhou et al. 2021). با این حال، توالی‌های منطقه ITS به تنهایی نمی‌تواند برخی از گونه‌های *Fusarium* را از هم متمایز کند (Zhou et al. 2018). با توجه به خصوصیات ناحیه ژنی *EF-1a*، استفاده از ناحیه ژنی *EF-1a* برای شناسایی گونه‌های *Fusarium* ترجیح داده می‌شود (Geiser et al. 2004)، که به همراه ITS و با تلفیق داده‌های ریخت‌شناختی می‌تواند اطلاعات مفیدی در تفکیک گونه‌های جنس *Fusarium* به دست بدهد. علاوه بر نواحی ژنی ITS و *EF-1a* امروزه از ژن‌های دیگری نظیر *tub2 act1 rpb2 call* نیز در مطالعات فیلوژنتیکی گونه‌های *Fusarium* استفاده می‌شود (Geiser et al. 2021).

با توجه به نتایج این تحقیق، در استان مرکزی گونه‌های FOSC و FSSC از فراوان‌ترین و پرآزارترین گونه‌های *Fusarium* عامل پوسیدگی ریشه لوبیا هستند که می‌توانند به عنوان یک عامل محدودکننده در کشت لوبیا مطرح باشند و برای کاهش خسارت آنها بایستی مدیریت تلفیقی و استفاده از ارقام مقاوم مدنظر قرار گیرد (Naseri & Mousavi 2015). در مورد FSSC، مطالعات آینده با جدایه‌ها و ژن‌های بیشتر و استفاده از نشانگرهای مولکولی، نه تنها شباهت‌های ژنتیکی جدایه‌ها را بیشتر مشخص می‌کند، بلکه تفکیک گونه‌های جدید را امکان پذیر خواهد ساخت. از طرف دیگر، بررسی ژنتیک جمعیت جدایه‌های FSSC دیدگاه بهتری نسبت به روش‌های مبارزه به خصوص استفاده از ارقام را در پی دارد.

مانند سیب‌زمینی شیرین (Clark 1992) و شاه‌توت (Vajna 2000) نیز گزارش شده است.

در این تحقیق، از لوبیاکاری‌های استان مرکزی، گونه‌های *F. acuminatum* و *F. equiseti* با فراوانی کم جداسازی و شناسایی شدند. در استان زنجان صفرو و همتمی (Safarloo and Hemmati 2014) قارچ *F. acuminatum* را با فراوانی هشت درصد جداسازی کردند، دهقانی و همکاران (Dehghani et al. 2018) در استان لرستان این قارچ را جزء گونه‌های با فراوانی کم معرفی نمودند. به نظر می‌رسد در ایران این قارچ از اهمیت کمی در مزارع لوبیا برخوردار باشد.

گزارش‌های متعددی از وجود *F. equiseti* در بقولات وجود دارد (Safarloo & Hemmati 2014). این قارچ به عنوان عامل همراه یا عامل پوسیدگی ریشه لوبیا نیز گزارش شده است (Asan 2011). فراوانی کم و توزیع ضعیف *F. equiseti* در مزارع لوبیا نشان می‌دهد که نقش آنها در پوسیدگی ریشه لوبیا در مناطق لوبیا کاری چندان مهم نباشد (Montiel-González et al. 2005).

در این تحقیق کمترین، شدت بیماری‌زایی در تک جدایه RB50 به ثبت رسید که به عنوان گونه *F. redolens* از نظر ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شد. *F. redolens* از مهمترین گونه‌های *Fusarium* عامل پوسیدگی ریشه در نخود است (Zhou et al. 2021). در کرمانشاه این قارچ مهمترین عامل پوسیدگی ریشه نخود است (Saeedi & Jamali 2021). *F. redolens*، یک گونه نزدیک به *F. oxysporum* است و در اکثر مزارع حبوبات نظیر، نخود، عدس و نخودفرنگی در کشور کانادا جدا می‌شود (Esmaeili Taheri et al. 2011).

- Abawi G. S. 1989. Root Rots. In Schwartz H. F. and Pastor- Corrales M. A. (eds.). Bean Problems in the Tropics. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical: 105-107.
- Ahari Mostafavi H., Safaie N., Naserian B., Fathollahi H., Dorri H., Lak M. and Babaie M. 2009. Possibility of biological control of bean root rot disease, using of avirulent mutants of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* isolate. Journal of Plant Production 16(3): 135-149. (in Persian)
- Ahmadi K., Ebadzadeh H., Hatami F., Abdeshah B. and Kazemian A. 2020. Agricultural statistics crop year book for 2018-2019. Ministry of Agriculture-Jahad Publishing, planning and economic deputy, information and communication technology center. 1: 97 p. (in Persian)
- Alves-Santos F. M., Benito E. P., Eslava A. P. and Diaz-Minguez J. M. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. Applied Environment Microbiology 65: 3335–3340.
- Aoki T., O'Donnell K., Homma Y. and Lattanzi A. R. 2003. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex- *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. Mycologia 95: 660-684.
- Aoki T., O'Donnell K. and Mercedes Scandiani M. 2005. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae* and *F. virguliforme*. Mycoscience 46:162–183.
- Aoki T., O'Donnell K. and Geiser D. M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges. J. Gen. Plant Pathology 80:189-201.
- Arif M., Zaidi N. W., Haq Q. M., Singh Y. P., Taj G., Kar C. S. and Singh U. S. 2015. Morphological and comparative genomic analyses of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium solani* isolated from Dalbergia sissoo. Molecular Biology Reports 42: 1107-1122.
- Asan A., 2011. Checklist of *Fusarium* species reported from Turkey. Mycotaxon 116(1): p.479.
- Bilgi V. N., Bradley C. A., Khot S. D., Grafton K. F. and Rasmussen J. B. 2008. Response of dry bean genotypes to *Fusarium* root rot caused by *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, under field and controlled conditions. Plant Disease 92 (8): 1197-1200.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Common Wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, United Kingdom 237 p.
- Burke D. W. and Hall R. 1991. *Fusarium* root rot. In Hall R. (Ed.), Compendium of Bean Diseases USA: The American Phytopathological Society 9-10.
- Buruchara R. A. and Camacho L. 2000. Common Bean Reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in central Africa. Phytopathology 148: 39–45.
- Carbone I. and Kohn L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91(3): 553-556.
- Chitrapalam P. and Nelson B. J. R. 2016. Multilocus phylogeny reveals an association of agriculturally important *Fusarium solani* species complex (FSSC) 11, and clinical important FSSC 5 and FSSC 3 + 4 with soybean roots in the north central United States. Antonie van Leeuwenhoek 109: 335-347.
- Clark C.A. 1992. Histological evidence that *Fusarium lateritium* is an exopathogen on sweetpotato with chlorotic leaf distortion. Phytopathology 82: 656-663.
- Crous P.W., Lombard L., Sandoval-Denis M., et al. 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. Studies in mycology, 98, p.100116.
- Dehghani A., Panjehkesh N., Darvishnia M., Salari M. and Asadi Rahmani H. 2018. Importance and climatic distribution of pathogenic fungi associated with bean root and crown in Lorestan province. Applied Entomology and Phytopathology 86(2): 219-234. (in Persian)
- Doyle J. J. and Doyle, J. L. 1987. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.
- Du M., Ren X., Sun Q., Wang Y. and Zhang R. 2012. Characterization of *Fusarium* spp. Causing Potato Dry Rot in China and Susceptibility Evaluation of Chinese Potato Germplasm to the Pathogen. Potato Research 55: 175–184.

- Edel-Hermann V. and Lecomte C. 2019. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology* 109(4): 512-530.
- Esmaili Taheri A., Hamel C., Gan Y. and Vujanovic V. 2011. First report of *Fusarium redolens* from Saskatchewan and its comparative pathogenicity. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33: 559-564
- Geiser D. M., del Mar Jiménez-Gasco M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T. J., Zhang N., Kulda G. A. and O'donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110(5): 473-479.
- Geiser D. M., Al-Hatmi A. M. S., Aoki T., Arie T., Balmas V., Barnes I., Bergstrom G. C., Bhattacharyya M. K. and Blomquist C. L. *et al.*. 2021. Phylogenomic analysis of a 55.1 kb 19-gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* Species Complex. *Phytopathology*®, pp.PHYTO-08. (<https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0330-LE>)
- Goody P., Cano J., Gene J., Guarro J., Luisa Hufing-Lima A. and Lopes Colombo A. 2004. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, The main agent of fungal keratitis in Brazil. *Journal of Clinical Microb* 4494-4497.
- Gossen B. D., Conner R. L., Chang K., Pasche J. S., McLaren D. L., Henriquez M. A., Chatterton S. and Hwang S. 2016. Identifying and managing root rot of pulses on the northern Great Plains. *Plant Diseases* 100(10): 1965-1978.
- Josh P. K. and Rao P. P. 2017. Global pulses scenario: status and outlook. *Annals of the New York Academy Sciences* 1392: 6-17.
- Knodel J. J., Beauzay P. B., Franzen D. W., Kandel H. J., Markell S. G., Osorno J. M. and Zollinger R. K. 2011. Dry bean grower survey of production, pest problems, and pesticide use in Minnesota and North Dakota. NDSU Extension Service, Fargo, ND. 24 p.
- Khodagholi M., Hemmati R., Naseri B. and Marefat A. 2013. Genotypic, phenotypic and pathogenicity variation of *Fusarium solani* isolates, the causal agent of bean root rot in Zanjan province. *Iranian Journal of Pulses Research* 4(1): 111-125. (in Persian)
- Kraft J. M., Burke D. W., Hagland W. A. 1981. *Fusarium* diseases of beans, peas and lentils. Pennsylvania State University Press, University Park, PA. USA. 142-156.
- Leslie J. F. and Summerell B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, USA: Blackwell Publishing. 399 p.
- Li Y. P., You M. P. and Barbetti M. J. 2014. Species of *Pythium* associated with seedling root and hypocotyl disease on common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Western Australia. *Plant Disease* 98 (9):1241-1247.
- Lombard L., Van der Merwe, N.A., Groenewald J.Z. and Crous P.W. 2015. Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology* 80: 189-245.
- Montiel-González L., González-Flores F., Sánchez-García B. M., Guzmán-Rivera S., Gámez-Vázquez F. P., Acosta-Gallegos J. A., Rodríguez-Guerra R., Simpson-Williamson J., Cabral-Enciso M. and Mendoza-Elos M. 2005. *Fusarium* species on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots causing rots, in five states of Central Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 1-10.
- Naseri B. 2008. Root rot of common bean in Zanjan, Iran: major pathogens and yield loss estimates. *Australasian Plant Pathology* 37: 546-551.
- Naseri B. and Mousavi S.S. 2015. Root rot pathogens in field soil, roots and seeds in relation to common bean (*Phaseolus vulgaris*), disease and seed production. *International journal of pest management* 61(1): 60-67.
- Nash S. N. and Snyder W. C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology* 73: 458-462.
- Nelson, P.E., T.A. Tousson, and W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium* species, An illustrated manual for identification. Penn State University Press. 193p.
- O'Donnell K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*-*Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92: 919-938.
- Porter L. D., Pasche J. S., Chen W. and Harveson R. M. 2015. Isolation, identification, storage, pathogenicity tests, hosts, and geographic range of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* causing *Fusarium* root rot of pea. *Plant Health Progress* 16(3): 136-145.
- Roth M. G., Oudman K. A., Griffin A., Jacobs J. L., Sang H. and Chilvers M. I. 2020. Diagnostic qPCR assay to detect *Fusarium brasiliense*, a causal agent of soybean sudden death syndrome and root rot of dry bean. *Plant*

- disease 104(1): 246-54.
- Saeedi S. and Jamali S., 2021. Molecular characterization and distribution of *Fusarium* isolates from uncultivated soils and chickpea plants in Iran with special reference to *Fusarium redolens*. Journal of Plant Pathology 103(1): 167-183.
- Safarloo Z. and Hemmati R. 2014. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with bean root rot in Zanjan Province. Journal of Applied Research in Plant Protection 3(1): 77-92. (in Persian)
- Sandoval-Denis M., Lombard L. and Crous P. W. 2019. Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. Persoonia 43:90-185.
- Saremi H., Amiri M. E. and Ashrafi J. 2011. Epidemiological aspects of bean decline disease caused by *Fusarium* species and evaluation of the bean resistant cultivars to disease in Northwest Iran. African Journal of Biotechnology 10(66): 14954-14961.
- Schneider K. A., Grafton K. F. and Kelly J. D. 2001. QTL analysis of resistance to *Fusarium* root rot in bean. Crop Science 41: 535-542.
- Schwartz H. F., Steadman J. R., Hall R. and Forster R. F. 2005. Compendium of bean diseases. New York: American Phytopathology Society Press. 109 p.
- Tewoldemedhin Y. T., Lamprecht S. C., Vaughan M. M., Doehring G. and O'Donnell K. 2017. Soybean SDS in South Africa is caused by *Fusarium brasiliense* and a novel undescribed *Fusarium* sp. Plant disease 101(1): 150-157.
- Vajna L. 2000. First report of trunk blight and canker of *Morus alaba* var. *pendula* caused by *Fusarium lateritium* f. sp. *mori* in Hungary. Plant Disease 84: 372.
- Wang J., Sang H., Jacobs J. L., Oudman k. A., Hanson L. E. and Chilvers M. I. 2019. Soybean Sudden Death Syndrome Causal Agent *Fusarium brasiliense* Present in Michigan. Plant Disease 103: 1234-1243.
- White T. J., Bruns T. Lee S. J. W., T. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18(1): 315-322.
- Zhou Q., Li N., Chang K. F., Hwang S. F., Strelkov S. E., Conner R. L., McLaren D. L., Fu H., Harding M. W. and Turnbull G. D. 2018. Genetic diversity and aggressiveness of *Fusarium* species isolated from soybean in Alberta, Canada. Crop Protection 105: 49-58.
- Zhou Q., Yang Y., Wang Y., Jones C., Feindel D., Harding M. and Feng, J. 2021. Phylogenetic, phenotypic and host range characterization of five *Fusarium* species isolated from chickpea in Alberta, Canada. Canadian Journal of Plant Pathology: 1-7.