




<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
14th Year, Vol. 14, No. 54, 2025 pp. 67-82
Received: 05/08/2025 Accepted: 04/10/2025

(Research Paper)

Isolation and Identification of *Fusarium* Species Associated with Wild grass in Wheat Fields of Western Iran and Major Mycotoxins Produced

Maryam Karami Nazargahi ¹

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
Maryam.karami120@gmail.com

Dustmorad Zafari

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
Zafari_d@yahoo.com

Khosrow Chehri

Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran
kh.chehri@razi.ac.ir

Abstract

Fusarium species are widespread phytopathogenic fungi that pose threats to agriculture, ecosystems, and food safety due to their ability to produce harmful mycotoxins. This study aimed to assess the species diversity and toxigenic potential of *Fusarium* isolates obtained from wild grasses in wheat and barley fields in western Iran. A total of 264 *Fusarium* isolates were identified morphologically, and 20 representative isolates were selected for multilocus phylogenetic analysis using the TEF-1 α and CAL1 gene regions. Phylogenetic reconstruction identified nine distinct *Fusarium* species, including *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. acuminatum*, *F. culmorum*, *F. brachygibbosum*, *F. incarnatum*, and *F. equiseti*. PCR assays using gene-specific primers detected *FUM1* and *PKS4* genes in 50% of *F. proliferatum* and 32% of *F. equiseti* isolates, respectively, indicating their potential to produce fumonisin and zearalenone. The highest frequency of toxigenic isolates was observed in Kermanshah, Hamedan, and Lorestan provinces. These results underscore the phylogenetic diversity and toxigenic capacity of *Fusarium* populations in natural habitats and highlight the importance of monitoring native fungal communities to reduce potential agricultural and health risks.

Keywords: *Fusarium* species, Wild grasses, Phylogenetic analysis, Fumonisin, Zearalenone, Western Iran.

¹ Corresponding Author
3060-7647/ © 2025 The Authors



Introduction

Fusarium species are prevalent in nearly all the world's bioclimatic zones and have had significant social and economic impacts that persist to the present day. This genus is classified within the phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina, class Sordariomycetes, subclass Hypocreomycetidae, order Hypocreales, and family Nectriaceae. It was initially described by Link in 1809. The genus *Fusarium* encompasses a diverse array of fungal species that produce mycotoxins and act as saprophytes, endophytes, and plant pathogens, posing a threat to both humans and domestic animals. The historical context of research on *Fusarium* highlights the considerable economic importance of these fungi, particularly species associated with agricultural crops. However, it is logical to hypothesize that many *Fusarium* species associated with cultivated plants have emerged from populations within their natural habitats. Studying the diverse range of *Fusarium* species in natural populations and their interactions within the agricultural ecosystem could provide significant insights. Surveys of grass endophytes in natural settings have led to the discovery of new *Fusarium* species. The transfer of plant filamentous fungi from agricultural land to wild regions has consequences for both agricultural productivity and the conservation of biodiversity. This transmission of fungi from one host to another, known as "spillover," can substantially impact the prevalence of fungi and greatly influence host communities. *Fusarium* species can colonize plants during their entire growth cycle, acting as harmful plant pathogens or secondary invaders. Additionally, they can produce and accumulate various secondary toxic substances, known as mycotoxins, within plant tissues (Desjardins, 2006). Examples of mycotoxins associated with *Fusarium* species include fumonisins (FUM), deoxynivalenol (DON), HT2-toxin, T2-toxin, and zearalenone (ZEA). Fumonisins are highly poisonous and carcinogenic mycotoxins, initially identified in 1988. Fumonisin B1 is the most significant and naturally abundant type of fumonisin found in plants infected with *Fusarium*, and it is primarily produced by *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. Consumption of fumonisins has been linked to the occurrence of esophageal cancer in humans, as well as certain malignancies in animals. Zearalenone, a phenolic resorcylic acid lactone, originates from several *Fusarium* species, including *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, and *F. equiseti*. The detrimental effects of ZEA are mainly attributed to its estrogenic activity, which can cause hormonal disruptions, particularly in pigs, cattle, and sheep.

Currently, there is a lack of research on *Fusarium* spp. in grass species in western Iran. The aims of this study were to: (i) develop a reliable checklist by conducting a multi-gene phylogenetic study of *Fusarium* species associated with wild grasses in Iran, and (ii) determine if isolated *Fusarium* spp. possess the genetic capability to produce fumonisins and zearalenone.

Materials and methods

From 2019 to 2021, over two agricultural cycles, samples of *Fusarium* isolates were collected from both symptomatic and apparently healthy leaves and stems of wild grasses. The fragmented material was surface-sterilized in two cycles using 70% ethanol, each lasting 1 minute. Subsequently, the sterilized material was meticulously deposited on PCNB-PPA media, following the procedure outlined by Leslie and Summerell (2008). The media were then incubated at 25 °C for 7 days to isolate fungi. For single spore isolation and morphological identification, four media types were utilized: potato dextrose agar (PDA), potato sucrose agar (PSA), carnation leaf agar (CLA), and water agar (WA), as described in the *Fusarium* Laboratory Manual. Morphological identification was conducted based on the macroscopic and microscopic characteristics of the *Fusarium* isolates, as detailed in the manual. A total of 20 monosporic *Fusarium* strains, representative of the isolates, were selected for molecular investigations. Prior to molecular analyses, the isolates were grown on potato dextrose agar at 25 °C in the absence of light for five days. Approximately 100 mg of fungal mycelium was harvested from uncontaminated cultures. The genomic DNA was isolated from the fungal specimen using a modified CTAB procedure, as specified by Guo et al. (2000). Specific DNA loci were amplified using primer sets and PCR conditions described in O'Donnell et al. (1998) for EF-1 α , and for calmodulin gene sequences, previously amplified and sequenced with the primer pair CL1/CL2A (O'Donnell et al., 2000). Each PCR reaction was carried out in a 25 μ l volume using a thermal cycler (MyCycler, Bio-Rad, Foster, CA, USA). The PCR products were then sent to Bioneer for sequencing. Following sequencing, the nucleotide sequences were edited using BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.5 software (Hall, 1999). Similar sequences were searched in NCBI using the BLAST service (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). To investigate the toxigenic capacity of the *Fusarium* spp. isolates, PCR-based molecular studies were conducted to assess test their ability to produce fumonisin B1 and zearalenone. Specific primer pairs (PKS4F and PKS4R, and FUM1F and FUM1R) were used to target genes involved in the synthesis of mycotoxins: PKS4 (zearalenone) and FUM1 (fumonisin), respectively.


Discussion of Results & Conclusions

In this study, an extensive species diversity within the genus *Fusarium* was elucidated by integrating morphological and molecular datasets from samples obtained from indigenous wheat and barley fields. Phylogenetic analyses, based on sequences of two gene loci, *TEF-1 α* and *CAL1*, facilitated the delineation of nine distinct *Fusarium* species, each supported by robust statistical validation. Furthermore, the investigation of chemotypes and the detection of genes implicated in mycotoxin biosynthesis provided additional insights. The presence of the *FUM1* gene, a key determinant of fumonisin production, was identified in 50% of *F. proliferatum* isolates, highlighting the significant mycotoxigenic potential of this species. Furthermore, the presence of *PKS4* genes, which are associated with zearalenone biosynthesis, in 32% of *F. equiseti* isolates, highlights the importance of these fungi as potential sources of biocontaminants in agricultural produce. Spatial analysis revealed that the highest prevalence of fumonisin-producing isolates was found in the Kermanshah (66%) and Hamedan (34%) regions (Table 2), while zearalenone-producing isolates were predominantly found in Kermanshah (62%) and Lorestan (38%).

Conclusion

This comprehensive investigation, integrating morphological and molecular phylogenetic analyses of *TEF-1 α* and *CAL1* gene sequences, successfully delineated nine distinct species within the genus *Fusarium* sampled from indigenous wheat and barley fields. The study further characterized these species based on their chemotypes and the presence of critical mycotoxin biosynthesis genes. Notably, the *FUM1* gene, essential for fumonisin production, was detected in approximately 50% of *F. proliferatum* isolates, indicating a significant potential for fumonisin contamination. Similarly, the identification of *PKS4* genes, linked to zearalenone biosynthesis, in 32% of *F. equiseti* isolates highlights this species' potential mycotoxigenic capacity. Geographically, spatial analysis identified Kermanshah and Hamedan as hotspots for fumonisin-producing isolates, whereas Kermanshah and Lorestan showed the highest incidence of zearalenone-producing isolates. These findings collectively emphasize the urgent necessity for targeted monitoring and management strategies to mitigate the adverse effects of toxigenic *Fusarium* species on agricultural commodities and food safety.

جداسازی و شناسایی گونه‌های فوزاریوم مرتبط با گیاهان خودرو مزارع گندم در غرب ایران و شناسایی مایکوتوکسین‌های مهم تولیدشده توسط آنها

مریم کرمی نظرگاهی* 

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

Maryam.karami120@gmail.com

دوست مراد ظفری

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

Zafari_d@yahoo.com

خسرو چهری

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

kh.chehri@razi.ac.ir

چکیده

گونه‌های فوزاریوم، گروهی از قارچ‌های فرصت‌طلب و بیماری‌زای گیاهی هستند که به‌طور گسترده در زیستگاه‌های مختلف پراکنده شده‌اند. این قارچ‌ها به دلیل توانایی چشمگیر در تولید طیف وسیعی از مایکوتوکسین‌های بالقوه مضر برای سلامت انسان و دام، تهدیدی جدی برای امنیت غذایی و پایداری اکوسیستم‌های کشاورزی به شمار می‌روند. هدف پژوهش حاضر، ارزیابی دقیق تنوع گونه‌ای و پتانسیل توکسین‌زایی نمونه‌های فوزاریوم جداشده گیاهان خودرو در اکوسیستم‌های زراعی گندم و جو واقع در غرب ایران است. در مطالعه حاضر، ۲۶۴ جدایه از نظر مورفولوژیکی شناسایی شد. براساس ارزیابی‌های دقیق و با استفاده از مناطق ژنی کلیدی مانند ژن کدکننده فاکتور تولیدسازی ترجمه ۱-آلفا و کالمادولین، ۲۰ جدایه به‌عنوان نمونه‌های نماینده برای انجام تحلیل‌های فیلوژنتیکی پیچیده‌تر انتخاب شدند. نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنتیکی، حضور ۹ گونه متمایز از جنس فوزاریوم را در میان نمونه‌های بررسی شده تأیید کرد. این گونه‌ها شامل *F. solani*، *F. equiseti* بودند که نشان‌دهنده گسترده‌گی تنوع این قارچ‌ها در منطقه مورد مطالعه است. علاوه بر شناسایی گونه‌ها، با استفاده از تکنیک‌های مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی، حضور ژن‌های مسئول تولید مایکوتوکسین‌ها بررسی شد. نتایج نشان دادند ژن FUM1 که در تولید فومونیزین‌ها نقش دارد، در حدود ۵۰ درصد از جدایه‌های *F. proliferatum* یافت شد. همچنین، ژن PKS4 مرتبط با تولید زیراتون، در ۳۲ درصد از جدایه‌های *F. equiseti* شناسایی شد. نتایج به‌دست آمده، توانایی بالقوه این جدایه‌ها را برای تولید مایکوتوکسین‌های مزبور تأیید می‌کند. از نظر پراکندگی جغرافیایی در ۴ استان بررسی شده، بیشترین فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا به ترتیب در استان‌های کرمانشاه، همدان و لرستان و کردستان مشاهده شد. این یافته‌ها بر پیچیدگی و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های فوزاریوم در زیست‌بوم‌های طبیعی و کشاورزی ایران تأکید دارند و ضرورت اجرای برنامه‌های پایش و نظارت مستمر بر این جوامع میکروبی را به‌منظور کاهش مؤثر خطرات بالقوه ناشی از آنها بر بخش کشاورزی و سلامت عمومی برجسته می‌کنند.

واژگان کلیدی: گونه‌های فوزاریوم، گرامینه‌های وحشی، آنالیزهای فیلوژنتیکی، فومونیزین، زیراتون، غرب ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات

کرمی، مریم، ظفری، دوست مراد، چهری، خسرو. جداسازی و شناسایی گونه‌های فوزاریوم مرتبط با گیاهان خودرو مزارع گندم در غرب ایران و شناسایی مایکوتوکسین‌های

مهم تولید شده توسط آنها. زیست‌شناسی میکروبی، ۱۴۰۴؛ ۱۴(۵۴): ۶۷-۸۲. doi: 10.22108/bjm.2025.146247.1647

3060-7647/ © 2025 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



مقدمه

فوزاریوم یکی از عوامل بیماری‌زای گیاهی رایج در اغلب مناطق اقلیمی جهان به شمار می‌رود که پیامدهای اجتماعی و اقتصادی گسترده‌ای به همراه داشته است و این تأثیرات همچنان ادامه دارد (۱). سیستم طبقه‌بندی جنس فوزاریوم شامل مجموعه‌ای متنوع از گونه‌هایی است که توانایی تولید مایکوتوکسین داشته‌اند، به‌عنوان ساپروفیت، اندوفیت و پاتوژن‌های گیاهی فعالیت می‌کنند و از این جهت، تهدیدی بالقوه برای سلامت انسان‌ها و حیوانات محسوب می‌شوند. پیشینه مطالعاتی انجام‌شده پیرامون این جنس، بر اهمیت اقتصادی قابل‌توجه آن تأکید دارد، به‌ویژه با تمرکز بر گونه‌هایی که به محصولات کشاورزی مرتبط هستند. با این حال، به نظر می‌رسد بخش چشمگیری از گونه‌های فوزاریوم مرتبط با گیاهان زراعی، خاستگاهی از جمعیت‌های طبیعی در زیستگاه‌های بومی داشته‌اند. انتقال قارچ‌های رشته‌ای گیاهی از اکوسیستم‌های کشاورزی به زیستگاه‌های طبیعی نقش کلیدی در حفظ تنوع زیستی ایفا می‌کند. انتقال قارچ‌ها از یک میزبان به میزبان دیگر که به آن «اسپیلور» گفته می‌شود، می‌تواند تأثیر چشمگیری بر شیوع قارچ‌ها داشته باشد و بر جوامع میزبان به شدت تأثیر بگذارد (۲). مطالعه تنوع گونه‌ای فوزاریوم در جمعیت‌های طبیعی و نحوه تعامل آنها با اکوسیستم‌های کشاورزی، می‌تواند بینش‌های ارزشمندی در زمینه اکولوژی و بیماری‌زایی این جنس فراهم آورد. شواهد حاصل از بررسی اندوفیت‌های گیاهان علفی در زیستگاه‌های طبیعی، منجر به شناسایی و توصیف گونه‌های جدیدی از فوزاریوم شده است که پیش‌تر ناشناخته بوده‌اند (۳).

گونه‌های فوزاریوم قادرند در طی چرخه کامل رشد گیاهان، آنها را کلونی‌سازی کنند و به‌عنوان عوامل بیماری‌زای اولیه یا مهاجمان ثانویه عمل کنند. افزون بر این، بسیاری از این گونه‌ها توانایی تولید و تجمع طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه سمی موسوم به مایکوتوکسین‌ها را در بافت‌های گیاهی دارند که این ترکیبات می‌توانند اثرات

زیان‌بار چشمگیری بر سلامت گیاه، انسان و دام بر جای گذارند (۴). مایکوتوکسین‌هایی نظیر فومونیزین‌ها (FUM)، دتوکسی‌نیوالنول (DON)، HT2، T2، و زیرالنون (ZEA) از جمله متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به‌طور عمده توسط گونه‌های مختلف جنس فوزاریوم تولید می‌شوند (۵، ۶). فومونیزین‌ها مایکوتوکسین‌های بسیار سمی و سرطان‌زا هستند که نخستین بار در سال ۱۹۸۸ شناسایی شدند. در میان آنها، فومونیزین B مهم‌ترین و شایع‌ترین فرم بوده است که به‌طور عمده در گیاهان آلوده یافت می‌شود. فومونیزین B1، رایج‌ترین زیرگونه این گروه، عمدتاً توسط *F. verticillioides* و *F. proliferatum* تولید می‌شود و بالاترین غلظت را در نمونه‌های آلوده دارد. مطالعات اپیدمیولوژیک بیان کرده‌اند مصرف فومونیزین با بروز سرطان مری در انسان‌ها و همچنین برخی از بدخیمی‌ها در حیوانات مرتبط است (۵). زیرالنون یک لاکتون اسید رسورسیلیک فنولی است که از بسیاری از گونه‌های فوزاریوم، از جمله *F. crookwellense*، *F. culmorum*، *F. graminearum* و *F. equiseti* منشأ می‌گیرد. اثرات مضر زیرالنون عمدتاً به فعالیت استروژنی آن نسبت داده می‌شود که منجر به اختلالات هورمونی، به‌ویژه در خوک‌ها، گاو‌ها و گوسفندها می‌شود (۶). مطالعات متعدد نشان داده‌اند حضور گرامینه‌های وحشی رشدیافته در حاشیه مزارع کشاورزی، بر فراوانی گونه‌های فوزاریوم، ترکیب جامعه گونه‌ها و میزان تجمع مایکوتوکسین‌ها در گیاهان زراعی تأثیر درخور توجهی دارد؛ به‌ویژه در بخش‌هایی از مزرعه که به‌طور مستقیم مجاور این گیاهان خودرو قرار دارند. این گیاهان به‌عنوان زیستگاه‌های مطلوب و مناسبی برای گونه‌های فوزاریوم شناخته می‌شوند و به‌طور گسترده در چشم‌اندازهای نیمه‌طبیعی، مانند گودال‌ها، پرچین‌ها و مرزهای بین مزارع، حضور دارند؛ از این‌رو، مطالعه علف‌های رشدیافته در مجاورت محصولات کشاورزی، به‌عنوان عوامل مؤثر در تعیین تنوع گونه‌ای و ساختار جوامع فوزاریوم ضروری و

آلوده و پوسیدگی گرامینه‌های وحشی، استان کرمانشاه بررسی شد. براساس خصوصیات مورفولوژیکی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سه گونه *F. verticillioides*، *F. proliferatum* و *F. subglutinans* شناسایی شدند (۱۲).

طبق جست‌وجوهای انجام‌شده مطالعه‌ای مبتنی بر گونه‌های فوزاریوم در گونه‌های علفی در غرب ایران منتشر نشده است و سؤالات بسیاری در این زمینه وجود دارد که از رایج‌ترین سؤالات سازوکار اثربخشی گونه‌های جداسازی شده فوزاریوم در تولید فومونیزین‌ها و زیرالنون است. براساس شواهد مذکور اهداف این مطالعه عبارت بودند از (i) ایجاد یک لیست قابل اعتماد با انجام یک مطالعه فیلوژنتیکی چند ژنی از گونه‌های فوزاریوم که در ارتباط با گیاهان خودرو در ایران یافت می‌شوند؛ (ii) تعیین اینکه آیا گونه‌های جداسازی شده فوزاریوم توانایی ژنتیکی تولید فومونیزین‌ها و زیرالنون را دارند.

مواد و روش‌ها

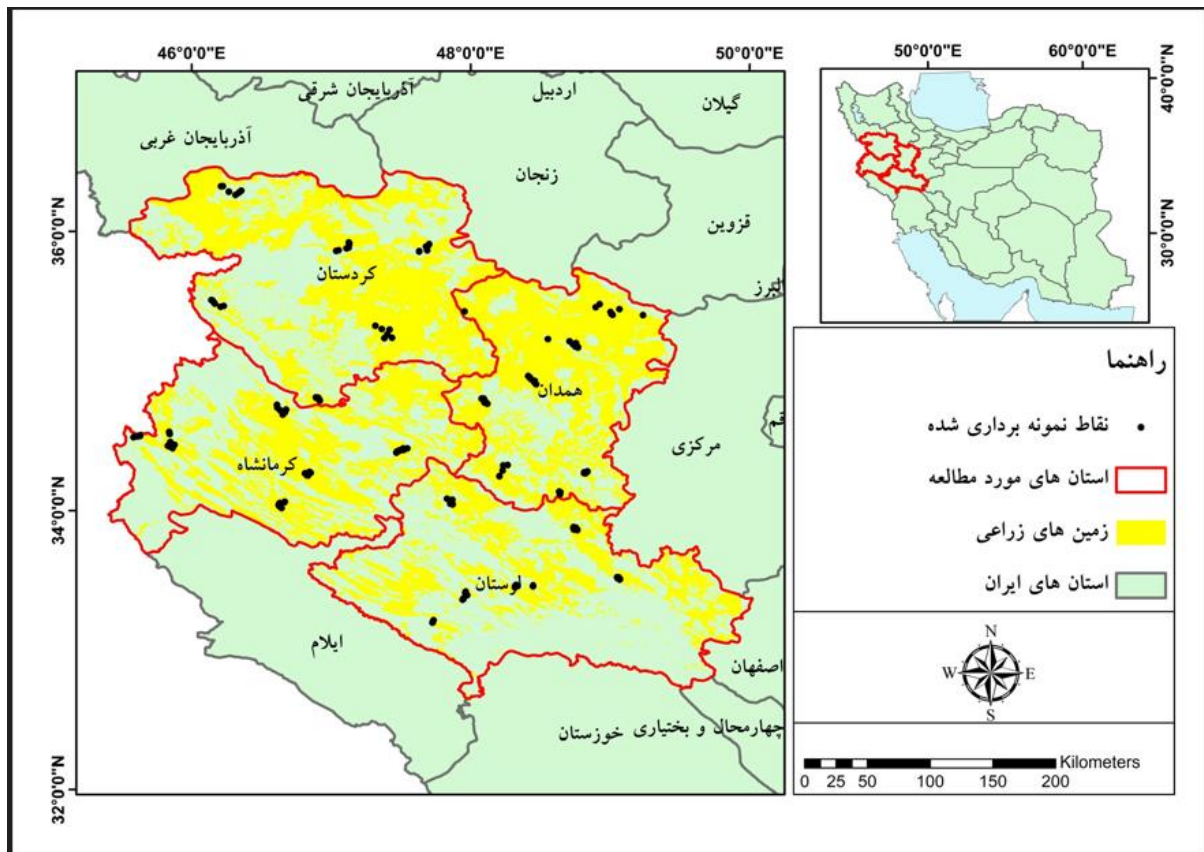
نمونه‌برداری و جداسازی

طی دو سال زراعی، از سال ۲۰۱۹ تا ۲۰۲۱، نمونه‌هایی از جدایه‌های فوزاریوم از برگ و ساقه‌های گیاهان خودرو علامت‌دار و ظاهراً سالم جمع‌آوری شد. شکل ۱ موقعیت جغرافیایی مزارع گندم و جو بررسی شده در این پژوهش را در مناطق مختلف غرب ایران نشان می‌دهد. نمونه‌ها برای جداسازی و خالص‌سازی به آزمایشگاه منتقل شدند. مواد تکه‌تکه‌شده در دو مرحله ضدعفونی سطحی، هر بار به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند. سپس با آب استریل، شسته و با استفاده از کاغذ صافی خشک شدند. در ادامه، طبق روش توصیف‌شده توسط Summerell and Leslie (2008) قطعات به‌طور دقیق روی محیط کشت اختصاصی PCNB-PPA کشت داده شدند. سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز انکوبه شدند تا رشد قارچ و جداسازی جدایه‌های فوزاریوم امکان‌پذیر شود (۱۳).

حیاتی است. در مطالعه‌ای که در شش منطقه مختلف برزیل انجام شد، جدایه‌های فوزاریوم از دانه‌های بدون علامت گیاهان خودرو ایزوله شدند. گونه‌های *F. fujikuroi*، *F. chlamydosporum incarnatum-equiseti* شناسایی شدند که شامل پاتوژن‌های شناخته‌شده گیاهی، گونه‌های مایکوتوکسین‌زا و اندوفیت‌ها هستند. همچنین در این بررسی، دو گونه جدید به نام‌های *F. caapi* و *F. brachiariae* شناسایی شدند (۷). جدایه‌هایی از فوزاریوم از گیاهان علفی مهم کشاورزی در آفریقا و برزیل بازیابی شد و با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و تحلیل‌های فیلوژنتیکی سه گونه *F. madaense*، *F. andiyazi* و *F. mirum* شناسایی شدند (۸). مطالعه‌ای که در منطقه مانیتوبا و روی گیاهان خودرو انجام شد، به شناسایی گونه‌های *Fusarium graminearum*، *F. avenaceum*، *F. oxysporum*، *F. equiseti* و *F. culmorum* منجر شد (۹). تولید مایکوتوکسین توسط گونه‌های بازیابی‌شده از میزبان‌های غیرکشاورزی مانند گیاهان خودرو تاکنون به‌طور چشمگیر بررسی نشده است.

براساس نتایج حاصل از یک مطالعه، ۱۲ گونه فوزاریوم از گیاهان خودرو در مناطق مختلف مالزی جداسازی و شناسایی شدند و تولید چهار مایکوتوکسین اصلی یعنی مونیلیفورمین (MON)، فومونیزین (FB1) (B1)، زیرالنون (ZEN) و بایورسین (BEA) در گونه‌های جداسازی‌شده ارزیابی شدند (۱۰).

در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی تنوع زیستی گونه‌های فوزاریوم مرتبط با گرامینه‌های وحشی صورت گرفت، با بهره‌گیری از داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی، گونه‌های *F. cf. torulosum*، *F. brachygibbosum* و *F. reticulatum var. negundis* شناسایی شدند (۱۱). همچنین به‌منظور تعیین جدایه‌های مولد فومونیزین در مجموعه گونه‌های *Fusarium fujikuroi* (FFSC)، مرتبط با سنبله‌های



شکل ۱. مکان‌های مطالعه‌شده در سراسر غرب ایران روی نقشه نشان داده شده است.

Figure 1. Study sites across western Iran are shown on the map. The study sites are represented by colored circles originating from wheat and barley fields of wild oats.

۵۰ درصد و گلیسرین، تهیه و شناسایی جدایه‌ها براساس منابع علمی معتبر انجام شد. برای بررسی دقیق ویژگی‌های میکروسکوپی، سویه‌ها روی محیط آگار برگ میخک، کشت و در دمای 1 ± 25 درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز در انکوباتور نگهداری شدند.

استخراج DNA، PCR، تعیین توالی و آنالیزهای فیلوژنتیکی

در مجموع، ۲۰ جدایه نماینده از جنس فوزاریوم برای انجام تحلیل‌های مولکولی انتخاب شدند. این جدایه‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در بشرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت دکستروز سیب‌زمینی (PDB) در شیکر انکوباتور کشت داده شدند. استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های قارچی با بهره‌گیری از روش اصلاح‌شده

شناسایی مورفولوژیکی

برای جداسازی تک‌اسپور و شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌ها، از چهار محیط کشت شامل دکستروز آگار سیب‌زمینی (PDA)، ساکارز آگار سیب‌زمینی (PSA)، آگار برگ میخک (CLA) و واتر آگار (WA) استفاده شد. این محیط‌ها مطابق با روش‌های توصیف‌شده توسط سامر و لسلی، تهیه و به کار گرفته شدند (۱). شناسایی اولیه جدایه‌های قارچی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی میکروسکوپی شامل رنگ و بافت پرگنه و ویژگی‌های میکروسکوپی نظیر نوع و ابعاد کنیدیوفورها، مشخصات سلول‌های کنیدیوم‌زا و شکل، رنگ و ابعاد کنیدیوم‌ها انجام شد. به‌منظور بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی میکروسکوپی، از هریک از جدایه‌ها اسلایدهای میکروسکوپی در محلول اسیدلاکتیک

ترجمه ۱-آلفا (TEF1 α) و کالمودولین استفاده شد. مشخصات آغازگرهای به کاررفته در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

CTAB، مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط Guo et al (2000) انجام گرفت (۱۴). در این پژوهش، به منظور تکثیر بخش‌هایی از DNA ژنومی، از جفت آغازگرهای EF1/EF2 و CL1/CL2A به ترتیب برای نواحی ژنی فاکتور طویل‌سازی

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

Table 1. Characterization of primer pairs employed in the Polymerase Chain Reaction (PCR) assay.

نام آغازگر	ژن هدف	توالی	اندازه محصول	منبع
EF1 EF2	TEF	ATGGGTAAGGAGGACAAGA GGAAGTACCAAGTGATCATGTT	650-700	O'Donnell et al., 1998
CL1 CL2A	CAL1	GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC TTTTTGCATCATGAGTTGGAC	500-850	O'Donnell et al., 2000

فومونیزین B₁ و زیرالنون بررسی شدند. از جفت آغازگرهای اختصاصی FUM1R و FUM1F، PKS4R و PKS4F، به ترتیب برای هدف قرار دادن ژن‌های مسیر سنتز PKS4 (زیرالنون) و FUM1 (فومونیزین) استفاده شد (جدول ۲) (۱۷). PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس دو ایکس (شرکت آمپلیکون)، ۹ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز، ۱ میکرولیتر پیشرو و معکوس و ۱ میکرولیتر DNA الگو در دستگاه ترموسایکلر (Gradient Thermal cycler Bio Rad, USA) انجام گرفت. برنامه حرارتی شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه، اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه و بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه برای فومونیزین و واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه، اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه، بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه و بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۷ دقیقه برای زیرالنون انجام شد (۱۸).

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. ترکیبات واکنش شامل، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس ۲ ایکس^۳ (شرکت آمپلیکون)، ۹ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز، ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای پیشرو و معکوس و ۱ میکرولیتر DNA الگو بود. واکنش‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Gradient Thermal cycler Bio Rad, USA) براساس برنامه‌های حرارتی اختصاصی هر آغازگر انجام گرفت (۱۵) و (۱۶). محصولات PCR برای تعیین توالی نواحی تکثیرشده، از طریق شرکت توپاز به شرکت مایکروساینت (سوئیس) ارسال شدند. برای هر مکان ژنی تکثیرشده، توالی جدایه‌های فوزاریوم جداشده از گیاهان خودرو، با توالی‌های موجود در داده بانک ژن (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مقایسه شدند و با توالی‌های با درصد مشابهت بالا با استفاده از الگوریتم کلاستال دبل یو هم‌تراز شدند. روابط فیلوژنتیکی با استفاده از روش مستر بیزی و حداکثر صرفه‌جویی در سایت سپرس مطالعه شد. ظرفیت توکسین‌زایی گونه‌های *F. proliferatum* و *F. equiseti* به‌عنوان جدایه‌هایی با فراوانی بیشتر توسط آنالیز مطالعات مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بررسی شد. این جدایه‌ها برای تولید

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای پتانسیل تولید فومونیزین و زیرانون

Table 2. Characterization of primers utilized for assessing the potential of fumonisin and zearalenone production.

نام آغازگر	ژن هدف	توالی	اندازه محصول	منبع
FUM1F FUM1R	FUM1	CCATCACAGTGGGACACAGT GGAAGTACCAGTGATCATGTT	183	Bluhm et al., 2004
PKS4F PKS4R	PKS4	GGTTGCATACGAGGCCTT TAGTACGGTGGATAGC	753	Neera and H. S. Murali., 2021

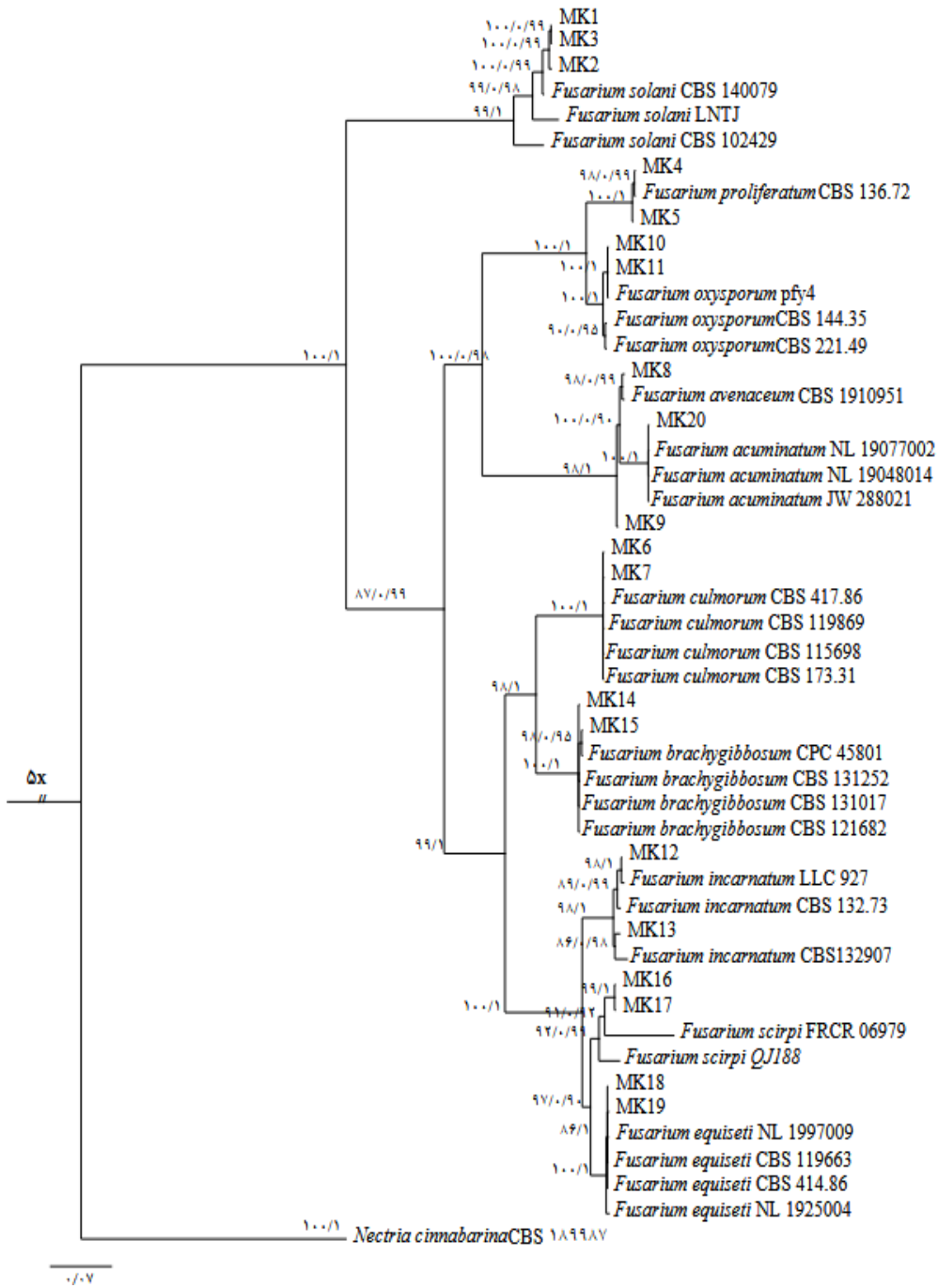
نتایج

نتایج جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

در مجموع ۴۲۴ جدایه قارچی از گیاهان خودرو مزارع گندم و جو جمع آوری شد که از این تعداد ۲۶۴ جدایه براساس داده‌های ریخت‌شناسی مربوط به جنس فوزاریوم بود. طبق شناسایی‌های مورفولوژیکی که براساس کلید شناسایی صورت گرفت (۱۳). ۲۰ جدایه به‌عنوان نماینده برای تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی انتخاب شدند. مجموعه داده‌ها شامل توالی‌های DNA دو جایگاه ژنی (فاکتور طول‌سازی ترجمه ۱-آلفا: ۱۹ و کالمودولین: ۲۰) از جدایه‌های انتخابی بود و *Nectria. cinnabarina* به‌عنوان گروه خارجی در تحلیل‌های فیلوژنتیکی استفاده شد. توالی‌های ژنی تک هم‌تراز شده به هم متصل شدند و تحت ماکسیمم پارسیمونی و مستریزی قرار گرفتند. برای هر جدایه، یک توالی ژنی به هم پیوسته از ۱۶۶۲ موقعیت در نظر گرفته شد. از این تعداد، ۸۷۳ کاراکتر ثابت، ۱۶۳ کاراکتر متغیر و بدون اطلاعات مفید و ۶۲۶ کاراکتر اطلاعات مفید بودند. تحلیل ماکسیمم پارسیمونی از ۶۲۶ ویژگی اطلاعاتی باقی‌مانده، منجر به ایجاد درخت فیلوژنی با بیشترین صرفه‌جویی شد (TL=۱۶۳۱)، (CI=۰/۷۱۸، RI=۰/۹۲۵، HI=۰/۲۸۲). تحلیل‌های بیزی حاصل از هم‌ردیفی‌های به‌هم‌پیوسته دو جایگاه، منجر به تولید ۱۴۰۲ درخت فیلوژنتیکی شد که از این تعداد، ۳۵۰ درخت ابتدایی به‌عنوان درخت سوخته حذف شدند. درخت اجماع و مقادیر احتمال پسین (PP) از مجموع ۱۰۵۲ درخت باقیمانده حاصل از تحلیل بیزی محاسبه شدند. میانگین

انحراف معیار فراوانی‌های تقسیم شده در پایان اجرای زنجیره برابر با ۰/۰۰۹۹۶۱ بود که نشان‌دهنده همگرایی مناسب تحلیل است.

درخت فیلوژنتیک ماکسیمم پارسیمونی روی درخت مستریزی، ترسیم و در شکل ۲ نمایش داده شده است. نتایج حاصل از این تحلیل‌ها امکان شناسایی و تفکیک ۹ گونه متمایز فوزاریوم را فراهم کرد که همگی با سطوح بالای پشتیبانی آماری تأیید شدند. مطابق با نتایج حاصل از مقایسه با سویه‌های مرجع، سه جدایه MK1، MK2 و MK3 همولوژی بسیار بالایی با سویه‌های مرجع *F. solani* نشان دادند و در تحلیل‌های فیلوژنتیکی در همان خوشه قرار گرفتند. جدایه‌های MK4 و MK5 در تحلیل فیلوژنتیکی با سویه مرجع *F. proliferatum* CBS 136.72 در یک خوشه قرار گرفتند. در شاخه مربوط به جدایه‌های مرجع *F. oxysporum* دو جدایه MK10 و MK11 قرار گرفتند. جدایه MK8 همولوژی بسیار نزدیک با جدایه مرجع *F. avenaceum* نشان داد. دو جدایه MK9 و MK20 به‌عنوان گونه‌های *F. acuminatum* شناخته شدند. جدایه‌های MK6 و MK7 با *F. culmorum*، MK14 و MK15 با *F. brachygibbosum* و MK12 و MK13 با سویه‌های مرجع *F. incarnatum* خوشه‌بندی شدند. جدایه‌های MK16 و MK17 ارتباط نزدیکی با جدایه‌های مرجع *F. sciripi* داشتند و در نهایت در شاخه مربوط به جدایه‌های مرجع *F. equiseti* دو جدایه MK18 و MK19 گروه‌بندی شدند. استان و مکان جداسازی این گونه‌ها در جدول ۳ ذکر شده‌اند.



شکل ۲. درخت فیلوژنتیک رسم شده به روش حداکثر صرفه‌جویی که از تجزیه و تحلیل داده‌های ترکیبی توالی CAL1 و TEF1 به دست آمده است. مقادیر پشتیبانی بوت استرپ MP/BI در گره‌ها نشان داده شده‌اند. درخت فیلوژنتیک با *Nectria. cinnabarina* CBS 189987 ریشه‌یابی شده است.

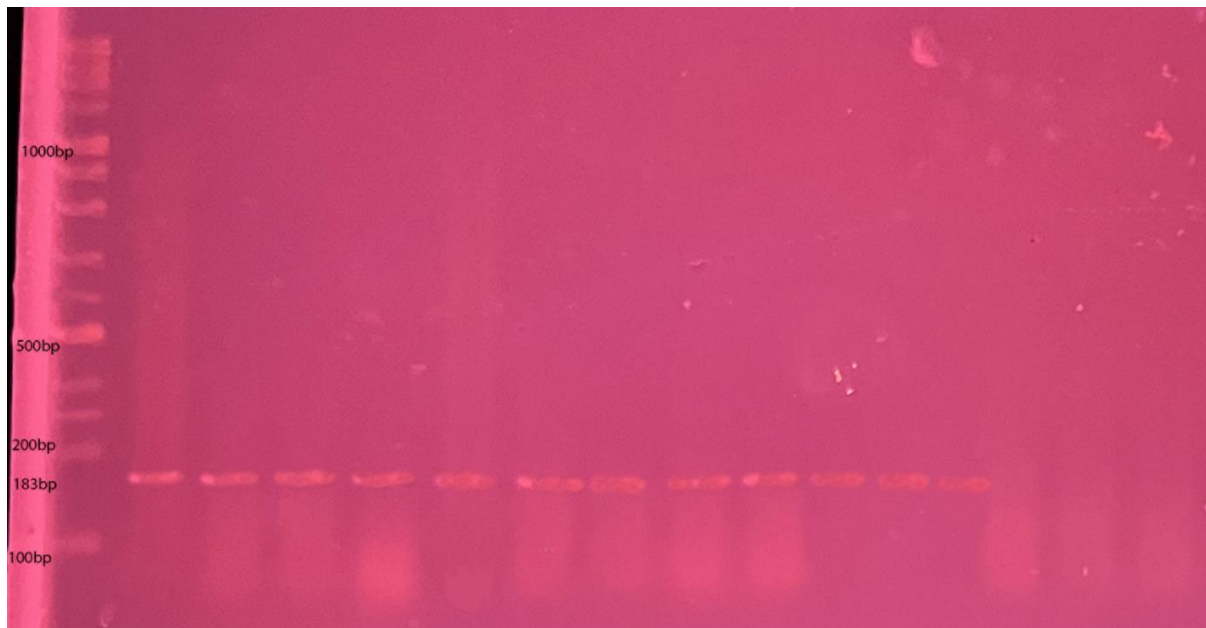
Figure 2. The phylogenetic tree drawn by the maximum parsimony method, obtained from the combined analysis of CAL1 and TEF1 sequence data. Bootstrap support values MP/BI at the nodes are indicated. The phylogenetic tree was rooted with *Nectria cinnabarina* CBS 189987.

بالقوه فومونیزین شناسایی شدند (شکل ۳). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدایه‌های *F. equiseti* با آغازگرهای PKS4R و PKS4F نشان داد ۸ جدایه از ۲۵ جدایه شناسایی شده به‌عنوان *F. equiseti* (۳۲ درصد) تولید قطعات ۷۵۳ جفت‌بازی می‌کنند و به‌عنوان جدایه‌های تولیدکننده تپ شیمیایی زیرالنون (ZEA) شناخته شدند (شکل ۴). بیشترین میزان جدایه‌های تولیدکننده فومونیزین در مناطق کرمانشاه (۵۸ درصد) و همدان (۴۱ درصد) مشاهده شد (جدول ۴). فراوانی تولید زیرالنون در جدایه‌هایی مشاهده شد که از کرمانشاه (۶۲ درصد) و لرستان (۳۸ درصد) جداسازی و شناسایی شدند.

نتایج تیپ‌های شیمیایی گونه‌های کمپلکس *F.*

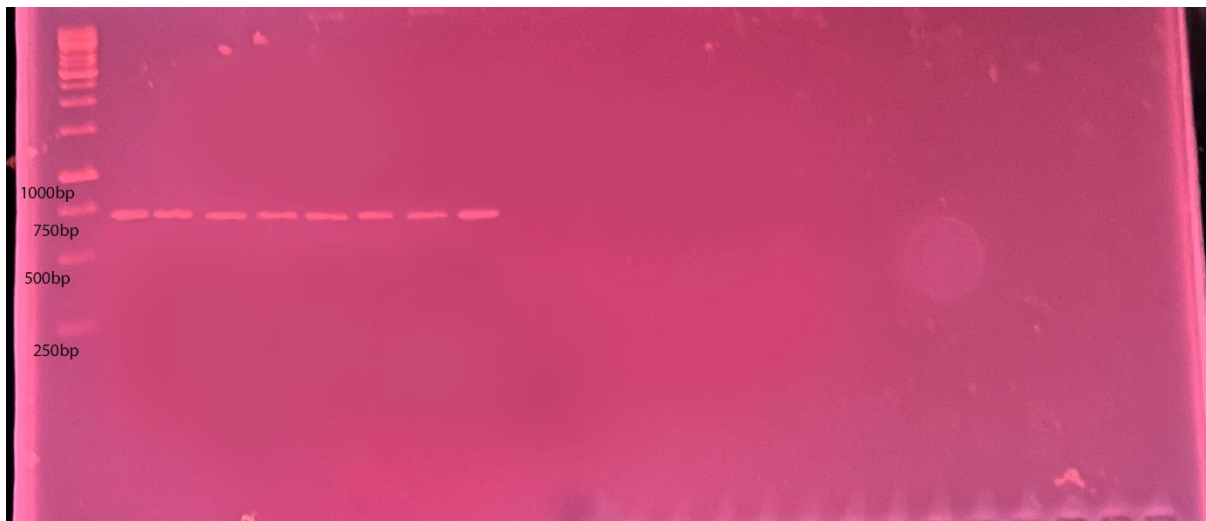
F. equiseti و *proliferatum*

نتایج واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی فومونیزین‌ها و زیرالنون‌ها نشان دادند تیپ‌های شیمیایی FUM1 در بین جمعیت گونه‌های کمپلکس *F. equiseti* و *proliferatum* در ZEA و گونه‌های کمپلکس *F. equiseti* وجود دارد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای FUM1F و FUM1R نشان داد ۱۲ جدایه از ۲۴ جدایه شناسایی شده به‌عنوان *F. proliferatum* (۵۰ درصد) تولید قطعات ۱۸۳ جفت‌بازی می‌کنند و به‌عنوان تولیدکنندگان



شکل ۳. تشخیص PCR جدایه‌های تولیدکننده فومونیزین با استفاده از جفت آغازگرهای FUM1F/FUM1R.

Figure 3. PCR-based identification of fumonisin-producing isolates with FUM1F/FUM1R primers



شکل ۴. تشخیص PCR جدايه‌های توليدکننده زیرالنول با استفاده از جفت آغازگرهای PKS4F/PKS4R.

Figure 4. PCR-based identification of zearalenone-producing isolates with PKS4F/PKS4R primers.

جدول ۳. مشخصات نمونه‌های بررسی شده در مطالعات فایلوژنتیکی

Table 3. Characteristics of the examined samples in phylogenetic studies assay.

نام گونه	جدایه	میزبان	محل نمونه برداری
<i>F. solani</i>	MK1	<i>Vicia Villosa</i>	Khoramabad
	MK2	<i>Convolvulus arvensis</i>	Khoramabad
	MK3	<i>Alyssum minus</i>	Dehgolan
<i>F. proliferatum</i>	MK4	<i>Hordeum glaucum</i>	Mahidasht
	MK5	<i>Adonis parviflora</i>	Bahar
<i>F. oxysporum</i>	MK10	<i>Galium aparine L</i>	Bijar
	MK11	<i>Elymus repens</i>	Kamyaran
<i>F. avenaceum</i>	MK8	<i>Adonis parviflora</i>	Bahar
<i>F. acuminatum</i>	MK9	<i>Descurainia Sophia</i>	Bahar
	MK20	<i>Adonis parviflora</i>	Bijar
<i>F. culmorum</i>	MK6	<i>Avena fatua</i>	Islamabad
	MK7	<i>Cynodon dactylon</i>	Mahidasht
<i>F. brachygibbosum</i>	MK14	<i>Torilis arvensis</i>	Bistoon
	MK15	<i>Dactylis glumerata</i>	Mahidasht
<i>F. incarnatum</i>	MK12	<i>Delphinium staphisagria</i>	Dehgolan
	MK13	<i>Descurainia Sophia</i>	Dorood
<i>F. scirpi</i>	MK16	<i>Sorghum halepens</i>	Boroojerd
	MK17	<i>Malva sylvestris</i>	Islamabad
<i>F. equiseti</i>	MK18	<i>Descurainia Sophia</i>	dorood
	MK19	<i>Dactylis glumerata</i>	khoramabad

جدول ۴. مناطق نمونه‌برداری شده مرتبط با جدایه‌های *F. equiseti* و *F. proliferatum*

Table 3. Characteristics of sampling regions for *F. proliferatum* and *F. equiseti* isolates.

منطقه	میزبان و گونه‌های <i>F. proliferatum</i> شناسایی شده	میزبان و گونه‌های <i>F. equiseti</i> شناسایی شده
کرمانشاه	<i>Bromus tectorus</i> (zghm2h, khm1k) <i>Avena fatua</i> (5-110, MK30) <i>Lolium temulentus</i> (MK32 و MK28)	<i>Dactylis glomerata</i> (MK26, MK19) <i>Malva sylvestris</i> (PnB1) <i>Adonis parviflora</i> (Apk4) <i>Cynodon dactylon</i> (Cdm1)
همدان	<i>Hordeum glaucum</i> (MK4) <i>Cynodon dactylon</i> (MK3) <i>Sorghum halepense</i> (Ghh3) <i>Hordeum glaucum</i> (Khap6)	-
لرستان	<i>Adonis parviflora</i> (MK41) <i>Avena fatua</i> (MK37)	<i>Descurainia Sophia</i> (MK18) <i>Sorghum halepense</i> (Ghh5) <i>Malva sylvestris</i> (MK43)

بحث

در مطالعه حاضر، تنوع گونه‌ای قابل توجهی از جنس فوزاریوم از گیاهان خودروی مزارع گندم و جو در غرب ایران، با رویکرد ترکیبی مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی شد. استفاده از توالی‌یابی دو جایگاه ژنی فاکتور طول‌ساز ترجمه ۱-آلفا (TEF-1 α) و کالمودولین (CaM) در کنار تحلیل‌های فیلوژنتیکی مبتنی بر روش‌های حداکثر صرفه‌جویی و بیزی، امکان شناسایی دقیق و معتبر گونه‌ها را فراهم آورد. این تطابق قوی بین نتایج مولکولی و شناسایی‌های مورفولوژیکی که براساس کلیدهای استاندارد صورت گرفت، اعتبار یافته‌های ما را به خوبی تأیید می‌کند. یافته‌های این تحقیق مبنی بر تنوع گسترده گونه‌های فوزاریوم در گیاهان خودرو، با گزارش‌های پیشین از سایر نواحی ایران و جهان همسو است (۱۷، ۱۸)؛ برای مثال، در مطالعه‌ای مشابه که توسط Postic et al (2012) در مانتوبای جنوبی کانادا روی گل‌آذین گندمیان وحشی انجام شد، هفت گونه فوزاریوم شامل *F. sporotrichoides*، *F. graminearum*، *F. equiseti*، *F. avenaceum*، *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. acuminatum*، *F. oxysporum*، *F. avenaceum*، *F. equiseti*، *F. culmorum* و *F. poae* جداسازی شدند که

graminearum به‌عنوان گونه غالب گزارش شد (۱۹). همچنین، اینچ و گیلبرت در کرواسی، ۱۴ گونه فوزاریوم را از گونه‌های مختلف علف هرز جداسازی کردند که بیشترین فراوانی مربوط به *F. graminearum*، *F. subglutinans*، *F. oxysporum* و *F. proliferatum* بود. این مقایسه‌ها نشان‌دهنده همگرایی در تنوع گونه‌ای فوزاریوم در گیاهان خودروی مناطق مختلف جغرافیایی است که اهمیت آنها را به‌عنوان میزبان‌های جایگزین این قارچ‌ها برجسته می‌کند. در ایران نیز تحقیقات اندکی روی گونه‌های فوزاریوم مرتبط با گیاهان خودرو صورت گرفته است. داوری و همکاران با استفاده از مطالعات ریخت‌شناختی و توالی‌یابی TEF-1 α ، ۱۵ گونه فوزاریوم را از گل‌آذین گیاهان وحشی در استان اردبیل شناسایی و گزارش کردند که این امر نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه را در کشور نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر، ۱۰ گونه از جنس فوزاریوم شامل *F. solani*، *F. proliferatum*، *F. acuminatum*، *F. oxysporum*، *F. avenaceum*، *F. incarnatum*، *F. brachygibbosum*، *F. culmorum* و *F. scirpi* از گیاهان علفی همجوار با مزارع

زراعی در چهار استان غربی ایران شناسایی شدند. این گیاهان علفی می‌توانند به‌عنوان مخازن مهمی

برای بقا و انتشار عوامل بیماری‌زای فوزاریوم در اکوسیستم‌های کشاورزی عمل کنند. تحلیل فراوانی نسبی گونه‌ها نشان داد *F. proliferatum* و *F. equiseti* به‌ترتیب به‌عنوان غالب‌ترین گونه‌ها در مناطق بررسی‌شده شناخته شدند. این یافته‌ها نه تنها اطلاعات ارزشمندی درباره الگوهای پراکنش این قارچ‌ها در منطقه ارائه می‌دهند؛ بلکه بر اهمیت شناسایی دقیق گونه‌ای برای درک بهتر دینامیک جمعیت‌های فوزاریوم و پتانسیل بیماری‌زایی آنها تأکید می‌ورزند. حضور این گونه‌ها، به‌ویژه گونه‌های غالب، حاکی از سازگاری بالای آنها با شرایط محیطی منطقه و پتانسیل بالای آنها برای گسترش است. با توجه به توانایی بسیاری از گونه‌های فوزاریوم در تولید طیف وسیعی از مایکوتوکسین‌ها و از آنجایی که گیاهان علفی گرامینه بخش قابل توجهی از خوراک دام در ایران را تشکیل می‌دهند، بررسی تیپ‌های شیمیایی این قارچ‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. تعیین پروفایل مایکوتوکسینی گونه‌های شناسایی‌شده، به‌ویژه گونه‌های غالب، می‌تواند به ارزیابی دقیق‌تر خطرات بالقوه برای سلامت دام‌ها کمک شایانی کند. در این راستا، تشخیص ژن FUM1 که مسئول بیوسنتز فومونیزین است، در ۵۰ درصد از جدایه‌های *F. proliferatum* نشان‌دهنده پتانسیل بالای این گونه برای تولید این توکسین‌های مهم قارچی است. همچنین، شناسایی ژن‌های PKS4 مرتبط با تولید زیرانون در ۳۲ درصد از جدایه‌های *F. equiseti*، بر اهمیت این گونه‌ها به‌عنوان منابع بالقوه آلاینده‌های زیستی در محصولات کشاورزی دلالت دارد. این سموم، علاوه بر تأثیر مستقیم بر سلامت گیاه، به‌دلیل سمیت بالا می‌توانند خطرات

جدی برای سلامت انسان و دام ایجاد کنند. فراوانی بالای جدایه‌های تولیدکننده فومونیزین در مناطق کرمانشاه و همدان و همچنین تولیدکنندگان زیرانون در کرمانشاه و لرستان، بیان‌کننده نیاز به انجام نظارت مستمر و انجام مطالعات جامع‌تر در این مناطق برای ارزیابی دقیق‌تر ریسک سلامت عمومی است.

در نهایت، پیشنهاد می‌شود مطالعات آتی بر بررسی عوامل محیطی مؤثر بر توکسین‌زایی و پراکنش گونه‌ها تمرکز کنند. علاوه بر این، بررسی توان بالقوه گونه‌های فوزاریوم در تولید توکسین‌های دیگر و اثرات ترکیبی (هم‌افزایی یا آنتاگونیستی) آنها می‌تواند به درک بهتر خطرات و پیامدهای اکولوژیکی کمک کند. همچنین، استفاده از روش‌های پیشرفته‌تر توالی‌یابی، مانند متازنومیکس یا توالی‌یابی در مقیاس وسیع (NGS) و تحلیل‌های جمعیت‌شناسی مولکولی می‌تواند عمق بیشتری به شناخت ساختار جمعیت‌های این قارچ‌ها و الگوهای تکاملی آنها بدهد.

نتیجه‌گیری

این پژوهش به شناسایی و بررسی تنوع گونه‌های جنس فوزاریوم در مزارع گندم و جو غرب ایران با استفاده از روش‌های ترکیبی مورفولوژیکی و مولکولی توالی‌یابی ژن‌های فاکتور طویل‌سازی ترجمه ۱-آلفا و کالمادولین پرداخت. هدف اصلی، ارزیابی تنوع گونه‌ای فوزاریوم و تعیین پتانسیل تولید مایکوتوکسین‌ها توسط این قارچ‌ها در منطقه مورد مطالعه بود. نتایج این تحقیق می‌تواند در کاهش خطرات ناشی از آلودگی مایکوتوکسینی در محصولات کشاورزی منطقه مؤثر باشد.

References

- Summerell BA, Laurence MH, Liew EC, Leslie JF. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity*. 2010;44(1):3-13.
<https://doi.org/10.1007/s13225-010-0060-2>
- Gilbert GS, Hubbell SP. Plant diseases and the conservation of tropical forests. *BioScience*. 1996;46(2):98-106.
<https://doi.org/10.2307/1312812>
- Ma N, Abdul Haseeb H, Xing F, Su Z, Shan L, Guo W. *Fusarium avenaceum*: A toxigenic pathogen causing ear rot on maize in yunnan province, China. *Plant Dis*. 2019;103(6):1424.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-2034-PDN>
- Desjardins AE, Proctor RH. Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. *Fungal Biology*. 2011;115(1):38-48.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-2034-PDN>
- Miller J, Savard M, Schaafsma A, Seifert K, Reid L. Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1995;17(3):233-9.
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19961002204>
- Oldenburg E, Höppner F, Ellner F, Weinert J. *Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. *Mycotoxin research*. 2017;33(3):167-82.
<https://doi.org/10.1007/s12550-017-0277-y>
- Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Manes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*. 2007;45(1):1-18.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>
- Costa MM, Melo MP, Carmo FS, Moreira GM, Guimarães EA, Rocha FS, et al. *Fusarium* species from tropical grasses in Brazil and description of two new taxa. *Mycological Progress*. 2021; 20(1): 61-72.
<https://doi.org/10.1007/s11557-020-01658-5>
- Inch S, Gilbert J. The incidence of *Fusarium* species recovered from inflorescences of wild grasses in southern Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2003;25(4):379-83.
<https://doi.org/10.1080/07060660309507093>
- Azliza IN, Hafizi R, Nurhazrati M, Salleh B. Production of major mycotoxins by *Fusarium* species isolated from wild grasses in peninsular Malaysia. *Sains Malays*. 2014;43:89-94.
<https://doi.org/10.11598/btb.2009.16.2.57>
- Davari M, Wei S, Babay-Ahari A, Arzanlou M, Waalwijk C, van der Lee TA, et al. Geographic differences in trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* in the Northwest and North of Iran. *World Mycotoxin Journal*. 2013;6(2):137-50.
<https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1493>
- Chehri K. Detection of the fumonisin-producing *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC) associated with wild grasses in Iran. *Mycologia Iranica*. 2016;3(2):121-6.
<https://doi.org/10.22043/mi.2016.112592>
- Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium laboratory manual*: John Wiley & Sons; 2008
<https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Guo L, Hyde K, Liew E. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *The New Phytologist*. 2000;147(3):617-30.
<http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00716.x>
- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of

- Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(14):7905-10.
<https://doi.org/10.1073/pnas.130193297>
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 1998;90(3): 465-93.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026933>
- Bluhm B, Cousin M, Woloshuk C. Multiplex real-time PCR detection of fumonisin-producing and trichothecene-producing groups of *Fusarium* species. *Journal of Food Protection*. 2004; 67(3):536-43.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.3.536>
- Neera, Murali H. Development and evaluation of multiplex PCR for detection of T-2 and zearalenone producing *Fusarium* spp. *Letters in Applied Microbiology*. 2021;73(3):363-71
<https://doi.org/10.1111/lam.13522>
- Postic J, Cosic J, Vrandecic K, Jurkovic D, Saleh AA, Leslie JF. Diversity of *Fusarium* species isolated from weeds and plant debris in Croatia. *Journal of phytopathology*. 2012;160(2):76-81.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01863.x>