

בידוד אפיון של מיני *Fusarium spp.* הגורמים למחלת ריקבון עוגת
הבצל (*Allium cepa*) בצפון ישראל

Isolation and characterization of *Fusarium spp.*, the
cause of onion (*Allium cepa*) Basal rot in north Israel



תכנית מחקר מספר _____

שם החוקרים: אופיר דגני, בן קלמן ושאול גרף

תקציר

בעולם נפוצים מספר מינים של *Fusarium* הידועים כפתוגנים לבצל (*Allium cepa*), הגורמים לנזקים כלכליים משמעותיים. המינים הידועים כפתוגנים, המסוגלים לחדור לעוגת הבצל או לשורשים ולגרום למחלת ריקבון עוגת הבצל, הינם: *Fusarium oxysporum* (Klokočar-Šmit, Lević, Maširević, Grozdanović-) *F. proliferatum* ו- *F. verticillioides*, *F. compactum*, *F. solani* (Varga, Vasic & Aleksic, 2008) (Klokočar-Šmit et al., 2008). ההדבקה מתרחשת באדמת השדה בה החומר האורגני והכימיקלים מגוונים מאוד. נוכחות חברות מיקרוביאליות בקרקע יכולה להשפיע על הפוטנציאל להתיישבות הפטרייה. כשהפטרייה מזהה נוכחות בצל באדמה, היא חודרת לשורש או לעוגת הבצל ע"י כריות הדבקה, הפרשת אנזימי עיכול המפרקים את דופן התא, דרך הפיוניות או חדירה ישירה לתאים ולצינורות ההובלה. בנוסף מפרשה הפטרייה רעלנים (מיקוטוקסינים) אופייניים כמו Beauvericin, Fumonisin ו-Moniliformin התורמים להתבססות והתפתחות הפטרייה בבצל. בעת התבססות הפטרייה בצמח היא מתחילה לייצר כמות רבה של נבגים (Microconidia) ואלו מתפשטים לשאר חלקי הצמח דרך העצה וגורמת להופעת החמות בשורשים ולתסמינים של "חולי נופל" בנבטים (צניחה ומוות של הנבט) בתחילת עונת הגידול (ינואר). בעוגת הבצל או ברקמה פצועה התסמינים מתפתחים לריקבון והשחרה לאורך הגלדים, לכלורוזה ולנקרוזה בעלים. כל אלו גורמים לעיכוב בהתפתחות הצמח ולבסוף למוות (Nelson, Horst, & Woltz, 1981; Lager, 2011). חשוב לציין כי קיים שוני ברגישות הבצל לפתוגן והתפתחות תסמיני המחלה הינה כתלות בגיל הבצל המאולח. באוקטובר 2017, בסמוך לקיבוץ אליעד בדרום רמת הגולן, נדגמו בצלים נגועים מזן אורלנדו שנשארו בשדה לאחר אסיף הבצל עם תסמינים של מחלת ריקבון עוגת הבצל (תמונה מס' 1). במחקר הנוכחי בודדו מרקמות הצלים הנגועים שלושה תבדידים כאשר שניים מהם (B1, B5) זוהו מורפולוגית ומולקולרית כ- *Fusarium proliferatum* והשלישי (*Fusarium* (B7) זוהה כ- *acutatum* (תמונה מס' 2). כאמור *F. proliferatum* ידוע כפתוגני לבצל, אך הפתוגניות של *F. acutatum* לבצל אינה ברורה ועל כן הוא חשוד כטפיל משני (אופורטוניסט). שלושת התבדידים נבחנו במבחן לפתוגניות בנבטים. רמת אלימות גבוהה יותר נמדדה בתבדידי ה- *F. proliferatum* (B1 ו-B5) בהשוואה לביקורת, כאשר B5 היה האלים ביותר כלפי זרעי הבצל מזן אורלנדו. התבדיד *F. acutatum* (B7) הראה רמת אלימות בינונית למרות יכולתו לעכב את הנביטה באופן שווה ל-B1 ו-B5. בצלים מהזנים אורלנדו ונועם שאולחו בשלושת תבדידים אלו הראו, לאחר שבועיים הדגרה, תסמיני מחלה אופייניים של ריקבון עוגת הבצל. התסמינים כללו התפתחות נרחבת של תפטיר לבן על גבי הצד החיצוני של עוגת הבצל, התפתחות כתמים חומים בשלבים שונים בחלק הפנימי של הבצל, וריקבון מתקדם של רקמה רכה ומכווצת שנראתה בשני זני הבצל. לאחר בידוד חוזר של הפטרייה מהרקמה הנגועה מהבצל הושלם מבחן קוד לבדיקת הפתוגניות של התבדידי ה- *Fusarium* שבודדו מהשדה. כאשר תבדידים B1 ו-B5 אופינו כ- *F. proliferatum*, תבדיד מס' B7 זוהה כ- *F. acutatum*. האחרון אמנם חדר לבצלים הפצועים אך עדיין לא אובחן סופית כפתוגן ראשוני לבצלים אלה. נוכחות התסמינים והעדות לחדירת הפטרייה לבצל בתבדיד זה יכולים להיות כתוצאה מאילוח בריכוז גבוה על גבי הרקמה נרקבת ולא בהכרח כתוצאה בלעדית מפעילות הפתוגן. מבחן קוד בעצבים שיבוצע בהמשך, יאפשר אפיון מדויק יותר של רמת הפתוגניות בין התבדידים השונים.

מבוא ורקע מדעי

F. proliferatum - תיאור הפתוגן

F. proliferatum בודד ואופיין ממגוון רב של בתי גידול בכל העולם (Toit, Inglis & Pelter, 2003). טווח הפונדקאים של *F. proliferatum* רחב מאוד וכולל חד-פסיגיים ודו-פסיגיים. בנוסף להם *F. proliferatum* מתקיים בהצלחה כספרופיט בקרקע, ומסוגל להתחרות עם מיקרואורגניזמים אחרים על חומר אורגני זמין באדמה (Cotton & Munkvold, 1998). מינים ספרופיטיים של *Fusarium*, הם בעלי פוטנציאל לפלישה שניונית בשורשים רקובים (Leslie & Summerell, 2006). הפתוגן *F. proliferatum* שורד ומפיץ עצמו באמצעות נבגים, זרעים נגועים, באדמה על גבי שאריות חומר אורגני, באמצעות מי ההשקיה, באמצעות ציוד חקלאי מזוהם, דרך האוויר או ע"י חרקים המשמשים כווקטורים (Reyes Gaige, 2016). קיימים מספר מקטעי Mitochondrial DNA (mtDNA) אשר מראים פולימורפיזם, ושימוש במקטעים אלו מוכיח שמספר קוים של הפטרייה יכולים לתקוף סימולטנית את הפונדקאי (Láday et al., 2004), כפי שקיים בתירס (Kedera, Leslie, & Claflin, 1994). *F. proliferatum* שורד מתחת או מעל פני האדמה על שאריות חומר אורגני מספר שנים (Cotton & Munkvold, 1998). טווח הטמפ' להתפתחותו הוא 14-33°C עם טמפרטורה אופטימלית של 25-28°C (Elshahawy, Saied, Morsy, 2017). הוא ידוע כפתוגן אגרסיבי עם מגוון פונדקאים המחולל מחלות בצמחים בעלי חשיבות כלכלית - צמחים מתורבתים המשומשים לחקלאות אך גם בכאלו שלא משוייכים לענף החקלאי (Stepien, Koczyk, & Waskiewicz, 2011). הפטרייה עלולה להימצא גם בפונדקאים לא ספציפיים, לרוב בצמחי בר או עשבים הקרובים לחלקה נגועה (Wang, Brubaker, & Burdon, 2004; Helbig & Carroll, 1984). בנוסף לריקבון עוגת הבצל בצמחי בצל, הוא גם גורם לריקבון שורשים באספרגוס (Elmer, 1995; Elmer, 2001) ולריקבון הגבעול או האשבל בתירס (Logrieco, Moretti, Ritieni, 1999; Bottalico, & Corda, 1995; White, 1999). כמו כן בודדו תבדידי *F. proliferatum* המשוויכים לריזוספרה של מינים מסוימים ממשפחת הדיקליים (Neumann et al., 2004). *F. proliferatum* מתקיים כנראה גם כאנדופיט בחיטה (Bishop, 2002) ומעורר בה את מנגנוני ההגנה של הצמח (Bishop, Chatterton, Harrison, 2002; Hyun, & Hatfield, 2002). צמחים נוספים כמו בננה (Jimenez, Logrieco, & Bottalico, 1993), פירות הדר (et al. 2000), אורז (Desjardins, 2000) וסורגום (Leslie et al., 1990) אובחנו כפונדקאים הרגישים ל-*F. proliferatum*. ההטרונגניות של *F. Proliferatum* נובעת מקיומם של קוים בעלי מגוון גנוטיפי רב. רבים מהם נחקרים, אך קיים מגוון רחב של קוים נוספים שיש לאפיין (Leslie & Summerell, 2006).

F. acutatum - תיאור הפטרייה

הפטרייה בודדה מכנימות על גבי חיטה ומחיטה מהודו ופקיסטן. ומינים של *Cajanus sp.* לא ידועה פתוגניות כלפי בצל או צמחים אחרים. פטרייה זו משויכת לקומפלקס *Gibberella fujikuroi species*. עד כמה שידוע לנו, לא קיים הרבה מידע בספרות בהקשר למחלות צמחים, נבגי הפטרייה, Microconidia - מופיעים בשכחות גבוה בעלי מופע אליפטי אופייני בעלי מראה וגודל אופני, יימצאו על גבי False head הנוצרים מתוך תאים האחראיים על תהליך הנבגה (Conidiogenous cells: Polyphialides / Monophialides) ובצברים (Sporodochia). Macroconidia - מיוצרים בשכחות יותר נמוכה, מאורכים ומעוקלים. אופייני ויחודי למינים מקומפלקס *Gibberella fujikuroi species* (Leslie & Summerell, 2006). דרוש מחקר נוסף במעבדתנו על מנת לבדוק את אופייה ואת רמת הפתוגניות של פטרייה זו.

מורפולוגיה כללית של *F. proliferatum*

מראה מורפולוגי אופייני - תפטיר המושבה המתפתח על גבי מצע PDA (potato dextrose agar) הוא לבן, או משולב עם גוונים של סגול לאורך התפתחות המושבה עם תפטיר צפוף וצמרירי או דליל ומפוזר (Nirenberg, 1976) (תמונה מס' 2).

Macroconidia - מראה ה- Macroconidia ייחודי למינים המשויכים לקומפלקס המינים *Gibberella fujikuroi species complex*. לעיתים רחוקות הם מתארגנים כצברים (Sporodochia). על גבי המושבה הם יופיעו בצבע לבן על מצע SNA (Spezieller Nährstoffarmer agar) או בגוונים של סגול על מצע PDA וקשה למצוא התארגנות שכזאת תחת מיקרוסקופ. מבנה ה- Macroconidia דק, ארוך ובעל עיקול עדין בקצותיו בהשוואה למינים השונים של ה- *Fusarium*. בדרך כלל מחויץ ל- 3-5 תאים. ניתן למצוא את הנבגים הללו בעיקר על פני רקמה צמחית נגועה. יתמקמו לרוב בתחתית המושבה על גבי צלחת פטרי (Leslie & Summerell, 2006).

Microconidia - ה- Microconidia הם בעלי מופע אופייני של שרשראות, בצברי תאים (Sporodochia) ומתארגנים בעת יצירתם בצורת False heads (Fh) על גבי תאים האחראים לתהליך ההנבגה (Conidiogenous cells): (Monophialides או Polyphialides) אשר יתמיינו באופן נרחב כשמגיע האות ליצירת נבגים. מבנה ה- Microconidia קצר, אליפטי, צר ומאורך, בדרך כלל תא יחיד ללא חיוץ. הם מיוצרים בשפע ובעיקר בתפטיר העליון. זה הוא הנבג השכיח ביותר ומיוצר ע"י הפטרייה תחת מגוון תנאים, בעיקר בתוך צינורות ההובלה של הפונדקאי (Leslie & Summerell, 2006).

השערת המחקר

לימוד הפתוגנים המעורבים במחלת רקבון עוגת הבצל והתפתחות המחלה, תאפשר לפתח אמצעי הדברה להתמודדות מול החמרת המחלה בשדה בזני הבצל הקיציים אורלנדו ונועם.

מטרת המחקר וחשיבותו

מטרת מחקר ראשית - אפיון מיני *Fusarium* הגורמים למחלת ריקבון עוגת הבצל בצפון ישראל.

מטרות משנה

1. יצירת ספריית תבדידים מצמחי בצל נגועים שיאספו משדות בצפון ישראל.
2. זיהוי ואיתור הפתוגנים המעורבים במחלת עוגת הבצל.
3. בחינה מולקולארית וביצוע מבחן קוך לכל אחד מהפתוגנים המעורבים כדי לקבוע את מעורבותו במחלה.
4. הערכת מידת האלימות (וירולנטיות) של הפתוגנים המעורבים.

ייחודיות ומשמעות המחקר

סך כל שטח גידול הבצל היבש בארץ הוא 25,000 דונם. הבצל הקיצי המוביל, אורלנדו, מהווה כ- 45% מהיקף שטחי הבצל היבש (זנים קיציים אחרים הם מאדים ונועם) ומגודל בכל חלקי הארץ. בשנים האחרונות נצפתה החמרה בשכיחות מחלות ומזיקים בשדות בצל ברחבי הארץ ובעיקר בקרב זני הבצל הקיצי. אחד מהנזקים החמורים יותר הוא מחלת ריקבון עוגת הבצל. מחלה זו מוכרת בארץ שנים רבות אך קיימים פערי ידע משמעותיים באשר לאופייה, תפוצתה, הפתוגנים המעורבים בגרימתה, ואמצעי הדברה כנגדה. כך למשל לא קיים בארץ מידע מוסדר על היסטוריית המחלה, לא מוכרים בארץ זנים עמידים למחלה ולא מוכרים אמצעי הדברה שהוכחו כיעילים נגד הפתוגן באופן חד משמעי. ידוע כי מועד זריעת הבצל הקיצי במהלך ינואר, הטמפי הגבוהה של ימי הקיץ בתקופת הצניחה והאסיף בסוף יוני, עשויים לגרום לעלייה בביטוי מחלות, כתלות בטמפי האופטימלית להתפתחות הפתוגן (Elshahawy, Saied, Morsy, 2017). באדמה נגועה קיים סיכון גובר בהופעת "חולי נופל" בנבטים בתחילת עונת הגידול ובהופעת ריקבון עוגת הבצל לאורך הגידול, לקראת האסיף ובמהלכו. הטמפי הגבוהה של ימי תקופת הצניחה והאסיף הינם אופטימליים עבור הפטרייה לחדירה, התיישבות והתבססות בבצלים שבשדה. תסמיני המחלה עלולים להופיע בשטחים חקלאיים חדשים ללא היסטוריה מוקדמת של המחלה. התפרצות המחלה היא לרוב מקומית או בכתמים בשדה, ולא בכל השדה. לאורך הזמן התפשטות המחלה מתגברת ויש יותר הופעות נקודתיות בשדה ואיבוד שטחי גידול. עם גילוי מחלת ריקבון עוגת הבצל באזור חדש, ננקטים דרכי התמודדות המבוססים על מחזור יבולים 4-שנתי וחיתוי קרקע כללי כנגד מחלות עם Metam Sodium, לפני מועד הזריעה.

יחד עם זאת, אם הקרקע נגועה, אין היום דרך למזער את התפתחות המחלה. כמות היבולים הנגועים בשדה יכולה להגיע ל- 1%. אולם לפחת יבולים זה מתווספת פגיעה באמצעי יבול (צמצום שטחי גידול אופציונליים), באחסון, בפיזור המחלה לשטחים נוספים והפסדים מתרחבים מעבר לתחומי השדה. בצלים נגועים לא תמיד מראים תסמיני מחלה ובמידה והם מגיעים לאחסון, הבעיה מחמירה בהרבה. באחסון בסככות פתוחות או בבתי אריזה, המחלה יכולה להתפשט במהרה לשאר הבצלים. בנוסף קיים חשש שבצלים נגועים ללא הופעת תסמינים ויזואליים יגיעו לשווקים ברחבי הארץ. חשש זה מתגבר עקב נוכחותם של רעלנים מוכרים בפתוגנים אלו (Turner, Nikiema, & Wild, 1999).

המחקר הנוכחי יכול לשפוך אור על תפוצה והתפתחות המחלה בגידולי הבצל הקיצי בצפון הארץ ויספק מידע על הבדלים בוירולנטיות והשוני הפילוגנטי באוכלוסיות הפתוגנים המעורבים הגורמים למחלה. בנוסף, מציאת חומרי הדברה פוטנציאליים יתרמו לעכוב המחלה בשדה ומניעת התפשטות המחלה בשטחי גידול נוספים או באחסון וזליגת בצלים נגועים לרשתות השיווק.

מהלך עבודה שיטות וחומרים

איסוף דוגמאות ראשונות ובידוד בצלים מאולחים (אוקטובר 2017) משדה בצל נגוע באליעד
באוקטובר 2017 סמוך לקיבוץ אליעד נדגמו בצלים מזן אורלנדו נגועים שנשארו בשדה לאחר אסיף הבצל עם תסמינים של מחלת ריקבון עוגת הבצל. הבצלים הגיעו למעבדתנו לטובת בידוד הפתוגן מרקמת הבצל הנגועה. לאחר שטיפה ייסודית היטב תחת מי ברז, הרקמה הנגועה מעוגת הבצל והשורשים הופרדה מהבצל בעזרת סקלפל ונחתכה לחתיכות קטנות שניטבלו למספר שניות באלכוהול 70%. לאחר מכן, הרקמה הועברה

לתמיסת 1% NaOCl ל-1 דקה ומשם אל שתי שטיפות ב-DDW (מים מזוקקים) מעוקרים פעמיים. לאחר השטיפות וייבוש הרקמה על גבי נייר סופג מעוקר הועברו הרקמות אל צלחות פטרי עם מצע PDA או אל צלחות PDA עם כלורמפניקול (2.5mg/ml) והוכנסו לאינקובציה בחושך ב- $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. לאחר יומיים כאשר נראתה התחלה של צמיחת תפטיר מתוך הרקמה את צלחות ה-PDA, בודד התפטיר בזהירות אל צלחות חדשות עד לקבלת תבדיד נקי. בדרך זו התקבלו שלושה תבדידים - B1, B5, B7 שיעברו אפיון מעמיק בהמשך המחקר.



תמונה מס' 1: תסמיני מחלה בזן אורלנדו, בשדה נגוע סמוך לקיבוץ אליעד ברמת הגולן (אוקטובר 2017).

ניקוי ושימור התבדידים על ידי Single-spore Subcultures

המושבות שבודדו מבצלים בעלי רקבון בעוגת הבצל, עברו ניקיון נוסף ע"י טכניקת (Single-spore SSS Subcultures) במטרה לקבל מושבה שמקורה מנגב בודד. מכל אחד משלושת התבדידים הועברה דסקית בקוטר 6 mm אל מבחנת 15 ml עם DDW. לאחר וורטקס יסודי בוצעה זריעת מהולים עד לריכוז של 1-5 נבגים ל- $5\mu\text{l}$. ספירת הנבגים נעשתה בעזרת המוציטומטר (בשיטת-Fuchs-Rosenthal), תחת מיקרוסקופ אור המצויד במצלמת מוטיקאם 5 (Motic Instruments, Richmond, Canada). לאחר מכן הועברו $5\mu\text{l}$ מכל תבדיד אל צלחות PDA ופוזרו באמצעות מקל דריגלסקי. לאחר יום-יומיים באינקובציה בחושך, ב- $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, הועבר התפטיר הזעיר שגדל אל צלחות PDA חדשות, מושבות אלו שימשו כמקור גנטי בודד ונקי להמשך עבודות המחקר. לאחר בידוד הפטרייה מהבצלים הנגועים וקבלת תבדיד נקי (SSS) נעשתה הפקת DNA באמצעות Master Pure Yeast DNA Purification set kit (sigma, Rehovot, Israel) לטובת המשך עבודה מולקולרית ולזיהוי ואפיון הגנטי.

אפיון *F. acutatum* ו-*F. proliferatum*

אפיון מורפולוגי

לזיהוי מיני ה-*Fusarium*, אפיון המורפולוגי נעשה בעזרת Slide culture technique תחת מיקרוסקופ אור המצויד במצלמת מוטיקאם 5 (Motic Instruments, Richmond, Canada) על תבדידים B1, B5, B7. טכניקה זו תאפשר התבוננות מיקרוסקופית ממוקדת על מופעים מורפולוגיים בעלי ערך טקסונומי.

אפיון מולקולרי, אמפליפיקציה ע"י PCR, ריצוף תוצרי ה-PCR והרצה בג'ל אלקטרופורזה לאחר ניקוי ושימור התבדידים, והפקת ה-DNA מפטריות שגדלו במשך 5 ימים בחושך ב- $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ המשכנו בזיהוי ואפיון מולקולרי ראשוני של הפטריות שבודדו מהבצלים הנגועים בעזרת הפריימרים: Beta-tubulin, E1E2, הספציפים לסוג *Fusarium* ו- ITS 1/4 (טבלה מס' 2). מקטעי DNA הוגברו ע"י מכשיר PCR (Idaho Technology, Salt Lake City, Utah 84108, USA Rapidcycler) וזוהו באמצעות אלקטרופורזה בג'ל (תמונה מס' 6).

ITS1/4 - משמש כסמן אוניברסלי לזיהוי פטריות. הגברת המקטע הנוכח באזור הלא מקודד (Internal transcribed spacer) ויושב בין תת היחידה הריבוזומלית הקטנה לגדולה בגן ליצירת RNA ריבוזומלי, מקטע זה הוא כללי יותר וגדול לזיהוי פטריות ויאפשר לנו למצוא הבדלים פילוגנטיים בין התבדידים השונים. (White, 1990), (Bruns, Lee, & Taylor, 1990), (Schoch et al., 2012).

EF12- fusarium specific (E1E2) - האזור המקודד בקצה 5' של Translation Elongation factor (EF) 1 α בעל תפקוד בשרשרת האנזימתית של מעבר ה-tRNA אל הריבוזום. בעל רצפי אקסונים שמורים בתת היחידה המיטוכונדיאלית הקטנה (mtSSU) בין המינים של *Fusarium* (O'Donnell et al., 1998).

T12 beta-tubulin fusarium specific - מקודד ליצירת יחידת מבנה של המיקרוטובולי. מקטע זה מאפשר השוואה פילוגנטית רחבה בגלל נוכחות אזורי קידוד מגוונים מאוד ושמורים מאוד, והוא כנראה בעל יציבות אבולוציונית גבוהה בדיפרנציאציה של מינים של *Fusarium* בהשוואה לגנים אחרים. (Nosratabadi, 1997), (Kachuei, Rezaie, & Harchegani, 2018; O'Donnell et al., 1997).

PCR (Idaho Technology, Salt Lake City, Utah 84108, USA Rapidcycler)
בוצע בנפח כולל של 20 μ l לריאקציה: 1 μ l מכל פריימר (Backward/Forward) בריכוז של 20 μ M, 20 μ l סה"כ μ l (2, 10 μ l תערובת ריאקציה מוכנה: RedTaq® ReadyMix (sigma, Rehovot, Israel), 3 μ l template DNA ו- 5 μ l מים מזוקקים פעמיים (DDW) שעוקרו באוטוקלב. תנאי ה-PCR – 94°C למשך 2 דקות, 30 סיבובים של 94°C למשך 30 שניות, 55°C למשך 30, 72°C למשך דקה, לסיום 72°C למשך 5 דקות. תוצרי ה-PCR הורצו בגיל אגרוז בריכוז של 1.5% (Lonza, Rockland, USA) (Drori et al. 2013). תוצאות ה-PCR נשלחו לריצוף (Hy Labs, Rehovot, Israel) ואחוזי דמיון בהשוואת רצפים ומציאת הבדלים פילוגנטיים יעשו בהמשך ע"י BLASTN at GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology Information, MD, USA), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (USA, Web site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

אלימות תבדידי הפוזריום בצלחות פטרי

ניסוי זה הוא נדבך ראשוני בחקר האנטראקציה פתוגן-פונדקאי ורמת הוירולנטיות של קווי/מיני הפטריות שבודדו מהבצל הנגוע. זרעי בצל מזן אורלנדו (סופקו על ידי חברת הזרע, ישראל) אולחו בשלושת תבדידי הפוזריום B7, B5, B1 כמפורט להלן. לאחר שטיפה ב-DDW, השרייה ב-1% NaOCl לדקה אחת ו-2 שטיפות נוספות ב-DDW, 15 זרעי בצל הועברו בסדר אקראי אל צלחת פטרי שבהן נייר וואטמן סטרילי ספוג במים יחד עם דיסקית בקוטר 6 mm ממושבה בת 5 ימים שגדלה על מצע PDA בתנאי חושך וב-28 \pm 1°C. לכל תבדיד בוצעו 6 חזרות. לקבוצת הביקורת הועברה דיסקית PDA בקוטר 6 mm (תמונה מס' 7). מים הוספו לצלחות כל שלושה ימים לשמירה על הלחות לטובת יעילות הנביטה ובחינת התקדמות המחלה. לאחר אינקובציה של 9 ימים בתנאי חושך וב-28 \pm 1°C. הזרעים נשטפו היטב ונמדדו אחוזי נביטה (תמונה מס' 8), ביומסת הנבטים (תמונה מס' 9) ואורך הנצרון שלהם (תמונה מס' 10).

ביצוע מבחן קוד

בצלים מהזנים אורלנדו ונועם נאספו משדה חקלאי בעמק החולה ונבחנו להערכת רגישות הזנים בסביבה לחה בתנאי מעבדה. פרוטוקול אילוח הבצל נעשה כמתואר קודם לכן (Toit, Inglis, & Pelter, 2003) עם שינויים קלים. הכנת תרחיף נבגים מכל תבדיד (B1,B5,B7) בוצעה בריכוז 10^6 conidia/ml ממושבה בת 5 ימים על מצע PDA ב- $28 \pm 1^\circ\text{C}$ בחושך. לפני האילוח, הוסרו מכל בצל הגלדים היבשים. הבצלים נטבלו ב- 70% אתנול ולייבש. בתנאים סטריליים, כל בצל נדקר עם טיפ ($10 \mu\text{l}$) מעוקר בעוגת הבצל 5 פעמים באזורים אקראיים ובעומק של 5 מ"מ- 10 מ"מ. לכל חור הוזרקו כ- $50 \mu\text{l}$ תרחיף נבגים בריכוז 10^6 conidia/ml, לביקורת הוזרקו מים סטריליים בלבד באותה הכמות. כל בצל, מאולח או ביקורת, הועבר אל שקית עיקור (המדמה סביבה לחה) סטרילית. הניסוי נעשה ב-6 חזרות לכל תבדיד כולל הביקורת. שקית העיקור נאטמה והועברה לאינקובציה בחושך בטמפי של $28 \pm 1^\circ\text{C}$ למשך שבועיים.

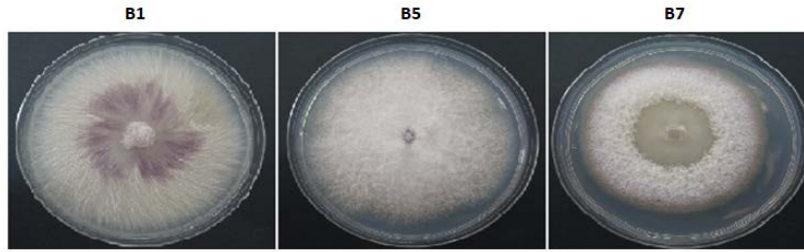
תוצאות

אפיון *F. proliferatum* ו-*F. acutatum*

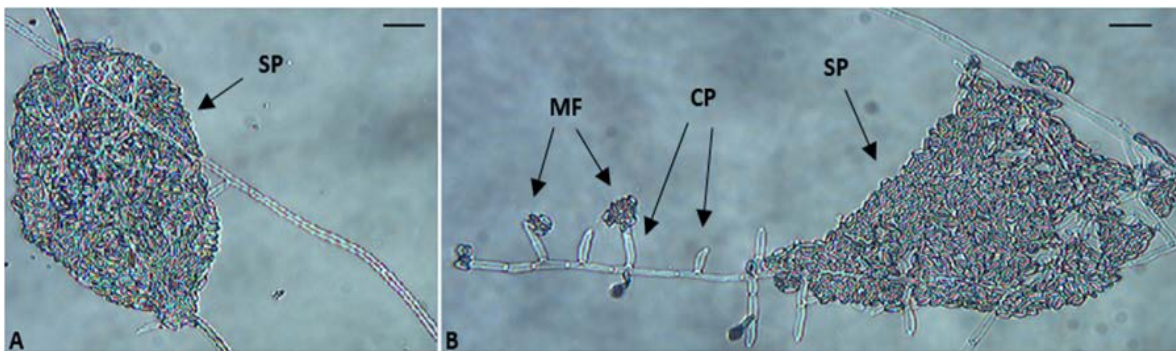
לאחר בידוד הפטריות מהבצל המאולח שנדגם מהשדה, ולאחר ניקיון התבדידים ע"י טכניקת SSS התקבלו מושבות שמקורן מנבג בודד. בכך הוריאציות המורפולוגיות והגנטיות הצטמצמו באופן משמעותי, לטובת מבחנים גנטיים ואפיון של אוכלוסיות מהשדה.

אפיון מורפולוגי

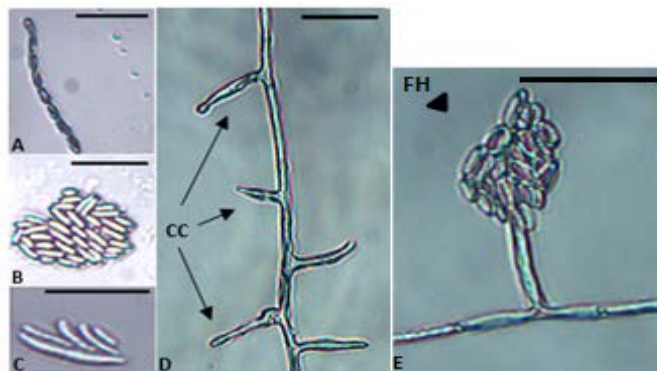
לזיהוי ואיתור הפתוגנים המעורבים במחלה נעשה אפיון מורפולוגי לאחר גידול הפטרייה על מצעים שונים. אלו מאפשרים התבוננות מדוייקת על המבנים הספציפיים של מושבת הפטרייה המאפיינים ומגדירים אותה, מראה צבע וגודל התפטיר, הנבגים ואופן התארגנותם הספציפי. מורפולוגית מושבות התבדידים אשר גדלו על מצע PDA המאפשר להבדיל ולהבחין באופן מדוייק יותר בין מיני ה-*Fusarium*. מראה אופייני של תפטיר צפוף ומעט צמרירי לבן בתחילת האינקובציה והתפתחות גוון סגול במרכז המושבה עם התבגרותה (תבדיד מס' B1) והופעת תפטיר צמרירי ולבן לאורך כל שלבי הגידול (תבדיד מס' B5). מראה המושבה של תבדיד מס' B7 הראתה צבע סגול מתחילת האינקובציה והתפתחות תפטיר צמרירי לבן בחלק העליון של המושבה עם התבגרותה. מופעים אלו אופייניים למינים שונים של *Fusarium*. (תמונה מס' 2). האפיון בעזרת Slide culture technique על מצע SNA הגורם לגדילת תפטיר מסיבי עם התארגנות ה- Microconidia בצברים גדולים (Sporodochium) או על גבי תפטיר האחראי עם על יצירת הנבגים (Conidiophores), בקצה תפטיר זה מנץ מין צבר תאים בעל מראה שלפוחית (Monophialide) שממנו לבסוף מיוצרים ה- Microconidia וה- Macroconidia עם המראה וההתארגנות האופייניים (תמונות 3,4) ובעלי הגדלים האופייניים (תמונה מס' 5), (טבלה מס' 1) ל-*F. proliferatum* ו-*F. acutatum*



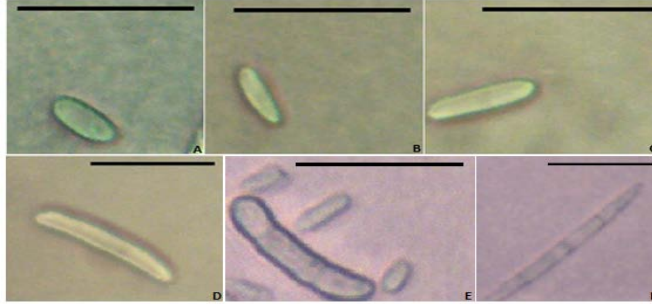
תמונה מס' 2: מורפולוגיה המושבה של התבדידים שבדדו משדה הבצל באליעד (קיץ/אוקטובר 2017). מושבות בנות 5 ימים שגדלו על מצע PDA, בחושך, ב- $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. *F. acutatum* - B7, *F. proliferatum* - B5, *F. proliferatum* - B1.



תמונה מס' 3: מורפולוגיה מיקרוסקופית של *F. proliferatum*. התבדידים גדלו על מצע SNA ב- $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ בחושך למשך 5 ימים, בשיטת Slide culture technique. A - תבדיד מס' B1 : SP - Sporodochium, B - תבדיד מס' B5 : CP - Conidiophores, MF - Sporodochium - SP, Monofilament. הקו השחור בכל תמונה הוא קנה מידה של $20\mu\text{m}$.



תמונה מס' 4: מורפולוגיה מיקרוסקופית של *F. acutatum* ו-*F. proliferatum*. התבדידים גדלו על מצע PDA ב- $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ בחושך למשך 5 ימים בשיטת Slide culture technique. A - תבדיד מס' B1 : מראה אופייני של Microconidia מצומדים בשרשרת. B - תבדיד מס' B7 : מראה אופייני של Microconidia המתאגדים בצברים. C - תבדיד מס' B5 : Macroconidia. D - תבדיד מס' B7 : תחילת התפתחות הנבגים ע"י CC - Conidiogenesis cell, E - תבדיד מס' B5 מופע Microconidia כ- False head (FH) על גבי Monophialide. הקו השחור בכל תמונה הוא קנה מידה של $20\mu\text{m}$.



תמונה מס' 5: מורפולוגית הנבגים של התבדילים B1, B5, B7 לאחר אינקובציה מושבות ב- $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ל- 5 ימים בחושך על מצע PDA והכנת תרחיף נבגים: A,B,C - Microconidia של B5, B1 (*F. proliferatum*) ו- B7 (*F. acutatum*), בהתאמה. D, E, F - Macroconidia של B1, B5, B7 בהתאמה. הקו השחור בכל תמונה הוא $20\mu\text{m}$.

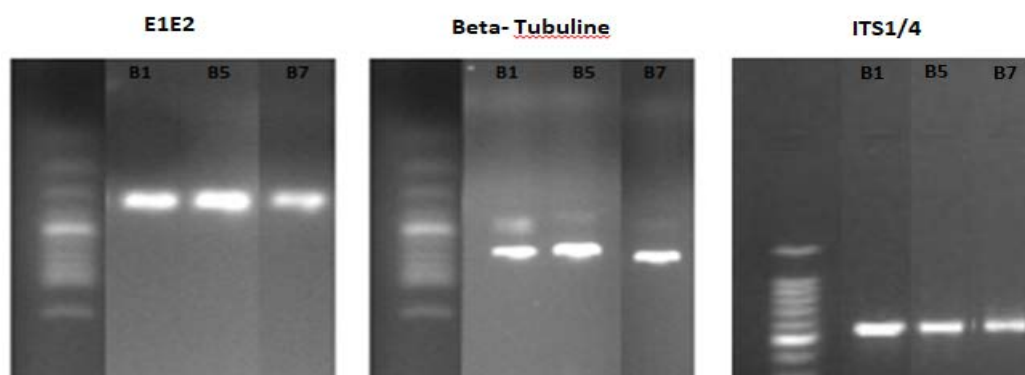
טבלה מס' 1: מדדים מיקרוסקופיים אופייניים לתבדילים B1, B5, B7. עובי התפטיר וגודל הנבגים של התבדילי ה-*Fusarium*, שבודדו מהבצל הנגוע לאחר אינקובציה ב- $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ל- 5 ימים בחושך על מצע PDA והכנת ממוצע של 5 מדידות.

מס' תבדיל	גודל (μm) -Microconidia ממוצע	גודל (μm) Macroconidia ממוצע	עובי תפטיר (μm)
B1 - <i>F. proliferatum</i>	6.2 × 2.9	20.5 × 3.2	3.6
B5 - <i>F. proliferatum</i>	5.8 × 2.7	18.2 × 3.7	3.4
B7 - <i>F. acutatum</i>	9.75 × 24	52.7 × 3.1	3.3

אפיון מולקולרי, אמפליפיקציה ע"י PCR, ריצוף תוצרי ה-PCR והרצה בג'ל אלקטרופורזה לאחר הגברת מקטעי ה- DNA בעזרת הפריימרים E2/E1 ו- Beta-Tubulin בעזרת PCR, רוצף מקטע ה- DNA של הדוגמאות והם הושוו לנתוני הבנק הגנומי. תוצאות ההשוואה המולקולרית מראות התאמה מלאה של 100% לתבדילים B1 ו- B5 עם *F. proliferatum* (Accession number- [KC964149.1](#),) *F. proliferatum* (Accession number- [KF222556.1](#), לעומת זאת תבדיל מס' B7 הראה התאמה מלאה של- 100% ל- *F. acutatum* (Accession number- [KU603870.1](#), [MH401553.1](#), השוואת הריצוף של המקטע שהוגבר ע"י ITS הראה התאמה מלאה של עד 99% של תבדילים B1 ו- B5 עם *F. proliferatum* (Accession number- [MH712164.1](#)) ושל עד 98% ל- *F. acutatum* (Accession number- [JX114782.1](#)).

טבלה מס' 2: הפריימרים שנבחרו לטובת האמפליפיקציה של מקטעי DNA הנייל בעזרת PCR. השוואת רצפים ומציאת הבדלים ועץ פילוגנטי יעשה בהמשך המחקר בתוכנה MUSCLE באתר של EMBL-EBI.

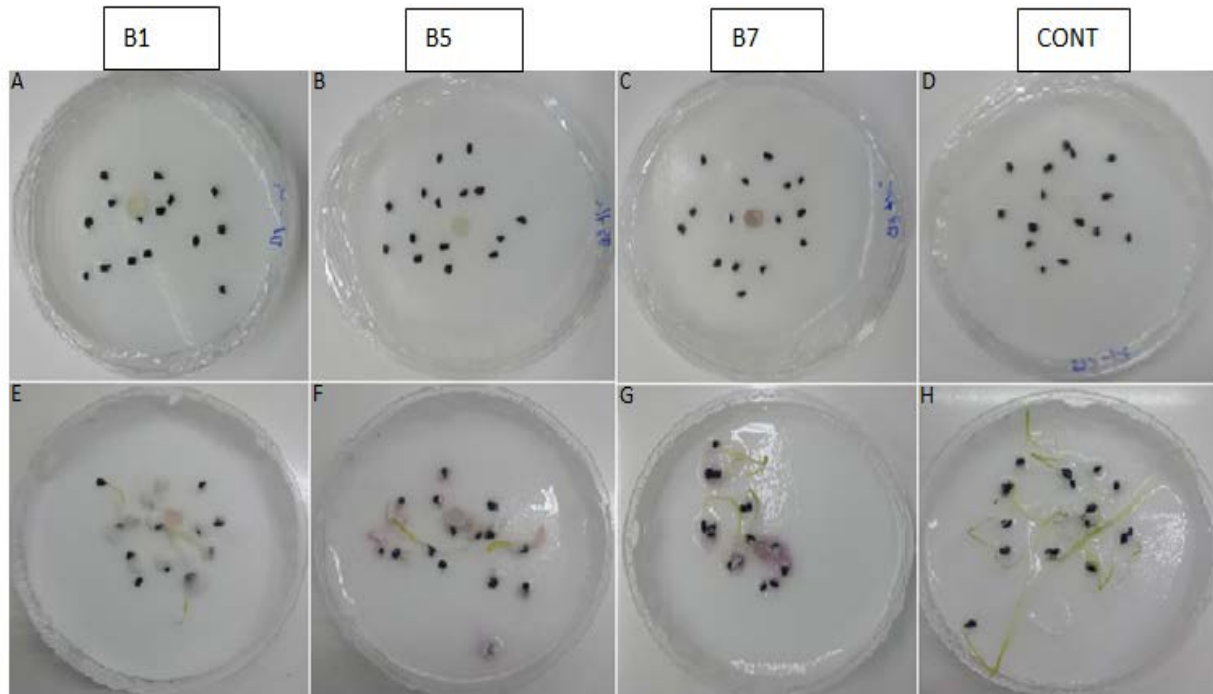
Primer	Sequence(5'-3')	Fragment(bp)	Literature
EF12- fusarium specific (E1E2)	F- ATGGGTAAGGAGGACAAG	500-700 bp	O'Donnell et al., 1998
	R-GGAAGTACCAGTGATCAT		
T12 beta-tubulin gene fusarium specific	F-AACATGCGTGAGATTGTAAGT	550 bp	Nosratabadi, Kachuei, Rezaie, & (Harchegani, 2018; O'Donnell et al., 1997
	R-TAGTGACCCTTGCCCCAGTTG		
ITS1/4universal DNA marker for Fungi	F- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	500-600 bp	Schoch et al., 2012
	R-TCCTCCGCTTATTGATATGC		



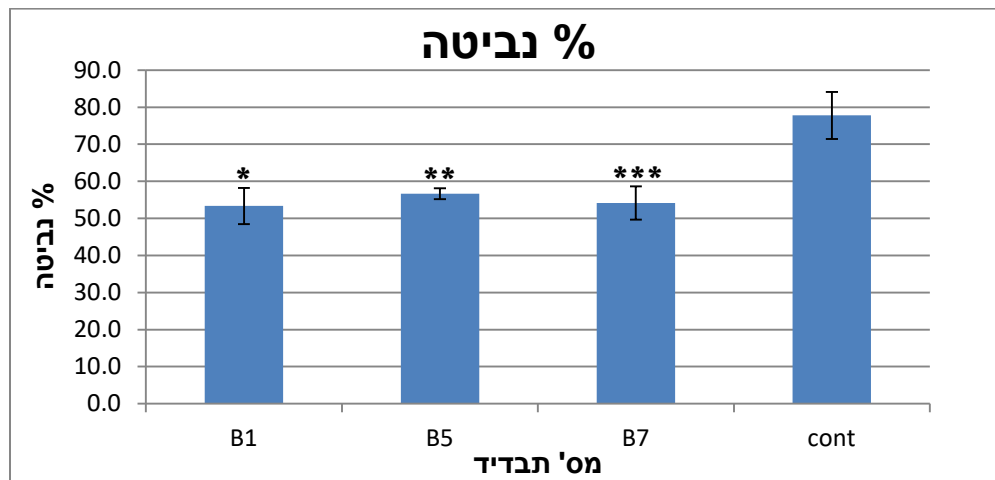
תמונה מס' 6: מקטעי ה-PCR והרצה בגיל אלקטרופורזה של הפריימרים ITS1/4, Beta-Tubulin, ו-E1E2 של תבדידי הפטרייה שבודדו מהבצל הנגוע – B1, B5, B7.

אלימות תבדידי הפוזריום בצלחות פטרי

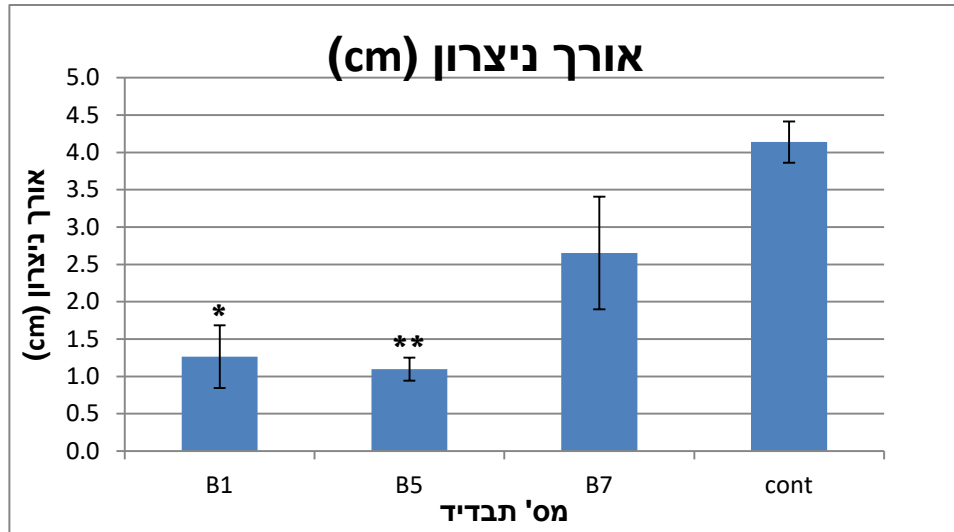
במדידה אורך הניצרון נראה עכוב נביטה בשלושת התבדידים כאשר תבדיד B5 האלים ביותר עם עכוב הנביטה הגבוה מבין השלושה (תמונה מס' 8) עם קורלציה ישירה לתוצאות רמת הביומסה הנמוכה (תמונה מס' 9). במדידת אחוזי הנביטה נראה עכוב נביטה יחסית זהה מבין כל התבדידים (תמונה מס' 7). ניתן לראות עכוב גדול יותר של התבדידים באורך הניצרון וכתוצאה מכך רמת הביומסה בהשוואה לעכוב אחוז הנביטה, ניתן לראות בכך מנגנוני הגנה שונים של הצמח במהלך הנביטה, כאשר יותר ממחצית מהזרעים הצליחו לנבוט למרות נוכחות הפתוגן אך לא הצליחו להתפתח ולהגדיל את הביומסה. באומדן אחוז הנביטה והביומסה הרטובה, תוצאות מבחן t למדגמים בלתי תלויים הראו עיכוב מובהק סטטיסטית בנוכחות שלושת התבדידים שנבדקו. מדידת אורך הניצרון הראתה הבדל מובהק סטטיסטית בתבדידים B1 ו-B5. מהנבטים נאספו דגימות להפקת DNA באמצעות Extract-N-amp plant PCR kit (sigma, Rehovot, Israel) דוגמאות ה-DNA אוכסנו במקרר בטמפ' 4°C.



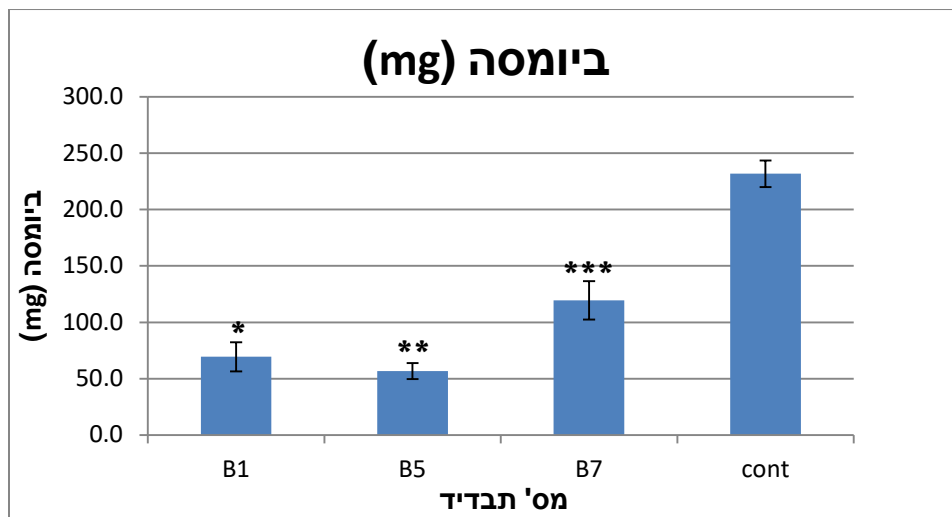
תמונה מס' 7: אלימות תבדידי פוזריום בצלחות פטרי. זרעים מזן אורלנדו אולחו בשלושת התבדידי B7, B5, B1 והועברו לאינקובציה (A-B), בתנאי חושך ב- $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$. לאחר 9 ימים (E-H) נמדדה רמת האלימות של כל אחד מהתבדידים.



תמונה מס' 8: אחוז נביטה של זרעי בצל בנוכחות תבדידי פוזריום. זרעים מזן אורלנדו לאחר אולחו בתבדידים B5, B1 ו-B7 בצלחות פטרי עם נייר וואטמן ספוג ב-DDW. לאחר אינקובציה של 9 ימים בחושך ב- $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ נמדד אחוז נביטה של הנבטים ביחס לביקורת. עמודות מייצגות ממוצע של 6 חזרות, קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. כוכביות מסמנות הבדל משמעותי סטטיסטית מהביקורת (שלוש כוכביות: $p=0.012$, שתי כוכביות: $p=0.020$, כוכבית אחת: $p=0.012$).



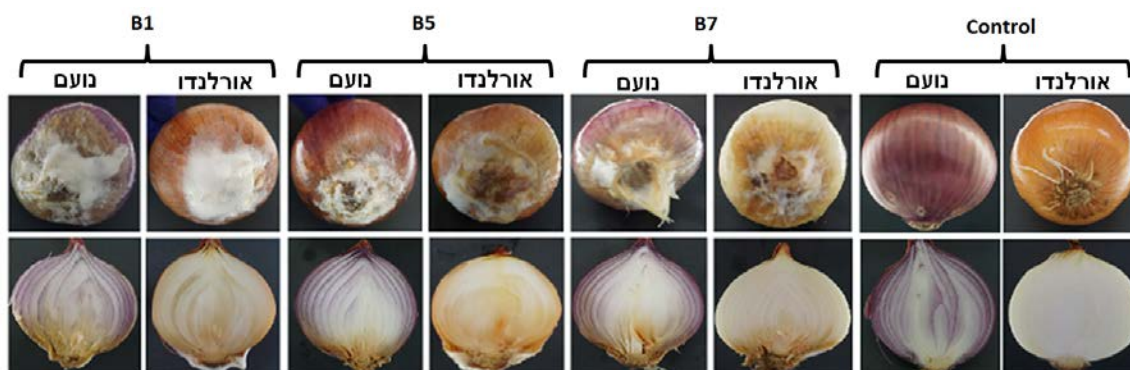
תמונה מס' 9: אורך הנצרון של נבטי בצל בנוכחות תבדידי פוזריום. זרעים מזן אורלנדו לאחר אילוח בתבדידים B5, B1 ו-B7 בצלחות פטרי עם נייר וואטמן ספוג ב-DDW ואינקובציה של 9 ימים בחושך ב- $28 \pm 1^\circ\text{C}$. ממוצע אורך הנצרון של הנבטים מיצג 6 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. כוכביות מסמנות הבדל משמעותי סטטיסטית מהביקורת. (שתי כוכביות: $p < 0.001$, כוכבית אחת: $p < 0.001$). לא נמצאה מובהקת סטטיסטית באורך הנצרון בין הזרעים שאולחו ב-B7 ביחס לביקורת, $p = 0.091$ (n.s).



תמונה מס' 10: הביומסה (משקל רטוב) של נבטי בצל בנוכחות תבדידי פוזריום. זרעים מזן אורלנדו לאחר אילוח בתבדידים B5, B1 ו-B7 בצלחות פטרי עם נייר וואטמן ספוג ב-DDW ואינקובציה של 9 ימים בחושך ב- $28 \pm 1^\circ\text{C}$. עמודות מייצגות משקל רטוב ממוצע של 6 חזרות. קווי שגיאה מייצגים שגיאת תקן. כוכביות מסמנות הבדל משמעותי סטטיסטית מהביקורת. (שלוש כוכביות: $p = 0.001$, שתי כוכביות: $p < 0.001$, אחת: $p < 0.001$).

מבחן קוד

לאחר אילוח זני הבצל אורלנדו ונועם בעוגת הבצל עם שלושת התבדידים B1, B5, B7 ל-7 ימי אינקובציה נראתה התפתחות אגרסיבית של ריקבון בעוגת הבצל עם התפתחות תפטיר לבן על גבי הצד החיצוני של עוגת הבצל המלווה בריקבון הרקמה והתפתחות החמות בבסיס העוגה המתרחבים אל פנים הבצל (תמונה מס' 11). לאחר האינקובציה והתפתחות ריקבון בעוגת הבצל, בודדנו את הפטרייה מהבצלים הנגועים. תהליך בידוד זהה ללא ממצאים בוצע לביקורת (בצל לא מאולח). ובכך הושלם מבחן כוך. בנוסף הופק DNA (ראה פרוטוקול הפקת DNA מבצל נגוע) של רקמת הבצל הנגועה לצורך זיהוי מולקולרי.



תמונה מס' 11: מבחן קוד - תסמיני ריקבון עוגת הבצל בתנאי מעבדה. תצלום זני הבצל נועם ואורלנדו לאחר אילוח בתרחיף הנבגים ממושבה בת 5 ימים של תבדידים B5, B7 ו-B1. תסמיני ריקבון מופיעים בשני זני הבצל לאחר האילוח בכל תבדיד בנפרד בהשוואה לביקורת שכללה דקירה בדומה לבצלים המאולחים והוזרק אליה DDW במקום תרחיף הנבגים.

דיון בתוצאות

אפיון מורפולוגי ומולקולרי

האפיון המורפולוגי שכלל אפיון צבע ומראה המושבה (תמונה מס' 2) ואפיון מיקרוסקופי (תמונות מס' 3-5) השווה למידע הכתוב במחקרם של לזלי וסאמרל (Leslie & Summerell, 2006). מהנתונים המורפולוגיים יחד עם הנתונים המולקולריים המינים שבודדו מהבצל אופיינו כ: *F. acutatum* - B7, *F. proliferatum* - B1, B5. דרוש מחקר נוסף כדי ללמוד על ההבדלים גנטיים בין קווי ה-*F. proliferatum* שבודדו מצמחי הבצל. קוים הפתוגנים לאספרגוס מגוונים מאוד ובעלי תפוצה רחבה וחלקם מוגבלים לקו יחיד ממקור יחיד (Elmer, 1999, Summerell, Burgess, & Nigh Jr, 1999). רקומבינציה מינית המתרחשת בשדה מופיעה כנראה לעתים קרובות על מנת לשמר את היכולת של כלל האוכלוסיה לקיים רבייה מינית ומשפיעה על שרידות הפתוגן (Leslie & Klein, 1996).

מבחן לפתוגניות בנבטים

תוצאות ניסוי זה מראות תסמיני חולי נופל של נבטים בתנאי מעבדה. אחוז הנביטה, אורך הנצרון והביומסה של הנבטים (תמונות מס' 8-10) מראים וריאביליות באלימות התבדידים כלפי הבצל עם קורלציה ישירה בין אורך הנצרון לביומסה. רמת אלימות גבוהה יותר נראית בתבדידים B1 ו-B5 בהשוואה לביקורת כאשר B5

האלים ביותר כלפי זרעי הבצל מזן אורלנדו. B7 לעומת זאת מראה רמת אלימות בינונית למרות יכולתו לעכב את הנביטה באופן שווה ל-B1 ו-B5. לגיל הנבטים יש השפעה על רמת רגישותם כלפי פתוגנים (Badino *et al.*, 1980; Holz, Knox-Davies, 1974). דרוש מחקר נוסף לסקירת זני בצל, במטרה לאתר זנים עמידים כנגד מחלת ריקבון עוגת הבצל.

מבחן קוד

לאחר שבועיים באינקובציה הבצלים הראו סמפטומים של רקבון עוגת הבצל בתנאי מעבדה. נראה ששלושת התבדידים B1, B5, B7 פתוגנים לזני הבצל אורלנדו ונועם. התסמינים כללו התפתחות נרחבת של תפטיר לבן על גבי הצד החיצוני של עוגת הבצל, התפתחות כתמים חומים בשלבים שונים בחלק הפנימי של הבצל, וריקבון מתקדם של רקמה רכה ומכווצת שנראתה בשני זני הבצל (תוצאות לא מוצגות). לאחר בידוד חוזר של הפטרייה מהרקמה הנגועה מהבצל הושלם מבחן קוד לבדיקת הפתוגניות של התבדידי ה-*Fusarium* שבודדו מהשדה. כאשר תבדידים B1 ו-B5 אופינו כ-*F. proliferatum*, תבדיד מס' B7 אשר זוהה כ-*F. acutatum* אמנם חדר לבצלים הפצועים אך עדיין לא אובחן סופית כפתוגן ראשוני לבצלים אלה ויתכן כי הוא פתוגן משני, אופורטוניסט. תומך במסקנה זו מבחן אלימות התבדידים בצלחות פטרי שבו נמדדה השפעה מתונה יחסית של התבדיד B7 בהשוואה לביקורת. נוכחות התסמינים והעדויות לחדירת הפטרייה לבצל בתבדיד B7 יכולים להיות כתוצאה מאילוח בריכוז גבוה על גבי הרקמה נרקבת ולא בהכרח כתוצאה בלעדית מפעילות הפתוגן. מבחן קוד בעציצים שיבוצע בהמשך, יאפשר אפיון מדויק יותר של רמת הפתוגניות בין התבדידים השונים.

רשימת ספרות

Badino M., Schiavi M., Falavigna A., Fantino M.G., 1980. A new technique of infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* of onion seedlings grown in vitro. In: Dore C. (ed.). Application de la Culture in vitro. Amelioration des Plantes Potageres, pp. 111-120. INRA Editions, Versailles, France.

Bao, J. R., Fravel, D. R., O'Neill, N. R., Lazarovits, G. & van Berkum, P. (2002). Genetic analysis of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* from tomato plants. *Canadian Journal of Botany* 80: 271-279.

Bishop, D. L. (2002). Gene expression of a vacuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 65-71.

Bishop, D. L., Chatterton, N. J., Harrison, P. A. & Hatfield, R. D. (2002). Changes in carbohydrate coordinated partitioning and cell wall remodeling with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 53-63.

Cotten T.K. & Munkvold G.P. (1998) Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* in maize stalk residue. *Phytopathol* 88:550-555.

Davis, R. D., Moore, N. Y. & Kochman, J. K. (1996). Characterization of a population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* causing wilt of cotton in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 47: 1143-1156.

Desjardins, A. E., Manandhar, H. K., Plattner, R. D., Manandhar, G. G., Poling, S. M. & Maragos, C. M. (2000). *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1020-1025.

Drori, R., Sharon, A., Goldberg, D., Rabinovitz, O., Levy, M., & Degani, O. (2013). Molecular diagnosis for *Harpophora maydis*, the cause of maize late wilt in Israel. *Phytopathologia Mediterranea*, 16-29.

Elmer, W. H. (1995). A single mating population of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium proliferatum*) predominates in asparagus fields in Connecticut, Massachusetts, and Michigan. *Mycologia*. 87: 68-71.

Elmer, W. H., Summerell, B. A., Burgess, L. W., & Nigh Jr, E. L. (1999). Vegetative compatibility groups in *Fusarium proliferatum* from asparagus in Australia. *Mycologia*, 650-654.

Elmer, W. H., Summerell, B. A., Burgess, L. W., & Nigh Jr, E. L. (1999). Vegetative compatibility groups in *Fusarium proliferatum* from asparagus in Australia. *Mycologia*, 650-654

Elmer, W. H. (2001). *Fusarium* diseases of asparagus, p. 248- 262. In B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden, and L. W. Burgess (eds.), *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. APS Press, St. Paul, Minnesota.

Elshahawy I.E., Saied N.M., Morsy A.A. (2017). *Fusarium proliferatum*, the main cause of clove rot during storage, reduces clove germination and causes wilt of established garlic plants. *Plant Pathol J* 99:85–93.

Hansen, O. H. (1968). Ecology, physiology, and biochemistry of blue green algae. *Ann Rev Microbiol*; 22: 47-57.

Helbig, J. B., & R. B. Carroll. (1984). Dicotyledonous weeds as a source of *Fusarium oxysporum* pathogenic on soybean. *Plant Disease* 68: 694-696.

Holz G., Knox-Davies P.S., 1974. Resistance of onion selections to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytophylactica* 6: 153-156.

Hyun, J. W., Lee, S. C., Kim, D. H., Ko, S. W., & Kim, K. S. (2000). *Fusarium* fruit rot of citrus in Jeju Island. *Mycobiology*, 28(3), 158-162.

Jimenez, M., Logrieco, A., & Bottalico, A. (1993). Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in banana fruits. *Journal of Phytopathology* 137: 214-220.

- Kedera, C. J., Leslie, J. F. & Claflin, L. E. (1994). Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize plants. *Phytopathology* 84: 603-607.
- Klokočar-Šmit, Z., Lević, J., Maširević, S., Grozdanović-Varga, J., Vasić, M., & Aleksić, S. (2008). *Fusarium* rot of onion and possible use of bioproduct. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (114), 135-148.
- Láday, M., Mulè, G., Moretti, A., Hamari, Z., Juhász, Á., Szécsi, Á., & Logrieco, A. (2004). Mitochondrial DNA variability in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*). In *Molecular diversity and PCR-detection of toxigenic Fusarium species and ochratoxigenic fungi* (pp. 563-571). Springer, Dordrecht.
- Lager, S. (2011). Survey of *Fusarium* species of yellow onion (*Allium cepae*) on Oland. Master thesis.
- Leslie, J. F., Pearson, C. A. S., Nelson, P. E. & Toussoun, T. A. (1990). *Fusarium* species from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80: 343-350.
- Leslie, J. F., & Klein, K. K. (1996). Female fertility and mating-type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics* 144: 557-567.
- Leslie, J. F., & Summerell B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing, Ames, IA.
- Logrieco, A., A. Moretti, A. Ritieni, A. Bottalico, & P. Corda. (1995). Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Disease* 79: 727-731.
- Nelson, P. E., Horst, R. K & S. S. Woltz. (1981). *Fusarium* diseases of ornamental plants, p. 121-128. In P. E. Nelson, T. A. Toussoun, and R. J. Cook (eds.), *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Neumann, M. J., Backhouse D., Carter D. A., Summerell B. A., & Burgess L. W. (2004). Genetic structure of populations of *Fusarium proliferatum* in soils associated with *Livistona mariae* palms in Little Palm Creek, Northern Territory, Australia. *Australian Journal of Botany* 52: 543-550.
- Nirenberg, H. I. (1976). Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem)* 169: 1-117.
- Nosratabadi, M., Kachuei, R., Rezaie, S., & Harchegani, A. B. (2018). Beta-tubulin gene in the differentiation of *Fusarium* species by PCR-RFLP analysis. *system*, 3, 8.

O'Donnell K. & Cigelnik E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular and Phylogenetic Evolution* 7: 103-116.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E. & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*95: 2044–2049.

Reyes Gaige, A. J. (2016). *Invasion potential and colonization dynamics of *Fusarium proliferatum** (Doctoral dissertation, Kansas State University).

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & Miller, A. N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.

Stępień Ł., Koczyk G., & Waśkiewicz A. (2011). Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *J. Appl. Genet.* 52 4: 487-496.

Toit, L. D., Inglis, D. A., & Pelter, G. Q. (2003). *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease*, 87(6), 750-750.

Turner, P. C., Nikiema, P., & Wild, C. P. (1999). Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1), 81-93.

Wang, B., C. L. Brubaker, & J. J. Burdon. (2004). *Fusarium* species and *Fusarium* wilt pathogens associated with native *Gossypium* populations in Australia. *Mycological Research* 108: 35-44.

White, D. G., ed. (1999). *Compendium of Corn Diseases*, 3rd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & 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.