طب‌نظامی
تابستان ۱۳۸۸، دوره ۱۱، شماره ۲
صفحات: ۱۰۸- ۱۰۳

جداسازی گونه حدواسط *فوزاریوم لانگستیه* و *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* و شناسایی برخی از خصوصیات ریختی و مولکولی آن

محمدحسین یادگاری[*] PhD، رضا کچوئی[۱] PhD، ساسان رضایی[۲] PhD،
عبدالامیر علامه[۳] PhD، ناصر صفایی[۴] PhD، فریده زینی[۲] PhD

[*] آدرس مکاتبه: گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
yadegarm@modares.ac.ir

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۷/۹/۲۶ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۸/۶/۲۱

چکیده

اهداف. گونه‌های فوزاریوم از مهم‌ترین قارچ‌ها هستند که مایکوتوکسین‌ها، به‌ویژه تریکوتسن‌ها، را تولید می‌کنند و سبب آلودگی مواد غذایی می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر، شناسایی گونه‌ای از فوزاریوم از دسته اسپوروتریکیلا بود که مولد سم T-2 است و اخیرا از گندم انباری استان تهران جدا شده است.

روش‌ها. این گونه به روش "فریز بلاتر" از گندم جدا و سپس به روش کشت تک اسپور، خالص شد. برای شناسایی از محیط‌های کشت CLA، SNA، PDA و PSA استفاده گردید. همه خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی گونه فوزایوم جداشده مورد بررسی قرار گرفت. DNAی قارچ از طریق PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* و *فوزاریوم لانگستیه* مورد ارزیابی قرار گرفت. در DNA ریبوزومی قارچ مورد نظر، نواحی ITS1 و ITS2 با استفاده از پرایمرهای جهانی ITS4 و ITS5 و همچنین قطعه‌ای از ژن TEF-1α این قارچ، با استفاده از پرایمرهای جهانی بیرونی (EF1 و EF2) و درونی تکثیر، خالص‌سازی و تعیین توالی شد.

یافته‌ها. از نظر ریخت‌شناسی و توالی، ژن ITS کاملاً مشابه *فوزاریوم لانگستیه* بود (گونه‌ای که اخیراً از اروپا گزارش شده است). لیکن بر اساس توالی، ژن TEF-1α با *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* گروه‌بندی شد.

نتیجه‌گیری. این گونه برای اولین بار در ایران جدا شده و تاکنون موردی از جداسازی این گونه از آسیا گزارش نشده است. بنابراین، بررسی وسیعی روی غلات ایران از نظر وجود این دسته فوزاریوم‌ها و سم T-2 ضروری است.

کلیدواژه‌ها: *فوزاریوم لانگستیه*، *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس*، گندم

۱- گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- گروه بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مقدمه

گونه‌های فوزاریوم به دلیل اهمیت‌شان در پزشکی، بهداشت و کشاورزی از مهم‌ترین گروه‌های قارچی محسوب می‌شوند. آنها طیفی از مایکوتوکسین‌ها را تولید می‌کنند که سبب آلودگی غذا و مواد غذایی می‌شوند. زیان‌های ناشی از تأثیر مایکوتوکسین‌ها به صنایع خوراک دام و دام‌پروری ایالات متحده و کانادا، سالانه پنج میلیارد دلار برآورد شده است [۱]. مایکوتوکسین‌های مهم آفلاتوکسین‌ها، تریکوتسن‌ها، فومونیسین‌ها، زرالنون و اکراتوکسین A هستند. تریکوتسن‌ها بزرگ‌ترین گروه از مایکوتوکسین‌ها را تشکیل می‌دهند. آنها را بر اساس خواص شیمیایی و قارچ مولدشان به ۴ تیپ A، B، C و D طبقه‌بندی می‌کنند. تریکوتسن‌های تیپ A به‌ویژه T-2 و HT-2 سمی‌ترین تریکوتسن‌ها هستند [۲].

طی سال‌های ۴۷-۱۹۴۲، هزاران نفر در روسیه به‌دنبال مصرف غلات آلوده و شیوع بیماری ATA (Alimentary Toxic Aleukia) رنج بردند [۳، ۴، ۵]. بیش‌ترین گونه‌های قارچی سمی جداشده از آن غلات، *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* و *فوزاریوم پوئه* گزارش شده و مشخص گردیده که به میزان خیلی زیاد سم T-2 تولید می‌کنند [۴]. *وانگ* و همکاران مواردی از مسمومیت انسانی به‌دلیل مصرف برنج کپکی آلوده با فوزاریوم و سم T-2 را در چین گزارش نموده‌اند [۶]. مواردی از بیماری نیز در حیوانات گزارش شده است. مسمومیت شدید اسب‌ها با پوست باقالی آلوده به قارچ مولد سم T-2 در ژاپن گزارش شده است. در این بررسی قارچ مولد سم، *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* بوده است [۷، ۸].

فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس، *فوزاریوم پوئه* و *فوزاریوم تریسینکتوم* گونه‌هایی از جنس فوزاریوم هستند که از نظر مورفولوژی واجد میکروکونیدیاهای کروی، گلابی- یا شلغمی‌شکل بوده و بر این اساس، از سال ۱۹۶۸ که *سیمولر* آنها را در دسته اسپوروتریکیلا معرفی نمود، تاکنون در این دسته قرار داشته‌اند. در دهه اخیر بر پایه مطالعات توالی DNA و تولید متابولیت‌های ثانویه، برخی دانشمندان *فوزاریوم پوئه* را از دسته دیسکلر و *فوزاریوم تریسینکتوم* را از دسته روزئوم می‌دانند [۹، ۱۰]. *فوزاریوم کایوشوئنس* گونه جدیدی است که در سال ۱۹۹۸ معرفی شد و بر پایه توالی DNA در دسته اسپوروتریکیلا قرار گرفته است [۱۱]. اخیراً گونه جدیدی از فوزاریوم به نام *فوزاریوم لانگستیه* کشف و شناسایی شده که بر اساس خصوصیات مورفولوژی و مولکولی در دسته اسپوروتریکیلا قرار گرفته است. این تک‌سلولی خصوصیات مورفولوژی شبیه *فوزاریوم پوئه* داشته و به‌عنوان شکل پودری *فوزاریوم پوئه* شناخته شده است. اما از نظر تولید مایکوتوکسین مشابه *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* است، به‌طوری‌که تریکوتسن‌های تیپ A مثل T-2 را تولید می‌کند [۹، ۱۲].

فوزاریوم لانگستیه از غلاتی چون گندم، جو و جوی دوسر در شمال، مرکز و شرق اروپا از کشورهای نروژ، اتریش، آلمان، هلند، جمهوری چک، دانمارک، انگلستان، ایتالیا، لهستان و اسلواکی به‌صورت موردی جدا و گزارش شده است [۹، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶]. لیکن گزارشی مبنی بر جداسازی آن در آسیا منتشر نشده است. هدف از مطالعه حاضر، معرفی و شناسایی گونه‌ای از فوزاریوم از دسته اسپوروتریکیلاست که مولد سم T-2 بوده و در بررسی انجام‌شده توسط ما روی ۷۴ نمونه گندم انباری استان تهران طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ جدا شده است.

روش‌ها

جداسازی و شناسایی مورفولوژی: قارچ مورد نظر به روش فریز بلاتر از گندم جدا شد [۱۷]. به روش کشت تک‌اسپور روی محیط کشت آبی آگار ۲٪ خالص و سپس به‌منظور شناسایی از محیط‌های کشت CLA (Carnation Leaf Agar) و SNA (Spezieller Nahrstoffarmer) محتوی کاغذ صافی استریل PDA (Potato Dextrose Agar) و PSA (Potato Sucrose Agar) استفاده شد [۱۸، ۱۹]. انکوباسیون در دمای ۲۵°C تحت شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور UV با طول موج ۳۶۰ نانومتر به‌طور متوالی صورت گرفت. همه خصوصیات میکروسکوپی (وجود اسپورودوچیا یا ماکروکونیدیا، شکل و اندازه میکروکونیدیا، وجود مونوفیالاید یا پلی‌فیالاید و وجود کلامیدوکونیدیا) و ماکروسکوپی (کلنی پودری روی PDA، قطر کلنی روی PSA و PDA در دو شرایط دمایی ۲۵°C و ۲۰°C) فوزاریوم جداشده مورد بررسی قرار گرفت [۹، ۱۲].

شناسایی مولکولی: استخراج DNA به روش فنل/کلروفرم مطابق با روش *چوئی* و همکاران [۲۰] و *رضایی* و همکاران [۲۱] (البته با کمی تغییر) صورت گرفت. DNAی این‌گونه از طریق PCR با پرایمرهای اختصاصی *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* مطابق روش *کولیک* و همکاران [۲۲] و با پرایمرهای اختصاصی *فوزاریوم لانگستیه* و *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* مطابق روش *ویلسون* و همکاران [۲۳] تکثیر شد. نواحی ITS1 و ITS2 در DNAی ریبوزومی قارچ موردنظر با استفاده از پرایمرهای جهانی ITS4 و ITS5 معرفی‌شده توسط *وایت* و همکاران [۲۴]، که توالی آنها در جدول ۱ مشخص شده تکثیر شد.

جدول ۱) توالی پرایمرهای ITS4 و ITS5

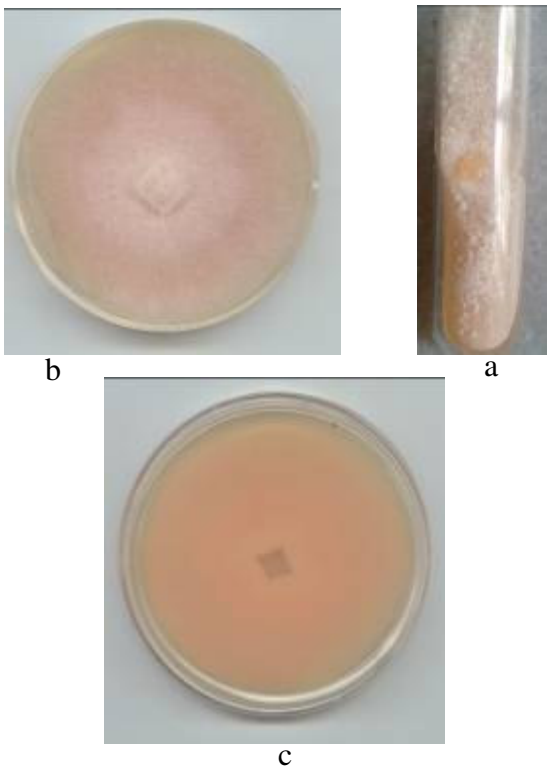
پرایمر	توالی
ITS4	*5′ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3′*
ITS5	*5′ GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3′*

نحوه انجام PCR: واسرشت ابتدایی در ۹۴°C به‌مدت ۲ دقیقه، ۳۵دور از واسرشت (۹۴°C، ۳۰ ثانیه)، اتصال (۵۸°C، ۳۰ ثانیه) و گسترش (۷۲°C، یک دقیقه) و در ادامه، گسترش نهایی (۷۲°C، ۷ دقیقه) انجام شد. سپس محصول PCR به‌دست آمده (تقریباً ۵۷۰ bp) از روی ژل استخراج و تعیین توالی شد.

همچنین قطعه‌ای (تقریباً bp۷۰۰) از ژن TEF-1α‌ی این قارچ با استفاده از پرایمرهای خارجی EF1 و EF2 مطابق روش *اودونل* و همکاران [۲۵] و پروتکل شرح‌داده‌شده توسط *کربن* و همکاران [۲۶] (با این تفاوت که به جای ۲۰میکرولیتر از ۵۰میکرولیتر نتیجه واکنش PCR استفاده شد) تکثیر گردید. هم‌چنین از پرایمرهای داخلی رفتی EF15 و برگشتی EF16 مطابق روش *کنوتسن* و همکاران [۲۷] قطعه‌ای (تقریباً bp۳۰۰) از محصول PCR قبلی حاصل شد. هر دو قطعه از روی ژل استخراج و تعیین توالی شدند. در پایان، توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار Mega 3 بررسی شد.

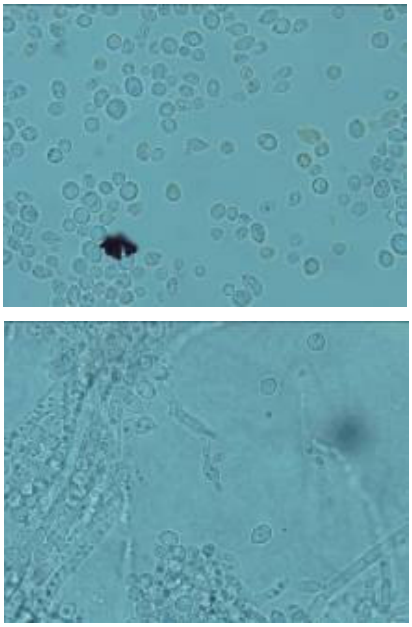
نتایج

مشاهدات ماکروسکوپی: در کشت اولیه روی PDA، رنگ صورتی، رشد کُند همراه با میسلیوم هوایی کم مشاهده شد. در اثر پاساژ مجدد روی این محیط، رنگ سفید با ظاهر پودری دیده شد (شکل ۱). قارچ موردنظر روی محیط کشت PSA رشد سریعی داشت و میسلیوم هوایی زیادی تولید نمود. میزان رشد شعاعی قارچ روی محیط‌های کشت PSA و PDA در دمای ۲۵°C در شرایط کاملاً تاریک به‌ترتیب ۸/۵ و ۷/۵ میلی‌متر در روز بود. هم‌چنین روی محیط کشت PDA در دمای ۲۰±۰/۵°C، میزان رشد شعاعی ۶/۴ میلی‌متر در روز بود. روی محیط PSA، رنگدانه قرمز در پشت کلنی مشاهده نشد.



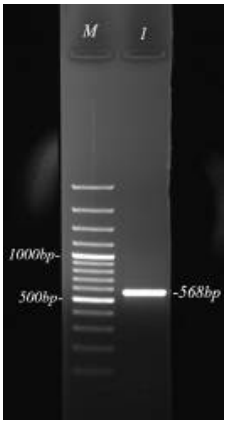
شکل ۱) *فوزاریوم لانگستیه*. a: کشت اولیه روی PDA بعد از ۷ روز در۲۵°C؛ b: منظره پشت کلنی تحت همین شرایط؛ c: کشت مجدد روی PDA بعد از ۵ روز در ۲۵°C (مشاهده نمای پودری)

مشاهدات میکروسکوپی: قارچ موردنظر، حتی تحت نور UV ماکروکونیدیا و اسپورودوچیا ایجاد ننمود. در عوض، میکروکونیدیاهای کروی و شلغمی‌شکل در اندازه ۶/۴–۳/۸μm × ۹/۴–۵/۱ μm با میانگین و انحراف‌معیار ۵±۰/۶ × ۱±۶/۷ تولید نمود (طول و عرض حدود ۴۰ میکروکونیدیا اندازه‌گیری شد). هیچ کلامیدوکونیدیایی مشاهده نشد؛ اما، کونیدیوفور کوتاه و منشعب داشت و واجد مونوفیالاید منشعب و پلی‌فیالاید و هم‌چنین فیالایدهای متورم و آمپولی‌شکل بود (شکل ۲).

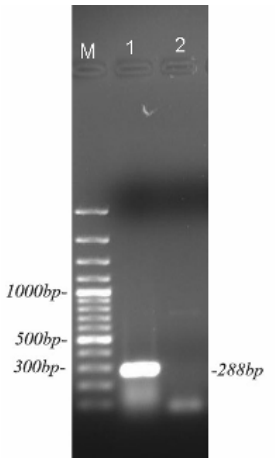


شکل ۲) *فوزاریوم لانگستیه*. میکروکونیدیای کروی و شلغمی‌شکل به همراه فیالاید متورم و آمپولی‌شکل (۱۰۰×)

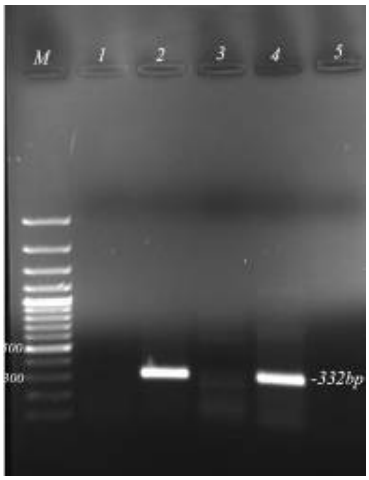
خواص مولکولی: نتیجه تعیین توالی قطعه ژن به طول bp۵۶۸ که حاصل پرایمرهای جهانی ITS4 و ITS5 بود با رکوردهای ثبت‌شده در بانک اطلاعات ژنی مربوط به ژن ITS1 و ITS2 *فوزاریوم لانگستیه* به شماره‌های دسترسی EF526078 و AY680864 ۱۰۰٪ مطابقت داشت. گونه موردنظر به پرایمر اختصاصی *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* معرفی‌شده توسط *کولیک* و همکاران [۲۲] پاسخ نداد (شکل ۳)؛ اما به پرایمر اختصاصی *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* معرفی‌شده توسط *ویلسون* و همکاران [۲۳] پاسخ داد (شکل ۴). هم‌چنین به پرایمر اختصاصی *فوزاریوم لانگستیه* معرفی‌شده توسط *ویلسون* پاسخ نداد (شکل ۵). نتیجه تعیین توالی محصول PCR خالص‌شده مربوط به پرایمرهای بیرونی (EF1، EF2) و پرایمرهای درونی (EF15، EF16) ژن TEF-1α با رکورد ثبت‌شده در بانک اطلاعات ژنی به شماره دسترسی AJ427272 *فوزاریوم لانگستیه* ۹۹٪ مطابقت داشت (شکل ۶). هم‌چنین با رکوردهای ثبت‌شده به شماره‌های دسترسی EF521146، AY337442، AJ420840 و AJ420820 مربوط به *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* ۹۹٪ تشابه داشت.



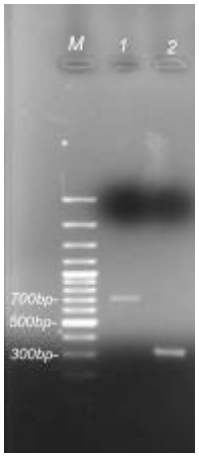
شکل ۳) محصول PCR با پرایمرهای جهانی ITS4 و ITS5 و DNAی گونه حاضر روی ژل آگارز ۱٪
خط M: مارکر استاندارد



شکل ۴) محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس* روی ژل آگارز ۱٪
خط M: مارکر استاندارد، خط ۱: *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس* استاندارد (VTT D-72014)، خط ۲: گونه حاضر



شکل ۵) محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی *فوزاریوم لانگستیه* و *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس* مطابق با *ویلسون* و همکاران روی ژل آگارز ۱٪
خط M: مارکر استاندارد، *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس* استاندارد (VTT D-72014) با پرایمرهای اختصاصی *فوزاریوم لانگستیه* (خط ۱) و *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس* (خط ۲). گونه حاضر با پرایمرهای اختصاصی *فوزاریوم لانگستیه* (خط ۳) و *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس* (خط ۴) و کنترل منفی (خط ۵)



شکل ۶) محصول PCR با پرایمرهای جهانی ژن TEF-1α با DNAی گونه حاضر روی ژل آگارز ۱٪
خط M: مارکر استاندارد؛ خط ۱: محصول پرایمرهای بیرونی (EF1، EF2)؛ خط ۲: محصول پرایمرهای لانه‌گرفته

بحث

گونه‌های *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس*، *فوزاریوم پوئه* و *فوزاریوم لانگستیه* از جمله فوزاریوم‌های مهم مولد توکسین هستند که در دسته اسپوروتریکیلا قرار دارند. *فوزاریوم لانگستیه* هر چند که طی سال‌های اخیر شناسایی و معرفی شده، لیکن گزارشاتی مبنی بر جداسازی آن در سال‌های قبل به نام فرم پودری *فوزاریوم پوئه* یا *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس* ارایه شده است [۱۳، ۲۸].

فوزاریوم لانگستیه گونه‌ای از فوزاریوم است که کونیدیاهای کروی تا شلغمی‌شکل تولید می‌نماید و فاقد اسپورودوچیا یا ماکروکونیدیا است که مشخصه‌های مورفولوژی جنس فوزاریوم هستند. البته بر اساس نوع متابولیت تولیدی و خصوصیات مولکولی، این قارچ را در جنس فوزاریوم طبقه‌بندی نموده‌اند و بررسی‌ها نشان داده که این گونه، ارتباط نزدیکی با *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس* دارد [۲۷، ۲۹، ۳۰، ۳۱]. از نظر مورفولوژی، *فوزاریوم لانگستیه* برخلاف *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس* دارای خصوصیاتی چون عدم تولید ماکروکونیدیا، فاقد کلامیدوکونیدیا، عدم تولید رنگدانه قرمز در پشت کلنی در محیط کشت PSA و واجد رشد آهسته‌تر روی محیط کشت PDA در مقایسه با محیط PSA و غیره است [۹]. این خصوصیات و دیگر یافته‌ها که در قسمت نتایج اشاره شد، کاملاً در گونه جداشده در بررسی حاضر مشاهده شد و بهتر است بگوییم که گونه جداشده از نظر مورفولوژی *فوزاریوم لانگستیه* است.

نواحی ITS ریبوزومی به‌طور گسترده برای مطالعات فیلوژنتیکی فوزاریوم‌ها و اعضای دسته اسپوروتریکیلا مثل *فوزاریوم اسپوروتراکیوئیدس*، *فوزاریوم پوئه* و *فوزاریوم لانگستیه* به‌کار رفته است [۲۹، ۳۲، ۳۳]. هم‌چنین EF-1 α که پروتئینی بسیار محافظت شده است، در فرآیند ترجمه سلول نقش داشته و برای مطالعه تغییرات بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای و طبقه‌بندی طیف وسیعی از یوکاریوت‌ها

شامل قارچ‌ها، فوزاریوم‌ها و هم‌چنین دسته اسپوروتریکیلا به‌کار گرفته شده است [۲۵، ۲۷، ۳۴، ۳۵]. در بررسی حاضر نیز، برای شناسایی مولکولی قارچ مورد نظر از این دو ژن استفاده شد.

از نظر مولکولی، بررسی توالی قطعه ژن 18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA از ژن rDNAی گونه حاضر با تمام رکوردهای ثبت‌شده *فوزاریوم لانگستیه* در بانک اطلاعات ژنی NCBI مطابقت داشت. به عبارتی، گونه جداشده از این نظر نیز مشابه *فوزاریوم لانگستیه* بود. بررسی قطعه‌ای از توالی ژن TEF-1α این‌گونه با اکثر رکوردهای ثبت‌شده *فوزاریوم لانگستیه* در بانک اطلاعات ژنی NCBI مطابقت نداشت و تنها با رکورد ثبت‌شده *فوزاریوم لانگستیه* به شماره دسترسی AJ427272 که مربوط به *فوزاریوم لانگستیه* با کد IBT9959است، مطابقت داشت. هم‌چنین با اکثر رکوردهای ثبت‌شده *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* مطابقت داشت. به عبارتی، گونه حاضر از نظر توالی ژن TEF-1α مشابه *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* بود. *کریستنسن* و همکاران [۲۶] گونه *فوزاریوم لانگستیه* با کد IBT9959 را بر اساس مورفولوژی به‌عنوان *F. cf.langsethiae* و بر اساس ژن TEF-1α با گونه‌های *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* گروه‌بندی نمودند. گونه حاضر تفاوتی نیز از جنبه مورفولوژی با IBT9959 داشت. میزان رشد گونه حاضر روی محیط PSA در مقایسه با PDA همانند گونه‌های لانگستیه بیش‌تر بود، اما در *فوزاریوم لانگستیه* با کد IBT9959، برعکس، رشد قارچ روی محیط PDA بیشتر از PSA گزارش شده است [۱۲]. با توجه به خصوصیات ذکرشده، گونه حاضر حدواسط *فوزاریوم لانگستیه* و *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* بوده و می‌تواند به‌عنوان *F. cf.langsethiae* (cf در سیستم نام‌گذاری ۲اسمی به معنی این است که گونه موردنظر به احتمال فراوان همان گونه شناخته‌شده است، اما نه به‌طور قطعی) معرفی شود. البته بهتر است بررسی‌های مولکولی بیشتری مثل آنالیز IGS-RFLP روی گونه جداشده صورت گیرد که نیازمند مطالعات بعدی است.

نتیجه‌گیری

این گونه، برای اولین بار در ایران جدا شده است. طبق مطالعات ما تاکنون گزارشی از جداسازی این‌گونه در آسیا ارایه نشده است. *فوزاریوم لانگستیه* و *فوزاریوم اسپوروتریکیوئیدس* و گونه‌های حدواسط به‌عنوان گونه‌های اصلی مولد سم T-2 شناخته شده‌اند [۱۲]. از آنجاکه گونه حاضر نیز مولد سم T-2 است، توصیه می‌شود که مطالعاتی در سطح وسیع روی غلات ایران از نظر وجود این دسته فوزاریوم‌ها و متابولیت‌های سمی آنها صورت گیرد.

تشکر و قدردانی: از آقایان دکتر پال نیکلسون و دکتر رالف کریستنسن که ما را در شناسایی *فوزاریوم لانگستیه* راهنمایی نمودند، تشکر می‌کنیم. هم‌چنین از تمامی افرادی که ما را در این تحقیق یاری نمودند به‌ویژه از سرکار خانم دکتر فاطمه نوربخش، آقای محمدرضا صفری و سرکار خانم مریم رازقی کمال سپاسگزاری را داریم.

منابع

1- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Manual on the application of the HACCP System in mycotoxin prevention and control. Food and Nutrition paper. 2001;73:1-48.
2- Marasas WFO, Nelson PE, Toussoun TA. Toxigenic Fusarium species: Identity and mycotoxicology. Pennsylvania: University Park; 1983.
3- Ueno Y. Trichothecenes in food. In: Krogh P, editor. Mycotoxins in food. London: Academic Press; 1987.
4- Joffe AZ. Fusarium poae: Sporotrichioides as principal causal agents of alimentary toxic aleukia. In: Wyllie RD, Morehouse LG, editors. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses: An encylopedic handbook. New York: Marcel Dekker; 1978.
5- Beardall JM, Miller JD. Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. In: Miller JD, Trenholm HL, editors. Mycotoxins in grain: Compounds other than aflatoxin. Portland: Eagan Press; 1994.
6- Wang ZG, Feng JN, Tong Z. Human toxicosis caused by moldy rice contaminated with Fusarium and T-2 toxin. Biomed Environ Sci. 1993;6:65-70.
7- Ueno Y, Ishii K, Kanaeda S, Tsunoda H, Tanaka T, Enomoto M. Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria. Microbial survey on bean-hulls poisoning of horses with the isolation of toxic trichothecenes, neosolaniol and T-2 toxin of Fusarium solani M-1-1. Japan J exp Med. 1972;42:187-203.
8- Yazar S, Omurtag GZ. Fumonisins, Trichothecenes and Zearalenone in cereals. Int J Mol Sci. 2008;9:2062-90.
9- Torp M, Nirenberg HI. Fusarium langsethiae sp. nov. on cereals in Europe. Int J Food Microbiol. 2004;95:247-56.
10- Yli-Mattila T, Paavanen-Huhtala S, Bulat SA, Alekhina IA, Nirenberg HI. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the F. avenaceum, F. arthrosporioides, F. tricinctum species complex: A polyphasic approach. Mycol Res. 2002;106(6):655-69.
11- Aoki T, O'Donnell K. Fusarium kyushuense sp. nov. from Japan. Mycoscience. 1998;39:1-6.
12- Torp M, Langseth W. Production of T-2 toxin by a Fusarium resembling Fusarium poae. Mycopathology. 1999;147:89-96.
13- Torp M, Adler A. The European Sporotrichiella project: A polyphasic approach to the biology of a new Fusarium species. Int J Food Microbiol. 2004;95(3):241-5.
14- Lukanowski A, Lenc L, Sadowski C. First report on the occurrence of Fusarium langsethiae isolated from Kernels in Poland. Plant Dis. 2008;92(3):488-90.
15- Infantino A, Pucci N, Conca G, Santori A. First report of Fusarium langsethiae on Durum Wheat Kernels in Italy. Plant Dis. 2007;91:1362-7.
16- Hudec K, Rohacik T. The occurrence and predominance of Fusarium species on Barley Kernels in Slvakia. Cereal Res Commun. 2009;37(1):101-9.
17- Mathur SB, Kongsdal O. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. Denmark: International Seed Testing Association Copenhagen; 2003.
18- Leslie JF, Summerell BA. The Fusarium laboratory manual. Oxford: Blackwell Publishing; 2006.
19- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. Fusarium species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Park; 1983.

20- Choi GH, Marek ET, Schardl CL, Richey MG, Chang S, Smith DA. A stress-responsive gene in Fusarium spp. J Bacteriol. 1990;72:4522-8.
21- Rezaie S, Ban J, Mildner M, Poitschek C, Brna C, Tschachler E. Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen Trichophyton rubrum. Gene. 2000;241:27-33.
22- Kulik T, Fordon G, Pszczo lkowska A, Plodzien K, Lapin M. Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of Fusarium sporotrichioides. FEMS Microbiol Lett. 2004;239:181-6.
23- Wilson A, Simpson D, Chandler E, Jennings P, Nicholson P. Development of PCR assays for the detection and differentiation of Fusarium sporotrichioides and Fusarium langsethiae. FEMS Microbiol Lett. 2004;233:69-76.
24- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfan DHd, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press;1990.
25- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:2044-9.
26- Carbone I, Anderson JB, Kohn LM. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. Evolution. 1999;53:11-21.
27- Knutsen AK, Torp M, Holst-Jensen A. Phylogenetic analyses of the Fusarium poae, F. sporotrichioides and F. langsethiae species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. Int J Food Microbiol. 2004;95:287-95.
28- Bateman GL, Kwasna H, Ward E. Relationships among Fusarium spp. Estimated by comparing polymerase chain reaction amplified nuclear rDNA. Can J Microbiol. 1996;42:1232-40.
29- Yli-Mattila T, Mach RL, Alekhina IA, Bulat SA, Koskinen S, Kullnig-Gradinger CM, et al. Phylogenetic relationship of Fusarium langsethiae to Fusarium poae and F. sporotrichioides as inferred by IGS, ITS, β-tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. Int J Food Microbiol. 2004;95:267-85
30- Thrane U, Adler A, Clasen PE, Galvano F, Langseth W, Lew H, et al. Diversity in metabolite production by Fusarium langsethiae, Fusarium poae and Fusarium sporotrichioides. Int J Food Microbiol. 2004;95:257-66.
31- Schmidt H, Niessen L, Vogel RF. AFLP analysis of Fusarium species in the section Sporotrichiella: Evidence for F. langsethiae as a new species. Int J Food Microbiol. 2004;95:305-19.
32- Suga H, Hasegawa T, Mitsui H, Kageyama K, Hyakumachi M. Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus Fusarium solani based on the rDNA-ITS region. Mycol Res. 2000;104:1175-83.
33- Lee YM, Choi YK, Min BR. Molecular characterization of Fusarium solani and its formal special's based on sequences analysis of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of ribosomal DNA. Mycobiology. 2000;28:82-8.
34- Kristensen R, Torp M, Kosiak B, Holst-Jensen A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in Fusarium species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycol Res. 2005;109(2):173-86.
35- Roger AJ, Sandbloom O, Doolittle WF, Philippe H. An evaluation of elongation factor 1α as a phylogenetic marker for eukaryotes. Mol Biol Evol. 1999;16:218-33.