مطالعه مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی تعدادی از گونه‌های *Fusarium* متعلق به گونه مرکب *Gibberella fujikuroi* در ایران

دریافت: ۱۳۹۲/۳/۲۰/ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۲۹

زینب حیدریان: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

محمد جوان نیکخواه⌧: استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج (jnikkhah@ut.ac.ir)

خلیل بردی فتوحی‌فر: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

عبداله احمدپور: دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

چکیده

گونه مرکب *Gibberella fujikuroi* با فرم غیرجنسی *Fusarium* spp. عامل تعدادی از بیماری‌های گیاهی مهم می‌باشد و گونه‌های شناسایی شده در این گونه مرکب متابولیت‌های ثانویه متعددی تولید می‌کنند. در تحقیق حاضر، ارزیابی مورفولوژیکی ۴۶ جدایه به دست آمده از میزبان‌های برنج، ذرت، نیشکر و پیاز و مطالعه فیلوژنتیکی ۲۲ جدایه منتخب از این گونه‌ها براساس توالی‌یابی نوکلئوتیدی نواحی ITS1-5.8S-ITS2 و ژن *EF-1α* انجام گردید. با ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی ۴۶ جدایه از جنس *Fusarium*، پنج گونه *F. fujikuroi*، *F. proliferatum*، *F. sacchari*، *F. verticillioides* و *F. thapsinum* شناسایی شدند. دو جدایه به دست آمده از نیشکر از نظر مورفولوژیکی به گونه *F. verticillioides* بسیار شبیه بودند، اما توالی‌یابی ژن *EF-1α* نشان داد که جدایه‌ها متعلق به گونه *F. andiyazi* می‌باشند. براساس توالی‌یابی ژن *EF-1α* شش کلاد اصلی مشخص شد و این ژن توانست تمامی گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق را به خوبی از یکدیگر تفکیک نماید. این در حالی است که نواحی ITS1-5.8S-ITS2 پنج کلاد اصلی را مشخص نمود. نواحی ITS1-5.8S-ITS2 گونه‌های *F. proliferatum* و *F. verticillioides* را از یکدیگر متمایز نمود، اما این نواحی قادر به تمایز گونه‌های *F. proliferatum* و *F. fujikuroi* و همچنین دو گونه *F. andiyazi* و *F. verticillioides* از یکدیگر نبودند. در مجموع می‌توان بیان کرد که ژن *EF-1α* برای شناسایی سریع گونه‌های فوزاریوم بسیار مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیمارگر، تاکسونومی، توالی‌یابی، قارچ، DNA، *EF-1α*، ITS

Morphological and phylogenetic investigation on selected *Fusarium* species belong to *Gibberella fujikuroi* species complex in Iran

Received: 10.06.2013/ Accepted: 20.11.2013

Zeinab Heidarian: MSc graduated, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj

Mohammad Javan-Nikkhah⌧**:** Prof., Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj (jnikkhah@ut.ac.ir)

Khalil Berdi Fotouhifar: Assistant Prof., Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj

Abdollah Ahmadpour: PhD Student, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj

Summary

The *Gibberella fujikuroi* species complex with *Fusarium* anamorphs is the causal of diverse diseases of many important plants. Many of the known species in this species complex produce a wide range of secondary metabolites. In this study, morphological characteristics of 46 isolates from rice, maize, sugarcane and onion and phylogenetic relationships of 22 isolates on the basis of ITS1-5.8S-ITS2 region and *EF-1α* gene sequences were investigated. According to the morphological characteristics of 46 isolates, five species including *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. thapsinum*, and *F. verticillioides* were identified. Moreover, earlier morphologically two isolates obtained from sugarcane were very similar to *F. verticillioides* but, using *EF-1α* gene sequence were identified as *F. andiyazi*. On the basis of *EF-1α* sequence, six clades were identified and differentiated all of six species (*F. andiyazi*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. thapsinum* and *F. verticillioides*) from one another. Moreover, sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region identified five clades and differentiated *F. proliferatum* and *F. verticillioides* from each other but this region could not differentiate *F. proliferatum* and *F. fujikuroi* or *F. andiyazi* and *F. verticillioides* from each other. Generally, *EF-1α* gene was appropriate for differentiation of *Gibberella fujikuroi* species complex.

Keywords: DNA sequencing, *EF-1α*, fungus, ITS, pathogen, taxonomy

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی دکتر محمد جوان نیکخواه ارایه شده به پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

مقدمه

گونه مرکب *Gibberella fujikuroi* complex (GFC) با فرم غیرجنسی *Fusarium* spp. عامل تعدادی از بیماری‌های گیاهی مهم از نظر اقتصادی از جمله پوسیدگی طوقه برنج، پوسیدگی فوزاریومی خوشه و بلال ذرت، پوسیدگی ریشه و طبق پیاز و بیماری چاقو بریدگی نیشکر و ... می‌باشد و گونه‌های شناسایی شده در این گونه مرکب متابولیت‌های ثانویه سمی زیادی از جمله فومونیزین، مونیلیفورمین و بووریسین را تولید می‌کنند (Marasas *et al.* 1984, Leslie 1995, Gupta *et al.* 1991) طی سالهای اخیر مفهوم گونه در این گونه مرکب به طور اساسی و با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی (Nirenberg & O'Donnell 1998, Nirenberg *et al.* 1998)، تلاقی‌های جنسی (Leslie 1995) و تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی حاصل از توالی‌یابی DNA (O'Donnell & Cigelnik 1997 &O'Donnell *et al.* 1998) مورد مطالعه قرار گرفته است. گونه مرکب *G. fujikuroi* یک آرایه تک‌نیایی می‌باشد و شامل گروهی از گونه‌هایی از جنس *Fusarium* است که از لحاظ بسیاری از ویژگی‌های مورفولوژیکی با یکدیگر هم‌پوشانی دارند و همین ویژگی تمایز مورفولوژیکی این گونه‌ها را مشکل می‌نماید. برای شناسایی و تعریف گونه‌ها در گونه مرکب *G. fujikuroi*، مفاهیم مختلف گونه به کار می‌رود. ویژگی‌های بیولوژیکی، اکولوژیکی و ژنتیکی برای این منظور استفاده می‌شود (Rojas 1992, Mayden 1997) که تنها شناسایی گونه مورفولوژیکی (Morphological Species Recognition)، شناسایی گونه بیولوژیکی (Biological Species Recognition) و شناسایی گونه فیلوژنتیکی (Phylogenetic Species Recognition) برای طبقه‌بندی گونه‌های جنس *Fusarium* در GFC به کار می‌رود (Taylor *et al.* 2000). در بین این سه مفهوم، مفهوم مورفولوژیکی گونه از سال ۱۸۰۹ برای طبقه‌بندی جنس *Fusarium* استفاده شده است (Kvas *et al.* 2009). بر این اساس، شناسایی با استفاده از ویژگی‌هایی مثل شکل و اندازه ماکروکنیدیوم‌ها و میکروکنیدیوم‌ها، آرایش هوایی میکروکنیدیوم‌ها، مورفولوژی یاخته‌های کنیدی‌زا و حضور و عدم حضور کلامیدوسپورها برای شناسایی گونه‌های *Fusarium* انجام می‌شود (Kvas *et al.* 2009). همچنین، در مفهوم مورفولوژیکی گونه از تعدادی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی از جمله سرعت رشد پرگنه در دماهای مختلف، ارتباط میزبانی و تولید زهرابه‌های ثانویه استفاده می‌شود (Nelson *et al.* 1983, Kvas *et al.* 2009). براساس مفهوم مورفولوژیکی گونه، GFC شامل ۳۴ گونه مورفولوژیکی می‌باشد (Kvas *et al.* 2009). به دلیل اینکه صفات مورفولوژیکی قادر به تفکیک گونه‌های خیلی مشابه نمی‌باشند و هنوز تعدادی از گونه‌های متعلق به گونه مرکب *G. fujikuroi* توصیف نشده‌اند. بنابراین، کاربرد مفهوم مورفولوژیکی گونه به تنهایی، به درستی تنوع درون جنس *Fusarium* را تعیین نمی‌کند. با این وجود مفهوم مورفولوژیکی گونه برای شناسایی و توصیف نهایی گونه‌های *Fusarium* در کنار مفاهیم بیولوژیکی و فیلوژنتیکی گونه همچنان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Leslie & Summerell 2006, Kvas *et al.* 2009) پیشرفت‌های اخیر در زمینه طبقه‌بندی مولکولی آشکار کرده است که گونه مرکب *G. fujikuroi* شامل حداقل ۵۰ گونه مجزا و یا دودمان فیلوژنتیکی می‌باشد (Kvas *et al.* 2009). که از این ۵۰ گونه، ۳۴ گونه با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی توصیف شده‌اند و دارای شرح کامل هستند. ده گونه نیز براساس باروری جنسی توصیف شده‌اند و حداقل ۲۰ گونه، یک و یا تعداد زیادی زهرابه تولید می‌کنند (Kvas *et al.* 2009). در دهه ۱۹۹۰ با پیشرفت روش‌های بیولوژی مولکولی، روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی DNA برای طبقه‌بندی گونه مرکب *G. fujikuroi* استفاده شد. ژن *EF-1α* به عنوان نشانگری که در طول ژنوم تنها دارای یک نسخه است و بسیار مفید است برای شناسایی و طبقه‌بندی گونه‌های جنس *Fusarium* به فراوانی استفاده می‌گردد. ویسنتین و همکاران (Visentin *et al.*, 2009) نیز با توالی‌یابی ناحیه ITS، دو گونه مورفولوژیکی *F. verticillioides* و *F. proliferatum* را از هم تفکیک کرده‌اند.

شناسایی دقیق عوامل بیماری‌زای گیاهی جهت دستیابی به روش‌های مناسب در مدیریت بیماری‌های گیاهی مهم و ضروری می‌باشد. از طرفی، شناسایی مورفولوژیکی بیمارگرهای قارچی در ارتباط با برخی بیمارگرها از جمله برخی گونه‌های جنس *Fusarium* به دلیل وجود برخی تشابهات و کم بودن قدرت تمایز ویژگی‌های مورفولوژیکی به تنهایی کافی نمی‌باشد. لذا، لازم است به لحاظ فیلوژنتیکی وضعیت هر گونه و ارتباط بین گونه‌ها معلوم شود و جایگاه تاکسونومیکی آن‌ها تعیین گردد. در ایران، هنوز مطالعه جامعی در ارتباط با فیلوژنی گونه‌های بیولوژیکی شناخته شده گونه مرکب *G. fujikuroi* انجام نشده است. اگرچه برخی مطالعات مورفولوژیکی انجام شده، ولی هنوز مرز بین گونه‌ها کاملا مشخص نیست و مطالعه فیلوژنی برای تعیین روابط فیلوژنتیکی آن‌ها و تایید گونه‌ها لازم است. بنابراین، این پژوهش با هدف مطالعه مورفولوژیکی گونه‌های بیولوژیکی شناسایی شده در گونه مرکب *G. fujikuroi* به دست آمده از برنج، ذرت، نیشکر و پیاز و مطالعه فیلوژنتیکی

جدایه‌های منتخب از این گونه‌ها براساس توالی‌یابی نوکلئوتیدی نواحی ITS1- 5.8S- ITS2 و ژن *EF-1α* انجام گردیده است.

روش بررسی

- تهیه جدایه‌های قارچی

در این تحقیق، ۴۶ جدایه قارچی از چهار میزبان برنج، ذرت، نیشکر و پیاز متعلق به گونه مرکب *G. fujikuroi* از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران (کرج) تهیه گردیدند که مشخصات ۲۲ جدایه منتخب از چهار میزبان مذکور در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های گونه مرکب *Gibberella fujikuroi* استفاده شده برای ارزیابی روابط فیلوژنتیکی آن‌ها

Table 1. Characterization of fungal isolates *Gibberella fujikuroi* species complex included in phylogenetic analyses

Species	Host	Isolate	Location	GenBank No. *EF-1α*	GenBank No. ITS
Fusarium andiyazi	Sugarcane	81-2B	Khuzestan	JQ432381	JQ363716
F. andiyazi	Sugarcane	82-42	Khuzestan	JQ432382	JQ363717
F. verticillioides	Maize	3	Golestan	JQ432383	JQ363718
F. verticillioides	Maize	75	Tehran-Karaj	JQ432384	JQ363719
F. fujikuroi	Rice	F13	Mazandaran	JQ432385	JQ363720
F. fujikuroi	Rice	F18	Mazandaran	JQ432386	JQ363721
F. fujikuroi	Rice	F34	Mazandaran	JQ432387	JQ363722
F. fujikuroi	Rice	F45	Mazandaran	JQ432388	JQ363723
F. fujikuroi	Rice	F4	Mazandaran	JQ432389	JQ363724
F. fujikuroi	Rice	F11	Mazandaran	JQ432390	JQ363725
F. fujikuroi	Rice	F30	Mazandaran	JQ432391	JQ363726
F. fujikuroi	Rice	118	Guilan	JQ432392	JQ363727
F. fujikuroi	Rice	119	Guilan	JQ432393	JQ363728
F. proliferatum	Maize	76R	Tehran-Karaj	JQ432394	JQ36372
F. proliferatum	Maize	92R	Kermanshah	JQ432395	JQ363730
F. proliferatum	Sugarcane	19Su	Khuzestan	JQ432396	JQ363731
F. proliferatum	Sugarcane	80-35	Khuzestan	JQ432397	JQ363732
F. proliferatum	Onion	E2	Khorasan	JQ432398	JQ363733
F. proliferatum	Onion	E6′	Khorasan	JQ432399	JQ363734
F. sacchari	Sugarcane	79-8A	Khuzestan	JQ432400	JQ363735
F. sacchari	Sugarcane	80-44	Khuzestan	JQ432401	JQ363736
F. thapsinum	Maize	TV196	Tehran-Varamin	JQ432402	JQ363737
F. fujikuroi	Rice	7ALH	Nepal	FN252407	–
F. proliferatum	Wheat	LMSA 1.09.149	France	JF278609	–
F. proliferatum	Wheat	LMSA 1.09.134	France	JF278596	–
F. proliferatum	Rice	34ALH	China	FN252396	–
F. subglutinans	Maize	–	South Africa	HM135532	–
F. sacchari	Rice	ASHCFsac2	India	FJ603497	–
F. thapsinum	Sorghum	H03-11-9	USA	GU116573	–
F. verticillioides	Rice	31 ALH	China	FN179345	–
F. andiyazi	Rice	30ALH	China	FN252387	–
F. thapsinum	Sorghum	M-3790	USA	–	EF152433
F. fujikuroi	–	PUF022	China	–	HQ165925
F. proliferatum	Maize	PO1	Italy	–	EU151487
F. sacchari	–	NRRL 43543	USA	–	EF453121
F. verticillioides	Maize	VP2	Italy	–	EU151483
F. verticillioides	Maize	NOVb1	Italy	–	EU151476
F. andiyazi	–	4647	Spain	–	GU205409
F. oxysporum	Rice	ASHCFo	India	FJ603494	–
F. oxysporum	Pine	KP10	Lithuania	–	DQ093759

- مطالعه مورفولوژیکی جدایه‌ها

ویژگی‌های مورفولوژیکی اعم از صفات ماکروسکوپی نظیر رنگ، نحوه و سرعت رشد شعاعی پرگنه قارچ روی محیط غذایی PDA پس از یک تا دو هفته نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی و صفات میکروسکوپی نظیر وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم و شکل آن‌ها و همچنین نحوه تولید آن‌ها به صورت زنجیری و یا سرهای دروغی و نوع فیالید (مونوفیالید یا پلی‌فیالید) پس از دو هفته رشد روی محیط کشت SNA در شرایط تاریکی و دمای ۲۲-۲۰ درجه سلسیوس و اندازه و شکل ماکروکنیدیوم و وجود و یا عدم وجود کلامیدوسپور پس از ۱۰-۵ روز روی محیط کشت CLA در دمای ۲۰ درجه سلسیوس بررسی شد. شناسایی براساس منابع علمی معتبر موجود برای شناسایی گونه‌ها (Gerlach & Nirenberg 1982, Nelson *et al.* 1983, Leslie & Summerell 2006) انجام گردید.

- آنالیزهای فیلوژنتیک مولکولی

به منظور تهیه توده میسلیوم مورد نیاز جهت استخراج DNA ژنومی از محیط غذایی مایع سیب‌زمینی- دکستروز (PDB: potato dextrose broth) استفاده شد. بعد از رشد و تشکیل میسلیوم قارچی، توده میسلیوم توسط دستگاه خشک‌کن با سرما (freeze dryer) خشک شدند. به منظور استخراج DNA ژنومی از کیت استخراج DNA (Corebio کره جنوبی) استفاده شد. به منظور ارزیابی روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های بررسی شده در تحقیق حاضر، نواحی ITS1- 5.8S- ITS2 و ژن *EF-1α* برای ۲۲ جدایه منتخب تکثیر و تعیین توالی شد که مشخصات این جدایه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. برای تکثیر نواحی rDNA ITS1-5.8S-ITS2 هسته‌ای از ترکیب آغازگرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم (forward) و معکوس (reverse) استفاده گردید (White *et al.* 1990). مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۸/۳ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، پنج میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید، ۱۰پیکومول از هر آغازگر، یک واحد *Taq* DNA پلیمراز و سه میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰-۵۰ نانوگرم تهیه شد و واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Palm cycler CG1-96 (thermal cycler ,Corbett Research Australia) با ۳۵ چرخه تحت شرایط واسرشت‌سازی اولیه (primary denaturation) در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، چسبیدن (hybridization) در۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۰ ثانیه، بسط (extension) ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام گردید. برای تکثیر ژن *EF-1α* در نمونه‌های مورد بررسی، از ترکیب آغازگرهای EF1T (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') و EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم (forward) و معکوس (reverse) استفاده شد (Geiser *et. al* 2004). مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۹/۳ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، پنج میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید، ۱۰پیکومول از هر آغازگر، یک واحد *Taq* DNA پلیمراز و سه میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰-۵۰ نانوگرم تهیه شد و واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با ۳۵ چرخه تحت شرایط واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۸۵ ثانیه، واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ ثانیه، دورگه‌سازی در ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۶۵ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. به منظور خالص‌سازی محصولات حاصل از تکثیر نواحی ITS1-5.8S-ITS2 و ژن *EF-1α* از کیت AccuPrep® PCR & Gel Purification Kit (Bioneer, South Korea) استفاده شد. پس از خالص‌سازی، محصولات خالص شده در ژل آگارز ۱/۲٪ ارزیابی شدند. تعیین توالی محصولات خالص شده توسط شرکت Bioneer کره جنوبی صورت گرفت. برای اطمینان از صحت توالی‌های به دست آمده از هر نمونه، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (basic local alignment search tool) (Altschul *et al.* 1997) با توالی‌های موجود در بانک ژن و پایگاه اطلاعاتی FUSARIUM-ID v. 1.0 (Geiser *et al.* 2004) مقایسه شد. مقایسه فیلوژنتیکی ۲۲ توالی جدید مربوط به جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به همراه نه توالی مربوط به این گروه از قارچ‌ها که از بانک ژن (NCBI) اخذ شد انجام گرفت و گونه *F. oxysporum* نیز به عنوان آرایه گروه خارجی (outgroup) انتخاب شد (جدول ۱) (Kvas *et al.* 2009). توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalX ver 2.0.12 هم‌ردیف شدند (Thompson *et al.* 1997). توالی‌های مرتب شده به دقت رویت و تغییرات اندکی در آن‌ها ایجاد گردید.

در ارزیابی توالی‌های مرتب شده از روش مقایسه توالی‌ها و ترسیم درخت فیلوژنتیکی maximum-parsimony استفاده

گردید (Eck & Dayhoff 1966). درخت فیلوژنتیکی maximum-parsimony با الگوریتم Close-Neighbor-Interchange algorithm (Nei & Kumar 2000) و با استفاده از الگوی از پیش تعیین شده (default) نرم‌افزار MEGA4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver. 4.0) ترسیم شد (Tamura *et al.* 2007). سایر اندازه‌گیری‌ها مانند طول شجره (tree length)، مقیاس استحکام و هماهنگی شجره (consistency index)، شاخص بازداری (retention index) و شاخص ثبات واحدها (rescaled consistency index) در این نرم افزار اندازه‌گیری شد. برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در شجره‌های حاصل، از تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی (bootstrapping) با انجام ۱۰۰۰ تکرار استفاده گردید (Felsenstein 1985). توالی‌های مربوط به ۲۲ جدایه به NCBI فرستاده شد و شماره دستیابی اخذ شد. شماره‌های دستیابی برای ناحیه ژنی ITS1-5.8S-ITS2 و ژن *EF-1α* به ترتیب از JQ363716 تا JQ363737 و JQ432381 تا JQ432402 می‌باشند (جدول ۱).

نتیجه و بحث

- ارزیابی مورفولوژیکی جدایه‌ها گونه مرکب *Gibberella fujikuroi*

در این تحقیق، با ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی ۴۶ جدایه گونه مرکب *G. fujikuroi*، پنج گونه *F. sacchari* (سه جدایه از نیشکر) (شکل ۱-A-D)، *F. thapsinum* (یک جدایه از ذرت) (شکل ۱-E-H)، *F. verticillioides* (شش جدایه از ذرت و دو جدایه از نیشکر) (شکل ۱-I-K)، *F. fujikuroi* (۱۸ جدایه از برنج) و *F. proliferatum* (پنج جدایه از پیاز، پنج جدایه از ذرت و پنج جدایه از نیشکر) (شکل ۱-L-O) شناسایی شد. جدایه‌های 81-2B و 82-42 (جدا شده از نیشکر) از نظر مورفولوژیکی به گونه *F. verticillioides* بسیار شبیه بودند (جدول ۱). اما توالی‌یابی ژن *EF-1α* نشان داد که جدایه‌ها متعلق به گونه *F. andiyazi* می‌باشند (به بخش آنالیزهای فیلوژنتیکی مراجعه شود).

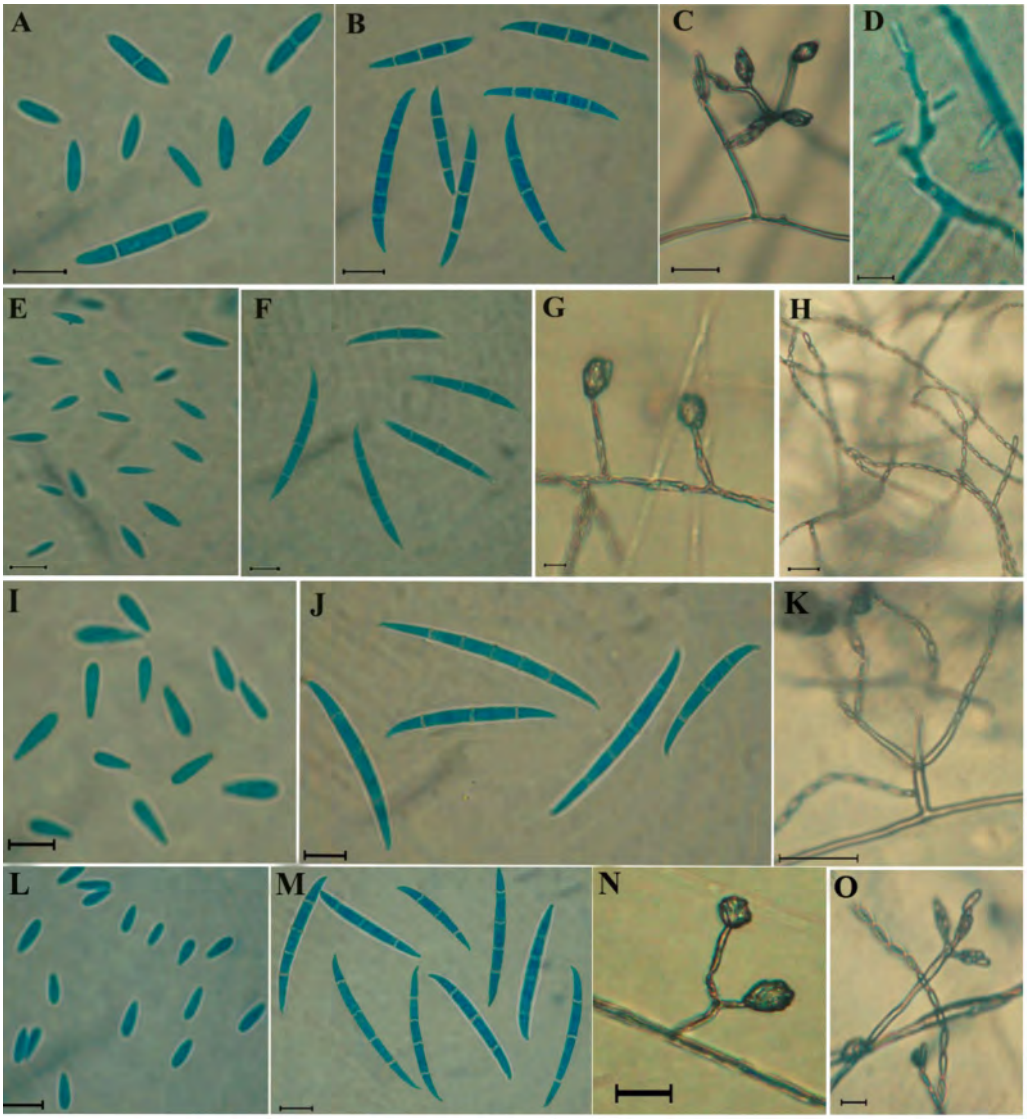
- ارزیابی روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن *EF-1α*

طول توالی نوکلئوتیدی ژن *EF-1α* در بین ۲۲ جدایه مورد بررسی از ۶۶۳ تا ۶۹۰ جفت باز متغیر بود. در شجره حاصل از روش MP (Maximum-Parsimony)، ضرایب مربوط به طول درخت، مقیاس استحکام و هماهنگی شجره، شاخص بازداری و شاخص ثبات واحدها به ترتیب ۱۰۶، ۰/۷۸، ۰/۹۲ و ۰/۷۲ بودند. تعداد مکان‌های مفید (informative sites) ۲۰۳ نوکلئوتید از ۷۰۱ نوکلئوتید و تعداد مکان‌های متغیر و حفاظت شده به ترتیب ۲۳۶ و ۴۶۲ نوکلئوتید می‌باشد (شکل ۲).

با توجه به شجره MP رسم شده براساس ژن *EF-1α*، طول توالی نوکلئوتیدی در جدایه‌های مختلف گونه *F. fujikuroi* جدا شده از برنج (نه جدایه) بین ۶۶۷-۶۷۹ جفت باز متغیر بود و با مقدار اعتبارسنجی ۹۹٪ تشکیل گروه مونوفیلتیک با گونه *F. fujikuroi* (FN252407) دادند و با هم گروه‌بندی شدند (شکل ۲). میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق با گونه مذکور ۹۹٪ بود. در جدایه‌های مختلف گونه *F. proliferatum* جدا شده از نیشکر (دو جدایه)، ذرت (دو جدایه) و پیاز (دو جدایه) طول توالی نوکلئوتیدی (۶۶۳-۶۹۰ جفت باز) و مقدار حمایت اعتبارسنجی ۹۸٪ بود و درصد تشابه ژنتیکی جدایه‌های فوق با گونه *F. proliferatum* (JF278609, JF278596, FN252396) ۹۸-۹۹٪ بود. کلاد *F. proliferatum* تشکیل گروه خواهری با کلاد *F. fujikuroi* با مقدار حمایت ۹۴٪ را داد (شکل ۲). گونه‌های *F. proliferatum* و *F. fujikuroi* از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی شباهت زیادی با هم دارند. هر دو گونه در محیط کشت SNA زنجیر میکروکنیدیومی و سرهای دروغی را در میکروکنیدیوفورهای مونوفیالید و پلی‌فیالید تولید می‌کنند (شکل ۱-L-O). ماکروکنیدیوم نیز در هر دو گونه داسی شکل و کشیده با سه تا پنج دیواره عرضی می‌باشد (شکل ۱-L-O). اما گونه *F. fujikuroi* با یاخته‌های کنیدی‌زای مونوفیالید و به ندرت پلی¬فیالید تنها با دو مکان کنیدی‌زایی و گونه *F. proliferatum* با یاخته‌های کنیدی‌زای اغلب پلی‌فیالید از یکدیگر تفکیک می‌شوند (Gerlach & Nirenberg 1982). با این حال این دو گونه با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی به سادگی از یکدیگر قابل تفکیک نیستند و مقایسه توالی‌یابی DNA جهت شناسایی دقیق آن‌ها لازم می‌باشد (Leslie & Summerell 2006).

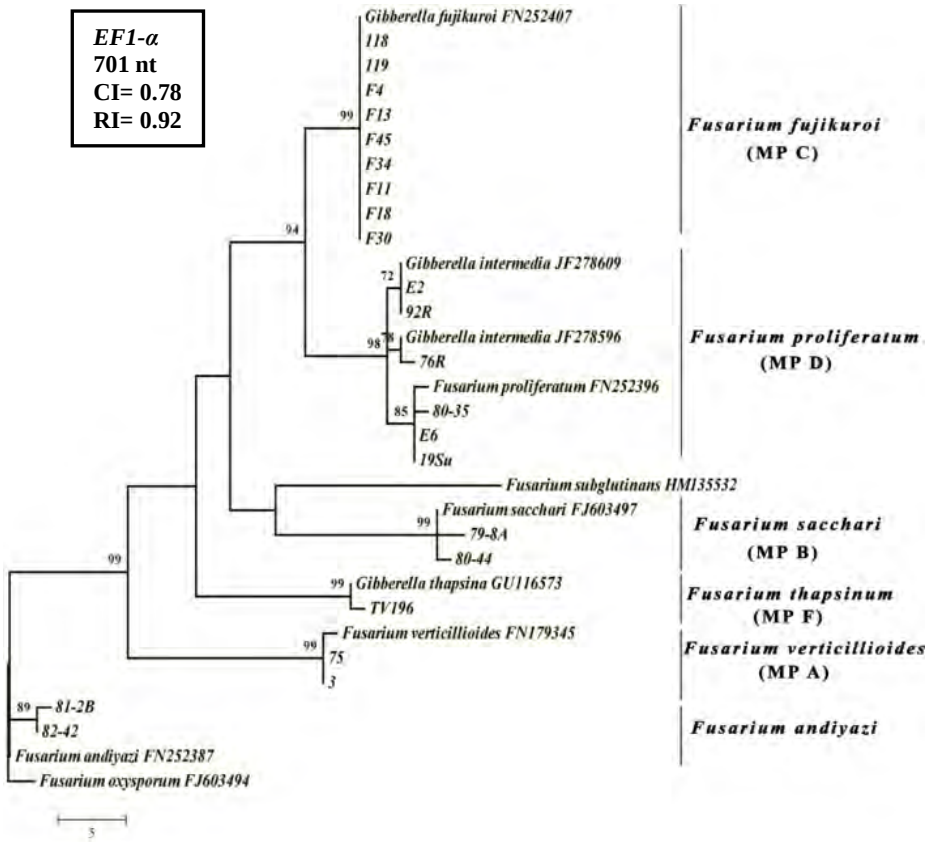
طول توالی نوکلئوتیدی در جدایه‌های گونه *F. sacchari* جدا شده از نیشکر (دو جدایه) بین ۶۷۴-۶۸۹ جفت باز متغیر بود و با مقدار اعتبارسنجی ۹۹٪ تشکیل گروه مونوفیلتیک با گونه *F. sacchari* (FJ603497) دادند. میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق با گونه مذکور ۹۹٪ بود. به علاوه، کلاد مذکور تشکیل گروه خواهری با گونه *F. subglutinans* داد (شکل ۲). دو گونه *F. sacchari* و *F. subglutinans* از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی بسیار شبیه به یکدیگر می‌باشند. اما براساس

مورفولوژی میکروکنیدیوم‌ها می‌توان این دو گونه را از هم متمایز کرد. گونه *F. sacchari* میکروکنیدیوم‌های ۳-۱ یاخته‌ای تولید می‌کند (شکل ۱-A-D) در حالی که گونه *F. subglutinans* تنها میکروکنیدیوم‌های تک‌یاخته‌ای تولید می‌نماید (Leslie & Summerell 2006). با این حال، این دو گونه از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی بسیار شبیه به هم می‌باشند و تنها با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی تشخیص دقیق آن‌ها امکان‌پذیر نمی‌باشد (Leslie & Summerell 2006).



شکل ۱- A–D. *Fusarium sacchari*: A. میکروکنیدیوم‌ها، B. ماکروکنیدیوم‌ها، C. سرهای دروغی و پلی‌فیالید، D. پلی‌فیالید منشعب، E–H. *Fusarium thapsinum*: E. میکروکنیدیوم‌ها، F. ماکروکنیدیوم‌ها، G. سرهای دروغی و مونوفیالیدها، H. زنجیر میکروکنیدی، I–K. *Fusarium verticillioides*: I. میکروکنیدیوم‌ها، J. ماکروکنیدیوم‌ها، K. زنجیر میکروکنیدی و مونوفیالید، L–O. *Fusarium proliferatum*: L. میکروکنیدیوم‌ها، M. ماکروکنیدیوم‌ها، N. سرهای دروغی و مونوفیالید، O. زنجیر میکروکنیدی و پلی‌فیالید (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. A–D. *Fusarium sacchari*: A. Microconidia, B. Macroconidia, C. False heads and polyphialide, D. Proliferation polyphialide, E–H. *Fusarium thapsinum*: E. Microconidia, F. Macroconidia, G. False heads & monophialides, H. Chain of microconidia, I–K. *Fusarium verticillioides*: I. Microconidia, J. Macroconidia, K. Chain of microconidia and monophialide, L–O. *Fusarium proliferatum*: L. Microconidia, M. Macroconidia, N. False heads and monophialide, O. Chain of microconidia and polyphialide (Bar = 10 µm).



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن *EF-1α* برای ۳۲ جدایه از گونه مرکب *Gibberella fujikuroi* به روش Maximum-Parsimony. اعداد بالای هر شاخه مقدار حمایت بوتسترپ از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهند. طول شاخه‌ها با تعداد تغییرات نوکلئوتیدی که به صورت مقیاس بار نشان داده شده است، متناسب می‌باشد. گونه *Fusarium oxysporum* (FJ603494) به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است. توالی‌های دارای نام گونه و شماره ثبت از بانک ژن استخراج شده‌اند. MP (mating population) جمعیت‌های آمیزشی یا گونه‌های بیولوژیکی را در گونه مرکب *Gibberella fujikuroi* نشان می‌دهد.

Fig. 2. A Maximum-Parsimony tree inferred from *EF-1α* sequence from 32 taxa of *Gibberella fujikuroi* species complex. Numbers above branches show the bootstrap values in 1000 replicates. The length of branches is proportional to the number of base changes (scale bar). *Fusarium oxysporum* (FJ603494) is set as outgroup. MP=mating population or biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. For sequences from GenBank species name and accession number have been mentioned. MP (mating population) indicates biological species or mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex.

کلادهای *F. thapsinum*، *F. verticillioides* و *F. andiyazi* به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۹۹٪، ۹۹٪ و ۴۶٪ حمایت شدند. کلاد *F. andiyazi* با جدایه‌های به دست آمده از نیشکر (دو جدایه) از بقیه کلادها جدا و در کنار گونه *F. oxysporum* (گروه خارجی) در پایه درخت قرار گرفت (شکل ۲). جدایه‌های (B)81-2 و 82-42 در شناسایی مورفولوژیکی به عنوان گونه *F. verticillioides* شناسایی شدند (جدول ۱)، اما توالی‌یابی ژن *EF-1α* نشان داد که جدایه‌ها متعلق به گونه *F. andiyazi* می‌باشند. گونه *F. andiyazi* توسط ماراساس و همکاران (Marasas *et al.* 2001) با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی و مولکولی توصیف شد. اعضای این گونه قبلا به دلیل شباهت مورفولوژیکی زیاد در گونه *F. verticillioides* قرار می‌گرفت. گونه *F. andiyazi* از لحاظ مورفولوژیکی به گونه‌های *F. verticillioides*، *F. thapsinum* و *F. musae* خیلی شباهت دارد (Van Hove *et al.* 2011, Leslie & Summerell 2006). این گونه با تولید کلامیدوسپور دروغی از دو گونه *F. verticillioides* و *F. thapsinum* متمایز می‌گردد. کلامیدوسپور دروغی در گونه *F. andiyazi* به عنوان یک صفت تاکسونومیکی قابل قبول در نظر گرفته می‌شود (Leslie & Summerell 2006). با توجه به اینکه تمام ویژگی‌های مورفولوژیکی دو جدایه بررسی شده با ویژگی‌های مورفولوژیکی توصیف شده برای گونه *F. verticillioides* مطابقت داشت (Gerlach & Nirenberg 1982, Nelson *et al.* 1983, Leslie & Summerell 2006) و در محیط کشت CLA نیز کلامیدوسپور دروغی تولید نکردند. بنابراین، از لحاظ مورفولوژیکی این دو جدایه به عنوان گونه *F. verticillioides* شناسایی شدند. اما با

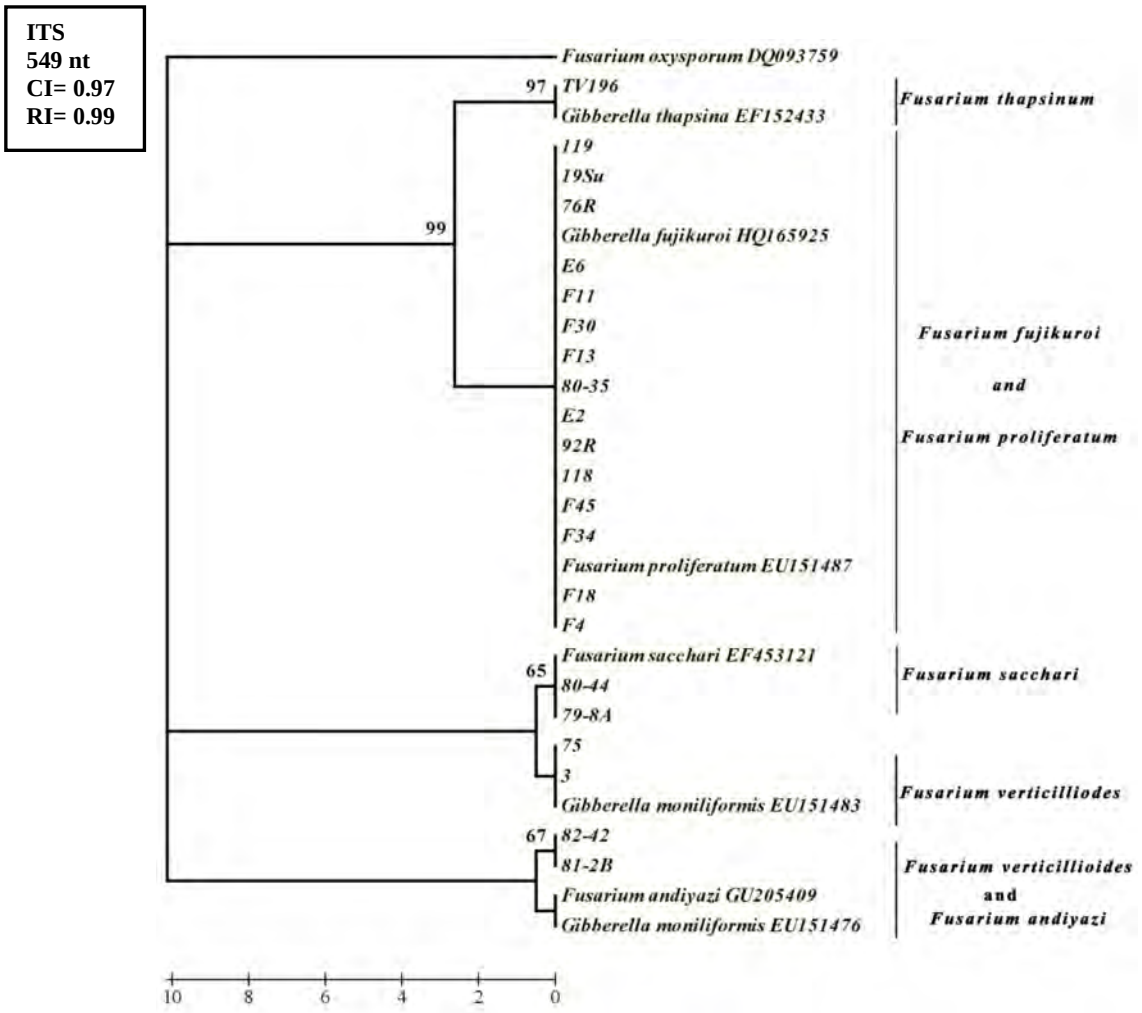
استفاده از توالی یابی ژن *EF-1α* و جستجو در پایگاه اطلاعاتی FUSARIUM-ID این دو جدایه به عنوان گونه *F. andiyazi* شناسایی شدند.

گونه *F. thapsinum* نیز قبلا به عنوان گونه *F. verticillioides* شناسایی می‌شد (Klittich *et al.* 1997). ویژگی اصلی تفکیک *F. thapsinum* از گونه فوق شناسایی مرحله جنسی در گونه *G. thapsina* به عنوان جمعیت آمیزشی جداگانه (جمعیت آمیزشی F) و تعدادی از ویژگی‌های دیگر از جمله ترجیح میزبانی و زهرابه‌های این گونه بود (Klittich *et al.* 1997). به علاوه، جدایه‌هایی از گونه *F. thapsinum* که رنگدانه زرد تولید نمی‌کنند از لحاظ مورفولوژیکی به عنوان گونه *F. verticillioides* شناسایی می‌شوند (Leslie & Summerell 2006). جدایه بررسی شده (جدایه TV196) در این تحقیق به دلیل تولید رنگدانه زرد در محیط کشت PDA به عنوان گونه *F. thapsinum* در نظر گرفته شد. با این حال، به نظر می‌رسد که جهت تفکیک دقیق دو گونه مذکور از آزمون تلاقی جنسی و توالی‌یابی DNA بایستی استفاده گردد (Leslie & Summerell 2006).

ژن *EF-1α* در جنس *Fusarium* دارای یک نسخه است و سطح زیادی از چند شکلی توالی را بین گونه‌های نزدیک در مقایسه با سایر ژن‌های کد کننده پروتئین از جمله *Calmodulin*، *β-tubulin* و *H3* نشان می‌دهد. نسخه‌های غیرارتولوگ در سطح جنس شناسایی نشده است و آغازگرهای عمومی طراحی شده براساس این ژن اجازه مطالعات فیلوژنتیکی در موجودات مختلف را می‌دهد (Geiser *et al.* 2004) به همین دلایل ژن *EF-1α* به عنوان یک ابزار شناسایی تک جایگاهی در جنس *Fusarium* به فراوانی به کار برده می‌شود. جیسر و همکاران (Geiser *et al.* 2004) براساس توالی *EF-1α* از ۴۶۳ جدایه از جنس *Fusarium* پایگاه اطلاعاتی FUSARIUM-ID v. 1.0 را پایه‌گذاری کردند. این پایگاه شامل ۱۷۵ توالی نماینده انتخابی فیلوژنتیکی در جنس *Fusarium* می‌باشد که اجازه شناسایی سریع گونه‌های جنس *Fusarium* را می‌دهد. برخی گروه‌ها از جمله گونه‌های مرکب *F. oxysporum*، *F. solani* و *F. graminearum* به خوبی توسط این پایگاه اطلاعاتی پوشش داده شده است (Geiser *et al.* 2004). اخیرا برای تفکیک گونه‌های *F. musae* و *F. verticillioides* و گونه‌های *F. temperatum* و *F. subglutinans* از توالی‌یابی ژن *EF-1α* به همراه ژن‌های *Calmodulin* و *β-tubulin* استفاده شده است. این ژن به خوبی توانسته است گونه‌های مذکور را از هم تفکیک نماید (Van Hove *et al.* 2011, Scauflaire *et al.* 2011). ولف و همکاران (Wulff *et al.* 2010) نیز برای تفکیک گونه‌های مختلف جنس *Fusarium* در ارتباط با بیماری باکانه برنج از توالی‌یابی ژن *EF-1α* استفاده نمودند و جدایه‌های گونه‌ها با مقدار اعتبارسنجی زیادی از یکدیگر تفکیک گردیدند. مطالعه هسوان و همکاران (Hsuan *et al.* 2011) نیز نشان می‌دهد که شناسایی گونه‌های *F. verticillioides* و *F. andiyazi*، *F. proliferatum* و *F. fujikuroi*، *F. sacchari* و *F. subglutinans* از یکدیگر تنها براساس خصوصیات مورفولوژیکی امکان‌پذیر نبوده و همراه با اشتباهاتی می‌باشد. در تحقیق حاضر نیز شناسایی جدایه‌های 81-2(B) و 82-42 گونه *F. andiyazi* از جدایه‌های گونه *F. verticillioides* مقدور نبود. با این حال، براساس توالی ژن *EF-1α* تمامی گونه‌ها با مقدار اعتبارسنجی زیاد از یکدیگر متمایز شدند و با جستجو در پایگاه اطلاعاتی FUSARIUM-ID نیز شناسایی گونه‌ها تایید گردید.

- ارزیابی روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها با استفاده از توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS1-5.8S-ITS2

طول توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS1-5.8S-ITS2 در جدایه‌های مورد بررسی بین ۵۱۹ تا ۵۳۴ جفت باز متغیر بود. در مرحله مرتب‌سازی، با وارد شدن فاصله‌ها در توالی‌های مورد بررسی، طول نهایی توالی‌ها به ۵۴۹ نوکلئوتید رسید. در درخت حاصل از روش MP، ضرایب مربوط به مقیاس استحکام و هماهنگی درخت، شاخص بازداری و شاخص ثبات واحدها به ترتیب ۰/۹۷، ۰/۹۹ و ۰/۹۶ بودند (شکل ۳). تعداد مکان‌های مفید ۶۱ نوکلئوتید از ۵۴۹ نوکلئوتید و تعداد مکان‌های متغیر و حفاظت شده به ترتیب ۷۲ و ۴۶۹ نوکلئوتید می‌باشد. با توجه به درخت MP رسم شده براساس نواحی ITS1-5.8S-ITS2، تمام جدایه‌های متعلق به گونه‌های *F. fujikuroi* و *F. proliferatum* در یک کلاد با مقدار حمایت۲۰٪ قرار گرفتند. جدایه‌های مختلف گونه‌های *F. thapsinum* و *F. sacchari* به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۹۷٪ و ۶۵٪ در کلادهای مجزا قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های گونه *F. verticillioides* نیز در یک کلاد مجزا در کنار کلاد *F. sacchari* قرار گرفت. دو جدایه 82-42 و 81-2B با گونه‌های (EU151446) *G. moniliformis* و (GU205409) *F. andiyazi* در یک کلاد قرار گرفتند (شکل ۳).



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS1-5.8S-ITS2 برای ۳۲ جدایه از گونه مرکب *Gibberella fujikuroi* به روش Maximum-Parsimony. اعداد بالای هر شاخه مقدار حمایت بوتسترپ از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهند. طول شاخه‌ها با تعداد تغییرات نوکلئوتیدی که به صورت مقیاس بار نشان داده شده است، متناسب می‌باشد. توالی‌های دارای نام گونه و شماره ثبت از بانک ژن استخراج شده‌اند. گونه *Fusarium oxysporum* (DQ093759) به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

Fig. 3. A Maximum-Parsimony tree inferred from ITS1-5.8S-ITS2 sequences from 32 taxa of *Gibberella fujikuroi* species complex. Numbers of above branches show the bootstrap values in 1000 replicates. The length of branches is proportional to the number of base changes (scale bar). For sequences from GenBank species name and accession number have been mentioned. *Fusarium oxysporum* (DQ093759) is set as out-group.

ژن‌های رمز کننده RNA ریبوزومی، متداول‌ترین ژن‌هایی هستند که در مطالعات تاکسونومیکی و فیلوژنتیکی قارچها استفاده شده‌اند. این ژن‌ها به دلیل اینکه دارای چندین نسخه در ژنوم هستند، ژن‌های رمزکننده غیرپروتئین هستند و نسخه‌های متعدد آن‌ها به صورت هماهنگ با هم تکامل می‌یابند مورد توجه قرار گرفته‌اند. همچنین، بخش‌های مختلف آن‌ها دارای سرعت تکامل متفاوت از هم بوده و اطلاعات حاصل از آن‌ها می‌تواند در سطوح مختلف تاکسونومیکی استفاده شود (Graser *et al.* 1998, Guarro *et al.* 1999). بخش‌های ITS بسیار متغیر بوده و هم‌ردیف کردن مطمئن‌تر توالی‌های آن‌ها فقط بین آرایه‌های با خویشاوندی بالا می‌تواند انجام شود. اطلاعات حاصل از توالی‌های این بخش، در تفکیک جنس و گونه‌های تعداد متنوعی از قارچها استفاده شده است (Graser *et al.* 1998, Guarro *et al.* 1999). نواحی ITS1-5.8S-ITS2 اکثرا برای سایر قارچها استفاده می‌گردد، ولی به دلیل وجود نسخه‌های غیرارتولوگ ناحیه ITS2 این ژن در طول ژنوم بسیاری از گونه‌های جنس *Fusarium*، از این ناحیه برای طبقه‌بندی گونه‌های جنس *Fusarium* زیاد استفاده نشده است (Waalwijk *et al.* 1996, O'Donnell & Cigelnik 1997)، اما ویسنتین و همکاران (Visentin *et al.* 2009) از نواحی ITS1-5.8S-ITS2 به عنوان ابزار تاکسونومیکی برای تمایز گونه‌های *F. verticillioides* و *F. proliferatum* استفاده کردند و توانستند این دو گونه را از هم متمایز نمایند.

به علاوه آغازگرهای اختصاصی براساس ناحیه مذکور طراحی شده است که امکان شناسایی سریع دو گونه فوق را فراهم می‌سازد. در این تحقیق نیز گونه‌های *F. proliferatum* و *F. verticillioides* براساس این ناحیه از یکدیگر متمایز شدند. اما ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 قادر به تمایز گونه‌های *F. proliferatum* و *F. fujikuroi* از یکدیگر نبود و جدایه‌های این دو گونه با مقدار حمایت بالای ۹۸٪ در یک کلاد قرار گرفتند و جدایه‌های گونه‌های *F. thapsinum* و *F. sacchari* در کلادهای مجزا گروه‌بندی گردیدند. به علاوه، دو جدایه 42-82 و 81-2B با گونه‌های (EU151446) *G. moniliformis* و (GU205409) *F. andiyazi* با هم گروه‌بندی شدند و دو گونه مذکور براساس این ناحیه از یکدیگر تفکیک نشدند (شکل ۳).

در مجموع می‌توان بیان کرد که نواحی ITS1-5.8S-ITS2 بنا به دلایل ذکر شده فوق قادر به تفکیک کامل گونه‌های موجود در گونه مرکب *G. fujikuroi* نمی‌باشد. هرچند که برخی از گونه‌ها در تحقیق حاضر در کلادهای مجزا قرار گرفتند. نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققان نیز مطابقت دارد (Waalwijk *et al.* 1996, O'Donnell & Cigelnik 1997). به علاوه، در تحقیق حاضر تعداد مکان‌های مفید نواحی ITS1-5.8S-ITS2 و *EF-1α* به ترتیب ۶۱ نوکلئوتید از ۵۴۹ نوکلئوتید و ۲۰۳ نوکلئوتید از ۷۰۱ نوکلئوتید بود. در مجموع می‌توان بیان کرد که ژن *EF-1α* برای شناسایی سریع گونه‌های فوزاریوم بسیار مناسب می‌باشد.

همان طوری که قبلا نیز اشاره شد اعضای گونه مرکب *G. fujikuroi* از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی بسیار به هم شبیه می‌باشند و همین ویژگی تمایز آن‌ها را از همدیگر پیچیده می‌سازد. بنابراین، برای حصول اطمینان از تشخیص صحیح و دقیق گونه در کنار روش‌های مورفولوژیکی از روش‌های دیگر از جمله تلاقی جنسی با آزمایشگرهای استاندارد و مطالعه روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها با استفاده از چندین ژن مهم در جنس *Fusarium* بایستی استفاده گردد. در ایران مطالعه پلی‌فازیک گونه مرکب *G. fujikuroi* انجام نشده است و در اغلب موارد چندین گونه مشابه از نظر مورفولوژیکی در یک میزبان گیاهی دیده می‌شود که شناسایی عامل یا عوامل اصلی بیماری را با مشکلاتی مواجه می‌سازد. به علاوه شناسایی دقیق عوامل بیماری‌زای گیاهی جهت دستیابی به روش‌های مناسب در مدیریت بیماری‌های گیاهی مهم و ضروری می‌باشد. لذا، پیشنهاد می‌شود که نمونه‌برداری وسیعی از میزبان‌های مهم اقتصادی از مناطق مختلف کشور انجام گردد و شناسایی گونه‌ها به صورت پلی‌فازیک شامل مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی، بیولوژیکی، متابولیت‌های ثانویه و کاربرد توأم چندین ژن بویژه ژن‌های *EF-1α* و بتاتوبولین در مطالعات فیلوژنتیکی گونه مرکب *G. fujikuroi* مد نظر قرار گیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم کردن اعتبارات پژوهشی این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

References

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389–3402.

Eck, R.V. & Dayhoff, M.O. 1966. Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland, 215 pp.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791.

Geiser, D.M., Jimenez-Gasco, M.M., Kang, S., Makalowski, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A. & O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology 110: 473–479.

Gerlach, W. & Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium*-A Pictorial Atlas. Mitteilungen aus der Bioloischen Bundesansalt für Land-und Forstwirschaft, Berlin-Dahlem, 406 pp.

Graser, M., Elfari, M., Preshber, W., Sorry, W. & Tietz, H.J. 1998. Identification of a common

dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermatophyton*) using polymerase chain reaction. British Journal of Dermatology 138: 576–582.

Guarro, J., Gene, J. & Stichgel, A.M. 1999. Developments in fungal taxonomy. Clinical Microbiology Reviews 12: 454–500.

Gupta, S., Krasnoff, S.B., Underwood, N.L., Renwick, J.A.A. & Roberts, D.W. 1991. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Mycopathologia 115: 185–189.

Hsuan, H.M., Salleh, B. & Zakaria, L. 2011. Molecular Identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia. International Journal of Molecular Science 12: 6722–6732.

Klittich, C.J.R., Leslie J.F., Nelson, P.E. & Marasas, W.F.O. 1997. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A new species in section *Liseola* from sorghum. Mycologia 89: 643–652.

Kvas, M., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. & Steenkamp, E.T. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. Fungal Diversity 34: 1–21.

Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Oxford, 388 pp.

Leslie, J.F. 1995. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. Canadian Journal of Botany 73: 282–291.

Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. & Toussoun, T.A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species: Identity and Mycotoxicology. Pennsylvania State University Press, University Park, 328 pp.

Marasas, W.F.O., Rheeder, J.P., Lamprecht, S.C., Zeller, K.A. & Leslie J.F. 2001. *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. Mycologia 93: 1203–1210.

Mayden, R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. *In*: Species: the units of biodiversity. M.F. Claridge, H.A Dawah and M.R. Wilson (eds), Chapman and Hall, London, pp. 381–424.

Nei, M. & Kumar, S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York, USA, 333 pp.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, 193 pp.

Nirenberg, H.I., & O'Donnell, K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 434–458.

Nirenberg, H.I., O'Donnell, K., Kroschel, J., Andrianaivo, A.P., Frank, J.M. & Mubatanhema, W. 1998. Two new species of *Fusarium*: *Fusarium brevicatenulatum* from the noxious weed *Striga asiatica* in Madagascar and *Fusarium pseudoanthophilum* from *Zea mays* in Zimbabwe. Mycologia 90: 459–464.

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

O'Donnell, K., Cigelnik, E. & Nirenberg, H.I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 465–493.

Rojas, M. 1992. The species problem and conservation: what are we protecting? Conservation Biology 6: 170–178.

Scauflaire, J., Gourgue, M. & Munaut, F. 2011. *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. Mycologia 103: 586–597.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596–1599.

Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S. & Fisher, C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genetics and Biology 31: 21–32.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25: 4876–4882.

Van Hove, F., Waalwijk, C., Logrieco, A., Munaut, F. & Moretti, A. 2011. *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov., a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. Mycologia 103: 570–585.

Visentin, I., Tamietti, G., Valentino, D., Portis, E., Karlovsky, P., Moretti, A. & Cardinale, F. 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. Mycological Research 113: 1137–1145.

Waalwijk, C., Baayen, RP., de Koning J.R.A. & Gams, W. 1996. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. Mycologia 88: 361–368.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S.B. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Gelfand, M., Sninsky, D. & White, T. (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, California, pp. 315–322.

Wulff, E.G., Sørensen, J.L., Lübeck, M., Nielsen, K.F., Thrane, U. & Torp, J. 2010. *Fusarium* spp. associated with rice bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. Environmental Microbiology 12: 649–657.