معرفی سه آرایه جدید فوزاریوم مرتبط با سنبله گندمیان وحشی برای ایران با داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی*

دریافت: ۱۳۹۲/۲/۱۷/ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۲۹

مهدی داوری✉: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه محقق اردبیلی، صندوق پستی ۱۷۹، اردبیل (mdavari@uma.ac.ir)

اسداله بابای اهری: استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز

مهدی ارزنلو: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز

رسول زارع: استاد پژوهش بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

آنه دی وان دیپنینخن: استادیار مرکز قارچ‌شناسی آکادمی علوم هلند، اوترخت

سیبرن دهوخ: استاد مرکز قارچ‌شناسی آکادمی علوم هلند، اوترخت

چکیده

به منظور بررسی تنوع زیستی گونه‌های فوزاریوم همراه با سنبله علف‌های هرز متعلق به تیره *Poaceae*، سنبله‌های گندمیان وحشی مزارع غلات و اطراف آن‌ها در استان اردبیل جمع‌آوری و گونه‌های فوزاریوم با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی و عمومی جداسازی شدند. جدایه‌ها پس از خالص‌سازی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی‌یابی ژن *TEF 1-α* مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که گونه‌های متعددی از جنس فوزاریوم روی گندمیان وحشی در ایران حضور دارند. در بین این گونه‌ها، *Fusarium brachygibbosum*، *F. torulosum* و *F.* cf. *reticulatum* var. *negundis* به عنوان یافته جدید از ایران گزارش می‌شوند. با توجه به اینکه توصیف قبلی برخی از این آرایه‌ها مربوط به منابع قدیمی و یا غیرقابل دسترس می‌باشد، در این نوشتار، توصیف کامل این سه آرایه بحث شده است. این نخستین مطالعه از تنوع گونه‌های فوزاریوم همراه با گل‌آذین گندمیان وحشی و نیز شناسایی گونه‌های متعلق به این جنس با استفاده توام از داده‌های ریخت‌شناختی و توالی‌یابی در ایران است.

واژه‌های کلیدی: سیستماتیک، گل‌آذین، علف‌های هرز تیره غلات، مغان، *Fusarium*

Morphological and molecular characterization of three new *Fusarium* species associated with inflorescence of wild grasses for Iran

Received: 07.05.2013/ Accepted: 21.10.2013

Mahdi Davari✉**:** Assistant Prof., Department of Plant Protection, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, P.O. Box 179, Iran (mdavari@uma.ac.ir)

Asadollah Babai-Ahari: Prof., Department of Plant Protection, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Mahdi Arzanlou: Associate Prof., Department of Plant Protection, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Rasoul Zare: Research Prof., Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

A.D. Van Diepeningen: Assistant Prof., CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands

G.S. De Hoog: Prof., CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands

Summary

In order to explore biodiversity of *Fusarium* species associated with the inflorescences of poaceous weeds, heads and inflorescences were collected from wild grasses in Ardabil province (Iran). *Fusarium* species were isolated using general and selective media. Pure cultures were established using a single spore technique. The isolates were identified based on morphological and molecular data. Sequence data were generated for *TEF-1α* gene, following PCR amplifciation. The results revealed that several species of *Fusarium* are present on inflorescences of wild grasses in Ardabil province. Among the identified species, *F. brachygibbosum*, *F. torulosum* and *F.* cf. *reticulatum* var. *negundis* represent new records to the mycobiota of Iran. There is no description available for these taxa in Persian literature and references to the original descriptions are not easily accesible. Here we provide detailed descriptions for these taxa and discuss their morphology, phylogeny and ecology. This is the first study on biodiversity of *Fusarium* spp. associated with the inflorescences of wild poaceous grasses by using a combination of morphology and DNA sequence data.

Keywords: *Fusarium*, inflorescence, Moghan, *Poaceous* wild grass, systematic

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول به راهنمایی دکتر اسداله بابای اهری و دکتر مهدی ارزنلو ارایه شده به دانشگاه تبریز

مقدمه

سوختگی فوزاریومی سنبله (Fusarium Head Blight, FHB) گندم و پوسیدگی فوزاریومی بلال (Fusarium Ear Rot, FER) ذرت از بیماری‌های مهم و مخرب این محصولات در دنیا و ایران به شمار می‌روند و در شمال و شمال‌غرب کشور با فراهم بودن شرایط جوی مساعد خسارت ناشی از این بیماری‌ها چشمگیر گزارش شده است (Safaie *et al.* 2005, Rahjoo *et al.* 2008, Davari *et al.* 2013). گونه‌های متعددی از جنس فوزاریوم در ایجاد این دو بیماری دخیل می‌باشند. با این وجود، گونه مرکب *Fusarium graminearum* species complex به عنوان عامل اصلی بیماری FHB و *F. verticillioides* به عنوان گونه غالب در ایجاد بیماری FER در اغلب مناطق شناخته شده است (Sarver *et al.* 2011, Ghiasian *et al.* 2004, Davari *et al.* 2006, 2013). شناسایی عامل بیماری و آگاهی از چرخه زندگی و تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بیمارگر به عنوان اصول اساسی در اتخاذ راهکار مناسب برای مدیریت بیماری‌های گیاهی مطرح هستند. زمستان‌گذرانی عامل بیماری عمدتا روی بقایای غلات و بذور آلوده به صورت میسلیوم، پریتسیوم، کلامیدوسپور و کنیدیوم صورت می‌گیرد (Sutton 1982, Parry *et al.* 1995). در این بین، نقش گرامینه‌های وحشی اطراف مزارع گندم و ذرت به عنوان میزبان تناوبی برای عامل بیماری و هم‌چنین نقش آن‌ها در زمستان‌گذرانی عامل بیماری کمتر مطالعه شده است.

به دلیل غنای تنوع زیستی گونه‌های فوزاریوم در جمعیت‌های طبیعی، بهتر است در صورت امکان، این جمعیت‌ها نیز در کنار زیست‌بوم کشاورزی مد نظر قرار گیرد (Leslie & Summerell 2006). به همین دلیل، تحقیقاتی در دنیا روی شناسایی گونه‌های فوزاریوم همراه با گل‌آذین گندمیان وحشی انجام گرفته است، از جمله اینچ و گیلبرت (Inch & Gilbert 2003) در مانیتوبای جنوبی کانادا طی سالهای ۱۹۹۹ و ۲۰۰۰ اقدام به جمع‌آوری ۳۶ گونه از گرامینه‌های وحشی کرده و گونه‌های فوزاریوم موجود در گل‌آذین‌ها را جداسازی و شناسایی نمودند. براساس نتایج این تحقیق، گونه *F. graminearum* به عنوان گونه غالب تعیین شد. گونه‌های دیگری که با فراوانی کمتر از گل‌آذین‌های گندمیان وحشی مورد شناسایی قرار گرفتند، عبارت بودند از *F. sporotrichioides*، *F. oxysporum*، *F. avenaceum*، *F. culmorum*، *F. equiseti* و *F. poae*. آن‌ها نتیجه گرفتند که گندمیان وحشی به عنوان پناهگاه چندین گونه از *Fusarium* بویژه گونه غالب *F. graminearum* می‌باشند که به عنوان قارچ عامل بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله غلات در کانادا مطرح است. هم‌چنین، پوستیک و همکاران (Postic *et al.* 2012) از ریشه و ساقه ۲۲ گونه از علف‌های هرز تیره‌های مختلف گیاهی در کرواسی، ۱۴ گونه فوزاریوم جداسازی کردند که بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به *F. graminearum*، *F. oxysporum*، *F. subglutinans* و *F. proliferatum* بود. هم‌چنین، ایشان از میان گونه‌های جداسازی شده *F. graminearum* را به عنوان گونه غالب در ایجاد بیماری FHB و *F. verticillioides* و *F. subglutinans* را از بیمارگرهای مهم ذرت در کرواسی نام بردند. لندس‌کوت و همکاران (Landschoot *et al.* 2011)، با بررسی گونه‌های فوزاریوم موجود روی گرامینه‌های وحشی، بقایای گندم، خاک و گیاه گندم در دو سال، گونه‌های *Microdochium nivale*، *F. avenaceum*، *F. graminearum*، *F. poae* و *F. culmorum* را از گرامینه‌های وحشی به دست آوردند، اما نتوانستند تناسب قابل قبولی را بین تنوع گونه‌ها روی این بستره‌ها به دست آورند.

آرایه‌بندی جنس فوزاریوم همواره از موضوعات مورد بحث و اختلاف‌انگیز بین قارچ‌شناسان بوده است. دلیل اصلی این اختلاف، عدم ثبات خصوصیات ریخت‌شناختی در جدایه‌ها و نیز عدم پذیرش عمومی مفهوم گونه در این جنس است. نکته مهم این است که این جنس فاقد ویژگی‌های ریخت‌شناختی کافی جهت تفکیک رضایت‌بخش گونه‌ها می‌باشد. به عبارت دیگر، تعداد ویژگی‌های قابل تشخیص به مراتب کمتر از تعداد گونه‌های فوزاریوم می‌باشد. در مفهوم مورفولوژیک گونه در فوزاریوم، مجموعه‌ای از جدایه‌ها که می‌بایست در گروه‌های مجزا قرار داده شوند، در یک گروه قرار می‌گیرند که به این پدیده اصطلاحا لامپینگ (lumping) گفته می‌شود. به این معنی که گاهی گونه‌های متفاوت که از نظر ریخت‌شناختی از یکدیگر قابل تشخیص نیستند، در یک گروه قرار می‌گیرند. این امر منجر به توصیف گونه‌های جدیدی با ویژگی‌های ریخت‌شناختی ناکافی و ویژگی‌های ریخت‌شناختی مشترک با سایر گونه‌ها و در نتیجه پیچیدگی در شناسایی گونه‌های فوزاریوم و ایجاد بحث‌های جدی بین متخصصان قارچ‌شناسی در مورد مفهوم و مرز گونه در جنس فوزاریوم شده است. برخی اوقات هم جدایه‌های متعلق به یک گونه، ممکن است تفاوت‌هایی را در برخی ویژگی‌های ریخت‌شناختی از جمله اندازه و رنگ پرگنه، شکل و اندازه ماکروکنیدیوم و تشکیل کلامیدوسپور نشان دهند. به عنوان مثال، با وجود اینکه شکل ماکروکنیدیوم یک معیار عمده در شناسایی گونه‌های فوزاریوم به شمار می‌رود، اما شکل و اندازه آن تحت شرایط محیطی تغییر یافته و بسته به شرایطی که

هاگ‌ها در آن تولید می شوند، می‌تواند متفاوت باشد (Leslie & Summerell 2006). بنابراین، تعداد زیاد گونه‌ها، واریته‌ها، فرم‌ها و نیز تنوع بالای ریخت‌شناختی در بین جدایه‌های متعلق به یک گونه و اختلاف نظر قارچ‌شناسان در تعیین مرز و تعداد گونه‌ها در این جنس مشکلات مربوط به شناسایی ریخت‌شناختی را دو چندان می‌کند (Leslie & Summerell 2006, Klittich *et al.* 1997).

امروزه استفاده از توالی‌یابی نوکلئوتیدی امری رایج در آرایه‌بندی موجودات زنده از جمله قارچ‌های بیمارگر گیاهی است. داده‌های توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA و یا دامنه D1 و D2 از LSU اطلاعات کافی برای تشخیص بیشتر گروه‌های قارچی در سطح گونه را فراهم می‌آورد. با وجود این، در مورد فوزاریوم این مکان‌های ژنی تنوع کافی برای تمایز گونه‌های نزدیک به هم را ندارند. بنابراین، توالی ژن‌های کدکننده پروتئین از قبیل ژن *TEF-1α* و *β-tubulin* که دارای چندین اینترون می‌باشند برای شناسایی صحیح به کار می‌رود (O'Donnell *et al.* 2010). به نظر می‌رسد ژن *TEF-1α* به عنوان یک ژن تک‌نسخه، چند-شکلی مناسبی را بین گونه‌های نزدیک به هم در جنس فوزاریوم حتی در مقایسه با ژن‌های کد کننده پروتئین مثل کالمودولین، بتاتوبولین و هیستون H_3 نشان می‌دهد. بنابراین، *TEF-1α* به عنوان یک ابزار کافی برای شناسایی مولکولی گونه‌های فوزاریوم شناخته شده است (Geiser *et al.* 2004).

با وجود مطالعات نسبتا زیادی که در مناطق مختلف کشور روی جنس فوزاریوم، بیماری سوختگی سنبله گندم و پوسیدگی بلال ذرت انجام گرفته است، هنوز تحقیقی در خصوص وضعیت گونه‌های فوزاریوم همراه با گل‌آذین گندمیان وحشی صورت نگرفته و اطلاعی از تنوع زیستی این قارچ روی علف‌های هرز و دخالت احتمالی آن‌ها در افزایش تنوع ژنتیکی این بیمارگرها در دسترس نیست. دو بیماری FHB و FER از بیماری‌های بسیار مهم و خسارت‌زای این دو محصول راهبردی در منطقه مغان به شمار می‌رود (Rahjoo *et al.* 2008, Davari *et al.* 2006). این منطقه از قطب‌های مهم تولید گندم و ذرت در ایران به شمار می‌رود، به طوری که حدود ۹۵ درصد از بذر ذرت مورد نیاز کشور را تامین می‌کند. بنابراین، به منظور شناسایی گونه‌های فوزاریوم همراه با گل‌آذین گندمیان وحشی در منطقه مغان با روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی، تحقیقی انجام شد که در اینجا سه گونه فوزاریوم که برای فلور قارچی ایران جدید هستند معرفی و توصیف می‌شوند.

روش بررسی

- جمع‌آوری سنبله‌های گندمیان وحشی

نمونه‌برداری از سنبله‌های مشکوک به آلودگی فوزاریومی و سنبله‌های فاقد علایم گیاهان خودروی متعلق به تیره *Poaceae* بویژه خویشاوندان وحشی گندم در فصل اپیدمی (سال ۹۰-۱۳۸۹) بیماری سوختگی فوزاریومی خوشه گندم (FHB) در استان اردبیل بویژه منطقه گندم‌خیز مغان و برخی مناطق دیگر استان شامل مشگین‌شهر، گرمی و اردبیل از مزارع گندم و اطراف آن‌ها و برخی مراتع انجام شد. گیاهان جمع‌آوری شده با استفاده از کلیدهای معتبر مورد شناسایی قرار گرفتند.

- جداسازی قارچ‌ها و شناسایی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی

قسمت‌های مختلف سنبله شامل دانه، پوشینک‌های دانه و قطعاتی از محور سنبله و سنبلچه با استفاده از تیغ جراحی جدا شده و پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، جدایه‌های فوزاریوم با استفاده از محیط‌های کشت PDA و نیمه‌انتخابی اصلاح شده Nash & Snyder (Nash & Snyder 1962) و با روش‌های رایج جداسازی شدند (Gerlach & Nirenberg 1982, Burgess *et al.* 1994). برای مشاهده مشخصات پرگنه و ویژگی‌های میکروسکوپی، جدایه‌ها به ترتیب روی محیط کشت PDA و SNA (Synthetic Nutrient-poor Agar) حاوی کاغذ صافی سترون کشت داده شدند (Leslie & Summerell 2006). گونه‌ها از روی مشخصات ریخت‌شناختی با استفاده از کلیدهای تشخیص معتبر ارایه شده توسط گرلاخ و نیرنبرگ (Gerlach & Nirenberg 1982)، نلسون و همکاران (Nelson *et al.* 1983)، توصیف گونه‌ها در لزلی و سامرل (Leslie & Summerell 2006) و برخی مقالات مرتبط مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. کلیه جدایه‌ها به مجموعه قارچ‌های زنده مرکز قارچ‌شناسی آکادمی علوم کشور هلند (CBS-KNAW) اهداء شدند.

- استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

برای این منظور جدایه‌های مورد نظر روی محیط کشت PDA کشت شدند و به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و DNA جدایه‌ها مطابق روش مولر و همکاران (Möller *et al.* 1992) استخراج گردید. تکثیر و توالی‌یابی ژن Translation Elongation Factor 1α (*TEF1-α*) با استفاده از آغازگرهای EF1-fus (5´-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3´) و EF2-fus (5´-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3´) Geiser *et al.*

(2004) انجام گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بهینه شده در این مطالعه، در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۱۰ الی ۱۵ نانوگرم DNA ژنومی الگو، دو میلی‌مول کلرید منیزیم، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر واکنش 10X، ۶۰ میکرومول دی‌اکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (dNTPs) ، ۵ پیکومول از هر آغازگر و و ۰/۵ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز (Bioline UK, London, UK) انجام گرفت. واکنش مزبور در دستگاه ترموسایکلر بیو-راد (Bio-Rad, North Carolina, USA) انجام شد. چرخه‌های دمایی به کار رفته PCR برای تکثیر ژن *EF* شامل ۴۰ چرخه به شرح زیر بود: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۱۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی DNA ژنومی مجدد در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه.

- توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

واکنش توالی‌یابی با استفاده از کیت توالی‌یابی ABI Applied Biosystems, prism BigDye^{TM} terminator cycle) (Foster City, USA و در یک توالی‌یاب اتوماتیک ABI 3730XL و مطابق دستورالعمل ارایه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. اطلاعات توالی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SeqMan ویرایش (edit) شدند (DNASTAR, Madison, WI, USA). توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در GenBank و پایگاه اطلاعاتی FUSARIUM-ID (http://isolate.fusariumdb.org/, Geiser *et al.* 2004) با استفاده از ابزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) مقایسه شدند و جدایه‌های با بیشترین مشابهت از هر پایگاه اطلاعاتی برای شناسایی جهت رج‌بندی (alignment) و برآورد روابط فیلوژنتیک دریافت و ذخیره شدند. رج‌بندی توالی‌ها با برنامه Mega5 (Tamura *et al.* 2011) و رسم درخت فیلوژنتیکی در نرم‌افزار RAxML (Stamatakis *et al.* 2008) با مدل حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) به ازای ۱۰۰۰ تکرار اعتبارسنجی (Bootstrap) انجام شد.

نتیجه

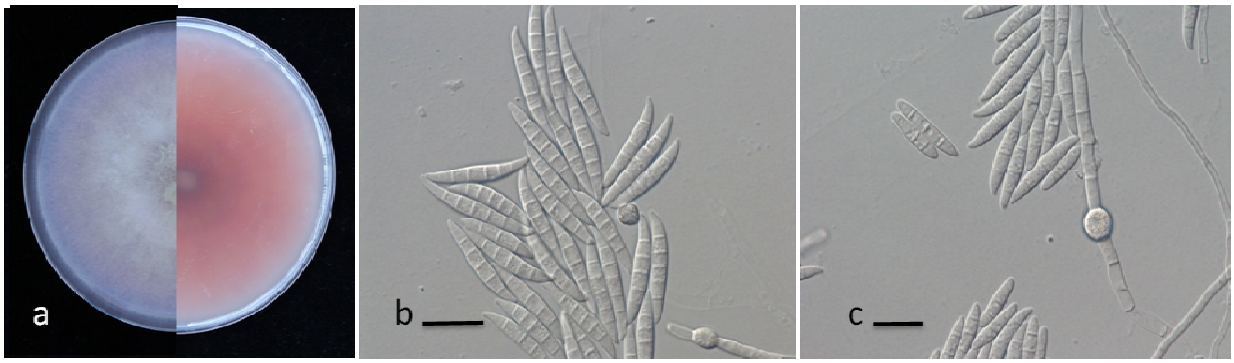
شناسایی گونه‌ها با مطالعه ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مطابقت با کلیدهای معتبر و مقایسه توالی‌های *TEF-1α* به دست آمده از جدایه‌های فوق با توالی‌های موجود در بانک ژن و پایگاه اختصاصی FUSARIUM-ID با استفاده از ابزار جستجوی BLAST نشان داد که تنوع بالایی در گونه‌های فوزاریوم همراه با گل‌آذین‌های گندمیان وحشی استان اردبیل وجود دارد، به طوری که گونه‌های متعلق به شش کمپلکس گونه‌ای شامل FIESC (*Fusarium incarnatum-equiseti* species complex)، FGSC (*Fusarium graminearum* species complex)، FTSC (*Fusarium tricinctum/avenaceum/acuminatum* species complex)، GFSC (*Gibberella fujikuroi* species complex)، FOSC (*Fusarium oxysporum* species complex) و FSAMSC (*Fusarium sambucinum* species complex) به ترتیب با فراوانی ۶۸/۴، ۹/۵، ۹/۵، ۸/۱، ۱/۵ و ۱/۵ درصد دیده می‌شود (داده‌های چاپ نشده). از میان گونه‌های شناسایی شده، گونه‌های *F. brachygibbosum*، *F. torulosum* و *F.* cf. *reticulatum* var. *negundis* برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شوند. روابط تکاملی ترسیم شده براساس توالی ناحیه *TEF-1α* شامل جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق و برخی جدایه‌های موجود در بانک ژن و پایگاه اختصاصی FUSARIUM-ID در شکل ۳ نشان داده شده است. در اینجا توصیف کاملی برای این آرایه‌ها ارایه و با توصیف‌های ارایه شده توسط سایر محققان مقایسه می‌شود. مشخصات سه آرایه جدید برای ایران که علاوه بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی، با نتایج توالی‌یابی ژن *TEF-1α* مورد تایید قرار گرفتند، به شرح زیر است:

Fusarium brachygibbosum Padwick 1945

پرگنه روی محیط کشت PDA از بالا سفید و گلی‌رنگ تا کمی مایل به پرتقالی است و از پشت، وسط پرگنه به تدریج قهوه‌ای می‌شود. بعد از دو هفته، روی ریسه‌های کرکی، حالت پودری ریز به رنگ پرتقالی مایل به زرد پدیدار می‌شود. قطر پرگنه بعد از سه روز، ۷/۲ -۵/۶ سانتی‌متر و بعد از یک هفته کل تشتک پتری نه سانتی‌متری را پر می‌کند. ماکروکنیدیوم‌ها با اندازه ۴-۳ × ۴۲-۲۰ میکرومتر و ۵-۱ بندی (اغلب ۴-۳ بند) با دیواره‌های مشخص و دوکی شکل یا خمیده با انتهای باریک شونده، با نوک گرد و یاخته پایه با کمی فرورفتگی در سطح شکمی و به ندرت پاشنه‌ای شکل و یاخته‌های وسطی پهن‌ترند. کلامیدوسپورها بعد از ده روز روی محیط SNA هم در

ماکروکنیدیوم و هم روی ریسه‌ها تشکیل می‌شوند (شکل ۱). کلامیدوسپورها به صورت انتهایی یا میانی، انفرادی و زنجیری، عموما گرد و تک‌یاخته‌ای و گاهی دو یاخته‌ای گرانوله (مضرس، خاردار) دیده می‌شوند. اسپورودوکیوم در این گونه دیده نمی‌شود. ماکروکنیدیوم‌ها روی منوفیالیدهای کوتاه تا متوسط تشکیل می‌شوند. این جدایه در بررسی تولید تریکوتسن B با فناوری لومینکس فاقد قدرت تولید زهرابه‌های قارچی متعلق به این گروه بود (Davari *et al.* 2013).

این گونه نخستین‌بار در سال ۱۹۴۵ توسط پادویک (به نقل از Gerlach & Nirenberg 1982) توصیف شده است و بوث (Booth 1971) آن را همنام *F. semitectum* در نظر گرفته است ولی سوبرامانیان (Subramanian 1971) آن را به عنوان گونه مجزا در نظر گرفت و در کتاب گرلاخ و نیرنبرگ (۱۹۸۲) به عنوان گونه مستقل توضیح داده شده است. این گونه برای نخستین بار از ریشه‌های آلوده *Sorghum vulgare* Pers. در هند جداسازی شده است (Gerlach & Nirenberg 1982). در حال حاضر، این گونه متعلق به کمپلکس گونه‌ای *F. sambucinum* (*Fusarium sambucinum* species complex, FSAMSC) است و در بخش *Gibbosum* قرار می‌گیرد. دو جدایه از این گونه با شماره‌های دسترسی CBS131017 و CBS131252 در مرکز قارچ شناسی آکادمی علوم کشور هلند (CBS) نگهداری می‌شوند که در این تحقیق به ترتیب از دم‌روباهی صحرایی (*Alopecurus mycosuroides* Hudson) بیله‌سوار مغان و گندم استان گلستان جداسازی شده‌اند. هم‌چنین، توالی‌های *TEF-1α* این دو جدایه با شماره‌های JQ429370 و JQ429334 در بانک ژن (GenBank) ثبت شده است. تا زمان این مطالعه، توالی *TEF-1α* تنها یک جدایه (NRRL34033) به دست آمده از عفونت پای انسان در تگزاس آمریکا و یک جدایه (NRRL25093) جدا شده از نوعی پروانه در هند در بانک ژن و توالی یک جدایه (NRRL20954) در پایگاه اطلاعاتی FUSAIUM-ID به عنوان ex-type ثبت شده است. به طور کلی، تعداد معدودی از جدایه‌های متعلق به این گونه در دنیا گزارش شده است و گزارش این گونه برای فلور قارچی ایران جدید است. هم‌چنین، گزارش گونه‌ای از جنس فوزاریوم روی گیاه*Alopecurus mycosuroides* در دنیا جدید می‌باشد. وضعیت بیماری‌زایی این جدایه‌ها روی دم‌روباهی و گندم و هم‌چنین پتانسیل ایجاد بیماری روی جانداران نیاز به بررسی دارد.



شکل ۱- *Fusarium brachygibbosum*: a. پرگنه روی PDA پس از هفت روز (نیمه چپ و راست به ترتیب سطح رویین و زیرین پرگنه)،b–c. ماکروکنیدیوم‌ها و کلامیدوسپورها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. *Fusarium brachygibbosum*: a. Colony on PDA after seven days (left and right: surface and reverse of colony, respectively), b–c. Macroconidia and Chlamydospores (Bar = 10 µm).

Fusarium torulosum (Berkeley & Curtis) Nirenberg

میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA در شرایط استاندارد نوری و دمایی بعد از سه روز برابر ۲ سانتی‌متر و بعد از ۱۰ روز ۵/۲ سانتی‌متر بود و بدین ترتیب گونه کندرشدی محسوب می‌شود. سطح پرگنه کرک‌دار (lanose) تا نمدی شکل (felt-like) متراکم و به رنگ سفید مایل به نارنجی بود و از بالا به تدریج به صورت حلقه‌های متحدالمرکز دیده می‌شد و زیر لایه میسلیومی یاقوتی رنگ توسط کرک‌های گل سرخی مایل به خاکستری پوشیده می‌شد. اطراف پرگنه در اوایل رشد، سفید رنگ و دارای بریدگی‌های (lobed) نامنظم و رنگ پرگنه از پشت تشتک پتری، نارنجی مایل به زرد بود. روی محیط کشت SNA ماکروکنیدیوم‌های فراوان روی اسپورودوکیوم‌های نارنجی‌رنگ تولید می‌شدند. یاخته‌های کنیدیوم‌زا، منوفیالید استوانه‌ای تا کمی بشکه‌ای شکل هستند که به صورت منشعب روی اسپورودوکیوم قرار می‌گیرند. ماکروکنیدیوم‌ها هلالی شکل

به اندازه ۵-۴ × ۴۰-۳۰ و معمولا ۵-۴ بندی با یک یاخته پایه‌ای مشخص و دنباله‌دار (pedicellete) و یاخته انتهایی مختوم به نقطه (pointed) هستند. کلامیدوسپورها به صورت زنجیری یا خوشه‌ای بعد از دو هفته روی SNA تشکیل شدند. میکروکنیدیوم در جدایه مورد بررسی تشکیل نشد ولی بنا به نظر نیرنبرگ (۱۹۹۵) میکروکنیدیوم‌های تخم‌مرغی ۲-۱ یاخته گاهی در برخی جدایه‌ها تشکیل می‌شود. مشخصات این گونه با شرح ارایه شده توسط نیرنبرگ (۱۹۹۵) مطابقت داشت و توالی *TEF-1α* این جدایه با توالی‌های ارایه شده در بانک جهانی ژن مشابهت بسیار بالایی نشان داد. یک جدایه از این گونه که از یک گیاه نامشخص متعلق به تیره *Poaceae* از استان اردبیل به دست آمده بود، با شماره CBS131188 به مجموعه قارچ‌های زنده مرکز قارچ‌شناسی آکادمی علوم کشور هلند (CBS) اهدا شد و توالی *TEF-1α* نیز با شماره دسترسی JQ429376 در بانک ژن به ثبت رسید. تعداد توالی ثبت شده از این گونه در بانک جهانی ژن تا این موقع به ۲۰ می‌رسد. گزارش این گونه برای میکوفلور ایران جدید است.

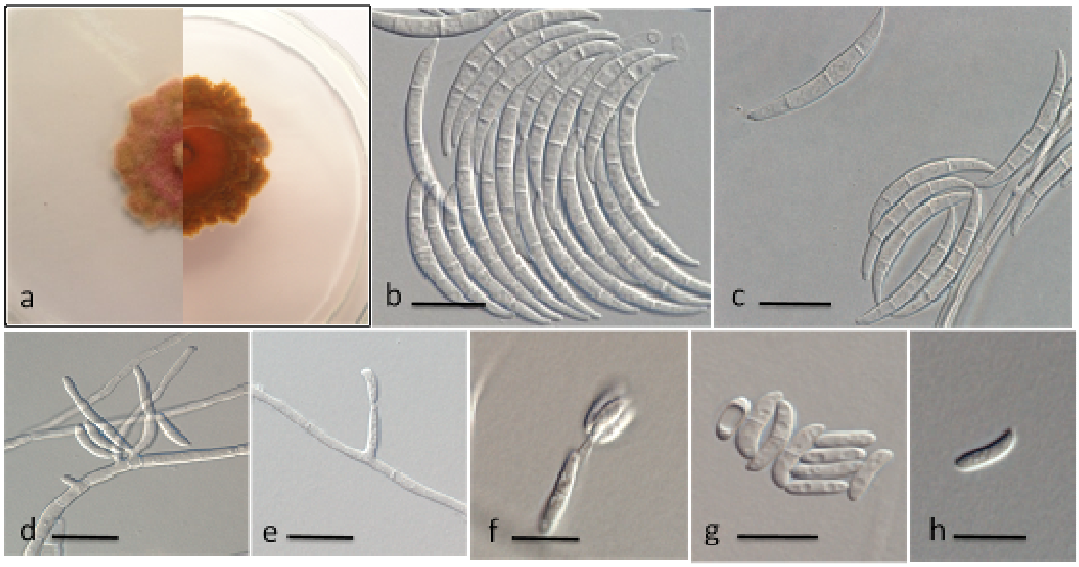
گونه *F. torulosum* با اسامی مختلفی شناخته شده است اما اغلب در گزارش‌های قبل از سال ۱۹۹۵ به نام *F. sambucinum* var. *coeruleum* به کار برده می‌شد. نیرنبرگ (۱۹۹۵) این گروه را به موقعیت گونه ارتقا داد. احتمال اینکه به دلیل شباهت ریخت‌شناختی *F. torulosum* با برخی از سایر گونه‌های متعلق به FSAMSC در بخش *Discolor* (*F. sambucinum* و *F. venenatum*) اشتباه شود، زیاد است. تمایز این گونه‌ها براساس نرخ رشد روی PDA است، *F. torulosum* بسیار کندرشدتر از *F. sambucinum* و *F. venenatum* است. در ضمن *F. torulosum* می‌تواند کلامیدوسپور تشکیل دهد، اما *F. sambucinum* کلامیدوسپور تولید نمی‌کند. با این‌حال، تمایز دقیق این گونه‌ها نیاز به روش‌های مولکولی از جمله توالی‌یابی دارد. *F. torulosum* اغلب در نواحی معتدل از ریشه تعدادی از گیاهان شامل غلات، گوجه‌فرنگی، چغندر قند و درختان جداسازی شده است (Nirenberg 1995). هم‌چنین، این گونه می‌تواند باعث پوسیدگی ریشه یونجه شود (Mebalds 1987) و در خاک چمنزارهای استرالیا نیز متداول است (Summerell *et al.* 2011). در منابع مختلف، *F. torulosum* فاقد قدرت تولید تریکوتسن‌ها معرفی شده است (Altomare *et al.* 1995) و این جدایه نیز در سنجش MLGT با فناوری لومینکس قادر به تولید زهرابه‌های قارچی متعلق به گروه تریکوتسن B نبود (داوری و همکاران ۲۰۱۳). این گونه می‌تواند آنتی‌بیوتیک Y، انیاتین B و ورتمانین (wortmannin) تولید کند. در ضمن قادر است تعدادی ترکیبات آلی فرار تولید کند که در توسعه حسگرهای زیستی (biosensors) برای پیش‌بینی پوسیدگی خشک سیب‌زمینی در انبار به کار می‌روند (Leslie & Summerell 2006).

cf. *reticulatum* Mont. var. ***negundinis Fusarium*** (Sherb.) Wollenw.

توالی‌های *TEF-1α* چند جدایه به دست آمده از گندمیان وحشی استان اردبیل با جدایه‌های ارایه شده در بانک ژن تحت عنوان *Fusarium reticulatum* var. *negundinis* از جمله جدایه‌های MB276318 و MB276318 و در پایگاه اطلاعاتی FUSARIUM-ID تحت عنوان *F. negundis* شامل جدایه NRRL 20682 (FD-1324) مشابهت بسیار بالایی نشان دادند. در پایگاه‌های معتبر قارچ‌شناسی، گونه *reticulatum* var. *Fusarium negundinis* به عنوان اسم اصلی و *F. negundinis* یا *F. negundi* به عنوان همنام پذیرفته شده است. مشخصات ریخت‌شناختی جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق به شرح زیر است: پرگنه رشد بسیار کندی روی PDA دارد و قطر آن پس از سه روز به ۲/۲-۱ سانتی‌متر و بعد از ۱۰ روز به ۳/۲-۱/۴ سانتی‌متر می‌رسد. رنگ پرگنه، قهوه‌ای تا بنفش با میسلیوم‌های بسیار متراکم و شبیه بافت پارچه پشمی دیده می‌شود و از پشت تشتک پتری قهوه‌ای تا یشمی‌رنگ است. اسپورودوکیوم‌های نارنجی فراوان روی PDA و SNA تولید می‌شوند. روی محیط کشت SNA ماکروکنیدیوم‌ها با انحنای نسبتا زیاد، با یاخته پایه پاشنه‌ای شکل کوتاه و یاخته انتهایی نوک‌تیز منقاری شکل یا پاپیل‌دار دارای ۵-۳ دیواره واضح روی منوفیالیدهای انفرادی یا کنیدیوم‌برهای منشعب اسپورودوکیوم‌ها و گاهی روی منوفیالیدها در میسلیوم هوایی (به عنوان مزوکنیدیوم) تولید می‌شود و اندازه آن‌ها ۴-۳ × ۳۶-۲۵ میکرومتر است. تولید میکروکنیدیوم‌های تک‌یاخته‌ای و گاهی دو یاخته‌ای کشیده یا سوسیسی شکل به اندازه ۳-۲/۵ × ۱۱-۸ میلی‌متر روی منوفیالیدهای کوتاه یا بلند انفرادی و منشعب در محیط کشت SNA از مشخصات دیگر این جدایه‌ها به شمار می‌رود (شکل ۲). در جدایه‌های مورد بررسی، تشکیل کلامیدوسپور بعد از نگهداری به مدت یک ماه روی محیط‌های کشت SNA و PDA مشاهده نشد ولی مطابق وولن‌وبر و رینکینگ (Wollenweber & Reinking 1935) گاهی کلامیدوسپورهای قهوه‌ای رنگ به صورت زنجیری یا مجتمع و به ندرت انفرادی یا دوتایی روی میسلیوم یا ماکروکنیدیوم تشکیل می‌شود. این قارچ به عنوان بیمارگر روی نوعی افرا (*Acer negundo*) که باعث قرمز شدن رنگ چوب می‌شود و نیز از کندوی عسل در آمریکای شمالی

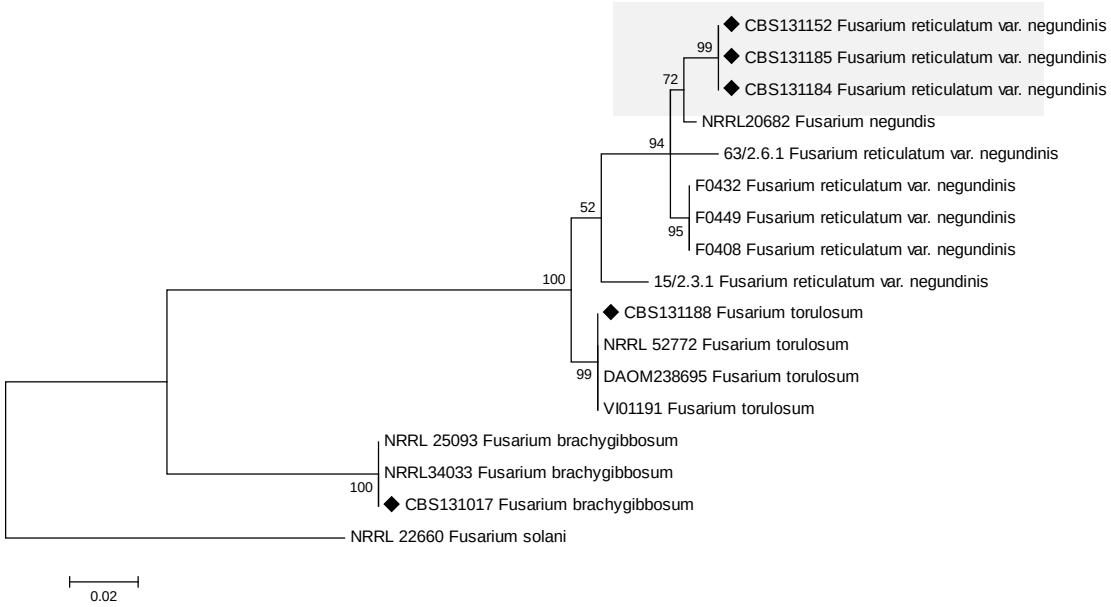
گزارش شده است (Wollenweber & Reinking 1935). وضعیت بیماری‌زایی این گونه روی میزبان‌های گیاهی نیاز به بررسی دارد.

سه جدایه از گونه مذکور با شماره‌های CBS131152، CBS131184 و CBS131185 در مجموعه قارچ‌های مرکز قارچ‌شناسی علوم کشور هلند (CBS) نگهداری می‌شود که از گل‌آذین سه بوته مختلف گیاه گندم‌نیا (*Aegilops triuncialis* L.) از خویشاوندان وحشی گندم در پارس‌آباد مغان در این تحقیق جداسازی شده‌اند. هم‌چنین، توالی‌های *TEF-1α* دو جدایه از این گونه با شماره‌های JQ429356 و JQ429375 در بانک ژن (GenBank) ثبت شده است. تاکنون توالی *TEF-1α* تعداد پنج جدایه از چین و اسپانیا در بانک ژن و یک جدایه در پایگاه اطلاعاتی FUSAIUM-ID ثبت شده است. به طور کلی، تعداد معدودی جدایه متعلق به این گونه در دنیا گزارش شده است و گزارش این گونه برای میکوبیوتای ایران جدید است. در درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر مبنای توالی *TEF-1α*، جدایه‌های شمال‌غرب ایران به صورت یک زیرکلاد (subclade) مجزا با حمایت اعتبارسنجی ۹۹ درصد در داخل کلاد اصلی مربوط به توالی‌های این آرایه قرار می‌گیرد (شکل ۳). با این وجود، کلاد اصلی از حمایت اعتبارسنجی ضعیف (۵۲ درصد) برخوردار است و تنوع نوکلئوتیدی قابل توجهی در ناحیه *TEF-1α* در بین جدایه‌های معرفی شده تحت این نام در بانک ژن دیده می‌شود. ضمنا با وجود توالی‌یابی ژن RPB_2 و *β-tubulin* برای این جدایه‌ها به دلیل عدم وجود توالی این ژن‌ها در مورد جدایه‌های دیگر در بانک ژن و پایگاه اختصاصی FUSARIUM-ID، امکان مقایسه توالی‌ها و تجزیه فیلوژنتیک در مورد این آرایه فراهم نشد و فعلا این جدایه‌ها تحت عنوان *F.* cf. *reticulatum* var. *negundinis* معرفی می‌شوند. تعیین دقیق هویت این جدایه‌ها از طریق مقایسه خصوصیات ریخت‌شناختی این جدایه با جدایه تیپ این گونه و دیگر جدایه‌های موجود در کلکسیون‌های دنیا امکان‌پذیر خواهد بود. بنابراین، مطالعات درباره وضعیت تاکسونومیکی این گونه و جدایه‌های مورد نظر ادامه دارد.



شکل ۲- *Fusarium* cf. *reticulatum* var. *negundinis*: a، پرگنه روی PDA پس از هفت روز (نیمه چپ و راست به ترتیب سطح رویین و زیرین پرگنه)، b–c ماکروکنیدیوم‌ها، d–e. منوفیالیدهای انفرادی، f–h. میکروکنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 2. *Fusarium* cf. *reticulatum* var. *negundinis*: a. Colony on PDA after seven days (left and right: surface and reverse of colony, respectively), b–c. Macroconidia. d–e. Unbranched monophialides, f–h. Microconidia (Bar = 10 µm).



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده براساس توالی ناحیه *TEF-1α* با استفاده از نرم‌افزار Mega5 به روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum likelihood) به ازای ۱۰۰۰ تکرار اعتبارسنجی (Bootstrap). گونه *F. solani* به عنوان گروه خارجی (outgroup) و مقیاس نشان دهنده ۰/۰۲ جایگزینی به ازای هر نوکلئوتید می‌باشد. علامت ◆ جدایه‌های به دست آمده از گل‌آذین گندمیان وحشی در این تحقیق را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Phylogenetic tree inferred from maximum likelihood analysis of the partial sequences of translation elongation factor (*TEF-1α*) gene. The scale bar shows 0.02 substitutions per site and bootstrap supports values from 1000 replicates shown at node. The tree was rooted to *F. solani*. ◆ indicates sequence data obtained from inflorescence of wild grasses in our study.

بحث

در کشاورزی نوین، یکی از روش‌های معمول در مبارزه با بیماری‌های گیاهی استفاده از قارچ‌کش‌هاست و به دلیل عدم کارآیی قارچ‌کش‌ها در مورد بیمارگرهای ساکن روی علف‌های هرز و بقایای گیاهی به علت وسعت زیاد آن‌ها، جمعیت قارچ‌ها در این سامانه، اهمیت زیادی به عنوان نگهدارنده‌های مایه تلقیح بیماری و عامل افزایش تنوع ژنتیکی قارچ بیماری‌زا پیدا می‌کنند و به احتمال قوی با شیوع آن بیماری در فصل زراعی آتی ارتباط دارند. بنابراین اطلاع از گستره گونه‌ها و تنوع ژنتیکی داخل گونه‌ها در این اجتماعات، دانش لازم برای برآورد خطرات فراروی سامانه‌های کشاورزی را فراهم می‌نماید (Postic *et al.* 2012).

پوستیک و همکاران (۲۰۱۲) از ریشه و ساقه گونه‌های مختلف علف‌های هرز در کرواسی، ۱۴ گونه فوزاریوم جدا کردند که بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به *F. graminearum*، *F. oxysporum*، *F. subglutinans* و *F. proliferatum* بود. ایشان از میان گونه‌های جدا شده، *F. graminearum* را به عنوان گونه غالب در ایجاد بیماری FHB و *F. verticillioides* و *F. subglutinans* را از بیمارگرهای مهم ذرت در کرواسی نام بردند. اینچ و گیلبرت (۲۰۰۳) تنوع گونه‌های فوزاریوم را در گل‌آذین‌های گندمیان وحشی مانیتوبای جنوبی کانادا بررسی کرده و هفت گونه فوزاریوم شامل *F. graminearum*، *F. sporotrichioides*، *F. equiseti*، *F. oxysporum*، *F. avenaceum*، *F. culmorum* و *F. poae* را از ۳۴ گونه گیاهی جداسازی نمودند و گونه اول را به عنوان گونه غالب معرفی نمودند. طی تحقیقات مختلف، گونه‌های جدیدی نیز برای این جنس از گندمیان وحشی در دنیا جداسازی و معرفی شده است که می‌توان به *F. thapsinum* و *F. andiyazi* از سورگوم (Klittich *et al.* 1997, Marasas *et al.* 2001)، *F. konzum* از ساقه و گل‌آذین *Andropogon* spp. و چند گرامینه وحشی دیگر (Zeller *et al.* 2003) و *F. gaditjirrii* از ساقه *Heteropogon triticeus* (Phan *et al.* 2004) اشاره کرد.

تاکنون در ایران مطالعه چندانی در خصوص پراکنش گونه‌های فوزاریوم روی خوشه گندمیان وحشی صورت نگرفته است. درویش‌نیا و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی جدایه‌های فوزاریوم به دست آمده از اندام‌های مختلف بویژه ریشه و طوقه گیاهان تیره گندمیان از برخی مناطق کشور، ۳۲ گونه را از روی مشخصات ریخت‌شناختی تشخیص دادند که بیشترین فراوانی

مربوط به *F. verticillioides* و *F. proliferatum* بود. در تحقیق حاضر، طبق نتایج مبتنی بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی‌یابی *TEF-1α* تعداد ۱۵ گونه فوزاریوم متعلق به شش کمپلکس گونه‌ای از گل‌آذین گندمیان وحشی مورد مطالعه در استان اردبیل شناسایی شد (داده‌های چاپ نشده) که در بین آن‌ها گزارش گونه‌های *F. brachygibbosum*، *F. torulosum* و cf. *reticulatum* var. *negundinis* برای میکوبیوتای ایران جدید است. تاکنون گونه *F. brachygibbosum* به تعداد انگشت‌شمار به عنوان بیمارگر انسانی و گیاهی از برخی کشورها گزارش شده است (Gerlach & Nirenberg 1982, O'Donnell *et al.* 2009) و جزو گونه‌های کمیاب فوزاریوم محسوب می‌شود. گونه *F. torulosum* به تعداد بیشتری از ریشه برخی گیاهان شامل غلات، گوجه‌فرنگی، چغندرقند، یونجه و درختان جدا شده است (Nirenberg 1995) و در خاک چمنزارهای استرالیا نیز متداول است (Summerell *et al.* 2011). *F. reticulatum* var. *negundinis* نیز جزو گونه‌های کمیاب به شمار می‌رود و تنها به عنوان عامل تغییر رنگ نوعی افرا (*Acer negundo*) در جنگل و نیز از کندوی عسل گزارش شده است (Wollenweber & Reinking 1935) ولی در مورد نام دقیق و توصیف این گونه اختلاف نظرهایی وجود دارد و نیاز به مطالعه بیشتر احساس می‌شود. در چند دهه اخیر، برخی گونه‌های فوزاریوم به عنوان بیمارگر انسان نیز شناخته شده‌اند از جمله بیماری التهاب قرنیه یا کراتیت (keratitis) که به عنوان شایع‌ترین بیماری ناشی از فوزاریوم در انسان گزارش شده است (Gorscak *et al.* 2007). آلودگی‌های سیستمیک با گونه‌های فوزاریوم در افراد با ضعف ایمنی نیز تقریبا همیشه منجر به مرگ می‌شود، زیرا هنوز داروی مؤثری برای درمان این نوع عفونت‌ها معرفی نشده است (O'Donnell *et al.* 2010, Nucci & Anaissei 2007). آگاهی از تنوع گونه‌های فوزاریوم همراه با علف‌های هرز می‌تواند گامی در جهت شناسایی زیستگاه‌های طبیعی این قارچ‌ها نیز محسوب شود. این اولین مطالعه از تنوع گونه‌های فوزاریوم همراه با گل‌آذین گندمیان وحشی و نیز شناسایی گونه‌های متعلق به این جنس با استفاده توام از روش‌های ریخت‌شناختی و توالی‌یابی در ایران است.

با در نظر گرفتن مشکلات و نواقص موجود در آرایه‌بندی ریخت‌شناختی گونه‌های فوزاریوم و نیز تعداد زیاد گونه‌ها، واریته‌ها، فرم‌ها و تنوع بالای ریخت‌شناختی در بین جدایه‌های متعلق به یک گونه و اختلاف نظر قارچ‌شناسان در تعیین مرز و تعداد گونه‌ها در این جنس (Leslie & Summerell 2006, Klittich *et al.* 1997) و ناکافی بودن اطلاعات ریخت‌شناختی در شناسایی دقیق گونه پیشنهاد می‌شود در بررسی‌های مربوط به شناسایی گونه‌های فوزاریوم جهت تایید هویت، حتی‌المقدور از اطلاعات مولکولی نیز بهره گرفته شود و بویژه در گزارش‌های جدید از کشور احتیاط بیشتری صورت گیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان لازم می‌دانند از دکتر جی. اف. های‌بروک (J.F. Heijbroek) از هرباریوم ملی لایدن هلند و مهندس موسی ترابی گیگلو و دکتر عادل دباغ‌نسب از دانشگاه تبریز به خاطر همکاری در شناسایی گونه گندمیان وحشی و نیز اعضای دپارتمان قارچ‌شناسی پزشکی مرکز قارچ‌شناسی آکادمی علوم کشور هلند (CBS) که بخش مولکولی این تحقیق توسط نگارنده اول در آن مرکز انجام گرفته است، تشکر و قدردانی نمایند.

References

Altomare, C., Logrieco, A., Bottalico, A., Mulè, G., Moretti, A. & Evidente, A. 1995. Production of type A trichothecenes and enniatin B by *Fusarium sambucinum* Fückel *sensu lato*. Mycopathologia 129: 177–181.

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 pp.

Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. & Backhouse, D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. Department of Crop Science and Royal Botanic Garden, University of Sydney, Australia, 133 pp.

Davari, M., Didar, R. & Hajieghrari, B. 2006. Wheat fusarium head blight and identification of dominant species in Moghan area, Iran. Communications in Applied Biological Sciences 71: 1391–1397.

Davari, M., Wei, S.H., Babai-Ahari, A. Arzanlou, M., Waalwijk, C, van der Lee, T.A.J., Zare, R., Gerrits van den Ende, A.H.G., de Hoog, S.G. & van Diepeningen, A.D. 2013. Geographic differences in trichothecene chemotypes of

Fusarium graminearum in the Northwest and North of Iran. World Mycotoxin Journal 6(2): 137–150.

Geiser, D.M., Jiménez-Gasc, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T., 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. Heff 209, MiH. Biol. Bande sanst. Land- Fors Wirtsh. Berlin- Dahlem. 406 pp.

Ghiasian S.A., Kord-Bacheh, P., Rezayat, S.M., Maghsood, A.H., Taherkhani, H. 2004. Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000. Mycopathologia 158: 113–121.

Inch, S. & Gilbert, J. 2003. The incidence of *Fusarium* species recovered from inflorescences of wild grasses in southern Manitoba. Canadian Journal of Plant Pathology 25: 379–383.

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.

Landschoot, S., Audenaert, K., Waegeman, W., Pycke, B., Bekaert, B., De Baets, B. & Haesaert, G. 2011. Connection between primary *Fusarium* inoculum on gramineous weeds, crop residues and soil samples and the final population on wheat ears in Flanders, Belgium. Crop Protection 30: 1297–1305.

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

Mebalds, M.I. 1987. Mycoflora of *Medicago truncatula*, *M. rugosa* & *M. littoralis* seed produced in Victoria, Australia. Seed Science and Technology 15: 175–183 (abstract).

Möller, E.M., Bahnweg, G., Sanderman, H. & Geiger, H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. Nucleic Acids Research 20: 6115–6116.

Nash, S.N. & Snyder, W.C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology 73: 458–462.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. Press Park and London. 193 pp.

Nirenberg, H.I. 1995. Morphological differentiation of *Fusarium sambucinum* Fückel sensu stricto, *F. torulosum* (Berk. & Curt.) Nirenberg comb. nov., and *F. venenatum* Nirenberg sp. nov. Mycopathologia 129: 131–141.

O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Gueidan, C., Crous, P.W. & Geiser, D.M. 2009. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*, *F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. Journal of Clinical Microbiology 47: 3851–3861.

Parry, D.W., Jenkinson, P. & McLeod, P.L. 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review. Plant Pathology 44: 207–238.

Phan, H., Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Liew, E.C.Y., Smith-White, J. & Clarkson, J. 2004. *Gibberella gaditjirri* (*Fusarium gaditjirri*) sp. nov., a new species from tropical grasses in Australia. Studies in Mycology 50: 261–272.

Postic, J., Cosic, J., Vrandecic, K., Jurkovic., D., Saleh, A.M., John, F. & Leslie., J.F. 2012. Diversity of *Fusarium* species isolated from weeds and plant debris in Croatia. Journal of Phytopathology 160: 76–81.

Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Mirzadi Gohari, A., Okhovvat, S.M., Bihamta, M.R., Razzaghian, J. & Klemsdal, S.S. 2008. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. Journal of Plant Pathology 90: 463–468.

Safaie, N., Alizadeh, A., Saidi, A., Rahimian, H. & Adam, G. 2005. Molecular characterization and

genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat head blight. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 171–191.

Sarver, B.A.J., Ward, T.J., Gale, L.R., Broz, K., Kistler, H.C., Aoki, T., Nicholson, P., Carter, J. & O'Donnell, K. 2011. Novel Fusarium head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. Fungal Genetics and Biology 48: 1096–1107.

Stamatakis, A., Hoover, P. & Rougemont, J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web-Servers. Systematic Biology 75: 758–771.

Subramanian, C.V. 1971. Hyphomycetes- an Account of Indian Species, except *Cercospora*. Indian Council for Agricultural Research, New Delhi.

Summerell, B.A., Leslie, J.F., Liew, E.C.Y., Laurence, M.H., Bullock, S., Petrovic, T., Bentley, A.T., Howard, C.G., Peterson, S.A., Walsh, J.L. & Burgess, L.W. 2011. *Fusarium* species associated with plants in Australia. Fungal Diversity 46: 1–27.

Sutton, J.C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology 4: 195–209.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Steker, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731–2739.

Wollenweber, H.W. & Reinking, O.A. 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekampfung. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany.

Zeller, K.A., Summerell, B.A., Bullock, S. & Leslie, J.F. 2003. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov., a new biological species within the *Gibberella fujikuroi* species complex from prairie grasses. Mycologia 95: 943–954.