

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg، عامل پوسیدگی
بلال ذرت با استفاده از نشانگرهای AFLP

Study of Genetic Variation in Isolates of
Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg, the Causal Agent of Fusarium
Ear Rot of Corn Using AFLP Markers

وحید رهجو^۱، جواد زاد^۲، محمد جوان نیکخواه^۳، محمدرضا بی‌همتا^۴،
سید محمود اخوت^۲، امیر میرزادی گوهری^۴، عبدالحمید الامین^۵ و سونیا س. کلمسدال^۵

- ۱- دانشجوی سابق دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.
- ۲ و ۳- به ترتیب استاد و استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.
- ۴- مربی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ولیعصر، رفسنجان
- ۵- محقق، بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات کشاورزی و محیط زیست نروژ، اوس، نروژ.

تاریخ دریافت: ۱۳۷۶/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۱۱/۲۵

چکیده

رهجو، و.، جوان نیکخواه، م.، بی‌همتا، م.، ر.، اخوت، س. م.، میرزادی گوهری، ا.، الامین، ع.، و کلمسدال، س. س. ۱۳۸۷. بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg، عامل پوسیدگی بلال ذرت با استفاده از نشانگرهای AFLP. نهال و بذر ۲۴: ۴۷۴-۴۵۷.

تعداد ۱۰۸ جدایه قارچ *Fusarium verticillioides* عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت که از نمونه‌های به دست آمده از مناطق مختلف جغرافیایی و ذرت خیز ایران در سال ۱۳۸۴ جداسازی شده بودند به همراه دو جدایه استاندارد این قارچ از آفریقای جنوبی با استفاده از نشانگرهای AFLP ارزیابی شدند. پس از استخراج DNA جدایه‌ها، از آنزیم‌های برشی *MseI* و *EcoRI* برای برش استفاده شد و قطعات برش یافته به آداپتورهای دو رشته‌ای اختصاصی اتصال یافتند. محصولات PCR اولیه پس از رقیق شدن با به کارگیری پنج ترکیب آغازگر از آغازگرهای انتخابی *EcoRI* نشاندار شده با فسفر ۳۳ و *MseI* در یک واکنش انتخابی PCR استفاده شدند و در نهایت محصولات تکثیر با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید ۵٪ تفکیک شدند. پس از امتیازدهی الگوهای نواری حاصل به روش مشاهده‌ای، گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از ضریب شباهت دایس و الگوریتم UPGMA انجام شد. از تجزیه به مختصات اصلی نیز بعنوان روش مکمل تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. بر اساس دندروگرام حاصل از تعداد ۹۸ نشانگر چند شکل، ۱۱۰ جدایه *F. verticillioides* به هشت گروه انگشت‌نگاری مجزا (A-H) منتسب شدند که گروه انگشت‌نگاری A با ۹۸ عضو بزرگ‌ترین گروه ژنتیکی و بقیه گروه‌ها بین یک تا سه عضو را شامل شدند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) تنوع ژنتیکی در بین افراد هر جمعیت زیاد و بین جمعیت‌ها پائین ارزیابی شد که علت آن را شاید بتوان به عوامل موثر در تغییر پذیری ژنتیکی نظیر جهش و مهاجرت ژن یا ژنوتیپ در اثر عوامل مختلف نسبت داد.

واژه‌های کلیدی: ذرت، تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای، *Fusarium verticillioides*، AFLP

مقدمه

بیماری پوسیدگی فوزاریومی خوشه یا بلال (*Fusarium ear rot*) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ذرت در سراسر جهان، به خصوص مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به شمار می‌رود. این بیماری در ایران نیز یکی از بیماری‌های مهم در اغلب مناطق ذرت خیز محسوب می‌شود. بیماری، اولین بار در ذرت‌های پوسیده از نبراسکا مشاهده شد و شلدون (Sheldon, 1904) عامل آن را *Fusarium moniliforme* Sheldon گزارش کرد. قارچ *F. moniliforme* را در ایران ابتدا شریف و ارشاد در سال ۱۳۴۴ از استان‌های گیلان و مازندران روی برنج گزارش کردند (Okhovvat, 1999) و در تحقیقات بعدی این قارچ از بذر ذرت در ایران جداسازی شد (Bujari and Ershad, 1993)؛ (Zad and Ale-Agha, 1986). شبه گونه‌های متعددی از شبه جنس *Fusarium* موجب بیماری پوسیدگی بلال می‌شوند ولی شبه گونه *Fusarium verticillioides* = *F. moniliforme* در اکثر مناطق گونه غالب در ذرت است (Leslie, 1991؛ Chulze et al., 2000). در بررسی‌هایی که تاکنون بر روی عامل این بیماری در ایران انجام شده است، گونه *F. verticillioides* به عنوان گونه غالب شناسائی شده است (Ghiasian et al., 2004)؛ (Zamani and Alizadeh, 2000). فرم غیرجنسی این قارچ متعلق به بخش *Liseola* از

قارچ‌های فوزاریوم بوده و فرم جنسی آن یکی از اعضا گوناگون کمپلکس *Gibberella fujikuroi* به نام (*G. fujikuroi* mating population A) است (Booth, 1971). *G. moniliformis* قارچ *F. verticillioides* توانایی تولید میکوتوکسین‌هایی چون فومونیسین‌ها به ویژه فومونیسین B1 که مهم‌ترین آن‌ها است را دارد که موجب بیماری‌های خطرناکی در برخی از حیوانات می‌شود و اثر سرطان‌زایی بر روی انسان دارد (Danielsen et al., 1998). بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعه ساختار جمعیت درون گونه‌های قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی به منظور دستیابی به ارقام مقاوم و تناوب زراعی در جهت کاهش بیماری و یا مدیریت آن ضروری است. به کمک نشانگرهای مولکولی و یا تعیین گروه‌های سازگاری رویشی (Vegetative Compatibility Groups) VCGs می‌توان تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت را درون یک گونه بیولوژیکی قارچ عامل پوسیدگی فوزاریومی ذرت ارزیابی کرد (Chulze et al., 2000؛ Danielsen et al., 1998). در سال‌های اخیر با پیشرفت علوم مولکولی و ژنتیکی استفاده از تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر DNA برای بررسی تنوع ژنتیکی در موجودات زنده و به ویژه قارچ‌ها رواج یافته است. تا کنون از نشانگرهای مولکولی مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها به ویژه قارچ *F. verticillioides* استفاده شده است، ولی

VCG مشابه یا کلنال بوده یا خیلی به هم نزدیک هستند و تنوع مشاهده شده بر اساس تجزیه AFLP و VCG حاکی از آن است که تولید مثل جنسی ممکن است به نسبت فراوان تری از حالت تخمین زده شده انجام شود. تحقیقات نشان داده است که جمعیت آمیزشی A قارچ *G. fujikuroi* از نظر ژنتیکی متنوع بوده و مرحله جنسی نقش مهمی را در سیکل زندگی مزرعه‌ای قارچ ایفا می‌کند (Leslie, 1991). عبدالستار و همکاران (Abdel-Satar *et al.*, 2003) با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای را در جدایه‌های مختلف به دست آمده از پنج گونه مختلف فوزاریوم از جمله گونه *F. moniliforme* جدا شده از پنبه بررسی و تنوع زیادی را بین گونه‌های مختلف مشاهده کردند. در تحقیقی دیگر مورتی و همکارانش (Moretti *et al.*, 2004) با استفاده از روش AFLP تعداد ۳۳ جدایه از قارچ *F. verticillioides* را که از دو میزبان مختلف ذرت و موز جداسازی شده بودند مورد مقایسه قرار دادند که جدایه‌های مربوط به هر میزبان در گروه‌های ژنتیکی جداگانه قرار گرفتند. این جدایه‌ها از نظر سایر صفات نظیر تولید توکسین و بیماریزایی نیز متفاوت بودند. لزلی و همکاران (Leslie *et al.*, 2004) با استفاده از انگشت‌نگاری DNA به کمک نشانگر مولکولی AFLP تنوع ژنتیکی بین ۲۵ جدایه از پنج گونه

نشانگر AFLP یا «تفاوت طولی قطعات تکثیری» (Amplified Fragment Length Polymorphism) به دلیل دقت و تکرارپذیری بیشتر، مورد استفاده گسترده تری قرار گرفته است. این روش مبتنی بر تکثیر انتخابی برخی قطعه‌ها از بین تمام قطعات برش یافته DNA است (Vos *et al.*, 1995). نشانگرهای AFLP برای آشکار کردن تفاوت‌های ژنتیکی میان نژادها یا گونه‌های بسیار مرتبط با یکدیگر در طیف وسیعی از موجودات اعم از گیاهان، باکتری‌ها (Huys *et al.*, 1996) و قارچ‌ها (Majer *et al.*, 1998) مورد استفاده قرار گرفته‌اند، در حالی که این کار با خصوصیات مورفولوژیکی و یا دیگر صفات سیستماتیک مولکولی امکان‌پذیر نبوده است. تحقیقات نشان داده است که نشانگرهای AFLP در مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ فوزاریوم مناسب هستند (Abdel-Satar *et al.*, 2003).

در ارتباط با تنوع ژنتیکی قارچ *F. verticillioides* عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال به وسیله نشانگر مولکولی AFLP مطالعات متعددی در نقاط مختلف جهان انجام نشده است. به عنوان مثال در تحقیقی که توسط کولز و همکاران (Chulze *et al.*, 2000) انجام شد تنوع ژنتیکی قارچ *F. verticillioides* (جمعیت آمیزشی گروه A) بر اساس گروه‌های سازگاری رویشی (VCGs) و روش مولکولی AFLP تعیین شد. بر این اساس نتیجه گرفته شد که نژادهای یک

محتوی خاک استریل جهت انجام مطالعات بعدی نگهداری شدند. براساس معیارهای موجود در منابع قارچ‌شناسی نظیر گرلاخ و نیرنبرگ (Gerlach and Nirenberg, 1982)، نلسون و همکاران (Nelson et al., 1983) و لزلی و سامرل (Leslie and Summerell, 2006) شناسائی گونه‌های فوزاریوم انجام و گونه غالب بیماری تعیین شد. از میان ۱۳۳ جدایه قارچ گونه غالب بیماری (*F. verticillioides*) تعداد ۱۰۸ جدایه از نمونه‌های به دست آمده از مناطق مختلف ایران به همراه دو جدایه استاندارد تیپ آمیزشی این گونه (SA201 و SA200) که از کشور آفریقای جنوبی تهیه شده بود برای بررسی تعیین تنوع ژنتیکی به کمک نشانگر مولکولی AFLP انتخاب شدند (جدول ۱).

بخش مولکولی این تحقیق نظیر استخراج DNA ژنومی و هضم آن‌ها توسط آنزیم‌های برشی و آزمون AFLP در آزمایشگاه دکتر سونیا کلمسدال (Sonja S. Klemsdal)، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات کشاورزی و محیط زیست کشور نروژ انجام شد. میسلوم قارچی جدایه‌ها پس از دو هفته رشد در دمای ۲۵°C روی محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth) پس از رد شدن از دو لایه پارچه ملامل به عنوان صافی و شستشو با آب مقطر استریل از محیط جدا شده و به کمک نیتروژن مایع در هاون‌های چینی استریل پودر شدند. DNA ژنومی جدایه‌ها بر اساس پروتکل

مختلف فوزاریوم از جمله *F. verticillioides* جدا شده از بذر ارزن و سورگوم را بررسی کردند.

با توجه به این که تا کنون تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* جدا شده از ذرت در ایران توسط نشانگر AFLP مورد بررسی قرار نگرفته بود، این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف عامل غالب بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت که از مناطق مختلف جغرافیائی ایران به دست آمده بودند به کمک نشانگر مولکولی AFLP انجام شد.

مواد و روش‌ها

۱- آماده سازی جدایه‌ها و استخراج DNA

نمونه برداری از بلال‌های ذرت در سال ۱۳۸۴ از یازده استان کشور از مزارع مختلفی در ۲۳ منطقه بر اساس اولویت سطح زیر کشت و نیز شرایط آب و هوایی مساعد برای رشد قارچ انجام شد. نمونه برداری در مزارع به صورت تصادفی انجام شد. نمونه‌های آلوده در داخل پاکت‌های کاغذی مجزا قرار گرفته و پس از ثبت مشخصات لازم جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند. از میان نمونه‌های جمع‌آوری شده تعداد سه تا چهار بلال آلوده از هر مزرعه جهت جداسازی عامل بیماری انتخاب شد. پس از جداسازی و خالص‌سازی، از جدایه‌ها تک اسپور تهیه شد و در تشتک‌های پتری محتوی (Potato Dextrose Agar) PDA و لوله‌های

به مدت چهار ساعت در دمای 37°C انجام و نمونه‌های هضم شده تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای 20°C - نگهداری شدند. قطعات برش یافته سپس به آداپتورهای دو رشته‌ای اختصاصی اتصال یافتند. ابتدا PCR اولیه با آغازگرهای غیر انتخابی در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر نمونه انجام شد. مواد و ترکیبات استفاده شده شامل Buffer with 15 mM MgCl₂ 10X PCR dNTP 2.5 mM (0.24 μl) (2.5 μl)، *EcoRI*₀ primer 50ng/ μl (2.5 μl)، *MseI*₀ primer 50ng/ μl (2.5 μl)، Ampli Taq polymerase (5U/ μl)، ddH₂O (12.06 μl) بود که به مخلوط DNA الگوی برش یافته و چسبیده به آداپتورهای اختصاصی برای هر نمونه اضافه شد. شاهد منفی در واکنش شامل تمام موارد فوق به استثنای DNA الگو بود. چرخه‌های دمایی به کار رفته در PCR غیر انتخابی شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای 94°C به مدت ۲ دقیقه و ۴۵ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای 56°C به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای 72°C به مدت ۹۰ ثانیه و در خاتمه یک چرخه گسترش نهائی در دمای 72°C برای مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولات تکثیری پس از رقیق شدن، با به کارگیری شش ترکیب آغازگر از آغازگرهای انتخابی *EcoRI* نشاندار شده با عنصر رادیواکتیو فسفر ۳۳ و پلی نوکلئوتید کیناز T4 و *MseI* (که نوکلئوتیدهای انتخابی به

(Leslie "Mini-prep" DNA extraction and Summerell, 2006) کیت‌های QIAGEN- DNeasy Plant Mini Kit استخراج شدند.

۲- تجزیه AFLP

تجزیه AFLP بر اساس روش وس و همکاران (Vos *et al.*, 1995) با تغییراتی مبتنی بر پروتکل لزلزی و سومرل (Leslie and Summerell, 2006) انجام شد. ابتدا به منظور دستیابی به DNA خالص‌تر و با کیفیت بالاتر از ستون‌های تصفیه Micro Spin Columns (Bio Rad) و ماده پلی وینیل پلی پیرولیدون (PVPP) استفاده شد، سپس به منظور تعیین غلظت و خلوص نسبی DNA استخراج شده جدایه‌ها، از ژل آگارز ۰/۸ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید و نشانگر وزن مولکولی (BioLabs) 1kb استفاده شد و میزان حجمی DNA مورد نیاز برای تجزیه AFLP به طوری که محتوی ۲۵۰ نانوگرم DNA خالص باشد، محاسبه شد. برای برش مولکول DNA از آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *MseI* استفاده شد. واکنش برش شامل ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم *EcoRI* (5U)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *MseI* (5U)، هشت میکرولیتر بافر 5X RL و ۱/۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل دو بار تقطیر به علاوه مقادیر حجمی مورد نیاز از DNA الگو و آب مقطر استریل به حجم نهائی ۴۰ میکرولیتر برای هر نمونه واکنش بود. برش

درجه سانتی گراد در معرض یک فیلم نگاتیو حساس (Kodak Biomax MR – 43 cm x 35cm) قرار گرفتند و پس از ظهور فیلم‌ها با تعیین نوارهای چندشکلی نسبت به نمره‌دهی الگوهای نواری حاصل بر اساس حضور یا فقدان نوارها به ترتیب به صورت یک و صفر اقدام شد. تجزیه خوشه‌ای به کمک نرم افزار NTSYS version 2.10 انجام شد و گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از ضریب شباهت دایس (Dice) (Nei and Li, 1979)، و الگوریتم (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) UPGMA انجام شد. تجزیه (Principal Coordinate Analysis; PCoA) یا تجزیه به مؤلفه‌های اصلی جهت تمایز بین گروه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار فوق انجام شد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های قارچ نیز تجزیه واریانس مولکولی داده‌ها (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlex ver.6 انجام شد.

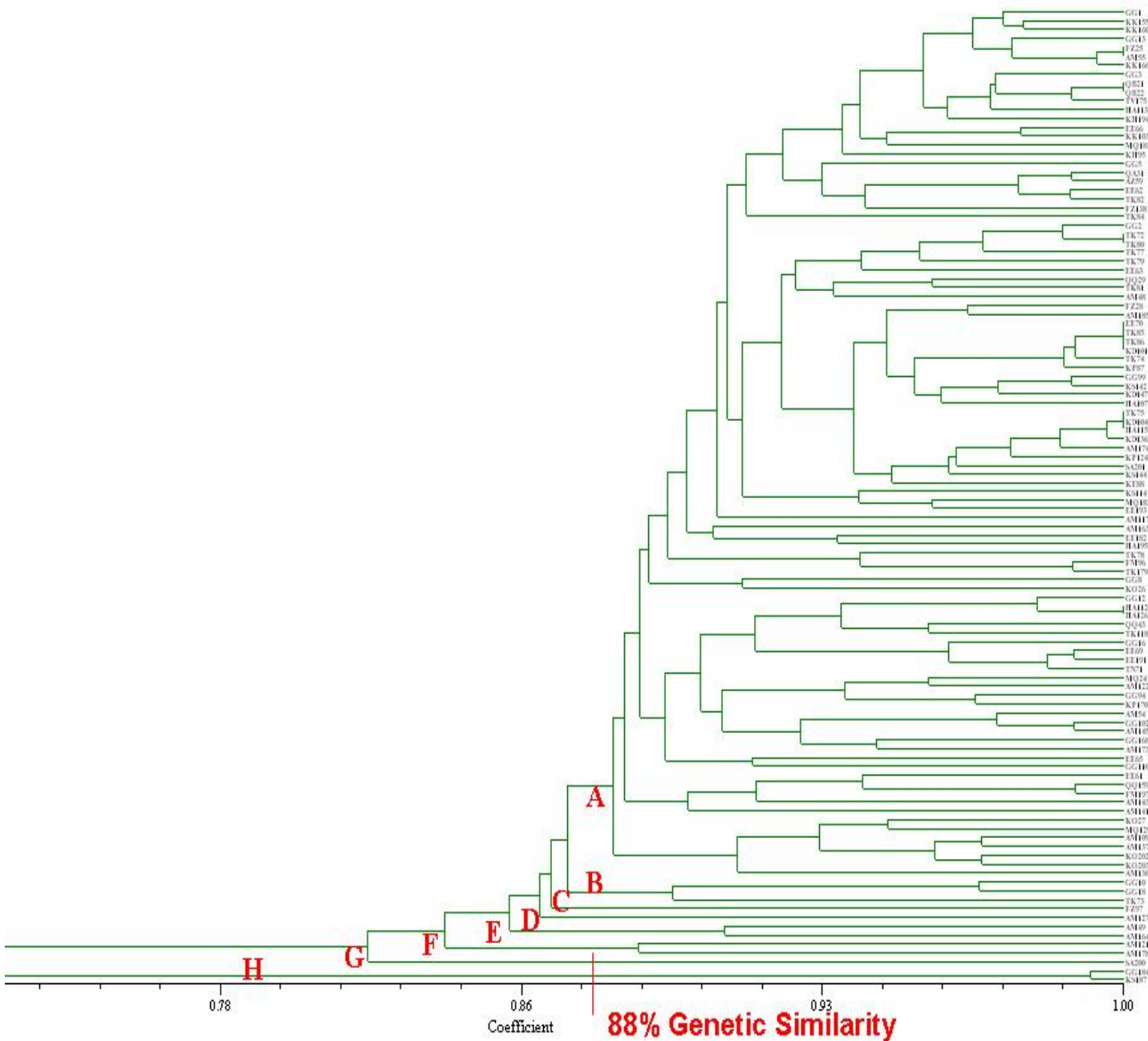
نتایج و بحث

در آزمون PCR انتخابی تجزیه AFLP انجام شده در این تحقیق از آغازگرهای با دو باز انتخابی استفاده شد که نتایج قابل قبولی به دست آمد. خاصیت انتخابی بودن آغازگرهای با یک یا دو باز انتخابی در ژنوم‌های ساده‌ای نظیر قارچ‌ها، باکتری‌ها و برخی گیاهان مناسب است. اگرچه انتخابی بودن با آغازگرهایی که دارای

انتهای 3' – آن‌ها متصل شده‌اند) در یک واکنش انتخابی PCR (Selective PCR) استفاده شدند (جدول ۲). واکنش انتخابی PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر برای هر نمونه شامل ۵ میکرولیتر از محصول PCR رقیق شده فوق، نیم میکرولیتر آغازگر انتخابی *EcoRI* نشاندار شده و ۱۵ میکرولیتر مخلوطی از آغازگر انتخابی *MseI* و دیگر مواد واکنش طی ۳۶ چرخه دمایی انجام شد. چرخه اول شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۴°C، ۳۰ ثانیه دمای ۶۵°C و ۶۰ ثانیه دمای ۷۲°C بوده و طی چرخه‌های ۱۳-۲ دمایی مرحله اتصال در هر چرخه ۰/۷°C کاهش یافت. چرخه‌های ۱۴-۳۶ نیز شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۴°C، ۳۰ ثانیه دمای ۵۶°C و ۶۰ ثانیه دمای ۷۲°C بوده و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه با استفاده از یک دستگاه ترمو سائیکلر Gene AMP PCR System 9700 انجام شد. در نهایت ۲ میکرولیتر از محصولات نهایی را که محلول رنگی فرم آمیدی به آن‌ها افزوده شده بود در چاهک‌های ژل پلی‌اکریل آمید ۵٪ بارگذاری و تفکیک قطعات تکثیر یافته در یک دستگاه الکتروفورز عمودی (Constant power 75 W) برای مدت ۲ ساعت صورت گرفت. پس از انتقال ژل بر روی یک کاغذ فیلتر و خشک کردن آن در یک دستگاه خشک‌کننده متصل به پمپ خلا (Gel Dryer)، ژل‌ها برای مدت ۴۸ ساعت در یک محفظه بسته و تاریک و در دمای ۸۰-

قرار گرفت، الگوریتم UPGMA گروه‌بندی مناسب‌تری نسبت به سایر الگوریتم‌ها نشان داد و میزان همبستگی Cophenetic برتر محاسبه شده برای این الگوریتم ($r = 0.85$) در نرم‌افزار NTSYS ver 2.10 انتخاب این الگوریتم را مورد تایید قرار داد. بدین ترتیب ۱۱۰ جدایه که در آزمون AFLP نوارهای مشخص تشکیل داده بودند در سطح شباهت ۸۸٪ در هشت گروه انگشت‌نگاری مجزا (A-H) قرار گرفتند (شکل ۱). گروه انگشت‌نگاری A با ۹۸ عضو بزرگ‌ترین گروه ژنتیکی محسوب شده و بقیه گروه‌ها بین یک تا سه عضو را شامل شدند (جدول ۱). همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود بیشتر جدایه‌ها (۸۹٪) در سطح تشابه ۸۸٪ در یک گروه ژنتیکی قرار گرفتند. این امر بیانگر این مطلب است که اکثریت جدایه‌ها دارای تشابه ژنتیکی بالا هستند و یا به عبارتی تنوع ژنتیکی پائینی را نشان می‌دهند. قرار گرفتن جدایه‌های مختلف از نظر منشا جغرافیایی در یک گروه انگشت‌نگاری وجود هر گونه ارتباطی بین منشا جغرافیایی و گروه‌بندی ژنتیکی بر مبنای انگشت‌نگاری DNA را نفی می‌کند. این نتیجه با نتایج تحقیقات مشابه در دیگر کشورها مطابقت دارد (Moretti et al., 2004؛ Abdel-Satar et al., 2003؛ Abd-Elsalam et al., 2002). علی‌رغم انتظار مشاهده تنوع ژنتیکی زیاد میان جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* به خاطر امکان تولید مثل جنسی و برخورداری از دو نوع تیپ آمیزشی

سه باز هستند نیز قابل قبول است اما با افزوده شدن باز چهارم این خاصیت زایل می‌شود (Vos et al., 1995). استفاده از دو باز انتخابی برای آغازگرهای انتخابی در تجزیه AFLP جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* توسط برخی محققین نتایج مطلوبی در تولید قطعات کافی برای ارزیابی ژنتیکی در بر داشته است. به عنوان مثال گونزالس و همکاران (Gonzalez et al., 1998) از دو باز به جای سه باز برای تولید تعداد قطعات کافی در تجزیه AFLP جدایه‌های قارچ *Colletothricum lindemuthianum* کردند که منجر به نتایج مطلوبی شد. از بین ۶ جفت ترکیب آغازگرهای انتخابی (جدول ۲) که بر اساس نتایج و تجارب قبلی متخصصین آزمایشگاه مربوطه (Sonja Klemsdal، مکاتبه شخصی) بر روی گونه‌های مختلف قارچ فوزاریوم انتخاب شده بودند، جفت آغازگر اول به دلیل تشکیل نوارهای چند شکل کمتر و عدم وضوح لازم برای تفکیک نوارها حذف شد و نوارهای چند شکل حاصل از ۵ جفت ترکیب آغازگر باقیمانده برای تجزیه استفاده شدند. بر این اساس از میان ۱۸۰ نوار تشکیل شده توسط ۵ جفت ترکیب آغازگر مورد استفاده در آزمون تعداد ۹۸ نوارهای چند شکل (۵۴٪ کل نوارها) به صورت مشاهده‌ای تشخیص داده شد. از بین الگوریتم‌های متفاوتی چون UPGMA، Neighbor Joining و Complete Linkage، که برای تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها مورد استفاده



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه دایس در آزمون AFLP برای ۱۱۰ جدایه قارچ *F. verticillioides* (حروف A-H نشانگر گروه‌های ژنتیکی در سطح تشابه ۸۸٪ هستند)
Fig. 1. Dendrogram generated by clustral analysis based on dice similarity coefficient in AFLP analysis of 110 *F. verticillioides* isolates (A-H letters represent the genetic groups at 88% similarity level)

جدول ۱- گروه‌بندی جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* جدا شده از بلال ذرت جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیائی ایران در سال ۱۳۸۴ بر اساس آزمون انگشت نگاری DNA به روش AFLP

Table 1. DNA fingerprint groups generated by AFLP markers of *F. verticillioides* strains isolated from corn ears collected from different geographic area of Iran during 2005

منطقه Location	تعداد جدایه‌ها No. of isolates	گروه‌بندی جدایه‌ها در گروه‌های انگشت‌نگاری مختلف* Grouping the isolates into different fingerprint groups*								
		گروه A	گروه B	گروه C	گروه D	گروه E	گروه F	گروه G	گروه H	
Ardabil	اردبیل	20	AM48, AM54, AM55, AM109, AM117, AM122, AM130, AM137, AM141, AM143, AM145, AM163, AM173, AM174, AM185	-	-	AM127	AM49, AM164	AM121, AM178	-	-
Isfahan	اصفهان	10	EE61, EE62, EE63, EE65, EE66, EE69, EE70, EE182, EE191, EE193	-	-	-	-	-	-	-
Tehran	تهران	17	TK72, TK74, TK75, TK77, TK78, TK79, TK80, TK81, TK82, TK84, TK85, TK86, TK118, TK179, TN71, TV175	TK73	-	-	-	-	-	-
Khuzestan	خوزستان	8	KD101, KD104, KD136, KD147, KS114, KS142, KS144	-	-	-	-	-	-	KS187
Fars	فارس	6	FM96, FM197, FZ25, FZ28, FZ138	-	FZ97	-	-	-	-	-
Qazvin	قزوین	6	QA31, QB2, QB22, QQ29, QQ43, QQ159	-	-	-	-	-	-	-
Kerman	کرمان	4	KO26, KO27, KO202, KO203	-	-	-	-	-	-	-
Kermanshah	کرمانشاه	11	KE88, KH95, KH113, KH194, KK103, KK155, KK160, KK166, KP87, KP124, KP170	-	-	-	-	-	-	-
Golestan	گلستان	16	GG1, GG2, GG3, GG5, GG8, GG13, GG99, GG12, GG16, GG94, GG102, GG110, GG168	GG10, GG18	-	-	-	-	-	GG184
Mazandaran	مازندران	4	MQ24, MQ129, MQ181, MQ183	-	-	-	-	-	-	-
Hamedan	همدان	5	HA107, HA112, HA115, HA126, HA195	-	-	-	-	-	-	-
Other areas	دیگر مناطق	3	AZ59, SA201	-	-	-	-	-	SA200	-
All Areas	کل مناطق	110	98	3	1	1	2	2	1	2

*: گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه دایس در سطح تشابه ۸۸٪ انجام شده است.

*: The isolates were grouped using UPGMA method based on dice similarity coefficient at 88% similarity level.

جدول ۲- جفت آغازگرهای انتخابی استفاده شده در آزمون AFLP

Table 2. Selective primer pairs used in AFLP analysis

ترتیب No.	جفت آغازگرهای انتخابی Selective primer pairs
1	E12 (AC - 3')* M17 (CG- 3')
2	E21 (GG - 3') M17 (CG- 3')
3	E12 (AC- 3') M15 (CA- 3')
4	E13 (AG- 3') M15 (CA- 3')
5	E11 (AA- 3') M16 (CC- 3')
6	E13 (AG- 3') M16 (CC- 3')

* دو باز انتخابی با ترکیب‌های متفاوت به انتهای 3' آغازگرهای انتخابی زیر الحاق یافتند:

* Two selective nucleotide with different arrangement were added to 3' end of following selective primers:

EcoRI: 5'- GACTGCGTACCAATTCNNN -3'

MseI : 5'- GATGAGTCCTGAGTAANNN -3'

آمیزشی (*MAT1*) در همه جدایه‌ها و در نتیجه ناتوانی در تولید مثل جنسی یا کاهش نرخ تکثیر جنسی مرتبط دانست. بی‌تردید این استدلال تنها می‌تواند برای آن بخش از جدایه‌ها که پیشتر تیپ آمیزشی آن‌ها تعیین شده بود مصداق داشته و بسط این استدلال برای همه جدایه‌ها نیازمند به تعیین تیپ آمیزشی همه جدایه‌ها در آزمون تکمیلی دیگری است. سطح پائین چند شکلی مشاهده شده در این تحقیق ممکن است در ارتباط با تعداد محدود آغازگرهای انتخابی باشد. دو جدایه استاندارد *F. verticillioides* استفاده شده در آزمون، SA200 (Mating Type A-*MAT1*) و SA201 (Mating Type A-*MAT2*) که از کشور آفریقای جنوبی تهیه شدند تفاوت ژنتیکی زیادی در گروه‌بندی انگشت‌نگاری

MAT1 و *MAT2* در طبیعت، جدایه‌های استفاده شده در این آزمون که از نقاط مختلف جغرافیایی کشور به دست آمده بودند تنوع ژنتیکی خیلی زیادی را نشان ندادند که این نتیجه تا حدی با نتایج محققین دیگر در سایر کشورها منطبق نیست (Chulze *et al.*, Abdel-Satar *et al.*, 2003)؛ اما با نتایج تحقیق دیگری (Mirzadi Gohari *et al.*, unpublished data) که به بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جدایه‌های مشترک با این تحقیق بر اساس گروه‌های سازگاری ریشی (VCGs) و تعیین تیپ آمیزشی آن‌ها پرداخته است منطبق است، به طوری که می‌توان تنوع ژنتیکی پائین‌تر از حد انتظار میان جدایه‌های مشترک هر دو آزمون را تا حد زیادی با مشاهده تنها یک نوع تیپ

در بررسی جدایه‌های گروه انگشت‌نگاری A، جدایه‌هایی با ۱۰۰٪ تشابه ژنتیکی مشاهده شد که در برخی موارد جدایه‌ها از یک مزرعه و حتی یک بلال و در برخی موارد جدایه‌ها از مناطقی متعلق به استان‌های متفاوت و با اقلیم‌های متفاوت بودند. به عنوان مثال جدایه‌های TK72 و TK80 هر دو از مزارع مجاور ذرت واقع در شهر کرج و جدایه‌های QB21 و QB22 از بذره‌های مختلف یک بلال جمع‌آوری شده از مزرعه‌ای در بوئین‌زهرای قزوین جداسازی شده بودند، در حالی که جدایه‌های TK75، KD104 و HA115 در عین دارا بودن ۱۰۰٪ تشابه ژنتیکی به ترتیب از مزارعی در کرج، دزفول و اسدآباد همدان با فواصل جغرافیایی زیاد جداسازی شده بودند.

در بررسی جدایه‌های مربوط به هر استان یا منطقه جغرافیایی (جمعیت) تفاوت بین مناطق از نظر میزان تنوع ژنتیکی جدایه‌های درون آن منطقه مشاهده شد، به طوری که در برخی استان‌ها جدایه‌ها در چندین گروه انگشت‌نگاری قرار گرفته و تنوع بیشتری را نشان دادند ولی جدایه‌های برخی از مناطق در یک یا دو گروه انگشت‌نگاری واقع شده و تنوع ژنتیکی پائینی بین جدایه‌ها مشاهده شد. به عنوان مثال جدایه‌های استان اردبیل (منطقه مغان) در چهار گروه انگشت‌نگاری مختلف قرار گرفتند و از این نظر بالاترین سطح تنوع ژنتیکی را نشان دادند و از طرفی جدایه‌های بسیاری از مناطق نظیر استان اصفهان یا کرمان همگی در یک

انجام شده نشان دادند به طوری که علی‌رغم ۸۲٪ تشابه تقریبی در نوارهای AFLP، جدایه SA200 به تنهایی در گروه انگشت‌نگاری تک‌عضوی G قرار گرفت در حالی که جدایه SA201 در بزرگ‌ترین گروه انگشت‌نگاری A جای گرفت. قرابت ژنتیکی و هم‌گروه بودن جدایه SA201 از آفریقای جنوبی با بسیاری از جدایه‌های ایرانی در گروه A نشان می‌دهد که حتی بین جدایه‌هایی با فواصل زیاد جغرافیایی می‌توان قرابت ژنتیکی بالایی را مشاهده کرد. با توجه به این که این جدایه‌های استاندارد صرفاً جهت شناسائی مورفولوژیکی و تعیین جمعیت آمیزشی (در آزمونی جداگانه) از کشور آفریقای جنوبی تهیه شده و پیش از این تحقیق هیچ گونه آزمون مولکولی و به ویژه تجزیه AFLP بر روی آن‌ها انجام نشده بود، لذا نمی‌توان از آن‌ها به عنوان نمونه‌های شاهد در تجزیه AFLP استفاده کرد، ولی قرار گرفتن یکی از این جدایه‌ها در گروهی مجزا که نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی مشخص این جدایه با جدایه‌های ایرانی قارچ *F. verticillioides* است، می‌تواند در آزمون‌های بعدی مورد توجه قرار گیرد. بدیهی است جهت نتیجه‌گیری و بحث دقیق در مورد جایگاه جدایه‌های آفریقای جنوبی یا هر کشور دیگر نیاز به حضور تعداد بیشتری از جدایه‌های آن کشور در آزمون AFLP است و با این تعداد نمونه نمی‌توان به طور دقیق در مورد جایگاه ژنتیکی جدایه‌های آفریقای جنوبی بحث کرد.

گروه (A) قرار گرفته و بیش از ۸۸٪ تشابه ژنتیکی بین آن‌ها مشاهده شد (جدول ۱). وجود تنوع بالا در استان اردبیل و منطقه حاصلخیز مغان را شاید بتوان به شرایط آب و هوایی مساعد آن منطقه برای رشد و تکثیر هر چه بیشتر قارچ نسبت داد به طوری که رطوبت کافی و دمای معتدل و گرم هوا در زمان تشکیل و رشد بلال‌های ذرت شرایط مناسبی را برای فعالیت و رشد قارچ فراهم می‌سازد. از طرفی تولید بذر و استفاده از لاین‌های والدین ذرت جهت تولید بذر هیبرید مورد نیاز کشور در سطح وسیع و حساسیت بالای لاین‌های ذکر شده نیز به فراهم کردن شرایط تکثیر و رشد و نمو قارچ کمک شایانی می‌کند که طبعاً این عوامل در افزایش میزان تنوع ژنتیکی قارچ تاثیرگذار خواهند بود. مشاهده بالاترین درصد آلودگی مزارع ذرت در منطقه مغان در بین تمامی مزارع بازدید شده طی فصل نمونه‌برداری در سال ۱۳۸۴ موید این مطلب است که فراهم بودن بستر رشد و تکثیر زیاد در این منطقه می‌تواند در تنوع ژنتیکی بالای جدایه‌های به دست آمده از منطقه نقش اساسی ایفا کند، همچنین با افزایش فعالیت و رشد و نمو قارچ در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب ممکن است احتمال وقوع تلاقی‌های جنسی و چرخه‌های شبه جنسی که در ایجاد تنوع ژنتیکی قارچ دخیل هستند افزایش یابد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) میزان تنوع ژنتیکی در بین افراد هر جمعیت یا منطقه زیاد (حدود ۹۱٪) و میزان تنوع

بین جمعیت‌های مختلف پائین (حدود ۹٪) ارزیابی شد (جدول ۳) که علت آن را شاید بتوان به عوامل موثر در تغییرات ژنتیکی نظیر جهش و مهاجرت ژن یا ژنوتیپ (gene or genotype flow) در اثر عوامل مختلف نسبت داد. نتایج آزمایش آمون جایگشت (Permutation test) با ۹۹۹ مرتبه تکرار با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.0 درستی نتایج تجزیه مولکولی را تایید کرد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی در زمینه تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها همچنین مشخص کرد که سهم افراد جمعیت گلستان (با ۱۶ نمونه) معادل ۲۵/۴ درصد از تنوع درون جمعیتی بوده و از این نظر بیشترین درصد تنوع را نشان دادند، همچنین سهم افراد جمعیت‌های اردبیل (با ۲۰ نمونه)، تهران (با ۱۷ نمونه)، کرمانشاه (با ۱۱ نمونه)، خوزستان (با هشت نمونه)، اصفهان (با ۱۰ نمونه)، فارس (با شش نمونه)، همدان (با پنج نمونه)، قزوین (با شش نمونه)، مازندران (با چهار نمونه) و کرمان (با چهار نمونه) به ترتیب با ۲۰/۹، ۱۱/۵۹، ۸/۹۱، ۷/۴۸، ۶/۵۴، ۶/۰۲، ۴/۱۶، ۳/۰۶ و ۱/۷۸ درصد از تنوع درون گونه‌ای محاسبه شد. لازم به توضیح است که در تجزیه واریانس مولکولی انجام شده در این تحقیق از ۱۱ جمعیت استفاده شد که بیانگر ۱۱ منطقه جغرافیائی (استان) که دارای حداقل چهار عضو (جدایه) بوده‌اند، می‌باشد. لذا از جدایه‌های دیگر مناطق (دو جدایه از آفریقای جنوبی و یک جدایه از استان آذربایجان شرقی)

۷۱٪ تشابه ژنتیکی با سایر جدایه‌های *F. verticillioides* متعلق به گونه *Fusarium sp.* که گونه‌ای متفاوت از نظر ژنتیکی است، هستند. طبق نظر لزی و سومرل (Leslie and Summerell, 2006) جدایه‌هایی که متعلق به یک گونه هستند معمولاً در ۶۰ تا ۷۰٪ یا بیشتر از نوارهای AFLP خود تشابه دارند در حالی که جدایه‌هایی که به طور واضح متعلق به گونه‌های متمایز هستند معمولاً ۴۰٪ یا کمتر از نوارهایشان دارای تشابه است. همچنین جدایه‌هایی که دارای نوارهای مشابه در حد واسط بین ۴۰ و ۶۰٪ هستند ممکن است که به واسطه قابلیت باروری جنسی و خصوصیات تاکسونومیکی خود به صورت گونه‌های حد واسط محسوب شوند، مانند جمعیت‌های آمیزشی D و C از گونه کمپلکس *G. fujikuroi* (Leslie et al., 2004). بنابراین دو گونه *Fusarium sp.* علی‌رغم آن که بر اساس نتیجه توالی‌یابی DNA به عنوان گونه‌ای مجزا شناسائی شدند ولی از آن جاکه دارای حدوداً ۷۱٪ تشابه نوارهای AFLP در مقایسه با جدایه‌های *F. verticillioides* بوده و دارای خصوصیات مورفولوژیک مشابه با آن‌ها بوده‌اند احتمالاً باید استرین‌هایی از قارچ *F. verticillioides* با تنوع ژنتیکی بیشتر و متمایز با سایر جدایه‌های موجود در ایران بوده و یا گونه‌ای حد واسط متعلق به گونه کمپلکس *G. fujikuroi* باشند که تاکنون توالی کامل آن‌ها در بانک‌های اطلاعاتی توالی DNA نظیر

که به طور مستقل در یک سطر از جدول ۱ مشخص شده‌اند به دلیل آن که تعداد جدایه‌ها برای آن که به صورت یک جمعیت فرض شوند کافی نبود، استفاده نشد. همان‌گونه که در شکل ۱ و جدول ۱ مشاهده می‌شود جدایه‌های GG184، KS187 با ۷۱٪ تشابه ژنتیکی با سایر جدایه‌های مورد استفاده در آزمون در یک گروه مجزا (H) قرار گرفته‌اند. از آن‌جا که این دو جدایه فاصله ژنتیکی محسوسی با سایر جدایه‌ها نشان دادند، نسبت به توالی‌یابی DNA این دو جدایه به همراه دو جدایه *F. verticillioides* استفاده شده در آزمون AFLP به عنوان شاهد (جدایه‌های AM163 جدا شده از مغان و FM96 جدا شده از مرودشت فارس)، در آزمونی جداگانه اقدام شد. نتیجه توالی‌یابی DNA که بر اساس توالی ژن ناحیه Elongation factor 1- α (TEF) انجام شد (Geiser et al., 2004) پس از مقایسه با توالی‌های بانک‌های اطلاعاتی GenBank و FUSARIUM-ID دو جدایه GG184 و KS187 را به عنوان گونه متفاوتی به نام *Fusarium sp.* شناسائی کرد در حالی که دو جدایه دیگر به عنوان گونه *F. verticillioides* شناخته شدند (Rahjoo et al., unpublished data). ترتیب دو جدایه GG184 (جدا شده از گرگان) و KS187 (جدا شده از شوش) علی‌رغم شباهت‌های مورفولوژیکی فراوان با جدایه‌های *F. verticillioides* با حدوداً

فوق مورد تایید قرار می‌دهد که از این نظر با نتایج تحقیقی که توسط عبد الستار و همکاران بر روی چند گونه فوزاریوم صورت گرفته بود تطابق دارد (Abdel-Satar *et al.*, 2003).

در مجموع با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه دایس و آنالیز PCoA در مورد جدایه‌های مورد استفاده در آزمون می‌توان نتیجه گرفت که تکنیک AFLP همان گونه که پیش‌بینی می‌شد یک تکنیک مفید و سودمند در بررسی و تنوع ژنتیکی بین گونه‌های مختلف قارچ‌های *Fusarium* و نیز روشی کارآمد در بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌های قارچی از جمله قارچ *F. verticillioides* است. تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف قارچ *F. verticillioides* در این آزمون اگرچه تا حدودی پایین‌تر از حد انتظار بود ولی به واسطه وجود چرخه جنسی و تیپ‌های آمیزشی متفاوت برای قارچ و همچنین عوامل مختلفی چون جهش و جریان ژن یا ژنوتیپ احتمال مشاهده تنوع بیشتری در مطالعات بعدی که به طور کامل‌تری در آینده انجام خواهد شد، وجود خواهد داشت. حتی با در نظر گرفتن همین سطح از تنوع در میان جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* و با توجه به پتانسیل موجود برای تنوع بیشتر، توجه به مکانیسم‌های مقاومت و مقابله علیه استرین‌های مختلف قارچ *F. verticillioides* و تولید هیبریدهای مقاوم ذرت اهمیت بیشتری می‌یابد. به نظر می‌رسد به دلیل مشاهده تنوع بالا درون

GenBank یا FUSARIUM-ID موجود نبوده است. لازم به ذکر است که با توجه به نتایج به دست آمده در AFLP و اطلاعات به دست آمده راجع به توالی DNA و صفات مورفولوژیک این دو جدایه آزمون‌های تکمیلی دیگری برای نتیجه‌گیری قاطع‌تر نیاز است. این نتایج قابلیت تکنیک AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی و نشان دادن فواصل ژنتیکی حتی بین گونه‌های حد واسط یا نزدیک به هم قارچی را مورد تایید قرار می‌دهد.

آنالیز PCoA یا آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی یکی از روش‌های گروه‌بندی چند متغیره بر اساس ضرایب تشابه یا مقادیر واریانس-کوواریانس اجزاء آزمون است. به نظر می‌رسد که این روش در تمایز میان گروه‌های اصلی مفید باشد در حالی که تجزیه خوشه‌ای وضوح بیشتری میان جمعیت‌های نزدیک به هم را نشان می‌دهد (Abdel-Satar *et al.*, 2003). همان گونه که در شکل ۲ مشخص است، در آنالیز PCoA انجام شده، گونه‌های *Fusarium sp.* علی‌رغم شباهت‌های مورفولوژیکی، به خوبی از جمعیت‌های قارچ *F. verticillioides* از نظر ژنتیکی متمایز می‌شوند. این شکل نشان می‌دهد که دو جدایه GG184 و KS18 به میزان زیادی با هم دارای تشابه و با سایر جدایه‌های آزمون دارای تفاوت و فاصله ژنتیکی می‌باشند. بدین ترتیب نتایج حاصل از PCoA نتایج گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه دایس را از نظر تفکیک جدایه‌ها به دو گروه اصلی

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) داده های تجزیه AFLP مربوط به ۱۱ جمعیت

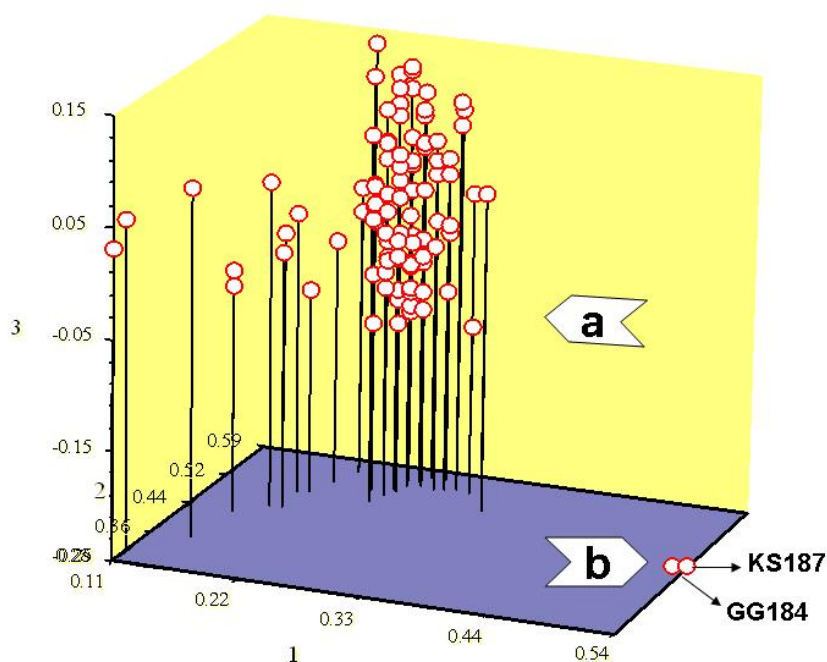
F. verticillioides (۱۱ منطقه) قارچ

Table 3. Analysis of molecular variance of AFLP data related to 11 populations of fungus *F. verticillioides* (11 Regions)

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات M.S.	واریانس Variance		PhiPT
				اجزاء Components	درصد (%)	
Among populations	بین جمعیت ها	10	13.16	0.683	9	0.092 **
Within populations	درون جمعیت ها	96	6.715	6.715	91	
Total	کل	106		7.399	100	

** : Significant difference at 1% level.

** : اختلاف معنی دار در سطح ۱٪.



شکل ۲- نمایش سه بعدی تجزیه PCoA که نمایانگر تفاوت ژنتیکی بین ۱۰۸ جدایه قارچ

(a) *F. verticillioides* و دو جدایه قارچ *Fusarium* sp. است (b)

Fig. 2. Three -dimensional display generated by NTSYS of principal coordinate analysis (PCoA) which demonstrates genetic distance of 108 *F. verticillioides* (a) and two *Fusarium* sp. isolates (b)

سپاسگزاری

از مسئولین محترم سازمان تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی و معاونت پژوهشی دانشگاه تهران که منابع مالی این تحقیق را فراهم کردند تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از مسئولین و کارکنان محترم بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران و موسسه تحقیقات کشاورزی و محیط زیست کشور نروژ به خاطر همکاری صمیمانه و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی و دکتر Gordon Shephard محقق مؤسسه تحقیقات PROMEC آفریقای جنوبی به خاطر ارسال جدایه‌های استاندارد گونه کمپلکس *Gibberella fujikuroi* قدردانی می‌شود.

برخی از جمعیت‌های قارچ که می‌تواند در روابط متقابل بیمارگر و میزبان تاثیر گذار باشد، بررسی‌های دقیق‌تر و وسیع‌تری در ارتباط با تنوع ژنتیکی این قارچ می‌بایست در اولویت قرار گیرد. بدیهی است اهمیت دادن به امر تحقیق در زمینه تنوع ژنتیکی این قارچ می‌تواند زمینه را برای مدیریت بهتر بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال فراهم سازد. همچنین تلفیقی از آزمون‌های دقیق مولکولی، همچون تجزیه AFLP به همراه انجام تلاقی‌های جنسی با استفاده از جدایه‌های استاندارد اعضاء گونه کمپلکس *G. fujikuroi* به منظور شناخت مولکولی و بیولوژیکی دقیق‌تر دو جدایه *Fusarium sp.* که بیشترین تفاوت ژنتیکی را با جدایه‌های *F. verticillioides* نشان دادند، در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود.

References

- Abd-Elsalam, K. A., Khalil, M. S., Aly, A. A., and Asran-Amal, A. 2002. Genetic diversity among *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates revealed by UP-PCR and AFLP markers. *Phytopathologia Mediterranea* 41:1-7.
- Abdel-Satar, M. A., Khalil, M. S., Mohmed, I. N., Abd-Elsalam, K. A., and Verreet, J. A. 2003. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. *African Journal of Biotechnology* 2: 51-55.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*, Commonweath Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 385 pp.
- Bujari, J., and Ershad, J. 1993. An investigation on corn- seed mycoflora. *Iranian Journal of Plant Pathology* 29: 23-34 (in Farsi).

- Chulze, S. N., Ramirez, M. L., Torres, A., and Leslie, J. F. 2000.** Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. Applied and Environmental Microbiology 66: 5312-5315.
- Danielsen, S., Meyer, U. M., and Funck Jensen, D. 1998.** Genetic characteristics of *Fusarium verticillioides* isolates from maize in Costa Rica. Plant Pathology 47: 615-622.
- Geiser, D. M., Jimenz Gasco, M. M., Kang, S., Mkalowska, I., Veeraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., and O'Donnell, K. 2004.** FUSARIUM-IDv.1.0: A DNA Sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology 110: 473-479.
- Gerlach, W., and Nirenberg, H. 1982.** The Genus *Fusarium*, A Pictorial Atlas. Mitteilungen Biologischender Bundesanstalt Land-und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 406 pp.
- Ghiasian, S. A., Kord-Bacheh, P., Rezayat, S. M., Maghsood, A. H., and Taherkhani, H. 2004.** Mycoflora of Iranian Maize harvested in the main population area in Iran. Mycopathologia 158: 113-121.
- Gonzalez M., Rodriguez M. E. Z., Jacabo, J. L., Hernandez, F., Acosta, J., Martinez, O., and Simpson, J. 1998.** Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. Phytopathology 88: 292-299.
- Huys, G., Coopman, R., Janssen, P., and Kersters, K. 1996.** High resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. International Journal of Systematic Bacteriology 46: 572-580.
- Leslie, J. F. 1991.** Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). Phytopathology 81:1058-1060.
- Leslie, J. F., and Summerell, B. A. 2006.** The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. First Edition. 388pp.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A., and Ritieni, A. 2004.** Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. Applied and Environmental Microbiology 70: 2254-2262.

- Majer, D., Lewis, B. G., and Mithen, R. 1998.** Genetic variation among field isolates of *Pyrenopeziza brassicae*. *Plant Pathology* 47:22-28.
- Moretti, A., Mule, G., Susca, A., Gonzalez-jaen, M. T., and Logreico, A. 2004.** Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal of Plant Pathology* 110: 601-609.
- Nei, M., and Li, W. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of National Academic Science, (USA)* 76:5269-5273.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Marasas, W. F. O. 1983.** *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification.* Pennsylvania State University, University Park.
- Okhovvat, S.M. 1999.** *Cereal Diseases (Barley, Wheat, Rice, Corn and Sorghum).* Tehran University Publications. 475 pp. (in Farsi).
- Sheldon, J. L. 1904.** A corn mold (*Fusarium moniliforme* n.sp.). *Agricultural Experimental Station of Nebraska. 17th Annual Report* page 23-32.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Zad, J., and Ale-Agha, N. 1986.** A note on the mycoflora of maize in Iran. *Review of Plant Pathology* 55: 3271.
- Zamani, M., and Alizadeh, A. 2000.** Identification of *Fusarium* species causing ear rot of corn in Sari and Karaj. *Iranian Journal of Plant Pathology* 36: 17-29 (in Farsi).