بررســی بیــماری‌زایی و تعیین تیپ آمیزشی در جدایه‌های قارچ *Fusarium proliferatum*

Study of pathogenecity and determination of mating type of *Fusarium proliferatum* isolates

سپیده کریمی‌زنجانی اصل[۱]، وحید رهجو[۲] و مجید زمانی[۳]

دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۲۸

چکیده

گونه *Fusarium proliferatum* یکی از عوامل غالب بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت در اکثر نقاط جهان و به ویژه ایران به‌شمار می‌رود. در این بررسی از بین جدایه‌های فوزاریوم به دست آمده از بلال‌های آلوده، دوازده جدایه به‌عنوان گونه *F. proliferatum* شناسائی شدند. به‌منظور بررسی جمعیت آمیزشی و تعیین تیپ آمیزشی، جدایه‌ها با تسترهای استاندارد این گونه روی محیط کشت هویج آگار تلاقی داده شدند و به مدت ۳ تا ۴ هفته در انکوباتور با نور دائم سفید و نزدیک به ماوراء بنفش نگهداری شدند. این آزمون دو بار و هر بار در سه تکرار انجام شد. در این آزمون همه جدایه‌هائی که از نظر مورفولوژیکی مورد شناسائی قرار گرفته بودند از نظر جمعیت آمیزشی مورد تایید قرار گرفتند به‌طوری که همه دوازده جدایه *F. proliferatum* متعلق به جمعیت آمیزشی D بودند. هفت جدایه دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT* – 1 (با فراوانی ۵۸/۳ ٪) و پنج جدایه دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT*– 2 (با فراوانی ۴۱/۷ ٪) بودند. تنوع بیمـاری‌زایی دوازده جـدایه در ساقـه لاین حساس MO17 با سـه روش مزرعـه ای، گلخانه‌ای و آزمایشگاهی در سه تکرار انجام و بیماری‌زایی آن‌ها با اندازه‌گیری طول نکروز در محل زخم ارزیابی شد. در آزمون بیماری‌زایی روی ساقه، در مزرعه، گلخانه و آزمایشـگاه به ترتیب جـدایه‌های SK27، SK32 و SK24 بیش‌ترین شدت بیماری (طول نکروز در بافت ساقه) را از خود نشان دادند.

واژگان کلیدی: ذرت، *Fusarium proliferatum*، تنوع بیماری‌زائی، تیپ آمیزشی.

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین

۲ و ۳- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای ،کرج

نویسنده مسئول مکاتبات: **vrahjoo@yahoo.com**

مقدمه

قارچ فوزاریوم اولیـن بار در سال ۱۸۰۹ توسـط لینک شناسایی و مورد بررسی قـرار گرفت، این قارچ دارای گونه‌های فراوانی است و می‌تواند بیماری‌های مهمی را روی میزبان‌های مختلف ایجاد کند. بیماری پوسیدگی فـوزاریومی بلال ذرت یکی از مهـم‌ترین بیمـاری‌های ذرت محسـوب می‌شود که در سـراسـر جهـان بـه خصـوص در مناطق گرمسیـری و نیمـه گرمسیری گسترش دارد (Mc Gee, 1988). از مهـم‌ترین گـونه‌های عامـل این بیمـاری قـارچ فـوزاریـوم، *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg است که تلئـومـورف آن *Gibberella intermedia* (Kuhlman) Samuels, Nirenberg & Seifert می‌باشـد. این گـونه دامنـه میـزبانی وسیعی دارد و از محصولاتی مانند جو، گندم، برنج، نیشکر، یولاف و ذرت جداسازی شده است (امیرعبدالهیان، ۱۳۸۸).

این قارچ جزو قارچ‌های هتروتالیک است و سیستم آمیزشی دو قطبی دارد (Chulze *et al*., 2000). قارچ *Fusarium proliferatum* اولین بار از ایران در فارس گزارش شد. وقوع این بیماری در درجه اول به شرایط محیطی بستگی دارد. در اروپا *Fusarium proliferatum* بیش‌تر در مناطق گرم و خشک مانند ایتالیا و اسپانیا دیده می‌شود (Logrieco *et al*., 1995, Jurrado *et al*., 2006). این قارچ تولید مایکوتوکسین‌های مختلفی مانند فوزاریک اسید (Fusaric acid) و مشتقات آن، انـواع فوزارین بەویژه فوزارین C، انواع فـومـونیسین (Fumonisin) که خطرناک‌ترین آن‌ها نوع Fumonisin B1 می‌کند که علاوه بر گیاهان برروی حیوانات و انسان‌ها نیز موثر، و تعدادی بسیار خطرناک هستند. توکسین‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی بلال ذرت ترکیبات سمی مانند فوزارین‌ها، اسید فوزایک و مونیلی فورمین را تولید می‌کنند (صارمی، ۱۳۷۹). با توجه به‌این که دانه‌های بدون علائم ظاهری هم ممکن است به قارچ عامل بیماری آلوده باشد لذا از نظر سلامت غذایی (Food – safety) این بیماری دارای اهمیت ویژه‌ای است و کنترل اقتصادی آن یک امر مهم و حیاتی می‌باشد (Warfield and Davis, 1996).

به‌منظور شناسائی گونه‌های فوزاریوم جدا شده از بافت بیمار میزبان‌های مختلف عمدتا از روش شناسائی مورفولوژیکی گونه‌ها استفاده می‌شود که مبتنی بر برخی صفات میکروسکوپی و ماکروسکوپی قارچ می‌باشد (صارمی، ۱۳۸۴). برای شناسائی دقیق گونه‌های متعلق به گونه کمپلکس *G. fujikuroi* نمی‌توان تنها بر این نوع خصوصیات متکی بود. امروزه محققین با تلفیقی از خصوصیات مورفولوژیکی، خصوصیات جمعیت‌های آمیزشی (گونه‌های بیولوژیکی) و همچنین ویژگی‌های مولکـولی و فیلوژنتیـکی، گونه‌های فوزاریوم را مورد بررسی و شنـاسـائی قرار می‌دهند (Summerell *et al*., 2003). براساس ویژگی‌های بیولوژیکی تا کنون ۹ جمعیت آمیزشی در این گونه کمپلکس تعیین شده‌اند که تحت عنوان جمعیت‌های آمیزشی A تا I نامگذاری شده‌اند (Moretti *et al*., 2004). جمعیت آمیزشی گونه *F. proliferatum* که فرم جنسی آن *G. intermedia* می‌باشد در جمعیت آمیزشی D قرار دارد. طی بررسی‌های دانیلسن و همکاران (Danielson *et al*., 1998) روی تیپ آمیزشی ۳۹ جدایه از جمعیت آمیزشی A گونه کمپلکس *G. fujikuroi* به دست آمد که از بذر ذرت در کاستاریکا، تعداد ۲۳ جدایه $MAT-1$ و ۱۶ جدایه $MAT-2$ تشخیص داده شدند (Chulze *et al*., 2000).

لزلی (Leslie, 1991) نیز تعداد ۱۳۵ جدایه متعلق به جمعیت آمیزشی D از گونه کمپلکس *G. fujikuroi* را مورد بررسی قرار داد و نتایج حاصل از تلاقی این جدایه‌ها با جدایه‌های استاندارد نشان داد که ۷۲ جدایه دارای تیپ آمیزشی از نوع $MAT-1$ و ۶۳ جدایه دارای تیپ آمیزشی از نوع $MAT-2$ بودند.

در یک تحقیق که روی تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌های *Fusarium verticilliodes* در ایران انجام شد، مشخص گردید که کلیه ۵۵ جدایه مورد استفاده در آزمون تیپ آمیزشی پس از تلاقی با جدایه‌های تستر به صورت تیپ آمیزشی $MAT-2$ تعیین شدند (میرزادی‌گوهری، ۱۳۸۵).

در تحقیقـی دیگر ۴۱ جـدایه به دست آمده از ارقام مختلف برنج مربوط به گونه‌های *Fusarium proliferatum* *F. verticilliodes* و *F. fujikuroi* از نظر باروری جنسی و تعیین جمعیت و تیپ آمیزشی آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند. هر یک از جدایه‌ها با شش جدایه ماده بارور نماینده استاندارد از سه جمعیت آمیزشی A، C و D روی

محیط غذایی هویج آگار (CA) در آزمایشگاه تلاقی داده شدند در نتیجه، ده جدایه در جمعیت آمیزشی A، دو جدایه در جمیعت آمیزشی C (*F. fujikuroi*) و ۲۹ جدایه در جمعیت آمیزشی D (*F. proliferatum*) گروه‌بندی شدند. تمام جدایه‌های *F. verticillioides* متعلق به تیپ آمیزشی *MAT*A – 1 و تمام جدایه‌های *F. fujikuroi* متعلق به تیپ آمیزشی *MAT*C–1 بودند، در حالی که هر دو تیپ آمیزشی *MAT*D – 1 و *MAT*D–2 برای جدایه‌های *F. proliferatu*m شناسایی شدند (لطفی‌میری و همکاران، ۱۳۸۹).

در تحقیقات دیگری که در این زمینه در داخل کشور انجام شد می‌توان به نتایج تحقیقی که توسط محمدیان و همکاران (۱۳۸۹) صورت گرفت اشاره نمود که بر اساس تلاقی ۳۰ جدایه از گونه *G. intermedi* به دست آمده از ذرت با جدایه‌های استاندارد، ۱۹ جدایه (۶۳٪) دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT*– 1 و ۱۱ جدایه (۳۷٪) دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT*– 2 بودند. از جدایه‌های حاصل از برنج نیز هفت جدایه دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT*– 1 و پنج جدایه دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT*– 2 بودند.

در ایران عباس‌زاده (۱۳۸۴)، تعداد ۲۳ جدایه از گونه *G. intermedia* به‌دست آمده از گیاه برنج از استان گیلان را به‌منظور بررسی وضعیت باروری جنسی و تعیین پراکنش آلل‌های تیپ آمیزشی مورد بررسی قرار داد. نتایج حاکی از آن بود که هشت جدایه دارای باروری جنسی بوده و آلل‌های تیپ آمیزشی *MAT*– 2 تشخیص داده شدند.

آزمون‌های بسیاری در داخل و خارج از کشور روی بیماری‌زائی جدایه‌های *F. proliferatum* جدا شده از ذرت در شرایط گلخانه‌ای یا مزرعه‌ای صورت گرفته است. آزمایش‌های بیماری‌زایی انجام شده توسط عظیمی (۱۳۸۹) در بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های پوسیدگی فوزاریومی بلال به روش ایجاد زخم در بلال (Nail Punch) حاکی از بیماری‌زا بودن جدایه‌های جمع‌آوری شده در استان خوزستان بود و نشان داد که بیش‌ترین میزان بیماری‌زایی مربوط به جدایه‌های گونه *F. verticillioides* و کم‌ترین میزان بیماری‌زایی متعلق به جدایه‌های گونه *F. proliferatum* جدا شده از بلال‌های آلوده می‌باشد. پرچمیان و همکاران (۱۳۸۹) نیز در بررسی اختلاف بیماری‌زایی ۳۲ جدایه *F. verticillioides* و دو جدایه *F. proliferatum* به روش خلال دندان (Tooth pick) در گلخانه دریافتند که چهار جدایه از گونه *F. verticillioides* میزان بیماری‌زایی بالاتری را به خود اختصاص دادند. نتایج به دست آمده توسط داوودی و مهریان نیز (۱۳۸۳) در منطقه قزوین حاکی از این نتایج بود. در تحقیقی که توسط کوماگان و همکاران (Cumagun *et al*., 2011) در فیلیپین انجام شد قدرت تهاجمی ۱۶ جدایه *F. verticillioides* در آزمون‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای روی رقم حساس ذرت شیرین مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج این آزمون‌ها نشان داد که بین جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری در هر دو آزمون وجود داشت ولی همبستگی بین نتایج دو آزمون متوسط ارزیابی گردید به‌منظور ارزیابی تنوع بیماری‌زائی جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* جدا شده از بذر ذرت از روش‌های مایه‌زنی ساقه ذرت در مزرعه (Bacon *et al*., 1996) و نیز در گلخانه (Danielsen *et al*., 1998) استفاده شده است.

تحقیقات انجام شده در کشورهایی مانند چین، کرواسی و آلمان نشان می‌دهد که قارچ *F. verticillioides* در این کشورها به‌عنوان گونه غالب پوسیدگی بلال معرفی و این گونه نسبت به گونه‌های دیگر از توانایی بیماری‌زایی بیش‌تری برخوردار است (Pan and Zhang, 1992; Goertz *et al*., 2010). گزینش دقیق در بین جدایه‌ها برای انتخاب مهاجم‌ترین جدایه ضروری است تا عمل مایه‌زنی برای برنامه‌های اصلاحی درست انجام شود (Reid and Zhu, 2002; Iglesiase *et al*., 2010).

آگاهی از خصوصیات قارچ‌های بیمارگر گیاهان می‌تواند در کنترل آن‌ها و مبارزه علیه خسارات احتمالی موثر واقع گردد. با شناخت بیش‌تر از قدرت بیماری‌زائی و تهاجمی قارچ و نیز پتانسیل تولید مثل جنسی، آگاهی از وضعیت باروری جدایه‌ها و تعیین تیپ آمیزشی آن‌ها آگاهی بیش‌تری از قارچ‌های فوزاریوم حاصل خواهد شد که می‌تواند در ارائه راهکارهای مدیریتی مورد استفاده قرار گیرد.

این تحقیق به منظور تعیین تیپ آمیزشی و تنوع بیماری‌زائی تعدادی از جدایه‌های*F. proliferatum* جدا شده از ذرت انجام شد.

مواد و روش‌ها

تشخیص گونه بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی در میان اعضاء گونه کمپلکس *G . fujikuroi* برای متخصصین رشته بیماری‌شناسی امری مشکل می‌باشد (Summerell *et al*., 2003; Leslie and Summerell, 2006). بنابراین استفاده از دیگر خصوصیات نظیر تعیین جمعیت آمیزشی و استفاده از صفات باروری جنسی برای آزمون جمعیت آمیزشی گونه‌ها و تعیین گونه بیولوژیکی یکی از روش‌های تکمیلی مهم در شناسایی این گونه‌ها به شمار می‌رود. در این تحقیق از روش‌های مورفولوژیکی و بیولوژیکی جهت شناسایی دقیق‌تر عامل بیماری استفاده شد.

به‌منظور مطالعه باروری جنسی و تعیین تیپ آمیزشی (Mating type) و بررسی بیماری‌زایی دوازده جدایه از گونه قارچ *Fusarium proliferatum* عامل پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ از مزارع مختلف ذرت‌کاری شهرهای ساری و کرج نمونه‌های آلوده به فوزاریوم جمع‌آوری و مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند. برای تعیین تیپ آمیزشی، جدایه‌های *Fusarium proliferatum* جدا شده از ذرت با جدایه‌های آزمایشگر استاندارد (Tester) با تیپ آمیزشی مشخص اَعضا گونه کمپلکس *G. fujikuroi* به‌عنوان والدین ماده برروی محیط کشت هویج – آگار (Carrot Agar) تلاقی داده شدند.

این جدایه‌های استاندارد از آزمایشگاه قارچ شناسی پروفسور Moretti دانشگاه Bary کشور ایتالیا تهیه شده بودند و هم اکنون در کلکسیون قارچ‌شناسی بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه اصلاح و بذر نگهداری می‌شوند. مشخصات این جدایه‌ها در جدول ۱ ذکر شده است. با تشکیل پریتسیوم‌های محتوی آسک و آسکوسپورهای جدایه‌های قارچ عامل بیماری، شناسائی گونه (جمعیت آمیزشی) و نوع تیپ آمیزشی گونه تعیین گردید.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های آزمایشگر استاندارد گونه *F. proliferatum* مورد استفاده برای آزمون‌های تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌های مزرعه‌ای

Table 1. The specification of standard testers *F. proliferatum* to determine the mating type of field isolates

کد جدایه Isolate code	جمعیت آمیزشی Mating population	تیپ آمیزشی Mating type	فرم جنسی Sexual stage	فرم غیرجنسی Asexual stage
7596	D	*MATD*– 1	*Gibberella intermedia*	*F. proliferatum*
7595	D	*MATD*– 2	*Gibberella intermedia*	*F. proliferatum*

بدین منظور ابتدا محیط هویج – آگار تهیه شد و پس از تهیه محیط کشت CA، قطعه کوچکی به قطر حدود پنج میلی‌متر از حاشیه کلنی جدایه‌های نماینده استاندارد، که جدیداً کشت داده شده بودند، به محیط کشت هویج – آگار (CA) انتقال داده شد. جدایه‌های نماینده استاندارد به عنوان والد ماده و جدایه‌های *Fusarium proliferatum* جمع‌آوری شده از مزرعه به‌عنوان والد نر در نظر گرفته شدند. هم‌زمان با کشت جدایه‌های نماینده استاندارد، جدایه‌های مزرعه‌ای که بیش از دو تا سه روز از کشت آن‌ها نمی‌گذشت، مجدداً درون تشتک‌های پتری ۶ سانتی‌متری که حاوی محیط PDA بودند کشت داده شدند و همراه با جدایه‌های نماینده استاندارد کشت داده شده در محیط کشت CA در انکوباتور با شرایط تاریکی و دما ۲۵°C به مدت یک هفته نگهداری شدند. پس از گذشت یک هفته محلول ۰/۲۵-۰/۲ درصد توین ۲۰ (Tween 20) تهیه شد و به مقدار سه تا پنج میلی‌لیتر به محیط‌های حاوی جدایه‌های مزرعه‌ای اضافه گردید و سوسپانسیون اسپور تهیه شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده روی تشتک‌های پتری حاوی جدایه‌های نماینده استاندارد ریخته شدند و با یک میله شیشه‌ای خمیده با

زاویه ۹۰ درجه و یا لوپ سترون روی محیط کشت CA حاوی جدایه‌های نماینده استاندارد کشیده، پس از آن تشتک‌ها به انکوباتور و یا ژرمیناتور با شرایط روشنایی دائِم به صورت تلفیقی از نور سفید و سرد (Cool white) و نزدیک به ماوراء بنفش (near-UV) با طول موج۴۰۰-۳۲۰ نانومتر و دمای $^{\circ}C$ ۳۲-۲۲ با رطوبت کافی منتقل و حدود ۲-۱ ماه در این شرایط نگهداری شدند.

برای اطمینان از صحت نتایج به دست آمده از تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌های *Fusarium proliferatum*، جدایه‌های نماینده استاندارد را که به‌عنوان والد ماده در نظر گرفته شده بودند (تسترها)، به‌عنوان شاهد مثبت و منفی با هم تلاقی داده شدند یعنی یک بار $MAT-1$ با $MAT-1$ و یک بار هم $MAT-1$ را با $MAT-2$ تلاقی داده شد. این آزمایش‌ها بر اساس روش کلینچ و لزلی (Klittich and Leslie, 1988) انجام شد.

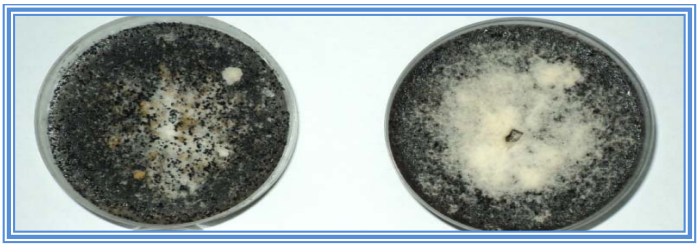
آزمون بیماری‌زایی به منظور اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *F. proliferatum* جدا شده از بلال ذرت و همچنین مقایسه و بررسی تنوّع بیماری‌زایی در مزرعه، آزمایشگاه و گلخانه روی لاین حساس ذرت MO17 انجام شد. در آزمون بیماری‌زایی در مزرعه روی ساقه ذرت، از روش خلال دندان‌های آلوده به قارچ (Tooth picks) روی رقم حساس MO17 با دوازده جدایه از *F. proliferatum* به همراه دو شاهد (یک شاهد با مایه‌زنی با آب مقطر استریل و شاهد دیگر بدون مایه‌زنی) و در سه تکرار استفاده شد. تمام این آزمون‌ها در موسسه تحقیقات اصلاح تهیه نهال و بذر کرج انجام شد. برای تهیه مایه تلقیح (زادمایه) جدایه‌ها در این روش، از محیط کشت PDB و خلال دندان استفاده شد. در این روش ابتدا خلال دندان‌ها را ۵ تا ۶ مرتبه در آب جوشانده تا مواد فنـلی آن‌ها خارج شوند. پس از خشک شدن خلال‌های دندان آن‌ها را درون لوله‌های آزمایش قرار داده (برای هر جدایه در هر تکرار شش خلال دندان در نظر گرفته شد) و حدود دو سانتی‌متر از انتهای خلال‌ها، درون لوله حاوی محیط PDB که قبلاً تهیه شده بود، قرار داده و درب لوله‌ها با مقداری پنبه و فویل آلومینیوم پوشانده شد. لوله‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدّت ۲۰ دقیقه سترون شدند. بعد از سترون کردن لوله‌های حاوی محیط PDB، آن‌ها را زیر هود سترون منتقل کرده و در آن جا، سوسپانسیون اسپور جدایه‌ها با غلظت ^{5}۱۰ کنیدیوم در میلی‌متر، به میزان ۲۰ میلی‌لیتر داخل لوله‌ها اضافه شدند. بعد از انجام این مراحل لوله‌ها در انکوباتور به مدّت ۱۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند تا تمام سطح خـلال‌ها از میسلیـوم جدایه‌ها پوشانده شوند. در آزمون بیمـاری‌زایی در مزرعـه، روش کار بدین صـورت بود که ساقه‌های گیـاه ذرت در ارتفاع ۵ تا ۱۰ سانتی‌متری از سطح خاک و مابین دو میان گره توسط یک میخ خیلی نازک سوراخ شدند و سپس خلال‌های دندان آلوده به هر یک از جدایه‌های قارچ به‌طور جداگانه در درون حفره ایجاد شده در ساقه گیاه، قرار داده شد و آلودگی به صورت مصنوعی صورت گرفت. به‌منظور ارزیابی شدت بعد از گذشت دو ماه از مایه‌زنی ساقه های ذرت، آن‌ها را با داس بریده و به آزمایشگاه منتقل کرده و سپس با یک چاقوی تیز ساقه‌ها را از مرکز به صورت عمودی به دو نیم بریده و شدت بیماری (DS%) بر اساس طول نکروز و تغییر رنگ بافت مغز ساقه محاسبه شد. به این صورت که با یک خط‌کش طـول نکـروز ایجـاد شده بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از آن یادداشت و داده‌های حاصل مـورد تجـزیه واریـانس قـرار گرفتند. در آزمـون بیمـاری‌زایی جـدایـه‌ها در گلخـانه نیز تعـداد دوازده جـدایه از *F. proliferatum* به همراه دو تیمار شاهد که یکی با مایه‌زنی با آب مقطر سترون و دیگری بدون مایه‌زنی (۱۴ تیمار) بودند. روی لاین حساس MO17 در یک آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر جدایه در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این آزمون از بذرهای لاین MO17 که نسبت به بیماری پوسیدگی بلال ذرت حساس است استفاده شد. بذرهای انتخاب شده پس از ضدعفونی و از بین بردن آلودگی‌های سیستمیک و داخلی (قرار دادن به مدت ۵ دقیقه در آب گرم در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) و خشک کردن در گلدان‌های کوچک حاوی ماسه‌بادی سترون شده توسط دستگاه اُتوکلاو، کشت داده شده و پس از دو هفته که گیاهچه‌های سالم رشد مناسبی کردند به گلـدان‌های اصلـی (حاوی خاک مزرعه و ماسه‌بادی و خاک برگ به نسبت مساوی) انتقال داده شدند. بعد از هشت تا ده هفتـه از رشد گیاهچـه‌های ذرت مایه‌زنی ساقه‌ها با استفـاده از خـلال دندان‌های آلـوده به قـارچ (Tooth picks) در گلخانه انجام شد. ساقه‌های گیاه ذرت در ارتفاع ۵ سانتی‌متری از سطح خاک در گلدان

توسط یک میخ خیلی نازک سوراخ شدند و سپس با استفاده از خلال‌های دندان آلوده به هر یک از جدایه‌های قارچ *F. proliferatum* به درون حفره ایجاد شده در ساقه گیاهچه آلودگی مصنوعی انجام شد. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۱۸ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ده روز نگهداری شدند (Danielsen *et al.*, 1998). جهت ارزیابی شدت بیماری‌زایی در گلخانه، ده روز بعد از مایه زنی ساقه‌های گیاه ذرت، ساقه‌های مایه‌زنی شده با چاقوی تیزی بریده شده و به صورت طولی و از مرکز ساقه به دو نیم شد. شدت بیماری (Disease severity) ساقه‌های آلـوده به روش دانیلسـن و همـکاران (Danielsen *et al.*, 1998) بر اساس طول ناحیـه زخـم بر حسب میلی‌متر و میزان نکروز ایجاد شده بر حسب میلی‌متر ارزیابی شد. در آزمایشگاه نیز از روش ساقه‌های بریده شده (Detached stem) برای اثبات بیماری‌زایی، دوازده جدایه به همراه دو شاهد مایه‌زنی با آب مقطر سترون و بدون مایه‌زنی در سه تکرار و در قالب طرح کامل تصادفی، استفاده شد. در این آزمون از ساقه‌های بریده شده از رقم حساس MO17 استفاده شد. برای انجام این آزمون ساقه بوته‌های ذرت در مرحله گل‌دهی، در اندازه‌های ۲۰ سانتی‌متری و داشتن دو میان گره بریده شدند به آزمایشگاه انتقال یافتند. ساقه‌های بریده شده با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند، سپس با یک میخ نازک سترون بین دو میان گره سوراخ شده و خلال‌های دندان آغشته به قارچ در سوراخ ایجاد شد قرار داده شدند. اَرزیابی شدت بیماری در آزمایشگاه، ساقه‌های مایه‌زنی شده نیز همانند روش ذکر شده در آزمون گلخانه‌ای انجام شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری شدت بیماری مورد تجزیه واریانس قرارگرفتند و جدایه‌ها از نظر شدت بیماری به روش دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

آزمون تعیین تیپ آمیزشی

جدایه‌های گونه *F. proliferatum* پس از گذشت سه الی چهار هفته نگهداری در تشک‌های پتری حاوی تلاقی جدایه‌ها با جدایه‌های نماینده استاندارد این گونه، با تهیه اسلایدهای میکروسکوپی از پریتسیوم‌های تشکیل شده و مشاهده آن‌ها زیر میکروسکوپ از تولید مثل جنسی آن‌ها اطمینان حاصل شد. پس از مایه‌زنی کشت والد ماده با استفاده از سوسپانسیون غلیظ اسپور والد نر، پریتسیوم‌ها به صورت نقاط سیاه رنگ کوچک روی محیط کشت CA تشکیل شدند (شکل ۱). بعد از گذشت چهار تا شش هفته بعد از مایه‌زنی، آسکوسپورهای کامل در پریتسیوم‌ها تشکیل شدند و با تهیه اسلاید و شکافتن آسکوکارپ آن‌ها روی اسلایدهای میکروسکوپی، آسک‌ها و آسکوسپورهای قارچ به خوبی مشاهده شدند. این نتایج نشان‌دهنده آن بود که همه جدایه‌های *F. proliferatum* آزمایش شده عضو جمعیت آمیزشی D از گونه کمپلکس *G. fujikuroi* بوده و بدین ترتیب شناسایی مورفولوژیکی این جدایه‌ها به کمک تسترهای استاندارد این گونه مورد تایید قرار گرفت.

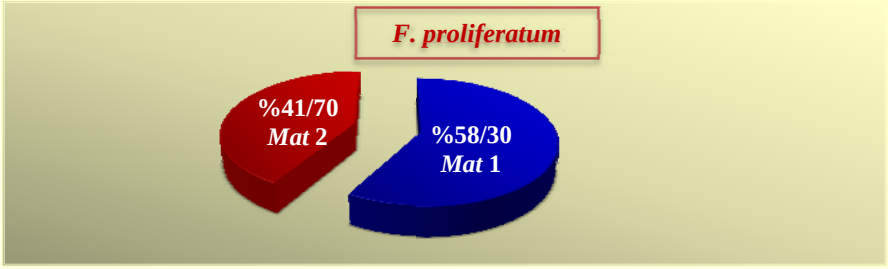


شکل ۱– تشکیل پریتسیوم (به صورت نقاط سیاه رنگ کوچک) یکی از جدایه‌های *F. proliferatum* روی محیط کشت A پس از دو هفته نگهداری در انکوباتور (سمت چپ) و تشکیل پریتسیوم‌ها در شاهد مثبت جمعیت آمیزشی D (سمت راست) (عکس اصلی)

Fig. 1. Preithecium formation (as small black points) of a *Fusarium proliferatum* on CA medium after two weeks of Incubation (left) and Preithecium formation in the presence of positive venereal population (right)

نتایج به‌دست آمده از تلاقی دوازده جدایه از *Fusarium proliferatum* به‌عنوان والد نر، با جدایه‌های استاندارد به‌عنوان والد ماده (تسترها)، حاکی از آن بود همه جدایه‌ها نر بارور بوده و قادر به تشکیل پریتسیوم روی جدایه‌های

استاندارد با تیپ آمیزشی مشخص بودند. در مجموع از بین دوازده جدایه مورد آزمون، هفت جدایه دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT* – 1 بودند یعنی روی جدایه‌های استاندارد دارای تیپ آمیزشی مخالف (*MAT* – 2) تشکیل پریتس دادند و پنج جدایه نیز دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT* – 2 بودند یعنی روی جدایه‌های استاندارد دارای تیپ آمیزشی مخالف (*MAT* – 1) تشکیل پریتس دادند. به عبارت دیگر ۵۸/۳ درصد جدایه‌ها از نوع *MAT* – 1 تشخیص داده شدند و ۴۱/۷ درصد جدایه‌ها از نوع *MAT* – 2 بودند (شکل ۲). این نتایج در هر سه تکرار آزمایش در مورد همه جدایه مورد تایید قرار گرفت. همچنین نمونه‌هائی که به عنوان شاهد مثبت (تلاقی تیپ‌های آمیزشی مخالف برای تستر گونه که شامل تلاقی *MAT* – 1 با *MAT*–2) و شاهد منفی (تلاقی تیپ‌های آمیزشی یکسان برای تستر گونه که شامل تلاقی *MAT* – 1 با *MAT*–1 و نیز *MAT*– 2 با *MAT*– 2) در این آزمون‌ها مورد استفاده قرار گرفتند همگی صحت و درستی آزمون را مورد تایید قرار دادند.



شکل ۲- فراوانی تیپ‌های آمیزشی تعیین شده درجدایه‌های گونه *F. proliferatum*

Fig. 2. Frequency of mating types determined in isolates of *Fusarium proliferatum*

شناسایی گونه *F. proliferatum* بر اساس مشخصات داده شده توسط نلسون و همکاران (Nelson *et al*., 1983)، بورگس و همکاران (Burgess *et al*., 1994) و لزلی و سومرل (Leslie and Summerell, 2006) نیز انجام شد که نتایج گونه *F. proliferatum* را برای تمام جدایه‌ها تایید کرد.

در تحقیقاتی که براساس تلاقی ۳۰ جدایه از گونه *F. proliferatu*m با فرم جنسی *G. intermedia* با جدایه‌های استاندارد تیپ آمیزشی توسط محمّدیان (۱۳۸۹) انجام شده بود، نتایج مبین این بود که ۱۹ جدایه از ذرت (۶۳٪) دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT* – 1 و ۱۱ جدایه از ذرت (۳۷٪) دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT* – 2 بودند. در گیاه برنج نیز بررسی دوازده جدایه این قارچ نشان داد که هفت جدایه دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT* – 1 و پنج جدایه دارای تیپ آمیزشی از نوع *MAT* – 2 بودند (لطفی میری و همکاران، ۱۳۸۹). این نتایج نشان می‌دهد که به‌طور کلی تیپ آمیزشی *MAT* – 1 در گیاهانی نظیر ذرت و برنج بیش‌تر از تیپ آمیزشی *MAT* – 2 هستند. که با نتایج این گزارش مشابه است.

در بررسی‌های دانیلسن و همکاران (Danielson *et al*., 1998) روی تیپ آمیزشی ۳۹ جدایه از جمعیت آمیزشی A گونه کمپلکس *G. fujikuroi* به‌دست آمده از بذرهای ذرت در کاستاریکا، تعداد ۲۳ جدایه *MAT* – 1 و ۱۶ جدایه *MAT* – 2 تشخیص داده شدند. از این منظر نیز نتایج به‌دست آمده با نتایج تحقیق حاضر یکسان بود.

آزمون تنوع بیماری‌زائی جدایه‌ها

علائم بیماری پس از آلوده سازی مصنوعی ساقه‌های لاین حساس MO17 در مزرعه با روش خلال دندان‌های آلوده به جدایه‌های قارچ پس از ۱۶-۱۰ روز روی ساقه‌های آلوده شده به صورت نکروز ایجاد شده در مغز ساقه مشاهده شد (شکل ۳). تمام جدایه‌ها قادر به ایجاد بیماری روی لاین حساس MO17 بودند، اما از نظر قدرت بیماری‌زایی بین جدایه‌ها تفاوت وجود داشت. بین جدایه‌ها از نظر شدت بیماری (طول نکروز) اختلاف معنی‌دار در

سطح ۱٪ وجود داشت و جدایه‌ها از این نظر با هم متفاوت بودند. میانگین طول نکروز بین جدایه‌ها از ۲۵/۶ تا ۴۷/۶ میلی‌متر متغیر بود (جدول ۲). بیش‌ترین میزان شدت بیماری مربوط به جدایه SK27 با میزان ۴۷/۶ درصد و کم‌ترین میزان شدت بیماری مربوط به SK33 با میزان ۲۵/۶ درصد بود. بررسی شدت بیماری‌زایی ایجاد شده توسط جدایه‌ها روی لاین حساس MO17 در مزرعه حاکی از آن است که از نظر شدت بیماری‌زایی بین جدایه اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

شکل۳- تنوع در طول نکروز ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف *Fusarium proliferatum* در مقایسه با شاهد (سمت راست) روی ساقه‌های بریده شده لاین حساس ذرت MO17 در گلخانه (عکس اصلی)

Fig. 3. Variation in necrosis length on stalks of susceptible maize line Mo17 induced by different isolates of *Fusarium proliferatum* in greenhouse compared with check plants (right) (Original phopto)

آشناگر (۱۳۹۰) در بررسی‌های خود گزارش کرد که نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی گونه *F. verticillioides* در مزرعه روی ساقه حاکی از آن بود که بین جدایه‌ها از نظر شدت بیماری و درصد آلودگی اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشته و دامنه شدت بیماری از ۱۳/۳۳٪ تا ۴۲٪ متغیر بود که با نتایج این آزمون مطابقت دارد. در این رابطه کوهلر و هلبرت (Koehler and Holbert, 1930) مشاهده کردند که پوسیدگی ساقه باعث متلاشی شدن بافت‌ها به صورت بی‌قاعده می‌شود که این مشاهدات نتایج این آزمایش را تائید می‌کند.

نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *F. proliferatum* در گلخانه نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر طول نکروز در ساقه، اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد و جدایه‌ها از این نظر با هم متفاوت بودند. از میان جدایه‌های مورد استفاده در این آزمون جدایه SK32 بیش‌ترین طول نکروز و جدایه SK31 کم‌ترین طول نکروز را داشتند (جدول ۲). میانگین طول نکروز ایجاد شده توسط جدایه‌های قارچ عامل بیماری در آزمون گلخانه‌ای از ۲۰/۶ تا ۳۴ درصد در جدایه‌ها متفاوت بود. در این روش شش جدایه بیش‌ترین شدت بیماری را داشتند که میزان طول نکروز آن ها از ۲۸٪ بالاتر بود و به‌عنوان جدایه-های برتر بیماری‌زا شناخته شدند. پرچمیان و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی اختلاف بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* جدا شده از ذرت در گلخانه با استفاده از روش خلال دندان‌های آلوده به قارچ عامل بیماری، نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌ها از نظر میزان توان بیماری‌زایی روی ساقه ذرت وجود داشت. آن‌ها گزارش دادند که از میان ۳۶ جدایه، چهار جدایه از قارچ *F. verticillioides* بالا-ترین شدت بیماری را نسبت به سایر جدایه‌ها نشان دادند. در یک تحقیقی که توسط کوماگان و همکاران (Cumagun *et al*., 2011) در فیلیپین انجام شد قدرت تهاجمی ۱۶ جدایه *F .verticillioides* در آزمون‌های گلخانه‌ای و مزرعه روی رقم حساس ذرت شیرین مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند، نتایج این آزمون‌ها نشان داد که بین جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری در هر دو آزمون مشاهده می‌شود ولی همبستگی بین نتایج دو آزمون متوسط ارزیابی گردید.

در آزمایش بیماری‌زایی جدایه‌های *F. proliferatum* در آزمایشگاه نیز نتایج به دست آمده نشان داد که بین جدایه-ها از نظر شدت بیماری‌زایی درسطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد و جدایه‌های *F. proliferatum* از نظر میزان طول نکروز ساقه با یک دیگر تفاوت داشتند. در این آزمایش دامنه طول نکروز ساقه بیـن ۲۸/۳ تا ۴۶/۷ میلی‌متر متغیر بود

جدول ۲- مقایسه میانگین طول نکروز ایجاد شده توسط جدایه‌های *F. proliferatum* روی ساقه‌های بریده شده لاین حساس ذرت MO17 در آزمون های مزرعه‌ای، گلخانه‌ای و آزمایشگاهی

Table 2. Mean comparison of necrosis length on stalks of maize susceptible line Mo17 induced by different isolates of *Fusarium proliferatum* in field, greenhouse and laboratory tests

	Necrosis length (mm) طول نکروز		
جدایه	مزرعه	گلخانه	آزمایشگاه
Isolate	Field	Greenhouse	Laboratory
SK22	30.3 n	24.6 fg	31.6 ghi
SK23	37.6 n e - h	27.3 de	38.3 def
SK24	46.3 abc	30.0 cd	46.7 b
SK26	34.6 g-j	28.0 d	38.3 def
SK27	47.6 ab	23.6 fg	41.6 bcd
SK28	31.0 jk	28.3 d	36.6 d-g
SK29	36.3 f-i	23.0 fgh	28.3 ij
SK30	45.6 abc	33.0 ab	46.6 b
SK31	33.0 i-k	20.6 ij	38.3 def
SK32	31.3 jk	34.0 a	31.0 hi
SK33	25.6 l	24.0 fg	41.6 bcd
SK34	40.0 def	29.6 cd	39.3 cde
Control 1	10.3m	1.3 m	19.6 k
Control 2	0n n	0 n	0 l

Control 1: Inoculation with distilled water
Control 2: No inoculation

میانگین‌ها در هر ستون با حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

Means with similar letters in each column are not significantly different.

با توجه به نتایج به دست آمده از جدول مقایسه میانگین شدت بیماری (جدول ۲)، بیش‌ترین طول نکروز مربوط به جدایه SK24 بود و جدایه SK29 نسبت به جدایه‌های دیگر کم‌ترین طول نکروز را داشت. در این آزمون مشاهده گردید که جدایه‌های این گونه از قدرت بیماری‌زایی نسبتاً بالایی برخوردارند. در یک بررسی بیماری‌زایی توسط فرهمنـد (۱۳۹۱) با دو روش ایجـاد زخـم در بلال (Nail punch) در مزرعـه، و روش سـاقه‌های جـدا شده (Detached stem) در آزمایشگاه بیماری‌زایی جدایه-های *F. verticillioides* مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج آن‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌ها از نظر بیماری‌زایی در دو روش مذکور وجود داشت. در این تحقیق

هفت جدایه بال‌اترین ویرولانس را نسبت به سایر جدایه‌ها از لحاظ بیماری‌زایی نشان دادند. در ضمن همبستگی معنی‌داری بین دو روش آزمایشگاهی و مزرعه‌ای به ترتیب به میزان r =0.71 و r = 0.77 برای درصد آلودگی (%DI) و شدت بیماری (%DS) تعیین شد. نتایج همبستگی بین آزمون‌های مزرعه‌ای و آزمایشگاهی بیماری‌زائی روی ساقه MO17 در چهارده تیمار موجود حاکی از همبستگی بالا (r = 0.47**) بین دو آزمون بود. این نتایج نشان داد جدایه‌ها هم در آزمایشگاه و هم در مزرعه رفتار نسبتا مشابهی روی ساقه میزبان داشته‌اند به‌طوری که به عنوان مثال در آزمون بیماری‌زایی در آزمایشگاه جدایه‌های SK30 و SK24 بیش‌ترین طول نکروز را نشان دادند در آزمون مزرعه‌ای نیز طول نکروز بیش‌تری داشتند. جدایه‌های SK22 و SK32 که از نظر طول نکروز در مزرعه در سطح پایینی قرار داشتند در آزمون بیماری‌زایی در آزمایشگاه نیز کم‌ترین طول نکروز را از خود نشان دادند. مقایسه نتایج آزمون‌های ارزیابی بیماری‌زائی نشان داد که بین آزمون‌های مزرعه‌ای با گلخانه‌ای (r= 0.97**)، و گلخانه‌ای با آزمایشگاهی (r= 0.94**) نیز همبستگی مثبت و بالائی داشت (جدول ۳).

جدول ۳- ضرایب همبستگی بین طول نکروز روی ساقه ذرت در آزمون‌های مزرعه‌ای، گلخانه‌ای و آزمایشگاهی

Table 3. Correlation coefficents between the necrosis length on maize stalk in field, greenhouse and laboratory tests

Test	آزمون	Laboratory آزمایشگاه	Greenhouse گلخانه	Field مزرعه
Laboratory	آزمایشگاه	1	0.94**	0.97**
Greenhouse	گلخانه	0.94**	1	0.97**
Field	مزرعه	0.97**	0.97**	1

** : Significant at 1% level of probability. ** : معنی دارد در سطح احتمال ۱%.

نتایج آزمون تعیین جمعیت آمیزشی نشان داد که همه جدایه‌های *F. proliferatum* به جمعیت آمیزشی D تعلق داشتند. به عبارتی با این آزمون نتایج شناسائی مورفولوژیکی جدایه‌ها مورد تایید قرار گرفت. نتایج آزمون تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌ها نشان داد در گونه *F. proliferatum* تحت بررسی فراوانی‌های نسبتا یکسانی از دو تیپ آمیزشی مخالف وجود دارد که می‌تواند در شکل‌گیری تولید مثل جنسی و تنوع و نوترکیبی بیش‌تر قارچ موثر باشد. تشخیص گونه در میان اعضای گونه کمپلکس *G. fojikuroi* بر اساس خصوصیات مورفولوژیک امری مشکل می‌باشد بنابراین استفاده از دیگر خصوصیاتی نظیر جمعیت آمیزشی و روش‌های شناسایی مبتنی بر توالی DNA و استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه با دقت بالا در میان اعضای این دو گونه مورد نیاز می‌باشد. جهت ارزیابی قابلیت باروری و تعیین تیپ آمیزشی گونه‌ها به دلیل زمان بردن طولانی می‌توان از روش‌های مولکولی که باعث افزایش کارایی و کاهش زمان لازم برای دستیابی به نتایج شود استفاده برد.

پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات بعدی به منظور بررسی توانایی بیماری‌زایی *F. proliferatum* تعداد بیش‌تری جدایه از میزبان ذرت مورد مطالعه قرار گیرد و از لاین‌هائی با طیفی از حساسیت‌های متفاوت بهره برده شود. همچنین در راستای این تحقیقات بهتر است مطالعات از جنبه‌های دیگری همچون تنوع در تولید با متابولیت‌های ثانویه و مایکوتوکسین‌های این دو گونه از قارچ و نیز تنوع ژنتیکی استفاده شود.

منابع References

آشناگر، ل. ۱۳۹۰. شناسایی عوامل پوسیدگی فوزاریومی بلال و بررسی مقاومت نسبی تعدادی از ارقام رایج ذرت به این بیماری در استان لرستان. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران. ۱۳۶ صفحه .

امیرعبداللهیان، ن.، درویش‌نیا، م.، رضایی‌دانش، ی و عبداللهی‌مندولکانی، ب. ۱۳۸۸. بررسی تاکسونومیکی فوزاریوم‌های مرتبط با غلات در منطقه دامغان. گروه بیماری شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان.

پرچمیان، م.، رهجو، و.، زمانی، م.، پیرنیا، م. و ذهابی، ع. ۱۳۸۹. جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچ عامل پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تهران.

داوودی، ع. و مهریان، ف. ۱۳۸۳. شناسایی عوامل بیماری‌زایی قارچی بلال و دانه ذرت در منطقه قزوین. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تبریز. صفحه ۱۱۵.

صارمی، ح. ۱۳۷۹. بیماریهای گیاهی ناشی از گونه‌های فوزاریوم. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

صارمی، ح. ۱۳۸۴. فوزاریوم، بیولوژی، اکولوژی و تاکسونومی، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۱۵۳ صفحه.

عباس‌زاده ، م. ۱۳۸۴. مطالعه باروری جنسی و تیپ‌های آمیزشی در قارچ *Gibberella fugikuroi* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکرو بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان.

عظیمی، ص. ۱۳۸۹. بررسی پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت در استان خوزستان. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تهران.

فرهمند، ش. ۱۳۹۰. بررسی واکنش هیبریدهای دیررس و متوشط ذرت نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی بلال *Fusarium verticillioides*. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، واحد ورامین – پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین. ۱۲۳ صفحه .

لطفی‌میری،ف.، جوان نیکخواه، م.، زمانی‌زاده ،ح. ر. و پاداشت دهکایی، ف. ۱۳۸۹. جمعیت‌های آمیزشی در گونه کمپلکس*Gibberella fujikuroi*، عامل پوسیدگی طوقه برنج در گیلان و تعیین گروه‌های سازگاری رویشی آن‌ها. مجله دانش گیاهپزشکی ایران ۴۲ (۱): ۷۴ – ۶۱.

محمدیان، ا.، جوان‌نیکخواه، م.،اخوت، س، م.و غضنفری، ک. ۱۳۸۹. مطالعه وضعیت باروری جنسی وتعیین فراوانی آلل‌های تیپ آمیزشی در جمعیت‌های آمیزشی A و D از گونه مرکب *Gibberella fujikuroi* به دست آمده از برنج و ذرت به کمک PCR. مجله دانش گیاهپزشکی ایران ۴۱ (۱): ۱۴۲ – ۱۳۵.

میرزادی‌گوهری، ا. ۱۳۸۵. مطالعه باروری جنسی و گروه‌های سازگاری رویشی در جمعی قارچ *Fusarium verticillioides*، عامل پوسیدگی بلال و ساقه ذرت. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج. ۸۶ صفحه .

Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P. and **Leslie, J. F. 1996**. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. Applied and Environmental Microbiology 62: 4039 - 4043.

Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P. and **Backhouse, L. W**. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research, 3rd ed. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia.

Cumagun, C. J. R., **Vargas1., M., L. and Alviar, A. N. 2011.** Evaluation of greenhouse and field aggressiveness of *Fusarium verticillioides* from corn in Laguna province, Philippines. African Journal of Agricultural Research. 6(32): 6586-6591

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 Microboilogy 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.

Goertz, A., Zuehlke, S., Spiteller, M., Steiner, U., Dehn, H. W., Waalwijk, C., Vries, I. and Oerke, C. 2010. Fusarium species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. European Journal of plant Pathology 128: 101-111.

Iglesiase, J., Presello, D. A., Botta, G., Lori, G. A. and **Fauguel, C. M**. **201**0. Agressiveness of Fusarium Section Liseola isolates cousing maize ear rot in Argentina. Journal of Plant Pathology 92: 205 – 211.

Jurrado, M., Vazquez, C., Callejas, C. and Gonzalez- Jane, MT. **2006**. Occurrence and variability of mycotoxigenic *Fusarium* species associated to wheat and maize in South West of Spain. Maycotoxin Research 22: 691.

Klittich, C. J. R. and Leslie, J. F. 1988. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). Genetics 118: 417-423.

Koehler, B. and Holbert, J. R . **1930.** Corn Disease in Illinois. Illiois Agricultural Experiment Station Bulletin pp 164-354.

Leslie, J. F. 1**991**. Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section Liseola). Phytopathology 81: 1058 – 1060.

Leslie, J. F. 1996. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. *Advances in Experimental Medicine and Biol*ogy. 392: 153 - 164. Review.

Leslie, J. F. **and Summerell, B. A**. **2006**. The *Fusarium* Laboratory Manual. First edition. Blackwell Publishing, London, UK. 388 pp.

Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Bottalico, A. and Corda, P. 1995. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. Plant Disease 79: 727 – 731.

McGee, D. C. **1988**. Maize Diseases: A Reference Source for Seed Technologist. The American Phytopathological Society. St. Paul. MN., USA.

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.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and **Marasas, W. F. O**. **1983**. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University, University Park, USA.

Pan, H. K. and Zhang, L. X. 1992. The analysis of corn varieties and climatic factor for the yield loss caused by ear rot disease. Acta-Agriculturae- Boreali- Sinica 7: 99 – 103.

Reid, L. M. and Zhu, X. 2002. Screening corn for resistance to common diseases in Canada. [Online]. Available at: http://res2.agr.ca/ecorc/corn-mais/resistance/resistance_e.htm Agriculture and Agri-Food Canada, Central Experimental Farm.

Summerell, B. A., Salleh, B. and **Leslie, J. F. 2003**. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Disease 87: 117 – 128.

Warfield, C. Y., and **Davis, R. M. 1996**. Importance of husk coveringon the susceptibility of corn hybrids to Fusarium ear rot. Plant Disease 80: 208 – 210.