

بررسی روابط خویشاوندی قارچ

Fusarium graminearum sensu lato در ایران

با استفاده از آنالیز توالی ژن MAT

امیرحسین بیکی^{۱*}، امیر جهانشاهی^۲، ناصر صفایی^۳، جعفر احمدی^۴

۱، ۲ و ۴- به ترتیب استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار دانشگاه بین المللی امام

خمینی (ره)، گروه بیوتکنولوژی

۳- استادیار، دانشکده کشاورزی تربیت مدرس، گروه بیماری شناسی

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: amirbeiki@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۹)

چکیده

بلایت سنبله گندم (FHB) یکی از مهم ترین بیماری های خسارت زا روی گندم، جو، برنج و سایر غلات دانه ریز در سطح جهان می باشد. عامل اصلی بیماری بلایت سنبله گندم، قارچ *Fusarium graminearum* است که یک گونه مرکب بوده و حداقل شامل ۱۱ گونه مجزای دارای روابط خویشاوندی می باشد. در این مطالعه، ۱۳ جدایه مختلف *F. graminearum sensu lato* که نماینده مناطق مختلف جغرافیایی ایران بودند، جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور بررسی روابط خویشاوندی جدایه ها از مقایسه توالی ژن MAT در آنها استفاده شد. بدین منظور با استفاده از DNA خالص سازی شده جدایه ها و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، توالی ژن MAT تکثیر شد. جهت مطالعه روابط خویشاوندی درون *fg clade*، اقدام به تعیین توالی ژن MAT1-1-2 با استفاده از جفت آغازگر M1-2-3/M1-2-2 و ژن MAT1-2-1 با استفاده از جفت آغازگر M2-1-1/M2-1-2 گردید و برای آنالیز داده ها از روش حداکثر پارسیمونی استفاده شد. آنالیز روابط خویشاوندی نمونه مورد بررسی، نشان دهنده تک نیایی بودن گونه های مورد آزمایش بود. همچنین مشخص شد تمام جدایه های مورد بررسی در این تحقیق به گونه *F. graminearum sensu lato* تعلق دارند.

مقدمه

فوزاریوم یکی از جنس های مهم قارچ های رشته ای است که بطور وسیعی در خاک و گیاهان دیده می شود (۶). یکی از گونه های مهم فوزاریوم، *F. graminearum sensu lato* است که موجب بیماری های مختلفی در گیاهان می شود. فرم جنسی این عامل بیماری زا (*Gibberella zeae*) می تواند سبب بیماری های پوسیدگی طوقه، بلایت خوشه در غلات و

واژه های کلیدی

فیلوژنی،
تیپ آمیزشی،
Fg clade،
Fusarium graminearum
MAT

پوسیدگی ساقه و بلال در ذرت شود (۴). تاکسونومی فوزاریوم همیشه چالش بزرگی برای تعیین گونه‌های مورفولوژیکی بوده است (۱۰). ابزار مولکولی مبتنی بر آنالیز DNA، بعنوان یک راهکار مناسب در مقابل شیوه‌های کلاسیک و به منظور بررسی واریته‌های گونه‌های مختلف قارچ‌ها مورد استفاده می‌باشد (۸). اکنون این ابزارهای مولکولی بر اساس مفاهیم خویشاوندی گونه-ای برای تاکسونومی مولکولی فوزاریوم بکار می‌روند (۱۳ و ۱۲). استفاده از روش‌های مولکولی برای مطالعه اجداد خویشاوند جهت تشخیص قارچ‌های غیر مرتبط ولی مشابه از نظر مورفولوژیکی کمک زیادی کرده است (۵). اطلاعات مولکولی، بخصوص زمانی که خصوصیات مورفولوژیکی برای تشخیص دقیق رده‌بندی گروه‌های تاکسونومیک کافی نیست، بسیار سودمند است (۸). برخلاف خصوصیات فوق، استفاده از توالی‌های DNA در مطالعات روابط خویشاوندی، اطلاعات زیادی را برای موجودات مورد مقایسه فراهم می‌نماید. همگامی نسب شناسی چند ژنی (ژن‌های میتوکندریایی و هسته‌ای) ابزار قدرتمندی را برای تشخیص گونه‌های دارای روابط خویشاوندی فراهم کرده است (۳، ۱۱ و ۱۷). ژن‌های *EF1-α*، *MAT*، *rRNA*، *ITS*، *Histone H3* و β -tubulin رایج‌ترین نشانگرهای بکار رفته برای بررسی فیلوژنی مولکولی هستند (۶، ۹ و ۱۱). توالی ژن‌های *MAT* "دارای توانایی شناسایی مرزهای گونه‌ای" می‌باشند (۱۷). تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که تمام ۹ گونه درون شاخه *F. graminearum sensu lato* دارای روابط خویشاوندی مجزا (۹) و دارای جایگاه ژنی *MAT* بسیار حفاظت شده هستند (۱۵). تجزیه و تحلیل داده‌های *Histon H3* وجود ۹ گونه تک نیایی بیوجغرافیایی را درون شاخه *F. graminearum sensu lato* کاملاً تایید کردند. همچنین تطبیق شدید تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی *MAT* و *non-MAT* این تفسیر را که درخت‌های ژنی، درخت‌های گونه‌ای را نشان می‌دهند، تایید می‌کند. این یافته فرضیه‌ای را که ژن‌های *MAT* می‌توانند در مطالعه مرزهای گونه‌ای مفید باشند را نیز تایید می‌نماید (۱۷). ژن‌های فوق معمولاً برای مطالعه گوناگونی درون گونه‌ای و برون گونه‌ای و تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی، در گستره وسیعی از یوکاریوت‌ها از جمله قارچ‌ها

بکار می‌رود (۱۰). نتایج تجزیه و تحلیل‌های مرکب، اصل تک نیایی بودن شاخه *F. graminearum* و هموتال بودن آن را تایید می‌کند (۹). توالی‌های نوکلئوتیدی ژن *MAT1-2-1* برای آزمایش ارتباطات خویشاوندی درون *Cochliobolus*، *G. fujikuroi* (۱۴) و *Ascochyta sp.* (۲) مورد استفاده قرار گرفته است. خطوط نسلی شاخه *F. graminearum* تاریخچه روشنی از جداسازی تولید مثلی را نشان می‌دهد، همچنین برخی از سطوح ناسازگاری تولید مثلی درونی را نیز نشان می‌دهد که از طریق کاهش باروری در تلاقی‌های مصنوعی ثابت می‌شود و با مفاهیم گونه که به طور وسیع در گیاهان و حیوانات به کار برده می‌شود سازگاری دارد (۹). با وجود مطالعات گسترده، هنوز بسیاری از جنبه‌های این بیماری مهم گندم از جمله تعاملات درون گونه‌ای در جمعیت‌های مختلف این بیمارگر ناشناخته است و روشن‌ترین شاهد این ادعا اذعان پژوهشگران به ناتوانی در کنترل این بیماری می‌باشد. برای مبارزه با هر بیماری شناخت پاتوژن بویژه ساختار جمعیت آن ضروری است و عدم توفیق در کنترل یک بیماری ناشی از عدم درک ساختار ژنتیکی جمعیت‌های عامل بیماری می‌باشد (۹). بنابراین ضرورت دارد که مطالعات بیشتری در زمینه شناسایی جمعیت‌های این پاتوژن و روابط آنها با یکدیگر انجام شود. هدف از این تحقیق گسترش دانش مربوط به بیمار *FHB* و تعیین روابط خویشاوندی جدایه‌های *F. graminearum sensu lato* با استفاده از خصوصیات نوکلئوتیدی بدست آمده از توالی ژن‌های *MAT* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

جدایه‌های قارچی استفاده شده در این تحقیق از خاک مزارع گندم آلوده به بیماری فوزاریومی سنبله گندم و از استان‌های اردبیل، گلستان، کرمان و مازندران جمع آوری شده بودند. تعداد ۱۳ جدایه در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- جدایه‌ای *F. graminearum sensu lato* جمع‌آوری شده از مزارع گندم کشور

مکان	کد	مکان	کد
نوده ملک - گرگان	Fg-8a	دشت مغان - اردبیل	Fg-1a
قراخیل - قائمشهر	Fg-9a	دشت مغان - اردبیل	Fg-2a
سرطاق - بندرگز	Fg-10a	دشت مغان - اردبیل	Fg-3a
جیرفت - کرمان	Fg-11a	گرگان - گلستان	Fg-4a
دشت مغان - اردبیل	Fg-12a	رستم کلا - بهشهر	Fg-5a
دشت مغان - اردبیل	Fg-13a	دشت ناز - ساری	Fg-6a
		نوده ملک - گرگان	Fg-7a

خالص‌سازی جدایه‌ها

کلیه نمونه‌ها با استفاده از کشت تک اسپور خالص گردیدند. ابتدا با استفاده از برگ میخک سترون شده با اشعه گاما و محیط آب-آگار اقدام به تهیه محیط کشت اختصاصی CLA^۱ شد. یک بلوک از محیط PDA^۲ حاوی نمونه قارچی نزدیک برگ میخک روی محیط کشت قرار داده شد. کشت‌های فوق به مدت ۵ تا ۷ روز در انکوباتور زیر نور NUV^۳ (T136w/80RsF40 BLB Philips) با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. محیط فوق سبب تحریک اسپوردهی قارچ می‌شود. سپس از یک لوله آزمایش کوچک حاوی ۵ میلی‌لیتر آب مقطر که توسط اتوکلاو سترون شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از یک لوپ روی سطح محیط حاوی اسپورها کشیده و نمونه به آب مقطر داخل لوله آزمایش اضافه شد. در مرحله بعد زیر هود و در شرایط سترون با استفاده از لوپ محتویات لوله آزمایش روی محیط آب آگار در امتداد خطوط فرضی پخش شدند. محیط‌های فوق یک شبانه روز در داخل دستگاه انکوباتور قرار گرفتند. سپس تشتک‌ها با میکروسکوپ بررسی و اسپورهای تکی جوانه زده با دقت به محیط PDA منتقل شدند. بعد از گذشت ۲ تا ۳ روز توده قارچی حاصل از کشت تک اسپور در سطح محیط PDA مشاهده شد.

تهیه توده میسلومی و استخراج DNA

بلوک‌های کوچک حاوی نمونه قارچی از کشت ۶ روزه جدایه-های قارچ روی محیط PDA به فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB^۴ منتقل گردید. کشت‌ها روی دستگاه شیکر در دمای اتاق با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ تا ۴ روز نگهداری شدند. جمع‌آوری میسلوم‌ها با فیلتر کردن محیط کشت به کمک کاغذ صافی، پمپ خلاء و شستشو با آب مقطر سترون صورت گرفت. میسلوم بدست آمده برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت و یا اینکه در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. استخراج DNA با استفاده از روش محلول نمکی DNA انجام گرفت (۱). برای اطمینان از موفقیت عمل استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت DNA استحصالی، پنج میکرولیتر از محلول DNA با یک میکرولیتر بافر رنگ^۵ شش برابر مخلوط گردید و در ژل آگارز ۰/۸ درصد بار-گذاری شد. غلظت DNA استخراج شده با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید (شکل ۱).

تکثیر، خالص‌سازی و تعیین توالی قطعات DNA

برای تکثیر ایدیومورف *MAT1-1-2* از جفت آغازگر M12-2/M12-3 و برای تکثیر ایدیومورف *MAT1-2-1* از جفت آغازگر M2-1-1/M2-1-2 استفاده گردید (۸) (جدول ۲).

^۱ Carnation Leaf Agar

^۲ Potato Dextrose Agar

^۳ Near Ultra Violet

^۴ Potato Dextrose Broth

^۵ Loading buffer

درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و در آخر واکنش یک مرحله طولی سازی رشته به مدت ده دقیقه در ۶۸ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد (شکل ۲).

محصول واکنش PCR در جدایه‌های *F. graminearum sensu lato* با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR (شرکت QIAgene®) خالص‌سازی شد. سپس ناحیه ۱۱۰۰ جفت بازی ژن *MAT1-1-2* و ۸۰۰ جفت بازی ژن *MAT1-2-1* در ۱۳ جدایه از نژادهای مختلف *F. graminearum sensu lato* که مربوط به نواحی مختلف جغرافیایی بودند، تعیین توالی گردید. توالی‌های ژن *MAT1-1-2* با شماره‌های دسترسی HM474042- HM474054 و ژن *MAT1-2-1* با شماره‌های دسترسی HM474055-HM474067 در پایگاه GenBank ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

هم‌ردیف‌سازی اولیه توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام گرفت و سپس با استفاده از روش حداکثر پارسیمونی با نرم افزار Mega4 تجزیه و تحلیل گردیدند. درخت روابط خویشاوندی با استفاده از برنامه Mega4 طراحی شد و با کاربرد بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار استحکام یافت.

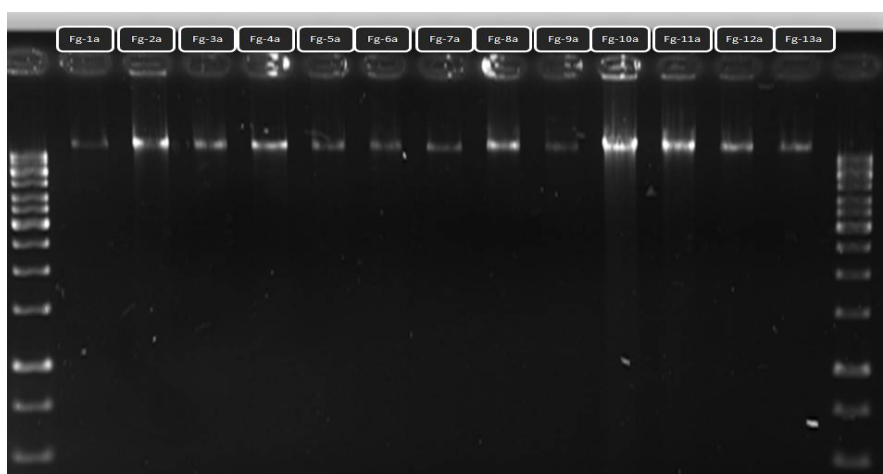
واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر تیوب شامل دو و نیم میکرولیتر بافر 10X PCR+MgSO₄، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (با غلظت ۱۰ پیکومول)، نیم میکرولیتر از مخلوط dNTP ها (با غلظت ۰/۲ میلی مولار)، یک واحد از DNA پلیمرز Pfu و یک میکرولیتر از DNA قارچی (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم) تهیه گردید. تمام واکنش‌ها از شرکت سیناژن تهیه شدند.

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ایدیومورف

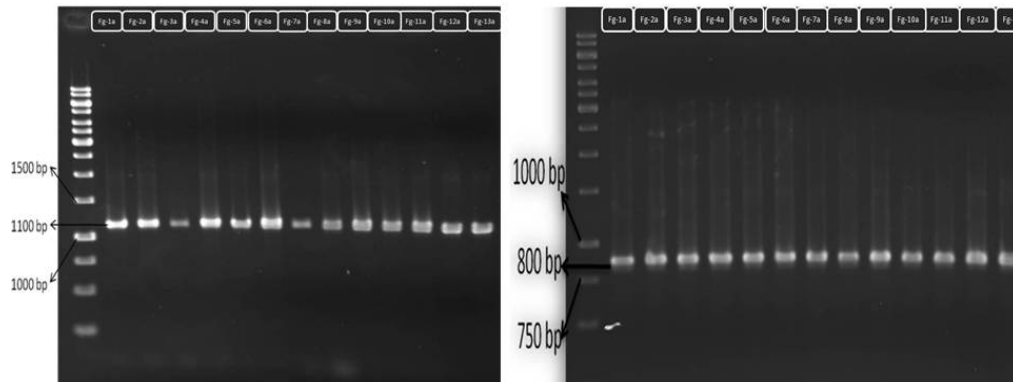
MAT1-1-2 و *MAT1-2-1*

نام آغازگر	توالی
M21-1	5'-ATGAGCACCCCTTATGTTGATG - 3'
M21-2	5'-TCAGACGTTGTTTTTGCTGAGC - 3'
M12-2	5'-GATCATCCGGCTCCTCAGGGTC - 3'
M12-3	5'-TCGGCCATCTGCTTGGATTGG - 3'

چرخه‌های PCR شامل ۹۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به عنوان شروع واکنش، ۴۰ چرخه در دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۸



شکل ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده از ۱۳ جدایه *F. graminearum sensu lato* شماره‌های یک تا ۱۳ به ترتیب جدایه‌های Fg-1a تا Fg-13a می‌باشند.



شکل ۲- محصولات PCR ژن *MAT1-1-2* (سمت راست) منجر به ایجاد قطعه ۸۰۰ جفت بازی می‌شود و ژن *MAT1-1-2* (سمت چپ) منجر به ایجاد قطعه ۱۱۰ جفت بازی می‌شود. شماره‌های یک تا ۱۳ به ترتیب جدایه‌های Fg-1a تا Fg-13a می‌باشند.

نتایج و بحث

جدایه‌هایی که از یک ناحیه جغرافیایی هستند در گروه‌های مختلف قرار دارند. گوناگونی جدایه‌ها به خصوص جدایه‌های استان اردبیل نشان می‌دهد عامل مهمی که در ایجاد تنوع نقش اساسی ایفا می‌کند، فرم جنسی آن می‌باشد که در روند تکاملی خویش سبب تغییراتی در توالی ژن *MAT* می‌شود. با توجه به اینکه نمونه‌ها از خاک مزارع گندم استخراج شده است، میزبان گندم نیز می‌تواند عامل ایجاد تنوع باشد. این مسئله می‌تواند نشانه استفاده از ژنوتیپ‌های خاص بیماری‌زا برای اصلاح ارقام مقاوم به FHB در موسسه اصلاح نهال و بذر باشد. به عبارت دیگر وقتی در برنامه‌های اصلاحی فقط از نوع خاصی از عوامل بیماری‌زا برای ایجاد ارقام مقاوم استفاده شود موجب بروز سایر ژنوتیپ‌های بیماری‌زا و ایجاد فرم‌های جدید در خلال روند تکاملی می‌شود.

اصل تک جدی بودن Fg Clade توسط اودانل و همکاران (۹) به اثبات رسید. تمام گونه‌های درون Fg Clade دارای جایگاه ژنی *MAT* بسیار حفاظت شده هستند. جهت بررسی اینکه جدایه‌های مورد آزمایش به کدام دسته از گروه‌های نه‌گانه دارای روابط خویشاوندی استاندارد معرفی شده (۹ و ۱۱) در داخل مجموعه گونه‌های Fg clade تعلق دارند، اقدام به هم‌ردیف کردن توالی‌های بدست آمده با توالی گونه‌های استاندارد موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و درخت روابط خویشاوندی آنها ترسیم شد. تمام جدایه‌های مورد آزمایش در گروه *F. graminearum sensu lato* (فرم جنسی *G. zeae*) قرار گرفتند. برای ریشه‌دار کردن درخت از ژن

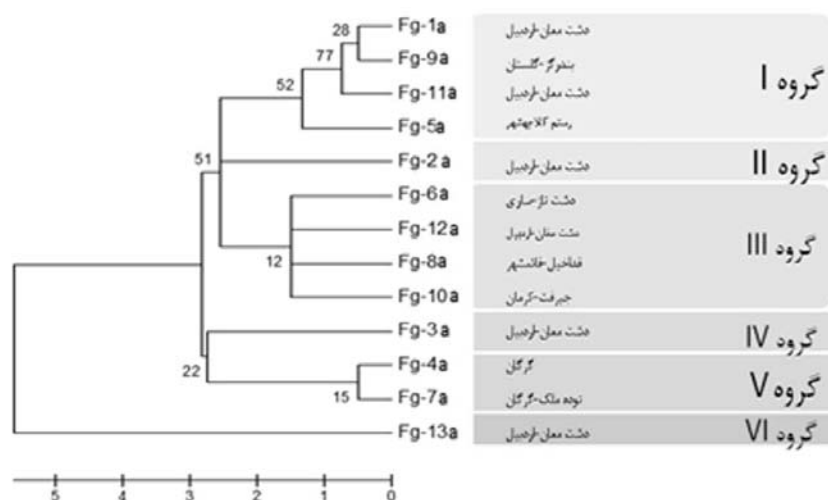
آغازگرهای بکار رفته در این بررسی بر اساس توالی موجود در GeneBank با شماره دسترسی AF318048 طراحی شده و قادر به شناسایی دقیق نواحی *MAT* در *F. graminearum sensu lato* می‌باشند. استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر ناحیه *MAT* منجر به ایجاد قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۱۱۰۰ جفت باز برای ایدیومورف *MAT1-1-2* و ۸۰۰ جفت باز برای ایدیومورف *MAT1-2-1* گردید (شکل ۲). پس از بررسی توالی‌های به دست آمده از ایدیومورف‌های ژن *MAT* توسط ClustalW هم‌ردیف شدند. فیلوگرام به دست آمده در شکل ۳ قابل رویت است. این فیلوگرام نشان می‌دهد که جدایه‌های مورد تحقیق به شش گروه تقسیم می‌شوند.

گروه اول شامل دو جدایه از دشت مغان، یک جدایه از بندر گز و یک جدایه از رستم‌کلا به‌شهر می‌باشد. گروه دوم شامل یک جدایه از دشت مغان می‌باشد. گروه سوم شامل یک جدایه از دشت مغان، یک جدایه از دشت‌ناز ساری، یک جدایه از قراخیل قائمشهر و یک جدایه از جیرفت کرمان می‌باشد. گروه چهارم شامل یک جدایه از دشت مغان می‌باشد. گروه پنجم شامل یک جدایه از گرگان و یک جدایه از نوده ملک گرگان می‌باشد. گروه ششم شامل یک جدایه از دشت مغان می‌باشد.

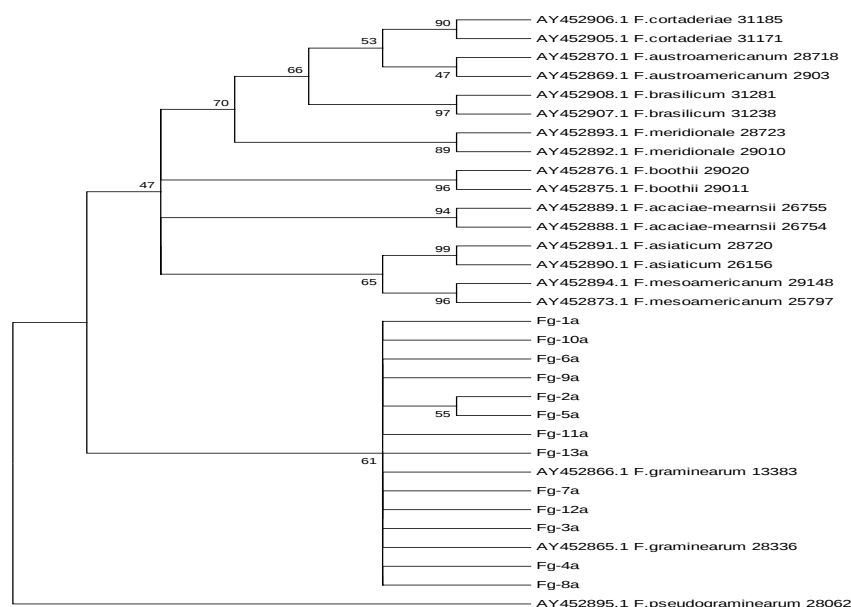
بررسی انجام شده نشان داد که جدایه‌هایی از مناطق مختلف جغرافیایی شامل نواحی شمالی، نواحی جنوبی و نواحی شمال-غربی در کنار هم و در یک گروه واحد قرار گرفته‌اند. همچنین

باشد و برای مطالعه تنوع درون گونه‌ای و برون گونه‌ای و تجزیه تحلیل روابط خویشاوندی در یوکاریوت‌ها از جمله قارچ‌ها بکار می‌رود (۳، ۱۰، ۱۱ و ۱۷) نتایج این تحقیق نیز این مطلب را نشان می‌دهد. از آنجایی‌که برای مبارزه موفق با هر بیماری شناخت ساختار جمعیت عامل بیماری ضروری است، لذا تعیین روابط خویشاوندی جدایه‌های *F. graminearum* می‌تواند چالش تشخیص گونه‌های مورفولوژیکی را برطرف نماید و در برداشت گام‌های موثر در اصلاح گندم برای مقاومت به FHB کارا باشد.

Mating type در گونه *F. pseudograminearum* استفاده شد (شکل ۴). تجزیه و تحلیل‌های قبلی (۹) نشان می‌دهد که فقط سه گونه از نه گونه شاخه Fg Clade را می‌توان با مجموعه خصوصیات کنیدی تشخیص داد. در حالی که با بررسی‌های مولکولی و روش‌های نسب‌شناسی ژن می‌توان گونه‌هایی که از لحاظ مورفولوژیکی و فنوتیپی قابل تمایز نیستند، را شناسایی نمود. همانطور که در نتایج محققین آمده است ژن‌های MAT توانایی تشخیص گونه‌های دارای روابط خویشاوندی را دارا می-



شکل ۳- درخت روابط خویشاوندی جدایه‌های *F. graminearum* طراحی شده بر اساس توالی ایدیومورف‌های *MAT1-1-2* و *MAT1-2-1*



شکل ۴- درخت روابط خویشاوندی جدایه‌های *F. graminearum* طراحی شده بر اساس توالی ژن *MAT* و توالی‌های استاندارد به روش حداکثر پارسیمونی با کاربرد بوت استرپ ۱۰۰۰

منابع

- including isolates from the 2005-06 multistate contact lens-associated US keratitis outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2235-2248.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M.G., Brandt, M.E., Zhang, N. and Geiser, D.M. (2008) Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2477-2490.
 - Steenkamp, E.T., Wingfield, B.D., Coutinho, T.A., Zeller, K.A., Wingfield, M.J., Marasas, W.F.O., Leslie, J.F. (2000). PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4378-4382.
 - Turgeon, B.G., Yoder, O.C. (2000). Proposed nomenclature for mating type genes in filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 31: 1-5.
 - Worrall, J. (1999) Structure and dynamics of fungal populations. *Springer*, 348 pp
 - Yun, S.-H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O.C., Turgeon, B.G. (2000) Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/ Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.* 31: 7-20.
 - Barve, M.P., Arie, T., Salimath, S.S., Muehlbauer, F.J., Peever, T.L. (2003). Cloning and characterization of the mating type (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legume-associated *Ascochyta* spp. *Fungal Genet. Biol.* 39: 151-167.
 - Esser, K. Paul A. Lemke, David Jordan McLaughlin, E G McLaughlin. (1994). The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. *Springer*
 - Farr, D.F., G.F. Bills, G.P. Chamuris, and A.Y. Rossman. (1989) Fungi on plants and plant products in the United States. *APS Press*, St. Paul, MN.
 - Geiser, D. M., Jimenez-Gasco, M. D., Kang, S. C., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kulda, G. A. and O'Donnell, K. (2004) FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473-479.
 - Goswami, R.S. and Kistler, H.C., (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*. 5: 515-525.
 - King, M. (1995) Species Evolution: The Role of Chromosome Change *Robinson Syst. Biol.* 44: 578-580
 - Nalim, F.A., Elmer, W.H., McGovern, R.J., and Geiser, D.M. (2009) Multilocus genetic diversity of *Fusarium avenaceum* pathogenic on *lisianthus*. *Phytopathology*. 99: (4) 462-468.
 - O'Donnell, K., Ward, T. J., Geiser, D. M., Kistler, H. C. and Aoki, T. (2004) Genealogical concordance between the matting type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 600-623.
 - O'Donnell, K., Cigelnik, E. and Casper, H. H. (1998) Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genetics and Biology* 22: 57-67.
 - O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K. and Casper, H. C. (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 97: 7905-7910.
 - O'Donnell, K., Sarver, B.A.J., Sutton, D.A., Benjamin, L., Lindsley, M., Padhye, A., Geiser, D.M. and Ward, T.J. (2007) Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria,

