Iranian Journal of Plant ProtectionScience
Vol 51, No 2, Autumn and winter 2020 (235-249)
DOI: 10.22059/ijpps.2020.300436.1006935

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۹ (۲۴۹-۲۳۵)

ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی و وضعیت باروری جنسی جدایه‌های *Fusarium proliferatum* حاصل از برخی اکوسیستم‌های آبی

راضیه پورسعید[۱]، خلیل بِردی فتوحی فر[۲*] و رسول زارع[۳]

۱ و ۲. دانشجوی دکتری رشته بیماری شناسی گیاهی و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.

۳. استاد بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۱۳ – تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۲۵)

چکیده

در این تحقیق برای شناسایی ایدیومورف های تیپ آمیزشی و باروری جنسی، از برخی رودخانه‌ها، دریاچه‌ها، تالاب‌ها و سدهای واقع در ۱۰ استان (آذربایجان‌شرقی، البرز، بوشهر، خراسان جنوبی، خوزستان، فارس، کردستان، گیلان، لرستان و مازندران) نمونه برداری شد. در هر محل، نمونه ها از سه بستر آب، رسوبات و کف (حباب‌های ریز روی آب) اخذ شدند. برای جداسازی جدایه‌ها از محیط‌کشت آب-آگار حاوی آنتی-بیوتیک و دمای ۲۵ درجه سلسیوس و نور متناوب و محیط‌کشت پیتون پی سی ان بی آگار حاوی آنتی‌بیوتیک استفاده شد. تعداد ۵۱ جدایه از *F. proliferatum* به دست آمد. شناسایی ریخت‌شناختی روی محیط کشت‌های برگ میخک-آگار، سیب‌زمینی-دکستروز-آگار و SNA انجام گرفت. سپس جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه شناسایی شدند. برای تعیین ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی از آغازگرهای طراحی شده بر اساس جایگاه‌های ژنی *MAT* در آزمون multiplex PCR استفاده شد. از ۵۱ جدایه، تیپ آمیزشی ۲۸ جدایه (۵۴/۹ درصد) از نوع *MAT-1* و ۲۳ جدایه (۴۵/۱ درصد) از نوع *MAT-2* تشخیص داده شد. به منظور بررسی وضعیت باروری جنسی، جدایه‌های یک تیپ آمیزشی با تمام جدایه‌های تیپ آمیزشی مخالف روی محیط‌کشت هویج-آگار تلاقی داده شدند. در مجموع ۱۲۸۸ تلاقی بین جدایه‌ها انجام گرفت. در نتیجه، در ۱۰۲ تلاقی پریتسیوم‌های بارور مشاهده شدند که آسکوسپورهای تولید شده در آن‌ها ۷۰ تا ۸۰ درصد قابلیت جوانه‌زنی داشتند. پریتسیوم‌ها در تلاقی‌های چهار جدایه ماده بارور با جدایه‌های تیپ آمیزشی مخالف تولید شدند. فراوانی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی و وضعیت باروری جنسی جدایه‌های مورد بررسی، تایید کننده احتمال وقوع تولیدمثل جنسی بین جدایه‌های این گونه در اکوسیستم های آبی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تولیدمثل جنسی، ماده بارور، نر بارور، رودخانه، تالاب.

Mating type idiomorphs and sexual fertility status in *Fusarium proliferatum* isolates of some aquatic ecosystems

Razieh Poursaeid[1], Khalil-Berdi Fotouhifar[2*] and Rasoul Zare[3]

1, 2. Ph.D. candidate and associate professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj.

3. Professor, Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

(Received: May 2, 2020 - Accepted: July 15, 2020)

ABSTRACT

In this study, in order to identification of mating type idiomorphs and possibility of sexual fertility samples were taken from rivers, lakes, lagoons and dams of 10 provinces (Alborz, Bushehr, East Azerbaijan, Fars, Guilan, Khuzestan, Kurdistan, Lorestan, Mazandaran and South Khorasan). In each site, samples were taken from three substrates of water, sediments and foam (small bubbles on water surface). Water-agar containing antibiotic and alternating light in 25°C and peptone-PCNB-agar containing antibiotic were used for isolation of the isolates. Fifty-one isolates of *F. proliferatum* were recovered and maintained. Isolates were identified using morphological characteristics on carnation-leaf-agar, potato dextrose agar and SNA culture media. Then, identification of isolates was done by species-specific primers. To detect the mating type idiomorphs of the isolates, idiomorph loci were amplified by multiplex PCR using the primers designed based on corresponding *MAT* loci. Of 51 isolates, 28 (54.9%) were determined as *MAT-1* and 23 (45.1%) as *MAT-2*. To test sexual fertility of the isolates, each isolate was crossed with all isolates of opposite mating type on carrot agar culture medium, and total crosses of 1288 were done between the isolates. One hundred and two crosses resulted in fertile perithecia and ascospores recovered from fertile crosses had germination rate between 70–80%. Among successful crosses, four isolates were identified as female fertile. Distribution of mating type idiomorphs and fertility status of the isolates, confirms the probability of sexual reproduction among isolates in the aquatic ecosystems.

Keywords: Sexual reproduction, Female fertile, Male fertile, River, Lagoon.

* Corresponding author E-mail: fotowhi@ut.ac.ir

مقدمه

گونه *Fusarium proliferatum* یکی از عوامل بیمارگر گیاهان با دامنه میزبانی وسیع شامل ۷۵ گونه گیاهی تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای مانند ذرت، گندم، برنج، پیاز، انبه، کاج و نخل می‌باشد. این گونه قارچی، بیماری‌هایی از جمله پوسیدگی، پژمردگی، سرخشکیدگی و سوختگی را ایجاد می‌کند و همچنین قادر به تولید انواعی از زهرابه‌های قارچی می‌باشد (Moncrief *et al*., 2016). اهمیت این قارچ موجب شده است که مطالعات زیادی پیرامون جنبه‌های مختلف زیست‌شناسی، تنوع ژنتیکی و همه‌گیری-شناسی آن صورت گیرد. اما در اکثر قریب به اتفاق این مطالعات، جدایه‌های حاصل از اکوسیستم خشکی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و به تحقیق در محیط آب به ندرت پرداخته شده است (Palmero *et al*., 2009; Gil-Serna *et al*., 2016). این در حالی است که تحقیقات نشان می‌دهند که قارچ‌های موجود در خاک از طریق گرد و خاک اتمسفر و شستشو توسط باران قابلیت انتقال به منابع آبی را دارا هستند (Abdel-Hameed *et al*., 2008; Palmero *et al*., 2011). از سوی دیگر، گونه‌های موجود در آب نیز می‌توانند از طریق آب آبیاری، باد و پخش قطرات ریز حاصل از امواج، هوازاد شوند (Lacey, 1981; Elmer, 2008). بنابراین با توجه به پیوستگی دو اکوسیستم خشکی و آبی، مطالعه رودها، دریاچه‌ها، تالاب‌ها و سدها که به عنوان منابع آبیاری مزارع محسوب می‌شوند، از جنبه وجود برخی گونه‌های قارچی بیمارگر گیاهی و رفتارهای آمیزشی جدایه‌های آن‌ها لازم به نظر می-رسد. از جمله مطالعات معدود انجام شده در این زمینه، انتشار گزارش‌هایی از وجود گونه‌های *F. acuminatum*، *F. dimerum*، *F. equiseti*، *F. moniliforme*، *F. oxysporum*، *F. poae*، *F. semitectum* و *F. solani* در آب‌های باتلاقی می‌باشد (Gordon, 1960). علاوه بر آن، در تحقیقی دیگر به بررسی گونه‌های جنس *Fusarium* موجود در آب رودخانه آنداراکس (Andarax) و دریای مدیترانه در جنوب‌شرقی اسپانیا پرداخته شده است (Palmero *et al*., 2009). گونه‌های *F. anthophilum*، *F. acuminatum*، *F. chlamydosporum*، *F. culmorum*، *F. equiseti*، *F. oxysporum*، *F. proliferatum*، *F. solani* و *F. sambucinum* از این رودخانه جداسازی شده‌اند (Palmero *et al*., 2009). علاوه بر این، پنج گونه *F. equiseti*، *F. verticillioides*، *F. oxysporum*، *F. proliferatum* و *F. solani* نیز از نمونه‌های جمع‌آوری شده از دریای مدیترانه گزارش شده‌اند (Palmero *et al*., 2009). در تحقیقی دیگر نیز، پنج جدایه از گونه *F. proliferatum* به‌دست آمده از آب باران از نظر فیلوژنتیکی با شش جدایه حاصل از گیاه سیر در اسپانیا مورد مقایسه قرار گرفتند (Gil-Serna *et al*., 2016). در نتایج حاصل از بررسی توالی نوکلئوتیدی ناحیه IGS این جدایه‌ها مشاهده شده است که جدایه-های به‌دست آمده از آب باران و سیر بر اساس منشاء میزبانی از یکدیگر تفکیک می‌شوند و در دو گروه جداگانه قرار می‌گیرند (Gil-Serna *et al*., 2016).

در ایران نیز، مطالعات کمی در زمینه بررسی گونه‌های *Fusarium* موجود در آب انجام شده است. در یکی از این تحقیقات گونه‌های *F. javanicum*، *F. moniliforme* و *F. sambucinum* از گیاهان آبزی و برگ‌های (اویارسلام، لویی، جگن، نی، سوسن، بندواش، توسکا و پاسپالوم) غوطه‌ور در آب سه رودخانه منتهی به دریای خزر (رود تمیشان، لاویج رود و رود نور) جداسازی شده‌اند (Khatabakhsh, 1996). علاوه بر آن، در تحقیقی دیگر دو گونه *F. incarnatum* و *F.* cf. *ensiforme* از تالاب انزلی گزارش شده‌اند (Rezakhani *et al*., 2019). در برخی مطالعات دیگر نیز حضور این قارچ در آب استخرهای شنا در ایران گزارش شده است اما غالب گزارش‌ها در حد جنس بوده و گونه قارچی تعیین نشده است (Mollazadeh and Malakootian, 2010; Jafari *et al*., 2011).

همواره مطالعه رفتارهای مختلف قارچ‌ها حائز اهمیت می‌باشد. یکی از این موارد، وقوع تولیدمثل جنسی در قارچ‌ها است که توسط جایگاه ژنی *MAT*

کنترل می‌شود. به‌طوری‌که، در جایگاه ژنی آسکومیست‌های هتروتال دو آلل متناوب تیپ آمیزشی (*MAT-1*/*MAT-2*) وجود دارد و هر فرد هاپلوئید، حامل یکی از این دو آلل است. نوع آلل در هر فرد، تیپ آمیزشی آن را تعیین می‌کند. آلل‌های تیپ آمیزشی، اگرچه جایگاه ژنی واحدی را اشغال کرده‌اند اما دارای توالی غیرمشابه هستند و پروتئین‌های مختلفی را تولید می‌کنند. بنابراین به جای آلل، اصطلاح ایدیومورف برای آن‌ها به کار برده می‌شود (Martin *et al*., 2011). در گونه *F. proliferatum*، ایدیومورف *MAT-1* شامل سه ژن می‌باشد که پروتئینی با ناحیه حفاظت شده آلفا باکس (α-box) را کد می‌کند و ایدیومورف *MAT-2* شامل یک ژن کد کننده پروتئین با ناحیه‌ای به نام اچ ام جی باکس (HMG) می‌باشد (Waalwijk *et al*., 2006). در گونه *F. proliferatum* همانند سایر آسکومیست‌های هتروتال، تولیدمثل جنسی بین افراد با تیپ‌های آمیزشی مخالف رخ می‌دهد. بنابراین وجود نسبت متوازن تیپ‌های آمیزشی در جمعیت مورد مطالعه، امکان تولیدمثل جنسی را فراهم می‌کند. علاوه بر این، باروری نیز عامل موثر دیگری در وقوع تولیدمثل جنسی است که در مجموع نوترکیبی و بروز نژادهای جدید را در پی خواهند داشت. بنابراین به دلیل اهمیت این جنبه زیست‌شناختی قارچ، احتمال وقوع و شناخت عوامل موثر در بروز آن بارها در جدایه‌های *F. proliferatum* استحصال شده از بافت گیاهی ارزیابی شده است. در اکثر این مطالعات یک تیپ آمیزشی غالب در جمعیت مشاهده شده است و همچنین تمامی جدایه‌های مزرعه‌ای، نر بارور (ماده عقیم) تشخیص داده شده‌اند (Chulze *et al*., 2000; Abbaszadeh *et al*., 2007; Alian *et al*., 2008; Lotfi-Miri *et al*., 2010; Mohd Zainudin *et al*., 2017). این در حالی است که در جمعیت‌های مورد مطالعه علی‌رغم عدم مشاهده باروری بین جدایه‌های مزرعه‌ای، وجود تنوع ژنتیکی گزارش می‌شود (Mohammadian *et al*., 2011; Alizadeh *et al*., 2017). علت باروری کم و ناباروری در جدایه‌های جنس *Fusarium* تاکنون ناشناخته باقی مانده است (Martin *et al*., 2011). بنابراین برای درک بهتری از زیست‌شناسی و بوم‌شناسی قارچ، بررسی این موضوع در جدایه‌های به‌دست آمده از آب نیز می‌تواند حائز اهمیت باشد. چراکه با توجه به در ارتباط بودن اکوسیستم آب و خشکی احتمال این که این دو مجموعه یکدیگر را تحت تاثیر قرار دهند وجود دارد. اهداف تحقیق حاضر، شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌های *F. proliferatum* حاصل از برخی اکوسیستم‌های آبی و بررسی فراوانی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی جدایه‌های حاصل از این گونه و در نهایت بررسی احتمال وقوع تولیدمثل جنسی بین جدایه‌های به‌دست آمده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶ نمونه‌هایی از برخی منابع آبی جاری و راکد واقع در ۱۰ استان آذربایجان-شرقی، البرز، بوشهر، خراسان‌جنوبی، خوزستان، فارس، کردستان، گیلان، لرستان و مازندران تهیه شدند. انتخاب استان‌ها بر اساس تقسیم بندی اقلیمی موجود در تحقیق Heidari and Alijani (1999) انجام شد. به‌طوری‌که از اغلب اقلیم‌های موجود در ایران، استان یا استان‌هایی انتخاب شدند. نمونه‌برداری از هر استان طبق الگوی مشخص انجام شد. ابتدا در هر استان رودخانه‌ها، نهرها، دریاچه‌ها و تالاب‌های مهم به عنوان ایستگاه‌های نمونه‌برداری انتخاب شدند. تعداد این جایگاه‌های نمونه‌برداری بسته به میزان منابع آبی موجود در هر استان (پرآبی یا کم آبی) متغیر بود. به-طوری‌که در استان‌های پر آب به طور متوسط از پنج رودخانه اصلی بعلاوه سه تالاب یا دریاچه نمونه‌برداری انجام شد. در هر استان کم آب نیز از سه منبع آبی نمونه‌برداری صورت گرفت. در انتخاب مکان نمونه-برداری، امکان دسترسی و قابلیت نمونه‌برداری نیز مدنظر قرار گرفت. در نهایت، در هر محل از سه بستر نمونه‌برداری انجام شد. آب در تمامی نقاط تعیین شده نمونه‌برداری شد و از رسوبات ته آب (sediments) و حباب‌های ریز روی آب (foam) بر حسب در دسترس

بودن، نمونه‌برداری انجام گرفت. نمونه‌ها درون لوله-های پلاستیکی درب‌دار ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شدند. به هر نمونه شماره‌ای اختصاص داده شد. مشخصاتی از قبیل نام اکوسیستم نمونه‌برداری شده، تاریخ، گیاهان منطقه، زلال بودن یا نبودن آب و ویژگی قابل مشاهده ته آب (وجود سنگ یا گیاه یا لجن ته آب) در هر مورد یادداشت شد. همچنین برای هر مکان نمونه‌برداری مختصات جغرافیایی و اسیدیته (pH) آب به همراه تصاویری از محل جمع‌آوری و گیاهان منطقه تهیه شدند. تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده تا زمان انتقال به آزمایشگاه درون یخدان پلاستیکی حاوی یخ نگهداری شدند.

جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری

جهت جداسازی جدایه‌های جنس *Fusarium* از نمونه‌های جمع‌آوری شده، قرص‌هایی از محیط‌کشت آب-آگار (WA) حاوی ۰/۰۱ گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به تشتک‌های پتری شیشه‌ای منتقل شدند و سپس مقداری از نمونه جمع‌آوری شده درون تشتک پتری ریخته شد، به‌طوری‌که سطح قرص‌های محیط‌کشت با نمونه پوشانده شد. سپس تشتک‌های پتری به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تحت نور متناوب (۱۲ ساعت روشنایی نور سفید/۱۲ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. پس از طی این مدت، قرص‌های WA به محیط‌کشت اختصاصی پپتون پی سی ان بی آگار (peptone PCNB agar) حاوی ۰/۰۱ گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل منتقل شدند. در هر مورد از یک شاهد آب مقطر استریل نیز استفاده شد.

به منظور خالص‌سازی جدایه‌های قارچی به‌دست آمده، بخشی از ریسه رشد کرده در محیط‌کشت اختصاصی، به محیط‌کشت WA منتقل شدند و به روش نوک ریسه (hyphal tip) خالص‌سازی انجام شد. بدین منظور پس از ۴۸ ساعت، بخش انتهایی ریسه منفرد موجود روی محیط‌کشتWA ، به درون تشتک پتری حاوی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) منتقل شد و پس از هفت روز، خالص‌سازی به روش تک اسپور کردن (single spore) انجام گرفت. در مورد جدایه‌هایی که در محیط‌کشت PDA اسپور تولید نمی‌کردند، برای خالص‌سازی صرفاً از روش نوک ریسه استفاده شد. نگهداری تمامی جدایه‌ها به دو روش روی کاغذ صافی استریل و همچنین روی محیط‌کشت PDA به ترتیب در دمای ۲۰- و چهار درجه سلسیوس انجام گرفت.

شناسایی ریخت‌شناختی

به منظور شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی به‌دست آمده، خصوصیات هر یک از آن‌ها مطابق روش Leslie and Summerell (2006) مورد بررسی قرار گرفت. خصوصیات ماکروسکوپی همچون سرعت رشد و رنگ پرگنه روی محیط‌کشت PDA پس از هفت روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مداوم ارزیابی شد. بررسی وجود و یا عدم وجود میکروکنیدی‌ها، نحوه تشکیل آن‌ها و نوع فیالید، با کشت جدایه‌ها روی محیط‌کشت synthetic nutrient-poor agar (SNA) و نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مداوم به مدت هفت روز انجام گرفت. صفات میکروسکوپی دیگری همچون رنگ اسپورودوکیوم، شکل ماکروکنیدی‌ها و وجود و یا عدم وجود کلامیدوسپور نیز در محیط‌کشت برگ میخک آگار (CLA) پس از ۱۴ روز نگهداری جدایه‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی (تلفیقی از نور سفید و نور نزدیک به ماورای بنفش) و ۱۲ ساعت تاریکی مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از مشخصات ارزیابی شده، شناسایی جدایه‌ها انجام شد. جدایه‌هایی که به عنوان گونه *F. proliferatum* شناسایی شدند، در مرحله بعد مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند.

شناسایی مولکولی

برای اطمینان از شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی، تکثیر DNA به کمک آغازگرهای اختصاصی گونه انجام گرفت. بدین منظور استخراج DNA به روش CTAB انجام شد (Doyle and Doyle, 1990) و

تکثیر با استفاده از آغازگرهای Proli 1F و TEF 1R (جدول ۱) صورت گرفت (Amatulli *et al*., 2012). واکنش PCR به ازای هر نمونه در مخلوطی به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل پنج میکرولیتر آب دیونیزه، ۱۰ میکرولیتر مخلوط آماده‌ی PCR (Ampliqon, Denmark)، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکومول (با غلظت نهایی ۰/۵ پیکومول در حجم ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش) و سه میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم (با غلظت نهایی ۱/۵ نانوگرم در حجم ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش) انجام شد (Amatulli *et al*. (2012).

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ناحیه اختصاصی گونه ***Fusarium proliferatum*** و ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی آن.

Table 1. Used primers for amplifying of specific region of *Fusarium proliferatum* and its mating type idiomorphs.

Primer	Gene	Primer sequence	Reference
Proli 1F	*TEF*	5′-GTCACGTGTCAAGCAGCGA-3′	Amatulli *et al*. (2012)
TEF 1R	*TEF*	5′-GCGACAACATACCAATGACG-3′	Amatulli *et al*. (2012)
fusALPHAfor	*MAT-1*	5′- CGCCCTCTKAAYGSCTTCATG-3′	Kerenyi *et al*. (2004)
fusALPHArev	*MAT-1*	5′-GGARTARACYTTAGCAATYAGGGC-3′	Kerenyi *et al*. (2004)
fusHMGfor	*MAT-2*	5′-CGACCTCCCAAYGCYTACAT-3′	Kerenyi *et al*. (2004)
fusHMGrev	*MAT-2*	5′-TGGGCGGTACTGGTARTCRGG-3′	Kerenyi *et al*. (2004)

فرایند تکثیر در دستگاه ترموسایکلر مدل T3000 (Biometra, Germany) طبق برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده توسط Amatulli *et al*. (2012) تنظیم گردید با این تفاوت که دمای اتصال شش درجه افزایش داده شد. ارزیابی محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد انجام گرفت.

ردیابی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی

جهت ردیابی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در جدایه‌های به‌دست آمده، از دو جفت آغازگر به نام‌های fusALPHAfor، fusALPHArev، fusHMGfor و fusHMGrev (جدول ۱) استفاده شد (Kerenyi *et al*., 2004) که به ترتیب جفت اول برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۲۰۰ جفت باز از ناحیه آلفا باکس (α box) مربوط به ایدیومورف *MAT-1* و جفت دوم برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۲۵۰ جفت باز از ناحیه اچ ام جی باکس (HMG box) مربوط به ایدیومورف *MAT-2* می‌باشد. مخلوط واکنش multiplex PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر به ازای هر نمونه مطابق روش استفاده شده توسط Kerenyi *et al*. (2004) با کمی تغییرات انجام گرفت.

فرایند تکثیر در دستگاه ترموسایکلر مدل PTC 200 (MJ Research, USA) طبق برنامه حرارتی یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه؛ ۳۵ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام گرفت (Kerenyi *et al*., 2004). ارزیابی محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز دو درصد انجام گرفت.

آزمون باروری جنسی

پس از تعیین تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های مورد بررسی، با توجه به هتروتال بودن گونه *F. proliferatum* هر جدایه با تمام جدایه‌های متعلق به تیپ آمیزشی مخالف تلاقی داده شد. برای انجام این آزمون، محیط‌کشت هویج آگار (CA) مورد استفاده قرار گرفت و تلاقی‌ها به روش تلاقی متقابل مطابق روش Leslie and Summerell (2006) انجام شد.

برای انجام تلاقی‌ها، به طور همزمان هر جدایه و

جدایه‌ای از تیپ آمیزشی مخالف آن، روی دو محیط-کشت PDA آگار و CA کشت شدند. تشتک‌های پتری در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت هفت روز، محلول ۰/۲ درصد توین ۲۰ (Tween 20) به مقدار پنج میلی‌لیتر به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌کشت PDA برای هر جدایه اضافه شد و سوسپانسیون اسپوری تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون به تشتک پتری حاوی CA هر جدایه با تیپ آمیزشی مخالف اضافه شد و با یک میله شیشه‌ای خمیده با زاویه ۹۰ درجه پخش شد. از طرف دیگر، این آزمایش به طور همزمان برای جدایه‌ای از تیپ آمیزشی مخالف به همین ترتیب انجام گرفت. به عبارت دیگر، هر جدایه یک بار به عنوان والد ماده و بار دیگر به عنوان والد نر در تلاقی شرکت داده شد. به این ترتیب، در تلاقی که پریتسیوم تشکیل شود، جدایه پذیرنده به عنوان والد ماده و جدایه‌ای که سوسپانسیون اسپوری از آن تهیه شده است، به عنوان والد نر تلقی می‌شود. علاوه بر این، در هر سری تلاقی هر جدایه نیز به تنهایی روی محیط-کشت CAرشد داده شد و به این ترتیب عدم هموتال بودن آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام تلاقی‌ها، تشتک‌های پتری تلقیح شده به درون انکوباتور با تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی (تلفیقی از نور سفید و نور نزدیک به ماوراء بنفش) و ۱۲ ساعت تاریکی منتقل شدند و به مدت شش هفته در این شرایط با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در مدت زمان آزمایش، از روز ششم بعد از تلقیح به منظور اطلاع از وضعیت تلاقی‌ها به صورت روزانه بازرسی انجام شد. ارزیابی تلاقی‌ها نیز مطابق دستور العمل Leslie and Summerell (2006) انجام گرفت. سه تکرار برای هر تلاقی در نظر گرفته شد. تلاقی‌هایی مثبت محسوب شدند که حداقل در دو تکرار از سه تکرار آن‌ها پریتسیوم تشکیل شده باشد و تلاقی‌هایی منفی در نظر گرفته شدند که در هیچ‌یک از تکرارها پریتسیوم دیده نشده باشد. میزان باروری جدایه‌ها بر اساس تعداد پریتسیوم تشکیل شده در هر تشتک پتری ۶۰ میلی‌متری محاسبه شد. بدین منظور سه سطح باروری شامل باروری کم، متوسط و زیاد برای جدایه‌ها در نظر گرفته شد. در صورت تشکیل یک تا ۱۰ پریتسیوم: باروری کم، ۱۱ تا ۵۰ پریتسیوم: باروری متوسط و بیش از ۵۰ پریتسیوم: باروری زیاد ارزیابی شد (Hebert, 1971). بررسی جوانه‌زنی آسکوسپورهای حاصل از تلاقی‌ها به منظور آگاهی از قوه نامیه (viability) آن‌ها نیز انجام شد. بدین منظور از هر تلاقی موفق، یک پریتسیوم انتخاب گردید و در پنج میلی‌لیتر آب مقطر استریل غوطه‌ور شد. سپس به مدت یک دقیقه روی دستگاه ورتکس تکان داده شد تا کنیدی‌ها و هیف‌های اطراف پریتسیوم حتی‌الامکان از جداره آن جدا شوند. پس از آن، پریتسیوم به محیط‌کشت WA سه درصد منتقل گردید و با کمک دو سوزن استریل دیواره آن تخریب گردید. آسکوسپورهای درون پریتسیوم در سطح محیط‌کشت WAپخش شدند و بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مداوم، قابلیت جوانه‌زنی و تولید هیف در ۱۰ آسکوسپور مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی ریخت-شناختی

در نهایت از ۲۴ نمونه مربوط به ۱۷ منبع آبی، ۵۱ جدایه منتسب به گونه *F. proliferatum* جداسازی و خالص‌سازی شد. تعداد ۳۶ جدایه (۷۰/۶ درصد) از بستر رسوبات، ۱۳ جدایه (۲۵/۵ درصد) از بستر آب و دو جدایه (۳/۹ درصد) از بستر کف جداسازی شدند. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. اسیدیته در تمام مناطقی که جدایه‌ها از آن‌ها استحصال شدند بین ۷/۵ تا ۸/۶ ثبت شد که مقدار آن به تفکیک هر محل نمونه‌برداری بدین شرح است. اسیدیه رود کرج ۷/۷، رود ولایت رود ۸/۹، رود آجی-چای ۷/۵، رود آیدوغموش ۷/۶، تالاب قوری‌گل ۷/۸، رود شاپور ۸/۱، رود کرگان رود ۸/۳، آبشار گریت ۷/۸، رود کشکان ۸، تالاب پل‌دختر ۷/۵، رود زز ۷/۹، دریای خزر ۷/۸، رود تجن ۷/۵، رود تلار ۸ می‌باشد. داده‌های

مربوط به اسیدیته رود کاکارضا، رود رباط و نهر ناوکش در دسترس نیست. صفات ریخت‌شناختی ۵۱ جدایه به‌دست آمده به ویژگی‌های گونه *F. proliferatum* بسیار شبیه بود. پرگنه قارچ روی محیط‌کشت PDA به رنگ بنفش روشن بود. روی محیط‌کشت CLA نیز اسپورودوکیوم‌های نارنجی رنگ تشکیل شدند. ماکروکنیدیوم‌های تولید شده در اسپورودوکیوم‌ها، صاف و باریک بودند. سلول رأسی خمیده و سلول پایه در ماکروکنیدیوم‌ها تا حدودی پاشنه‌ای شکل بود. ماکروکنیدیوم‌ها دارای سه تا پنج دیواره عرضی بودند. میکروکنیدیوم‌ها به شکل گرزی شکل و بدون دیواره عرضی بودند. سلول کنیدی‌زا از نوع مونوفیالید و پلی‌فیالید بود. کلامیدوسپور در هیچ جدایه‌ای مشاهده نشد. روی محیط‌کشت SNA سرهای دروغین و زنجیره‌های کنیدیومی تشکیل شدند. این ویژگی‌ها با توصیف Leslie and Summerell (2006) از این گونه مطابقت داشت.

شناسایی مولکولی

شناسایی مولکولی ۵۱ جدایه‌ای که از لحاظ ریخت-شناختی دارای صفات شبیه به گونه *F. proliferatum* بودند، انجام شد. در این جدایه‌ها با کمک آغازگرهای اختصاصی قطعه‌ای به طول ۱۸۸ جفت باز تکثیر شد. اندازه قطعه تکثیر شده بیانگر وجود توالی هدف آغازگرهای اختصاصی گونه *F. proliferatum* در این جدایه‌ها می‌باشد. این جدایه‌ها برای مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۲. جدایه‌های *Fusarium proliferatum* به‌دست آمده از اکوسیستم‌های آبی (برخی رودخانه‌ها، تالاب‌ها، نهر، سد و دریای خزر).

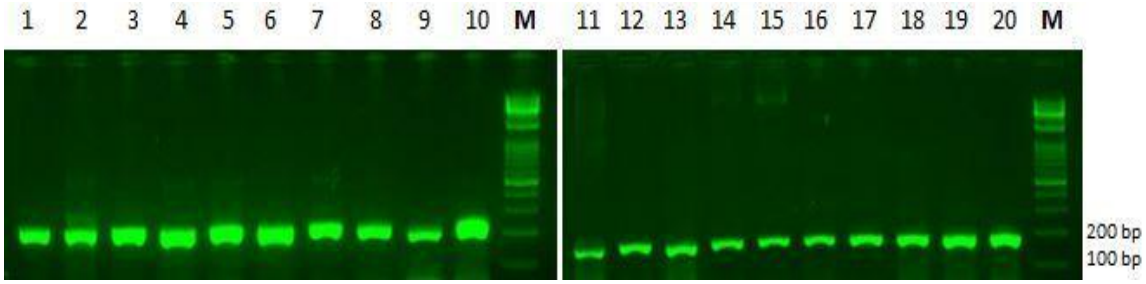
Table 2. *Fusarium proliferatum* isolates obtained from aquatic ecosystems (rivers, lagoons, stream, dam and Caspian Sea).

No.	Isolate name	Province	Aquatic ecosystem	Substrate	*MAT*	Geographical coordinates
1	Karaj Up-s-1	Alborz	Karaj River	sediments	*MAT-2*	36.31313, 51.219932
2	Karaj Up-s-2	Alborz	Karaj River	sediments	*MAT-2*	36.31313, 51.219932
3	Velayat-s-1	Alborz	Velayat Rud River	sediments	*MAT-2*	36.112204, 51.328598
4	Velayat-s-4	Alborz	Velayat Rud River	sediments	*MAT-2*	36.112204, 51.328598
5	Velayat-s-5	Alborz	Velayat Rud River	sediments	*MAT-2*	36.112204, 51.328598
6	AjiChay-s-3	East Azerbaijan	Aji Chy River	sediments	*MAT-2*	38.159949, 46.622348
7	AjiChay-s-4	East Azerbaijan	Aji Chy River	sediments	*MAT-2*	38.159949, 46.622348
8	Aydogh-s-5	East Azerbaijan	Aydoghmoush Dam	sediments	*MAT-1*	37.243271, 47.539150
9	Aydogh-s-6	East Azerbaijan	Aydoghmoush Dam	sediments	*MAT-1*	37.243271, 47.539150
10	Aydogh-w-1	East Azerbaijan	Aydoghmoush Dam	water	*MAT-1*	37.243271, 47.539150
11	Aydogh-w-2	East Azerbaijan	Aydoghmoush Dam	water	*MAT-1*	37.243271, 47.539150
12	GhouriGol-w-1	East Azerbaijan	Ghouri Gol Lagoon	water	*MAT-2*	37.909829, 46.696355
13	GhouriGol-w-2	East Azerbaijan	Ghouri Gol Lagoon	water	*MAT-2*	37.909829, 46.696355
14	Shadegan2-s-1	Khuzestan	Shadegan Lagoon	sediments	*MAT-2*	30.681649, 48.540171
15	Shadegan2-s-2	Khuzestan	Shadegan Lagoon	sediments	*MAT-2*	30.681649, 48.540171
16	Shapour-s-1	Fars	Shapour River	sediments	*MAT-2*	29.761581, 51.550753
17	Shapour-s-2	Fars	Shapour River	sediments	*MAT-2*	29.761581, 51.550753
18	Kargan-s-1	Guilan	Kargan Rud River	sediments	*MAT-1*	37.807849, 48.911552
19	Kargan-s-2	Guilan	Kargan Rud River	sediments	*MAT-1*	37.807849, 48.911552
20	Grit-s-11	Lorestan	Grit Waterfall	sediments	*MAT-2*	33.293858, 48.719208
21	Grit-s-12	Lorestan	Grit Waterfall	sediments	*MAT-2*	33.293858, 48.719208
22	Kaka-s-5	Lorestan	Kaka Reza River	sediments	*MAT-2*	33.703522, 48.385248
23	Kaka-s-6	Lorestan	Kaka Reza River	sediments	*MAT-2*	33.703522, 48.385248
24	Kaka-w-3	Lorestan	Kaka Reza River	water	*MAT-1*	33.703522, 48.385248
25	Kaka-w-4	Lorestan	Kaka Reza River	water	*MAT-1*	33.703522, 48.385248
26	Kashkan-s-9	Lorestan	Kashkan River	sediments	*MAT-2*	33.496924, 47.968156
27	Kashkan-s-10	Lorestan	Kashkan River	sediments	*MAT-2*	33.496924, 47.968156
28	NaveKash-s-3	Lorestan	Nave Kash Stream	sediments	*MAT-1*	33.529079, 48.118249
29	NaveKash-s-4	Lorestan	Nave Kash Stream	sediments	*MAT-1*	33.529079, 48.118249
30	NaveKash-w-1	Lorestan	Nave Kash Stream	water	*MAT-2*	33.529079, 48.118249
31	NaveKash-w-2	Lorestan	Nave Kash Stream	water	*MAT-2*	33.529079, 48.118249
32	NaveKash-w-3	Lorestan	Nave Kash Stream	water	*MAT-2*	33.529079, 48.118249
33	PoleDokhtar-s-1	Lorestan	Pole Dokhtar lagoon	sediments	*MAT-1*	33.082462, 47.697752
34	PoleDokhtar-s-2	Lorestan	Pole Dokhtar lagoon	sediments	*MAT-1*	33.082462, 47.697752
35	PoleDokhtar-s-3	Lorestan	Pole Dokhtar lagoon	sediments	*MAT-1*	33.082462, 47.697752
36	Robat-s-1	Lorestan	Robat River	sediments	*MAT-2*	33.641852, 48.293993

No.	Isolate name	Province	Aquatic ecosystem	Substrate	*MAT*	Geographical coordinates
37	Robat-s-2	Lorestan	Robat River	sediments	*MAT-2*	33.641852, 48.293993
38	Zaz-f-1	Lorestan	Zaz River	foam	*MAT-1*	33.214856, 48.892178
39	Zaz-f-2	Lorestan	Zaz River	foam	*MAT-1*	33.214856, 48.892178
40	Zaz-s-3	Lorestan	Zaz River	sediments	*MAT-1*	33.214856, 48.892178
41	Zaz-s-4	Lorestan	Zaz River	sediments	*MAT-1*	33.214856, 48.892178
42	Zaz-w-7	Lorestan	Zaz River	water	*MAT-1*	33.214856, 48.892178
43	Zaz-w-8	Lorestan	Zaz River	water	*MAT-1*	33.214856, 48.892178
44	Khazar-s-3	Mazandaran	Caspian Sea	sediments	*MAT-2*	36.890114, 50.725877
45	Khazar-s-4	Mazandaran	Caspian Sea	sediments	*MAT-2*	36.890114, 50.725877
46	Khazar-w-1	Mazandaran	Caspian Sea	water	*MAT-1*	36.890114, 50.725877
47	Khazar-w-2	Mazandaran	Caspian Sea	water	*MAT-1*	36.890114, 50.725877
48	Tajan-s-3	Mazandaran	Tajan River	sediments	*MAT-2*	36.501458, 53.082374
49	Tajan-s-4	Mazandaran	Tajan River	sediments	*MAT-2*	36.501458, 53.082374
50	Talar-s-3	Mazandaran	Talar River	sediments	*MAT-1*	36.339508, 52.854139
51	Talar-s-4	Mazandaran	Talar River	sediments	*MAT-1*	36.339508, 52.854139

ردیابی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی

در آزمون سازگاری جنسی، از ۵۱ جدایه، ۲۳ جدایه با جفت آغازگر fusALPHAfor و fusALPHArev تکثیر شدند. به‌طوری‌که قطعه‌ای به طول حدوداً ۲۰۰ جفت‌باز مربوط به ایدیومورف *MAT-1* تکثیر شد. همچنین در ۲۸ جدایه نیز، با جفت آغازگر fusHMGfor و fusHMGrev قطعه‌ای به طول تقریبی ۲۵۰ جفت‌باز تکثیر شد که به عنوان ایدیومورف *MAT-2* ردیابی شدند (شکل ۱). بنابراین در ۵۱ جدایه مورد بررسی، نسبت ایدیومورف *MAT-1* به *MAT-2* برابر با ۱/۲۱:۱ بود. توزیع ایدیومورف هر جدایه به تفکیک بستر جداسازی آن در جدول ۳ آورده شده است.



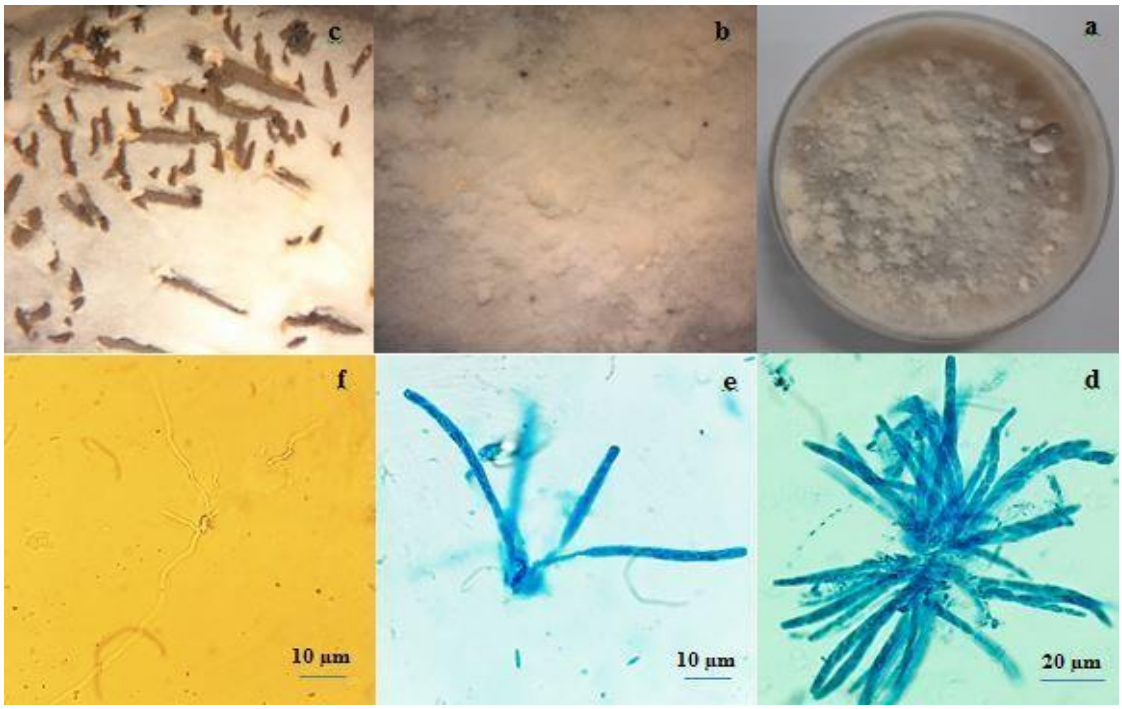
شکل ۱. ایدیومورف‌های *MAT-1* و *MAT-2* تکثیر شده در جدایه‌های قارچ *Fusarium proliferatum* در ژل آگارز دو درصد. قطعه تکثیر شده در جدایه‌های شماره ۱ تا ۱۰ مربوط به ایدیومورف *MAT-2* و در جدایه‌های شماره ۱۱ تا ۲۰ مربوط به ایدیومورف *MAT-1* می‌باشد. M بیانگر نشانگر اندازه DNA (ExcelBandTM 1KB Plus DNA Ladder, SMOBIO, Taiwan) است.

Fig. 1. Amplified *MAT-1* and *MAT-2* idiomorphs of *Fusarium proliferatum* isolates in 2% agarose gel. Isolates no. 1 to 10 with *MAT-2* idiomorph and isolates no. 11 to 20 with *MAT-1* idiomorph. M is DNA size marker (ExcelBandTM 1KB Plus DNA Ladder, SMOBIO, Taiwan).

آزمون باروری جنسی

در بررسی وضعیت باروری جدایه‌ها، در مجموع ۱۲۸۸ تلاقی بین جدایه‌ها انجام گرفت که با احتساب سه تکرار، تعداد کل تلاقی‌ها برابر با ۳۸۶۴ تلاقی بود. دو جدایه از تیپ آمیزشی *MAT-1* (جدایه‌های شماره ۸ و ۹) و دو جدایه از تیپ آمیزشی *MAT-2* (جدایه‌های شماره ۴۸ و ۴۹)، وقتی که به عنوان والد ماده در نظر گرفته شدند، توانستند با تمامی جدایه‌های مربوط به تیپ آمیزشی مخالف، پریتسیوم‌های حاوی آسک و آسکوسپور تولید نمایند (شکل ۲ a تا e). به این ترتیب، به عنوان جدایه‌های ماده بارور ارزیابی شدند. تلاقی‌های بارور در هر سه تکرار پریتسیوم تولید کردند. در جداول ۳ و ۴ چگونگی انجام تلاقی‌ها و نتایج آن‌ها آورده شده است. در هر یک از جدول‌ها، جدایه‌های یک تیپ آمیزشی به عنوان والد ماده (مطابق روش تلاقی متقابل) در تلاقی شرکت داده

شدند. در تمام تلاقی‌های موفق، میزان باروری در سطح متوسط (۱۱ تا ۵۰ پریتسیوم در هر تشتک پتری ۶۰ میلی‌متری) مشاهده شد. در پریتسیوم‌های حاصل، آسکوسپورهایی با میزان جوانه‌زنی ۷۰ تا ۸۰ درصد تولید شدند (شکل ۲، f). وضعیت باروری سایر جدایه‌ها به صورت نر باروری تعیین شد. به‌طوری‌که در هیچ‌یک از تکرارها پریتسیوم مشاهده نشد. همچنین در هیچ‌یک از تشتک‌های پتری که در آن هر جدایه به صورت منفرد کشت شده بود، هیچ پریتسیومی مشاهده نشد.



شکل ۲. فرم جنسی قارچ *Fusarium proliferatum* حاصل از تلاقی جدایه شماره ۸ و ۱۵. a تا c) پریتسیوم‌های تشکیل شده روی محیط‌کشت هویج آگار، d و e) آسک‌های حاوی آسکوسپورها و f) آسکوسپور جوانه زده حاصل از تلاقی روی محیط‌کشت آب آگار.

Fig. 2. Sexual state of *Fusarium proliferatum* produced following crosses between isolates no. 8 and 15. a-c) Perithecia produced on carrot agar culture medium, d and e) Asci with ascospores and f) Germinating ascospore on water agar produced in a fertile cross.

جدول ۳. وضعیت باروری جنسی جدایه‌های *Fusarium proliferatum* به‌دست آمده از اکوسیستم‌های آبی با جدایه‌های دارای تیپ آمیزشی *MAT-1* به عنوان والد ماده.

Table 3. Sexual fertility status of *Fusarium proliferatum* isolates recovered from aquatic ecosystems with *MAT-1* mating type isolates as female parent.

Isolates with *MAT-2* mating type (male parent)	Isolates with *MAT-1* mating type (female parent)																							
	8	9	10	11	18	19	24	25	28	29	33	34	35	38	39	40	41	42	43	46	47	50	51
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Isolates with *MAT-1* mating type (female parent)																							
	8	9	10	11	18	19	24	25	28	29	33	34	35	38	39	40	41	42	43	46	47	50	51
20	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: عدم تشکیل پریتسیوم +: تشکیل پریتسیوم

-: absence of perithecium +: presence of perithecium

جدول ۴. وضعیت باروری جنسی جدایه‌های *Fusarium proliferatum* به‌دست آمده از اکوسیستم‌های آبی با جدایه‌های تیپ آمیزشی *MAT-2* به عنوان والد ماده.

Table 4. Sexual fertility status of *Fusarium proliferatum* isolates recovered from aquatic ecosystems with *MAT-2* mating type isolates as female parent.

	Isolates with *MAT-1* mating type (male parent)																							
Isolates with *MAT-2* mating type (female parent)	8	9	10	11	18	19	24	25	28	29	33	34	35	38	39	40	41	42	43	46	47	50	51
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-: عدم تشکیل پریتسیوم +: تشکیل پریتسیوم

-: absence of perithecium +: presence of perithecium

بحث

جدایه‌های این تحقیق از نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های البرز، آذربایجان‌شرقی، خوزستان، فارس، گیلان، لرستان و مازندران استحصال شدند. وجود جدایه‌های قارچ *F. proliferatum* در شرایط متنوع اقلیمی حاکم بر مناطق نمونه‌برداری شده، نمایانگر امکان بقای این قارچ در اکوسیستم آبی متنوع می‌باشد. از میان کل جدایه‌های به‌دست آمده از نمونه-

های جمع‌آوری شده، بیشترین فراوانی (۴۷/۱ درصد کل جدایه‌ها) به استان لرستان تعلق دارد و پس از آن، استان‌های آذربایجان‌شرقی و مازندران هر یک با ۱۵/۷ درصد بیشترین فراوانی جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند. از استان البرز نیز ۹/۸ درصد جدایه‌ها استحصال شدند و استان‌های فارس، خوزستان و گیلان هر یک با ۳/۹ درصد، کمترین فراوانی جدایه را داشتند. هیچ جدایه‌ای از استان‌های کردستان و خراسان‌جنوبی به‌دست نیامد. میزان پراکنش جدایه‌ها در هر استان را می‌توان به عوامل متعددی نسبت داد. یکی از این عوامل تعداد منابع آبی نمونه‌برداری شده در هر استان می‌باشد که با توجه به کم آب یا پر آب بودن منطقه متغیر بود. طبعاً در مناطق پرآب‌تر امکان نمونه‌برداری از تعداد محل‌های بیشتری فراهم شده است. عامل موثر دیگر بر فراوانی جدایه‌ها در نمونه‌های بررسی شده، مجاورت مکان نمونه‌برداری با مزارع می‌باشد. چرا که بر اساس میزان آلودگی مزرعه مجاور محل نمونه‌برداری، امکان انتقال جدایه‌های این قارچ با رواناب‌های کشاورزی به منابع آبی فراهم می‌شود. همان‌طور که Abdel-Hameed *et al.* (2008) در تحقیق خود خاطر نشان کرده‌اند که جدایه‌های قارچی توانایی انتقال از خشکی به آب را دارا هستند و پس از آن با اشغال بافت‌های گیاهی موجود در آب، بقاء می‌یابند.

شوری آب نیز با تاثیر بر میزان اسپورزایی قارچ از دیگر عوامل موثر در فراوانی جدایه‌های قارچی موجود در منابع آبی می‌باشد (Dix and Webster, 1995). ورود فاضلاب‌های شهری که متاسفانه در بسیاری از منابع آبی مشاهده می‌شود نیز به شدت فراوانی جدایه‌های موجود در آب را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در نتیجه به دلیل اینکه به نظر می‌رسد منابع آبی نمونه‌برداری شده در استان لرستان از نظر عوامل ذکر شده، از شرایط مناسب‌تری برای جدایه‌های این گونه نسبت به سایر استان‌ها برخوردار بودند، میزان فراوانی جدایه‌ها در نمونه‌های این استان قابل توجیه می‌باشد. اولاً پرآب بودن استان لرستان و در نتیجه اخذ نمونه‌های بیشتر از این استان نسبت به استان‌های کم آب و دوماً آلودگی کمتر منابع آبی این استان توسط فاضلاب‌های شهری از علل این نتیجه می تواند باشد.

آزمون ردیابی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در جدایه‌های به‌دست آمده از اکوسیستم‌های آبی نشان داد که در مجموع فراوانی تیپ آمیزشی *MAT-2* (۵۴/۹ درصد) نسبت به تیپ آمیزشی مخالف (۴۵/۱ درصد) بیشتر است. این نسبت در کل جدایه‌ها (بدون تفکیک هر منطقه) در نظر گرفته شده است. همچنان‌که در مطالعات سایر محققین که گونه *F. proliferatum* به‌دست آمده از بافت‌های گیاهی را مورد بررسی قرار داده‌اند، نسبت تیپ‌های آمیزشی در جدایه‌های کل استان‌های نمونه‌برداری شده محاسبه شده است (Mohammadian *et al*., 2011; Alizadeh *et al*., 2017; Salleh and Salleh, 2017). اگرچه بررسی نسبت تیپ آمیزشی در هر منطقه نمونه‌برداری شده نیز نشان داد که عموماً یکی از تیپ‌های آمیزشی غالب است. بیشتر بودن یا غالب بودن یک تیپ آمیزشی در اکثر تحقیقات انجام شده روی جدایه‌های *F. proliferatum* به‌دست آمده از بافت‌های گیاهی مشاهده شده است. به‌طوری‌که روی گیاه برنج، تیپ آمیزشی *MAT-2* به عنوان ایدیومورف غالب در جمعیت‌های مورد مطالعه این گونه ارزیابی شده است. در تحقیق Alian *et al.* (2008) تمام جدایه‌های حاصل از برنج در استان مازندران متعلق به تیپ آمیزشی *MAT-2* ارزیابی شدند. در تحقیق Lotfi-Miri *et al.* (2010) و Abbaszadeh *et al.* (2007) نیز جدایه‌های به‌دست آمده از برنج در استان گیلان به ترتیب با ۷۵ درصد و ۶۵ درصد، متعلق به تیپ آمیزشی *MAT-2* شناسایی شده‌اند. از سوی دیگر در مطالعات انجام شده در مورد جدایه‌های قارچ *F. proliferatum* به‌دست آمده از گیاه ذرت، تیپ آمیزشی غالب از نوع ایدیومورف *MAT-1* تشخیص داده شده است. به‌طوری‌که در تحقیق انجام شده توسط Mohd Zainudin *et al.* (2017) تیپ آمیزشی ۹۳ درصد جدایه‌های به‌دست آمده از چندین منطقه در کشور مالزی از نوع *MAT-1* شناسایی شده‌اند. همچنین در ۷۵ درصد از جدایه‌های به دست آمده از

مناطق مختلف کشورهای اندونزی و تایلند نیز تیپ آمیزشی *MAT-1* شناسایی شده است (Salleh and Salleh, 2017). در تحقیق دیگری که جدایه‌های به‌دست آمده از گیاه ذرت در کشور صربستان مورد بررسی قرار گرفتند، ۸۳ درصد از جدایه‌ها متعلق به تیپ آمیزشی *MAT-1* شناسایی شده‌اند (Kovacevic *et al*., 2013). مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً بقا و گسترش هر یک از ایدیومورف‌ها وابسته به نوع میزبان باشد. همچنان‌که Zeigler (1998) در مورد علت غالب بودن یک تیپ آمیزشی در جمعیت‌های مورد مطالعه در قارچ *Magnaporthe grisea* (syn: *Magnaporthe oryzae*) بیان می‌کند که این رویداد می‌تواند ناشی از پیوستگی ژن‌های جایگاه ژنی *MAT* با آلل‌های بیماری‌زایی در میزبان باشد. بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به این که به طور کلی در اکوسیستم آبی بستری متشکل از قطعات گیاهی متنوع به صورت غوطه‌ور در آب فراهم می‌شود، امکان بقای هر دو ایدیومورف در چنین شرایطی بیشتر از شرایط مزرعه است. از سوی دیگر در جدایه‌های به‌دست آمده از رود کاکارضا و نهر ناوه‌کش نسبت متوازنی از تیپ‌های آمیزشی وجود دارد. به‌طوری‌که نسبت تیپ آمیزشی *MAT-1* به *MAT-2* در رود کاکارضا ۲:۲ و در نهر ناوه‌کش ۲:۳ می‌باشد. اگرچه وجود دو تیپ آمیزشی به تنهایی برای اثبات وقوع تولیدمثل جنسی کافی نیست، اما طبق نظر Milgroom (1996) وقتی‌که نسبت تقریباً برابری از تیپ های آمیزشی در جمعیت وجود داشته باشد احتمال بروز آن افزایش می‌یابد. سازگاری جنسی لازمه وقوع تولیدمثل جنسی در قارچ‌های هتروتال است و اگر جدایه‌هایی از هر دو تیپ آمیزشی در جمعیت وجود داشته باشند امکان تشکیل فرم جنسی توسط قارچ فراهم می‌شود (Coppin *et al*., 1997). اما علاوه بر سازگاری جنسی، وضعیت باروری جدایه‌ها نیز در بروز تولیدمثل جنسی نقش دارد. به‌طوری‌که حداقل یکی از دو والد می‌بایست ماده بارور باشند. وجود جدایه‌های ماده بارور در بین جدایه‌های مزرعه‌ای جنس *Fusarium* نادر است و نر باروری (ماده عقیمی) در بسیاری از تحقیقات مرتبط با بررسی جدایه‌های گونه *F. proliferatum* در گیاه برنج و ذرت بارها گزارش شده است (Chulze *et al*., 2000; Abbaszadeh *et al*., 2007; Alian *et al*., 2008; Lotfi-Miri *et al*., 2010; Alizadeh *et al*., 2017; Mohd Zainudin *et al*., 2017). به همین دلیل به منظور بررسی باروری جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی از جدایه‌های استاندارد استفاده می‌شود (Kerenyi *et al*., 1999; Leslie and Summerell, 2006). با وجود این، در تحقیق حاضر، تلاقی‌ها بین جدایه‌های (intercrosses) جمع‌آوری شده از اکوسیستم آبی انجام گرفت و نتایج نشان دادند که بر خلاف شرایط معمول حاکم بر مزرعه، جدایه‌های ماده بارور در منابع آبی بقاء یافته‌اند. به‌طوری‌که چهار جدایه ماده بارور در بین جدایه‌های به‌دست آمده از منابع آبی بررسی شده در این تحقیق مشاهده شدند. دو جدایه متعلق به تیپ آمیزشی *MAT-1* و دو جدایه متعلق به تیپ آمیزشی *MAT-2* بودند که هر یک از آن‌ها توانستند به عنوان والد ماده با تمام جدایه‌های مربوط به تیپ آمیزشی مخالف تولیدمثل جنسی انجام داده و پریتسیوم‌های بارور تشکیل دهند. به این ترتیب در مجموع، در ۱۰۲ تلاقی پریتسیوم حاوی آسک و آسکوسپور مشاهده شدند. از آنجا که مطابق اظهارات Mekwatanekam *et al*. (1999) باروری به عنوان تشکیل پریتسیوم‌های تولید کننده آسکوسپورهای دارای قدرت تندش (viable) تعریف می‌شود، بنابراین در این تحقیق نیز جوانه‌زنی آسکوسپورها به منظور اطمینان از توانایی قدرت تندش آن‌ها بررسی شد و نتیجه مثبت ارزیابی گردید. این چهار جدایه می‌توانند کاندید تولید جدایه‌های استاندارد برای آزمایش‌های سازگاری جنسی و باروری در این گونه باشند. برای تولید جدایه‌های استاندارد انجام یک یا دو نسل تلاقی برگشتی (backcross) به منظور افزایش باروری توصیه می‌شود (Leslie and Summerell, 2006).

این نتایج نشان می‌دهند که علی‌رغم کم‌یاب بودن جدایه‌های ماده بارور در مزرعه (Leslie and Klein, 1996; Venturini *et al*., 2011)، وجود آن‌ها در اکوسیستم‌های آبی قابل تامل می‌باشد. این موضوع را

می‌توان به نوع برهم کنش قارچ و محل زندگی آن نسبت داد که در نهایت موجب بقای چنین جدایه‌هایی در آب شده است. به نظر می‌رسد عواملی از جمله اسیدیته و دما بتوانند در بقای قارچ در محیط آب تاثیرگذار باشند. میزان اسیدیته آب در مناطقی که جدایه‌های ماده بارور از آن به دست آمده‌اند ۷/۵ و ۷/۶ بوده است که به ترتیب مربوط به رود تجن (منشاء جدایه‌های *MAT-2* در این تحقیق) و سد آیدوغموش (منشاء جدایه‌های *MAT-1* در این تحقیق) می‌باشد. دمای آب نیز در تمام مناطق نمونه‌برداری شده، همواره کمتر از دمای خاک ارزیابی شد. بنابراین احتمال اینکه یکی از دلایل بقای این جدایه‌های ماده بارور شرایط محیطی حاکم بر آب باشد دور از تصور نیست. تمامی اطلاعات مذکور با شرط در ارتباط بودن جدایه‌های آب و خاک است که می‌تواند در شناخت عوامل موثر در بیماری‌های گیاهی مفید واقع شود. وجود چنین پیوستگی در اکوسیستم آب و خشکی مورد تایید قرار گرفته است (Lacey, 1981; Abdel-Hameed *et al*., 2008; Elmer, 2008). در تحقیقات انجام شده پیرامون قارچ *Pyricularia oryzea* نقل شده است که با دانستن فراوانی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی و وضعیت باروری جدایه‌ها می‌توان احتمال وقوع تولیدمثل جنسی در یک جمعیت را برآورد کرد (Viji and Gnanamanicham, 1998). معمولاً وجود نسبت متوازنی از تیپ‌های آمیزشی در جمعیت، حاکی از فراوانی چرخه تولیدمثل جنسی است (Neddaf *et al*., 2017). از سوی دیگر وجود جدایه‌های ماده بارور نشان دهنده وقوع تولیدمثل جنسی در گذشته‌ای نزدیک یا افزایش احتمال وقوع آن در آینده است (Tredway *et al*., 2003). اگرچه فرم جنسی قارچ به ندرت در طبیعت مشاهده می‌شود اما عدم مشاهده آن در مزرعه، دال بر عدم وقوع آن نیست بلکه می‌تواند به عوامل دیگری وابسته باشد (Tsui *et al*., 2013). پس با توجه به نتایج تحقیق حاضر، احتمال بروز تولیدمثل جنسی در اکوسیستم آب و یا پس از انتقال جدایه‌ها به خشکی وجود دارد. بنابراین همان‌طور که تنوع ژنتیکی مشاهده شده در قارچ *F. proliferatum* در مزارع به دلیل عدم وجود جدایه‌های ماده بارور به عواملی مثل سازگاری رویشی و چرخه شبه‌جنسی نسبت داده می‌شود (Milgroom, 1996)، انتقال جدایه‌های حامل ژن‌های جدید نوترکیب (حاصل از تولیدمثل جنسی) از آب به خاک توسط آبیاری و باد هم می‌تواند به عنوان عامل موثر دیگری در این موضوع مورد انتظار باشد.

تحقیق حاضر اولین پژوهش در زمینه شناسایی گونه‌های جنس *Fusarium* از برخی اکوسیستم‌های آبی، بررسی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی آن‌ها و بررسی امکان باروری جنسی جدایه‌های حاصل در شرایط آزمایشگاهی است. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهند که امکان بقای جدایه‌های گونه *F. proliferatum* در اکوسیستم آبی وجود دارد. همچنین در این جدایه‌ها، امکان بقای هر دو ایدیومورف تیپ آمیزشی در منابع آبی نشان داده شده است. از سوی دیگر استحصال جدایه‌های ماده بارور در این مطالعه که به ندرت در بین جدایه‌های به‌دست آمده از اکوسیستم خشکی مشاهده می‌شود نشان‌دهنده این است که شرایط محیطی حاکم بر اکوسیستم آبی می‌تواند بر باروری جدایه‌ها تاثیرگذار باشد. این یافته‌ها در تکمیل اطلاعات موجود در زمینه بوم‌شناسی و زیست‌شناسی گونه مورد مطالعه می‌تواند کمک‌کننده باشد. بدیهی است شناخت بهتر جنبه‌های مختلف زندگی قارچ‌ها برای اتخاذ مناسب‌ترین روش‌های مدیریتی بیماری‌های گیاهی مرتبط با آن‌ها مفید خواهد بود. بنابراین مطالعه اکوسیستم آبی به موازات بررسی‌های معمول اکوسیستم خشکی، جالب توجه به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران، دانشگاه بولونیا کشور ایتالیا و همچنین صندوق حمایت از پژوهشگران انجام گرفته است. لذا نویسندگان از همگی آن‌ها برای حمایت مالی این تحقیق تشکر و قدرانی می‌نمایند.

REFERENCES

1. Abbaszadeh, M., Javan-Nikkhah, M. and Padasht-Dekaei, F. (2007). Sexual fertility and mating types of *Gibberella fujikuroi* species complex, the cause of bakanae disease and foot rot in Guilan province, Iran. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 38, 685-692. (In Farsi)
2. Abdel-Hameed, A. A., El-Hawarry, S. and Kamel, M. M. (2008). Prevalence and distribution of airborne and waterborne fungi and *Actinomycetes* in the Nile River. *Aerobiology*, 24, 231-240.
3. Alian, A., Javan-Nikkhah, M., Aminian, H. and Khosravi, V. (2008). Investigation on mating populations and mating types of *Gibberella fujikuroi*, the causal agent of rice bakanae disease in Mazandaran province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 44, 121-136. (In Farsi)
4. Alizadeh, A., Javan-Nikkhah, M., Salehi-Jouzani, G. R., Fotouhifar, Kh. B., Roodbar-Shojaei, T., Rahjoo V. and Taherkhani K. (2017). AFLP, pathogenicity and mating type analysis of Iranian *Fusarium proliferatum* isolates recovered from maize, rice, sugarcane and onion. *Mycologia Iranica*, 4(1), 13-28.
5. Amatulli, M. T., Spadaro, D., Gullino, M. L. and Garibaldi, A. (2012). Conventional and real-time PCR for the identification of *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium proliferatum* from diseased rice tissues and seeds. *European Journal of Plant Pathology*, 134(2), 401-408.
6. 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(12), 5312-5315.
7. Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S. and Picard, M. (1997). Mating type and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 411-428.
8. Dix, N. J. and Webster, J. (1995). *Fungal Ecology*. Chapman and Hall, London, UK.
9. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
10. Elmer, W. H. (2008). Preventing spread of *Fusarium* wilt of *Hiemalis begonias* in the greenhouse. *Crop Protection*, 27, 1078-1083.
11. Gil-Serna, J., Galvez, L., Paris, M. and Palmero, D. (2016). *Fusarium proliferatum* from rainwater and rooted garlic show genetic and pathogenicity differences. *European Journal of Plant Pathology*, 146(1), 199-206.
12. Gordon, W. L. (1960). The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperate regions. *Canadian Journal of Botany*, 38, 643-658.
13. Hebert, T. T. (1971). The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*, 61, 83-87.
14. Heidari, H. and Alijani, B. (1999). Climatologically classification of Iran using multivariate statistical methods. *Geographical Research*, 37: 74-57. (In Farsi)
15. Igbal, S. H. and Webster, J. (1995). Aquatic hyphomycetes spora of the River Exe and its tributaries. *Transactions of the British Mycological Society*, 61(2), 331-346.
16. Jafari, A. A., Ghaneian, M. T., Ehrampoush, M. H. and Zarei, S. (2011). Survey of fungal contamination in surfaces of Yazd indoor swimming pools in 2011. *The Journal of Toloo-e-behdasht*, 39(2): 61-69. (In Farsi)
17. Kerenyi, Z., Zeller K., Hornok, L. and Leslie, J. F. (1999). Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4071-4076.
18. Kerenyi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Olah, B. and Hornok, L. (2004). Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4419-4423.
19. Khatabakhsh, M. (1996). *Distribution of aquatic freshwater leaf-inhabiting Hyphomycetes associated with aquatic plants in Caspian Sea shores*. M. Sc. Thesis in plant pathology, Tarbiat Modares University, Iran. (In Farsi)
20. Kovacevic, T., Levic, J., Stankovic, S. and Vukojevic, J. (2013). Mating populations of *Gibberella fujikuroi* (Sawada) S. Ito species complex isolating from maize, sorghum and wheat in Serbia. *Genetika*, 45(3), 749-760.
21. Lacey, J. (1981). The aerobiology of conidial fungi. *Biology of Conidial Fungi*, 1, 373–416.
22. Leslie, J. F. and Klein, K. K. 1996. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics*, 144, 557-567.
23. Leslie, J. F. and Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Professional, Ames, USA.
24. Lotfi-Miri, F., Javan-Nikkhah, M., Zamani H. R. and Padasht-Dehkai, F. (2011). Mating populations of *Gibberella fujikuroi* species complex, the causal agent of rice foot rot in Guilan province, and determination of their vegetative compatibility groups. *Iranian Journal of Plant Protection Science*,

42(1), 61-74. (In Farsi)
25. Martin, S. H., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. and Steenkamp, E. T. (2011). Structure and evolution of the *Fusarium* mating type locus: new insights from the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 731-740.
26. Mekwatanakarn, P., Kositratana, W., Phormraka, T. and Zeigler, R. S. (1999). Sexually fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. *Plant Disease*, 83(10), 939-943.
27. Milgroom, M. 1996. Recombination and multilocus structure of fungal population. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 457-477.
28. Mohammadian, E., Javan–Nikkhah M., Okhovat S. M. and Ghazanfari, K. (2011). Study on genetic diversity of *Gibberella moniliformis* and *G. intermedia* from corn and rice, and determination of fertility status and of mating type alleles. *Australian Journal of Crop Science*, 5(11), 1448-1454.
29. Mohd Zainudin, N. A. I., Hamzah, F. A., Kusal, N. A., Zambri, N. S. and Salleh, S. (2017). Characterization and pathogenicity of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides*, causal agents of *Fusarium* ear rot of corn. *Turkish Journal of Biology*, 41, 220-230.
30. Mollazadeh, P. and Malakootian, M. (2010). Survey of fungi contamination and chemical water experiment in public pools of Kerman city. In: Proceedings of *13th National Congress On Environmental Health*, 1-3 Nov, Kerman, Iran, pp. 1-5. (In Farsi)
31. Moncrief, I., Garzon, C., Marek, S., Stack, J., Gamliel, A., Garrido, P., Proano, F., Gard, M., Dehne, H. and Fletcher, J. (2016). Development of simple sequence repeat (SSR) markers for discrimination among isolates of *Fusarium proliferatum*. *Journal of Microbiological Methods*, 126, 12-17.
32. Neddaf, H. M., Aouini, L., Bouznad, Z. and Kema, G. H. J. (2017). Equal distribution of mating type alleles and the presence of strobilurin resistance in Algerian *Zymoseptoria tritici* field populations. *Plant Disease*, 101, 544-549.
33. Palmero, D., Iglesias, C., de-Cara, M., Lomas, T., Santos, M. and Tello, J. C. (2009). Species of *Fusarium* isolated from river and sea water of southeastern Spain and pathogenicity on four plant species. *Plant Disease*, 93, 377-385.
34. Palmero, D., Rodriguez, J. M., de-Cara, M., Camacho, F., Iglesias, C. and Tello, J. C. (2011). Fungal microbiota from rain water and pathogenicity of *Fusarium* species isolated from atmospheric dust and rainfall dust. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 13-20.
35. Salleh, D and Salleh, B. (2017). Morphological characteristics and mating populations of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex (Gfsc) associated with stalk rot disease of maize in Indonesia, Malaysia and Thailand. *Plant Pathology Journal*, 16, 33-40.
36. Tredway, L. P., Stevenson, K. L. and Burpee, L. L. (2003). Mating type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations form turfgrass in Georgia. *Plant Disease*, 87, 435-441.
37. Tsui, C. K. M., DiGuistini, S., Wang, Y., Feau, N., Dhillon, B., Bohlmann, J. and Hamelin, R. C. (2013). Unequal recombination and evolution of the mating-type (*MAT*) loci in the pathogenic fungus *Grosmannia clavigera* and relatives. *G3-Genes Genomes Genetics*, 3(3), 4957-4962.
38. Venturini, G., Assante, G., Toffolatti, S. L. and Vercesi, A. (2011). Mating behavior of a Northern Italian population of *Fusarium verticillioides* associated with maize. *Journal of Applied Genetics*, 52, 367-370.
39. Viji, G. and Gnanamanickam, S. S. 1998. Mating type distribution and fertility status of *Magnaporthe grisea* populations from various hosts in India. *Plant Disease*, 82, 36-40.
40. Waalwijk, C., Keszthelyi, A., van-der-Lee, T., Jeney, A., de-Vries, I. and Kerenyi, Z. (2006). Mating type loci in *Fusarium*: structure and function. *Mycotoxin Research*, 22(1): 54-60.
41. Zeigler, R. S. 1998. Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 249-275.