تعیین گروهها و تیپهای آمیزشی در قارچ
Fusarium moniliforme

رضا فرخی نژاد[1]

چهارصد و شش جدایه از *Fusarium moniliforme* از بذور و گیاهان آلوده به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه دو رقم ذرت هیبرید (۳۴۷۵ و ۳۳۷۷) جداسازی شد. بذور از دوازده منطقه جغرافیایی متفاوت و گیاهان بیمار از یک منطقه در بخش شمال مرکزی کشور آمریکا جمع آوری شده بودند. پس از خالص سازی و تشخیص جدایه‌های فوزاریوم تا سطح گونه، جدایه‌های متفاوت قارچ با جدایه‌های استاندارد گروههای آمیزشی A و D روی محیط کشت هویج آگار آمیزش داده شدند. نتایج مشخص نمود که بیش از ۹۷٪ از جدایه‌های مورد مطالعه به گروه آمیزشی A و کمتر از ۳٪ جمعیت به گروه (های) آمیزشی دیگر تعلق داشتند. در دو منطقه تمام جدایه‌های مورد مطالعه به گروه آمیزشی A و در بقیه مناطق بین ۳ تا ٦٪ از جمعیت هر منطقه به گروه (های) دیگر تعلق داشتند. در یازده منطقه هر دو تیپ آمیزشی A^+ و A^- وجود دلشت ولی در دو منطقه تیپ آمیزشی A^- وجود نداشت. تیپهای آمیزشی A^- و A^+ در مناطق مختلف به ترتیب ٦۳ - ۷٪ و ۳۰-۱۳٪ از جمعیت جدایه‌های مورد مطالعه را تشکیل دادند. این نتایج همچنین مشخص نمود که ۴۰٪ جمعیت مورد مطالعه را افراد دو جنسی تشکیل می‌دهند. این تیپ آمیزشی ۸۱-۱۳٪ جمعیت افراد هر منطقه را به خود اختصاص داد.

واژه‌های کلیدی: گروههای آمیزشی، تیپ‌های آمیزشی، سازگاری جنسی، هرمافرودیت.

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

مقدمه:

گونه *Fusarium moniliforme* (Sheld) emend Snyder & Hans قارچی از شبه‌رده قارچهای ناقص[۱]، شبه‌راسته مونیلیال[۲]، شبه‌خانواده توبرکولاریاسه[۳] وبخش لسیولا[۴] می‌باشد. این قارچ در مناطق معتدل، گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان گسترش داشته و بیمارگر عمده محصولات مختلفی از قبیل گندم، جو، برنج، ذرت، سورگوم، نیشکر، پنبه (۳)، مارچوبه (۸) و انبه (۲۸) به حساب می‌آید. این قارچ هم چنین باعث بیماریهایی از قبیل مرگ گیاهچه، سوختگی برگ، پوسیدگی طوقه، کوتولگی و هیپرتروفی در گیاهان مختلفی از خانواده‌های مختلف گیاهی می‌گردد (۳). ازاین گذشته قارچ تولید مقادیر مهمی از متابولیتهای ثانویه مثل اسید جیبرلیک (۲۴) و مایکوتوکسینهایی از قبیل مونیلیفورمین[۵] (۲۰)، فوزارین C[۶] (۲۹)، اسیدفوزاریک (۲۰)، و فومونیزین[۷] (۲۵،۲۳،۱۹،۹) می‌نماید.

سردرگمی موجود در تعریف و در کلیدهای تشخیص گونه‌های فوزاریوم، تشخیص صحیح جدایه هایی را که بیمارگرهای مهم گیاهی بوده و یا متابولیت‌های ثانویه مهمی را تولید می‌کنند (برای محققینی که با تاکسونومی این گروه مهم از قارچها آشنا نیستند) مشکل ساخته است. این امر باعث ایجاد آشفتگی‌های قابل ملاحظه‌ای در مورد فوزاریوم در نوشته‌های علمی شده است (۱۷،۱۳). برای اجتناب از چنین سردرگمی هایی، بعضی از پژوهشگران (۱۷) استفاده از مرحله جنسی قارچ را (که معمولاً بر اساس سازگاری جنسی[۸] است) به عنوان یک راه حل احتمالی برای تشخیص گونه‌های جنس فوزاریوم پیشنهاد داده‌اند.

سازگاری جنسی یک روش کلاسیک ژنتیکی است که می‌تواند بصورت ابزار ارزشمندی در تشخیص قارچهای بیماریزای خاکزاد به ما کمک کند (۶). سازگاری جنسی به خصوصیات

1- Form class Deuteromycetes
2- Form order Moniliales
3- Form family tubercularíaceae
4- Section *Liseola*
5- Moniliformin
6- Fusarin C
7- Fumonisins
8- Sexual compatibility

ژنتیکی قارچ بستگی داشته و وسیله بسیار مهمی برای اهداف تاکسونومیکی و تشخیص قارچها محسوب می‌گردد. این روش برای تشخیص گونه‌ها و نیز جمعیتهای آمیزشی[۱] یا گونه‌های بیولوژیکی[۲] درون یک گونه بکار می‌رود (۶). در قارچهای ناجور ریسه[۳] آسکومیست و بازیدیومیست سازگاری جنسی یا سازگاری آمیزشی از طریق آمیزش افراد روی محیط کشتهای مصنوعی یا طبیعی و مشاهده نتایج حاصل از آمیزش (تولید آسکوسپور یا بازیدیوسپور) بین دو فرد تعیین می‌شود (۶).

در قارچ *F. moniliforme* تنها انواع ناجور ریسه شناخته شده‌اند (۱۰،۵). تحت شرایط آزمایشگاهی مناسب، در صورت وجود تیپ‌های آمیزشی سازگار[۴] تولید مثل جنسی قارچ بسهولت انجام می‌گیرد (۵). مرحله جنسی (تلمورف[۵]) قارچ *F. moniliforme* برای نخستین بار توسط وینلند[۶] (۳۰) با نام *Gibberella moniliformis* شناخته شده است، و این هنگامی بود که نامبرده دو تیپ آمیزشی سازگار از قارچ فوزاریوم را در محیط کشت مجاور هم قرار داد (۱۰). مرحله جنسی قارچ بعداً بصورت *G. fujikuroi* (Sawada) Wollenweber اصلاح شد (۲۷). جیبرلا قارچی از رده آسکومیست (پیرنومیستها[۷])، راسته هیپوکریال،[۸] و خانواده نکتریاسه[۹] می‌باشد (۲). پیدایش طبیعی مرحله جنسی قارچ از کشورهای مختلف از جمله ژاپن، تایوان، آمریکا، استرالیا، مکزیک، اروپای مرکزی و ایتالیا گزارش گردیده است (۱۰). قارچ *G. fujikuroi* یک گونه مرکب بوده (۳) که تاکنون حداقل شش گونه بیولوژیکی (جمعیت آمیزشی) متفاوت در آن تشخیص داده شده است (۱۸ ، ۱۷).

در سال ۱۹۷۷ سیه و همکاران[۱۰] (۱۰) ۶۰ جدایه از *F.moniliforme* را که از مناطق

1- Mating populations
2- Biological species
3- Heterothallic
4- Compatible mating types
5- Teleomorph
6- Wineland
7- Pyrenomycetes
8- Hypocreales
9- Nectriaceae
10 - Hsieh *et al.*,

مختلف، گیاهان متفاوت و حشرات گوناگون تغذیه کننده روی گیاهان آلوده جدا شده بودند با همدیگر تلاقی دادند. نتایج پژوهش نشان داد که در میان جدایه‌های فوق ۱۹ جدایه با یک یا تعداد بیشتری از جدایه‌ها باموفقیت آمیزش کرده و تولید آسکوکارپ نمودند. این جدایه‌های بارور در سه گروه آمیزشی [۱] متفاوت که محققین فوق آنها را با حروف C،B،A مشخص نموده بودند قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد که از ۱۹ جدایه فوق، پنج جدایه دو جنسی [۲] وبقیه یک جنسی بودند. در بین جدایه‌های یک جنسی هشت جدایه بعنوان نر و شش جدایه بعنوان ماده گزارش شدند. در این بررسی جدایه‌های برنج در گروه آمیزشی C، جدایه‌های نیشکر در گروه آمیزشی B و جدایه‌های ذرت، گندم، چاودار، کاج و حشرات در گروه آمیزشی A قرار گرفتند. در سال ۱۹۸۲ کولمان [۳] (۱۶) از تلاقی جدایه‌های *G. fujikuroi* var *subglutinans* و جدایه‌های فوزاریوم عامل شانکر سیاه[۴] کاج به عنوان معیاری جهت تأیید تشخیص فوزاریوم عامل شانکر سیاه به عنوان *G.f.* var *subglutinans* استفاده نمود. نامبرده ۱۰۸ جدایه از فوزاریومهای موجود در بخش لسیولا راکه از میزبانها و منابع متفاوت از مناطق مختلف دریافت کرده بود در این مطالعه به کار برد. نتایج تحقیقات کولمان نشان داد که از بین جدایه‌های فوق تنها ۳۹ جدایه بارور بودند. بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، این جدایه‌ها در چهار گروه متفاوت C،B،A و D قرار گرفتند و به این ترتیب گروه آمیزشی D به گروههای آمیزشی دیگر اضافه شد. در سال ۱۹۹۰ لسلی و همکاران [۵] (۱۸) در بررسی جمعیتهای فوزاریوم جمع آوری شده از مزارع سورگوم و ذرت دو گروه آمیزشی دیگر یعنی F و E را معرفی نمودند. در تحقیقاتی که متعاقباً صورت گرفت معلوم شد که گروه آمیزشی E دارای مرحله غیر جنسی *F. subglutinans* (۱۷،۱۸) و گروه آمیزشی F دارای مرحله غیر جنسی *F.moniliforme* می‌باشد (۱۸، ۱۷، ۱۵). گروه آمیزشی F بعداً بعنوان دومین گروه

1- mating group
2- Hermaphroditic
3- Kuhlman
4- Pitch canker

آمیزشی در قارچ *F. moniliforme* معرفی شد (۱۵).

هدف از این مطالعه تعیین گروه(ها) و تیپهای آمیزشی جدایه‌هایی از *F. moniliforme* بود که از بذور دو رقم ذرت هیبرید (۳۳۷۷ و ۳۴۷۵) جمع آوری شده از ۱۲ منطقه مختلف کشور آمریکا و نیز گیاهان ذرت آلوده به بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه همان ارقام در منطقه مانهاتان کانزاس جدا شده بودند.

مواد و روشها

جدایه‌های قارچ:

برای تهیه جدایه‌های قارچ از بذور دو رقم هیبرید ذرت که از ۱۲ منطقه مختلف در بخش شمال مرکزی کشور آمریکا جمع آوری شده بودند و نیز از گیاهان آلوده همان ارقام که در منطقه مانهاتان کانزاس رشد کرده بودند استفاده شد (جدول ۱). تمام گیاهان جمع آوری شده علائم پوسیدگی ریشه و طوقه را به همراه داشتند.

محیط کشت‌های مورد استفاده

برای جداسازی قارچها از بذور، از هر نمونه ۱۶ عدد بذر بطور تصادفی انتخاب و در محیط کشت انتخابی فوزاریوم[1] (۲۱) کشت گردید. برای جداسازی قارچ از گیاهان آلوده نیز پس از شستشوی نمونه‌های گیاهی با آب لوله‌کشی، قطعات کوچک سه میلیمتری از حد فاصل بافتهای سالم و آلوده جدا و روی محیط کشت فوق کشت گردیدند. در هر تشتک پتری چهار عدد بذر و یا چهار قطعه از بافت گیاهان آلوده گذاشته شد. سپس ظروف کشت در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شدند. بعد از حدود یک هفته، از هر کلنی قارچ یک قطعه کوچک دو میلیمتری جدا و به محیط کشت کامل[2] (۷) منتقل و ظروف کشت مجدداً به انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل گردیدند.

1- Nash & Snyder

2- Complete medium

جدول ۱ - محل جمع‌آوری بذور، تعداد جدایه، گروه، تیپهای آمیزشی جدایه‌ها و درصد تیپهای آمیزشی در هر منطقه

شماره	محل جمع‌آوری نمونه	رقم	تعداد جدایه	گروه آمیزشی A			گروه ناشناخته
				A^-(%)	A^+(%)	$A^\pm$(%)	
۱	آلگونا، آیوا	۳۳۷۷	۱۲	۱۹(۶۳)	۷(۲۳)	۴(۱۳)	—
		۳۴۷۵	۱۸				
۲	ماریون، آیوا	۳۳۷۷	۱۶	۱۱(۳۵)	۵(۱۶)	۱۵(۴۷)	۱(۳)
		۳۴۷۵	۱۶				
۳	جانستن، آیوا	۳۳۷۷	۱۶	۲(۷)	۶(۲۱)	۲۰(۶۹)	۱(۳)
		۳۴۷۵	۱۳				
۴	شلبی‌ویل ایلینویز	۳۳۷۷	۱۵	۵(۱۵)	۷(۲۱)	۲۰(۵۹)	۲(۶)
		۳۴۷۵	۱۹				
۵	پرینستون، ایلینویز	۳۳۷۷	۱۶	۶(۱۸)	۸(۲۴)	۱۸(۵۵)	۱(۳)
		۳۴۷۵	۱۷				
۶	نورث‌پلات نبراسکا	۳۳۷۷	۱۱	۶(۲۱)	۴(۱۴)	۱۸(۶۲)	۱(۳)
		۳۴۷۵	۱۸				
۷	یورک، نبراسکا	۳۳۷۷	۱۶	۲۰(۵۹)	۸(۲۴)	۵(۱۵)	۱(۳)
		۳۴۷۵	۱۸				
۸	باولینگ‌گرین اهایو	۳۳۷۷	۱۶	۲۲(۶۱)	۸(۲۲)	۵(۱۴)	۱(۳)
		۳۴۷۵	۲۰				
۹	گاردن سیتی کانزاس	۳۳۷۷	۱۵	۱۷(۵۳)	۴(۱۳)	۱۰(۳۱)	۱(۴)
		۳۴۷۵	۱۷				
۱۰	هورون، داکوتای جنوبی	۳۳۷۷	۱۵	۷(۲۶)	۵(۱۹)	۱۵(۵۵)	—
		۳۴۷۵	۱۲				
۱۱	یونیون‌سیتی تنسی	۳۳۷۷	۱۶	—	۹(۳۰)	۲۰(۶۷)	۱(۳)
		۳۴۷۵	۱۴				
۱۲	ویندل فال ایندیانا	۳۳۷۷	۱۵	—	۴(۱۵)	۲۲(۸۱)	۱(۴)
		۳۴۷۵	۱۲				
۱۳	مانهاتان‌کانزاس	۳۳۷۷	۱۷	۷(۲۱)	۱۰(۳۰)	۱۵(۴۵)	۱(۳)
		۳۴۷۵	۱۶				
جمع			۴۰۶	۱۲۲	۸۵	۱۸۷	۱۲

حدود یک هفته بعد و پس از رشد کافی کلنی قارچها، تمام جدایه‌ها از طریق تک اسپور کردن (این عمل با استفاده از دستگاه میکرومانی پولیتور[۱] انجام گرفت) خالص سازی شدند. این قارچها پس از یک هفته رشد روی محیط کشت کامل جهت نگهداری کوتاه مدت به سرد خانه چهار درجه سانتیگراد منتقل گردیدند. برای نگهداری بلند مدت قارچها، سوسپانسیونی از کیندیومهای قارچ با استفاده از گلیسرول ۱۵٪ تهیه گردید. سوسپانسیون قارچها به ویولهای کوچک (۲ میلی‌لیتری) منتقل و در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در این روش نگهداری، تغییرات ژنتیکی قارچ به حداقل می‌رسد.

تعیین گروه(ها) و تیپهای آمیزشی جدایه‌های فوزاریوم

همانطوریکه در قسمت مقدمه اشاره شد تاکنون شش گروه آمیزشی در قارچ *G. fujikuroi* تشخیص داده شده است (۱۸، ۱۷) و با توجه به ناجور ریسه بودن قارچ برای هر گروه دو تیپ آمیزشی (+) و (-) وجود دارد. برای هر گروه و هر تیپ آمیزشی جدایه‌های استانداردی تهیه شده که از آنها برای تعیین گروه و تیپ آمیزشی جدایه‌های ناشناس استفاده بعمل می‌آید. برای انجام مطالعات در این قسمت، در یک بررسی مقدماتی ۳۰ جدایه از قارچهای مورد مطالعه، با تیپهای آمیزشی متفاوت از دو گروه آمیزشی **A** و **D** آمیزش داده شدند. نتایج مشخص نمود که تمام جدایه‌های مورد استفاده به یکی از گروههای آمیزشی فوق یعنی **A** تعلق داشتند، در نتیجه در آمیزشهای بعدی تنها از استانداردهای مربوط به گروه **A** استفاده شد. جدایه‌های استاندارد مورد استفاده شامل جدایه‌های **A 0149**، **A 0999** (۱۷)، **D 00502** , **D 02945** (۱۹) بود که به ترتیب دارای تیپ آمیزشی A^-، A^+، D^+، D^- بودند. سه جدایه اولی قبلاً از ذرت و جدایه چهارم از سورگوم جدا و شناسایی شده بودند.

برای انجام تلاقی بین جدایه‌های ناشناس و استانداردها از روش کلی‌تیچ و لسلی[۲] (۱۴) استفاده شد. در این روش، آمیزشها روی محیط کشت هویج آگار که به شرح ذیل تهیه می‌شود

1- Micromanipulator 2- Klittich & Leslie

انجام می‌گیرد: ۴۰۰ گرم هویج تازه را شسته، خرد کرده و برای مدت ده دقیقه در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون شد. پس از آن مخلوط هویج و آب بصورت پوره هویج درآمده و با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافی و ۲۰ گرم آگار مخلوط گردید. هویج آگار حاصله بمدت نیم ساعت سترون شده و پس از خنک شدن (دمای ۴۰-۳۵ درجه سانتیگراد) ۱۷-۱۵ میلی لیتر از آن در هر تشتک پتری پلاستیک با ابعاد ۱۵×۶۰ میلیمتر ریخته شد. پس از آن تشتکهای پتری حاوی هویج آگار بمدت چهار روز در یخچال نگهداری شدند. سپس جدایه‌های استاندارد به عنوان استرینهای ماده روی هویج آگار کشت گردیدند، به این ترتیب که از کشتهای هفت روزه این جدایه‌ها روی محیط کشت کامل قطعات ۲ میلیمتری جدا و در وسط ظروف کشت حاوی هویج آگار قرار داده شد. همزمان، جدایه‌های ناشناس نیز روی محیط کشت کامل، داخل لوله‌های آزمایش مورب بعنوان استرینهای نر کشت گردیدند. طریقه کشت به این صورت بود که از کشتهای هفت روزه این جدایه‌ها روی محیط کشت کامل، تکه‌های ۲ میلمتری برداشته و در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت کامل که بصورت مورب آماده شده بودند قرار داده شد. پس از آن هم تشتکهای پتری و هم لوله‌های مورب به انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد که مجهز به نور فلورسنت سفید و سیاه بود در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. بعد از یک هفته ظروف کشت حاوی جدایه‌های استاندارد بوسیله جدایه‌های ناشناس مایه زنی شدند. روش مایه زنی به این صورت بود که داخل هر لوله آزمایش حاوی جدایه ناشناس مقدار پنج میلی‌لیتر از محلول دو درصد توین - شصت[1] اضافه و خوب بهم زده شد تا سوسپانسیونی از کنیدیومهای قارچ بدست آمد. سپس بمیزان ۱/۱-۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به هر پتری حاوی جدایه‌های استاندارد اضافه شده و با یک میله شیشه‌ای سترون سرکج روی سطح جدایه استاندارد با فشار ملایمی در تمام جهات بخوبی پخش شد. به این ترتیب تمام جدایه‌های ناشناس (بعنوان عوامل بارور کننده یا نر) با تیپهای آمیزشی استاندارد (عوامل بارور شونده یا ماده) آمیزش داده شدند. این نوع آمیزش دادنها حداقل دو

1- Tween 60

نوبت انجام شد. وقتیکه تیپ آمیزشی و گروه آمیزشی جدایه‌ها معلوم شد، برای مشخص کردن توانایی تولید ماده‌های بارور[۱]، جدایه ها مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمایش جدایه‌های ناشناس به عنوان استرینهای ماده و جدایه‌های استاندارد به عنوان نر بکار برده شدند. پس از انجام آمیزشها، ظروف کشت به انکوباتور با شرایط مذکور در بالا منتقل و پس از ۲، ۳و ۴ هفته بعد از زمان مایه زنی، ظروف کشت جهت تولید آسکوکارپهای بارور مورد بررسی قرار گرفتند (شکل یک).

نتایج و بحث:

جداسازی جدایه‌های قارچ

در این مطالعه جمعاً ۳۷۳ جدایه قارچ از بذور دو رقم ذرت و ۳۳ جدایه از گیاهان آلوده ذرت که پوسیدگی ریشه و طوقه را نشان می‌دادند جدا شد. مجموع جدایه‌های بدست آمده از بذور و گیاهان آلوده ۴۰۶ عدد بود که از آن تعداد، ۱۹۶ جدایه مربوط به رقم ۳۳۷۷ و بقیه (۲۱۰ جدایه مربوط به رقم ۳۴۷۵ بود) (جدول ۱). برای شناسایی جدایه‌های مورد مطالعه در این آزمایشها تا سطح گونه از کلید مصور نلسون و همکاران[۲] (۲۲) استفاده شد. بر اساس این کلید، بخش لسیولا دارای چهار گونه می‌باشد و در بین آنها ***F.moniliforme*** تنها گونه‌ای است که میکروکنیدیومهای خود را عموماً بصورت زنجیر و بندرت بصورت سر دروغی روی منوفیالید[۳] تشکیل می‌دهد. طبق این کلید تمام جدایه‌های مورد مطالعه به گونه ***F.moniliforme*** تعلق داشتند.

1- Female fertility

2- Nelson *et al.*,

3- Monophialide

رشد جدایه استاندارد روی محیط کشت هویج آگار در تشتک پتری

رشد جدایه ناشناس روی محیط کشت کامل در لوله آزمایش مورب

↓

نگهداری در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد تحت منبع نوری فلورسنت سفید و سیاه برای مدت هفت روز

↓

تهیه سوسپانسیون کنیدیومهای استرین نر (-) با استفاده از ۵ میلی‌لیتر از محلول ۲٪ توین - شصت برای هر لوله

↓

مایه زنی استرین ماده (+) از طریق پخش ۱/۱-۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کنیدیومهای استرین نر (-) روی تمام سطح کلنی کشت استرین ماده (+)

↓

نگهداری تشتکهای پتری آمیزش داده شده در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد با منبع نوری سیاه و سفید فلورسنت

↓

آمار برداری از تشتکهای پتری ۲،۳،۴ هفته بعد از عمل آمیزش، بمنظور مشاهده پریتسهای بارور دارای آسکوسپور

شکل ۱- مراحل آماده نمودن استرین‌های نر (-) و ماده (+) جهت آمیزش، به منظور تعیین گروهها و تیپهای آمیزشی.

تعیین گروه(ها) و تیپهای آمیزشی جدایه‌ها

همانطوریکه در بخش مواد و روشها گفته شد آمار برداری از نتایج تلاقی های انجام شده از دو هفته بعد از عمل تلاقی انجام و تا چهار هفته پس از آن جریان داشت (شکل ۱). برای آماربرداری از نتایج تلاقی ها، آمیزشهایی مثبت ارزیابی گردیدند که تشتک پتری، حاوی آسکوکارپهای بالغ و دارای آسکهای خارج شده بصورت فتیله[1] بودند. آسکوکارپهایی که فاقد آسک بودند در آماربرداری منظور نگردیدند.

روی محیط کشت هویج آگار، پریتسیومهای *G.fujikuroi* سطحی، دارای رنگ آبی - سیاه بودند. قطر پریتسیوم بین ۴۵۰-۲۲۰ میکرومتر و متوسط قطر آن ۳۳۰ میکرومتر بود. آسکوسپورها دارای ۴-۱ دیواره بوده و در نمونه‌های مورد مطالعه، آسکوسپورهای دارای سه دیواره بیشترین فراوانی را داشتند. طول آسکوسپور بین ۲۵-۱۱ میکرومتر و متوسط طول آن ۱۸ میکرومتر، عرض آسکوسپور بین ۹-۵ و متوسط آن ۵/۵ میکرومتر بود. برای تعیین ابعاد آسکوکارپ و آسکوسپورها، قطر ۱۰۰ پریتس و نیز ابعاد ۱۰۰ آسکوسپور محاسبه شده است. نتایج آمیزش جدایه‌های ناشناس با جدایه‌های استاندارد در جدول یک نشان داده شده است. براساس این نتایج بیش از ۹۷٪ از جدایه‌های مورد مطالعه به گروه آمیزشی **A** تعلق داشتند، و چیزی کمتر از ۳٪ از جمعیت به گروههای آمیزشی دیگر متعلق بودند (جدول ۱). گروه یا گروههای آمیزشی این قسمت از جمعیت تعیین نشد . در دو منطقه آلگونا و هورون تمام جدایه‌های مورد مطالعه به گروه آمیزشی **A** و در بقیه مناطق بین ۶-۳٪ از جمعیت هر منطقه به گروه آمیزشی غیر از **A** تعلق داشتند (جدول ۱).

در یازده منطقه از مناطق مورد مطالعه هر دو تیپ آمیزشی A^+ و A^- وجود داشتند ولی در دو منطقه یونیون سیتی و ویندفال تیپ آمیزشی A^- وجود نداشت (جدول ۱). فراوانی تیپ‌های آمیزشی A^+ و A^- در مناطقی که هر دو تیپ وجود داشت متفاوت بود. بیشترین فراوانی تیپ آمیزشی A^- در منطقه آلگونا حدود ۶۳٪ و کمترین فراوانی این تیپ آمیزشی در منطقه جانستن

1- Cirrhus

حدود ۷٪ بود. برخلاف تیپ آمیزشی A^-، تیپ آمیزشی A^+ در تمام مناطق وجود داشت، ولی فراوانی آن در مقایسه با فراوانی تیپ آمیزشی A^- بمراتب کمتر بود (جدول ۱). همانطوریکه از جدول یک برمی‌آید بیشترین فراوانی این تیپ آمیزشی در مانهاتان حدود ۳۰٪ و کمترین مقدار آن در منطقه گاردن سیتی بمیزان ۱۳٪ بود. نتایج این آزمایش هم چنین نشان داد که جمعیت قابل توجهی از جدایه‌های مورد بررسی هرمافرودیت یا دو جنسی بودند (اینها جدایه هایی بودند که در مقابل استرینهای نر نقش استرین ماده و در مقابل استرینهای ماده نقش استرین نر را بازی می‌کردند). بیشترین فراوانی این تیپ جنسی در ناحیه ویندفال حدود ۸۱٪ و کمترین آن در منطقه آلگونا و به مقدار ۱۳٪ بود. بطور کلی، جمعیت هرمافرودیت (دو جنسی) در جدایه‌های مورد مطالعه حدود ۴۰٪ کل جمعیت را تشکیل داد. بنظر می‌رسد که وجود درصد بالایی از افراد دوجنسی در جمعیت متعلق به گروه آمیزشی A باعث موفقیت این گروه آمیزشی در مقایسه با سایر گروههای آمیزشی موجود در جمعیت ***G.fujikuroi*** در گسترش در مناطق مختلف و نیز افزایش جمعیت این گروه در مقایسه با دیگر گروههای مورد اشاره باشد. از طرف دیگر وجود سازگاری جنسی بین جدایه‌های مختلف قارچ ***F.moniliforme*** باعث افزایش آمیزشهای طبیعی جدایه‌های مختلف این قارچ مهم و تولید افراد با خصوصیات جدید و نیز ایجاد تنوع ژنتیکی در این قارچ می‌گردد. شاید این امر نیز یکی از دلایل تنوع ژنتیکی زیاد مشاهده شده در قارچ ***F.moniliforme*** باشد که با استفاده از گروههای سازگار رویشی قابل تعیین می‌باشد (۱).

نتایج این مطالعه در مورد ترکیب جمعیتی جدایه‌ها از نظر افراد یک جنسی نر و یک جنسی ماده مشابه نتایج سیدو[1] (۲۶) و از نظر افراد دوجنسی با نتایج نامبرده در تضاد است، چرا که محقق فوق جمعیتهای مورد مطالعه خود را اصولاً متشکل از افراد یک جنسی نر و پس از آن افراد یک جنسی ماده گزارش نموده است. این پژوهشگر گسترش افراد دو جنسی را در مناطق مورد مطالعه خود به صورت خیلی پراکنده و در بعضی از مناطق نه در تمام آن مناطق می‌داند. از

1- Sidhu

طرف دیگر نتایج تحقیق حاضر از نظر ترکیب جنسی جدایه‌های مورد مطالعه به خصوص از نظر افراد دو جنسی و یک جنسی نر با نتایجی که سیدو (۲۶) به نقل از کاتاریو[1] گزارش نموده مشابه ولی از نظر افراد یک جنسی ماده با نتایج کاتاریو متفاوت است. نامبرده در مطالعات خود فراوانی بیشتری را به ترتیب در افراد دوجنسی و بعد از آن در یک جنسی نر پیدا نمود، ولی در نمونه‌های کاتاریو هیچ نمونه جنسی ماده‌ای وجود نداشت. همچنانکه از جدول ۱ برمی آید حدود ۹۲٪ از جدایه‌های مورد مطالعه در این آزمایش از کشت بذور بدست آمده‌اند و همانطوریکه گفته شد گروه آمیزشی این افراد A بوده است. این نتیجه با نتایج کار سیدو (۲۶) که اعلام داشته است گروه آمیزشی A در بین جدایه‌های ناشی از بذر غالبیت دارد همسو می‌باشد.

علیرغم پژوهشهای وسیع انجام یافته، سیستم طبقه‌بندی فوزاریوم هنوز هم خالی از اشکال نبوده و اخیراً سیستم طبقه بندی جدیدی برای فوزاریوم پیشنهاد شده است (۴). خصوصیاتی از قارچ که برای ابداع چنین طبقه بندیهایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند از قبیل مورفولوژی ماکروکنیدیوم برای تشخیص گونه‌های فوزاریوم از یکدیگر و نیز در تشخیص گونه‌های موجود در بخش لسیولا مفید نمی‌باشند (۲۲)، نتیجتاً بعضی از محققین (۱۰) در این بخش تنها یک گونه، عمدتاً *F.moniliforme* را تشخیص داده‌اند. بعضی دیگر از محققین (۲۲) با در نظر گرفتن خصوصیات مورفولوژیکی دیگری از قبیل حضور یا عدم حضور پلی فیالید، میکروکنیدیومهای شلغمی شکل[2] و وجود میکروکنیدیومها بصورت زنجیره‌های طویل، کوتاه یا سرهای دروغی وجود چهار گونه فوزاریوم را در بخش لسیولا مشخص کرده‌اند. بعلت وجود این اشکالات در سیستم طبقه‌بندی قارچ فوزاریوم، لسلی (۱۷) استفاده از مرحله جنسی را برای تشخیص گونه‌های فوزاریوم پیشنهاد نمود.

در قارچ *G.fujikuroi* که مرحله جنسی قارچهای فوزاریوم بخش لسیولا می‌باشد شش جمعیت آمیزشی متفاوت که بوسیله حروف A-F نشان داده شده‌اند مشخص گشته‌اند

1- Kathariou 2- Napiform

(۱۸،۱۷،۱۳،۱۲). از این تعداد سه عدد آنها یعنی A، B و C توسط محققینی که اعتقاد داشتند در بخش لسیولا تنها یک گونه *F.moniliforme* وجود دارد مشخص شده و مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۰). براساس نظر این محققین هر سه گروه آمیزشی فوق الذکر دارای یک مرحله آنامورف می‌باشند و آن *F.moniliforme* می‌باشد، ولی صحت این نتیجه‌گیری با مطالعات کولمان (۱۶) رد شد. کولمان (۱۶) در بررسی گروههای آمیزشی در قارچهای فوزاریوم بخش لسیولا، چهار گروه آمیزشی مختلف را که با حروف A، B ، C و D مشخص می‌شوند تشخیص داد. گروههای A، B و C همان گروههایی بودند که توسط سیه و همکاران قبلاً معرفی شده و مرحله غیر جنسی (آنامورف) هر سه گروه، قارچ *F.moniliforme* گزارش شده است (۱۰). بر اساس مطالعات کولمان گروه‌های آمیزشی فوق هر کدام مربوط به یک واریته از قارچ *G.fujikuroi*: A- var. *moniliformis, B - var. subglutinans, C - var. fujikuroi, D - var. intermedia* می‌باشند. هر کدام از این واریته‌ها به یک واریته آنامورفی از قارچهای فوزاریوم بخش لسیولا نسبت داده شده است (۱۶). همانطوریکه از نتایج پیداست این نتایج کار طبقه بندی فوزاریوم را تا اندازه‌ای پیچیده ساخته است. علاوه بر این، پیدایش گروههای آمیزشی دیگر یعنی E و F وضعیت تاکسونومیکی گونه‌های فوزاریوم را پیچیده‌تر ساخته و موضوع استفاده از مرحله جنسی آنرا در تشخیص گونه‌های فوزاریوم زیر سؤال می‌برد، زیرا که اعضای گروههای آمیزشی A و F جدایه‌های *F.moniliforme* (۱۸، ۱۷، ۱۵، ۱۱) و اعضای گروههای آمیزشی B و E جدایه‌های *F.subglutinans* هستند (۱۸، ۱۷). علاوه بر موارد فوق و با توجه به شواهد موجود، نویسنده اعتقاد دارد که گروه‌های آمیزشی بیشتری در جنس فوزاریوم وجود دارد که باید شناخته شوند.

این نتاج نشان می‌دهند علیرغم اینکه مطالعات آمیزشی در فوزاریوم به ما کمک می‌کند که گروهها و تیپهای آمیزشی قارچ را مشخص کرده و تا حدودی به تنوع ژنتیکی موجود در این قارچها پی ببریم ولی پیدایش بیش از یک گروه آمیزشی (فرم جنسی) برای یک فرم غیر جنسی فوزاریوم تعیین ارتباط تاکسونومیکی فوزاریومها را مشکل‌تر می‌سازد. بنابراین نیاز هست تا از روشهای مختلف ژنتیک کلاسیک بهمراه روشهای ژنتیک مولکولی استفاده شود تا شاید بتوان مشکل طبقه بندی جنس فوزاریوم را حل نمود.

REFERENCES: **منابع**

۱- فرخی نژاد، رضا. ۱۳۷۸. بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیتهای *Fusarium moniliforme* جدا شده از بذور دو رقم ذرت هیبرید با استفاده از گروههای سازگار رویشی. مجله علمی کشاورزی، جلد ۲۲ شماره ۱، ۸۶-۶۷.

2- BESSEY, E. A. 1950. Morphology and Taxonomy of Fungi. Blakistan, Philadephia.

3- BOOTH, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey, England, 237 pp.

4- BURGESS, L. W., SUMMERELL, B.A., BULLOCK, S., GOTT, K. P., BACKHOUSE, D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. 3rd ed. *Fusarium* Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney & Royal Botanic Gardens, Sydney, 133 pp.

5- CHAISRISOOK, C., & LESLIE, J. F. 1990. A maternally expressed nuclear gene controling perithecial pigmentation in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). Journal of Heredity 81:189-192.

6- CORRELL, J. C. 1991. Genetic, biochemical, and molecular techniques for the identification and detection of soilborne plant pathogenic fungi. PP. 7-16 in : Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. L. L., Singleton, J. D. Mihail & C. M. Rush, (eds.), The American Phytopatological Society Press, Saint Paul, Minnesota.

7- CORELL, J. C., KLITTICH, C. J. R., & LSLIE, J. F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* & their use

in vegetative compatibility tests. Phytopathology, 77:1640 -1646.

8- ELMER, W. H., & FERRANDINO, F. J. 1992. Pathogenicity of *Fusarium* species section *Liseola* to asparagus. Mycologia, 84: 253 - 257.

9- GELDERBLOM, W. C. A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., HORAK, R. M., VIEGGAAR, R. & KRIEK, N. P. J. 1988. Fumonisins: Novel mycotoxins with cancer - promoting activity associated with *Fusarium moniliforme*. Applied Environmental Microbilogy, 54:1806 - 1811.

10- HSIEH, W. H., SMITH, S. N. & SNYDER, W. C. 1977. Mating groups in *Fusarium moniliforme*. Phytopathology, 67:1041-1043.

11- JARDINE, D. J. & LISLIE, J. F. 1992. Aggressiveness of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) isolates to grain sorghum under greenhouse conditions. Plant Disease, 76:897 - 900.

12- KEDERA, C. J., LESLIE, J. F. & CLAFLIN, L. E. 1994. Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. Phytopathology, 84:603-607.

13- KLAASEN, J. A. & NELSON, P. E. 1996. Identification of a mating population, *Gibberella nygamai* sp. nov, within the *Fusariam nygamai* anamorph. Mycologia, 88:965 - 969.

14- KLITTICH, C. J. R. & LESLIE, J. F. 1987. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). Genetics, 118:417-423.

15- KLITTICH, C. J. R. & LESLIE, J. F. 1992. Identification of a

pathology, 31:233 - 252.

24- PHINNEY, B. O. & WEST, C. A. 1960. Gibberellins as native plant growth regulators. Annual Review of Plant Physiology, 11:411-436.

25- PLATTNER, R. D., DESJARDINS, A. E., LESLIE, J. F., & NELSON, P. E. 1996. Identification & characterization of strains of *Gibberella fujikuroi* mating population A with rare fumonisin production phenotypes. Mycologia, 88:416 - 427.

26- SIDHU, G. S. 1985. Characteristics & natural occurrence of *Gibberella fujikuroi* mating groups A & D on sorghum and corn hosts. Canadian Journal of Botany, 63: 562 - 566.

27- SIDHU, G. S. 1988. *Gibberella* spp., Pathogens of many crop species. pp.159 - 167 In: Advances in Plant Pathology Vol. 6, D.S. Ingram & P. H. WillIAMS,(eds.), Academic Press.

28- VARMA, A., LELE, V. C., RAYCHAUDHURI, S. P., RAM, A., & ZANG, A. 1974. Mango malformation: A fungal disease. Phytopathology Z., 79:254 - 257.

29- WIEBE, L. A., & BJELDANES, L. F. 1981. Fusarin C, a mutagen from *Fusarium moniliforme* grown on corn. Journal of Food Science 46:1424 - 1426.

30- WINELAND, G. O. 1924. An ascigerous stage & synonymy for *Fusarum moniliforme*.Journal of Agricultural Research 28: 909 - 922.

DETERMINATION OF MATING GROUPS AND MATING TYPES IN *FUSARIUM MONILIFORME*

R. Farrokhi-Nejad[1]

Keywords: mating groups, mating types, sexual compatibility, hermaphroditic.

SUMMARY

Four hundred and six isolates of *Fusarium moniliforme* were recovered from two corn seeds and diseased plants from two cultivars (3377,3475) . Seeds were collected from 12 different locations and plant materials from one location in the North Central United States. Isolates were purified and identified at species level. After that, all isolates were mated with standard testers of mating groups A and D. Results indicated that more than 97% of the population were in mating group A. In two locations all of the isolates belonged to this group, and in the other locations 3-6% of population in each area did not belong to this group. Both mating types A^- and A^+ were found in eleven regions, but mating type A^- was not found in two locations. Mating types A^- and A^+ comprised (7-63%) and (13-30%) of the population in different regions, respectively. These results also revealed that 40% of the population was bisexual , and this kind of isolates formed (13-81%) of the population in each area.

1- Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriwlture, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran.