نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷ ص. ۷۲-۶۱

Saffron Agronomy & Technology
Vol. 6, No. 1, Spring 2018, P. 61-72
Archive of SID

بررسی بیماری‌زایی گونه *Alternaria alternata* روی برگ و کورم زعفران در آزمایشگاه و گلخانه

علی حسین نیا[۱] و عباس محمدی[۲*]

تاریخ دریافت: ۱ خرداد ۱۳۹۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۶ آذر ۱۳۹۵

حسین نیا، ع.، و محمدی، ع. ۱۳۹۷. بررسی بیماری‌زایی گونه *Alternaria alternata* روی برگ و کورم زعفران در آزمایشگاه و گلخانه. زراعت و فناوری زعفران، ۶(۱): ۷۲-۶۱.

چکیده

تولید زعفران، با ارزش‌ترین گیاه دارویی و ادویه‌ای شرق ایران، تحت تأثیر بیمارگرهای مختلفی قرار می‌گیرد. این تحقیق با هدف جداسازی، شناسایی و بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *Alternaria alternata* به‌عنوان عامل پوسیدگی کورم و برگ گیاه زعفران، در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ با نمونه‌برداری از خاک و بافت‌های گیاهی نواحی مختلف دشت بیرجند صورت گرفت. جدایه‌های قارچی به کمک محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار جداسازی و خصوصیات ریخت‌شناسی آن‌ها بر روی محیط کشت سیب‌زمینی هویج آگار بررسی شد. دی‌ان‌آی ژنومی جدایه‌های قارچی به روش CTAB استخراج و زیر واحدهای ریبوزومی به کمک آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر گردیدند. آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی گیاه زعفران به سه روش تلقیح برگ‌های بریده‌شده، تلقیح کورم زعفران در شرایط آزمایشگاهی و تلقیح گیاه زعفران درون گلخانه انجام شد. بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی، ۸۰ جدایه *A. alternata* در این تحقیق از دشت بیرجند شامل شهرستان‌های بیرجند، خوسف و سربیشه جداسازی گردیدند. در آزمون‌های بیماری‌زایی، پس از ۳ تا ۵ روز، برگ‌های بریده‌شده در محل تلقیح ابتدا کلروز و سپس نکروز بافت‌ها مشاهده گردید. کورم‌ها در محل تلقیح پوسیده‌شده و برگ‌های گیاهان تلقیح‌شده در گلخانه نیز دچار زردی و خشکیدگی شدند. شدت پوسیدگی و توسعه آن در جدایه‌های مختلف تقریباً یکسان و پس ۵ از روز غده‌های آلوده، پوسیده‌شده و بافت برگ‌ها نکروزه گردیدند. توالی ناحیه ITS جدایه‌ها ۱۰۰ درصد با توالی جدایه‌های *A. alternata* بانک ژن شباهت داشتند و در شجره فیلوژنتیکی با آن‌ها در یک گروه قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد که *A. alternata* پتانسیل ایجاد پوسیدگی کورم، لکه‌برگی، کلروز و نکروز برگ‌های زعفران را در صورت وجود شرایط بیماری‌زایی، دارا است. این تحقیق اولین گزارش از بیماری‌زایی این قارچ روی بافت‌های مختلف زعفران در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه است.

کلمات کلیدی: بیرجند، بیماری‌زایی، پوسیدگی، تلقیح، لکه‌برگی.

۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
۲ - دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
(*- نویسنده مسئول: Amohammadi@birjand.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2016.54452.1164

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) از خانواده زنبقیان، گیاهی علفی، چندساله، بدون ساقه و دارای بنه است (Negbi, 2003). کشت این گیاه از قدیم در برخی نقاط دنیا مانند ایران، هند، ایتالیا و یونان متداول بوده و ایران ۹۵ درصد از زعفران جهان را تولید می‌کند. بیش از ۳۵۱ تن زعفران در سال از ۱۳۹۴ هزار هکتار مزارع آبی کشور برداشت گردیده که بخش اعظم آن در استان‌های خراسان رضوی و جنوبی تولید شده است (Anonymus, 2014). یکی از عوامل تأثیرگذار بر رشد و میزان محصول زعفران، بیمارگرهای قارچی، باکتریایی و نماتدی هستند (Ahrazem et al., 2010). تاکنون گونه‌های قارچی زیادی توسط پژوهشگران از مزارع زعفران در سرتاسر جهان جداسازی گردیده‌اند که برخی ازاین‌گونه‌های قارچی بر روی گیاه زعفران بیماری‌زا و برخی دیگر، فقط بخشی از میکوفلور زعفران بوده‌اند.

قارچ آلترناریا (*Alternaria* spp.) بیش از ۲۷۵ گونه دارد که گونه غالب در اکثر خاک‌ها و بافت‌های گیاهی، گونه *A. alternate* است. این‌گونه گسترش جهانی داشته و غلات، گیاهان زینتی، روغنی، سبزیجات ازجمله کلم بروکلی، بادمجان، فلفل، هویج، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، لوبیا و میوه‌هایی مانند مرکبات، سیب، توت و هلو را مورد حمله قرار می‌دهد (Droby et al., 1984; Akimitsu et al., 2003; Simmons, 2007). آلترناریا با ایجاد لکه روی برگ‌ها و قسمت‌های سبز گیاه و کاهش فتوسنتز باعث بیماری می‌شود (Woudenberg, 2015). این قارچ با تولید آنزیم‌های سلولاز و پکتین‌متیل-گالاکتوروناز، دیواره سلولی را تجزیه کرده و با تولید اسید-آلترناریک، سلول میزبان را از بین برده، مواد غذایی موردنیاز خود را جذب کرده و روی میزبان تکثیر می‌گردد. پاتوتیپ‌های *A. alternata* به علت توانایی‌های تولید توکسین‌های اختصاصی میزبان، دامنه میزبانی مشخص و محدود دارند (Templeton, 2013). برخی از جدایه‌های این قارچ نیز غیر بیماری‌زا بوده و به‌صورت ساپروفیت یا اندوفیت روی سطح و درون بافت‌های گیاهی رشد می‌نمایند.

یکی از گونه‌های این قارچ که تاکنون از گیاه زعفران جداسازی شده است گونه *A. alternate* است. راج و همکاران (Raj et al., 2013) در بررسی گونه‌های قارچی اندوفیت مزارع زعفران منطقه کیشتوار هند، گونه‌های قارچ آلترناریا را همراه دیگر گونه‌های قارچی مانند ریزوکتونیا، فوزاریوم، فیتوفترا، تریکودرما و پنی سیلیوم را از خاک و بافت زعفران جداسازی کردند (Raj et al., 2013). به استثنای مطالعه فوق که بیشتر بر مبنای اثر عصاره زعفران بر قارچ آلترناریا بوده و نه بیماری-زایی آن‌ها، مطالعه دیگری در مورد بیماری‌زایی این قارچ روی گیاه زعفران صورت نگرفته است ولی بیماری‌زایی دیگر گونه‌های قارچی در کشورهای دارای مزارع زعفران مطالعه شده‌اند.

زادوکس در سال ۱۹۸۱ پوسیدگی بنفش زعفران به‌وسیله قارچ *Rhizoctonia violaceae* را از اسپانیا گزارش کرد (Zadoks, 1981). گونه *Macrophomina phaseolina* عامل پوسیدگی ۳۰ تا ۴۰ درصد کورم‌های زعفران در فاصله سال‌های ۱۹۸۹-۹۰ در بخش‌هایی از هندوستان بوده است (Thakur et al., 1992). گونه *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* عامل پوسیدگی کورم زعفران در اسپانیا معرفی شده است (Di Primo & Cappelli, 2000). حسن و دوی (Hassan & Devi, 2003) گونه‌هایی از جنس فوزاریوم، پنی-سیلیوم و ریزوکتونیا را عامل پوسیدگی کورم زعفران در منطقه کشمیر هند تشخیص دادند. وانی و دار (Wani & Dar, 2004) سه گونه *F. moniliforme* ، *F. oxysporum* و *F. solani*

www.SID.ir

Archive of SID

را عامل پوسیدگی کورم زعفران در کشمیر هند معرفی کرده‌اند. قارچ *Sclerotium rolfsi* عامل پوسیدگی اسکلروتیومی کورم زعفران در بخش‌هایی از کشور هندوستان به شمار می‌رود (Kalha et al., 2007). نوربخش و همکاران (Noorbakhsh et al., 2009) تعداد زیادی از گونه‌های آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین را از گیاه زعفران در ایران جداسازی کرده‌اند که برخی از آن‌ها توانایی ایجاد پوسیدگی بر روی کورم زعفران را داشتند. اهرازم و همکاران (Ahrazem et al., 2010) تعدادی از گونه‌های قارچی را از گیاه زعفران در اسپانیا جداسازی کرده‌اند که برخی از آن‌ها بیماری‌زا و برخی دیگر غیر بیماری‌زا بودند. محمدی و امینی (Mohammadi & Amini, 2015) جدایه‌های *Acrostalagmus luteoalbus* را به‌عنوان یک قارچ غیربیماری‌زا و نجار (Najjar, 2016) چهار گونه آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین را از میکوفلور زعفران در شرق ایران جداسازی نموده‌اند.

قارچ *A. alternata* در حال حاضر بیمارگر مهم مزارع زعفران نبوده و از نظر اقتصادی، از میزان خسارت آن در مزارع زعفران آماری در دست نیست ولی در صورت بالا بودن رطوبت مزرعه، گسترش آفات و بروز تنش‌های محیطی که به این گیاه خسارت می‌زنند، شرایط برای گسترش این قارچ فراهم‌شده و در صورت دارا بودن قدرت بیماری‌زایی، خسارت اقتصادی به بار خواهد آورد. از آن‌جایی‌که تاکنون پژوهشی در خصوص بیماری‌زایی این‌گونه بر روی گیاه زعفران در ایران و به‌خصوص در شرق کشور صورت نگرفته است، این تحقیق با هدف بررسی بیماری‌زایی آن بر روی بخش‌های مختلف گیاه زعفران در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در مناطق مختلف دشت بیرجند، شامل شهرستان بیرجند و بخش‌هایی از شهرستان‌های خوسف و سربیشه، از خاک و بافت‌های گیاهی که لکه‌های تیره‌رنگ مشکوک به آلودگی توسط جنس آلترناریا را داشتند، انجام گرفت. جداسازی قارچ عامل بیماری از بافت گیاهی، پس از ضدعفونی سطحی بافت‌های آلوده به‌وسیله وایتکس ۱۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه و کشت آن‌ها روی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar) صورت گرفت (Hong & Pryor, 2004). جداسازی از خاک با استفاده از محیط کشت زاپک‌آگار (*Czapek's*-Dox Agar) حاوی رزبنگال انجام شد. خالص‌سازی جدایه‌ها با تک‌اسپور کردن روی محیط آب آگار (Water agar) ۲ درصد صورت گرفت (Samson et al., 2004). خصوصیات ریخت‌شناسی جدایه‌ها با استفاده از پرگنه‌های یک‌هفته‌ای قارچ بر روی محیط سیب-زمینی هویج آگار (Potato Carrot Agar) بررسی گردید (Atlas, 2010).

محیط کشت‌های PCA تلقیح شده با جدایه‌های قارچی، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، زیر نور سفید فلورسنت با چرخه ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند و پس از ۷ روز خصوصیات پرگنه‌ها بررسی گردید (Simmons, 2007). صفات ریخت‌شناسی موردمطالعه شامل اندازه، رنگ و آرایش بندهای اسپور، وجود یا عدم وجود نوک در اسپورها و طول آن، تزئینات سطح اسپور و ابعاد کنیدیوفورها بود (Simmons, 2007; Woudenberg, 2015). برای به دست آوردن ابعاد اسپور، میانگین اندازه‌های ۵۰ اسپور محاسبه گردید. تشخیص گونه‌ها بر اساس خصوصیات فوق با استفاده از کلید شناسایی سیمونز (Simmons, 2007) صورت گرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج دی‌ان‌آی جدایه‌های قارچی

ابتدا ۵۰ میلی‌گرم بافت ریسه ۷ روزه رشد کرده از هر جدایه

www.SID.ir

Archive of SID

بر روی محیط PCA، به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل خرد گردیده و به ویال‌های استریل ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۶۰۰-۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج CTAB2X و یک میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه و ورتکس گردید تا کاملاً سوسپانسیون یکنواخت به دست آید. در مرحله بعد به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از سرد شدن لوله‌ها، هم حجم محتویات آن‌ها، کلروفرم اضافه گردید و هم زده شد. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ هزار دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محلول رویی آن‌ها به داخل تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. مقدار ۶۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول سرد به آن‌ها اضافه گردید و دوباره با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از حذف محلول رویی، لوله‌ها روی یک دستمال کاغذی استریل به‌صورت وارونه قرار داده‌شده تا خشک گردند. سپس مقدار ۵۰-۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به آن‌ها اضافه شد (Raeder & Broda, 1985; Griffiths et al., 2006). ارزیابی کیفیت دی‌ان‌آی استخراج‌شده روی ژل آگارز ۱٪ در دستگاه الکتروفورز و عکس‌برداری با دستگاه ژل‌داکیومنت مدل Cleaver translaminator انجام شد.

نواحی ITS جدایه‌ها با آغازگرهای ITS1:5-3 TCCGTAGGTGAACCTGCGG- و ITS4:5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3 تکثیر گردیدند (Houbraken et al., 2007). تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Biometra و طبق برنامه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه در یک سیکل، واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه در ۳۵ سیکل و بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۱ سیکل انجام شد (Houbraken et al., 2007). بعد از انجام واکنش، محصول تکثیر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی ا درصد رنگ فلورسنت DNAsafe با ولتاژ ۹۰ میلی‌آمپر الکتروفورز شده و با دستگاه ژل داکیومنت مدل Cleaver translaminator از آن عکس‌برداری شد.

نواحی تکثیرشده با آغازگرهای ITS1&4، خالص‌سازی و توسط شرکت ماکروژن کره‌جنوبی (Macrogen Co.) توالی آن‌ها تعیین گردیدند. با توجه به یکسان بودن خصوصیات ریخت‌شناسی جدایه‌ها، توالی ناحیه فوق در ۴ جدایه به‌عنوان نمونه، موردبررسی قرار گرفت. تنظیم اولیه توالی‌ها و همسانه-سازی آن‌های با داده‌های بانک ژن NCBI و MycoBank، با استفاده از نرم‌افزارهای ClastalX و Mega6 انجام شد (Tamura et al., 2013). داده‌ها با استفاده از روش‌های فاصله و حداکثر شباهت در نرم‌افزار Mega6 آنالیز گردیدند. با کمک توالی‌های به‌دست‌آمده در این تحقیق و داده‌های بانک ژن NCBI و MycoBank، شجره‌ی فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه Mega6 طراحی گردید (Tamura et al., 2013). استحکام درخت فیلوژنتیکی با کاربرد Bootstrap (۱۰۰۰) آزمایش گردید.

بررسی قدرت بیماری‌زایی *A. alternata*

بررسی بیماری‌زایی روی برگ‌های بریده‌شده

بیماری‌زایی جدایه‌های *A. alternata* در شرایط آزمایشگاهی به روش تلقیح برگ‌های بریده‌شده انجام شد (Sharma et al., 2004). در این روش، برگ‌های بریده‌شده گیاه زعفران که فاقد هرگونه علائم و آلودگی ظاهری بودند، انتخاب و با محلول وایتکس ۱۰ درصد استریل شدند. روی برگ‌ها با نوک سوزن ظریف و استریل، زخم کوچکی ایجاد و قطعات ۵×۵ میلی‌متری از پرگنه ۷ روزه قارچ بر روی محیط PCA، روی آن قرار داده شد. از قطعات محیط کشت PCA و

www.SID.ir

Archive of SID

پرگنه قارچ *Bipolaris* sp. به‌عنوان شاهد، برای تلقیح بافت برگ‌ها استفاده شد. برگ‌های تلقیح شده برای حفظ رطوبت و شادابی، بر روی کاغذ صافی استریل مرطوب شده با آب مقطر استریل، درون تشتک پتری استریل، در انکوباتور ۲۵ °C در تاریکی نگهداری شدند (Akimitsu et al., 2003). پس از ۳–۷ روز، علائم ایجادشده بر روی برگ‌ها، موردبررسی قرار گرفت. جداسازی دوباره قارچ آلترناریا از بافت‌های برگ تلقیح شده با کشت آن‌ها بر روی محیط کشت PCA صورت گرفت.

بررسی بیماری‌زایی *A. alternata* بر روی کورم زعفران

به‌منظور تعیین بیماری‌زا *A. alternata* بر روی کورم زعفران، پوست لایه‌های سطحی کورم‌های کاملاً سالم زعفران حذف‌شده و کورم‌ها با وایتکس ۱۰ درصد، استریل سطحی شدند. با سوزن استریل، زخمی کوچک درون کورم ایجاد گردید و قطعه ۲ * ۲ میلی‌متری از قارچ رشد کرده بر روی محیط PCA درون آن قرار داده شد. تیمار شاهد در این آزمون، شبیه آزمون قبل، بافت محیط کشت PCA و پرگنه قارچ *Bipolaris* sp. بود. کورم‌های تلقیح شده، بر روی کاغذ صافی استریل مرطوب درون تشتک پتری و در داخل انکوباتور در دمای ۲۵ °C قرار داده شدند. بعد از حدود ۵–۴ روز، اثر قارچ بر روی بافت کورم‌ها بررسی گردید (Palmero et al., 2014). جداسازی دوباره قارچ از کورم‌های تلقیح شده، با کشت بافت حدفاصل ناحیه دارای علائم پوسیدگی و بافت سالم صورت گرفت.

بررسی بیماری‌زایی *A. alternata* بر روی گیاه زعفران در شرایط گلخانه

برای بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *A. alternata* بر روی گیاه زعفران در شرایط گلخانه، پوست پیازهای سالم زعفران حذف و در جعبه‌های ۳۰×۲۰ سانتی‌متری، درون خاک فاقد آلودگی کاشته شدند. جعبه‌های فوق در شرایط محیط بیرون از گلخانه قرار داده شدند تا بوته‌های زعفران به‌خوبی رشد کنند. ۱۰ گیاه زعفران کاملاً سالم که هرکدام ۵–۶ برگ سبز و فعال داشتند، انتخاب گردیده و برگ‌های خشک آن‌ها حذف شد تا جمعیت ساپروفیت‌های احتمالی روی برگ‌های مرده بر نتایج آزمون تأثیری نگذارد. سوسپانسیون 10^6 اسپور قارچ *A. alternata* از پرگنه‌های ۷ روزه آن روی محیط PCA درون آب مقطر استریل تهیه گردید و بر روی برگ‌های زعفران در شرایط گلخانه اسپری شد. گلدان‌های تلقیح شده به مدت ۴۸ ساعت در شرایط رطوبت نسبی ۹۰ درصد و دمای ۲۵ °C قرار داده‌شده و سپس به فضای گلخانه منتقل گردیدند (Palmero et al., 2014). نتایج این آزمون پس از یک هفته بررسی شد و از برگ‌هایی که علائم لکه‌برگی داشتند، دوباره قارچ عامل بیماری به کمک محیط کشت PCA جداسازی گردید. همانند دو آزمون قبل، از آب مقطر خالص و سوسپانسیون اسپور قارچ *Bipolaris* sp. به‌عنوان شاهد استفاده گردید.

نتایج و بحث

خصوصیات ماکروسکوپی قارچ

پرگنه‌های قارچ پس از ۷ روز روی محیط PCA، رنگ قهوه‌ای خاکستری تیره داشتند و ریسه‌ها درون محیط کشت و یا روی سطح آن رشد کردند. پرگنه‌ها، فاقد ریسه هوایی بوده و رشد آن‌ها تغییری در رنگ محیط کشت ایجاد نکرد. کنیدیوفورها منفرد و در برخی جدایه‌ها در انتها منشعب بودند. کنیدی‌ها به‌صورت دسته‌ای روی کنیدیوفورها تشکیل شدند. اسپورهای قارچ سطح محیط کشت را به‌طور یکنواخت پوشانده و پرگنه‌ها فاقد دوایر متحدالمرکز ناشی از تفاوت اسپورزایی در تاریکی و روشنایی بودند (شکل a و A– ۱).

خصوصیات میکروسکوپی

کنیدیوفورها به رنگ زرد کهربایی تا قهوه‌ای روشن، غالباً

www.SID.ir

Archive of SID

ساده، کوتاه، به طول ۳۰-۶۰ میکرومتر و در انتها خمیدگی‌های زانویی داشتند. کنیدیوفورهای ثانویه انتهایی و کوتاه، کنیدی‌ها زنجیری، منشعب و اغلب یک‌سلولی بودند. زنجیره‌های جانبی بلندتر بوده و طول برخی به ۲۵ میکرومتر هم می‌رسید. کنیدی-ها قهوه‌ای‌رنگ، بیضوی تا تخم‌مرغی شکل ولی جوان‌ترها گرد بودند. اندازه کنیدی‌ها ۴-۱۲ ×۲۲-۳۰ میکرومتر، ۳-۷ دیواره عرضی و ۱-۳ دیواره طولی تیره داشتند. سطح کنیدی‌ها منقوط تا زگیل‌دار بود که در برخی موارد نقوش سطحی مانع از دیده شدن دیواره‌ها می‌گردیدند.

تکثیر ناحیه ITS در جدایه‌ها انجام شد و ناحیه‌ای در حدود ۴۰۰ جفت باز در همه جدایه‌ها تکثیر گردید که ازنظر اندازه بر روی ژل آگارز تفاوتی با یکدیگر نداشتند. با توجه به اینکه تمام جدایه ای آلترناریای جداسازی شده در این تحقیق بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی به یک‌گونه تعلق داشتند، تعداد ۴ جدایه به‌عنوان الگو جهت تعیین توالی ناحیه ITS و تأیید گونه انتخاب شدند.

آغازگرهای ITS1 و ITS4 توانستند ناحیه‌ای ۴۰۰ جفت بازی از ژنوم قارچ را تکثیر کنند (شکل A-۲) که توالی این نواحی صد درصد با توالی ناحیه ITS جدایه‌های گروه *A. alternata* و *A. tenuissima* بانک ژن NCBI و MycoBank شباهت داشتند ولی با برخی دیگر از گونه‌های آلترناریا بیش از ۴ درصد تفاوت ژنتیکی در توالی ناحیه تکثیرشده داشتند (شکل B-۲). در درخت ژنتیکی طراحی‌شده بر اساس توالی‌های این تحقیق و توالی‌های موجود در بانک ژن (شکل C-۲)، جدایه‌های این تحقیق با جدایه‌های *A. alternata* در یک گروه فیلوژنتیکی قرار گرفتند. جدایه‌های این تحقیق با دیگرگونه‌های آلترناریا مانند گونه *A. consortialis* و گونه‌های جنس *Embellisia* sp. که شباهت زیادی با قارچ آلترناریا دارند، در گروه‌های فیلوژنتیکی مختلفی قرار گرفتند (شکل C-۲). ازآن‌جایی‌که توالی ناحیه ITS قادر به تفکیک برخی گونه‌های آلترناریا نبود، خصوصیات ریخت‌شناسی مبنای تفکیک از گونه‌هایی بودند که توالی یکسان داشتند.

با توجه به قرار گرفتن جدایه‌های این تحقیق با جدایه‌های گروه *A. alternata* در یک گروه و با استناد به‌خصوصیات ریخت‌شناسی کلید شناسایی سیمونز (Simmons, 2007) که کاملاً با خصوصیات گونه آلترناریا آلترناتا هم‌خوانی داشت، جدایه‌های این تحقیق به‌عنوان گونه *A. alternata* شناخته شدند.

نتایج آزمون بیماری‌زایی

در آزمون تلقیح برگ‌های بریده‌شده، پس از ۴ روز، علائم زردی و کلروز در محل تلقیح برگ‌ها مشاهده گردید که این تغییر رنگ، از محل تلقیح به دو طرف برگ گسترش پیدا کرد. نواحی زرد شده پس از مدتی دچار نکروز و پوسیدگی شدند که این پوسیدگی همراه با تیره شدن و خشک شدن بافت‌ها بود. در نمونه‌های شاهدی که با محیط PCA و قارچ *Bipolaris* sp. تلقیح شده بودند، هیچ‌گونه تغییر رنگ یا مرگ بافت در محل تلقیح روی برگ‌ها مشاهده نگردید (شکل B- ۱). بافت‌های تلقیح نشده و شاهد، علاوه بر این‌که هیچ‌گونه علائمی نشان ندادند، کاملاً شاداب بوده و در بافت آن‌ها تغییری ایجاد نشده بود که دلیلی بر عدم تأثیر شرایط آزمایش بر خصوصیات بافت‌ها بود. نتایج این بخش نشان داد که گونه *A. alternata* قادر است روی برگ‌های زعفران در شرایط آزمایشگاهی کلروز و نکروز ایجاد کرده و بافت برگ را بپوساند. برگ‌های استفاده شده در این آزمون از برگ‌های با سنین رشد مختلف انتخاب شده بودند که نتایج نشان داد قارچ *A. alternata* قادر به آلوده کردن برگ‌ها در تمام دوره رشدی گیاه است.

تکنیک تلقیح برگ‌های بریده‌شده، روش پذیرفته‌شده‌ای برای بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های آلترناریا بر روی بافت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهان زراعی است. این روش قبلاً جهت بررسی واکنش ارقام مختلف گوجه‌فرنگی به آلترناریا (Foolad et al., 2000)، مطالعه واکنش ارقام سیب‌زمینی به آلترناریا (Droby et al., 1984) و بیماری‌زایی آلترناریا بر روی بسیاری از گیاهان دیگر استفاده‌شده است (Templeton, 2013). این پژوهش، کاربرد روش فوق به‌منظور بررسی بیماری‌زای قارچ آلترناریا بر روی گیاه زعفران را تأیید کرده و نشان‌دهنده کارایی این روش در تشخیص بیمارگرهای این گیاه است. بر اساس این تحقیق، این روش به‌عنوان آزمونی مقدماتی جهت بررسی بیماری‌زایی گونه‌های *A. alternata* بر روی بافت برگ زعفران قابل‌استفاده است.

پس از تلقیح کورم‌ها توسط قارچ *A. alternata* بافت کورم‌های سالم تلقیح شده، پس از ۴ روز در محل تلقیح، تغییر رنگ داده و قهوه‌ای شدند. این تغییر رنگ به‌تدریج هم به‌صورت سطحی و هم به‌صورت عمقی گسترش پیدا کرد. بافت‌های تغییر رنگ یافته پس از ۵ روز به‌طور کامل دچار پوسیدگی گردیدند (شکل D و C– ۱). از کشت مجدد بخش‌های پوسیده‌شده کورم‌ها بر روی محیط PDA، قارچ آلترناریا جداسازی گردید. در تیمار شاهد، محل زخم‌ها تغییر رنگ بسیار محدودی داشتند که ناشی از تأثیر زخم ایجادشده بوده و این تغییر رنگ به سایر قسمت‌های کورم گسترش پیدا نکرد (شکل C-<u>C</u>– ۱). نتایج این آزمون نشان داد که قارچ *A. alternata* در صورت نفوذ به داخل کورم زعفران، قادر است در مدت کوتاهی بافت کورم را پوسانده و از بین ببرد.

کورم‌های زعفران که برای کاشت در مزرعه به کار می‌روند چندلایه پوششی دارند ولی در این تحقیق ابتدا پوشش سطحی حذف و بافت کورم زخمی گردید تا قارچ بتواند داخل بافت نفوذ کرده و آلودگی صورت گیرد. در شرایط مزرعه کورم‌های سالم دارای لایه‌های پوشش بوده و کمتر در معرض مستقیم قارچ هستند ولی این لایه ممکن است به‌تدریج دچار پوسیدگی شده و از بین بروند. پوسیده شدن و از بین رفتن پوشش کورم‌ها توسط عوامل مختلف در مزرعه یا از بین رفتن این لایه پوششی توسط جوندگان و حشرات می‌تواند شرایطی شبیه این آزمایش را ایجاد نماید. از طرفی در آزمون بیماری‌زایی حتماً باید قارچ با بافت گیاه تماس داشته باشد. در صورت عدم حذف پوشش، قارچ تماس مستقیم با بافت کورم نداشته و ممکن بود شرایط بیماری‌زایی فراهم نگردد، بنابراین حذف پوشش کورم در این آزمون، مغایرتی با شرایط فعالیت قارچ در مزرعه ندارد. هرچند ای کاهش یا حذف پوشش کورم‌ها در زمان از بین رفتن کورم-های مادری یا در طول دوره تابستان درون خاک ممکن است اتفاق بیفتد.

یکی دیگر از شرایط این آزمون، زخمی نمودن بافت کورم‌ها بود. زخمی شدن کورم امکان ورود قارچ به درون بافت را فراهم نمود. هرچند این شرایط ممکن است تا حدودی با شرایط کورم-ها در مزرعه تفاوت داشته باشد، بااین‌وجود در برخی موارد در مزرعه ممکن است همین وضعیت ایجاد گردد. در اثر تغذیه حشرات و کنه‌ها، کورم‌ها دچار زخم شده و شرایط برای ورود قارچ فراهم می‌گردد، بنابراین زخم ایجادشده بر روی کورم‌ها، در مزرعه نیز ممکن است توسط بسیاری از عوامل محیطی ایجاد گردیده و تفاوت زیادی میان شرایط این آزمون در مزرعه و در آزمایشگاه وجود نداشته است.

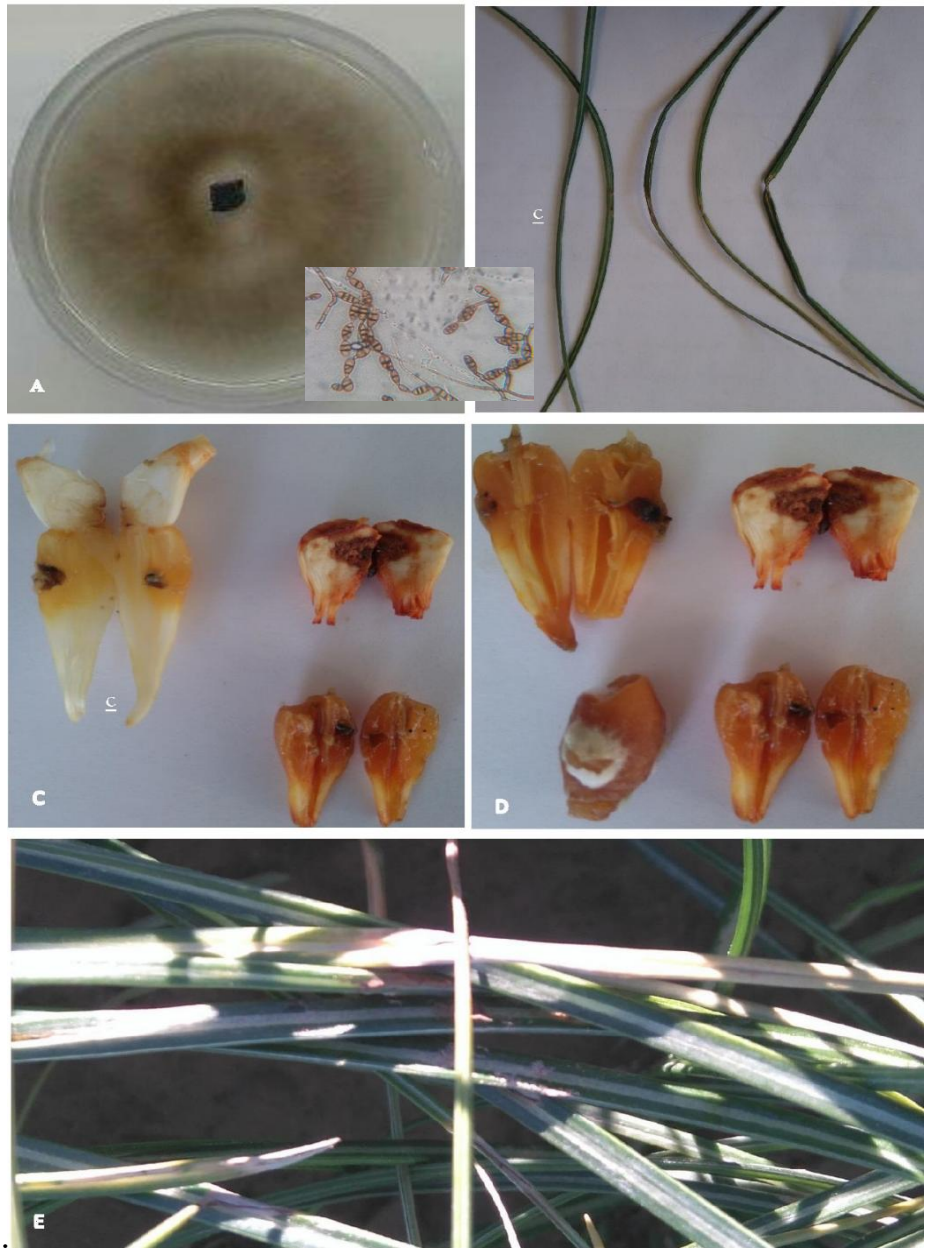
در شرایط گلخانه، ۳ تا ۵ روز پس از تلقیح بوته‌های زعفران، علائم زردی و کلروز برگ‌ها در محل‌های تلقیح، مشاهده گردید (شکل E – ۱). علائم ایجادشده در این آزمون با علائم ایجادشده در آزمون برگ‌های بریده تشابه بسیار زیادی داشت ولی سرعت گسترش علائم بسیار کمتر از سرعت گسترش لکه‌ها در آزمون برگ‌های بریده‌شده بود. این تفاوت احتمالاً به دلیل شرایط محیطی گلخانه نسبت به محیط انکوباتور بوده است. زردی ایجادشده در اثر فعالیت قارچ بر روی برگ‌ها، کم‌کم گسترش یافت و محل تلقیح پس از مدتی دچار نکروز و

www.SID.ir

Archive of SID

خشکیدگی گردید (شکل E – ۱).

تلقیح بافت‌های زعفران در شرایط گلخانه در اسفندماه انجام گردید. در این فصل گیاهان هم برگ‌های مسن و هم برگ‌های جوان سبز تازه داشتند. بیماری‌زایی قارچ بر روی برگ‌ها، نشان داد که قارچ *A. alternata* در هر مرحله از دوره رشد گیاه می‌تواند روی برگ ایجاد آلودگی کند.



شکل ۱- (A) پرگنه قارچ *Alternaria alternata* بر روی محیط PCA، نتایج آزمون بیماری‌زایی پس از ۳ تا ۵ روز بر روی برگ‌های بریده‌شده (B)، کورم (C و D) و گیاه زعفران در شرایط گلخانه (E)

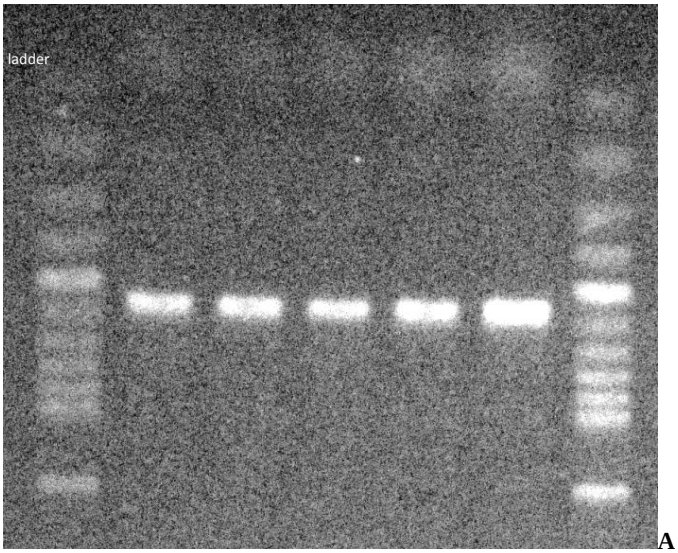
Figure 1- (A) *Alternaria alternata* on CMA, pathogenicity of *A. alternata* on detached leaves (B), corm (C and D) and saffron in greenhouse condition (E) after 3-5 days.

در این تحقیق بیماری‌زایی گونه *A. alternata* بر روی گیاه زعفران، به سه روش بیماری‌زایی بر روی کورم‌ها، برگ‌های

www.SID.ir

Archive of SID

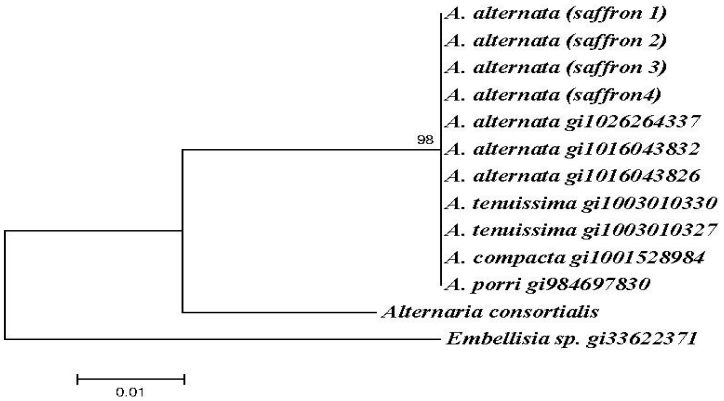
بریده‌شده و گیاه در حال رشد در گلخانه، موردبررسی قرار گرفت. هرچند روش تلقیح برگ‌های بریده‌شده به‌وسیله قارچ آلترناریا و بررسی میزان آلودگی برگ‌ها به‌تنهایی به‌عنوان یک روش قابل‌قبول در آزمون‌های بیماری‌زایی این قارچ پذیرفته‌شده است ولی در این تحقیق تلاش گردید که بیماری‌زایی بر روی برگ‌های گیاه در شرایط گلخانه نیز بررسی گردد.



A

A._alternata_(saffron_1)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
A._alternata_(saffron_2)	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
A._alternata_(saffron_3)	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
A._alternata_(saffron4)	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
A._alternata_gi1026264337	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
A._alternata_gi1016043832	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
A._alternata_gi1016043826	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
A._tenuissima_gi1003010330	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.01	0.02
A._tenuissima_gi1003010327	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.01	0.02
A._compacta_gi1001528984	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.01	0.02
A._porri_gi984697830	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.02
Alternaria_consortialis	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	
Embellisia_sp._gi33622371	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08

B



C

شکل ۲- ناحیه تکثیرشده با آغازگرهای ITS1&ITS4 (A) ماتریکس تشابه ژنتیکی (B) و شجره فیلوژنتیکی (C) جدایه‌های *A. alternata* جداشده از زعفران در این تحقیق و جدایه‌های بانک ژن بر اساس توالی ناحیه ITS

Figure 2- PCR product of ITS1&4 replication (A), Genetic Diversity (B) and Phylogenetic tree (C) of *A. alternata* isolates based on ITS region sequences.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج این تحقیق نشان داد که گونه آلترن *A. alternata* اریا آلترناتا در خاک و بروی بافت زعفران در شهرستان بیرجند به راحتی قابل جداسازی است. جدایه‌های این‌گونه قادرند در شرایط مساعد روی بافت‌های زعفران، لکه‌برگی و یا پوسیدگی کورم ایجاد کنند. از آنجایی‌که زعفران گیاهی چندساله است، بافت‌های در حال تجزیه و قدیمی که در انتهای فصل رشد اطراف کورم‌ها و برگ‌های گیاه باقی می‌مانند، می‌توانند محل مناسبی برای تکثیر گونه‌های آلترناریا بوده و بیماری‌های ناشی از این قارچ را تشدید کنند. کورم‌ها نیز در طول فصل خشک در خاک هستند و عوامل مختلفی به‌خصوص نماتدها، کنه‌ها و بندپایان قادرند از آن‌ها تغذیه کرده و با ایجاد زخم، پوسیدگی‌های آلترنارایی کورم را گسترش دهند.

به دلیل کوتاه بودن دوره ظهور، برداشت و خشک‌کردن گل‌ها، این قارچ، بر روی بخش‌های مختلف گل بیماری ایجاد نمی‌کند ولی درصورتی‌که گل‌ها در شرایط مرطوب انبار شوند، ممکن است به گل‌ها نیز خسارت بزنند. همان‌طور که قبلاً گفته شد برخی گونه‌های مختلف قارچی مانند آسپرژیلوس، عامل پوسیدگی کورم زعفران هستند. وجود آلودگی‌های ناشی از این بیمارگرها، می‌توانند اثر تشدیدکنندگی روی آلودگی آلترناریایی کورم زعفران داشته باشند. عکس پدیده فوق نیز صادق است. آلودگی به آلترناریا می‌تواند زمینه را برای آلودگی زعفران به‌خصوص کورم‌ها را به دیگرگونه‌های قارچی مولد توکسین مانند آسپرژیلوس‌ها فراهم نماید.

یکی از عوامل مؤثر در شیوع آلودگی آلترناریایی بر روی گیاهان مختلف، وجود رطوبت و دمای مناسب است ولی در زراعت زعفران در فصل تابستان در شرق ایران و مناطق زعفران کاری، به‌دلیل عدم آبیاری، مزارع زعفران خشک و میزان رطوبت در این ناحیه بسیار پایین است که باعث عدم گسترش قابل‌ملاحظه این قارچ در فصل تابستان می‌گردد. در فصل زمستان نیز میزان بارندگی کمتر از ۱۰۰ میلی‌متر یکی از عواملی است که باعث محدود شدن این بیمارگر شده است. بنابراین میزان گسترش بیماری‌های ناشی از این قارچ در حال حاضر در مزارع زعفران بسیار محدود است و معمولاً به‌صورت موردی و تک بوته‌ای است و این بیماری از بیماری‌های مهم زعفران محسوب نمی‌گردد ولی در صورت هرگونه تغییر شرایط محیطی یا کاشت زعفران در نواحی مرطوب یا با رطوبت بالا در سایر نقاط کشور، این قارچ می‌تواند یکی از عوامل محدودکننده زراعت زعفران به‌شمار آید.

توصیه می‌گردد که مدیریت تلفیقی گونه‌های آلترناریا در مزارع زعفران در کنار دیگرگونه‌های قارچی بیمارگر و توکسین‌زا به‌صورت هم‌زمان اعمال گردد تا هم پوسیدگی‌های ناشی از گونه *A. alternata* به بافت‌های زعفران خسارت بالایی وارد ننماید و هم اثر تشدیدکنندگی بر آلودگی بافت زعفران به گونه‌های خاکزاد مولد توکسین نداشته باشد.

منابع

Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Castillo-López, R., Trapero-Mozos, A., and Gómez-Gómez, L. 2010. Crocus sativus pathogens and defence responses. Functional Plant Science and Biotechnology. Global Science Book Isleworth, UK, p. 81-90.

Akimitsu, K., Peever, T.L., and Timmer, L. 2003. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding Alternaria diseases of citrus. Molecular Plant Pathology 4: 435-446.

Anonymus. 2014. Iran Agriculture Statistics (Vol. 2). Ministry of Jihad-Keshavrzi ,Iran, 421 pp.

www.SID.ir

Archive of SID

Atlas, R.M. 2010. Handbook of Microbiological Media. CRC press.

Di Primo, P., and Cappelli, C. 2000. Preliminary characterization of Fusarium oxysporum f. sp. gladioli causing Fusarium corm rot of saffron in Italy. Plant Disease 84: 806-806.

Droby , S., Dinoor, A., Prusky, D., and Barkai-Golan, R. 1984. Pathogenicity of Alternaria alternata on potato in Israel. Phytopathology 74: 537-542.

Foolad, M., Ntahimpera, N., Christ, B., and Lin, G. 2000. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. Plant Disease 84: 967-972.

Griffiths, L.J., Anyim, M., Doffman, S.R., Wilks, M., Millar, M.R., and Agrawal, S.G. 2006. Comparison of DNA extraction methods for Aspergillus fumigatus using real-time PCR. Journal of medical microbiology 55: 1187-1191.

Hassan, M., and Devi, L.S. 2003. Corm rot diseases of saffron in Kashmir valley. Indian Phytopathology 56: 122.

Hong, S.G., and Pryor, B.M. 2004. Development of selective media for the isolation and enumeration of Alternaria species from soil and plant debris. Canadian journal of microbiology 50: 461-468.

Houbraken, J., Due, M., Varga, J., Meijer, M., Frisvad, J.C., and Samson, R.A. 2007. Polyphasic taxonomy of Aspergillus section Usti. Studies in Mycology 59: 107-128.

Kalha, C.S., Gupta, V., Gupta, D., and Priya, S. 2007. First report of sclerotial rot of saffron caused by Sclerotium rolfsii in India. Plant Disease 91: 1203-1203.

Mohammadi, A., and Amini, Y. 2015. Molecular characterization and identification of Acrostalagmus luteoalbus from saffron in Iran. Agriculture Science Developments 4: 16-18.

Najjar, S. 2016. Taxonomic study of Aspergillus species associated with soil, crops and horticultural plants in Birjand plain. Department of plant protection,University of Birjand, Birjand, Iran. (In Persian with English Summary).

Negbi, M. 2003. Saffron: *Crocus sativus* L. CRC Press.

Noorbakhsh, R., Bahrami, A.R., Mortazavi, S.A., and Bahreini, M. 2009. PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron. Food Science and Biotechnology 18: 1018-1031.

Palmero, D., Rubio-Moraga, A., Galvez-Patón, L., Nogueras, J., Abato, C., Gómez-Gómez, L., and Ahrazem, O. 2014. Pathogenicity and genetic diversity of Fusarium oxysporum isolates from corms of Crocus sativus. Industrial Crops and Products 61: 186-192.

Raeder, U., and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology 1: 17-20.

Raj, P., Khan, S.S., Modak, M., Lone, Z.A., Rather, S.A., and Yaqoob, M. 2013. Biodiversity of endophytic fungi in saffron (*Crocus sativus*) and antimicrobial activity of their crude extract. IAJPR 3: 3702-3713.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., and Frisvad, J.C. 2004. Introduction to food-and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Sharma, P., Sharma, S., and Sindhu, M. 2004. A detached leaf technique for evaluation of resistance in cabbage and cauliflower against three major pathogens. Indian Phytopathology 57: 315-318.

Simmons, E.G. 2007. Alternaria: An Identification Manual. CBS fungal biodiversity centre,

www.SID.ir

Archive of SID

Netherlands.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular biology and evolution 30: 2725-2729.

Templeton, G. 2013. Alternaria toxins related to pathogenesis in plants. Microbial toxins 8: 169-192.

Thakur, R., Singh, C., and Kaul, B. 1992. First report of corm rot in Crocus sativus. Indian Phytopathology 45: 278.

Wani, M.A.S., and Dar, G. 2004. Studies on Corm Rot of Saffron (*Crocus sativus* L.). University of Kashmir.

Woudenberg, J. 2015. Restyling Alternaria. Phytopathology,Wageningen University.

Zadoks, J.C. 1981. Mr. DuHamel's 1728 treatise on the violet root rot of saffron crocus: physical explanation of a disease that perishes several plants in the Gastinois, and saffron in particular. Landbouwhoge school, Wageningen.

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation of *Alternaria alternata* pathogenicity on corm and leaves of saffron in vitro and greenhouse conditions

Ali Hossainnia[1] and Abbas Mohammadi[2]

Submitted: 21 May 2016 **Accepted:** 6 December 2016

Hossainnia, A., and Mohammadi, A. 2018. investigation of *Alternaria alternata* pathogenicity on corm and leave of saffron in vitro and greenhouse conditions. Saffron Agronomy & Technology 6(1): 61-72.

Abstract

Saffron is one of the most important herbs and spices in the East of Iran and its production is affected by various pathogens. This study is aimed at isolation, identification and pathogenicity detection of *Alternaria alternata* isolates as leave spot and corm rot of saffron agents. Soil samples and infected plant tissues were collected from different areas of the Birjand plain (Birjand, Khusf and Sarbishe) during the years 2014-15. *Alternaria* species were isolated by potato dextrose agar medium and their morphological characteristics were studied on the potato carrot agar medium. For molecular studies, genomic DNA was extracted by the CTAB method and ribosomal subunits of fungal isolates were amplified using ITS1 and ITS4 primers. Based on morphological characteristics, 80 isolates of A. alternata were isolated. The ITS regions sequences of selected isolates had 100 similarities with *A. alternata* spices sequences in NCBI and MycoBank. These isolates caused chlorosis and necrosis on detached leaves, the inoculated corm was rotten and inoculated plants showed chlorosis and necrosis on leaves after 3-5 days. The results showed that *A. alternata* in the Birjand plain can cause corm rot and leaf chlorosis and necrosis is saffron. This study is the first report of the virulence of this fungus on saffron tissue in the East of Iran.

Keywords: Birjand, Inoculation, Leaf spot, Pathogenicity, Rot.

1- MSc Student of Plant Pathology, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran
2- Associate Professor of Plant Pathology, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran
(*-Corresponding author Email: Amohammadi@birjand.ac.ir)
DOI: 10.22048/jsat.2016.54452.1164

www.SID.ir