Archive of SID

شناسایی و بیماری‌زایی گونه‌های فوزاریومی دخیل در پوسیدگی طبق و فلس پیاز خوراکی در اصفهان*

زهره سبحانی[۱]، بهرام شریف‌نبی[۲]** و مصطفی درویش‌نیا[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۷)

چکیده

پژمردگی و پوسیدگی طبق و فلس پیاز توسط گونه‌های مختلف فوزاریوم در سراسر جهان ایجاد می‌شود که سبب زیان و کاهش قابل ملاحظه‌ای در تولید می‌گردد. طی بازدیدهایی که از مزارع پیاز در اصفهان در اواسط دوره‌ی رشد گیاه به عمل آمد، علائم پژمردگی در مزرعه به صورت لکه‌ای مشاهده شد. نمونه‌برداری از پیازهایی که علائم زردی یا نکروز برگ‌ها و پژمردگی را نشان می‌دادند به صورت تصادفی انجام گرفت. همچنین هنگام برداشت پیاز سفید در مزارع و نیز در برخی از پیازهای انباری، علائمی چون آبسوختگی و تغییر رنگ روی چند فلس بیرونی پیاز در ناحیه گردن دیده شد. از نواحی تغییر رنگ یافته در ناحیه طبق و فلس پیاز کشت روی محیط PDA تهیه گردید. در مجموع ۶۰ جدایه از جنس فوزاریوم شامل؛ ۳۵ جدایه *Fusarium proliferatum*، هشت جدایه *F. acuminatum*، هفت جدایه *F. solani*، چهار جدایه *F. oxysporum*، چهار جدایه *F. falciforme* و دو جدایه *F. sambucinum* از گیاه پیاز جدا گردید. آزمون بیماری‌زایی روی فلس پیاز در دمای ۲۵ °C و رطوبت نسبی ۶۵ ٪ و گیاه پیاز در شرایط گلخانه انجام شد. دو گونه *F. sambucinum* و *F. falciforme* به عنوان عوامل پژمردگی بوته از پیازهای مبتلا به تغییر رنگ ریشه و طبق برای اولین‌بار جدا گردید. در تحقیق حاضر، علائم پوسیدگی، تغییر رنگ و ایجاد بافت نرم روی فلس‌های پیازهای سفید در اطراف گردن پیاز توسط گونه‌های فوزاریومی از ایران گزارش می‌شود. همچنین گونه *F. acuminatum* به عنوان عامل پوسیدگی و تغییر رنگ فلس برای اولین بار از پیاز جدا گردید.

کلیدواژه: پوسیدگی نرم، پژمردگی، پیاز سفید، ژن *EF-1α*، *Fusarium falciforme*

---

* بخشی از پایان نامه ی کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sharifna@cc.iut.ac.ir

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان (sobhani.zohreh69@yahoo.com)

۲. استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان (sharifna@cc.iut.ac.ir)

۳. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان (darvishnia.m@lu.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

Identification and pathogenicity of *Fusarium* species involved in onion basal and scale rot in Isfahan*

Z. Sobhani[1], B. Sharifnabi[2**], and M. Darvishnia[3]

(Received: 28.11.2018; Accepted: 16.2.2019)

Abstract

Several *Fusarium* species cause important diseases such as wilting and onion basal and scale rot all over the world lead to significant losses in the production. During the visits that were done from onion fields in Isfahan in the middle of the plant growth period, wilt symptoms were observed in the field as spots. Sampling of onions showing yellowish symptoms or leaf necrosis and wilting was done randomly. Also, during harvesting time of white onions in the fields and some onions in warehouse, symptoms such as watering and color changes were seen on several outer scales of onion in the neck area. A total of 60 Fusarium isolates were isolated from onion included; 35 isolates of *Fusarium proliferatum*, eight isolates of *F. acuminatum*, seven isolates of *F. solani*, four isolates of *F. oxysporum*, four isolates of *F. falciforme* and two isolates of *F. sambucinum*. Pathogenicity test was carried out on external scales of onions at 25 ° C and 65% relative humidity and onion plant in greenhouse conditions. Two species *of F. sambucinum* and *F. falciforme* were isolated as causal agent of plant wilting from onions with root and crown color changes for the first time. In the present study, the symptoms of rot, discoloration and soft tissue formation on the scales around the white onions neck by *Fusarium* species are reported from Iran. Also, *F. acuminatum* was isolated from the onion as a causal agent of rot and color change of the scales for the first time.

Keywords: Soft rot, Wilting, White onion, *EF-1α* , *Fusarium falciforme*

---

* A part of M.Sc. thesis submitted by the first author in College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

**Corresponding author's E-mail: sharifna@cc.iut.ac.ir

1,2. Graduate student and Professor of Plant Pathology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, respectively.

3. Associate Professor of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.)، یکی از قدیمی‌ترین سبزیجات، به عنوان ادویه و دارو برای هزاران سال استفاده شده است (Ghanbarzadeh *et al.* 2016). بیماری پوسیدگی طبق فوزاریومی مهم‌ترین عامل محدود کننده تولید محصول پیاز و گاهی کاهش عملکرد پیاز انباری است (Gei *et al.* 2014). تعدادی از گونه‌های فوزاریوم که باعث ایجاد بیماری می شوند، عبارتند از: *Fusarium oxysporum* Schlecht.، *F. solani* (Mart.) Sacc.، *F. acuminatum* Ellis & Everh.، *F. culmorum* (Smith) Sacc.، *F. equiseti* (Corda) Sacc.، *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg، *F. subglutinans* Wollenw. & Reinking.، *F. redolens* Wollenw. و *F. tricinctum* (Corda) Sacc (Bayraktar & Dolar 2011). این بیماری به فراوانی توسط گونه‌های *F. oxysporum* و *F. proliferatom* ایجاد می‌گردد. گونه *F. proliferatum* یکی از بیمارگرهای مهم پیاز در اروپا است و پتانسیل خطر تجمع زهرابه‌های قارچی در پیازهای آلوده به این قارچ وجود دارد (Dissanayake *et al.* 2009). قارچ *F. proliferatum*، به عنوان یک قارچ تولید کننده زهرابه، یکی از مهم‌ترین عوامل پوسیدگی قاعده پیاز است (Ghanbarzadeh *et al.* 2016). این گونه در کشور صربستان روی ارقام پیاز سفید و سیر مشاهده شده است (Stankovic *et al.* 2002). آلودگی فلس‌های بیرونی پیازهای سفید به *F. proliferatum* در ایالت واشنگتن آمریکا،گزارش گردیده است (Toit & Inglis 2003). گونه *F. proliferatum* در آرژانتین از فلس سیر و پیاز جدا و بیماری‌زایی آن اثبات گردیده است. (Salvalaggio & Ridao 2013). سه گونه *F. oxysporum*، *F. solani* و *F. semitectum* Berk. & Ravenel از پیازهای دارای علائم لکه برگی و سوختگی و مرگ گیاهچه در منطقه جیرفت جداسازی شده اند (Najafinia & Amiri 2010). اگرچه اولین شیوه آلودگی به وسیله *F. oxysporum* از طریق نفوذ مستقیم به قاعده پیاز است، آلودگی می‌تواند از طریق بافت‌های زخمی، به ویژه ریشه‌ها و بخش‌های قاعده‌ای فلس‌های پیاز نیز رخ دهد. این بیمارگر از طریق آلوده نمودن ریشه پیاز و نواحی طبق آن سبب پوسیدگی خشک می‌گردد. دمای مطلوب جهت توسعه بیماری اگرچه بین ۲۸ تا ۳۲ °C است، با این‌حال بیماری در خاک‌هایی با دمای ۱۵ تا ۳۲ °C نیز رخ می‌دهد (Cramer 2000). یک ارتباط مستقیم میان غلظت زاد مایه *F. oxysporum* f.sp *cepae* و میزان بیماری پوسیدگی طبق در گیاهچه‌های پیاز نشان داده شده است. این هم‌بستگی در خاک‌های مایه‌زنی شده بطور مصنوعی نیز مشاهده گردیده است. (Gei *et al.* 2014). این فرم یکی از ۱۰۰ فرم گزارش شده *F. oxysporum* است که جدایه‌های آن از مزارع مختلف و کشورهای گوناگون در قدرت بیماری‌زایی متفاوت هستند (Cramer 2000). پژمردگی فوزاریومی نیز از دیگر بیماری‌هایی است که توسط گونه‌های مختلف این قارچ ایجاد می‌شود. در ایران گونه‌های *F. solani*، *F. oxysporum* و *F. acuminatum* از ریشه و طبق پیاز جداسازی و به عنوان عامل پژمردگی گزارش شده‌اند. علائم این بیماری به صورت زردی، خشک شدن و پژمردگی بوته از پیاز گزارش شده است (Najafinia & Amiri 2010). گونه *F. falciforme* (Carrion) Summerb. & Schroers تاکنون فقط از درختان کاج *Pinus maximinoi* Moore و *Pinus tecunumanii* Eguiluz & Perry با علائم شانکر در ساقه و سرخشکیدگی شاخه‌ها در کشور کلمبیا (Herron *et al.*

www.SID.ir

Archive of SID

2015)، خاک، جلبک، پوست درخت و ریشه پوسیده برنج جدا گردیده است (Chehri *et al.* 2015). این گونه نخستین بار در ایران از خاک زمین‌های کشاورزی همدان، کردستان و کرمانشاه جدا گردیده است (Chehri 2014). تحقیق حاضر با هدف شناسایی گونه‌های فوزاریومی دخیل در بیماری پوسیدگی ریشه، طبق و فلس پیاز خوراکی سفید در منطقه فریدن اصفهان و ارزیابی بیماری‌زایی آن‌ها روی پیاز انجام گرفت.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه برداری، جداسازی و شناسایی

نمونه برداری در اواسط تیرماه، اوایل مرداد، اوایل تا اواخر شهریور و مهرماه ۱۳۹۴ از مزارع پیاز در منطقه فریدن استان اصفهان انجام شد. همچنین در دی ماه ۱۳۹۴ از تعدادی انبارهای خانگی بازدید بعمل آمد و تعدادی پیاز مشکوک به علایم پوسیدگی در فلس‌های بیرونی جمع‌آوری شد. نمونه‌های مزارع از گیاهانی که علایم پژمردگی را نشان می‌دادند، در پاکت‌های پلاستیکی قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور جداسازی گونه‌های فوزاریوم، بوته‌های آلوده ابتدا با آب روان به مدت کافی به منظور حذف خاک و خاشاک شستشو گردید. قطعات کوچکی (حد فاصل مرز سالم و آلوده) از ناحیه ریشه و طبق تهیه شد. این قطعات توسط اتانول ۷۰٪ و محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد با نسبت مساوی به مدت دو الی سه دقیقه ضدعفونی سطحی گردید و پس از شستشو در دو مرحله متوالی به مدت دو دقیقه با آب مقطر سترون، روی کاغذ صافی سترون خشک شدند. نمونه‌های خشک شده روی محیط کشت PDA در تشتک پتری کشت گردید. به منظور جداسازی قارچ بیمارگر از فلس پیاز نیز مراحل فوق انجام شد. ظروف پتری در دمای ۲۵ °C به مدت سه الی شش روز نگهداری و پس از تشکیل پرگنه قارچ، از حاشیه پرگنه قطعه کوچکی به محیط تازه PDA منتقل گشت. به منظور جداسازی و شناسایی گونه‌ها، از محیط‌های کشت جامد PDA به منظور اندازه‌گیری سرعت رشد پرگنه و ثبت مشخصات رنگ و شکل پرگنه در دمای ۲۵ °C با تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی، WA برای جوانه زدن کنیدیوم‌ها، تک اسپور کردن و یا انتخاب نوک ریسه و در نتیجه خالص سازی قارچ و CLA به منظور مشاهده برخی از ویژگی‌های تاکسونومیکی مانند زنجیره میکروکنیدیوم، سرهای دروغین، پلی‌فیالید، مونوفیالید، کلامیدوسپور و اسپوردوخیوم در دمای ۲۵ °C روز و ۲۰ °C شب و به فاصله ۳۰۰ میلی‌متری نور near ultra violet (nUV) به مدت ۱۴ الی ۲۱ روز درون انکوباتور استفاده شد (Nelson *et al.* 1983). به منظور شناسایی گونه‌های فوزاریومی، کلیدهای شناسایی (Leslie & Summerell 2006, Nelson *et al.* 1983) و مقالات معتبر مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA ژنومی قارچ به روش موری و تامپسون (Murray & Thompson 1980) با کمی تغییرات انجام گرفت. به منظور تهیه توده میسلیوم مورد نیاز برای استخراج از محیط PDA استفاده گردید. برای استخراج میزان ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر حاصل به لوله‌های ۱/۵ میلی-لیتری منتقل شد. مقدار ۷۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج نگهداری شده در حمام آب گرم ۶۵ °C (pH ۸، ۲۰ mM EDTA، ۱۰۰ mM Tris-HCl، ۱/۴ M NaCl، ۳ (W/V) ٪ CTAB) به هر نمونه اضافه گردید. به محتویات هر لوله بطور مجزا شش میکرولیتر بتا مرکاپتو اتانول اضافه شد

www.SID.ir

Archive of SID

(Murray & Thompson 1980). در این پژوهش، به منظور شناسایی جدایه‌های فوزاریومی ناحیه ژن *EF-1α* تکثیر و تعیین توالی شد. برای تکثیر ژن *EF-1α* در جدایه‌ها، از ترکیب آغازگرهای EF1T (5′-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3′) و EF2T (5′-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3′) به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده گردید. ساخت آغازگرها توسط شرکت ماکروژن Macrogen کره جنوبی صورت گرفت. مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل نه میکرولیتر آب دیونیزه سترون، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، پنج میکرولیتر مخلوط *Taq* DNA polymerase Master محصول شرکت Amplicon و چهار میکرولیتر DNA با غلظت ۳۰-۱۰ نانوگرم تهیه شد و واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Eppendorf T100 با ۳۵ چرخه تحت شرایط واسرشت سازی اولیه در ۹۴ °C به مدت ۸۵ ثانیه، واسرشت سازی در ۹۵ °C به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال در ۵۷ °C به مدت ۶۵ ثانیه، گسترش در ۷۲ °C به مدت ۹۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ °C به مدت ده دقیقه انجام گردید (Geiser *et al.* 2004).

آزمون بیماریزایی

آزمون بیماری‌زایی به منظور تعیین گونه‌های بیماری‌زا و مشخص نمودن علائم ایجاد شده توسط هرگونه انجام گرفت.

بیماری‌زایی روی فلس: به منظور اجرای آزمون برای هر تیمار (گونه فوزاریومی)، سه تکرار (پیازسفید) در نظر گرفته شد و آزمون سه بار تکرار گردید. ابتدا پوسته و دو فلس بیرونی، ریشه‌ها و قسمت پایینی طبق پیازهای خریداری شده از بازار جدا شد. پیازها پس از شستشو با آب روان در هیپوکلریت سدیم ۱ ٪ به مدت پنج دقیقه قرار گرفتند و پس از دو مرحله شستشو با آب مقطر سترون در هوا خشک شدند. در قسمت نزدیک به گردن و نزدیک به طبق پیاز توسط چوب پنبه سوراخ کن سه حفره به اندازه ۱۲۵ میلی‌متر مکعب ایجاد و از کشت جوان هر جدایه، قطعه‌ای به قطر پنج میلی‌متر در داخل حفره قرار داده شد. محل مایه‌زنی توسط پارافیلم پوشانده گردید. پیازهای مایه‌زنی شده بطور جداگانه داخل سلفون پیچانده و پس از ثبت مشخصات مربوطه داخل ظرف پلاستیکی درب بسته در دمای ۲۴ °C و رطوبت نسبی ۶۵ ٪ نگهداری شدند. برای تأمین رطوبت داخل ظرف پلاستیکی از دستمال‌های آغشته شده به آب مقطر سترون استفاده گردید. پس از گذشت ۱۵ روز، کیفیت بروز علائم بیماری توسط هر گونه فوزاریومی روی پیازهای مایه‌زنی شده ارزیابی گردید (Toit & Inglis 2003).

بیماری‌زایی در شرایط گلخانه‌ای: ابتدا برای انجام آزمون بیماری‌زایی در شرایط گلخانه‌ای زاد مایه از گونه-های مختلف فوزاریوم تهیه شد. راد مایه روی دانه گندم تهیه و به خاک سترون اضافه گردید. برای این منظور ابتدا بذور گندم به مدت ۲۰ ساعت در آب خیسانده و سپس به مقدار ۷۰ میلی‌لیتر از آن داخل ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و دهانه ارلن‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده گردید. بذور گندم داخل ارلن‌ها در سه روز متوالی توسط دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱۵ psi به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند. محتویات هر یک از ارلن‌های مذکور توسط یک گونه، با قرار دادن سه قطعه ۱۰ میلی‌متری از پرگنه قارچ روی محیط CLA مایه‌زنی شد و داخل انکوباتور با دمای ۲۵ °C و نور متناوب ۱۲ ساعت روشنایی به مدت سه هفته نگهداری گردید. هر هفته تکان شدیدی به ارلن‌ها داده شد تا قارچ تمام قسمت‌های بذور

www.SID.ir

Archive of SID

را بپوشاند. مخلوطی ازخاک مزرعه، شن و خاک برگ به نسبت وزنی ۱:۱:۱ تهیه و در دو روز متوالی اتوکلاو گردید (Amini *et al.* 2013). به منظور ایجاد زهکش مناسب، کف گلدان‌ها با سنگریزه اتوکلاو شده پوشانده شد. سپس یک مخلوط خاک گلخانه‌ای سترون شده داخل گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۹۰ میلی‌متر ریخته گردید. به میزان ۱۹ میلی‌لیتر از بذور گندم آلوده شده به صورت یکنواخت روی خاک پخش و دوباره مخلوط خاک به عمق یک سانتیمتر روی بذور آلوده ریخته شد. یک شیار به عمق پنج میلی‌متر داخل خاک ایجاد و هفت الی هشت بذر پیاز ضدعفونی شده (ابتدا با اتانول هفتاد درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس با هیپو کلریت سدیم یک درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شد و سپس سه مرتبه متوالی با آب مقطر سترون شسته و در مجاورت هوا خشک گردید (Galvan 2008) داخل شیار به طور مستقیم بالای محل آلودگی قرار داده شد. هر شیار با یک لایه نازک ماسه اتوکلاو شده پوشانده گردید. کاشت بذور پیاز در گلدان شاهد مانند روش مذکور انجام شد ولی فقط از دانه‌های گندم سترون شده استفاده گردید.گیاهان کشت شده روی یک میز گلخانه‌ای تحت شرایط تناوب نور طبیعی رشد کردند. دمای گلخانه بین ۲۲ الی ۲۵° C متغیر بود. خاک گلدان‌ها بعد از کاشت تا حد اشباع آبیاری و پس از آن در حد رطوبت زراعی نگهداری شد (Muller 2003). آزمون بیماری‌زایی برای هر گونه قارچی در چهار تکرار انجام گردید. گیاهان پس از گذشت ۲۴ روز از زمان مایه‌زنی برای ارزیابی کیفیت بیماری‌زایی از روی علائم برگی و تغییر رنگ ریشه و طبق مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج

در این پژوهش، در مجموع پنج گونه فوزاریومی شامل *F. proliferatum*، *F. acuminatum*، *F. solani*، *F. falciforme* و *F. sambucinum* به ترتیب با درصدهای فراوانی نسبی ۵۵/۵ ٪، ۱۵/۵ ٪، ۱۵/۵ ٪، ۸/۸ ٪ و ۴/۴ ٪ از طبق پیازهای مبتلا به علائم پژمردگی بوته، نکروز ریشه، تغییر رنگ طبق یا پوسیدگی در محل طبق جدا گردید. همچنین در تحقیق حاضر، گونه‌های *F. proliferatum*، *F. oxysporum* و *F. acuminatum* به ترتیب با درصدهای فراوانی نسبی ۶۴/۲۸ ٪، ۲۷/۵۷ ٪ و ۷/۱۴ ٪ از نواحی تغییر رنگ یافته در فلس‌های بیرونی در قسمت گردن پیاز جدا شدند.

بررسی مولکولی

به منظور تأیید شناسایی مورفولوژیکی و ارزیابی روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های بررسی شده در تحقیق حاضر، ناحیه‌ی ژن *TEF-1α* تکثیر گردید (Geiser *et al.*2004). طی تکثیر این ژن مشخص گردید که طول قطعات به دست آمده از گونه‌های مختلف فوزاریومی دارای اندازه-های متفاوت است، بطوری که اندازه قطعات تکثیر شده در محدوده‌ی ۶۰۰ تا ۷۰۰ bp. دیده شد. مقدار ۲۵ میکرولیتر از هر محصول PCR پس از انجام الکتروفورز و اطمینان از وجود باند مورد نظر به وسیله‌ی نشانگر III تعیین غلظت شد و به شرکت Macrogen کره جنوبی جهت توالی یابی ارسال گردید. پس از دریافت توالی‌ها، کیفیت توالی یابی نمونه‌ها با بررسی الکتروگرام آن‌ها با استفاده از نرم افزار CLC Sequence Viewer 6 بررسی و پس از اطمینان از کیفیت مناسب آن‌ها، توالی‌های مربوط به هر گونه مشخص شد. توالی ناحیه *TEF-1α* مربوط به هر گونه که توسط جفت آغازگر EF1T/EF2T تکثیر یافته بود، با استفاده از نرم افزار BLAST با اطلاعات موجود در بانک ژن مقایسه گردید. در تمامی موارد توالی یابی نوکلوتیدی نمونه‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های قارچی استفاده شده در این پژوهش.

Table 1. Characteristics of the isolates used in this study.

GenBank No.	Species	Code	IRAN accession No.
KY697902	*Fusarium falciforme*	ZSF179	IRAN 2753C
KY697903	*Fusarium proliferatum*	ZSF 191	IRAN 2754C
KY697906	*Fusarium. acuminatun*	ZSF 428	IRAN 2757C

No: number

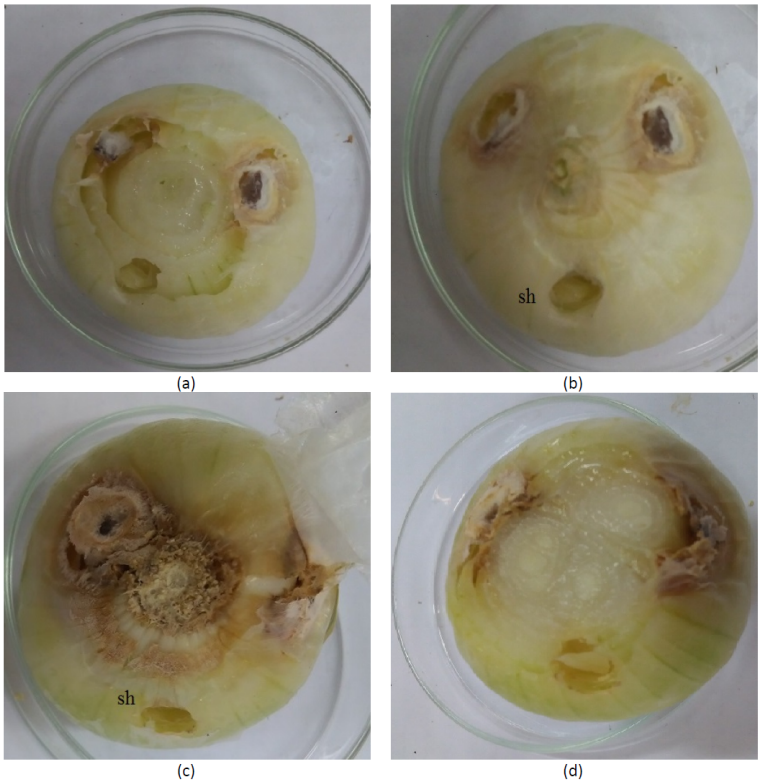
شناسایی مورفولوژیکی گونه‌ها را تأیید نمود. مشخصات تعدادی از جدایه‌های مورد استفاده در پژوهش و ثبت شده در بانک ژن NCBI که به کلکسیون ملی قارچ‌های زنده ایران نیز ارسال گردیده، در جدول ۱ آورده شده است.

بیماری‌زایی گونه‌ها

بیماری‌زایی روی فلس پیاز: پس از گذشت ۱۵ تا ۱۶ روز از زمان مایه‌زنی روی فلس پیاز در دمای ۲۴ °C و رطوبت نسبی ۶۵ ٪ علائم متعددی مشاهده گردید که با علائم مشاهده شده در پیازهای انباری و پیازهای برداشت شده در مزرعه مطابقت داشت. بعد از دو هفته از انجام مایه‌زنی عمیق (۵ میلیمتر)، علائم به اشکال آبسوختگی، صورتی مایل به نارنجی تا خرمایی تا طلائی شدن، چروکیدگی و بافت نرم در فلس‌های بیرونی همراه با توسعه پوسیدگی در طبق مشاهده گردید. در نمونه‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های مختلف *F. proliferatum* در اطراف گردن پیاز، علائم متعددی شامل؛ آبسوختگی در محل مایه‌زنی، تغییر رنگ در فلس‌های بیرونی از زعفرانی تا صورتی مایل به نارنجی تا بنفش کمرنگ تا قهوه‌ای شکلاتی و نرم شدن بافت مشاهده شد. در مایه‌زنی‌های نزدیک به طبق نیز علائم مذکور مشاهده گردید ولی پوسیدگی از محل مایه‌زنی تا قاعده‌ی فلس‌های بیرونی تا طبق توسعه پیدا نمود و سبب پوسیدگی طبق نیز شد. در بیش‌تر نمونه‌ها، با پوسیده شدن قاعده‌ی فلس‌های بیرونی و طبق، انتهای فلس‌ها از طبق جدا گردیده بود. در تمام نمونه‌ها ریسه‌های قارچی به رنگ هلویی تا زعفرانی در محل مایه‌زنی مشاهده گردید (شکل ۱). در نمونه‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های مختلف *F. oxysporum* نیز آبسوختگی در محل مایه‌زنی خصوصاً در حفره‌های ایجاد شده در اطراف گردن دیده شد که به طرف گردن پیشرفت و حتی گاهی حفره شاهد را نیز آلوده کرده بود. تغییر رنگ صورتی مایل به نارنجی تا بنفش کمرنگ تا قهوه‌ای شکلاتی همراه رگه‌های بنفش در فلس‌های بیرونی مشاهده شد. در مایه‌زنی‌های نزدیک به طبق، پوسیدگی از محل مایه‌زنی تا قاعده‌ی فلس‌های بیرونی تا طبق گسترش پیدا نمود که سبب پوسیده شدن طبق به رنگ شکلاتی تا قهوه-ای شد و قاعده‌ی پوسیده‌ی فلس‌های بیرونی از طبق جدا گردید. در برخی از نمونه‌ها پوسیدگی از محل طبق به فلس‌های داخلی نیز سرایت کرده بود. در بیش‌تر نمونه‌های مایه‌زنی شده بافت اضمحلال یافته، نرم و به شکل آبدار و لهیده مشاهده شد. در تمام نمونه‌ها ریسه‌های قارچی به رنگ سفید تا هلویی تا زعفرانی در محل مایه‌زنی رشد یافت (شکل ۲). علائم ناشی از قارچ *F. acuminatum* در تکرارهای متعدد شامل؛ آبسوختگی در اطراف محل مایه‌زنی، تغییر رنگ فلس‌های بیرونی به صورت طلائی و صورتی مایل به نارنجی تا خرمائی تا قهوه‌ای و نرم شدن بافت بود اما تغییر رنگ بنفش مشاهده نشد. در تمام تکرارها ریسه‌های زعفرانی رنگ در محل مایه‌زنی مشاهده گردید. در مایه‌زنی‌های نزدیک به محل گردن تغییر در

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. علائم تغییر رنگ، آبسوختگی، بافت نرم و پوسیدگی روی فلس‌های بیرونی پیاز ناشی از مایه‌زنی جدایه *Fusarium proliferatum*. علائم مایه زنی در اطراف گردن پیاز (a)، برش عرضی نزدیک گردن (b)، علائم مایه‌زنی نزدیک طبق پیاز (c)، برش عرضی نزدیک طبق پیاز (d) و حفره شاهد (sh).

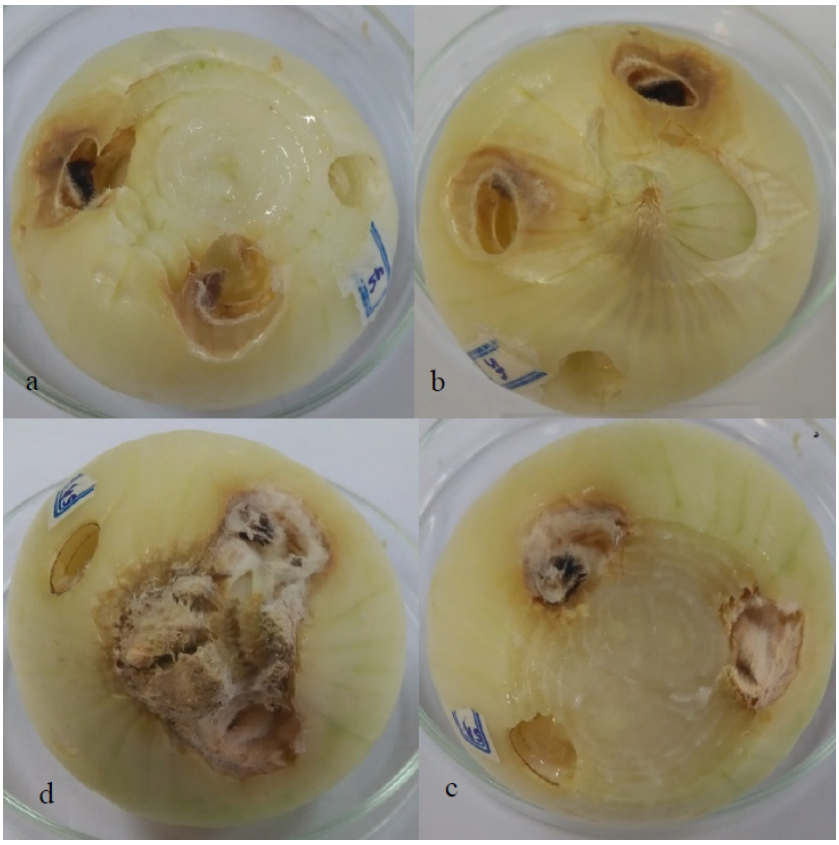
Fig 1. Symptoms of discoloration, watering, soft tissue and decay on foreign scales of onion induced by *Fusarium proliferatum* isolate. Symptoms of pathogenicity around the onion neck (a), cross cut at near neck (b), symptoms of pathogenicity near the onion basal (c), cross cut at near onion basal (d) and control cavity (sh).

بافت فلس بیش‌تر به صورت آبسوختگی بود و فلس‌های داخلی کم‌تر تحت تأثیر تغییر رنگ و پوسیدگی قرار داشتند. در مایه‌زنی‌های نزدیک به محل طبق، پوسیدگی از محل مایه‌زنی تا طبق توسعه پیدا نموده و بافت طبق دچار تغییر رنگ شکلاتی تا قهوه‌ای گردیده بود. قاعده‌ی پوسیده فلس‌های بیرونی نیز از طبق جدا و به رنگ قهوه‌ای شکلاتی دیده شد (شکل ۳.) به منظور تکمیل اصول کخ، بافت‌های پوسیده دوباره کشت گردید و همان قارچ‌های مادری در محیط کشت رشد نمود.

بیماری‌زایی در شرایط گلخانه‌ای: در این تحقیق با انجام آزمون بیماری‌زایی در شرایط گلخانه‌ای، علائمی چون؛ زردی، نکروز نوک برگ‌ها و حتی گاهی زردی تمام برگ در یک طرف گیاهچه‌های پیاز، پوسیدگی بذر و عدم سبز شدن، مرگ گیاهچه و همچنین کوتاه بودن گیاهچه‌ها در مقایسه با گیاهچه شاهد دیده شد. علائم زیرزمینی نیز شامل تغییر رنگ ریشه و طبق بود که به صورت زعفرانی تا قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره تا سیاه رنگ مشاهده گردید (شکل‌های ۴ و ۵). گیاهچه‌های شاهد اندام هوایی شادابی داشتند و هیچ علامتی از بیماری روی ریشه، طبق و اندام هوایی آن‌ها ایجاد نشد. به هر حال، تمام گونه‌ها قادر به ایجاد علائم پژمردگی در گیاهچه‌ها و تغییر رنگ ریشه و طبق بودند. به منظور تکمیل اصول کخ از نواحی تغییر

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲. علائم تغییر رنگ، آبسوختگی، بافت نرم و پوسیدگی روی فلس‌های بیرونی پیاز ناشی از مایه‌زنی جدایه *Fusarium oxysporum*.. علائم مایه زنی در اطراف گردن پیاز (a)، برش عرضی نزدیک گردن (b)، علائم مایه‌زنی نزدیک طبق پیاز (c)، برش عرضی نزدیک طبق پیاز (d) و حفره شاهد (sh).

Fig 2. Symptoms of discoloration, watering, soft tissue and decay on foreign scales of onion induced by *Fusarium oxysporum* isolate. Symptoms of pathogenicity around the onion neck (a), cross cut at near neck (b), symptoms of pathogenicity near the onion basal (c), cross cut at near onion basal (d) and control cavity (sh).

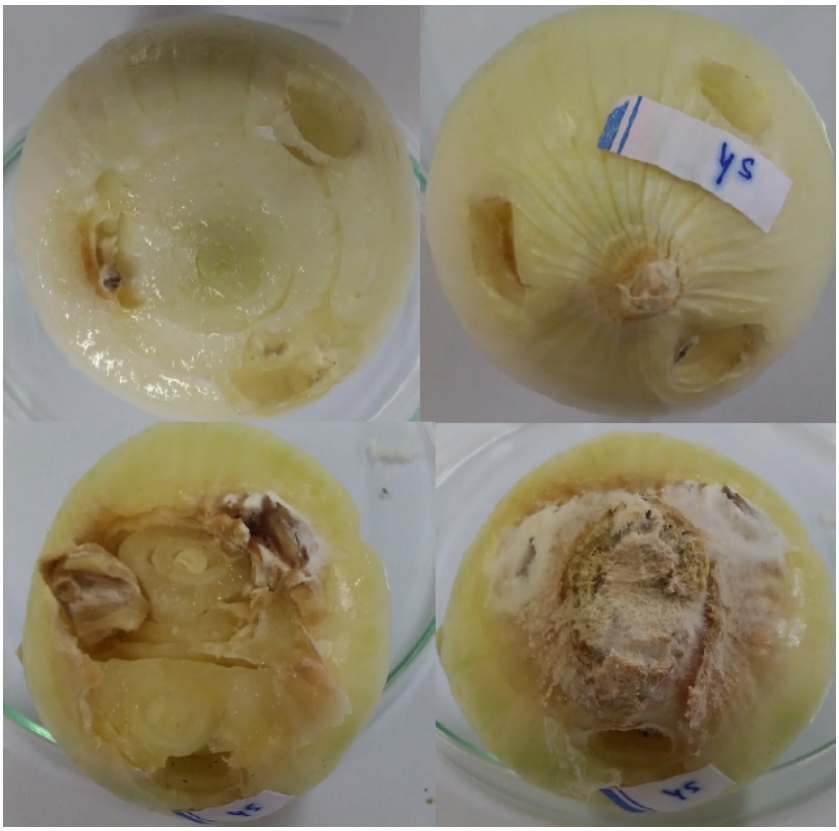
رنگ یافته در طبق دوباره کشت انجام شد و پرگنه رشد یافته روی محیط PDA همان مشخصات گونه مایه‌زنی شده را داشت.

بحث

در مجموع ۶۰ جدایه از جنس فوزاریوم شامل ۳۵ جدایه *F. proliferatum*، هشت جدایه *F. acuminatum*، هفت جدایه *F. solani*، چهار جدایه *F. oxysporum*، چهار جدایه *F. falciforme* و دو جدایه *F. sambucinum* از گیاه پیاز جدا گردید. پس از گذشت ۱۵ تا ۱۶ روز از زمان مایه‌زنی روی فلس‌های بیرونی در دمای ۲۴ °C و رطوبت نسبی ۶۵ ٪ علائم متعددی مشاهده گردید که با علائم مشاهده شده در پیازهای انباری و برداشت شده در مزرعه مطابقت داشت. نتایج آزمون همچنین با نتایج آزمون بیماری‌زایی توسط تویت و انگلیس (Toit & Inglis 2003) در واشنگتن شباهت داشت. آن‌ها نیز گزارش کردند که بعد از دو هفته از انجام مایه‌زنی عمیق (ده میلی‌متر) در شرایط رطوبت نسبی ۶۵ ٪ و دمای ۱۳ °C، تغییر رنگ صورتی- نارنجی روی فلس‌های بیرونی پیاز در محل‌های مایه‌زنی ظاهر و پوسیدگی طبق هم مشاهده شد. پس از

www.SID.ir

Archive of SID



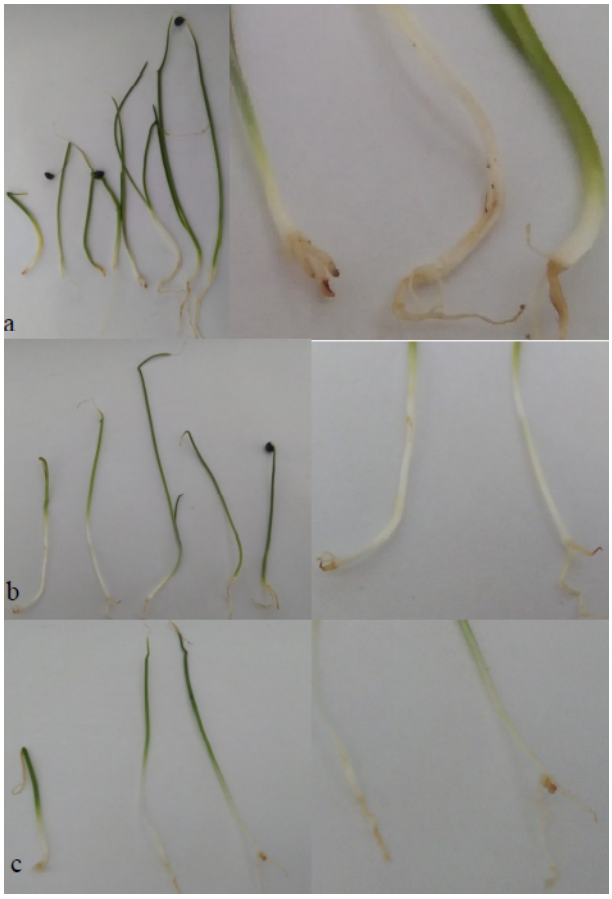
شکل ۳. علائم تغییر رنگ، آبسوختگی، بافت نرم و پوسیدگی روی فلس‌های بیرونی پیاز ناشی از مایه‌زنی جدایه *Fusarium acuminatum*. علائم مایه زنی در اطراف گردن پیاز (a)، برش عرضی نزدیک گردن (b)، علائم مایه‌زنی نزدیک طبق پیاز (c)، برش عرضی نزدیک طبق پیاز (d) و حفره شاهد (sh).

Fig 3. Symptoms of discoloration, watering, soft tissue and decay on foreign scales of onion induced by *Fusarium acuminatum* isolate. Symptoms of pathogenicity around the onion neck (a), cross cut at near neck (b), symptoms of pathogenicity near the onion basal (c), cross cut at near onion basal (d) and control cavity (sh).

گذشت سه هفته علائم را به اشکال؛ آبسوختگی، قهوه‌ای تا طلائی شدن، چروکیدگی، بافت نرم در فلس‌های بیرونی و بدون توسعه پوسیدگی در طبق مشاهده کردند که این علائم نیز مشابه علائم مشاهده شده در پیازهای سفید انباری در ایالت آیداهو در آمریکا توسط *F. proliferatum* بود (Toit & Inglis 2003). در این پژوهش، علائم متعدد و تقریباً مشابه شامل: آبسوختگی، صورتی مایل به نارنجی تا خرمایی تا طلائی شدن، چروکیدگی و بافت نرم در فلس‌های بیرونی همراه با توسعه پوسیدگی در طبق توسط هر سه گونه بیمارگر روی پیاز ایجاد شد که با علائم اولیه از گیاه بیمار مطابقت داشت هر چند که فقط تغییر رنگ بنفش توسط گونه *F. acuminatum* روی فلس ایجاد نگردید. به هر حال، به نظر می‌رسد که تفاوت قابل توجهی بین علائم و نوع گونه بیمارگر وجود ندارد. مایه‌زنی توسط هر سه گونه سبب توسعه پوسیدگی از فلس تا طبق شد و به نظر می‌رسد که یک نگرانی در مورد پتانسیل گسترش پوسیدگی از فلس‌های بیرونی به طرف طبق پیازهای انباری وجود دارد، هرچند که تویت و انگلیس (Toit & Inglis 2003) گزارش کرده‌اند که این پوسیدگی در انبار به فلس-های بیرونی محدود می‌گردد. در بیماری پوسیدگی ریشه و

www.SID.ir

Archive of SID



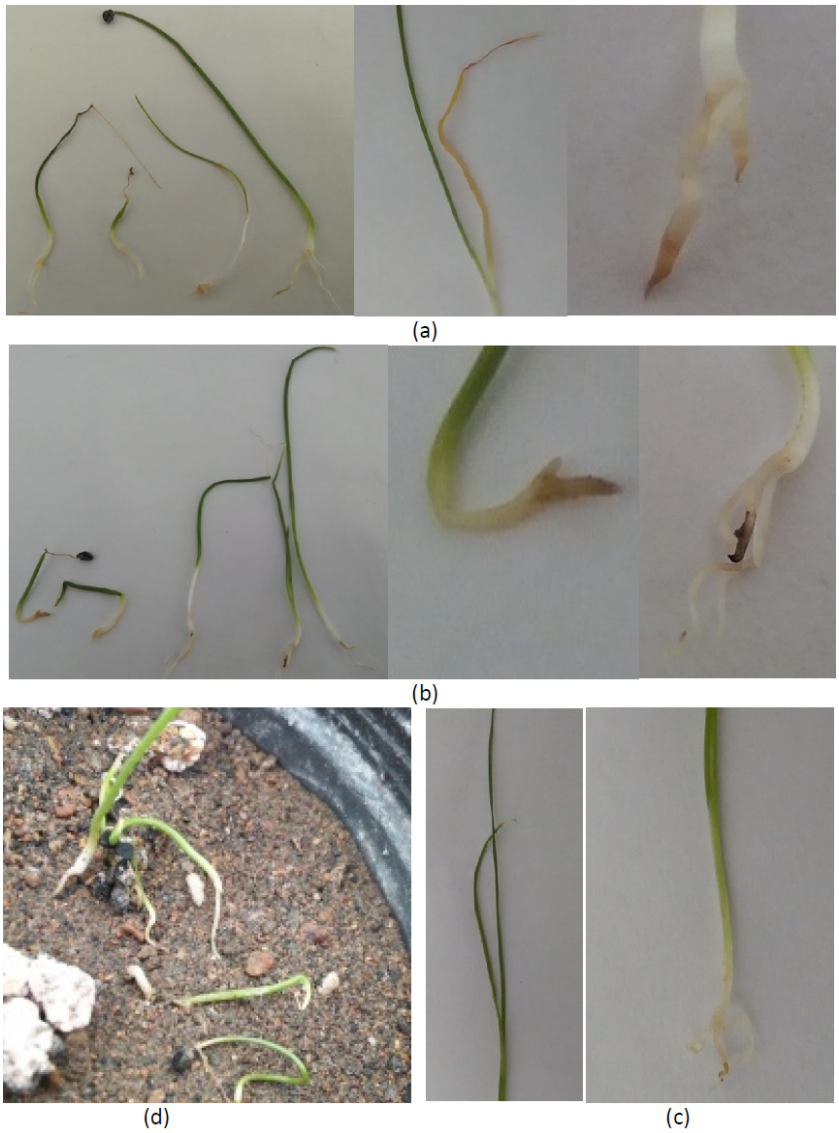
شکل ٤. تغییر رنگ قهوه ای تیره تا سیاه روی ریشه و طبق همراه زردی، نکروز و خشکیدگی نوک برگ‌ها در گیاهچه‌های پیاز ناشی از مایه‌زنی *F. falciforme* (a)، تغییر رنگ قهوه‌ای ریشه و طبق همراه نکروز و خشکیدگی نوک برگ ناشی از مایه‌زنی *F. acuminatum* (b) و تغییر رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره همراه زردی، نکروز و خشکیدگی نوک برگ ناشی از مایه‌زنی *F. solani* در گیاهچه‌های پیاز (c) در شرایط گلخانه‌ای.

Fig 4. Discoloration in dark brown to black color on root and crown with necrosis and drying of leaf tip in onion seedlings caused by *F. falciforme* (a), brown color change in root and crown along necrosis and leaf tip drying caused by *F. acuminatum* (b) and color change in light to dark brown with yellowish, necrosis and leaf tip drying due to *F. solani* inoculation in onion seedlings (c) in greenhouse conditions.

طبق فوزاریومی علائم می‌تواند در برگ‌ها، ریشه، طبق و فلس پیازچه‌ها، گیاهان بالغ و پیازهای انباری مشاهده شود. بیمارگر عامل پوسیدگی طبق، سبب قهوه‌ای شدن بافت قاعده‌ای طبق می‌شود. چنانچه شرایط محیطی جهت رشد و توسعه بیمارگر مساعد باشد، بیمارگر گیاهچه‌های جوان را پیش از ظهور علائم قابل رؤیت، خواهد کشت. به علاوه می‌تواند سبب تأخیر در جوانه‌زنی، مرگ و کوتاه-شدن رشد گیاهچه‌های جوان شود. در گیاهان بالغ اولین علائم هوایی زرد شدن تمام برگ‌ها است (Cramer 2000). در این تحقیق نیز با انجام آزمون بیماری‌زایی در شرایط گلخانه‌ای، علائمی چون؛ زردی، نکروز نوک برگ-ها و حتی گاهی زردی تمام برگ در یک طرف گیاهچه-های پیاز، پوسیدگی بذر و عدم سبز شدن، تأخیر در جوانه‌زنی و همچنین مرگ گیاهچه دیده شد. علائم زیرزمینی نیز شامل تغییر رنگ طبق و ریشه بود که به صورت زعفرانی تا قهوه‌ای روشن تا تیره تا سیاه رنگ مشاهده گردید. فروانی گونه‌های به دست آمده و نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان می‌دهد که گونه *F. proliferatum* در منطقه فریدن اصفهان روی پیاز شایع بوده و علاوه بر ایجاد پوسیدگی و تغییر رنگ در فلس پیاز در انبار و مزارع، عامل عمده‌ی پوسیدگی، تغییر رنگ ریشه و طبق پیاز و پژمردگی این گیاه در مزارع این منطقه است. در بیش‌تر نمونه‌ها آلودگی مخلوط مشاهده شد و بیش از یک جدایه فوزاریومی به دست آمد. در این پژوهش دو گونه *F. sambucinum* و *F. falciforme* نیز به عنوان عوامل پژمردگی از گیاهان مبتلا به تغییر رنگ ریشه و طبق برای اولین‌بار از گیاه پیاز جدا گردید. در تحقیق حاضر، علائم پوسیدگی، تغییر رنگ و ایجاد بافت نرم روی فلس‌های بیرونی در اطراف گردن پیازهای سفید توسط گونه‌های فوزاریومی برای اولین بار در ایران گزارش می‌شود. فلس-های پیاز و غلاف برگ پیاز دارای مقدار بالایی قند هستند. مقدار قند به عنوان یک عامل بازدارنده‌ی سنتز آنزیم‌های

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. تغییر رنگ زعفرانی تیره تا قهوه‌ای روشن تا تیره تا سیاه روی ریشه و طبق همراه زردی، نکروز و خشکیدگی نوک برگ و زردی برگ در یک طرف گیاهچه پیاز ناشی از مایه‌زنی *F. proliferatum* (a-b) و تغییر رنگ قهوه‌ای ریشه و طبق همراه نکروز، خشکیدگی نوک برگ و مرگ گیاهچه پیاز ناشی از *F. sambucinum* در شرایط گلخانه‌ای (c).

Fig 5. Discoloration in dark saffron to light and dark brown to black on the root and crown with yellowish, necrosis, drying of leaf tip and yellowish of leaf on one side of onion seedling caused by inoculation of *F. proliferatum* (a-b) and discoloration in dark brown on root and crown with necrosis, drying of leaf tip and damping off in onion seedling caused by *F. sambucinum* in greenhouse conditions.

پکتیک نشان داده شده است و ممکن است رشد قارچ را آهسته کند. طبق و آپوپلاست مقدار قند کم‌تری دارند و این ممکن است علت اینکه چرا بیمارگر ابتدا در این مناطق از گیاه ظاهر می‌گردد را توضیح دهد. هنگامی که *F. oxysporum* f.sp *cepae* به ریشه حمله می‌کند، به سمت طبق پیشرفت می‌کند. اگر بیماری توسعه یابد، پوسیدگی در طبق شروع شده و به طرف بالا در فلس پخش می‌گردد. سوخ‌های آلوده به صورت قهوه‌ای مایل به قرمز و در ظاهر

www.SID.ir

Archive of SID

ابتدا آبکی و سپس خشک و کاملاً چروکیده خواهند شد (Tahvonen 1981). نتایج این تحقیق نیز یک موافقت با این یافته‌ها نشان می‌دهد. با توجه به نتایج چنین به نظر می‌رسد که پتانسیل ایجاد پوسیدگی از نواحی آلوده‌ی موجود در اطراف قاعده‌ی فلس‌های بیرونی به طبق پیاز می‌تواند وجود داشته باشد. همچنین به نظر می‌رسد که آلودگی در اطراف گردن پیاز به فلس‌های بیرونی محدود می‌گردد و فلس‌های داخلی‌تر را درگیر نمی‌کند.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه صنعتی اصفهان به خاطر فراهم آوردن امکان انجام این تحقیق سپاسگزارند.

منابع

Amini J., Kazemi M., Abdollahzadeh J. and Darvishnia M. 2013. Identification of *Fusarium* spp. and their pathogenicity associated with root rot of tomato, Marvdasht. Iranian Journal of Plant Protection Science 44: 71-80. (In Persian with English Summary)

Bayraktar H. and Dolar F. S. 2011. Molecular identification and genetic diversity of *Fusarium* species associated with onion fields in Turkey. Journal of Phytopathology 159: 28-34.

Chehri K., Baharuddin S. and Latiffah Z. 2015. Morphological and phylogenetic analysis of *Fusarium solani* species complex in Malaysia. Microbiology Ecology 9:457–471.

Chehri K. 2014. Four new *Fusarium* species from *Fusarium solani* species complex isolated from soil. Rostaniha 15: 35-42. (In Persian with English Summary)

Cramer C. S. 2000. Breeding and genetics of Fusarium basal rot resistance in onion. Euphytica 115: 159–166.

Dissanayake M. L. M. C., Tanaka S. and Ito S. 2009. Fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* strains isolated from *Allium fistulosum* plants and seeds in Japan. Letters in Applied Microbiology 48: 598–604.

Galvan G. A., Koning-Boucoiran C. F. S., Koopman W. J. M., Burger-Meijer K., Gonzalez P. H., Waalwijk C., Kik C. and Scholten O. E. 2008. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to Fusarium basal rot in related *Allium* species. Europian Journal Plant Pathology 121: 499–512.

Gei P. F. C., Valdez J. G., Piccolo R. J. and Galmarini C. R. 2014. Influence of *Fusarium* spp. isolate and inoculum density on resistance screening tests in onion. Tropical Plant Pathology 39: 19-27.

Geiser D. M., Jimenez-Gasco M. M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T. J., Zhang N., Kuldau G. A. and O'Donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Plant Pathology 110: 473–479.

Ghanbarzadeh B., Safaie N., Mohammadi Goltapeh E., Rezaee Danesh Y. and Khelghatibana F. 2016. Biological control of Fusarium basal rot of onion using *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae*. Journal of Crop Protection 5: 359-368.

Herron D. A., Wingfield M. J., Wingfield B. D., Rodas C. A., Marincowitz S. and Steenkamp E. T. 2015. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. Studies in Mycology 80: 131–150.

Leslie, J. F. and Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Professional, Ames, USA. 388 pp.

Muller D. S., Nelson R. L., Hartman G. L. and Pedersen W. L. 2003. Response of commercially developed soybean cultivars and the ancestral soybean lines to *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Plant Disease 87: 827-831.

Murray M. and Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4326.

Najafinia M. and Amiri M. 2010. Identification of fungal agents of garlic and onion leaf spot and blight in Jiroft, Iran. Journal of Plant Production 17: 91-101. (In Persian with English Summary)

Nelson P. E., Toussoun T. A. and Marasas W. F. 1983. *Fusarium* species: *An* Illustrated Manual for Identification. University Park, Pennsylvania State University Press. 193 p.

Salvalaggio A. E. and Ridao A. del C. 2013. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot on garlic and onion

www.SID.ir

Archive of SID

in Argentina. Plant Disease 97: 556.
Stankovic S., Levic J., Petrovic T., Logrieco A. and Moretti A. 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. European Journal of Plant Pathology 118: 165–172.
Tahvonen R. 1981. Storage fungi of onion and their control. Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland 53: 27-41.
Toit, L. J. du and Inglis D. A. 2003. *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. Plant Disease 83: 750.

www.SID.ir