

تعیین نژاد فیزیولوژیکی جدایه های عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در مناطق عمده کشت محصول در ایران

رحیم احمدوند^۱ و عبدالجمیل زربخش^۲

چکیده

در سال ۱۳۸۲، طی بازدید از مناطق مهم کشت گوجه فرنگی از جمله ورامین، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، خوزستان، بوشهر و اصفهان از گیاهان دارای علائم پژمردگی نمونه برداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از جداسازی به روش تک اسپور خالص سازی گردیدند. در مجموع ۳۸ جدایه به عنوان نماینده انتخاب و با استفاده از کلید نلسون و همکاران تعیین هویت شدند. همه جدایه ها متعلق به گونه *Fusarium oxysporum* بودند. با تلقیح گیاهچه های ۳۰ روزه رقم حساس Bonny Best با سوسپانسیون قارچ با غلظت 5×10^6 Spores/ml بیماری زایی آن ها به اثبات رسید. جدایه های بیماری زا قادر به ایجاد پوسیدگی در ریشه و طوقه نبوده و تغییر رنگ آوندهای چوبی تا قسمت های بالایی ساقه و حتی در دمبرگ مشاهده گردید. سرعت رشد کلنی های قارچ در دمای ۲۷°C بیشتر از دمای ۱۸°C بود. لذا فرم اختصاصی این جدایه ها *lycopersici* تعیین گردید. میانگین درجه آلودگی جدایه های مختلف روی رقم Bonny Best نشان داد که بین توان بیماری زایی جدایه ها در سطح یک درصد اختلاف معنی دار وجود دارد. جدایه MD₄ (جمع آوری شده از مرنده) با میانگین درجه آلودگی ۴/۸۴ مهاجم تر (More Aggressive) از سایر جدایه ها بوده و جدایه DSF₂₈ (جمع آوری شده از دزفول) با میانگین آلودگی ۳/۰۶۲ کم ترین شدت بیماری زایی را نشان داد. به منظور تعیین نژاد جدایه ها، گیاهچه های ۳۰ روزه ارقام افتراقی شامل Bonny Best (فاقد ژن مقاومت)، Manapal (مقاوم به نژاد یک) و Walter (مقاوم به نژادهای یک و دو) مایه زنی کرده و در ۵ تکرار با سه گیاهچه (نشاء) در هر تکرار در گلخانه کشت شدند. پس از سه هفته علائم و شدت بیماری زایی بر اساس سیستم نمره دهی صفر تا پنج همینگ و همکاران ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که همه جدایه ها تنها روی رقم Bonny Best قادر به ایجاد علائم بیماری بوده اما روی ارقام Manapal و Walter بیماری زا نبودند. هم چنین مقایسه این جدایه ها با نژادهای استاندارد (۱، ۲ و ۳ تهیه شده از دانشگاه آمستردام هلند) روی ارقام افتراقی نشان داد که با نژاد یک مطابقت دارند، بنابراین به نژاد یک تعلق داشتند.

واژه های کلیدی: گوجه فرنگی، پژمردگی فوزاریومی، *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*، نژاد فیزیولوژیکی

مقدمه

گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) یکی از گیاهان مهم تیره سولاناسه (Solnaceae) می باشد که منشأ آن کشور پرو است. سابقه کشت آن در ایران حدود ۱۵۰ سال است. میوه این گیاه دارای ویتامین های مختلف و عناصر معدنی فراوانی است و از نظر مصرف غذایی این گیاه جایگاه ویژه ای در بین محصولات مختلف دارد (خوشخوی و همکاران، ۱۳۷۱). سطح زیر کشت این محصول در ایران حدود ۱۳۰ هزار هکتار با میزان تولید حدود ۴/۵ میلیون تن است (آمار- نامه کشاورزی، سال زراعی ۱۳۸۴-۱۳۸۳). بیماری پژمردگی فوزاریومی دارای اهمیت جهانی بوده و حداقل از ۳۲ کشور گزارش شده است (واکر، ۱۹۸۱؛ بوث، ۱۹۷۱). در برخی ایالت های آمریکا خسارت ناشی از این بیماری ۱۰۰-۸۰ درصد بوده است (نیرگارد، ۱۹۸۸). این بیماری به دلیل دارا بودن خصوصیتی از قبیل انتشار وسیع، ایجاد خسارت قابل ملاحظه، بقای طولانی مدت عامل بیماری در خاک، داشتن نژادهای فیزیولوژیک مختلف و مشکل بودن مبارزه شیمیایی با آنها، در ردیف مهم ترین و مورد توجه ترین بیماری های گوجه فرنگی قرار گرفته است. اولین علائم بیماری در گیاهچه های گوجه فرنگی به صورت روشن شدن رگبرگ ها و خمیدگی دمبرگ ها (Epinasty) است (دیموند و واگونر، ۱۹۵۳؛ فوستر، ۱۹۴۶). گیاهچه های آلوده کوتاه تر از گیاه طبیعی شده، برگ های مسن تر ریزش کرده یا به طرف پایین خم می شوند. بافت آوندی آنها قهوه ای تیره بوده و این گیاهچه ها غالباً پژمرده شده و می میرند (جونز، ۱۹۹۱). علائم بیماری در مزرعه به صورت زردی برگ های پایین و مرگ آنها بوده، سپس این علائم به طرف برگ های جوان پیشروی می کند. معمولاً یک یا چند شاخه تحت تاثیر بیماری قرار می گیرد و گاهی برگچه های یک طرف برگ و یا یک طرف برگچه ها علائم زردی را نشان می دهند. در برش ساقه یا دمبرگ آنها به صورت قهوه ای مشاهده می شوند (واکر، ۱۹۸۱). قهوه ای شدن سیستم آوندی از ویژگی های این بیماری بوده و عموماً جهت تشخیص بیماری به کار می رود (جونز، ۱۹۹۱).

قارچ *F. oxysporum* Schl. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, 1940 عامل این بیماری می باشد.

این قارچ سه نوع اسپور تولید می کند که شامل میکروکنیدی، ماکروکنیدی و کلامیدوسپور است. میکروکنیدی های یک تا دو سلولی به میزان فراوان و به طور مکرر در همه شرایط از جمله در آوندهای گیاهان آلوده تولید می شوند. ماکروکنیدی های ۳-۵ سلولی به تدریج باریک شده و در انتها حالت خمیده دارند. این ماکروکنیدی ها روی گیاهان مرده تشکیل می شوند. کلامیدوسپورها در حفظ بقاء قارچ در خاک نقش دارند. آنها یک یا دو سلولی با دیواره ضخیم و مدور بوده که از هیف های پیر و ماکروکنیدی ها به وجود می آیند. هر سه نوع اسپور در محیط کشت و احتمالاً در خاک تولید می شوند. هر چند که تنها کلامیدوسپورها عامل حفظ بقاء قارچ در خاک می باشند (اگریوس، ۱۹۹۷). میسلیم ها در ابتدا بی رنگ بوده اما به تدریج تیره تر شده و به رنگ کرم، زرد کمرنگ، صورتی کمرنگ و یا ارغوانی می شوند (آرمسترانگ و آرمسترانگ، ۱۹۸۱). بعد از اینکه پاتوژن از طریق سیستم ریشه ای وارد گیاه شد، هیف های آن در آوندها مستقر شده و در آوندهای چوبی زهرابه (توکسین) تولید می کنند که وارد قسمت های مختلف گیاه شده و باعث زردی و پژمردگی برگ ها و ساقه ها و در نهایت مرگ گیاه می شوند. به طور کلی پژمردگی فوزاریومی بیماری مناطق گرم می باشد و بیشتر در خاک های اسیدی و ماسه ای شایع می باشد. دمای بهینه مورد نیاز هوا و خاک برای توسعه این بیماری ۲۸ درجه سانتی گراد می باشد. دمای خاک هایی که خیلی گرم (۳۴ درجه سانتی گراد) و خنک (۲۰-۱۷ درجه سانتی گراد) هستند توسعه پژمردگی را به تاخیر می اندازد (اگریوس، ۱۹۹۷). کم بودن شدت نور و یا فتوپریود کوتاه باعث کاهش مقاومت گوجه فرنگی می شود. در حالی که صدمه به ریشه که باعث افزایش میزان قند در ساقه می شود باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به پاتوژن می گردد (بل و مسی، ۱۹۸۱). این قارچ دارای سه نژاد فیزیولوژیکی است (دیویس و همکاران، ۱۹۸۸). در سال ۱۹۴۰ مقاومت در

گراتلیج و اوبرین از ارقام افتراقی Strabelee (مقاوم به نژاد یک) Walter (مقاوم به نژادهای یک و دو)، Flora-Dode (مقاوم به نژادهای یک و دو) و Q₂ (مقاومت نامشخص) جهت تعیین نژاد جدید استفاده کردند. در سال ۱۹۹۱ الیاس و اشناپدر برای تعیین فرم اختصاصی و شناسایی نژاد این بیمارگر از ارقام افتراقی Fantastic (بدون ژن مقاوم)، Supersonic (مقاوم به نژاد یک) و Walter (مقاوم به نژاد یک و دو) استفاده نمود و سه نژاد این قارچ را شناسایی کرد (الیاس و اشناپدر، ۱۹۹۱). در سال ۱۹۹۶ مارلات و همکاران جهت تعیین نژاد *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* جدا شده از ایالات آرکانزاس از ارقام افتراقی Bonny Best (فاقد ژن مقاوم)، UC82-L (مقاوم به نژاد یک) MH (مقاوم به نژادهای یک و دو) و I₃R-1 (مقاوم به نژادهای یک، دو و سه) در یک طرح کاملاً تصادفی استفاده کرد (مارلات و همکاران، ۱۹۹۶).

این بیماری در ایران اولین بار به وسیله فصیحیانی در سال ۱۳۶۴ از استان هرمزگان گزارش شد (فصیحیانی، ۱۳۶۴). سپس اعتباریان در سال ۱۳۶۸ پژمردگی فوزاریومی را از منطقه ورامین گزارش و میزان آلودگی خزانه‌ها را در فروردین و اردیبهشت ماه ۱۹٪ درصد و میزان آلودگی مزارع را در مرداد ماه ۲۷/۴ درصد برآورد نمود (اعتباریان، ۱۳۶۸). فصیحیانی جهت تعیین نژاد جدایه‌های این قارچ در استان هرمزگان از ارقام افتراقی گوجه‌فرنگی شامل Bonny Best (بدون ژن مقاوم)، Manapal (مقاوم به نژاد یک) و Walter (مقاوم به نژاد یک و دو) استفاده نمود و جدایه‌های این استان را تحت عنوان نژاد یک معرفی نمود (فصیحیانی، ۱۳۷۱). هم‌چنین در سال‌های ۱۳۷۳ و ۱۳۷۴ ویانی پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی را در استان آذربایجان شرقی بررسی نمود. وی میزان خسارت این بیماری را طی این دو سال به ترتیب ۷٪ و ۷/۶٪ گزارش کرد (ویانی، ۱۳۷۴).

استفاده از ارقام مقاوم موثرترین و آسان‌ترین روش کنترل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی گزارش شده است (آگریوس، ۱۹۹۷). در این پژوهش به منظور دستیابی به ارقام مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی

برابر قارچ *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* عامل بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی در گونه *Lycopersicon pimpinellifolium* lih گزارش گردید که توسط یک ژن غالب I کنترل می‌شود (بون و استاکر، ۱۹۴۰). این ژن به ارقام تجاری گوجه‌فرنگی منتقل شد. اما در سال ۱۹۴۵ الکساندر و تاکر مشاهده کردند که جدایه‌هایی از قارچ مذکور قادر به ایجاد بیماری در ارقام تجاری حامل ژن I می‌باشند. این جدایه‌ها را به‌عنوان نژاد جدیدی از قارچ عامل بیماری بنام نژاد ۲ معرفی کردند (الکساندر و تاکر، ۱۹۴۵). این نژاد تا سال ۱۹۶۱ از اهمیت چندانی برخوردار نبود. اما در همین سال از ایالت فلوریدا (استال، ۱۹۶۱) و پس از آن در چند ایالت دیگر آمریکا و در دیگر کشورها گزارش شد. مقاومت به نژاد II باز هم در گونه *L. pimpinellifolium* مشاهده شد و سپس ژن مسئول مقاومت با ایجاد تلاقی بین این گونه و گونه زراعی *L. esculentum* به ارقامی از قبیل Walter منتقل گردید (استال و واکر، ۱۹۶۵). در این ارقام، مقاومت توسط دو ژن غالب مجزا به نام‌های I و I-2 کنترل می‌شود. در سال ۱۹۶۶ نژاد سوم این قارچ از برزیل گزارش شد (تاکشی و همکاران، ۱۹۶۶). اما این گزارش تایید نگردید (جونز و ولترز، ۱۹۸۱). سپس این نژاد از عراق (اسماعیل و عبدالله، ۱۹۷۶)، استرالیا (گراتلیج و ابراین، ۱۹۸۲)، فلوریدا و جورجیا (چملی و همکاران، ۱۹۹۱؛ مارلات و همکاران، ۱۹۹۶) و ایالت کالیفرنیا آمریکا (دیویس و همکاران، ۱۹۸۸) گزارش شد. هم‌چنین در سال ۱۹۹۶ این نژاد از مکزیک گزارش شد (والنزولا-اورتا، ۱۹۹۶). در تمام این موارد ارقام مقاوم به نژاد II نسبت به این نژاد حساس بودند. مقاومت در برابر نژاد سوم این قارچ در گونه *L. pennellii* (Corr.) DARCY مشاهده و به ارقام تجاری منتقل گردید (مک گرات و مالتبای، ۱۹۸۹؛ مک گرات، ۱۹۸۸) این مقاومت توسط ژن غالب I-3 کنترل می‌شود. نژادهای یک و دو با اپتیمم دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد فعالیت می‌کنند ولی نژاد III در دمای کمتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد نیز فعالیت می‌کند (چملی و همکاران، ۱۹۹۱).

جدایه های مختلفی از قارچ عامل بیماری از مناطق مختلف جمع آوری کرده تا ضمن شناسایی، نژاد فیزیولوژیکی آن ها را تعیین کرده تا در مراحل بعدی پروژه منابع مقاومت را شناسایی کرده و در آزمایشات اصلاحی به کار گرفته شوند.

مواد و روش ها

نمونه برداری، جداسازی و خالص سازی عامل بیماری

در سال ۱۳۸۲ به منظور جداسازی عامل بیماری، از مناطق مهم کشت این محصول از جمله ورامین، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، خوزستان، بوشهر و اصفهان بازدید به عمل آمد. از بوته های مشکوک گوجه فرنگی با علائم ظاهری بیماری پژمردگی فوزاریومی شامل زردی، پژمردگی برگ ها و ساقه و تغییر رنگ آوند چوبی نمونه برداری کرده و به آزمایشگاه منتقل شدند. قطعات آلوده روی محیط PDA با نصف غلظت کشت شدند. بعد از ۳-۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد پرگنه های قارچ فوزاریوم ظاهر گردید. خالص سازی جدایه های به دست آمده به روش تک اسپور کردن (single spore) انجام شد (نلسون و همکاران، ۱۹۸۳).

جدایه های دارای مشخصات گونه *F. oxysporum* را انتخاب و بررسی های بیشتر جهت شناسایی دقیق و بیماری زایی آن ها صورت گرفت. جهت نگهداری طولانی مدت جدایه ها، حدود یک سوم حجم لوله آزمایشگاهی را از ماسه نرم شسته شده و پیت موس به نسبت مساوی پر کرده و سپس دو بار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شدند. حدود یک میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور فوزاریوم به این لوله ها افزوده و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از این مدت، در دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچال نگهداری گردیدند.

شناسایی جدایه های فوزاریوم

برای شناسایی جدایه های فوزاریوم تا سطح گونه از روش نلسون و همکاران (نلسون و همکاران، ۱۹۸۳) استفاده شد. برای این منظور از خصوصیات اندام های رویشی و زایشی از قبیل وجود و یا عدم وجود میکروکنیدی و نحوه تشکیل آن، وجود و یا فقدان کلامیدوسپور و نوع آن، شکل ماکروکنیدی و نوع فیالیدها استفاده گردید. در مراحل مختلف شناسایی جدایه برای تحریک اسپور زایی و تولید کنیدی تیپیک بجای محیط کشت PDA از محیط CLA (Carnation leaf Agar) استفاده شد. جهت تهیه این محیط کشت قطعاتی به ابعاد حدود ۵ میلی متر از برگ های جوان گیاه میخک تهیه و پس از خشک کردن در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. محیط کشت ۲٪ Water Agar را پس از استریل در داخل پتری دیش ریخته و قبل از منجمد شدن کامل محیط، تعداد ۵-۴ قطعه ضد عفونی شده برگ میخک با کمک پنس استریل روی آن قرار داده شد.

اثبات بیماری زایی و تعیین توان بیماری زایی جدایه ها

جهت تهیه مایه تلقیح، قطعه کوچکی از حاشیه کشت شش روزه قارچ را درون ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth) قرار داده و سپس روی دستگاه شیکر (Shaker) با ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز نگهداری شدند. بعد از این مدت، اسپورها را با کمک ۳-۴ لایه پارچه لملل استریل از میسلیوم جدا کرده و با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه اسپورها از محیط کشت جدا گردید. به رسوب حاصل از سانتریفوژ، آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد آگار اضافه کرده و با کمک لام هموسیتومتر (Hemocytometer) سوسپانسیون با غلظت 5×10^6 spores/ml تهیه گردید (بنی هاشمی و همکاران، ۱۳۶۱، فصیحیانی، ۱۳۶۴). برای اثبات بیماری زایی، از بذر رقم Bonny Best (فاقد ژن مقاومت به *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) استفاده شد. حدود سی روز بعد از کشت بذور (ظهور دو برگ واقعی) گیاهچه ها را از خاک بیرون آورده و به

روش های جداسازی و خالص سازی عامل بیماری در سال ۱۳۸۲ به منظور جداسازی عامل بیماری، از مناطق مهم کشت این محصول از جمله ورامین، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، خوزستان، بوشهر و اصفهان بازدید به عمل آمد. از بوته های مشکوک گوجه فرنگی با علائم ظاهری بیماری پژمردگی فوزاریومی شامل زردی، پژمردگی برگ ها و ساقه و تغییر رنگ آوند چوبی نمونه برداری کرده و به آزمایشگاه منتقل شدند. قطعات آلوده روی محیط PDA با نصف غلظت کشت شدند. بعد از ۳-۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد پرگنه های قارچ فوزاریوم ظاهر گردید. خالص سازی جدایه های به دست آمده به روش تک اسپور کردن (single spore) انجام شد (نلسون و همکاران، ۱۹۸۳).

مواد و روش ها

نمونه برداری، جداسازی و خالص سازی عامل بیماری

در سال ۱۳۸۲ به منظور جداسازی عامل بیماری، از مناطق مهم کشت این محصول از جمله ورامین، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، خوزستان، بوشهر و اصفهان بازدید به عمل آمد. از بوته های مشکوک گوجه فرنگی با علائم ظاهری بیماری پژمردگی فوزاریومی شامل زردی، پژمردگی برگ ها و ساقه و تغییر رنگ آوند چوبی نمونه برداری کرده و به آزمایشگاه منتقل شدند. قطعات آلوده روی محیط PDA با نصف غلظت کشت شدند. بعد از ۳-۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد پرگنه های قارچ فوزاریوم ظاهر گردید. خالص سازی جدایه های به دست آمده به روش تک اسپور کردن (single spore) انجام شد (نلسون و همکاران، ۱۹۸۳).

جدایه های دارای مشخصات گونه *F. oxysporum* را انتخاب و بررسی های بیشتر جهت شناسایی دقیق و بیماری زایی آن ها صورت گرفت. جهت نگهداری طولانی مدت جدایه ها، حدود یک سوم حجم لوله آزمایشگاهی را از ماسه نرم شسته شده و پیت موس به نسبت مساوی پر کرده و سپس دو بار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شدند. حدود یک میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور فوزاریوم به این لوله ها افزوده و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از این مدت، در دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچال نگهداری گردیدند.

شناسایی جدایه های فوزاریوم

برای شناسایی جدایه های فوزاریوم تا سطح گونه از روش نلسون و همکاران (نلسون و همکاران، ۱۹۸۳) استفاده شد. برای این منظور از خصوصیات اندام های رویشی و زایشی از قبیل وجود و یا عدم وجود میکروکنیدی و نحوه تشکیل آن، وجود و یا فقدان کلامیدوسپور و نوع آن، شکل ماکروکنیدی و نوع فیالیدها استفاده گردید. در مراحل مختلف شناسایی جدایه برای تحریک اسپور زایی و تولید کنیدی تیپیک بجای محیط کشت PDA از محیط CLA (Carnation leaf Agar) استفاده شد. جهت تهیه این محیط کشت قطعاتی به ابعاد حدود ۵ میلی متر از برگ های جوان گیاه میخک تهیه و پس از خشک کردن در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. محیط کشت ۲٪ Water Agar را پس از استریل در داخل پتری دیش ریخته و قبل از منجمد شدن کامل محیط، تعداد ۵-۴ قطعه ضد عفونی شده برگ میخک با کمک پنس استریل روی آن قرار داده شد.

در روی محیط کشت PDA نگهداری شدند. هر جدایه در سه تکرار بررسی گردید.

تعیین نژاد جدایه‌های

F. oxysporum f.sp. *lycopersici*

بذور ارقام افتراقی شامل Bonny Best (فاقد

ژن مقاومت)، Manapal (مقاوم به نژاد یک)، Walter

(مقاوم به نژادهای یک و دو) از مرکز تحقیقات بین

المللی AVRDC دریافت شد. جهت تکثیر این بذور

آنها را در جعبه های گلدانی در گلخانه کشت کرده و

نشاهای حاصل به مزرعه منتقل گردید. پس از

میوه‌دهی از هر یک از ارقام بذری برداری شد. جهت تعیین

نژاد جدایه‌ها، هر یک از ارقام افتراقی گوجه فرنگی در

جعبه‌های نشاء کشت شده و پس از ظهور دو برگ واقعی

با ۵ تکرار با سه گیاهچه (نشاء) در هر تکرار در گلخانه

کشت شدند. مایه تلقیح همانند مرحله اثبات بیماریزایی

تهیه گردیده و گیاهچه های سی روزه را تلقیح و در

همان محیط قبلی کشت شدند. گیاهچه های شاهد

بدون آلودگی نیز با آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد

آگار تلقیح گردیدند.

همچنین نژادهای ۱، ۲ و ۳ این پاتوژن را از

دانشگاه آمستردام هلند تهیه و به عنوان استاندارد جهت

مقایسه با جدایه های ایرانی در این آزمایش استفاده

گردید.

نتایج و بحث

خالص سازی و شناسایی جدایه های فوزاریوم

بوته های آلوده عموماً دارای علائم زردی،

پژمردگی و خمیدگی دمبرگ‌ها (epinasty) بوده و در

موارد شدید بوته‌های آلوده کاملاً خشک شده بودند. این

علائم معمولاً هنگام شروع رسیدگی میوه‌ها ظاهر

می‌شدند. برای انتخاب بوته‌های آلوده

به *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* تنها

بوته‌های پژمرده فاقد علائم پوسیدگی

ریشه انتخاب شدند (به دلیل این‌که

F. oxysporum f.sp. *radicis-lycopersici* علاوه بر

پژمردگی باعث پوسیدگی ریشه نیز می‌شوند). با برش

آرامی با آب معمولی شسته و ریشه آنها را به مدت پنج

دقیقه به‌طور جداگانه در سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها

با غلظت فوق‌الذکر فرو برده شدند

(Root dip inoculation). سپس در قالب یک طرح

کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و سه گیاهچه در هر تکرار در

گلدان‌های حاوی پیت‌موس و ماسه استریل به نسبت

۱:۱ نشاء شدند. گیاهچه‌های شاهد با آب مقطر استریل

حاوی ۰/۰۵ درصد آگار تلقیح شدند.

علائم و شدت بیماری سه هفته بعد از تلقیح بر

اساس سیستم نمره‌دهی همینگ و همکاران

(۲۰۰۴) مورد ارزیابی قرار گرفت:

صفر: بدون واکنش

۱: نوک ریشه‌های اولیه آوندها به‌صورت موضعی قهوه‌ای

شده‌اند

۲: تغییر رنگ آوندها تا کوتیلدون ادامه یافته است

۳: تغییر رنگ آوندی تا بالای گره کوتیلدون ادامه یافته

اما بدون علائم خارجی است

۴: علائم خارجی مشاهده شده و کوتولگی شدید است

۵: پژمردگی و مرگ گیاه

گیاهان با میانگین درجه آلودگی ۲-صفر به

عنوان مقاوم و گیاهان با میانگین درجه آلودگی ۳-۵ به

عنوان حساس ارزیابی شدند (همینگ و همکاران،

۲۰۰۴).

داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SAS

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با

آزمون LSD انجام شد.

تعیین فرم اختصاصی جدایه‌های گونه

Fusarium oxysporum

برای تعیین فرم اختصاصی (form special)

جدایه‌های گونه *F. oxysporum* از ویژگی‌های ایجاد یا

عدم ایجاد پوسیدگی در ریشه و طوقه، میزان گسترش

تغییر رنگ آوندی به طرف قسمت‌های بالاتر ساقه و

میزان رشد کلنی قارچ در دماهای ۱۸ و ۲۷ درجه

سانتی‌گراد استفاده شد (دیویس و همکاران، ۱۹۸۸؛

جونز و همکاران، ۱۹۹۱). برای تعیین میزان رشد کلنی

در دماهای فوق، جدایه‌های کشت شده به مدت ۴ روز

نتایج حاصل از تست بیماری‌زایی نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به ایجاد زردی و پژمردگی برگ‌ها و در نهایت پژمردگی و مرگ گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی بودند. قارچ عامل بیماری مجدداً از قسمت‌های هوایی گیاهچه‌هایی که علائم بیماری را نشان داده بودند، جداسازی و شناسایی گردید.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از میانگین درجه آلودگی جدایه‌های مختلف روی رقم Bonny Best نشان داد که بین جدایه‌ها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

جدایه MD₄ با میانگین آلودگی ۴/۸۴ بیش‌ترین توان بیماری‌زایی را داشته و در واقع مهاجم‌تر از سایر جدایه‌ها بوده و جدایه DSF₂₈ با میانگین آلودگی ۳/۰۶۲ کمترین شدت بیماری را روی این رقم حساس داشت. اما این رقم نسبت به همه جدایه‌های مورد آزمایش حساس بود. جدول‌های ۲ و ۳ تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های حاصل را نشان می‌دهد.

تعیین نژاد جدایه‌های *F. oxysporum f.sp. lycopersici*

نژاد فیزیولوژیکی جدایه‌های هر یک از مناطق با بررسی عکس‌العمل ارقام افتراقی گوجه‌فرنگی نسبت به هر یک از این جدایه‌ها تعیین گردید. تمامی جدایه‌ها قادر به ایجاد تغییر رنگ در آوندهای چوبی رقم Bonny Best (فاقد ژن مقاومت) بودند که شدت این تغییر رنگ در جدایه‌های مختلف متفاوت بود و در بیشتر موارد منجر به پژمردگی و در نهایت مرگ گیاهچه‌ها گردید (شکل ۲). میانگین درجه آلودگی ایجاد شده توسط هر یک از جدایه‌ها را روی رقم Bonny Best در جدول ۲ آمده است. برخی از جدایه‌ها قادر به ایجاد علائم بیماری روی گیاهچه‌های این رقم حساس هم نشدند که احتمالاً در اثر انتقال روی محیط کشت مصنوعی در آن‌ها موتاسیون صورت گرفته و بیماری‌زایی خود را از دست داده‌اند. از دست دادن بیماری‌زایی یکی از مشکلات کار با این قارچ می‌باشد.

ساقه گیاهان آلوده، آوند چوبی تا قسمت‌های بالایی ساقه قهوه‌ای شده بودند.

از تعداد زیادی جدایه قارچ جدا شده در مناطق مورد بررسی در مجموع ۳۷ جدایه به‌عنوان نماینده انتخاب شد که به ترتیب تعداد ۶، ۲، ۶، ۸، ۹ و ۶ جدایه مربوط به مناطق آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، ورامین، اصفهان، خوزستان و بوشهر بود (جدول ۱).

تقریباً رنگ کلنی تمامی جدایه‌های جدا شده روی محیط PDA سفید کرمی مایل به ارغوانی با سطح زیرین کرمی تا ارغوانی بود. هر چند که در برخی جدایه‌ها تنوع در رنگ کلنی آن‌ها مشاهده گردید. این جدایه‌ها روی محیط کشت PDA سریع‌الرشد بوده و بعد از ۳-۴ روز تقریباً تمامی سطح پتری‌دیش را پوشاندند. میکروکنیدی‌ها یک تا دو سلولی بوده و روی سرهای دروغین (false head) به تعداد فراوان تشکیل گردید. مونوفیالیدها به‌صورت کوتاه و ساده بودند (خصوصیت بارز). ماکروکنیدی‌ها به‌صورت داسی شکل و اغلب ۳-۵ سلولی تشکیل شده بود (شکل ۱). کلامیدوسپورها به صورت تکی و یا دوتایی مشاهده گردید. بنابراین همه جدایه‌ها به گونه *F. oxysporum* نسبت داده شدند (نلسون و همکاران، ۱۹۸۳).

اثبات بیماری‌زایی، تعیین فرم اختصاصی جدایه‌ها تمامی جدایه‌ها تنها علائم پژمردگی روی گیاهچه‌های ۳۰ روزه رقم Bonny Best گوجه‌فرنگی به‌وجود آورده و توانایی ایجاد پوسیدگی روی ریشه و یا طوقه را نداشتند. هم‌چنین تغییر رنگ آوندی در قسمت‌های بالاتر ساقه و حتی دمبرگ مشاهده گردید. این جدایه‌ها در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد سرعت بیشتری نسبت به دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد داشتند. لذا فرم اختصاصی (f.sp.) این جدایه‌ها *lycopersici* تعیین گردید. لازم به‌ذکر است که تعداد ۱۴ جدایه *F. oxysporum* دیگر نیز شناسایی شده بود که توان بیماری‌زایی خود را از دست داده بودند.

جدول ۱: جدایه‌های *F. oxysporum* جمع آوری شده از مناطق مختلف

تاریخ نمونه‌برداری	محل نمونه‌برداری	کد جدایه	تاریخ نمونه‌برداری	محل نمونه‌برداری	کد جدایه	ردیف
بهمن ۱۳۸۲	بوشهر- آبدان	BA ₂₃	۲۰ مرداد ۱۳۸۲	اربطان- مرند	MA ₁	۱
اردیبهشت ۱۳۸۳	دزفول- کرخه	DKF ₂₄	۲۱ مرداد ۱۳۸۲	اسفهان- تبریز	ST ₂	۲
اردیبهشت ۱۳۸۳	دزفول- کرخه	DKF ₂₅	۲۲ مرداد ۱۳۸۲	تبریز	ASH ₃	۳
اردیبهشت ۱۳۸۳	دزفول- حومه	DKF ₂₆	۲۳ مرداد ۱۳۸۲	دیزج- مرند	MD ₄	۴
اردیبهشت ۱۳۸۳	دزفول- حومه	DKF ₂₇	۲۴ مرداد ۱۳۸۲	دیزج- مرند	MD ₅	۵
اردیبهشت ۱۳۸۳	دزفول- جاده سیاه‌منصور	DSF ₂₈	۲۵ مرداد ۱۳۸۲	دیزج- مرند	MD ₈	۶
اردیبهشت ۱۳۸۳	دزفول- جاده سیاه‌منصور	DSF ₂₉	۲۶ مرداد ۱۳۸۲	ساری‌بیگللو- ارومیه	SB ₉	۷
اردیبهشت ۱۳۸۳	دزفول	DKF ₃₇	۲۷ مرداد ۱۳۸۲	ارومیه	OF ₁₀	۸
اردیبهشت ۱۳۸۳	دزفول	DKF ₃₈	۲۸ تیر ۱۳۸۲	ورامین	AF ₁₁	۹
اردیبهشت ۱۳۸۳	دزفول	DKF ₃₉	۲۹ تیر ۱۳۸۲	ورامین	AF ₁₂	۱۰
تیر ۱۳۸۳	اصفهان- برآن شمالی	EBNF ₃₀	۳۰ تیر ۱۳۸۲	ورامین	AF ₁₃	۱۱
تیر ۱۳۸۳	اصفهان- جوزان	EJF ₃₁	۳۱ تیر ۱۳۸۲	ورامین	AF ₁₄	۱۲
تیر ۱۳۸۳	اصفهان- حیدرآباد	EHF ₃₂	۳۲ تیر ۱۳۸۲	ورامین- پیشوا	PF ₁₅	۱۳
تیر ۱۳۸۳	اصفهان- حیدرآباد	EHF ₁₃	۳۳ تیر ۱۳۸۲	ورامین- حصار	HF ₁₆	۱۴
تیر ۱۳۸۳	اصفهان- حیدرآباد	EHF ₃₄	۳۴ بهمین ۱۳۸۲	بوشهر- دشتستان	BD ₁₇	۱۵
تیر ۱۳۸۳	اصفهان- برآن شمالی	EBF ₃₅	۳۵ بهمین ۱۳۸۲	بوشهر- دانشکده	BD ₁₈	۱۶
تیر ۱۳۸۳	اصفهان- برآن شمالی	EBF ₃₆	۳۶ بهمین ۱۳۸۲	بوشهر- دشتستان	BD ₁₉	۱۷
تیر ۱۳۸۳	اصفهان	EJF ₅	۳۷ بهمین ۱۳۸۲	بوشهر- دشتستان	BD ₂₀	۱۸
			بهمین ۱۳۸۲	بوشهر- دانشکده	BD ₂₁	۱۹



شکل ۱: مشخصات مورفولوژی و میکروکنیدی روی آن (راست) و ماکروکنیدی (چپ) *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

جدول ۲: تجزیه واریانس شدت بیماری زایی جدایه‌های *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* روی رقم حساس Bonny Best

Pr>F	F Value	میانگین مربعات MS	مجموع مربعات SS	درجه آزادی DF	منابع تغییرات
۰/۰۰۰۱	۶/۵۶	۱/۴۰**	۵۱/۹۹	۳۷	جدایه
-	-	۰/۲۱	۳۲/۵۴	۱۵۲	جدایه (تکرار)
		۱۲/۱۷۲			C.V.

** معنی‌دار بودن اثر جدایه‌های آزمایشی روی رقم Bonny Best در سطح یک درصد

جدول ۲: مقایسه میانگین درجه آلودگی جدایه های آزمایشی روی رقم حساس Bonny Best

کلاس	میانگین درجه آلودگی	کد جدایه	کلاس	میانگین درجه آلودگی	کد جدایه
hijklm	۳/۵۹۸	DSF ₂₉	a	۴/۸۴	MD ₄
hijklmn	۳/۵۹۶	EHF ₃₄	ab	۴/۷۰	ST ₂
hijklmn	۳/۵۳۰	DKF ₂₇	ab	۴/۶۶	MA ₁
hijklmn	۳/۵۳۰	BD ₂₁	abc	۴/۵۹۶	BA ₂₃
ijklmn	۳/۴۶۴	BD ₁₈	abc	۴/۵۲۸	AF ₁₃
jklmn	۳/۳۹۶	EJF ₃₁	abcd	۴/۵۰	MD ₈
jklmn	۳/۳۹۶	EBF ₃₆	abcd	۴/۴۶۴	BD ₁₇
jklmn	۳/۳۹۴	DKF ₂₄	abcd	۴/۴۶۴	AF ₁₄
klmn	۳/۳۳۰	EHF ₃₂	abcde	۴/۳۶	MD ₅
klmn	۳/۳۳۰	EBNF ₃₀	abcdef	۴/۳۳	HF ₁₆
klmn	۳/۳۳۰	DKF ₃₈	bcdefg	۴/۱۸۰	ASH ₃
lmn	۳/۲۶۴	BD ₂₀	cdefgh	۴/۰۶۴	EHF ₁₃
lmn	۳/۲۶۴	DKF ₃₇	cdefgh	۴/۰۶۴	DKF ₂₅
lmn	۳/۲۶۲	DKF ₃₉	cdefghi	۴/۰۲۰	OF ₁₀
lmn	۳/۲۵۲	SB ₉	defghi	۳/۹۳	AF ₁₂
mn	۳/۱۹۶	EJG ₅	efghij	۳/۸۵	EBF ₃₅
n	۳/۰۶۲	BD ₁₉	fghijkl	۳/۷۸۰	AF ₁₁
n	۳/۰۶۲	DSF ₂₈	ghijklm	۳/۷۳۰	PF ₁₅
			ghijklm	۳/۷۳۰	DKF ₂₆

میانگین هایی که دارای حروف مشترک هستند اختلاف معنی دار با همدیگر ندارند.



شکل ۲- علائم پژمردگی گیاهچه های رقم Bonny Best در اثر مایه زنی توسط قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

هیچ یک از جدایه ها قادر به ایجاد بیماری روی ارقام Manapal (مقاوم به نژاد یک) و Walter (مقاوم به نژادهای یک و دو) نبودند و تغییر رنگ آوندهای چوبی در برخی از گیاهچه ها به ریشه اصلی محدود بوده و به قسمت های بالایی کوتیلدون توسعه نیافته بود (شکل های ۳ و ۴).

همچنین مقایسه واکنش این جدایه ها با نژاد ۱، ۲ و ۳ استاندارد تهیه شده از دانشگاه آمستردام هلند روی ارقام افتراقی نشان داد که این جدایه ها به نژاد یک این پاتوزن تعلق دارند. این نتایج با مشاهدات فصیحیانی در منطقه هرمزگان و ویانی در منطقه آذربایجان شرقی مطابقت دارد (فصیحیانی، ۱۳۷۱؛ ویانی، ۱۳۷۴). هم- چنین امینی با بررسی ۱۱ جدایه از این بیمارگر نژاد یک از استان کردستان گزارش کرده است (امینی، ۲۰۰۸).

از دلایل عمده توسعه و انتشار این بیماری آلوده بودن خزانه‌های تهیه نشاء گوجه فرنگی در مناطق مختلف و همچنین کشت ارقام حساس و عدم رعایت تناوب بلندمدت زراعی می‌باشند. چرا که این قارچ خاکزاد بوده و مدت زیادی قادر به حفظ بقاء در خاک می‌باشد (جونز و همکاران، ۱۹۹۱؛ اگریوس، ۱۹۹۷). قابل ذکر است که تناوب‌های کوتاه مدت تاثیری در کنترل این بیماری نخواهد داشت (جونز و ولتزف، ۱۹۸۱؛ نیرگارد، ۱۹۸۸).

به‌علاوه استفاده از روش‌های شیمیایی جهت کنترل این بیماری علاوه بر مشکلات زیست‌محیطی در کنترل این بیماری نقش چندانی ندارند (یاماگوچی و همکاران، ۱۹۹۲). لذا هر مزرعه‌ای که به عامل بیماری آلوده شود تقریباً برای همیشه آلوده باقی خواهد بود (اگریوس، ۱۹۹۷).

از طرفی در برخی از استان‌های کشت این محصول نظیر بوشهر، رقم امپریال از ارقام رایج منطقه بوده که نسبت به *F. oxysporum f.sp. lycopersici* حساس می‌باشد. در استان‌های دیگر از قبیل آذربایجان غربی، تهران (ورامین) و خوزستان از بذر ارقام محلی در سطح نسبتاً وسیعی استفاده می‌شود. این بذور سال‌های قبل وارد کشور شده و تقریباً همه آن‌ها نسبت به پژمردگی فوزاریومی حساس هستند (عابدی، مکاتبه شخصی). لذا کشت مداوم این ارقام باعث افزایش جمعیت بیمارگر در خاک مناطق مذکور شده است. به‌علاوه، کشاورزان این مناطق بذر مورد نیاز خود را از میوه‌های سال قبل تهیه می‌کنند. به‌دلیل این که این پاتوژن از طریق بذر نیز انتقال می‌یابد. لذا این بذور نیز می‌توانند در انتقال و انتشار بیماری نقش داشته باشند.

از ارقام رایج و مقاوم به این بیماری در کشور می‌توان به رقم‌های کال جی (Cal- J)، ارلی اوربانا (Early urbana)، سوپر استرین بی (Super strain B) و کستل راک (Castle rock) اشاره نمود.

هم‌اکنون یک طرح تحقیقاتی در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج با هدف دستیابی به رقم ایرانی مقاوم به بیماری‌های پژمردگی فوزاریومی، لکه‌موجی، و شانکر آلترناریایی در حال انجام می‌باشد.



شکل ۳: گیاهچه‌های مایه زنی شده رقم Manapal توسط قارچ *F. oxysporum f.sp. lycopersici*



شکل ۴: گیاهچه‌های مایه‌زنی شده رقم Walter توسط قارچ *F. oxysporum f.sp. lycopersici*

از نظر شدت بیماری‌زایی، بین جدایه‌های هر منطقه تفاوت زیادی وجود نداشت. اما به‌طور کلی جدایه‌های آذربایجان شرقی بیش‌ترین شدت بیماری‌زایی و استان اصفهان کم‌ترین بیماری‌زایی را در بین استان‌های مورد بررسی داشتند، که احتمالاً به دلیل کشت ارقام متحملی نظیر شف (Chef) در منطقه اصفهان می‌باشد.

تعدادی از جدایه‌ها بیماری‌زایی خود را از دست داده بودند. این امکان وجود دارد که هنگام تجدید کشت کردن و یا نگهداری قارچ در در روی ماسه و پیت‌موس در آن‌ها جهش رخ داده باشد (بوث، ۱۹۷۱؛ لزلی و سامرلا، ۲۰۰۶).

با توجه به این که گوجه فرنگی بومی ایران نمی‌باشد و در حال حاضر نیز بذر آن از خارج کشور تهیه می‌شود، احتمال دارد که این پاتوژن از یک منبع خارجی وارد کشور شده و از طریق بذر و نشاهای آلوده به سایر مناطق گسترش یافته باشد.

تعیین نژاد فیزیولوژیکی جدایه های عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی ...

پژمردگی های آوندی، پوسیدگی های خشک ریشه هم به طور گسترده های مشاهده گردید که احتمالاً سایر گونه های فوزاریوم در ایجاد این علائم نقش مهمی دارند. شناسایی علل عمده این پوسیدگی ها جهت به کار گیری راهکارهای مناسب برای کنترل آنها ضروری به نظر می رسد.

که این پژوهش نتایج یکی از پروژه های طرح مذکور می باشد. در مراحل بعدی این طرح، واکنش ارقام و دورگ های مختلف گوجه فرنگی نسبت به قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* بررسی شده که نتایج آن متعاقباً منتشر خواهد شد. طی بررسی های به عمل آمده از مزارع گوجه فرنگی در مناطق مورد بررسی مشخص شد که علاوه بر

Archive of SID

منابع

- اعتباریان، ح. ۱۳۶۸. بررسی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در منطقه ورامین. نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه مشهد.
- بنی هاشمی، ض. ۱۳۶۱. پیدایش یک نژاد فیزیولوژیک جدید *F. o. f.sp. melonis* در ایران، مجله بیماری‌های گیاهی ۱۸: ۶-۱.
- بی نام. ۱۳۸۴. آمارنامه کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه ریزی اقتصادی. دفتر فن آوری آمار و اطلاعات. خوشخوی، م. ۱۳۷۱. اصول باغبانی: مبانی دانش بوستانداری. چاپ اول، انتشارات دانشگاه شیراز، ۵۶۶ صفحه.
- فصیحیان، ع. ۱۳۶۴. پیدایش بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در استان هرمزگان. مجله بیماری‌های گیاهی ۱: ۲۹-۳۲.
- فصیحیان، ع. ۱۳۷۱. نژاد فیزیولوژیک فوزاریوم عامل پژمردگی گوجه‌فرنگی در استان هرمزگان مجله بیماری‌های گیاهی ۲۸: ۲۶-۱۹.
- ویانی، ع. ۱۳۷۴. بیماری فوزاریومی گوجه‌فرنگی در آذربایجان شرقی و اهمیت بذر در انتقال این بیماری. پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد بیماری گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس ۹۷ صفحه.
- Agrios, G. N. 1997. Plant pathology, 4th edition, Academic Press, USA. Pp: 635.
- Alexander, L. J., and Tucker, C. M. 1945. Physiological specialization in the tomato wilts fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. 303-313. In: Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Cook, R. J. (eds). 1981. *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*.
- Amini, J. 2008. Physiological race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in Kordistan province of Iran and reaction of some tomato cultivars to race 1 of pathogen. 1-6.
- Armstrong, G. M., and Armstrong, J. K. 1981. Form specials and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt disease. In *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy* (Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Cook, R. J. eds.) The Pennsylvania State University Press, University Park. Pp.391-399.
- Bell, A. A. and Mace, M. E. 1981. Biochemistry and physiology of resistance. In: Fungal Wilt Disease of Plant (Mace, M. E., Bell, A. A. and Beckman, C. H. eds). Academic Press, New York. Pp. 431-477.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. CMI, Kew, Surrey, England, 237P.
- Bohn, G. W., and Stuker, C. M. 1940, Studies on *Fusarium* wilt of the tomato, immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* and its inheritance in hybrids, pp:82, In: Nelson P. E. and Toussoun T. A. (eds), *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*, Pennsylvania St. Univ. Press. Park and London.
- Chellemi, D. O., Dankers, H. A., and Crosier, B. 1991. First report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race & on tomato in Northwest Florida and Georgia. *Plant Disease*. 76:861(Abst).
- Dimond, A. E., and Wagonner, P. E. 1953. The cause of epinastic symptoms in fusarium wilt of tomatoes. *Phytopathology* 43: 663-669.
- Davis, R. M., Limble, K. A., and Farrar, J. J. 1988. A Third race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* identified in California. *Plant Disease* 72:453(Abst).
- Elias, K. S., and Schneides, R. W. 1991. Vegetative Compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 81:159-162.
- Foster. R. E. 1946. The first symptoms of tomato fusarium wilt: clearing of the ultimate veinlets in the leaf. *Phytopathology* 36:691-694.
- Grattidge, R., and O'Brien, R. G. 1982. Occurrence of third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queens land, *Plant Disease* 66:165-166.
- Heming, M. N., Basuki, S., and Mc Grath, D. J. (2004). Fine mapping of the tomato I-3 gene resistance for *Fusarium* wilt resistance and elimination of a co-segregation resistance gene analogue as a candidate for I-3 Theo. *Appl. Genet*. 109: 409-418.

- Ismail, A. L. S., and Abdullah, S. K. 1976. Occurrence of physiological races in *Fusarium* causing wilt in tomato cultivars in Basrah. Iraq. *Indian Phytopathology* 29:378-380.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., and Zitter, T. A. 1991. *Compendium of tomato disease*, APS Press, pp: 73.
- Jones, J. P., and Woltz, S. S. 1981. *Fusarium* – incited disease of tomato and potato and their control, 157-168. In: Nelson, P. E. and Tousson, T.A. (eds.), *Fusarium: disease, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania State Univ. Press, University Park and London.
- Leslie, J. F., and Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell. 388p.
- Marlatt, M. L., Correl, J. C., Kautmann, P. and Cooper, P. E. 1996. Two Genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 in the united States. *Plant Disease* 80:1336-1342.
- McGrath, D. J. 1988. *Fusarium wilt resistant tomatoes*, Queensland Agric. J. 114:290-295.
- McGrath, D. J., and Maltby, J. E. 1989. *Fusariums wilt race 3 resistance in tomato*, Acta Hort., 272:107-109.
- Neergard, P. 1988. *Seed pathology*. Vol. I, II. Macmillan Press. 1191 P.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*, Pennsylvania state Univ. Press, University Park and London, 193 p.
- Stall, R. E. 1961. Development of *Fusarium* wilt on resistant varieties of tomato caused by a strain different from race 1 isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Plant disease* 45:12-15.
- Stall, R. E., and Walker, J. M. 1965. Selection and inheritance of resistance in tomato to isolate of race 1 and 2 of the *Fusarium* wilt organism. *Phytopathology* 55: 1213-1215.
- Tokeshi, H., Galli, F., and kurozawa, C. 1966. A new race of tomato *Fusarium* in Soupaulo. *Anais Luiz aueiroz*. 217-227. In: Nelson, P. E. and Toussoun, T. A. (eds.), *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania St.univ.Pren univ.Paslc and Fondon .
- Valenzuela –Ureta, J. G., Lown, D. A., Heisey, R. F. and Zamudionaloa, V. 1996. First report of *Fusarium* wilt race 3 Caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* of tomato in Mexico. *Plant Disease* 80:105(Abst).
- Walker, J. C. 1981. *Fusarium wilt of tomato*, Monograph No: 6, APS Press, 86 p.
- Yamaguchi, K., Sano, T., Arita, M. and Takahashi, M. 1992. Biocontrol of *Fusarium* wilt of tomato by non- pathogenic *Fusarium oxysporum* MT0062. *Ann. Phytopathol. Scoc. Jpn.* 58: 188-194.

Determination of Physiological Races of Tomato Wilt Agent in Major Cultivation Areas in Iran

Ahmadvand¹, R. and Zarbakhsh², A.

Abstract

The most common areas of tomato fields such as Varamin, west Azarbarijan, east Azarbaijan, Khoozestan, Busheher and Isfahan were surveyed and infected fields were identified during 2003-2004. Infected plants with wilt symptoms were identified. The samples were cultured on PDA (half concentration). The fungi grew after 3-4 days and each isolate was purified by single spore method. Thirty eight isolates were selected as Representative. The isolates were identified as *Fusarium oxysporum* by using Nelson key. The seedlings of Bonny Best cultivar was used for pathogenesis test. Thirty days old, tomato seedlings were inoculated with 5×10^6 spores/ml of each isolate. After inoculation, seedlings were cultured in a Random Complete Design with five replications (three seedlings in each replicate). The result showed that all isolates caused discoloration of xylem extended to stems and even petioles. Root and crown were not rotted. Growth at 27°C was quicker than that of 18°C. There fore, their form special was determined as *lycopersici*. The severity of disease (Aggressiveness of each isolate) was evaluated based on 0-5 scale presented by Hemming et al., 2004. The result of data analysis showed that the pathogenicity of isolates was significant at 1% level. The mean comparative of infection severity showed that the isolate MD₄ and DSF₂₈ with 4.84 and 3.062 of mean infection were the most and least aggressive, respectively. The isolates inoculated on differential tomato cultivars, Bonny Best (lacking resistance gene), Manapal (resistant to race one) and Walter (resistant to races 1 & 2) in five replications and three seedlings in each replication in greenhouse condition. Bonny Best without any resistance gene wilted four weeks after inoculation. Manapal and Walter cultivars did not develop symptoms to any of tested isolates. Hence, they were determined as race one.

Keywords: Tomato, Fusarium wilt, *Fusarium oxysporum* f. sp., *lycopersici* and Physiological Races