نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹، ص ۱۴۴-۱۳۷

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 2, Summer 2010, p. 137-144

بررسی فوزاریوم‌های بذرزاد پیاز در استان‌های خراسان شمالی و رضوی

الهه ربیعی مطلق[1*]- ماهرخ فلاحتی رستگار[2] - حمید روحانی[3]- بهروز جعفر پور[4] - وحید جهانبخش[5]

تاریخ دریافت:۸۷/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش:۸۸/۱/۲۳

چکیده

گونه‌های فوزاریوم یکی از بیمارگرهای مهم پیاز در ایران بوده که بعضا بذرزاد می‌باشند. بدین منظور بذور تولیدی در چهار شهرستان از استان‌های خراسان رضوی و شمالی جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمایش اول بذور بدون ضدعفونی سطحی و ضد عفونی شده با هیپوکلریت سدیم ۱درصد در محیط PDA کشت گردیدند. در آزمایشی دیگر بذور ضدعفونی شده به مدت ۳ دقیقه در خاک اتوکلاو شده و تحت شرایط گلخانه کاشته شدند و در آزمایش سوم مبادرت به تشخیص ملکولی آلودگی بذور گردید. از بذور کشت در محیط PDA و گیاهچه‌ها در گلخانه، دو گونه‌ی *Fusarium Proliferatum*و *F.oxysporum* جدا و شناسایی شدند. فراوانی گونه‌ی *F. Proliferatum* در بین قارچ‌های حاصله از کشت بذور در محیط PDA و در بین قارچ‌های جدا شده از گیاهچه‌ها به ترتیب ۱۵-۰ و ۶/۷-۰ درصد بود. این فراوانی در مورد گونه‌ی *F. oxysporum* ۴۸-۰ و ۱۰-۰ درصد تعیین گردید. به منظور تشخیص ملکولی آلودگی بذور به گونه*F. proliferatum* ، پس از استخراج DNA از بذور و انجام پی. سی. آر با آغازگر اختصاصی، با استفاده از نرم افزار labwork 3/0/2 مبادرت به مقایسه وزن ملکولی باندهای مربوطه رویژل گردید و تفاوت واضحی بین وزن ملکولی باندهای مربوط به بذور مناطق مختلف مشاهده شد. مقایسه نتایج حاصل از کشت بذور در محیط PDA و بررسی‌های ملکولی نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین آن‌ها از نظر میزان آلودگی بذور به *F. proliferatum* وجود دارد. با توجه به نتایج این تحقیق دو گونه‌ی *F. proliferatum* و*F. oxysporum* را می‌توان به عنوان دو بیمارگر بذرزاد در پیاز معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی : پیاز، بذرزاد، فوزاریوم، خراسان، شناسایی ملکولی

مقدمه

در بین عوامل مختلف بیماری‌زا که سبب خسارت اقتصادی به پیاز می‌گردند، گونه‌های فوزاریم از اهمیت بسزایی برخوردارند. آلودگی‌های فوزاریومی معمولا از مزرعه شروع شده و تا مراحل انبارداری ادامه می‌یابد. با توجه به کنترل مشکل و پرهزینه‌ی بیمارگرهای خاکزی از جمله فوزاریوم‌ها و نیاز به تناوب‌های طولانی مدت، لازم است بذور آلوده شناسایی و از کشت آن‌ها خودداری گردد، زیرا یکی از راه‌های ورود و استقرار بیمارگرهای بذرزاد در منطقه، بذور آلوده می‌باشد (۹، ۱۱ و ۲۰).

کشت پیاز از طریق بذر است و در بسیاری از مناطق به‌علت قیمت بالای بذور استاندارد، بذرگیری توسط زارع در مزرعه انجام می‌شود. بذر پیاز با وجود پوشش در ظاهر یکدست دارای شکاف‌ها و ترک خوردگی‌های ریزی است که می‌توانند اسپور قارچ را در خود حفظ نماید. آلوده شدن بذر گیاهان مختلف به قارچ‌های نکروتروف ممکن است از طریق آوندهای گیاه والد صورت گیرد مانند آن‌چه در مورد برخی گونه‌های فوزاریوم در گیاه آفتاب‌گردان گزارش شده است (۳۱) و یا اینکه عامل بیماری از طریق بافت دیواره تخمدان به درون بذر نفوذ کند (۷). تاکنون مطالعه‌ای در مورد چگونگی آلوده شدن بذر پیاز به قارچ‌های نکروتروف صورت نگرفته‌است، ولیکن در گیاهانی با گل آذین چتری مانند پیاز گل‌های در حال رشد بطور کامل در معرض محیط اطراف قرار دارند. در این حالت درو کردن و هوا خشک نمودن گیاه می‌تواند بذر را در معرض بقایای آلوده و خاک قرار دهد. کنیدی‌های فوزاریوم‌های بیماریزا از جمله عواملی هستند که ابتدا آلودگی خارجی ایجاد نموده و در حین خرمن‌کوبی به داخل بذر راه می‌یابند (۱۸). انتقال بیماری ناشی از فرم‌های تخصص یافته‌ی *F. oxysporum* توسط گامبوجی بررسی شده است (۱۸). تا کنون گونه‌های *F. acuminatum*، *F. culmorum*، *F. equiseti*، *F. graminearum*، *F. oxysporum* و *F. oxysporum* را

۱- دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: Rabiei_elahe@yahoo.com)
۲، ۳، ۴و۵- استاد، دانشیار، استاد، مربی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

F. subglutinans، *F. semitectum*، *F. solani* از روی پیاز گزارش شده‌اند (۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۶، ۱۷، ۱۹و ۳۵). فراوانی و توان بیماریزایی هریک از این گونه‌ها در مناطق مختلف متفاوت می‌باشد، ولیکن در اغلب گزارشات دو گونه *F. oxysporum* و *F. oxysporum*به ترتیب از فراوانی و توان بیماریزایی بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها برخوردار بودند (۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۶، ۱۷، ۱۹و ۳۵). تمامی گونه‌های فوق به همراه سه گونه *F. acuminatum* ، *F. moniliform* و *F. tricinctum* به عنوان فوزاریوم‌های همراه بذر از کشورهای سودان، ترکیه و ایتالیا معرفی شده‌اند (۱۷، ۲۳و ۲۶).

F. proliferatum دارای فرم جنسی *Gibberella fujikuroi* Mating type D و دامنه میزبانی وسیع شامل ذرت، برنج، نخل و ... است (۸، ۱۰، ۱۵و ۲۵). این گونه شباهت زیادی به گونه‌های *F.fujikuroi* و *F. verticilioides* دارد (۲۵). با درنظر گرفتن نقش فرم‌های سازگار جنسی در تولید مثل جنسی این گونه و دامنه وسیع میزبانی‌آن، انتقال این قارچ توسط بذر می‌تواند یک عامل سریع و راحت در انتقال فرم‌های جنسی به مناطق مختلف و افزایش احتمال تولید مثل جنسی و تنوع ژنتیکی باشد. لذا، بررسی احتمال انتقال گونه‌های فوزاریوم با بذر و انتخاب روشی سریع و دقیق جهت تعیین آلودگی و شدت آن حایز اهمیت است. در سال‌های اخیر تحقیقاتی در زمینه‌ی استفاده از روش‌های ملکولی جهت تشخیص آلودگی بذور گیاهان مختلف مانند زیتون، جو، هویج، لوبیا و ... به یک بیمارگر انجام شده است و مشخص گردیده که این روش‌ها نسبت به روش‌های کلاسیک از دقت و حساسیت بالاتری در شناسایی بذور آلوده برخوردارند (۲۱، ۲۴، ۲۸و ۳۴). چیلور و همکاران (۱۳) به کمک روشReal-time PCR ، آلودگی بذور پیاز به *Botrytis spp.* عامل پوسیدگی گردن پیاز را مورد مطالعه قرار دادند و موفق به طراحی پرایمر اختصاصی برای تشخیص بذور آوده به این بیماری شدند (۱۴) ولیکن تاکنون مطالعات ملکولی بر روی فوزاریوم‌های بذرزاد پیاز صورت نگرفته است.

در این تحقیق، گونه‌های فوزاریومی بذرزاد پیاز در استان‌های خراسان شمالی و رضوی تعیین و امکان تشخیص آلودگی بذور به *F. proliferatum* با روش پی.سی.آر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در شهریور و مهر ماه ۱۳۸۶ نمونه برداری‌هایی از مزارع تولیدکننده بذر پیاز با سابقه بیماری‌های فوزاریومی در چهار منطقه مشهد و بردسکن در استان خراسان رضوی و مانه و اسفراین در استان خراسان شمالی صورت پذیرفت. این مزارع در اواخر اسفند- اوایل بهار سال قبل به روش کشت بذر کاشته شده بودند و رقم کاشته شده رقم خسروخانی و از نوع پیاز قرمز (در اسفراین و مانه) و رقم محلی بدون نام و از نوع پیاز قرمز (در مشهد و بردسکن) بود. از هر مزرعه ۷-۵ گل‌آذین بصورت تصادفی جمع‌آوری شد. آلودگی بذور با استفاده از کشت آن‌ها روی PDA ، کشت بذور در شرایط گلخانه و روش پی.سی.آر تعیین گردید.

کشت بذور روی PDA : نمونه‌های بذور به مدت نیم ساعت بوسیله آب جاری شسته و سپس تحت ۳ تیمار: بدون ضدعفونی سطحی و ضدعفونی به‌مدت یک دقیقه(سطحی) و ضد عفونی به مدت سه دقیقه(عمقی) در هیپوکلریت سدیم ۱ درصد قرارگرفتند. بذور پس از شستشوی با آب مقطر سترون و خشک شدن در زیر هود، در پتری دیش‌های حاوی محیط PDA به همراه یک گرم در لیتر PCNB (پنتاکلرونیترو بنزن۷۵ درصد ماده موثره)، جهت ممانعت از رشد قارچ *Rhizopus sp.*، کشت‌گردیدند. برای هر نمونه ۸ پتری دیش (به عنوان ۸ تکرار) درنظر گرفته شد و در هر پتری ۲۵ عدد بذر قرار گرفت. پتری به مدت دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۲۳). قارچ‌هایی که در اطراف بذور فاقد جوانه‌زنی، ریشه‌چه و گیاهچه رشد کرده‌بودند به محیط کشت برگ میخک – آگار (CLA) منتقل و پس از خالص‌سازی به روش تک‌اسپور با استفاده از کلید نلسون و همکاران و بوس در حد گونه شناسایی گردیدند (۱۲و۳۳). درصد جداسازی هر گونه در هر نمونه بذری به‌صورت زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد جداسازی هر گونه} = \frac{\text{تعداد بذر آلوده}}{\text{تعداد کل بذور}} \times ۱۰۰$$

جدایه‌های خالص شده در مطالعات بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمایش قوه‌ی نامیه بذور بر اساس درصد جوانه زنی بذور در پتری دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب و سترون تعیین گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Minitab استفاده شد.

کشت بذور در شرایط گلخانه : بذوری که در آزمایش گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند، شامل بذور ضدعفونی شده به‌مدت ۳ دقیقه بود. در هر گلدان حاوی ۱ کیلوگرم ترکیبی به نسبت ۱:۱از ماسه و خاک زراعی اتوکلاو شده به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۳ اتمسفر بود. که در آن ۱۰ بذر کشت و روی آن‌ها بوسیله یک لایه نازک ماسه پوشانده شد و هر نمونه‌ی بذری در ۳ تکرار در قالب طرح آماری کاملا تصادفی انجام گردید. قبل از کاشت، بذور بمدت ۴۸ ساعت در پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار گرفته بودند. گلدان‌ها به‌مدت ۴ ماه در شرایط گلخانه با دمای متوسط ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. در پایان آزمایش از درصد بذور سبزشده و گیاچه‌های

آلوده به عامل بیماری یاداشت‌برداری گردید. نمونه‌هایی که دارای علایم بیماری بودند در محیط PDA کشت و قارچ‌های بدست آمده پس از خالص سازی به روش تک اسپور و انتقال جدایه ها به محیط CLA مانند آنچه ذکر شد مورد شناسائی قرار گرفتند.

تشخیص آلودگی بذور به گونه‌ی *F. Proliferatum* به روش PCR اختصاصی: جهت استخراج DNA از هر نمونه، صد عدد بذر به صورت تصادفی انتخاب و در زیر جریان آب شسته شد. پس از خشک شدن، هر نمونه جداگانه توسط نیتروژن مایع در هاون استریل پودر گردید و ۰/۱ گرم از آن در استخراجDNA استفاده شد (۲۴). به‌منظور یکسان بودن شرایط استخراج برای تمامی نمونه‌ها، از کیت استخراج DNA (Accuprep®GMO- Bioneer) استفاده شد. همچنین استخراج DNA از یک نمونه‌ی بذر تجاری (رقم استرلینگ) که عدم آلودگی آن در محیط‌کشت آگاردار مشخص شده بود، به عنوان شاهد منفی و از جدایه‌ی تایید شده‌ی *F. Proliferatum* (ITEM 7596) که توسط دکترآنتونیو لوجیکو(انسیتو علوم تولید مواد غذایی – ایتالیا) ارسال گردیده بود به عنوان شاهد مثبت نیز به روش فوق صورت گرفت. جهت انجام PCR از یک جفت پرایمر اختصاصی گونه به نام PRO1/2 که از قبل توسط مول و همکاران در بخشی از ژن *cmd* (Calmodulin.) طراحی شده بود، استفاده شد (۲۹). فرآیند PCR با استفاده از کیت PCR ۲۰ میکرولیتر (Accupower –Bioneer TM) انجام شد. به مخلوط واکنش ۱ میکرولیتریDNA به غلظت ۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر و۱ میکرولیتر از هر جفت آغازگر به غلظت ۱۰ پیکومول و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد. واکنش PCR پس از بهینه‌سازی، بر اساس برنامه‌ی حرارتی زیر صورت گرفت: یک واسرشت‌سازی ابتدایی به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد سپس ۵۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۳۵ سیکل و در آخر ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱/۷ درصد و بر اساس شرایط استاندارد مارکر (Fermentase – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) صورت گرفت. شدت نوری باندهای ایجاد شده بر روی ژل آگارز توسط نرم افزار Labwork 3.0.2 کمیت سنجی گردید. وزن ملکولی هر باند براساس باند ۵۰۰bp مارکر تخمین‌زده شد. تمامی مراحل فوق سه بار تکرار گردید. میانگین وزن ملکولی باندها درهر سه تکرار محاسبه شد.

نتایج

قارچ‌های جدا شده از کشت بذور در محیط PDA شامل *F. oxysporum* و *F. Proliferatum* به همراه *Alternaria spp.*،*Penicillium spp.*، *Aspergillus spp.* و *Rhizopus spp.* و چندین جنس ناشناس بودند. به دلیل رشد سریع رایزوپوس در پتری‌های کشت شده بوسیله بذور ضدعفونی نشده (با وجود اضافه کردن PCNB به محیط کشت) امکان جداسازی و شناسائی گونه‌های دیگر میسر نشد و تنها نتایج کشت‌هایی مدنظر قرارگرفت که مربوط به بذور ضدعفونی شده به مدت ۱ دقیقه (سطحی) و۳ دقیقه(عمقی)بودند. با افزایش زمان ضدعفونی از ۱ دقیقه به ۳ دقیقه درصد جداسازی گونه‌ی *F. proliferatum* کاهش یافت، در حالی‌که در بذور منطقه‌ی اسفراین که آلودگی به گونه‌ی *F. proliferatum* بسیار بالا بود افزایش زمان ضدعفونی سبب افزایش جداسازی گونه *F. oxysporum* گردید (جدول۱).

درآزمایش کاشت بذور در شرایط گلخانه، دو گونه‌ی *F. oxysporum* و *F. Proliferatum* از ریشه و لپه‌ی گیاهان آلوده جداسازی شدند (جدول ۲).

جدول ۱- اثر ضدعفونی سطحی و عمقی روی فراوانی گونه‌های فوزاریومی جداشده از بذور پیاز مناطق مختلف استان خراسان در محیط PDA و تعیین قوه نامیه بذور

منابع بذر	مدت ضدعفونی *	درصد جداسازی		قوه ی نامیه بذر(در صد)
		F. oxysporum	*F. proliferatum*	
مشهد	۳ دقیقه	۰	۰	۸۹
	۱ دقیقه	۰	۷	۸۴
مانه	۳ دقیقه	۰	۵	۶۵
	۱ دقیقه	۳	۲۰/۵	۶۹
اسفراین	۳ دقیقه	۴۸	۱۵	۴۵
	۱ دقیقه	۷	۷۵	۲۴
بردسکن	۳ دقیقه	۰	۰	۳۷
	۱ دقیقه	۰	۰	۳۸

* ضدعفونی به مدت ۱ دقیقه به عنوان ضدعفونی سطحی و ۳ دقیقه ، ضدعفونی عمقی در نظر گرفته شد.

جدول ۲- جداسازی گونه‌های F. oxysporum و F. Proliferatum از گیاهچه‌های پیاز درشرایط گلخانه

در صد آلودگی به *F. proliferatum*	در صد آلودگی به *F. oxysporum*	درصد بذر سبز شده در خاک اتوکلاو شده	مدت ضدعفونی (دقیقه)	منبع بذر
c۰	c۰	a۱۰۰	۳	مشهد
a۶/۷	c۰	b۷۶/۷	۳	مانه
b۳/۳	b۳/۳	d۱۰	۳	اسفراین
a۶/۷	a ۱۰	c۳۶/۷	۳	بردسکن

* مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD و α = ۰/۰۵ صورت گرفته است.

هیچ یک از جنس‌های آسپرژیلوس و پنیسلیوم از گیاهچه‌های آلوده جداسازی نشد و فقط از ریشه بذور منطقه‌ی بردسکن قارچ آلترناریا جداسازی شد. با توجه به این داده‌ها می‌توان گونه‌های *F. oxysporum* و *F. proliferatum* را گونه‌های مهم بذرزاد عامل مرگ و میر گیاهچه‌های پیاز در نظر گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد میان مناطق مختلف از نظر درصد آلودگی بذور و درصد سبزشدگی در گلخانه تفاوت معنی‌داری وجود دارد. گونه‌های فوزاریوم یکی از عوامل مرگ گیاهچه های پیاز پیش از خروج از خاک هستند (۱۷)، به همین علت این احتمال وجود دارد که در مناطقی همچون اسفراین، آلودگی شدید بذور سبب مرگ گیاهچه پیش از خروج از خاک و کاهش سبزشدگی بذور در گلخانه باشد.

در بذور منطقه‌ی بردسکن با وجود این‌که در محیط کشت هیچ گونه‌ی فوزاریومی جداسازی نشد (جدول ۱) ولیکن در گلخانه هر دو گونه‌ی *F. oxysporum* و *F. Proliferatum* از گیاهچه‌های آلوده جداسازی شدند (جدول ۲). به علت عدم هماهنگی میان نتایج محیط PDA و گلخانه از روش شناسایی مولکولی جهت بررسی آلودگی بذور به گونه‌ی *F. Proliferatum* استفاده‌شد. در مورد گونه‌ی *F. oxysporum* f.sp. cepea تاکنون پرایمر اختصاصی طراحی نشده‌است. در واکنش PCR بذور تمامی مناطق مورد بررسی از جمله منطقه‌ی بردسکن، آلودگی به گونه‌ی *F. Proliferatum* را نشان دادند، میان شدت باندهای ایجاد شده تفاوت بارزی مشاهده شد (شکل ۱).

جهت تعیین شدت نوری باندها و متعاقبا تخمین وزن ملکولی آن‌ها، ابتدا سیکل‌های ۳۰- ۲۶ به منظور مشخص نمودن مرحله‌ی اشباع در واکنش پی.سی.آر. بررسی گردیدند. ولیکن در هیچ‌یک از این سیکل‌ها، بذور مناطقی که در محیط PDA آلودگی کمی داشتند ایجاد باند نکردند. در نتیجه از تعداد سیکل ۳۵ بر اساس روش مول و همکاران استفاده شد (۲۴). در این تعداد سیکل، تمامی مناطق مورد مطالعه در محدوده‌ی ۵۸۷^{bp} ایجاد باند نمودند (شکل ۱) و تفاوت بارزی میان وزن ملکولی محاسبه شده برای باندها به‌دست آمد (شکل۲). در این مطالعه همبستگی معنی‌داری میان وزن ملکولی محاسبه شده در بالا و درصد جداسازی گونه‌ی *F. proliferatum* در محیط PDA (در تیمار ضدعفونی ۱ دقیقه) برای هرنمونه در سطح ۵ درصد مشاهده شد (r = ۰/۹۷۶) (شکل ۳).

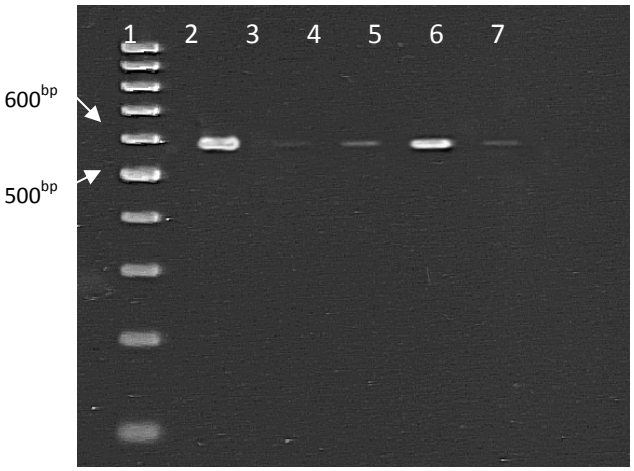
بحث

بررسی‌هایی که تا کنون روی قارچ‌های بذرزاد پیاز انجام شده نشان می‌دهند که *Aspergillus* spp. مهم‌ترین عامل بذرزاد پیاز می‌باشد (۱۷ و ۲۴). دراین بررسی علیرغم این‌که قارچ مزبور در کشت بذورروی PDA مشاهده شد ولی در هیچ موردی از گیاهچه‌های بیمار در شرایط گلخانه جداسازی نگردید. اکثر قارچ‌هایی که از بذرهای مورد بررسی جدا و شناسائی شدند متعلق به دو گونه *F. oxysporum* و *F. Proliferatum* بودند.

در بین مناطق مورد مطالعه میزان آلودگی به هر دو گونه‌ی فوزاریوم در منطقه‌ی اسفراین در محیط PDA بسیار بالا بود. در بذور این منطقه افزایش زمان ضدعفونی سبب کاهش جداسازی *F. proliferatum* و افزایش جداسازی *F. oxysporum* گردید که می‌توان آن را به نفوذ گونه‌ی *F. oxysporum* به قسمت‌های عمقی‌تر بذر نسبت داد. با افزایش زمان ضدعفونی و کاهش آلودگی‌های سطحی امکان جداسازی بیشتر این گونه فراهم شده است. این نتایج با نتایج بصیرنیا و بنی هاشمی (۲) مطابقت دارد. در مطالعات کوی کو و همکاران (۲۳) نیز گونه *F. oxysporum* از داخل رویان بذر پیاز جداسازی شده است. هرچه آلودگی بذرها عمقی تر باشد عوامل محیطی بر روی امکان انتقال بیماری از بذر به گیاهچه اثر کمتری دارند. در این میان رابطه‌ی میان آلودگی سطحی و داخلی حایز اهمیت است و می‌توان آن را به‌وسیله نوع ضدعفونی (سطحی یا عمقی) که روی بذر اعمال می‌شود از یکدیگر تفکیک کرد (۷و۲۳). مود و همکاران (۲۶) با کاشت بذر خردل آلوده به *Alternaria brassicicola* در خاک غیراستریل نشان دادند که انتقال بیماری بیشتر با آن دسته از بذرها مرتبط است که دارای آلودگی‌های داخلی هستند و نه با کل آلودگی‌های سطحی و داخلی بذر (۷). با توجه به این نتایج در مناطقی که شدت آلودگی بذر بسیار

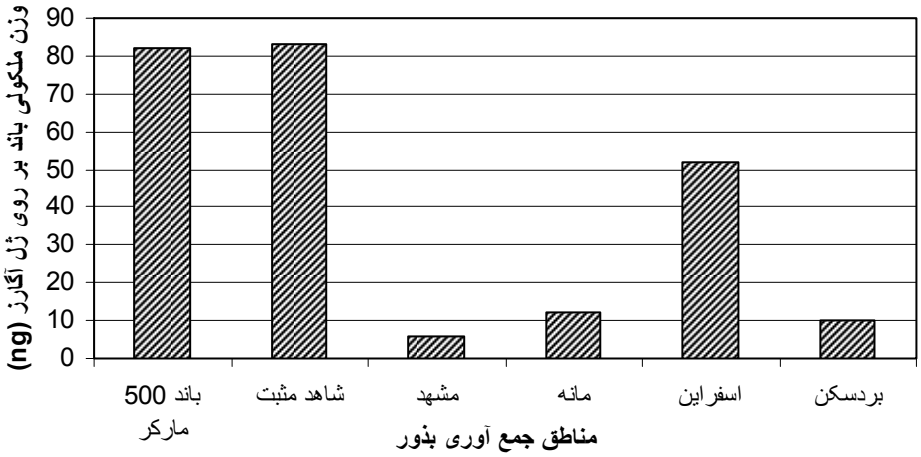
بالاست لازم است بذور را به‌وسیله قارچ‌کش‌های نفوذی ضدعفونی کرد.

در بین مناطق مورد مطالعه، در منطقه بردسکن با وجود مشخص شدن آلودگی گیاهچه‌ها به هر دو گونه‌ی فوزاریوم درآزمایش‌های گلخانه‌ای و مشخص‌شدن آلودگی به گونه *F. proliferatum* در روش مولکولی، هیچ گونه‌ی فوزاریومی در محیط PDA جداسازی نشد. بذرهای این منطقه در محیط کشت به شدت به قارچ‌های *Aspergillus spp.* و *Penicillium spp.* آلودگی داشتند. هیچ یک از قارچ‌های فوق از گیاهچه‌های آلوده در گلخانه جداسازی نشدند. احتمالا وجود قارچ‌های ساپروفیت با سرعت رشد بالا مانع از رشد قارچ فوزاریوم درمحیط کشت شده اند، ولی چون در گیاه زنده فقط قارچ‌های پارازیت توانایی رشد را دارند، بنابراین تنها گونه‌های فوزاریوم از گیاهچه‌ها جداسازی شدند (۲). بر اساس مطالعات کوی‌کو و همکاران (۳۹) روی قارچ‌های بذرزاد پیاز، قارچ آسپرژیلوس در محیط کشت مانعی جهت رشد قارچ فوزاریوم است ولی در گلخانه گونه‌های فوزاریوم می‌توانند گیاهچه‌های پیاز را آلوده کنند (۲۳).



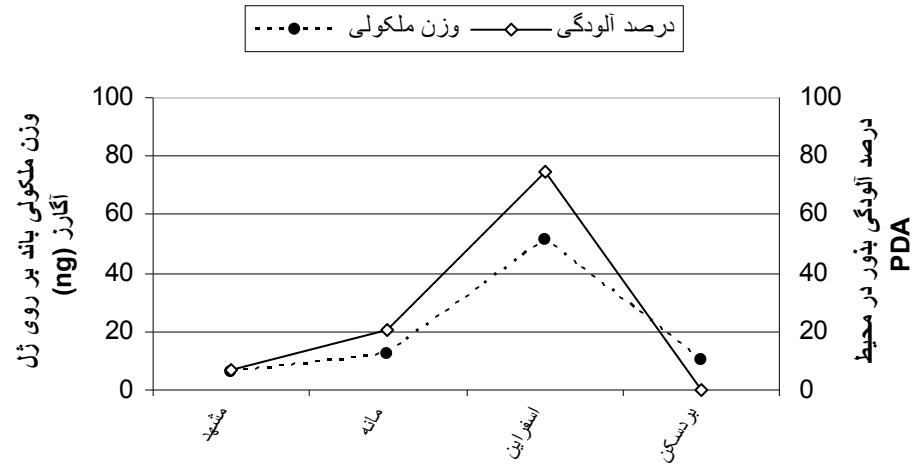
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR بخشی از ژن cmd در بذور پیاز آلوده به *F. priliferatum*

۱- مارکر، ۲- گونه‌ی تایید شده‌ی *F. proliferatum* (شاهد مثبت) ،۳- بذور منطقه‌ی مشهد،۴- بذور منطقه‌ی مانه، ۵- بذور منطقه‌ی اسفراین، ۶- بذور منطقه‌ی بردسکن، ۷- بذر رقم استرلینگ (شاهد منفی)



شکل ۲- وزن ملکولی باندهای ایجاد شده از محصول PCR بذور مناطق مختلف بر روی ژل آگارز

دو ستون اول از سمت چپ به ترتیب عبارتند از: ۱- باند ۵۰۰ bp مارکر (Fermentase –GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) با وزن ملکولی ۸۲bp که مبنای تخمین وزن ملکولی دیگر باندها می‌باشد و ۲- شاهد مثبت ، جدایه‌ی تایید شده‌ی*F. proliferatum*. دیگر ستون‌ها متعلق به بذور چهار منطقه از استان خراسان است.



شکل ۳- وزن ملکولی باندهای ایجاد شده از محصول PCR بذور مناطق مختلف بر روی ژل آگارز و ارتباط آنها با درصد آلودگی بذور به گونه‌ی *F. proliferatum* کشت شده درمحیط PDA

در بین روش‌های مطالعه شده برای شناسائی آلودگی‌های بذر پیاز روش محیط کشت آگاردار از روش گلخانه‌ای سریع‌تر است ولی به علت رقابت شدید میان قارچها در محیط کشت تشخیص دقیق و سریع پاتوژن مشکل می‌باشد. محیط‌های کشت اختصاصی نیز تاحدودی این مشکل را رفع می‌کنند. در روش کشت بذور در گلخانه به علت تفاوت در قوه‌ی نامیه بذور مختلف و در نتیجه عدم امکان استفاده از شاهد، عموما بخشی از مایه‌ی آلودگی محاسبه می‌شود که در مرگ گیاهچه پس از خروج از خاک دخالت دارد. PCR اختصاصی روشی سریع و حساس جهت تشخیص صحیح آلودگی‌های بذری است (۲۸،۲۴،۲۱ و ۳۴). لی و همکاران (۲۳) نیز مشاهده نمودند که تفاوت در میزان آلودگی بذور جو به قارچ *Rhynchosporium secalis* سبب تنوع در شدت نوری باندهای ایجاد شده بر روی ژل آگارز می‌گردد (۲۴). ما در این بررسی به منظور کمی نمودن این مشاهدات و انجام مقایسه میان باندها، اقدام به کمیت‌سنجی شدت نوری باندهای ایجاد شده روی ژل به کمک نرم‌افزار Labwork 3.0.2 نمودیم. کمیت سنجی شدت نوری باندهای ایجاد شده بر روی ژل، یک روش رایج است که در تحقیقاتی همچون بررسی میزان بیان یک ژن (۱۳و۲۳)، اثر یک فاکتور در میزان تولید یک پروتئین (۳۰) و یا در بررسی میزان آلودگی ویروسی در یک بافت (۳۶) کاربرد دارد. در این تحقیق همبستگی معنی‌داری میان وزن ملکولی باندهای ایجاد شده بر روی ژل آگارز و درصد آلودگی تعیین شده در محیط PDA به‌دست آمد. بررسی‌های وسیع‌تری در این زمینه می‌تواند امکان استفاده‌ی بیشتر از روش‌های ملکولی را در مراکزی مانند پست‌های قرنطینه فراهم کند.

منابع

۱- امیرمیجانی ا. و آزادوار م. ۱۳۸۵. وقوع پوسیدگی onion set در ایران. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره ی گیاهپزشکی ایران، ۱۱ تا ۱۴ شهریور، کرج.

۲- بصیرنیا ط. و بنی هاشمی ض. ۱۳۸۵. بررسی انتقال *Fusarium oxysporum* f. sp. sesame با بذور کنجد در مزارع استان فارس. مجله بیماریهای گیاهی، ۴۲ (۱): ۱۱۷ تا ۱۲۳.

۳- بهروزین م. و اسدی پ. ۱۳۷۳. معرفی سه گونه ی فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه و غده‌ی پیاز خوراکی و تعیین فراوانی آنها در آذربایجان شرقی. مجله بیماریهای گیاهی، ۳۰ : ۴۱ تا ۴۹

۴- حجازی ر. ، نصراصفهانی م. و صداقت فر ع. ۱۳۸۵. بررسی و شناسایی عوامل قارچی همراه پوسیدگی ریشه و طبق پیاز. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره ی گیاهپزشکی ایران، ۱۱ تا ۱۴ شهریور، کرج.

۵- حجازی ر. ، مدرس نجف آبادی س. ، صداقت فر ع. ، رهاننده ه. و فتاحی ب. ۱۳۸۷. بررسی جدایه های فوزاریوم در پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه پیاز و تعیین گونه ی غالب در استان اصفهان.خلاصه مقالات هجدهمین کنگره ی گیاهپزشکی ایران ۳ تا ۶ شهریورماه، همدان.

۶- قلندر م. و لک م. ۱۳۸۳. بررسی بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیاز در استان مرکزی. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۵تا۸ شهریور، کرمانشاه. ص ۲۳۸

۷- علوی ا. و آهومنش ع. ۱۳۷۸بیماریهای گیاهی بذرزاد : اصول و روشهای مبارزه (ترجمه) . چاپ اول انتشارات سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی. اصفهان.

۸- علیان ا. ، جوان نیکخواه م. ، امینیان ح. و خسروی و. ۱۳۸۷ . بررسی جمعیت‌ها و تیپ‌های آمیزشی قارچ عامل پوسیدگی طوقه برنج *Gibberella fujikuroi* ، در استان مازندران. مجله ی بیماریهای گیاهی، ۴۴ (۲) : ۱۲۱تا ۱۳۶.

9- Abd-El-Razik, Fahmy F.G., Amein A.M. & El-Amein A.I. 1990. Role of onion seeds in transmission of damping of causal fungi and chemical control of the disease. Seed Path Microbiol. 18: 247–253.

10- Armengol J., Moretti A., Perrone G., Vicent A., and Bengoechea J.A. 2005. Identification, incidence and characterization of Fusarium proliferatum on ornamental palms in Spain. European Journal of Plant. 112: 123–131.

11- Baker K.F., and Smith S.H. 1966. Dynamics of Seed Transmission of Plant Pathogens. Annual Review of Phytopathology. 4: 311–332.

12- Booth C. 1971. The Genus Fusarium. C.A.B, 231 P.

13- Crane J.K., Naeher T.M., Shulgina I., Zhu C., Boedeker E.C. 2007. Effect of Zinc in enteropathogenic Escherichia coli infection. Infection and Immunity 75(12) : 5974–5984.

14- Chilvers M.I., du Toit L.J., Akamatsu H., and Peever T.L. 2007. A real-time ,quantitative PCR seed assay for Botrytis spp. that cause neck rot of onion. Plant Dis. 91(5): 599–608.

15- Chulze S. N., Ramirez M. L., Pascale M., & Visconti A. (1998). Fumonisin production by, and mating populations of, Fusarium section Liseola isolates from maize in Argentina. Mycological Research, 102: 141–144.

16- Du Toit L.J., and Inglis D.A. 2003. Fusarium proliferatum pathogenic on Onion bulbs in Washington. Plant Dis. 87:750.

17- EL-Nagerabi S.A.F., and Abdalla R.M.O. 2004. Survey of seedborne fungi of Sudanese cultivars of onion, with new recored. Phytoparasitica 32(4) : 413-416.

18- Gabogi P. 1983. Seed transmission of Fusarium oxysporum epidemiology and control. Seed Ssci. And Tech. 11: 815-827.

19- Galvan G.A., Koning-Boucoiran C.F.S., Koopman W.J.M., Meijer K.B., 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. Eur. J. Plant Pathol. 121:499–512.

20- Hayden N.J., and Maude R.B. 1992. The role of seed-borne Aspergillus niger in transmission of black mould of onion. Plant Pathology. 41: 573-581.

21- Karajeh M.R. 2006. Seed transmission of Verticillium dahliae in olive as detected by a highly sensitive nested PCR-based assay. Phytopathol. Mediterr. 45: 15–23.

22- Kojima N., Hori M., Murata T., Morizane Y., and Ozaki H. 2007. Different profiles of Ca2? responses to endothelin-1 and PDGF in liver myofibroblasts during the process of cell differentiation. British Journal of Pharmacology 151: 816–827.

23- koyku N.D., and Ozer N. 1997. Determination of seedborne fungi in onion their transmission to onion set. Phytoparasitica 25(1) : 25-31.

24- Lee H.K., Tewari J.P., Turkington T.K. 2002. Uantification of seedborne infection by rhynchosporium secalis in barley using competitive PCR.Plant pathology, 51: 217-224.

25- lesli J.F., and Summerell B.A. 2006. The Fusarium laboratory manual. Blackwell publishing. 383 p.

26- Mannerucci G.F., Cristani C., Marziano O., and Gambogi P. 1987. Fusarium species of onion seed of Italian origin . Phytopathol. Mediterr. 26(3): 156-164.

27- Maude R.B., and Humpherson-Jones F.M. 1980. The effect of iprodione on the seed-borne phase of Alternaria brassicicola. Annald of applied biology 95: 311-319.

28- Molouba F., Guimier C., and Berthier C. 2001. Detection of bean seed-borne pathogens by PCR. Acta Hort. (ISHS) 546:603-607.

29- Mule G., Susca A., Stea G., and Moretti A. 2004 .A species-specific PCR assay based on the

Calmodulin partial gene for identification of Fusarium verticillioides, F. proliferatum and F. subglutinans . European Journal of Plant Pathology 110: 495–502.

30- Muller R., Owen C.A., Xue Z.T., Welander M., and Stummann B. 2002. Characterization of two CRT-like protein kinase in Rosa hybrida ans their expression during flower senescence and in response to ethylene. Journal of experimental botany, 35(371): 1223-1225.

31- Nahar S., and Mushtaq M. 2007. Pathogenic effects and transmission studies of seed-borne Fusarium species in sunflower. Pak. J. Bot., 39(2): 645-649.

32- Neergaard P. 1979. Seed pathology (Vol. 1) . Macmilan press, 839 P.

33- Nelson P.E., Toussoun T.A., and Marasas W.F.O. 1983. Fusarium species, a manual for identification. The Pennsylvania State University press. 193 p.

34- Pryor B.M., and Gilbertson R.L. 2001. A PCR-based assay for detection of Alternaria radicina on carrot seed. Plant Dis. 85:18-23.

35- Stankovic S., Levic J., Petrovic T., Logrieco A., and Amoretti A. 2007.Pathogenicity and mycotoxin production by Fusarium proliferatum isolated from onion and garlic in Serbia. Eur J Plant Pathol. 118:165–172.

36- Sugita S., Imagawa H., Vada R., and Fucunaga Y. 1997. RT-PCR detection of equine arthritis virus from various samples of an experimentally infected pregnant mare. J. Equine sci. 8(2): 29-33.