



مقاله کوتاه پژوهشی

اولین گزارش از جداسازی و شناسایی عامل پوسیدگی ریشه و پژمردگی فوزاریومی گیاه سیر از مزارع شهرستان ساری

نیما اکبری اوغاز^۱ - کامران رهنما^{۲*} - رقیه حبیبی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۹

چکیده

گیاه سیر یکی از سبزی‌های پرمصرف بوده که هر ساله خسارت بالای بیمارگرهای خاکزاد در این گیاه دیده می‌شود. در بهار سال ۱۳۹۷، طی بازدید از مزارع حومه شهرستان ساری، علائم پژمردگی و خشکیدگی گیاهان سیر مشاهده و از بوته‌های بیمار نمونه برداری شد. پس از جداسازی روی محیط کشت آب-آگار و خالص‌سازی روی محیط سیب زمینی-دکستروز-آگار، قارچ‌ها به محیط میخک-آگار جهت تولید ماکروکنیدیوم انتقال و شاخص‌های ریخت‌شناسی با کلیدهای شناسایی معتبر بررسی گردید. DNA قارچ به روش CTAB استخراج و با آغازگرهای ITS4، ITS5، EFGR و EF1-983F تکثیر و توالی‌یابی شد. اثبات بیماری‌زایی در گیاه سیر رقم طارم با اثر دو میزان ۳۰ و ۶۰ گرم مایه تلقیح قارچ بیمارگر (اسپان گندم) در یک کیلوگرم خاک ارزیابی گردید. ویژگی‌های ریخت‌شناسی شامل پرگنه ارغوانی، رشد پنبه‌ای، ماکروکنیدیوم‌های چهار تا شش سلولی و کلامیدسپورهای زنجیری مشابه قارچ *Fusarium oxysporum* بود. توالی ژنوم در ناحیه ITS با تشابه ۱۰۰ درصد و در ناحیه TEF با تشابه ۹۹-۹۸ درصد به قارچ *F. oxysporum* با رس شمار MK790682.1 و کد جدایه 7391 در بانک ژن (NCBI) ثبت گردید. با میزان ۳۰ g/kg مایه تلقیح در مقایسه با شاهد سالم پس از ۴۵ روز علائم پژمردگی، زردی و در نهایت خشکیدگی گیاه مشابه شرایط مزرعه ظاهر گردید. در میزان ۶۰ g/kg مایه تلقیح نیز پس از ۳۰ روز حبه‌ها رشدی نداشتند و قبل از جوانه‌زنی حبه کاملاً پوسیده گردید. بنابر داده‌های حاصل، عامل بیمارگر *F. oxysporum* 7391 احتمالاً یکی از عوامل مهم پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی گیاه سیر در مزارع حومه شهرستان ساری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی، پوسیدگی ریشه، گیاه سیر، TEF، ITS

مقدمه

نراقی و همکاران (۱) نیز قارچ‌های *F. solani*، *F. oxysporum* و *F. proliferatum* را به عنوان بیمارگر گیاه سیر از استان همدان گزارش نمودند. هرساله خسارت عوامل بیماری‌زای خاکزاد قارچی مختلف در استان‌های شمالی کشور ایران از جمله مازندران به عنوان یکی از مناطق مهم کاشت سبزی و صیفی بخصوص گیاه سیر با میزان ۳۰-۲۹ تن در سال ۹۷-۹۶، کشاورزان سیر کار را به شدت تحت تاثیر قرار داده، بطوری که در مزارع با درصد آلودگی بالای خاک، کشاورزان زمین‌های کشاورزی خود را رها کرده یا روی به کشت محصولات دیگر می‌آورند (۴). نظر به خسارت بالای اقتصادی در مناطق کشت گیاه سیر در استان‌های شمالی کشور، در این تحقیق

سیر (*Allium sativum* L.) یکی از سبزی‌های رایج، پرمصرف و مهم در پیش‌گیری و درمان بیماری‌های انسانی به شمار می‌آید. گونه‌های خاکزی *Fusarium* spp. از مهم‌ترین عوامل تنش‌زا در این گیاه و ایجاد خسارت در گیاهان زراعی، باغی و حتی در انبارداری پس از برداشت هستند (۲). در ایران تحقیقات محدودی در رابطه با جداسازی و شناسایی قارچ‌های بیماری‌زای *Fusarium* spp. در گیاه سیر صورت گرفته است. موسوی و امیری (۳) قارچ‌های *F. solani*، *F. oxysporum* و *F. semitectum* را به عنوان مهم‌ترین بیمارگرهای گیاه سیر از منطقه جیرفت گزارش کردند. مهدی زاده

(Email: rahnama@gau.ac.ir)

(* نویسنده مسئول)

DOI: 10.22067/jpp.2021.32779.0

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، استاد گروه گیاه‌پزشکی و دانش آموخته مقطع دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

یا صورتی روی غده‌ها، کاهش کیفیت محصول، خشک شدن و مومیایی شدن غده‌ها، پژمردگی بوته‌های آلوده، پوکی، لهیدگی غده و رنگ قهوه‌ای، صورتی یا بنفش ریشه‌ها از دیگر علائمی بودند که در مزارع با خاک مشکوک آلوده به این قارچ مشاهده شدند (شکل ۱). در بررسی ریخت‌شناسی، از میان قارچ‌های جدا و خالص شده اکثریت قارچ‌ها (بیش از ۹۰ درصد) مطابق با کلیدهای شناسایی (۶ و ۷) نزدیک به قارچ *F. oxysporum* شناسایی گردیدند. شاخص‌های ریخت‌شناسی ظاهر شده در محیط کشت PDA، دمای $23 \pm 2^\circ\text{C}$ و شرایط تاریکی شامل؛ رشد پنبه‌ای و رنگ ارغوانی ریشه‌های قارچ طی ۷۲ ساعت، سلول‌های میکروکنیدی کوچک تک سلولی با میانگین اندازه $1/34 \times 1/06$ میکرومتر طی ۹۶ ساعت، ماکروکنیدی‌های کشیده شفاف با چهار تا شش سلول و میانگین اندازه $5/80 \times 1/05$ میکرومتر به همراه یک پاشنه و کلامیدوسپوره‌های زنجیری با میانگین اندازه $4/25 \times 4/70$ میکرومتر پس از دو هفته در محیط کشت میخک آگار CLA بودند (شکل ۱). پس از الکتروفورز، ژنوم تکثیر شده در ناحیه ITS و TEF به تریب در محدوده ۶۰۰ و ۵۰۰ جفت باز قرار گرفتند (شکل ۱). مقایسه توالی ژنوم در ناحیه ITS در بانک ژن NCBI، تشابه ۱۰۰ درصد را به چندین قارچ *F. oxysporum* نشان داد، همچنین در ناحیه TEF نیز تشابه نزدیک به ۹۹ و ۹۸ درصد بود.

قارچ شناسایی شده در این تحقیق با نام *F. oxysporum* و کد جدایه 7391 با رس شمار MK790682.1 در بانک ژن NCBI ثبت گردید (۱۱). در بخش تست بیماری‌زایی مشاهده شد در مقدار ۶۰ گرم مایه تلقیح، حبه‌های گیاه سیر در مقایسه با تیمار شاهد (تیمار بدون حضور قارچ) بعد از گذشت ۳۰ روز از زمان کاشت، رشدی نداشتند و قبل از جوانه‌زنی رویان حبه پوسیده و از بین رفته است. علائم در تمام تیمارها به صورت قهوه‌ایی شدن، کدر شدن، لهیدگی و پوسیدگی حبه‌ها نمایان گردید. در حالی که در تیمار شاهد حبه‌ها به خوبی بدون ظهور علائم بیماری جوانه زده و رشد کردند (شکل ۲). در میزان ۳۰ گرم مایه تلقیح بعد از گذشت ۴۵ روز از زمان کاشت علائم خفیف‌تری نمایان شد، بطوری که در تمام تیمارها علائمی همچون زرد شدن برگ گیاهان آلوده، که از نوک برگ آغاز و پیشروی داشت نمایان گشت، این روند پیشروی در نهایت منجر به خشک شدن بوته گیاه سیر شد. در تیمار شاهد این علائم مشاهده نگردید و گیاه سیر بدون ایجاد علائم بیماری به رشد و نمو ادامه داد (شکل ۲). علائم مشاهده شده همانند علائمی بودند که در مرحله نمونه‌برداری از مزارع بر روی گیاهان بیمار مشاهده گردید. نمونه‌های میکروسکوپی از بافت ریشه و طوقه گیاهان نیز حضور و خاصیت بیماری‌زایی قارچ بیمارگر را بر روی گیاه سیر تایید نمود. احتمال می‌رود کاهش میزان مایه تلقیح به بتدریج در بازه‌های زمانی طولانی مدت علائم بیماری را ظاهر سازد.

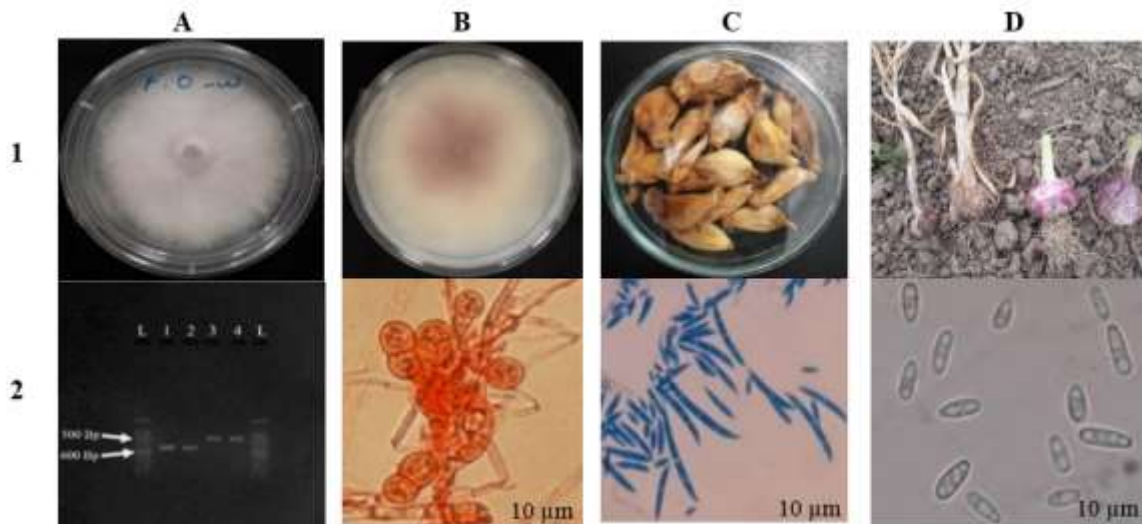
سعی شده به بررسی و شناسایی عوامل مهم قارچی خاکزاد بیمارگر این گیاه در مزارع حومه شهرستان ساری-استان مازندران پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از گیاهان بیمار با علائم پژمردگی و خشکیدگی بوته‌ها در مزارع سیر بنفش رقم طارم (۹) واقع در حومه شهرستان ساری در بازه‌های زمانی نزدیک به برداشت در نیمه اول و دوم فروردین و اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۷ طی دو مرحله صورت گرفت. محیط کشت آب آگار (Agar-Biolife Italiana S.R.I) جهت جدا سازی، محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA-Biolife Italiana S.R.I) جهت خالص سازی و جهت تحریک به اسپوردهی از محیط کشت اختصاصی برگ میخک-آگار (CLA) استفاده شد (۷). نمونه‌های میکروسکوپی از توده رشد کرده قارچ‌ها تهیه و شاخص‌های ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت (۶ و ۷). استخراج DNA به روش CTAB انجام (۸)، ژنوم استخراج شده با چهار آغازگر ITS4، ITS5، EfgR و EF1-983F (۱۰) تکثیر و برای الکتروفورز، از بافر TBE با ولتاژ ۸۵ استفاده شد (۸). شباهت توالی ژنوم بدست آمده با سایر توالی‌ها در بانک ژن NCBI از طریق نرم افزار بلاست بررسی گردید. در آزمون اثبات بیماری‌زایی، مایه تلقیح دانه گندم جهت تلقیح قارچ به خاک و سیر بنفش رقم طارم جهت کاشت استفاده گردید. بستر کاشت (۵۴ درصد خاک، ۳۶ درصد ماسه و ۱۰ درصد کود گاوی کاملاً پوسیده) دو بار قبل از تلقیح قارچ سترون شد. مایه تلقیح در دو حجم ۳۰ و ۶۰ گرم در یک کیلوگرم خاک اعمال و گلدان‌ها قبل از کاشت سیر جهت گسترش و تثبیت قارچ، دو هفته در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از کاشت، گلدان‌ها به دستگاه ژرمیناتور (رطوبت نسبی ۴۵٪، دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ و ۱۲ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی) منتقل، سه تکرار از هر تیمار انجام و نتایج به صورت کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

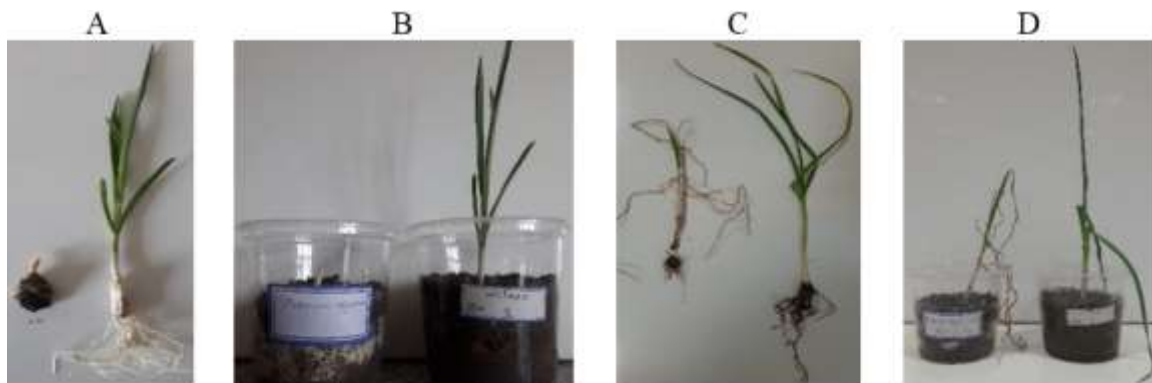
نتایج و بحث

در زمان نمونه‌برداری اولین نشانه‌های خفیف شامل؛ زرد شدن برگ که از نوک شروع به پیشروی کرده و حرکت رو به جلو داشت. در این مرحله احتمالاً قارچ از طریق ریشه یا زخم وارد غده گیاه سیر شده که در نهایت پوسیدگی پایه غده را ایجاد می‌نمود. نشانه‌های شدیدتر از جمله؛ فرا گرفتن بافت برگ‌ها و ساقه علفی گیاه و ایجاد خسارتی شبیه به آبسختگی که از پایه نزدیک به سطح خاک شروع شده به سمت انتهای اندام فوقانی گیاهان حرکت کرده و به مرور کل سطح گیاه را می‌پوشاند نیز در مزارع نمایان بود. میسلیوم‌های سطحی سفید



شکل ۱- بخشی از علائم بیماری در مزارع، شاخص‌های ریخت‌شناسی و ارزیابی توالی ژنوم قارچ بیمارگر جداسازی شده. A1 و B1: رشد پنبه‌ای و رنگ ارغوانی ریشه‌های قارچ؛ C1: علائم چروکیدگی حبه در اثر عامل بیماری؛ D1: علائم خسارت در مزارع؛ A2: باندهای تشکیل شده با پرایمرهای مختلف (L-چاهک حاوی ژنوم تکثیر شده شاهد (DNA-Ladder)، ۳ و ۴-چاهک‌های حاوی ژنوم تکثیر شده در ناحیه TEF؛ ۱ و ۲-چاهک‌های حاوی ژنوم تکثیر شده در ناحیه ITS)؛ B2: کلامیدوسپورهای زنجیری؛ C2: سلول‌های ماکروکنیدی کشیده شفاف با چهار تا شش سلول؛ D2: میکروکنیدی‌های کوچک و تک سلولی.

Figure 1- Some of the disease symptoms, morphological indicators and sequencing evaluation of the plant pathogenic fungus genome. A1 and B1: Cotton growth and purple color of fungal mycelium; C1: wrinkle bulb samples from infected plants; D1: Signs of damage in farms; A2: Evaluation of genome band on electrophoresis gel analysis by different primers (L-Wells: multiplied genome of the control (DNA-Ladder); 3 and 4-Wells: multiplied genome in the region TEF; 1 and 2-Wells: multiplied genome in the region ITS); B2: Chain of chlamydospores; C2: Transparent macroconidia cells with four or six cells; D2: Small, single-celled microconidia.



شکل ۲- تست بیماری‌زایی. A: حبه سیر آلوده شده در حجم ۶۰ g/kg اینوکولوم قارچ بیمارگر سمت چپ و گیاه سالم (شاهد) سمت راست؛ B: تیمار شاهد (گلدان سمت راست) و تیمار گیاه بیمار (گلدان سمت چپ) در حجم ۶۰ g/kg اینوکولوم؛ C: شاهد (گیاه سمت راست) و تیمار (گیاه بیمار) در حجم ۳۰ g/kg اینوکولوم؛ D: شاهد (گلدان سمت راست) و تیمار گیاه بیمار (گلدان سمت چپ) در حجم ۳۰ g/kg اینوکولوم.

Figure 2- Pathogenicity test. A: Diseased garlic bulb in a volume of 60 g/kg of inoculum at left side and healthy plant as control treatment on right side; B: Control treatment (right pot) in comparison with the treatment of the diseased garlic bulb (left pot) in a volume of 60 g/kg of inoculum; C: control treatment (right plant) compared to the treatment of diseased garlic plant (left plant) in a volume of 30 g/kg of inoculum; D: control treatment (right pot) compared to the treatment of diseased garlic plant (left pot) in a volume of 30 g/kg of inoculum.

مازندران بشمار آمده که باعث جابجایی مایه اینوکوم قارچ‌های بیمارگر حتی به استان‌های مجاور می‌شود. برای اولین بار این تحقیق گزارش کننده قارچ *F. oxysporum* 7391 به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد پژمردگی، پوسیدگی ریشه و تنش در مزارع سیر واقع در استان مازندران می‌باشد. اگرچه نیاز است مطالعات جامع‌تر و کاملی جهت شناسایی، تنوع و پراکنش فرم‌های اختصاصی و زیرگونه‌های قارچ *F. oxysporum* در مزارع این استان اجرا گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به جهت تامین مالی و سازمان جهاد کشاورزی استان مازندران به جهت همکاری‌های متقابل و صمیمانه در به ثمر رسیدن این تحقیق علمی کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورند.

بنابراین می‌توان پی برد، چرا خاک‌های مزارعی که به تازگی آلوده می‌گردند علائم بیماری را زود نشان نمی‌دهند یا امکان دارد این علائم در بازه‌های بسیار طولانی مدت ظاهر گردد. اغلب در این زمان گیاهان سیر برداشت شده و قارچ‌های بیمارگر خسارت اقتصادی قابل ملاحظه‌ای را برای کشاورزان در زمان تازه فروشی ایجاد نمی‌کنند. احتمالاً اسپوره‌های موجود در خاک اطراف حبه‌های برداشت شده در انبار پوسیدگی‌های بعدی را به وجود می‌آورند و باعث خسارات انباری در نگهداری‌های طولانی مدت می‌گردند. به همین جهت می‌بایست به علائم خفیف نیز در مزارع کشت گیاهان سیر توجه و اقدامات لازم مدیریتی را قبل از کشت اعمال نمود.

با توجه به پراکنش و گستردگی این بیمارگر و پایداری آن در خاک و اهمیت شهرستان ساری در اختصاص سطح بالایی از اراضی کشاورزی به کاشت گیاه سیر، هم به هدف تولید محصول مصرفی ساکنین استان و هم به جهت تولید بذر در سال کشاورزی آتیه، این شهر منبعی مهم جهت صادرات بذر سیر به دیگر شهرهای استان

منابع

- 1- Mahdzade Naraghi R., Zafari D., Zamanizade H.R., and Argmandian A. 2007. Identification of fungal pathogens in garlic at Hamadan province. *Agricultural Research* 7(3): 11-29. (In Persian with English abstract)
- 2- Elshahawy I.E., Saied N.M., and Morsy A.A. 2017. *Fusarium proliferatum*, the main cause of clove rot during storage, reduces clove germination and causes wilt of established garlic plants. *Journal of Plant Pathology* 99(1): 85-93.
- 3- Mosavi N.N., and Amiri M. 2010. Identification of fungal agents of seedling death, burns and leaf spot of garlic and onion in Jiroft region. *Plant Production Research* 17: 91-103. (In Persian with English abstract)
- 4- Ghanbari Shir Savar A. 2019. Investigating the situation of vegetables and summer crops in Iran. IRIB News Agency. Retrieved from www.iribnews.ir. (In Persian)
- 5- Fisher N.L., Burgess L.W., Toussoun T.A., and Nelson P.E. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology* 72(1): 151-153.
- 6- Barnett H.L., and Hunter B.B. 2006. *Illustrated genera of imperfect fungi. Illustrated genera of imperfect fungi*. APS press (3rd ed). 457p.
- 7- Nelson P.E., Toussoun T.A., and Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. University Park: Pennsylvania State University Press. 193p.
- 8- Liu L., Wang C.L., Peng W.Y., Yang J., Lan M.Q., Zhang B., and Li C.Y. 2015. Direct DNA extraction method of an obligate parasitic fungus from infected plant tissue. *Genetics and Molecular Research* 14(4): 18546-18551.
- 9- Zahedi B., Kashi A., ZabihAllah Z., and Masahebi G.H. 2008. Genetic diversity of some garlic (*Allium sativum* L.) masses in Iran using RAPD markers. *Iranian Agricultural Sciences* 39(2): 245-56. (In Persian with English abstract)
- 10- Karlsson I., Edel-Hermann V., Gautheron N., Durling M.B., Kolseth A.K., Steinberg C., Persson P., and Friberg H. 2016. Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. *Applied and Environmental Microbiology* 82(2): 491-501.
- 11- Akbari Oghaz N., Rahnama K., and Habibi R. 2019. First Report of Isolation and Identification of *Fusarium* Wilting of Garlic by *Fusarium oxysporum* from Mazandaran Province-Iran. 4th Iranian Mycological Congress, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. (In Persian with English abstract)



First Report of Isolation and Identification of *Fusarium* wilt and Root Rot of Garlic Fields from Sari Area

N. Akbari Oghaz¹- K. Rahnama^{2*}- R. Habibi³

Received: 23-06-2020

Accepted: 09-05-2021

Background and Objectives: Garlic (*Allium sativum*) is one of the most common and high consumption vegetables in the world specializing in the northern provinces of Iran. Various civilizations and cultures throughout history have realized the importance of this valuable plant in the prevention and treatment of human diseases. One of the most important environmental stresses on garlic plant specialty at the fields of Sari countryside, are different species of soil-borne plant pathogen fungi, which are causing damage to crops and even in the storage of the post-harvest. The most important parts that are damaged by these pathogens are bulbs and roots. Identifying these fungi that cause plant stress and weaken the plant in production or cause drought and eventually plant death, has been a very important issue in plant protection science. In this research, for the first time, an attempt has been made to isolate and identify the cause of garlic wilt and root rot at the farms in Sari countryside, Mazandaran province, Iran.

Materials and Methods: At the time of harvesting garlic (spring of 2018) several samples were taken from purple garlic farms of Tarom cultivar at Sari countryside. The fungi were isolated and purified on Water-Agar and PDA medium respectively, then transferred to CLA medium to stimulate the production of macro-conidia. The morphological characters of the fungi as the shape, type and size of the spores (length and width), the color of the mycelia and shape of chlamydo-spores determined by keys of Barnett and Hunter and Nelson et al., DNA of fungus was extracted by CTAB method, amplified and sequenced by the ITS4, ITS5, EFGR and EF1-983F primers. The similarity of the genome compared with other sequences in the NCBI gene bank. In order to test prove the pathogenicity of the fungus, the interaction of the fungus and purple garlic plant (Tarom cultivar) was evaluated by the effect of 30 and 60 g/kg of pathogenic fungus inoculum during seed germination and growth of this plant into the soil.

Results and Discussion: The morphological characters of the fungus were; purple colony color, cottony growth of mycelia, four to six cell macro-conidia and chain shape chlamydo-spores, which were confirmed in accordance by the identification keys close to the *Fusarium oxysporum* fungus. ITS genome aligned with 100 and TEF genome aligned approximately with 98-99 percent similarity to *F. oxysporum*, which were recorded at the GenBank with NCBI accession number; MK790682.1 and isolate code;7391. Symptoms at pathogenicity test included; wilting, yellowing, necrosing leaf and finally drying of garlic plant appeared at 30g/kg inoculum compared to healthy control treatment. Bulbs were rotted by 60g/kg inoculum and the plant did not grow. It was observed that reducing the amount of inoculation caused damage over a long period.. Garlic plants with few symptoms are usually harvested and transferred to the storehouse which probably causes the spreading of pathogen spores and makes storage rot even on healthy crops. Fewer symptoms are very important at farms and the fungus should be controlled before causing more damage. Also, the transmission of diseased plants with fewer symptoms should be avoided to the storehouse. Therefore, based on morphological and molecular characteristics and pathogenicity test probably *F. oxysporum* 7391 is one of the important factors of wilt and root rot of garlic plants in Mazandaran province.

Conclusion: Farmers take serious damages from soil-borne plant pathogens every year at the time of harvesting crops especially at the garlic farms from Mazandaran province. The importance of soil-born plant pathogen fungi on garlic has been reported from all around the world. High production of garlic in Sari, storage for planting at the next agricultural year and most important export of these garlic bulbs to other cities of Mazandaran and even neighboring provinces, will probably cause the spreading of pathogenic fungi inoculum. For the first time, this study reports the fungus *F. oxysporum* 7391 as one of the important factors in causing the disease of the Garlic-Tarom plant in Sari. More comprehensive studies are needed to identify, diversify and distribute specific forms and subspecies of the fungus *F. oxysporum* in farms at Mazandaran province. Epidemy criteria need to be defined for these *Fusarium* spp., and bulbs must be carefully inspected before export or storage. Quarantine should be used

1, 2 and 3- M.Sc. Graduated of Plant Pathology, Professor and Ph.D. Graduated of Plant Pathology of Plant Protection Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, respectively.

(*- Corresponding Author Email: rahnama@gau.ac.ir)

DOI: 10.22067/jpp.2021.32779.0

to prevent the spread of inoculum to other provinces until the pathogen is completely controlled.

Keywords: Garlic Plant, Root Rot, Wilting, ITS, TEF