



## مقاله پژوهشی

# ارزیابی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی گونه‌های *Fusarium* همراه ریشه و بنه زعفران در استان خراسان جنوبی

نیما خالدی\*

تاریخ دریافت: ۱۳ اردیبهشت ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۱ بهمن ۱۳۹۸

خالدی، ن. ۱۳۹۹. ارزیابی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی گونه‌های *Fusarium* همراه ریشه و بنه زعفران در استان خراسان جنوبی. زراعت و فناوری زعفران، ۸(۲): ۲۴۳-۲۵۹.

## چکیده

هدف از این مطالعه شناسایی گونه‌های *Fusarium* همراه با ریشه و بنه زعفران و ارزیابی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی تولید شده توسط آن‌ها می‌باشد. به منظور بررسی گونه‌های *Fusarium* طی فصل رشدی ۱۳۹۷ در مجموع ۵۳ نمونه ریشه و بنه به طور تصادفی از مزارع زعفران استان خراسان جنوبی جمع‌آوری شد. پس از شستشو نمونه‌ها با آب مقطر استریل و ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد، قطعات کوچک ریشه و بنه روی محیط‌های کشت عمومی و اختصاصی کشت داده شدند. تهیه کشت خالص قارچ‌ها به روش تک اسپور و نوک ریشه کردن روی محیط کشت آب - آگار دو درصد انجام شد. شناسایی قارچ‌ها بر اساس مشخصات میکروسکوپی و ریخت‌شناختی با توجه به کلیدهای معتبر شناسایی انجام گرفت. با توجه به خصوصیات ریخت‌شناختی، گونه‌های *F. culmorum*، *F. oxysporum*، *F. proliferatum* و *F. graminearum* شناسایی شدند. نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه، شناسایی ریخت‌شناختی را تأیید کرد. نتایج نشان داد که ۲۲/۶ درصد از نمونه‌های زعفران توسط گونه‌های *Fusarium* آلوده بودند. بر اساس مشاهدات ریخت‌شناختی و مولکولی، *F. oxysporum* به عنوان گونه غالب با بیشترین درصد فراوانی در نمونه‌ها به میزان ۹/۴ درصد پس از آن *F. culmorum* (۵/۷ درصد)، *F. proliferatum* (۳/۸ درصد) و *F. graminearum* (۳/۸ درصد) بود. نتایج نشان داد که تمام جدایه‌های *Fusarium* قادر به تولید آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و به طور عمده سلولاز و زایلاناز می‌باشند. سطوح فعالیت آنزیم‌های سلولز، زایلاناز و پکتیناز در این مطالعه بالاتر از فعالیت لیپاز در همه جدایه‌های مورد بررسی بود. تجزیه و تحلیل روند فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی نشان داد که برای بسیاری از جدایه‌های مورد بررسی حداکثر سطح فعالیت سلولاز، زایلاناز، پکتیناز و لیپاز به ترتیب در ۷۲، ۹۶، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت پس از کشت در محیط مایع مشاهده شد. سپس فعالیت‌های آنزیمی به تدریج با گذشت زمان کاهش یافت، تا اینکه در سطوح ثابتی باقی ماند. بر اساس منابع موجود *F. culmorum* و *F. proliferatum* برای اولین بار در ایران از روی زعفران گزارش می‌شوند.

**کلمات کلیدی:** ریخت‌شناختی، زایلاناز، سلولاز، شناسایی، مولکولی.

۱- استادیار، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران  
\* - نویسنده مسئول: (n.khaledy@areeo.ac.ir)

## مقدمه

زعفران زراعی با نام علمی *Crocus sativus* L. گیاهی علفی، چندساله، روز کوتاه، نیمه گرمسیری، سرمدوست، تریپلوئید، بدون ساقه و دارای بنه از تیره زنبقیان (Iridaceae) است که می تواند ۸ الی ۱۰ سال به دوره زندگی خود ادامه دهد (Koocheki & Seyedi, 2015). زعفران به عنوان طلای سرخ با ارزش ترین محصول کشاورزی، دارویی و گران بهاترین ادویه جهان می باشد. ارزش کیفی زعفران به علت وجود متابولیت های ثانویه و مشتقات آن می باشد. آنالیزهای فیتوشیمیایی و تجزیه شیمیایی زعفران حضور سه ماده مؤثره مهم و ارزشمند در مصارف دارویی و صنعتی به نام های کروسین به عنوان رنگیزهای کاروتنوئیدی محلول در آب مسئول رنگ زعفران، پیکروکروسین مسئول طعم و سافراناال مسئول عطر و بوی را نشان می دهد (Omidi et al., 2009; Yilmaz et al., 2010). امروزه ایران به عنوان بزرگترین و مهم ترین کشور تولیدکننده زعفران در دنیا شناخته شده است به طوری که بیش از ۸۰ درصد از تولید سالانه زعفران در دنیا، متعلق به ایران است (Koocheki et al., 2009). بر اساس آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی سطح زیر کشت، کل تولید، متوسط عملکرد آبی زعفران در کشور در سال ۱۳۹۶ به ترتیب ۱۰۸۰۸۶/۴ هکتار، ۳۷۶/۲۳ تن و ۳/۵ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است. بیش از ۹۰ درصد از سطح زیر کشت و تولید کل زعفران کشور مربوط به استان های خراسان رضوی، خراسان جنوبی و خراسان شمالی می باشد (Ebadzadeh et al., 2017). با وجود افزایش سطح زیر کشت و تولید زعفران در سال های اخیر، عملکرد زعفران به ازای هر واحد سطح زیر کشت از ۵/۱ کیلوگرم در سال ۱۳۶۰ به ۳/۵ کیلوگرم در سال ۱۳۹۶ رسیده است. کاهش عملکرد زعفران متأثر از عوامل مختلفی مانند سوء مدیریت در بخش

کشاورزی و اقتصادی از جمله توسعه کشت زعفران در استان های نواحی سرد و مرطوب، خشک سالی ها و عدم تأمین نیاز آبی گیاه، محدودیت های اجرایی در توسعه مکانیزاسیون، عدم توجه به تناوب کشت و تنوع در بعد زمانی، مدیریت بر اساس افزایش عملکرد گل به جای رشد بنه های دختری، عدم انتخاب بنه های مناسب جهت کشت، عدم توجه به الگوهای کشت پر تراکم بنه، دانش فنی پایین کشاورزان و ضعف در اجرای برنامه های ترویجی و فرآوری پس از برداشت است که باید در کنار عوامل دیگر زراعتی از قبیل تهیه زمین و بستر کشت، استفاده از کودهای مختلف، آبیاری صحیح و به موقع و مبارزه با آفات، بیماری ها و علف های هرز مورد بررسی قرار گیرد (Rezvani Moghaddam et al., 2013; Koocheki & Seyedi, 2015). عوامل بیماریزای باکتریایی قارچی، ویروسی و ناماتودی از عوامل تأثیرگذار بر رشد، عملکرد و میزان تولید محصول زعفران می باشند (Ahrazem et al., 2010). بیماری پوسیدگی بنه از مهم ترین بیماری های زعفران است که نه تنها موجب کاهش عملکرد می شود، بلکه بر کیفیت و کمیت بنه های دختری تأثیر می گذارد (Husaini et al., 2010). بیماری پوسیدگی بنه زعفران توسط قارچ های *Fusarium oxysporum* f. sp. *F. equiseti* *F. solani* *F. oxysporum gladioli* *F. pallidoroseum moniliforme* var. *intermedium* *Phoma R. crocorum* *Rhizoctonia solani* *Mucor* sp. *Macrophomina phaseolina crocophila* *Sclerotium rolfsii* و *Penicillium* sp. (Dhar, 1992; Thakur et al., 1992; Wani, 2004; ) (Ahmad & Sagar, 2006; Kalha et al., 2007). اطلاعات موجود در مورد بیماری های زعفران بسیار اندک است و تا کنون مطالعاتی مقدماتی در مورد پوسیدگی بنه و ریشه زعفران انجام شده است ولی هنوز زیست شناسی عوامل این بیماری و نحوه

سلولی، آنزیم‌هایی را تولید می‌کنند که توانایی تخریب پلیمرهای دیواره سلولی از جمله سلولز، زایلان و پکتین را دارند. قارچ‌های بیمارگر گیاهی به این آنزیم‌ها در حین مراحل نفوذ و گسترش در میزبان نیاز دارند (Gibson et al., 2011). مطالعات انجام شده در مورد قارچ‌های *Sclerotinia*، *Verticillium dahliae*، *Rhizoctonia*، *Magnaporthe grisea*، *sclerotiorum*، *Macrophomina phaseolina*، *solani* و گونه‌های *Fusarium* نشان داد که رابطه مستقیمی بین آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و میزان بیماری‌زایی این قارچ‌ها وجود دارد (Khaledi et al., 2017; Khaledi et al., 2015; Martinez-Soto et al., 2013; Gibson et al., 2011; Asoufi et al., 2007). آنزیم‌های پکتیناز، سلولاز، زایلاناز و لیپاز از مهم‌ترین آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح شده توسط جدایه‌های گونه‌های *Fusarium* می‌باشند (Ortega et al., 2009; Kikot et al., 2013; al.). کاهش تولید و فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی حاصل از بیمارگرها با کاهش قدرت تهاجم و بیماری‌زایی آن‌ها ارتباط مستقیمی دارد (Voigt et al., 2005). سنجش و ارزیابی آنزیم‌های خارج سلولی ترشح شده توسط بیمارگرها می‌تواند به عنوان روش مفیدی جهت ارزیابی توان بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گیرد (Khaledi et al., 2017).

از آنجایی که تاکنون پژوهشی در خصوص جداسازی و شناسایی گونه‌های *Fusarium* در مزارع زیر کشت زعفران در ایران و به خصوص در استان خراسان جنوبی صورت نگرفته است، این تحقیق با هدف بررسی، جداسازی و شناسایی گونه‌های *Fusarium* از مزارع زیر کشت زعفران در برخی از شهرستان‌های خراسان جنوبی و ارزیابی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح شده توسط آن‌ها انجام شد.

کنترل آن‌ها مورد مطالعه قرار نگرفته است، هر چند شدت این بیماری نیز تا کنون زیاد نبوده است. طبق بررسی از مزارع و محل‌های نگهداری بنه‌های زعفران در استان خراسان جنوبی (Saedizadeh, 2014)، گونه‌های قارچی *Penicillium*، *Rhizopus stolonifera* و *Aspergillus niger digitatum* جداسازی و شناسایی شده است. گونه *Alternaria alternata* به عنوان عامل پوسیدگی کورم و برگ گیاه زعفران در دشت بیرجند جداسازی و شناسایی شده است (Hossainia & Mohammadi, 2018).

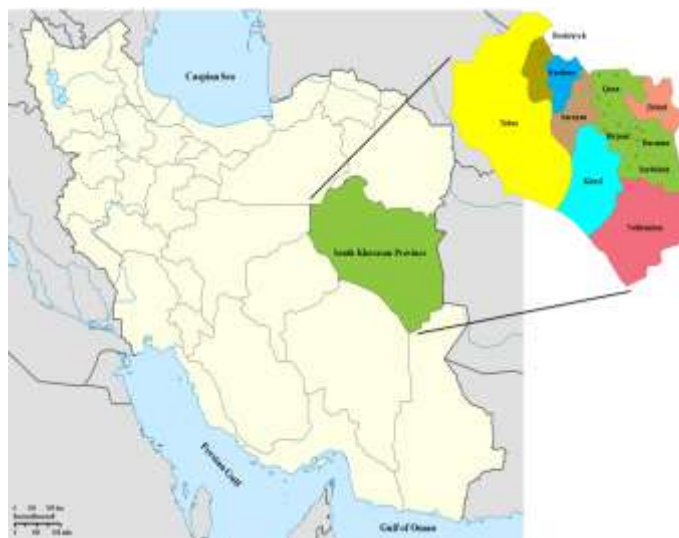
گونه‌های *Fusarium* از مهم‌ترین و گسترده‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشند که دامنه وسیعی از گیاهان را آلوده می‌کنند و در گیاهان علایم متفاوتی از جمله پوسیدگی و پژمردگی ریشه، پوسیدگی و شانکر ساقه، انسداد آوندها، لکه برگی، پوسیدگی‌های انباری و پوسیدگی‌های پس از برداشت را ایجاد می‌کنند که با کاهش کمی و کیفی محصولات موجب خسارات اقتصادی زیادی می‌شوند (Steinkellner et al., 1996; Trane, 1990; Vakalounakis, 2008). علاوه بر این بسیاری از گونه‌های *Fusarium* قادر به تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه از جمله توکسین‌ها هستند که برای سلامتی انسان و حیوانات مضر می‌باشند (Withanage et al., 2001). قارچ *Fusarium* sp. ساختاری تخصصی برای نفوذ در سلول‌های گیاهی ندارد، اما از طریق منافذ طبیعی وارد میزبان شده و یا به طور مستقیم توسط هیف کوتاه آلوده کننده در دیواره سلول‌های اپیدرمی نفوذ می‌کند. گونه‌های *Fusarium* با کمک ترشح آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی قادر به نفوذ به میزبان هستند. همچنین تولید آنزیم‌های خارج سلولی بیمارگر را قادر به نفوذ، رشد و آلوده‌سازی در بافت گیاهی می‌کند. دیواره سلول‌های گیاهی به طور عمده از پکتین، سلولز، همی‌سلولز، لیگنین، پلی ساکاریدها و پروتئین تشکیل شده است (Zhao et al., 2013). قارچ‌های بیمارگر گیاهی جهت نفوذ در دیواره

## مواد و روش‌ها

## نمونه‌برداری

به منظور بررسی گونه‌های *Fusarium* همراه ریشه و بنه زعفران، در مجموع ۵۳ نمونه از ریشه و بنه گیاهان مشکوک به بیماری از مزارع کشت زعفران قائن (۷ نمونه)، خضری دشت‌بیاض (۷ نمونه)، نیمبلوک (۷ نمونه) و سده (۷ نمونه) در

شهرستان قائن، خونیک (۷ نمونه) در شهرستان درمیان، فنود (۶ نمونه) و اصغول (۵ نمونه) در شهرستان سریشه و ساقی (۷ نمونه) در شهرستان بیرجند استان خراسان جنوبی طی فصل رشدی سال زراعی ۱۳۹۷ جمع‌آوری گردید (شکل ۱ و جدول ۳). نمونه‌های جمع‌آوری شده به صورت جداگانه، همراه ثبت مشخصات در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل گردیدند.



شکل ۱- مناطق جغرافیایی نمونه برداری شده از مزارع زعفران در شهرستان‌های استان خراسان جنوبی (بدون توجه به تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع زعفران، مناطق نمونه برداری با رنگ سبز و علامت × مشخص شده است).

Figure 1- Geographic areas sampled from saffron fields in the cities of South Khorasan province (Regardless of the number of samples collected, sampling areas are marked in green and with ×).

– آگار (Fisher et al., 1982) و خاک – آگار (Klotz et al., 1988) کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، زیر نور NUV و دوره نوری متناوب، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفت (Nirenberg, 1976) و بدین ترتیب جدایه‌ها به دست آمدند. روش‌های خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک ریشه و تک اسپور کردن روی محیط کشت آب – آگار دو درصد انجام شد (Booth, 1977; Nelson et al., 1983).

## شناسایی ریخت‌شناختی

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها بر اساس خصوصیات و ویژگی‌های ظاهری آن‌ها مانند رنگ پرگنه قارچ روی محیط

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های *Fusarium*

جهت به دست آوردن جدایه‌های گونه‌های *Fusarium* از حد واسط بافت آلوده و سالم، قطعات ۳-۵ میلی متری جداسازی و پس از ضدعفونی آن‌ها با محلول رقیق شده هیپوکلریت سدیم (حاوی یک درصد کلر فعال) به مدت دو دقیقه، با آب مقطر استریل ۳ بار شستشو داده شدند (Najari et al., 2018) و روی محیط کشت‌ها عمومی از جمله کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (Booth, 1977)، آب – آگار دو درصدی و اختصاصی از جمله برگ میخک – آگار (Fisher et al., 1982)، Peptone Spezieller (Nash & Snyder, 1962) و Nährstoffarmer Agar (Nirenberg, 1976)، کلرید کلسیم

DNA استخراج‌شده، چهار میکرولیتر از DNA استخراجی مربوط به هر نمونه DNA را با یک میکرولیتر محلول بافر بارگذاری (Loading Dye) ساخت شرکت Pars Tous ایران، مخلوط کرده، نشانگر وزن مولکولی Ladder 100 bp (فرمتناز) و سپس در ژل آگارز ۲ درصد در ولتاژ ۸۰ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. مشاهده باندهای قوی نشان‌دهنده کمیت و کیفیت مطلوب DNA استخراج‌شده می‌باشد. تعیین غلظت نمونه‌های DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتری (NanoDrop 2000; Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA) انجام گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت شناسایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه‌های *Fusarium* برای شناسایی مولکولی جدایه‌های گونه‌های *Fusarium* در این تحقیق از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه شامل ۷/۵ میکرولیتر آب، ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix (Pars Tous, Iran)، DNA با غلظت  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  و  $10 \text{ pmol}$  آغازگر روبه‌جلو و آغازگر برگشتی بود. در نهایت تیوب‌های PCR به دستگاه ترموسایکلر مدل (Germany) Biometra منتقل شدند و تکثیر صورت گرفت. هر آزمایش شامل کنترل مثبت (DNA یک جدایه شناخته‌شده) و کنترل‌های منفی (یک واکنش PCR بدون DNA) بود (Nicholson et al., 1998). برای شناسایی تکمیلی جدایه‌ها از آغازگرهای اختصاصی گونه که در جدول ۱ ارائه شده‌اند، استفاده شد. اختصاصی بودن هر آغازگر به وسیله انجام تجزیه و تحلیل BLAST در NCBI مورد تأیید قرار گرفت.

کشت سیب‌زمینی - دکستروز - آگار (به‌ویژه سطح زیرین پرگنه) و نحوه رشد پرگنه، و همچنین ویژگی‌های میکروسکوپی مانند اندازه و شکل ماکروکنیدیوم، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم و شکل آن و وجود یا عدم وجود کلامیدوسپورها با توجه به کلید شناسایی معتبر (Leslie & Summerell, 2006) انجام گرفت.

#### شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای تأیید گونه‌های شناسایی‌شده بر اساس مشخصات ریخت‌شناختی از آغازگرهای اختصاصی گونه برای شناسایی گونه‌های مختلف *Fusarium* sp. استفاده شد.

#### تهیه توده میسلیمی قارچ و استخراج DNA ژنومی

برای تهیه میسلیوم مورد نیاز جهت استخراج DNA، از حاشیه پرگنه تازه هر جدایه سه دیسک ۱۰ میلی‌متری به ظروف ارلن مایر محتوی محیط کشت مایع potato dextrose broth منتقل گردید. ارلن‌ها به مدت ۱۰ روز در داخل دستگاه انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از طی این مدت، محتوای هر یک از ارلن‌ها روی یک قطعه کاغذ صافی واتمن، روی قیف بوختر تخلیه‌شده و به کمک پمپ خلاء توده میسلیمی از محیط کشت مایع جداسازی شده و با آب مقطر سترون شسته شد. پس از آگیری کامل، توده میسلیمی برداشت و به درون میکروتیوب‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل می‌شود. میکروتیوب‌های حاوی میسلیوم تا مرحله استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای استخراج DNA از جدایه‌های قارچ از کیت Genomic DNA isolation kit IV ساخت شرکت DENA Zist Asia ایران با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

#### تعیین کیفیت و کمیت DNA

به منظور بررسی حضور یا عدم حضور و نیز تعیین کیفیت

جدول ۱- توالی آغازگرها، اندازه محصول و دمای اتصال مورد استفاده شده برای شناسایی گونه‌های *Fusarium*Table 1 - Primer sequences, product sizes and annealing temperatures used for identification of *Fusarium* species

گونه Species	آغازگر* Primer*	توالی آغازگر (۵'→۳') Sequences (5'→3')	اندازه قطعه (bp) Product size (bp)	منبع Reference
<i>F. oxysporum</i>	FOF1	ACATACCACTTGTTCGCTCG	340	Mishra et al. (2003)
	FOR1	CGCCAATCAATTTGAGGAACG		
<i>F. graminearum</i>	Fg16F	CTCCGGATATGTTGCGTCAA	400-500	Nicholson et al. (1998)
	Fg16R	GGTAGGTATCCGACATGGCAA		
<i>F. culmorum</i>	C51F	ATGGTGAACCTCGTCGTGGC	472	Nicholson et al. (1998)
	C51R	CCCTTCTTACGCCAATCTCG		
<i>F. proliferatum</i>	PRO1-F	CTTTCGCGCAAGTTTCTTC	585	Schilling et al. (1996)
	PRO1-R	TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG		

\*F: آغازگر روبه جلو، R: آغازگر معکوس.

\*F: Forward primer, R: Reverse primer.

تکثیر قطعات DNA روی ژل جدایه‌های مختلف از نظر ژنتیکی تفکیک گردیدند. نشانگر وزن مولکولی Ladder 100 bp (فرمتناز)، ردیابی باندها DNA با استفاده از رنگ آمیزی با Green viwer و سپس عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه Syngene GeneFlash مدل Gel Documentation (USA) Bio انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها اطلاعات

درصد فراوانی نمونه‌های آلوده (رابطه ۱) و درصد فراوانی گونه‌های *Fusarium* شناسایی شده (رابطه ۲) با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (Hajihassani et al., 2012; Tsedaley & Adugna, 2016):

$$(۱) \quad \text{درصد فراوانی نمونه‌های آلوده به } Fusarium = \frac{\text{تعداد نمونه‌های آلوده به } Fusarium}{\text{تعداد کل نمونه‌ها}} \times 100$$

$$(۲) \quad \text{درصد فراوانی گونه خاص } Fusarium = \frac{\text{تعداد جدایه‌های گونه خاص } Fusarium \text{ شناسایی شده}}{\text{تعداد کل جدایه‌های شناسایی شده}} \times 100$$

چرخه دمایی مورد استفاده شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۱۰ دقیقه ای در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، سپس ۴۰ چرخه در مرحله واسرشت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال (برای *F. oxysporum*: ۶۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس، برای *F. graminearum*: ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، برای *F. culmorum*: ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ درجه سلسیوس و برای *F. proliferatum*: ۵۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سلسیوس) و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس (برای *F. oxysporum*: ۱۲۰ ثانیه، برای *F. graminearum*: ۳۰ ثانیه، برای *F. culmorum*: ۳۰ ثانیه و برای *F. proliferatum*: ۳۰ ثانیه) و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C بود (Khaledi et al., 2017; Mishra et al., 2003; Nicholson et al., 1998; Schilling et al., 1996).

ارزیابی محصولات PCR

در نهایت مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد و از طریق الکتروفورز به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت عبور داده شد. بر اساس طول قطعات حاصل از

اسید گالاکترونیک را در هر دقیقه از پکتین‌های دیواره آزاد می‌کند، در نظر گرفته شد (Colowich, 1995). میزان فعالیت آنزیم سلولاز بر اساس جذب در غلظت‌های مختلف گلوکز با معرف اسید دی نیترو سالیسیلیک اندازه‌گیری شد و یک واحد از فعالیت سلولاز به‌عنوان مقدار آنزیمی که ۰/۱ میکرومول گلوکز را در هر دقیقه طی واکنش هیدرولیز تولید می‌کند، تعیین شد (Wood & Bhat, 1998). یک واحد از فعالیت زایلاناز به‌صورت مقدار آنزیمی که ۱ میکرومول زایلوز را در هر دقیقه تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس آزاد می‌کند، اندازه‌گیری شد (Bailey et al., 1992). میزان فعالیت آنزیم لیپاز بر اساس جذب در غلظت‌های مختلف پی نیتروفلن پالمیتات در ۳۷ درجه سلسیوس در ۵۰ میلی مولار بافر Tris-HCl (۷ pH) اندازه‌گیری شده و یک واحد از فعالیت لیپاز به‌عنوان مقدار آنزیمی که ۱ میکرومول پی - نیتروفلن پالمیتات را در هر دقیقه طی واکنش هیدرولیز کاتالیز تولید می‌کند، مشخص گردید (Ortega et al., 2013).

#### محاسبات آماری

آنالیز آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 23) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح  $P < 0.05$  مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 استفاده گردید.

#### نتایج و بحث

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌های گونه‌های *Fusarium* بر اساس مشاهدات ریخت‌شناختی و مولکولی در مجموع ۱۸ جدایه به دست آمده متعلق به چهار گونه قارچ *Fusarium* شناسایی شدند (جدول ۲، شکل ۲). هشت جدایه متعلق به *F.*

سنجش فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده توسط جدایه‌های گونه‌های *Fusarium* جهت استخراج آنزیم‌های پکتیناز (پلی متیل گالاکتوروناز)، سلولاز، زایلاناز و لیپاز تولیدشده توسط جدایه‌های قارچی، به ترتیب از محیط‌های کشت مایع حاوی پکتین (MacMillan & Voughin, 1964; Khairy et al., 1964)، کربوکسی متیل سلولز (Abdel-Razik, 1970)، زایلان جودوسر (Miller, 1959) و روغن زیتون (Ortega et al., 2013) استفاده شد. ویال‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای  $27 \pm 1$  درجه سلسیوس روی شیکر دوار با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. با توجه به مطالعات قبلی، فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در شرایط آزمایشگاهی در مدت ۱۰ روز پس از تلقیح مورد بررسی قرار گرفت (Ortega et al., 2013; Zhao et al., 2009; Kikot et al., 2013). سپس میزان فعالیت آنزیم‌های پکتیناز، سلولاز، زایلاناز و لیپاز ترشح‌شده توسط جدایه‌ها به ترتیب در طول موج‌های ۵۴۰، ۵۵۰، ۵۴۰ و ۴۴۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. شاهد‌های مثبت برای هر کدام از آنزیم‌های مورد بررسی شامل محیط‌های کشت و جدایه قارچ *F. FHI graminearum* می‌باشد که در پژوهش‌های قبلی میزان تولید آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی آن مورد ارزیابی قرار گرفته شده است (Khaledi et al., 2017). شاهد‌های منفی، شامل محیط‌های کشت بدون پکتین، کربوکسی متیل سلولز، زایلان جودوسر و روغن زیتون و به همراه قارچ مذکور می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ۲۴ ساعت پس از تلقیح مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت پکتیناز بر اساس میزان کاهش اسید D-گالاکترونیک اندازه‌گیری شده و تعیین مقدار اسید D-گالاکترونیک با استفاده از روش رنگ سنجی اسید دی نیترو سالیسیلیک انجام شد. واحد فعالیت آنزیمی پکتیناز، با توجه به منحنی استاندارد، تحت عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرومول

*oxysporum* پنج جدایه متعلق به *F. culmorum*، سه جدایه متعلق به *F. proliferatum* و دو جدایه متعلق به *F. graminearum* بودند (جدول ۲ و ۳).

جدول ۲- ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه‌های *Fusarium* جدا شده از مزارع زعفران  
Table 2- Morphological characters of *Fusarium* species isolated from saffron fields

نام گونه‌ها Name of the species	رنگ پرگنه در محیط کشت PDA Pigmentation on PDA	کلامیدوسپور Chlamydo-spore	اسپوردوکیوم Sporodochium	میکروکنیدیوم Microconidia	ماکروکنیدیوم Macroconidia			
					تعداد دیواره Number of septa	سلول انتهایی Apical cell	سلول پایه Basal cell	اندازه Size (µm)
<i>F. oxysporum</i>	سفید تا بنفش White to violet	دارد Presence	نارنجی کم‌رنگ Pale orange	دارد Presence	3	منحنی Curved	شکل پا با پاشنه Foot shaped to pointed	32-56×3.1-5.7
<i>F. culmorum</i>	قرمز Red	دارد Presence	نارنجی تا قهوه‌ای Orange to brown	ندارد Absence	3-5	گرد و بی‌نوک Rounded and blunt	شکل پا بدون پاشنه Notched and without a distinct foot shape	37-55×4-7
<i>F. proliferatum</i>	متغیر Variable	ندارد Absence	نارنجی کم‌رنگ Pale orange	دارد Presence	3-5	منحنی Curved	کم توسعه یافته Poorly developed	25-58×3-5
<i>F. graminearum</i>	متنوع، صورتی تا قرمز Varied, pink to red	ندارد Absence	نارنجی کم‌رنگ Pale orange	ندارد Absence	5-7	مخروطی Tapered	شکل پا Foot shape	24-72×4-7

#### گونه *F. culmorum*

تشخیص این گونه نیز بر اساس ویژگی‌های کلیدی ذکر شده توسط سایر محققان انجام گرفت (Leslie & Summerell, 2006). طبق بررسی‌های مورفولوژیکی ۵ جدایه *F. culmorum* از ریشه و بنه زعفران جداسازی و شناسایی شده بودند که با استفاده از آغازگرهای C51F/ C51R به روش مولکولی تأیید شد (شکل ۲). این گونه برای اولین بار در ایران از بنه زعفران گزارش شده است.

#### گونه *F. proliferatum*

نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل مولکولی با استفاده از آغازگرهای PRO1-F/PRO1-R نشان داد که ۳ جدایه جداسازی و شناسایی شده به روش مورفولوژیکی از بنه زعفران به عنوان *F. proliferatum* مورد تأیید است (شکل ۲). این گونه برای اولین بار در ایران از ریشه زعفران گزارش شده است.

#### گونه‌های *F. culmorum*، *F. proliferatum* و *F. graminearum*

برای اولین بار به عنوان قارچ‌های همراه ریشه و بنه زعفران از مزارع استان خراسان جنوبی در ایران جداسازی و گزارش می‌شوند.

#### گونه *F. oxysporum*

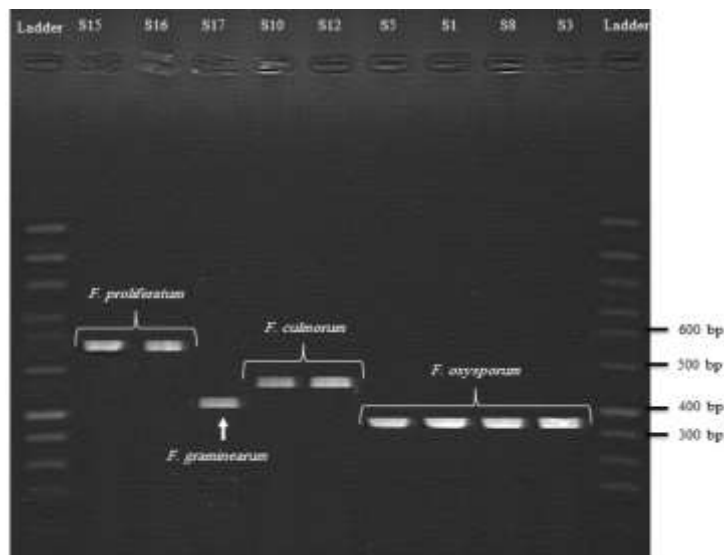
مشخصات این گونه منطبق بر مشخصات ذکر شده توسط سایر محققان بود (Leslie & Summerell, 2006). نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل مولکولی با استفاده از آغازگرهای FOF1/ FOR1 نشان داد که ۸ جدایه جداسازی و شناسایی شده به روش مورفولوژیکی از ریشه و بنه زعفران به عنوان *F. oxysporum* مورد تأیید است. قارچ *F. oxysporum* به عنوان عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران وحشی در استان ایلام گزارش شده است (Najari et al., 2018).



*culmorum* از مزارع قائن و خضری دشت بیاض شهرستان قائن، گونه *F. proliferatum* از مزارع قائن، خضری دشت بیاض و نیمبلوک شهرستان قائن و گونه *F. graminearum* از مزارع قائن و سده شهرستان قائن مشاهده شد.

در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع نمونه برداری شده زعفران استان خراسان جنوبی از ۱۸ جدایه قارچ *Fusarium* جداسازی و شناسایی شده، فراوانی گونه‌های *F. oxysporum*، *F. culmorum*، *F. proliferatum* و *F. graminearum* شناسایی شده در مزارع نمونه برداری شهرستان قائن به ترتیب به ۳۳/۳ درصد، ۳۳/۳ درصد، ۲۰ درصد و ۱۳/۳ درصد می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که گونه *F. oxysporum* شایع‌ترین گونه شناسایی شده در بین جدایه‌های فوزاریوم جداسازی و شناسایی شده از مزارع زعفران نمونه برداری شده در استان خراسان جنوبی است.

طبق بررسی‌های مورفولوژیکی ۲ جدایه *F. graminearum* از ریشه و بنه زعفران جداسازی و شناسایی شده بودند که با استفاده از آغازگرهای Fg16F/ Fg16R به روش مولکولی تأیید شد (شکل ۲). این گونه برای اولین بار در ایران از ریشه و بنه زعفران گزارش شده است. نتایج حاصل از درصد فراوانی نمونه‌های آلوده به قارچ *Fusarium* نشان داد که درصد فراوانی نمونه‌های آلوده به قارچ *Fusarium* به میزان ۲۲/۶ درصد کل نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع زعفران استان خراسان جنوبی می‌باشد. همچنین درصد فراوانی نمونه‌های آلوده به هر یک از گونه‌های *F. culmorum*، *F. oxysporum*، *F. graminearum* و *proliferatum* به ترتیب ۹/۴ درصد، ۵/۷ درصد، ۳/۸ درصد و ۳/۸ درصد می‌باشد. گونه *F. oxysporum* بجز مزارع فنود و اصغول از شهرستان سربیشه در تمامی مزارع نمونه برداری شده مشاهده شد. گونه *F.*



شکل ۲- شناسایی مولکولی جدایه‌های گونه‌های *Fusarium*

باند‌ها به ترتیب S3، S8، S1 و S5 متعلق به *F. oxysporum* با آغازگر FOF1/FOR1؛ S12 و S10 متعلق به *F. culmorum* با آغازگر C51F/C51R؛ S17 متعلق به *F. graminearum* با آغازگر Fg16R/Fg16F؛ S16 و S15 متعلق به *F. proliferatum* با آغازگر PRO1-F/PRO1-R؛ Ladder (100bp فرمنتاز).

Figure 2- Molecular identification of isolates of *Fusarium* species.

Lanes S3, S8, S1 and S5 respectively belongs to *F. oxysporum* amplified with FOF1/FOR1 primers; S12 and S10 belongs to *F. culmorum* amplified with C51F/C51R primers; S17 belong to *F. graminearum* amplified with Fg16R/Fg16F primers; S16 and S15 belongs to *F. proliferatum* amplified with PRO1-F/PRO1-R primers, Ladder (100bp Fermentas).

جدول ۳- تعداد نمونه های آلوده و جداییه های گونه های *Fusarium* شناسایی شده به تفکیک مناطق جغرافیایی نمونه برداری شده از مزارع زعفران در شهرستان های استان خراسان جنوبی

مناطق نمونه برداری (شهرستان ها)	محل نمونه برداری (Sample site)	تعداد نمونه ها (Number of samples)	تعداد نمونه های آلوده به <i>Fusarium</i> (number of samples infected with <i>Fusarium</i> )	تعداد کل جداییه های <i>Fusarium</i> شناسایی شده (Total number of <i>Fusarium</i> isolates identified)	تعداد نمونه های آلوده به گونه های <i>Fusarium</i> شناسایی شده (Number of <i>Fusarium</i> species identified)									
					<i>F. oxysporum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. oxysporum culmorum</i>	<i>F. oxysporum graminearum</i>	<i>F. proliferatum culmorum</i>	<i>F. proliferatum graminearum</i>	<i>F. culmorum proliferatum</i>	<i>F. graminearum</i>
قائن (Ghayen)	قائن (Ghayen)	7	5	8	2	1	1	1	1	3	1	1	1	1
	خضری دشتیاباز (Khezri Dashedbayaz)	7	3	4	1	2	0	0	0	1	2	1	0	0
	نیمبوک (Nimbook)	7	1	2	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
	سده (Sadéh)	7	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
درمیان (Darziyan)	خونیک (Khunik)	7	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	فونود (Fanoud)	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
سربیشه (Sarbishéh)	اصول (Osgul)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	سلفی (Salfi)	7	1	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0
مجموع (Total)		53	12	18	5	3	2	2	2	8	5	3	3	2

*F. proliferatum* و *culmorum* اغلب قادر به تولید آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی هستند (Ma et al., 2013). تجزیه و تحلیل آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی نشان داد که تمامی جدایه‌های قارچ *Fusarium* قادر به تولید آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی بودند. با توجه به نتایج به دست آمده، برای بسیاری از جدایه‌های مورد بررسی حداکثر سطح فعالیت سلولاز، زایلاناز، پکتیناز و لیپاز به ترتیب در ۷۲، ۹۶، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت پس از کشت در محیط مایع، مشاهده شد. پس از آن، با گذشت زمان فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافت (شکل ۳). در زمانی که بیشتر جدایه‌ها حداکثر سطح فعالیت آنزیمی را نشان می‌دهند، سطح فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در میان جدایه‌ها برای سلولاز از ۶۱۵ تا ۹۵۳  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ، زایلاناز از ۷۳۵ تا ۱۳۵۵  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ، پکتیناز از ۲۱۲۹ تا ۴۳۱۰  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  و لیپاز از ۶ تا ۲۲  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  مشاهده شد. در طول ۱۰ روز میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده بررسی شد و میزان تولید به حداکثر فعالیت هر آنزیم برای جدایه‌های قارچ *Fusarium* متفاوت بود (شکل ۳).

بیشترین فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در شرایط آزمایشگاهی در میان تمام جدایه‌ها مربوط به جدایه *F. S1 oxysporum* بود که بیشترین فعالیت سلولاز، زایلاناز، پکتیناز و لیپاز به ترتیب به میزان ۹۵۳±۶/۳، ۱۳۵۵±۹/۹، ۲۲±۰/۲ و ۴۳۱۰±۱۱/۵  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  مشاهده شد. همچنین کمترین فعالیت سلولاز، زایلاناز، پکتیناز و لیپاز مربوط به جدایه *F. graminearum* S18 بود (جدول ۴).

سلولاز اولین آنزیمی بود که در زمان کوتاه‌تری فعالیت آن به اوج می‌رسید، درحالی که پس از آن به ترتیب فعالیت حداکثر آنزیم‌های زایلاناز، پکتیناز و لیپاز با تأخیر بیشتر و در مقدار کمتری مشاهده شد. نتایج ما با مشاهدات محققان دیگر مطابقت دارد (Ortega et al., 2013). آن‌ها گزارش کردند که فعالیت

این نتایج با گزارش دیگر محققان در مورد فراوانی بالای گونه *Fusarium sp.* در مزارع زعفران منطقه کشمیر هند مطابقت دارد (Hassan & Devi, 2003). همچنین، عامل پوسیدگی کورم زعفران در اسپانیا گونه *Fusarium oxysporum f. sp. gladioli* می‌باشد (Di Primo & Cappelli, 2000). عامل پوسیدگی کورم زعفران در کشمیر هند گونه‌های *F. moniliforme*، *F. oxysporum* و *F. solani* می‌باشد (Wani & Dar, 2004). نتایج شناسایی مولکولی، شناسایی مورفولوژیکی را تأیید می‌کند. لازم به ذکر است علایم بیماری ناشی از گونه‌های *Fusarium* بر روی ریشه و بنه‌ها به صورت بسیار سطحی و خفیف مشاهده شد. نتایج حاصل از شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی نشان داد که در میان گونه‌های شناسایی شده در این مطالعه که به تفکیک با توجه به محل جمع آوری در جدول ۳ مشخص شده‌اند، گونه *F. oxysporum* در تمام مزارع زعفران نمونه-برداری شده به جز شهرستان سریشه مشاهده شد. در میان مناطق نمونه‌برداری شده، مزارع قائن از شهرستان قائن بالاترین فراوانی را از نظر تعداد جدایه‌های قارچ *Fusarium* جداسازی شده نشان دادند. در میان جدایه‌ها، گونه‌های *F. proliferatum.culmorum*، *F. oxysporum* و *F. graminearum* در مزارع زیر کشت زعفران در مزارع قائن شهرستان قائن مشاهده شد (جدول ۳).

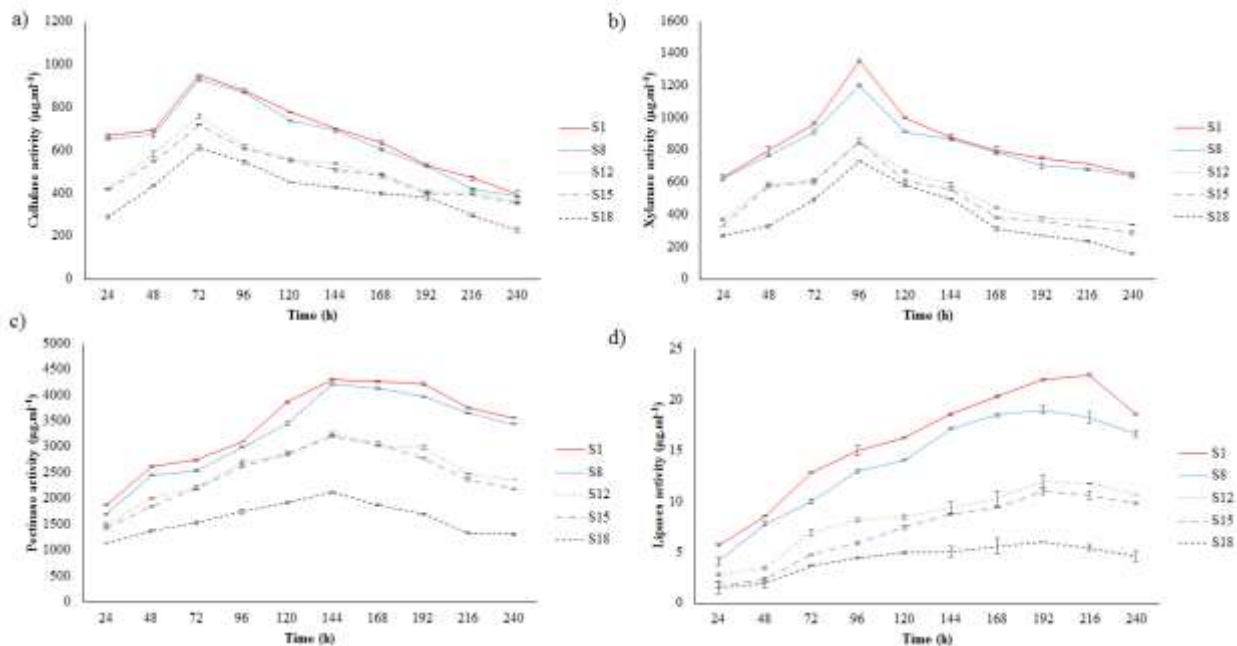
### ارزیابی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده توسط جدایه‌های *Fusarium*

قدرت تهاجم و بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Fusarium* در ارتباط با مکانیسم‌های مختلف دخیل در بیماری‌زایی از جمله تولید آنزیم‌های خارج سلولی و مایکوتوکسین هاست (Ortega et al., 2013). قارچ‌های *F. graminearum*،

### نتیجه گیری

زعفران از مهم‌ترین گیاهان دارویی صادراتی ایران است و با توجه به نقش و جایگاه آن در وضعیت اقتصادی و اجتماعی مردم به‌ویژه استان خراسان جنوبی و رقابت این محصول در بازارهای جهانی، بررسی عوامل بیماریزای آن در مناطق عمده‌ی زعفران کاری ضروری به نظر می‌رسد. بالا بودن درصد رطوبت همراه با دماهای بالا شرایط مناسبی را برای توسعه و گسترش سریع قارچ‌هایی که موجب پوسیدگی بنه و ریشه زعفران می‌شوند را فراهم می‌کند.

لیپاز با تأخیر بیشتری نسبت به سایر آنزیم‌ها به میزان حداکثر می‌رسد. آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز برای قارچ‌های بیماریزای گیاهی که ساختارهای نفوذ تخصصی ندارند اهمیت بیشتری دارند (Gibson et al., 2011). مقایسه فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و بیماری‌زایی جدایه‌ها نشان داد که لیپاز و پکتیناز اثر کمتری بر بیماری‌زایی جدایه‌ها در مقایسه با سلولاز و زایلاناز دارند (نتایج ارائه نشده است). نتایج ما با مشاهدات محققان دیگر مطابقت دارند که گزارش کردند سلولاز و زایلاناز در مقایسه با سایر آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در بیماری‌زایی جدایه‌ها اهمیت بیشتری دارند (Phalip et al., 2005).



شکل ۳. فعالیت‌های آنزیم مخرب دیواره سلولی ترشح شده توسط برخی جدایه‌های گونه‌های *Fusarium*، فعالیت سلولاز (a)، فعالیت زایلاناز (b)، فعالیت پکتیناز (c) و فعالیت لیپاز (d). میانگین داده‌ها  $\pm$  خطای استاندارد ارائه شده‌اند، آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد. جدایه‌های S1 و S8 متعلق به *F. oxysporum*; S12 متعلق به *F. culmorum*; S15 متعلق به *F. proliferatum*; S18 متعلق به *F. graminearum*.

S1; ——— S8; - - - S12; - - - S15; - - - S18

Figure 3- Analysis of activities of cell wall degrading enzymes produced by some isolates of *Fusarium* species cellulase activity (a), xylanase activity (b), pectinase activity (c) and lipase activity (d). Data are means  $\pm$  standard error. The experiment was repeated two times with similar results. Isolates S1 and S8 belongs to *F. oxysporum*; S12 belong to *F. culmorum*; S15 belong to *F. proliferatum*; S18 belong to *F. graminearum*.

S1; ——— S8; - - - S12; - - - S15;  
- - - S18

جدول ۴- مشخصات گونه‌های *Fusarium* جداسازی شده بر اساس محل نمونه‌برداری و حداکثر فعالیت آنزیمی خارج سلولی ترشح شده توسط جدایه‌ها

Table 4 - Characteristics of *Fusarium* species isolated based on sampling areas and maximum of extracellular enzymes activity of secreted by isolates

گونه‌های فوزاریوم <i>Fusarium</i> species	کد جدایه Isolate code	محل نمونه‌برداری Sample site	حداکثر فعالیت آنزیمی Maximum of enzyme activity ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )			
			سلولاز Cellulase 72 hpc	زایلاناز Xylanase 96 hpc	پکتیناز Pectinase 144 hpc	لیپاز Lipases 192 hpc
<i>F. oxysporum</i>	S1	قائن Qaen	953±6.3 a	1355±9.9 a	4310±11.5 a	22±0.2 a
	S2	بیرجند Birjand	650±8.5 i	815±11.3 g	2454±3.8 j	7±0.1 j
	S3	درمیان Darmian	652±9.2 i	813±12.1 g	2769±5.2 i	8±0.3 i
	S4	قائن Qaen	765±9.8 f	981±12.6 e	3452±23.4 f	12±0.2 f
	S5	قائن Qaen	692±3.1 h	853±9.5 f	3052±14.3 h	9±0.6 h
	S6	بیرجند Birjand	865±13.2 c	1104±11.5 c	4112±8.8 c	16±0.2 c
	S7	قائن Qaen	720±5.1 g	986±9.9 e	3208±6.5 g	11±0.3 g
	S8	قائن Qaen	935±11.2 b	1204±8.3 b	4222±12.1 b	19±0.4 b
<i>F. culmorum</i>	S9	بیرجند Birjand	800±8.3 e	985±21.5 e	3766±15.6 e	13±0.6 e
	S10	قائن Qaen	696±4.1 h	851±5.9 f	3056±13.1 h	9±0.2 h
	S11	قائن Qaen	695±5.3 h	857±8.6 f	3059±8.9 h	9±0.1 h
	S12	قائن Qaen	763±8.6 f	859±11.1 f	3259±9.3 f	12±0.3 f
	S13	قائن Qaen	859±12.1 c	1105±8.2 c	4121±7.8 c	16±0.2 c
<i>F. proliferatum</i>	S14	قائن Qaen	719±9.9 g	980±11.5 e	3211±8.2 g	8±0.5 g
	S15	قائن Qaen	722±12.1 g	852±6.9 f	3205±11.5 g	11±0.2 g
	S16	قائن Qaen	823±9.4 d	1024±14.1 d	3895±12.6 d	14±0.1 d
<i>F. graminearum</i>	S17	قائن Qaen	649±11.3 i	809±9.8 g	2759±14.2 i	8±0.1 i
	S18	قائن Qaen	615±9.6 j	735±6.5 h	2129±13.2 k	6±0.3 k

میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد، hpc: ساعت پس از کشت در محیط مایع، اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با استفاده از نرم افزار SPSS با توجه به آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت‌های معنی‌دار داشتند. آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد.

Average ± standard error, hpc: hour post culturing, Different letters indicate significant differences according to Duncan analysis using SPSS software (P = 0.05), experiment was repeated two times with similar results.

شناسایی گونه‌های *Fusarium* همراه با ریشه و بنه زعفران و اتخاذ استراتژی‌های مدیریتی مؤثر برای کاهش اثرات مخرب و تعیین میزان بیماری‌زایی و اهمیت آن‌ها می‌تواند جهت انتخاب این بیمارگرها بر روی عملکرد محصول مفید باشد. در طی بازدید

آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی مورد بررسی دارند. انجام مطالعات دقیق برای شناسایی گونه‌های *Fusarium* مناطق آلوده و شناسایی کانون‌های آلودگی برای جلوگیری از انتشار قارچ به دیگر مناطق زعفران کاری امری بسیار ضروری است. همچنین با رعایت موازین بهداشتی، بازدیدهای مزرعه‌ای در تمامی مراحل رشد گیاه، اقدامات قرنطینه‌ای، حذف و سوزاندن گیاهان آلوده، انتخاب زمین سالم، اجتناب از آبیاری بیش از حد و همچنین استفاده بیش از حد از کودهای ازته، ضدعفونی بنه قبل از کشت با سموم شیمیایی از جمله بنومیل یا محلول های حاوی مس باعث جلوگیری از انتشار آلودگی و کاهش پتانسیل ایجاد بیماری توسط قارچ *Fusarium* و افزایش عملکرد زعفران شود.

از برخی مزارع زعفران در استان خراسان جنوبی، در مجموع ۱۸ جدایه قارچ *Fusarium* جداسازی و براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و بررسی‌های مولکولی شناسایی شدند که متعلق به گونه‌های *F. graminearum*، *F. oxysporum*، *F. culmorum* و *F. proliferatum* بودند. گونه‌های *F. graminearum*، *F. culmorum* و *F. proliferatum* برای اولین بار از مزارع زعفران در استان خراسان جنوبی گزارش شدند. با توجه به اهمیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در بیماری‌زایی قارچ *Fusarium* و سطوح فعالیت آنزیم‌های سلولز و زایلاناز که در زمان کوتاه‌تری به حداکثر میزان فعالیتشان می‌رسند، این آنزیم‌ها اهمیت بیشتری در میان

## منابع

- Abdel-Razik, A.A. 1970. The parasitism of white *Sclerotium cepivorum* berk. the incitant of white rot of onion. PhD thesis, Agriculture Faculty, Assiut University, Assiut, Egypt.
- Ahmad, M., and Sagar, V. 2007. Integrated management of corm/tuber rot of saffron and Kalazeera. Horticulture Mini Mission-1, Indian Council for Agricultural Research (ICAR), India, 22 p.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Castillo-López, R., Traperro-Mozos, A., and Gómez-Gómez, L. 2010. *Crocus sativus* pathogens and defence responses. Functional Plant Science and Biotechnology. Global Science Book Isleworth, UK, pp. 81-90.
- Asoufi, H., Hameed, K.M., and Mahasneh, A. 2007. The cellulase and pectinase activities associated with the virulence of indigenous *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in Jordan Valley. The Plant Pathology Journal 23: 233-238.
- Bailey, M.J., Biely, P., and Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. Journal of Biotechnology 23: 257-270.
- Booth, C. 1977. *Fusarium* Laboratory Guide to Identification of Major Species. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 55 p.
- Colowich, S.P. 1995. Methods in Enzymology. London, Academic Press INC.
- Dhar, A.K. 1992. Bio-ecology and control of corm rot of saffron (*Crocus sativus* L.). MSc thesis, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology of Kashmir, India, 109 p.
- Di Primo, P., and Cappelli, C. 2000. Preliminary study on vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* isolates obtained from saffron in Italy. Informatore Fitopatologico 50: 35-38. (In Italian).
- Ebadzadeh, H.R., Ahmadi, K., Mohammadnia Afrouzi, S., Abbas Taghani, R., Abbasi Islami, M., and Yari, S. 2017. Agricultural Statistics of 2016: Economic and Planning Adjutancy, Information and Communication Technology Center. Iran's Ministry of Agriculture Press. 401 p. (In Persian).
- 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: 151-153.
- Gibson, D.M., King, B.C., Hayes, M.L., and Bergstrom, G.C. 2011. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. Current Opinion in Microbiology 14

- (3): 264-270.
- Hajihassani, A., Hajihassani, M., and Khaghani, S. 2012. Incidence and distribution of seed-borne fungi associated with wheat in Markazi province, Iran. *African Journal of Biotechnology* 11 (23): 6290-6295.
- Hassan, M., and Devi, L.S. 2003. Corm rot diseases of saffron in Kashmir valley. *Indian Phytopathology* 56: 122.
- Hossainnia, A., and Mohammadi, A. 2018. Investigation of *Alternaria alternata* pathogenicity on corm and leaves of saffron in vitro and greenhouse conditions. *Saffron Agronomy and Technology* 6: 61-72. (In Persian with English Summary).
- Husaini, A.M., Hassan, B., and Ghani, M.Y. 2010. Saffron (*Crocus sativus* L. Kashmirianus) cultivation in Kashmir: practices and problems. *Functional Plant Sciences Biotechnology* 4: 108-115.
- Kalha, C.S., Gupta, V., and Gupta, D. 2007. First report of sclerotial rot of saffron caused by *Sclerotium rolfsii* in India. *Plant Disease* 91: 1203-1206
- Khairy, E.M., Sammour, H.M., Ragheb, A., Ghandour, M.F., and Aziz, K. 1964. *A Laboratory Manual of Practical Chemistry*. Cairo, Egypt: Dar El-Nahda El-Arabia, pp.1-142.
- Khaledi, N., Taheri, P., and Falahati-Rastegar, M. 2017. Identification, virulence factors characterization and analysis virulence together with aggressiveness of *Fusarium* spp., causing wheat head blight in Iran. *European Journal of Plant Pathology* 147: 897-918.
- Khaledi, N., Taheri, P., and Tarighi, S. 2015. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 118: 704-717.
- Kikot, G.E., Hours, R.A., and Alconada, T.M. 2009. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *Journal of Basic Microbiology* 49: 231-241.
- Klotz, L.V., Nelson, P.E., and Toussoun, T.A. 1988. A medium for enhancement of chlamyospore formation in *Fusarium* species. *Mycologia* 80: 108-109.
- Koocheki, A., and Seyedi, S.M. 2015. Phonological stages and formation of replacement corms of saffron (*Crocus sativus* L.) during growing period. *Journal of Saffron Research* 3: 134-154. (In Persian with English Summary).
- Koocheki, A., Siahmarguee, A., Aziz, G., Jahan, M., Alimiradi, L., 2009. The effect of plant density and depth on agronomic characteristic of saffron. 3rd International Symposium on Saffron. Forth coming Challenges in Cultivation, Research and Economics, 20-23 May 2009. Korokos, Kozani, Greece.
- Leslie, J.F., and Summerell, A.B. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Ames: Blackwell Publishing Professional. 388 p.
- Ma, L.J., Geiser, D.M., Proctor, R.H., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D.M., Manners, J.M., and Kazan, K. 2013. Fusarium pathogenomics. *Annual Review of Microbiology* 67: 399-416.
- MacMillan, J.D., and Voughin, R.H. 1964. Purification and properties of a polyglacturonic acid- transeliminase produced by *Clastridium multiformentans*. *Biochemistry* 3: 564-572.
- Martinez-Soto, D., Robledo-Briones, A.M., Estrada-Luna, A.A., and Ruiz-Herrera, J. 2013. Transcriptomic analysis of *Ustilago maydis* infecting Arabidopsis reveals important aspects of the fungus pathogenic mechanisms. *Plant Signaling and Behavior* 8: 25-59.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Mishra, P.K., Fox, R.T.V., and Culham, A. 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 218: 329-332.
- Najari, G., Nourollahi, K., and Piri, M. 2018. The first report of (*Fusarium oxysporum*) causal agent of wild saffron corm rot disease in Iran. *Saffron Agronomy and Technology* 6: 119-123. (In Persian with English Summary).
- Nash, S.M., and Snyder, W.C. 1962. Quantitative and estimations by plat counts of propagules of the bean rot Fusarium in field soils. *Phytopathology* 73: 458-462.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium Species, An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 p.

- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W., and Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 53 (1): 17-37.
- Nirenberg, H. 1976. Unterstructure uber die morphologische und biologische differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fur Landund Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem* 169: 11-17.
- Omidi, H., Naghdibadi, H.A., Golzad, A., Torabi, H., and Fotoukian, M.H. 2009. The effect of chemical and biofertilizer source of nitrogen on qualitative and quantitative yield of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants* 8: 98-109. (In Persian with English Summary).
- Ortega, L.M., Kikot, G.E., Astoreca, A.L., and Alconada, T.M. 2013. Screening of *Fusarium graminearum* isolates for enzymes extracellular and deoxynivalenol production. *Journal of Mycology* 358140: 1-7.
- Phalip, V., Delande, F., Carapito, Ch., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E., Dupree, P., Van Dorsselaer, A., and Jetsch, J.M., 2005. Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Current Genetics* 48: 366-379.
- Rezvani Moghaddam, P., Khorramdel, S., Amin Ghafari, A., and Shabahang, J. 2013. Evaluation of growth and yield of saffron (*Crocus sativus* L.) affected by spent mushroom compost and corm density. *Saffron Agronomy and Technology* 1: 13-26. (In Persian with English Summary).
- Saeedizadeh, A. 2014. Identification of some saffron corm rot fungi and their control. *Saffron Agronomy and Technology* 3: 205-213. (In Persian with English Summary).
- Schilling, A.G., Moller, E.M., and Geiger, H.H. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *F. culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. *Phytopathology* 86: 515-522.
- Steinkellner, S., Mammerler, R., and Vierheilig, H. 2008. Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *European Journal Plant Pathology* 122: 395-401.
- Thakur, R.N., Singh, C., and Kaul, B.L. 1992. First report of corm rot in *Crocus sativus* L. *Indian Phytopathology* 45: 278-282.
- Trane, U. 1990. Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. *Journal of Microbiological Methods* 12: 23-39.
- Tsedaley, B., and Adugna, G. 2016. Detection of fungi infecting maize (*Zea mays* L.) seeds in different storages around jimma, southwestern Ethiopia. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 7: 338.
- Vakalounakis, D.J. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Journal of Plant Disease* 81: 313-316.
- Voigt, C.A., Schäfer, W., and Salomon, S. 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal* 42: 364-375.
- Wani, A. 2004. Studies on corm rot of saffron (*Crocus sativus* L.). PhD thesis, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology of Kashmir, India, 108 p.
- Wani, M.A.S., and Dar, G. 2004. Studies on Corm Rot of Saffron (*Crocus sativus* L.). University of Kashmir.
- Withanage, G.S., Murata, H., Koyama, T., and Ishiwata, I. 2001. Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines. *Veterinary and Human Toxicology* 43: 6-10.
- Wood, T.M., and Bhat, M. 1998. Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology* 160: 87-112.
- Yilmaz, A., Nyberg, N.T., Mølgaard, P., Asili, J., and Jaroszewski, J.W. 2010. 1H NMR metabolic fingerprinting of saffron extracts. *Metabolomics* 6: 511-517.
- Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., and Xu, J.R. 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* 14: 274.



## Evaluation of cell wall degrading enzymes of *Fusarium* species associated with root and corm of saffron in South Khorasan province

Nima Khaledi<sup>1\*</sup>

Submitted: 3 May 2019

Accepted: 21 January 2020

Khaledi, N. 2020. Evaluation of cell wall degrading enzymes of *Fusarium* species associated with root and corm of saffron in South Khorasan province. *Saffron Agronomy & Technology*, 8(2): 243-259.

### Abstract

The aim of this study is to identify *Fusarium* species associated with root and corm of saffron and evaluate extracellular enzyme activity secreted by them. In order to study the species of *Fusarium*, a total of 53 root and corm samples were randomly collected from saffron fields of the South Khorasan province during 2017 growing season. After washing the samples with sterile water and disinfected the surface with 1% sodium hypochlorite, small pieces of root and corm were cultured on general and specific culture media. Purification of fungal colonies was performed using single spore and hyphal tip methods on 2% water agar medium. Identification of fungi based on the microscopic and morphological characteristics was performed with valid identification keys. The *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. proliferatum* species were identified based on morphological characters. The results obtained from molecular analysis using species-specific primers confirm morphological identification. The results reveal that 22.6% of saffron samples are contaminated by *Fusarium* species. *F. oxysporum* is the predominant species with the highest isolation frequency in samples of 9.4% followed by *F. culmorum* (5.7%), *F. proliferatum* (3.8%) and *F. graminearum* (3.8%) based on morphological and molecular observations,

**Keywords:** Cellulase, Identification, Molecular, Morphological, Xylanase.

---

1- Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(\*- Corresponding author. Email: khnm13@gmail.com)

DOI: 10.22048/jsat.2020.184121.1349